

A Rad5 fehérje szerepe a blokkolt replikációs villa menekítésében

Doktori értekezés

Írta: Blastyák András

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

Szegedi Tudományegyetem

Biológus Doktori Iskola

Készült a

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetika Intézetében

Szeged

2008.

Tartalomjegyzék

ELŐSZÓ	4
ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS	6
DNS HIBÁK ÉS HIBAJAVÍTÓ MECHANIZMUSOK	6
A DNS KÁROSODÁSOK TOLERANCIÁJÁNAK MECHANIZMUSAI	9
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
A MESELSON-STAHN KÍSÉRLET	12
A KÁROSODOTT DNS REPLIKÁCIÓJA	13
A REPLIKÁCIÓS VILLA MEGFORDULÁSA	16
A DNS HELIKÁZOK	18
A POSZT-REPLIKÁCIÓS REPARÁCIÓ GENETIKÁJA	21
A REPLIKÁCIÓS VILLA ÉS A RAD6/18 ÚT BIOKÉMIÁJA	22
A RAD5 ÉS A REPLIKÁCIÓS VILLA MEGFORDÍTÁSA	26
ÖSSZEFOGLALÁS	28
CÉLKITŰZÉSEK.....	29
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
OLIGONUKLEOTID ALAPÚ REPLIKÁCIÓS VILLA, ÉS EGYÉB MODELL SZUBSZTRÁTOK	30
PLAZMID MÉRETŰ REPLIKÁCIÓS VILLA MODELL SZUBSZTRÁT	31
A KÉTSZÁLÚ DNS TRANSZLOKÁCIÓ SZUBSZTRÁTJAINAK ELŐÁLLÍTÁSA	32
A RAD5 TISZTÍTÁSA	33
A RAD5 DNS KÖTÉSÉNEK ÉS ENZIMATIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA OLIGONUKLEOTID ALAPÚ REPLIKÁCIÓS VILLA, ÉS EGYÉB MODELL SZUBSZTRÁTOKON	35
A RAD5 ENZIMATIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA PLAZMID MÉRETŰ REPLIKÁCIÓS VILLA MODELL SZUBSZTRÁTON	35
A RAD5 KÉTSZÁLÚ DNS TRANSZLOKÁZ AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATÁRA (TRIPLE HELIX DISPLACEMENT ASSAY)	36
EREDMÉNYEK.....	37
ELMÉLETI MEGFONTOLÁSOK	37
A RAD5 AKTIVITÁSA OLIGONUKLEOTID ALAPÚ REPLIKÁCIÓS VILLA MODELL SZUBSZTRÁTOKON	38
A RAD5 AKTIVITÁSA A „CSIRKELÁB” SZERKEZET MODELLJÉN	44
A RAD5 AKTIVITÁSA PLAZMID MÉRETŰ REPLIKÁCIÓS VILLA MODELL SZUBSZTRÁTON	45
A RAD5 DNS KÖTÉSÉNEK VIZSGÁLATA	49
A RAD5 KÉTSZÁLÚ DNS TRANSZLOKÁZ AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	50
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	55
A RAD5 MŰKÖDÉSÉNEK MODELLJE	55

A RAD5 ÉS A KLASSZIKUS HELIKÁZOK VISZONYA	59
A BLOKKOLT REPLIKÁCIÓS VILLA PROCESSZÁLÁSÁNAK KÖVETKEZMÉNYEI	61
AMIRE A MODELL NEM ADHAT VÁLASZT	64
ÖSSZEFOGLALÁS	68
THESIS OF PH. D	69
INTRODUCTION AND AIMS	69
RESULTS AND DISCUSSION	72
FELHASZNÁLT IRODALOM	74
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	90
FÜGGELÉK	91

Előszó

Tisztelt Olvasó!

A biológiában az eredmények közlése világszerte az angol nyelv használatán alapszik. Ez annyira így van, hogy akár olyan szakterületek esetén is, melyeket több magyarországi kutatóműhelyben is sikerrel művelnek, napjainkig nem alakult ki az egyes szakkifejezések pontos magyar megfelelője. Ez egy magyar nyelvű értekezés esetén a dolgozat szerzőjének jelentős problémát okoz. Az egyes szakkifejezések magyarra átültetésére anyanyelvünk számos lehetőséget kínál, de ez a szabadság könnyen azzal a következménnyel járhat, hogy előbb-utóbb ugyanarra a jelenségre, kísérleti rendszerre mindahány magyar nyelven íródott dolgozat szerzője kitalálja majd a saját fordítását. Az erőszakkal magyarított kifejezések tömegének használata a dolgok pontos és egységes megnevezése helyett bizonyosan csak letörheti azt az érdeklődést, amelyre a munkánk a kutató kollégák, és általában a tudomány iránt érdeklődő szélesebb közönség részéről számot tarthat. Jelen értekezés szerzőjeként nem kívánok a magyar tudományos nevezéktan újítoja lenni, habár a dolgozatban próbáltam arra törekedni, hogy magyar kifejezésekkel helyettesítsem az angolt, amennyiben ezt lehetségesnek gondoltam. A legtöbb olyan esetben, ahol ezt akár kissé is erőltetettnek tartottam, ott zárójelben és dőlt betűvel szedve adom meg a kifejezés angol megfelelőjét. Az érdeklődő olvasót ez remélhetőleg csak segíteni fogja a szakirodalom önálló feldolgozásában. Hasonlóan jártam el néhány olyan esetben is, ahol bizonyos vegyületek rövidítéssel képzett neve nem volt kellően informatív a kémiai szerkezetre, ezekben az esetekben megadtam a pontos kémiai elnevezést is. Néhány kifejezés már az angolban is kevésbé tűnik precíznek és tudományosnak, mint amennyire képszerű és jól használható magyarázatként. Ilyen a replikációs villa megfordulása után létrejövő szerkezet "csirkelábként" történő leírása (*chicken-foot structure*). Ez a hasonlat annyira szellemes, hogy megtartottam, de következetesen idézőjelben használom, jelezve, hogy nem a baromfi tájanatómia szakkifejezéseként szerepel a dolgozatban.

Vannak a biológiának olyan eredményei, amelyek olyan hatással voltak a biológia egészére, hogy a biológiával kapcsolatos általános műveltségünk alapját képezik; ilyen a DNS szerkezetével kapcsolatos tudásunk, az ubikvitin rendszer működése és még sok más. Éppen ezért próbáltam a

DNS replikációval és reparációval kapcsolatos ismereteinket olyan módon tárgyalni, hogy a dolgozat csak a megértéséhez általam szükségesnek és elégségesnek tartott információkat tartalmazza, de ne váljon a teljes szakirodalom nagyterjedelmű, és jelen keretek között teljesen indokolatlan mélységű áttekintésévé. Ugyancsak próbáltam a módszerekkel kapcsolatban mindazon információkat közölni, amelyeket szükségesnek tartok ahhoz, hogy a leírt kísérleteket könnyen reprodukálni lehessen, de nem tartalmazza a dolgozat az általános módszerek leírását; a klónozás és radioaktív végjelölés részletes leírására bizonyosan nem ez a értekezés a megfelelő fórum. Őszintén hiszem, hogy ezzel csak könnyebbé válhat a dolgozat mondanivalójának követése és befogadása.

Barátsággal

A Szerző

"Whatever can go wrong will go wrong, and at the worst possible time, in the worst possible way" (Murphy's law)

Általános bevezetés

DNS hibák és hibajavító mechanizmusok

Valamennyi makromolekula, beleértve valamennyi élőlény örökítőanyagát folyamatosan olyan celluláris és környezeti hatásoknak van kitéve amelyek megváltoztatják annak kémiai szerkezetét. Az örökítő anyag a "tervrajza" a sejtek működésének, bármilyen, kémiailag akár aprónak tűnő megváltozása is alapvetően érintheti a sejt működésének egészét. Ebből következően, míg bármely károsodott makromolekula eldobható és lecserélhető, a DNS bizonyosan nem, márcsak azért sem, mert jellemzően kevés példányban áll rendelkezésre. Szinte bizonyos, hogy ha a DNS elromlik, az a létező legrosszabb módon romlik el.

Valóban, a DNS károsodások javításának szükségességét kellően alátámasztja az a tény, hogy a hibajavító mechanizmusok legalább a folyamat mechanisztikus részleteit és főbb vonalait illetően konzerváltak, azaz, a DNS reparáció hasonló elvek mentén szerveződik prokariótákban és eukariótákban egyaránt. Ha figyelembe vesszük a szerves vegyületek és lehetséges reakcióik számát könnyen belátható a DNS reparáció, mint feladat óriási problémát jelent a sejt számára; habár a sejt összes fehérjéje közül minimálisan száz az, ami közvetlen szerepet játszik a DNS károsodások javításában, ezeknek a fehérjéknek a feladata a lehetséges végtelen változatosságú DNS károsodások kijavítása.

A hibák javítása alapvetően számos különböző módon mehet végbe. A károsodások egy részénél kémiailag lehetséges az ellenkező irányú kémiai reakció, a károsodás reverziója. Az ilyen, úgynevezett direkt reparációs utak közös jellemzője, hogy az eredeti kémiai szerkezet áll vissza, és nem a hiba eltávolítása után az eredeti állapottal ekvivalens szerkezet. Az UV sugárzás indukálta timin dimerek eltávolítása, direkt reparációja során a pirimidin bázisok között létrejött ciklobután gyűrű enzimatikusan, a látható fény energiájának felhasználásával felhasad és a

fotoreaktiváció eredményeként a korábbi szerkezet visszaáll (Beukers és mtsai, 2008; Goosen és Moolenaar, 2008). Alkilált bázisok direkt reparációja során egy, az adott alkilált bázisra specifikus alkiltranszferáz enzim eltávolítja az alkilcsoportot úgy, hogy azt a saját aktív centrumában lévő ciszteinhez kapcsolja (Drablos és mtsai, 2004).

Az excíziós reparáció során a hibás bázis felismerése után az fizikailag eltávolítódik a DNS-ből és a hiányzó információ a komplementer szálal templátként használva pótlódik. A bázis excíziós reparáció (*base excision repair, BER*) során egyetlen hibás bázis vágódik ki az arra a bázisra specifikus N-glikoziláz által. A keletkező AP (*angolból: apurinic and apyrimidinic*) helyet egy AP endonukleáz hasítja, majd a keletkezett 3' hidroxil véget egy DNS polimeráz folytatja az ép komplementer szálal használva templátként az AP hely egyidejű eltávolításával. A folytonossági hiányt egy ligáz foltozza be, helyreállítva az eredeti állapottal ekvivalens szerkezetet (David és mtsai, 2007).

A DNS replikációja, részben a replikatív polimeráz korrektor (3'-5' exonukleáz) tulajdonságának köszönhetően nagy pontosságú folyamat de nem hibátlan (Loeb és mtsai, 1979). A nem komplementer, azaz a kettős hélixbe nem pontosan illeszkedő bázis eltávolítását elvégző reparációs út (*mismatch repair, MMR*) felelős az összes hiba javításának 99 százalékáért. Ezen reparációs út képes az újonnan szintetizálódott szálal megkülönböztetni a szülői templát szálalól, és az újonnan szintetizálódott szálal a nem komplementer bázis mindkét oldalán hasítja. Az oligonukleotidot egy 5'-3' exonukleáz távolítja el és a folytonossági hiány a fentiekhez hasonlóan foltozódik be (Li, 2008; Modrich, 2006).

A nukleotid excíziós reparáció (*nucleotide excision repair, NER*) során nemcsak a károsodott DNS bázis, hanem annak közvetlen környezete is kivágódik, a hibás bázist is hordozó oligonukleotidot egy helikáz távolítja el. A rést a DNS polimeráz betölti a sértetlen komplementer szál alapján, és a folytonossági hiányt egy ligáz foltozza be (Prakash és Prakash, 2000).

Nemcsak elméleti az a lehetőség, hogy a károsodás mind a két DNS szálal érinti, a hiba excíziója ebben az esetben a DNS molekula mind a két szálának törését eredményezi, de hasonló károsodás alakulhat ki ionizáló sugárzás hatására, vagy akár enzimátikus folyamatok eredményeképpen (McHugh és mtsai, 2001). Diploid organizmusokban a homolog

rekombinációs apparátus képes az ilyen kétszálú törések befoltozására az érintetlen homolog DNS kópiát templátként használva (Prakash, 1981; San és mtsai, 2008). Haploid organizmusok is kihasználhatják a homolog rekombinációt, például a replikáció során.

Amennyiben erre nincs mód, akkor egy további lehetőség a két törött vég egyesítése (Burma és mtsai, 2006). A kétszálú törés szerkezete, a “törési felszín” azonban a legritkább esetben alkalmas arra, hogy az hibátlanul összeilleszthető legyen, és az összeillesztendő végek alkalmas processzálása gyakran jelentős DNS darabok eltávolításával jár. Ezen processzált végek összeillesztése az eredeti szerkezetet, azaz a kettős hélixet helyreállítja ugyan, de a szerkezet immáron nem ekvivalens a károsodás előtti állapottal.

Az előzőek során ismertetett hibajavító utak egy részét olyan mélységig sikerült megismerni, hogy a hiba javítását, vagy legalábbis annak lényeges *in vivo* aspektusait *in vitro* is rekonstruálni lehetett rekombináns komponensek felhasználásával (Matsumoto és mtsai, 1999; McHugh és mtsai, 2001; Wood és mtsai, 1993; Wood és mtsai, 2000; Zhang és mtsai, 2005). Az eképpen tehát kellően jól jellemzett folyamatokban számos olyan elvi sémát ismerhetünk fel, melyek az egyes reparációs mechanizmusok általános jellemzői. Ilyen séma a hiba természetének, vagy egyszerűen csak a tényének felismerése; a leggyakrabban előforduló hibákat speciális fehérjék képesek azonosítani, más esetben az intakt kettős helix szerkezetének a megváltozása az a jel, amelyik a DNS információtartalmának megváltozására utal. A reparáció végeredményeként a hiba, ha azt a kémiai szerkezet és a DNS információtartalmának megváltozásaként definiáljuk megszűnik és az eredeti állapot, vagy azzal ekvivalens szerkezet helyreáll; kevésbé szigorúan definiálva a hibát a DNS folytonossági hiányának megszüntetése is valódi hibajavítás.

Magától értetődően léteznek azonban olyan hibák melyek nem árulják el könnyen magukat és kétszálú kontextusban rejtve maradnak, vagy egyszerűen csak nem olyan jellegű változások, amelyeknek megfelelő, azt specifikusan felismerni képes fehérje létezik. Ugyancsak belátható, hogy a DNS károsodások keletkezése és javítása dinamikus folyamatok, bizonyos károsodások akár hosszabb ideig is megúszhatják a reparációt, példának okáért, ha olyan kromatin környezetben helyezkednek el, ami a hibajavítás számára a hibás szerkezetet nem teszi hozzáférhetővé (Escargueil és mtsai, 2008). Két olyan esemény azonban van a DNS működése során, ahol egy adott bázisról biztos kiderül, hogy az kémiaiilag instruktív-e, avagy sem; az egyik

ilyen eset a transzkripció, abban az esetben ha a szóban forgó nukleotid a genom kódoló része, mégpedig a DNS templát szála (Savery, 2007; Tornaletti és mtsai, 2006). A másik eset a DNS replikációja, ahol minden egyes bázisról kiderül az, hogy kémiaiilag intakt, avagy károsodott. Nem instruktív DNS károsodás esetén, azaz, ha a DNS replikációját végző enzimikus apparatus rendkívüli templáthűsége okán nem képes a négy bázis egyikeként sem interpretálni a károsodást, akkor a DNS szintézise ezen a ponton leáll (Bollum és Setlow, 1963; Setlow és mtsai, 1963). Egyetlen ilyen hiba leállíthatja a sejt ciklust és a sejt halálához, vagy legalábbis a genom nagymértékű átrendeződéséhez vezet; ez utóbbi eukariótákban közvetlen kapcsolatba hozható a karcinogenezissel. A károsodás amivel a replikációs apparátus találkozik olyan hiba, amelyik a létező legrosszabb időben került felismerésre.

A DNS károsodások toleranciájának mechanizmusai

A blokkolt replikációs villa sürgősségi helyzetet jelent, az adott pillanatban komolyabb problémát, mint maga a DNS károsodása. Ennek megfelelően, a probléma megoldása ezekben az esetekben nem a hiba javítása, hanem annak tolerálása, azaz egy olyan megoldás ami lehetővé teszi a replikáció folytatását a károsodott bázison keresztül, a hiba reparációja a valódi hibajavító mechanizmusok feladata lesz a későbbiekben. Mivel a blokk közvetett oka a replikációs apparátus nagy pontossága, ezért az egyik lehetőség a sejt számára az, hogy átengedje, legalábbis néhány nukleotid beillesztése erejéig, a szintézist olyan DNS polimerázoknak, amelyek akár nem megfelelő bázis beépítése árán is, de képesek átírni a károsodott bázist (*Trans-Lesion Synthesis; TLS*) (Ohmori és mtsai, 2001; Prakash és mtsai, 2005).

Jelenlegi ismereteink szerint az élesztő genom 3 TLS polimerázt kódol, a humán genom legalább tízet (Prakash és mtsai, 2005). Nem minden DNS károsodás írható át, és az átírható DNS károsodásokat nem minden TLS polimeráz képes átírni. A példa kedvéért, a DNS polimeráz éta képes két adenint illeszteni keresztkötött dT-dT (cys-syn dimer) dimerrel szemben; ha a bázisok károsodás előtti kémiai természetét tekintjük, ez egy hibátlan megoldás, nem jár hibás bázis beépítésével (Johnson és mtsai, 2000; Washington és mtsai, 2000). Hasonlóan, a DNS polimeráz éta 8-oxo guaninnal (*7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine*) szemben jellemzően dC-t illeszt be, azonban 6-O-metil guaninnal szemben dC-t és dT-t közel egyforma gyakorisággal illeszt be; ez utóbbi egyértelműen hibás megoldás (Haracska és mtsai, 2000a; Haracska és mtsai, 2000b). A DNS polimeráz éta nem képes átírni a benzopirén (pl. *benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide*

(BPDE)) N2-deoxiguanosin vegyületeit, butadién epoxidot, vagy a dG akroleinnel képzett vegyületét (*γ-hydroxy-1,N²-propano-deoxyguanosine (γ-HOPdG)*) (Chiapperino és mtsai, 2002; Minko és mtsai, 2001; Minko és mtsai, 2003). Ugyancsak nem képes átírni egy AP helyet, ez utóbbit hibamentesen nem is lehet, hiszen az nem instruktív a károsodás eredetét illetően (Haracska és mtsai, 2001a). Más léziók, mint a 6-4 ciklobután pirimidin dimerek átírásában a polimeráz éta nem egyedül, hanem egy másik polimerázzal, a DNS polimeráz zétával együtt vesz részt (Johnson és mtsai, 2001).

A fentiekből nyilvánvaló, hogy a károsodás kémiai természete alapvetően meghatározza azt, hogy az átírható-e, és azt is, hogy az átírás hibával jár-e, avagy sem (*angolból: error-prone or error-free bypass*) (Prakash és mtsai, 2000; Prakash és mtsai, 2005; Xiao és mtsai, 2000). Mindazonáltal a TLS út, tekintve a lehetséges károsodások végtelen számát, bizonyosan nem univerzálisan használható tolerancia mechanizmus és bizonyosan nem hibátlan.

1976-ban egymástól függetlenül két kutatócsoport is arra a következtetésre jutott, hogy a blokkolt replikációs villa átrendezése bizonyos feltételek teljesülése esetén lehetővé teszi a hiba átírását egy olyan módon, ami esszenciálisan hibamentes és nem, vagy csak kevéssé függ a károsodás kémiai természetétől (Fujiwara és Tatsumi, 1976; Higgins és mtsai, 1976). A model szerint a blokkolt szintetizálódó szál az ép szálon szintetizálódó másik szálát templátként használva képes lehet a hiba átírására, hangsúlyozni kell: egy olyan trükköt használva, ahol a hibás DNS szakasz immáron nem templátja a szintézisnek, éppen ezért blokkja sem lehet. A modellre a leggyakrabban a replikációs villa megfordulásaként szokás hivatkozni. Jelen dolgozat célja a folyamat biokémiai részleteinek vizsgálatát célzó kutatásaink és azok eredményeinek ismertetése.

Irodalmi áttekintés

(a DNS szemikonzervatív replikációjától a konzervatív DNS szintézisig)

Az egyes tulajdonságokat öröklődő részecskék (gének) alakítják ki, a gének fehérjék elsődleges szerkezetét befolyásolják, a gének kromoszómákon vannak, a kromoszómák DNS-ből és fehérjékből állnak, végül pedig a DNS maga az örökítő anyag. Nagyjából ennyivel össze is lehet foglalni az öröklődés kémiai természetével kapcsolatos ismereteinket azt megelőzően, hogy Watson és Crick 1953-ban leírták a DNS szerkezetére vonatkozó, lényegében máig érvényes modelljüket. A szerkezet leírása nem egyszerűen a korábbi kémiai és genetikai adatok szintézise, és az öröklődéssel kapcsolatos kutatások lezárása volt. Ellenkezőleg, úgy tűnt, hogy olyan központi és megválaszolatlan kérdések megoldását teszi lehetővé, mint az, hogy miként rendelkezik a DNS az információ tárolásának képességével és miként képes a DNS ezt az információt átörökíteni, azt lemásolni. Ez utóbbival kapcsolatban Watson és Crick megjegyzi: „*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material*”(Watson és Crick, 1953). Azaz, ha a DNS szálai szétválnak akkor azok templátként szolgálhatnak a megfelelő komplementer szál szintéziséhez, ez lenne a replikáció úgynevezett szemikonzervatív módja, amely szerint a replikáció után az utódmolekulák egyik szála a szülői szál, a másik pedig az újonnan szintetizálódott komplementer.

Bármennyire is kézenfekvő a szerkezet alapján a DNS replikációjának magyarázata, nem volt nyilvánvaló, hogy miként lehetne azt bizonyítani, márcsak azért sem mert nyilvánvalóan nem a szemikonzervatív replikáció az egyetlen elméleti lehetőség. Elképzelhető például, hogy csak az egyik szál templát a szintézis során, és az újonnan szintetizálódott egyszálú DNS egészítődik ki kétszálúvá, azaz a replikáció konzervatív; *ad absurdum* elképzelhető, hogy az örökítőanyag nem templátja saját replikációjának. Ez utóbbinak Arthur Kornberg szolgáltatja elegáns cáfolatát az első DNS polimeráz felfedezésével, mely szigorúan DNS templát függő enzimnek bizonyult (Adler és mtsai, 1958; Bessman és mtsai, 1958; Lehman és mtsai, 1958a; Lehman és mtsai, 1958b). A replikáció szemikonzervatív természetét pedig Meselson és Stahl bizonyította be azzal

a kísérletükkel, melyre szokás úgy is hivatkozni, mint a legszebb biológiai kísérletre amit valaha végrehajtottak (Hanawalt, 2004).

A Meselson-Stahl kísérlet

A replikáció mechanizmusának bizonyítására ki kellett dolgozni egy olyan módszert, amellyel megkülönböztethető a szülői molekula a replikáció utáni molekulától. Meselson ötlete az volt, hogy egy olyan DNS molekula, amelyben az egyik nukleotid helyére egy nukleotid analógot építenek be, adott esetben 5-bróm uracilt, az fizikai tulajdonságai alapján megkülönböztethető lesz a nem szubsztituált molekulától. A molekula vizsgált fizikai tulajdonsága a sűrűség volt, a szubsztituált és nem szubsztituált DNS elválasztásának alapja pedig az, hogy egyensúlyi sűrűség-grádiensen a vizsgálni kívánt molekula a grádiensnek azon részét foglalja el, ami a saját sűrűségével egyező (Meselson és mtai, 1957). A molekulák ülepedési sebessége függ a mérettől is, kellő hosszúságú centrifugálás után azonban ez nem komplikálja az eredményt, a sűrűség-grádiens “egyensúlyi” jelzője erre a kísérleti kondícióra utal. Cézium-klorid oldat ultracentrifugálása alkalmas grádienszt szolgáltatott és a kísérlet eredménye meggyőzően demonstrálta, hogy a szubsztituált DNS sűrűsége nagyobb, egész pontosan 1.80 g/cm^3 , mint a nem szubsztituált molekuláé, melynek a sűrűsége 1.70 g/cm^3 (Meselson és mtai, 1957).

A mára klasszikusnak számító kísérlet során az eredeti körülményeket Meselson és Stahl annyiban módosította, hogy tekintve a 5-bróm uracil toxicitását, és azt, hogy nehéz volt egységes jelölést elérni, inkább a nitrogén 15-ös tömegszámú izotópját használták jelölésre. A kísérlet során több generáción keresztül tenyésztettek *Escherichia coli*-t olyan táptalajon, ami nitrogénforrásként csak és kizárólag $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -t tartalmazott. Az ilyen sejtekből származó DNS cézium-klorid grádiensen egy nehéz sűrűségű molekulaként ülepedik, jól megkülönböztethetően attól a sávtól, amelyet a $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ tartalmú táptalajon növesztett baktérium DNS-e foglal el a sűrűség-grádiensen. Meselson és Stahl a 15-ös tömegszámú nitrogénnel tartott sejteket elkezdte 14 -es tömegszámú nitrogénnel tartalmozó tápfolyadékban növesztetni, és a kísérlet időtartama alatt folyamatosan mintákat vettek a kultúrából és tesztelték a DNS sűrűségét. Kezdetben egyetlen sávot lehetett megfigyelni a nehéz pozícióban, aztán egy másik sáv kezdett megjelenni abban a sávban, ami pontosan a nehéz és a könnyű sáv között található és a nehéz sáv pontosan úgy kezdett el eltűnni, ahogy a hibrid sáv megjelent. Egy generáció, azaz egy osztódás elteltével csak

a hibrid, átmeneti sűrűségű sáv volt megfigyelhető. Ezt követően megjelent a könnyű DNS, és a második generációra a hibrid sűrűségű DNS mennyisége megegyezett a nem szubsztituált DNS mennyiségével (Meselson és Stahl, 1958).

A kísérlet interpretációja Meselson és Stahl szavaival: "*the nitrogen of a DNA molecule is divided equally between two subunits which remain intact through many generations*", ..."*following replication each daughter molecule has received one parental subunit*", na és persze: "*the replicative act results in a molecular doubling*" (Meselson és Stahl, 1958). Érdeemes észrevenni, hogy a diszkrét sávok megfigyeléséhez elengedhetetlenül szükséges a DNS olyan mértékű törése a minta preparálása során, ami majd nem komplikálja a kísérlet interpretálását azzal, hogy nyilvánvalóan léteznie kell olyan DNS-nek ami még éppen csak elkezdett replikálódni, vagy már javában replikálódik, de még nem teljesen szintetizálódott meg; az ilyen molekulák a nehéz és az átmeneti sávok sűrűsége közötti tartományban ülepednének. Meselson és Stahl a centrifugálás előtt injekcióstűn nyomta át a DNS mintát, ami erősen töri a merev DNS molekulát, a cikkük szerint körülbelül 10 kilóbázis volt az az átlagos fragmentméret amivel ők dolgoztak. A DNS kíméletes kezelése valóban lehetővé tette később a növekvő replikációs villák megfigyelését sűrűség-grádiensen is; mindez semmit nem von le az eredeti kísérlet szépségéből (Hanawalt és Ray, 1964). Meselson és Stahl következtetése a fenti kísérlet alapján egyértelmű volt, a DNS replikációja legalábbis normális körülmények között szemikonzervatív és nem pedig konzervatív; az, hogy ez nemcsak prokariótákra igaz Herbert Taylor szintén klasszikus kísérletéből már akkor is többé-kevésbé nyilvánvaló volt (Taylor és mtsai, 1957).

A károsodott DNS replikációja

Watson és Crick munkája máig hatóan rendkívül motiváló, de ugyanúgy elmondható, hogy Meselson és Stahl kísérlete valóságos katalizátora lett elsősorban azoknak a kutatásoknak, amelyek azon folyamatok megértését célozták meg, hogy DNS károsodás hatására mi történik a DNS-sel, és a DNS károsodás mennyiben érinti a DNS replikációját. Az eredeti sűrűség-grádiens kísérlet számos verzióját fejlesztették ki. Gyakran használt a ^{15}N , ^{13}C és ^2H , vagy ^3H jelölés kombinációja, de az 5-bróm uracil szintén használatos maradt, ez önmagában közel olyan sűrűségű DNS-t eredményez, mint az előbb említett három jelölés együttvéve. A nukleotid excíziós reparációnak (NER) a felfedezése közvetlen hozzájárulás az egyik ilyen kísérletnek. Ha ^{13}C

jelölt sejteket UV-sugárzással kezeltek triciált 5-bróm uracil jelölés során és a mintát közvetlenül az UV kezelés után vizsgálták akkor a hibrid denzitású újonnan szintetizálódó DNS-t világosan meg lehetett figyelni, ez nemcsak a denzitásával árulja el magát, hanem a radioaktivitásával is. A meglepő az volt, hogy világosan lehetett azonosítani radioaktivitást a szülői denzitású sávban is, ebbe nyilvánvalóan beépült a 5-bróm uracil, ami egyértelműen DNS szintézisre utal, de bizonyosan nem annyi, hogy a DNS denzitását szignifikánsan megváltoztassa (Pettijohn és Hanawalt, 1964). Emlékezzünk vissza Meselson és Stahl kísérletére: a szokásos kísérleti kondíciók között nem lehet azonosítani a növekvő replikációs villákat, a szülői denzitás ezért egyértelműen arra utal, hogy ez a DNS darab még nem replikálódott, azaz a radioaktív jel beépülése ebben az esetben nem a kromoszóma replikációjával kapcsolatos. A jelenségre, melyet a “nem-konzervatív reparáció indukált DNS szintézis” kifejezéssel írhatunk körül (a szerzők eredeti meghatározása: *nonconservative repair replication*) a magyarázat az, hogy az UV indukált károsodások és azok közvetlen környezete fizikailag eltávolítodnak a DNS-ből, és a folytonossági hiányt *de novo* szintézis pótolja (Pettijohn és Hanawalt, 1964; Setlow és Carrier, 1964). Hasonló kísérletben lehetséges volt a rekombináció megfigyelése is, ebben az esetben a hibrid denzitás és a szülői denzitás között ülepedő DNS utalt a rekombinációs termékekre (Meselson, 1964).

Az UV sugárzás *in vitro* és *in vivo* egyaránt gátolja a DNS szintézisét, ezért okkal volt feltételezhető, hogy az UV által okozott DNS károsodás fizikai gátja a már folyamatban lévő replikáció továbbhaladásának (Bollum és Setlow, 1963; Setlow és mtsai, 1963). Ha ez igaz, akkor a blokkolt növekvő DNS szálat azonosítani is lehetne, a cézium klorid sűrűség-grádiens azonban erre nem alkalmas módszer. Ennek oka többek között az, hogy nem nyújt információt a vizsgált DNS méretéről, csak a sűrűségéről, továbbá a fentebb részletezett kísérleti körülmények között a módszer nem informatív a helix folytonosságát illetően, ugyanis a szintetizálódó szálon a folytonossági hiány nem nyilvánvaló akkor, ha az a komplementer szállal duplexet képez. A replikáció vizsgálata nem egyensúlyi alkalikus szukróz-grádiensen lehetővé tette ezeknek a kísérleti korlátoknak az átlépését. Alkalikus kondíciók között a DNS két szála denaturálódik, és amennyiben a centrifugálás időtartama kellően rövid, akkor lehetőség van a molekulák nemcsak sűrűség, hanem méret szerinti szeparálására. Lényeges továbblépés a korábbi kísérleti elrendezésekhez képes, hogy amennyiben a vizsgálni kívánt sejteket a grádiens tetején lizálják és

in situ deproteinizálják a DNS-t, akkor megtakarítható minden olyan pipettázási lépés, ami a vizsgálni kívánt molekulák törésével jár, és immáron valóban többé-kevésbé hiteles információ nyerhető a replikálódó DNS hosszáról (McGrath és Williams, 1966). A módszert eredetileg baktérium protoplasztokra dolgozták ki, de hamarosan alkalmassá tették élesztő és emlős sejtek vizsgálatára is (diCaprio és Cox, 1981; Lehmann, 1972; Prakash, 1981; Resnick és mtsai, 1981; Simpson és mtsai, 1973, Strauss és mtsai, 1975) .

A károsodott DNS replikációjának ilyen felbontású vizsgálata már csak azért is izgalmas volt, mert rendelkezésre álltak olyan *E. coli* törzsek, amelyek különösen érzékenyek voltak bizonyos DNS károsodásokra, más szóval reparáció defektívek voltak. Létezett olyan *E. coli* törzs, amiről tudni lehetett, hogy defektív a nukleotid excíziós reparációja (NER); az ilyen törzs használata nyilvánvalóan lényegesen megkönnyítheti az UV károsodás következményeinek vizsgálatát a replikációra azzal, hogy a károsodás nem tűnik el a vizsgálat során, még pontosabban a replikáció előtt. Az NER defektív baktérium törzs kromoszómájának mérete UV kezelés nélkül és alkalikus szukróz grádiensen vizsgálva körülbelül 15-20 százaléka a teljes kromoszóma méretének, ez kromoszómánként 4-5 törésre utal, ami a mégannyira kíméletes preparálás során is előfordul. Az UV kezelés után szintetizálódó DNS azonban sokkal kisebb darabokként ülepedett, habár hozzávetőleg tízszer nagyobb volt a legkisebb fragmentek mérete is, mint az Okazaki fragmentumoknak; azokkal bizonyosan nem volt összetéveszthető (Rupp és Howard-Flanders, 1968). További vizsgálatok tisztázták, hogy a folytonossági hiány fizikai természete az, hogy az újonnan szintetizálódó DNS szálak között nem replikálódott részletek találhatók, az ilyen rések mérete körülbelül 1000-1600 nukleotid, és a rések előfordulása megegyezik a pirimidin dimerek eloszlásával (Iyer és Rupp, 1971). Sőt, ép excíziós reparáció mellett is hasonló eredményt kaphatunk; ez utólag a legkevésbé sem meglepő, hiszen az NER szubsztrátja kétszálú DNS, és nem olyan, ahol a károsodással szemben nem a komplementer szál, hanem egy kilóbázis nagyságú rés van. A fenti kísérletek igazolták, hogy a DNS károsodás valóban fizikai gátja a replikáció előrehaladásának.

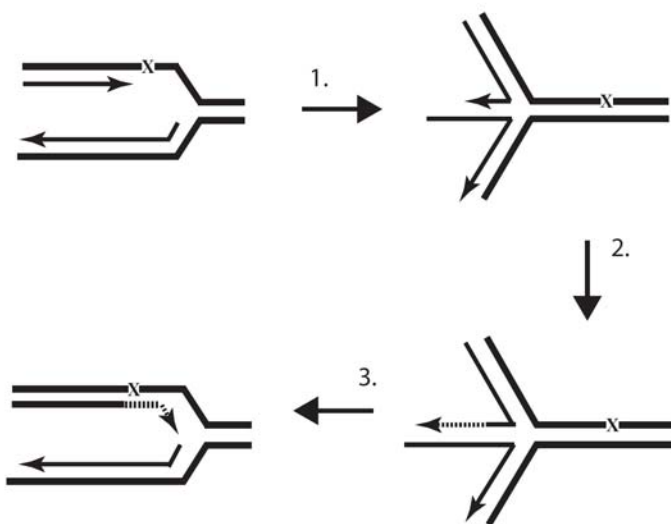
Amit igazából nem lehetett előrelátni az az volt, hogy amennyiben a besugárzás után nem azonnal, hanem viszonylag rövid inkubáció után vizsgálják meg a DNS szintézisét akkor az eredetileg apró darabokban szintetizálódó DNS visszanyeri a folytonosságát (Rupp és Howard-

Flanders, 1968). Úgy tűnt, hogy létezik egy NER független mechanizmus, ami képes a replikáció során felismert hibák reparációjára. Kézenfekvőnek tűnt megvizsgálni a DNS károsodások sorsát a folyamat során és az eredmény elképesztő volt: NER defektív sejtekben a pirimidin dimerek ugyanúgy ottmaradtak a szülői szálon, mintha mi sem történt volna, másszóval a sejt a DNS folytonossági hiányának befoltozása során nem a károsodást reparálja, hanem valahogy megtalálja a módját a károsodás okozta blokk áthidalásának (Rupp és mtsai, 1971; Rupp és Howard-Flanders, 1968). Megszületett a DNS károsodások reparációjának édestestvére, a DNS károsodások toleranciája, ami elég zavaros módon a poszt-replikációs reparáció (*post-replication repair*, PRR) nevet kapta, annak ellenére, hogy egyértelműen nem reparációs folyamatról van szó. Ezt követő vizsgálatok tisztázták, hogy prokariótákban a PRR alapvetően rekombinációs úton zajlik, ezt genetikai adatok is bőséggel alátámasztják (Rupp és mtsai, 1971). Hamarosan kiderült azonban, hogy eukariótákban a rekombinációnak nincs, vagy rendkívül alárendelt a PRR-ben betöltött szerepe (diCaprio és Cox, 1981; Lehmann, 1972; Prakash, 1981; Resnick és mtsai, 1981).

A replikációs villa megfordulása

A poszt-replikációs reparáció kísérletes megközelítése tradicionálisan a károsodott DNS replikációjának nem egyensúlyi alkalikus sűrűség-grádiensen történő vizsgálatát jelenti. 1976-ban két kutatócsoport egymástól függetlenül megvizsgálta, hogy miként viselkedik emlős sejtek károsodott DNS-e egyensúlyi cézium-klorid sűrűség-grádiensen (Fujiwara és Tatsumi, 1976; Higgins és mtsai, 1976). A kísérleti elrendezés lényegében a Meselson-Stahl kísérlethez hasonló, azzal a különbséggel, hogy radioaktívan jelölt halogenizált nukleotidot használtak a replikáció jelölésére. Alkiláló szerrel történő kezelés után jól láthatóan azonosítható volt a normális replikációra jellemző hibrid sáv, továbbá azonosítható volt a hibrid sáv és a szülői DNS sáv sűrűsége között is a radioaktivitás; erről korábban be lehetett látni, hogy jelentős részben a homolog rekombináció következménye. Jól láthatóan azonosítható volt továbbá egy sáv, amelynek a sűrűsége 1.80 g/cm^3 volt. Ez a sáv bizonyosan nem annak a következménye volt, hogy a jelölés időtartama alatt a sejtek két S-fázison is átmentek, ezért az egyértelműen konzervatív DNS szintézisre utalt (Fujiwara és Tatsumi, 1976; Higgins és mtsai, 1976).

A konzervatív DNS szintézis jelenségének magyarázatára a replikációs villa megfordításának a modelljét hívták életre, mely lényeges pontjai a következők. Amennyiben a DNS szintézis vezető szála (*leading strand*) DNS károsodással találkozik, az a további szintézist megakadályozza, de nincs hatással a komplementer szál szintézisére, az tovább folytatódik; ez egyébként egy meglehetősen meredek predikciója volt a modellnek, de napjainkra kísérletesen igazolttá vált (Cordeiro-Stone és mtsai, 1997; Cordeiro-Stone és mtsai, 1999; Pages és Fuchs, 2003; Svoboda és Vos, 1995). Ezt követően a késlekedő szál (*lagging strand*) letekeredik a villáról, letekeredik a blokkolt vezető szál is és párosodnak; az így kialakult szerkezet sokakat leginkább egy csirke lábára emlékeztetett, és a “csirkeláb-struktúra” (*chicken-foot structure*) elnevezés meg is honosodott a szakirodalomban. Ezt követően a blokkolt vezető szál a késlekedő szálat használja templátként annak a szekvenciának a szintézisére, mely szekvencia az eredeti kontextusban a károsodás után helyezkedik el (1. ábra). Ez az a pont, ahol a DNS szintézise templátként újonnan szintetizált láncot használ, és ha a szerkezet eltörik, akkor a “csirkeláb” középső újja megfigyelhető lesz a sűrűség-grádiensen; ez lenne a magyarázat a nagy denzitású sáv megfigyelésére. A folyamat végén a “csirkeláb” mozgatásával a replikációs villa helyreáll és a károsodás átíródott (Fujiwara és Tatsumi, 1976; Higgins és mtsai, 1976). A “csirkeláb” szerkezetet elektronmikroszkópiusan is azonosítani lehetett, és a “csirkeláb” középső újja a mérések szerint akár 4000 bp is lehet, mindezek egy meglehetősen processzív mechanizmusra utalnak (Higgins és mtsai, 1976).



1. ábra A kép replikációs villa megfordításának modelljét, és a blokkolt replikációs villa menekítésének folyamatát mutatja be három lépésben (számozott nyilakkal jelölve). A folyamat szubsztrátja a blokkolt replikációs villa, ahol a szintézis egy DNS károsodásnál megállt; a hibát “X” jelöli a szintézis irányára pedig nyíl utal. A folyamat első lépése során a szintézis késlekedő és vezető szála letekeredik a szülői szálakról, és egymással párosodva létrehozzák a villa megfordításának “csirkeláb” intermedierét. A második lépésben egy polimeráz a szintézis késlekedő szálát templátként használva folytatja

az eredeti kontextusban blokkolt vezető szál szintézisét (szaggatott vonal jelöli). A harmadik lépésben a “csirkeláb” mozgásával az eredeti szerkezet visszaáll, a replikáció tovább folytatódhat.

A DNS helikázok

A DNS működése során a legkülönbözőbb okokból, de általában szükség van a helix két szálának szétválására, és a helikázok olyan enzimek, amelyek képesek ennek a folyamatnak a katalízisére. Az első helikázt 1976-ban írták le és minden túlzás nélküli a becslés, hogy az azóta eltelt időben fehérjék százairól lehetett belátni, hogy helikázként működnek (Abdel-Monem és mtsai, 1976; Abdel-Monem és Hoffmann-Berling, 1976). Az egyes fehérjék közötti szerkezeti homológia alapján a helikáz funkciójú fehérjék hat “nagy családba” oszthatók (Singleton és mtsai, 2007) (2. ábra). Bizonyos konzervált motívumok valamennyi nagy családra (*superfamily*, *SF*) jellemzőek, ezek azok, amelyek a nukleotid kofaktor kötéséért és hidrolíziséért felelősek. A valamennyi nagy családra jellemző konzervált motívumok a fehérje nagyobb szerkezeti egységeinek az integráns részei. Az SF3-SF6 fehérjékben egyetlen ilyen domén található, amelynek a szerkezete főbb vonalakban megegyezik a prokarióta rekombinációban kulcsszerepet játszó RecA fehérjének a harmadlagos szerkezetével (*RecA-fold*). Szerkezeti vizsgálatok szerint az első és második helikáz nagy családba tartozó fehérjék közös jellemzője, hogy két ilyen RecA szerű harmadlagos szerkezetet formálnak, de ebben az esetben a két domén nem ekvivalens abban az értelemben, hogy a nukleotid kötéséért felelős konzervált motívumok az első doménben, a kofaktor hidrolíziséért felelős argininban gazdag motívum (*R-loop*) a második doménben helyezkedik el. Valószínűsíthető, hogy minimálisan két RecA szerű motívum együttesen szükséges ahhoz, hogy bármelyik nagy családba tartozó fehérje helikázként működhessen, ugyanis az SF3-SF6 helikázok valamennyi esetben multimerek (Patel és Picha, 2000). Az SF1-SF2 helikázok oligomerizációs státusza bizonytalan, de a legtöbb ismert esetben az a legvalószínűbb, hogy monomerként működnek, habár ismerünk példát arra is, hogy egyedi helikáz molekulák heterodimerként működnek.

1. számú nagycsalád (SF1)



2. számú nagycsalád (SF2)



3. számú nagycsalád (SF3)



4. számú nagycsalád (SF4)



5. számú nagycsalád (SF5)



6. számú nagycsalád (SF6)



motívum pontos szekvenciája egyes esetekben lényeges támpont annak az eldöntésére, hogy az adott fehérje a nagycsalád melyik családjába tartozik. Ez a motívum amolyan “határozóbélyege” egyes fehérjéknek, bár nem univerzálisan használható, és egyes esetekben önmagában akár félvezető is lehet a fehérje klasszifikációját illetően. Ugyancsak valószínűsíthető a motívum szerepe a szubsztrát felismerésében, ugyanis a DEAD, DEAH motívumok szinte kizárólag RNS helikázokban fordulnak elő.

M 3: SAT, TGT, SGT, vagy TAT. Nem világos a szerepe, de hasonló lehet a TxGx motívuméhoz.

M 4: fxxS/M/T. Lazán definiált motívum. Nem ismert a szerepe.

M 5: Tx...g: Ebben a motívumban is a treonin tűnik a legkonzerváltabbnak, de az ezt követő glicin már nem mindig található meg, és néha több aminosav is megelőzi.

M6: QRrgRxGR, vagy HRrgRxGR. Argininban gazdag motívum. Bizonyosan szükséges a kofaktor hidrolíziséhez, és valószínű a szerepe a szubsztrát megkötésében is.

A fenti felsorolásban a funkcióra való utalást kristályszerkezetek vizsgálata teszi lehetővé, de nem ismert annyi szubsztrát-fehérje komplex szerkezete, hogy az egyes motívumok funkcióját valamennyi SF2 nagycsaládba tartozó fehérjére általánosítani lehetne. Az ábra a www.helicase.net című honlapon közzétett adatok, valamint Singleton és munkatársai összefoglaló munkája alapján készült (Singleton és mtsai, 2007).

2. ábra Az ábrán a helikázok és helikáz szerű fehérjék nagycsaládjai (*superfamily*, SF), és az egyes nagycsaládokra jellemző konzervált motívumok elhelyezkedése látható. A mind a hat nagycsaládra jellemző motívumokat sárga szín jelöli, ezek elnevezése az egyes nagycsaládok esetén különbözhet. Fekete szín jelöli a csak bizonyos nagycsaládokra jellemző motívumokat. A piros és kék színek a fehérjék RecA-szerű harmadlagos szerkezetet formáló nagyobb egységeit jelölik. Az egyes konzervált motívumok mindössze néhány aminosav hosszúságú szakaszok, melyek szekvenciáját és gyanítható funkcióját az alábbi felsorolás részletezi a második nagycsalád motívumaira koncentrálni. Az invariáns, vagy legalábbis többé-kevésbé szigorúan konzervált aminosavak nagybetűvel jelöltek, x a nem konzervált aminosavakra utal. Üres hely utal arra, hogy a motívum hossza nem szigorúan meghatározott.

M (motívum) 1: TGxGKT, vagy MGxGKT szekvenciák. Ez a motívum a kofaktor kötéséért és hidrolíziséért felelős.

M 1a: Pxx. Feltételezhetően a nukleinsav szubsztrát felismerésében játszik szerepet.

TxGX motívum. Nem teljesen világos a szerepe, de a konzervált treonin a legtöbb esetben a szubsztrát polifoszfát gerincével alakít ki interakciót.

M 2: VxDExx: A kofaktor kötéséért és hidrolíziséért felelős. A

A valamennyi nagycsaládra jellemzőnek tűnő közös enzimatis aktivitás úgy tűnik, hogy nem más, mint a DNS mentén történő ATP hidrolízis függő transzlokáció (Lohman és mtsai, 2008). Szinte valamennyi ismert helikáz egyszálú DNS transzlokáz, és az, hogy ez az aktivitás a kettős helix Watson-Crick párijainak szétválásával jár az esetek döntő részében igaz. Ezekben az esetekben is figyelemreméltó különbségek vannak az egyes helikázok között. Számos helikáz struktúraspecifikus DNS kötő fehérje, ami azt jelenti, hogy ezek a fehérjék bizonyos DNS szerkezetek processzálására specializáltak. Azokban az esetekben is, amikor a helikáz működése nem specifikus egy adott szerkezetre előfordul, hogy az enzim nem csak azzal a szállal alakít ki DNS-fehérje interakciót ami mentén transzlokálódik, hanem a duplex régióval is. A szubsztrátspecifitás része, hogy egyes helikázok aktivitása RNS-RNS, DNS-RNS, vagy DNS-DNS heteroduplexekre korlátozódik, ez utóbbi a leggyakoribb. Végezetül, az egyes helikázok a transzlokáció során meghatározott polaritással mozognak a DNS szála mentén, ami szintén hozzájárul az enzim szubsztrátspecifitásához. A finom kis különbségek ellenére összességében a reakció mechanizmusa alapvetően azonos minden esetben: az enzim ATP hidrolízisét használja arra, hogy egyszálú DNS mentén lépegessen és ha a vándorlás során kétszálú régióhoz érkezik, az enzim minden egyes lépéssel újabb és újabb Watson-Crick párok közötti hidrogénkötések megszűnését hozza létre; *in vivo* az így exponált egyszálú DNS-t azonnal egyszálú DNS kötő fehérjék veszik birtokba, és megakadályozzák, hogy újra kialakulhasson a duplex. Általában nem akadály a transzlokációnak fehérjék jelenléte a transzlokáció vezető szálán, egyes helikázok egyszálú DNS és fehérjék közötti interakciókat szintén hatékonyan képesek megszüntetni (Delagoutte és von Hippel, 2002; Delagoutte és von Hippel, 2003; Krejci és mtsai, 2003).

Jellemző, bár semmiképpen nem egyedüli példája annak, hogy a helikáz nagycsaládba tartozó fehérjék nem mindegyike valódi helikáz az SF2 nagycsalád egyik családja, az úgynevezett SWI/SNF2 család (Flaus és mtsai, 2006). Az ebbe a csoportba tartozó fehérjék jellemző funkciója a kromatin szerkezetének, jellemzően a nukleoszóma-DNS interakció topológiájának változatos, és az egyes fehérjére jellemző módon történő átrendezése (Wang és mtsai, 2007). Az esetek egy részében kísérletesen belátható volt, hogy a kromatin szerkezetének átrendezése során ezek az enzimek kétszálú DNS transzlokázként működnek, bár közel sem áll rendelkezésre annyi adat, hogy ezt a tulajdonságot általánosítani lehessen erre az alcsaládra (Saha és mtsai, 2002; Thoma és mtsai, 2005). Az ebbe a családba tartozó MOT1 fehérje bizonyosan olyan kivétel,

mely enzim sem egyszálú, sem kétszálú DNS transzlokáz, de ATP függő módon képes a TBP (TATA-binding protein) DNS interakció megszüntetésére és ennyiben némileg emlékeztet a SWI/SNF2 család tagjainak a működésére (Auble és Steggerda, 1999). Jelenleg egyetlen SWI/SNF2 családba tartozó fehérjéről sem igazolt, hogy helikáz aktivitással rendelkezne.

A replikációs villa megfordítása egy olyan DNS szálak közötti tranzakció, melynek során az egyes szálak között hidrogénkötések szakadnak fel, és alakulnak ki. Kézenfekvőnek tűnik tehát, hogy a reakciót *in vivo* egy helikáz katalizálja. Nyilvánvaló, hogy a károsodott DNS replikációjának vizsgálata alkalikus szukróz grádiensen és cézium-klorid grádiensen ugyanannak a jelenségnek, a posztreplikációs reparációnak különböző aspektusait tárják fel, ezért alappal jelenthető ki, hogy a replikációs villa megfordítását végző enzim egy olyan fehérje, ami a fehérje elsődleges szerkezete alapján a hat "helikáz" nagycsalád valamelyikének tagjaként klasszifikálható, és hiányában a sejtek nem képesek a posztreplikációs reparációra.

A poszt-replikációs reparáció genetikája

Élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) számos olyan mutációt sikerült azonosítani, amelyek különböző DNS károsító hatásokra érzékeny teszik a hordozó sejteket. Az élesztő posztreplikációs reparációjának analízise különböző mutáns háttéren azt igazolta, hogy a Rad6 és Rad18 géneknek a szerepe a károsodott DNS replikációja során a DNS folytonosságának a helyreállítása (diCaprio és Cox, 1981; Prakash, 1981; Resnick és mtsai, 1981). Részletes genetikai analízis számos egyéb gént azonosított, amely a Rad6/Rad18 útba tartozik. A genetikai analízis alapja az adott esetben az, hogy amennyiben két DNS károsodásra érzékeny mutációt kombinálunk, akkor alapvetően két lehetséges dolog történhet; az egyik, hogy a kettős mutáns érzékenyebb lesz DNS károsodásra; ebben az esetben arról lehet szó, hogy a két gén különböző biokémiai folyamatban defektív. A másik esetben a kettős mutáns érzékenysége megegyezik a csak az egyik mutációt hordozó élesztő vonal érzékenységével, azaz a két mutáció episztatikus és ugyanazon biokémiai útban játszanak szerepet. A Rad6/Rad18 út analízise feltárta, hogy ezen út több episztázis csoportra tagolható, azaz a Rad6/Rad18 episztázis csoportba tartozó gének mutációi episztatikusak a Rad18 mutációval, de nem mindig episztatikusak egymással. Két ilyen episztázis csoport a TLS polimerázokat foglalja magában, az egyik a DNS károsodások hibamentes, a másik egy hibás módon történő átírásáért felelős (Xiao és mtsai, 2000). Érdekes

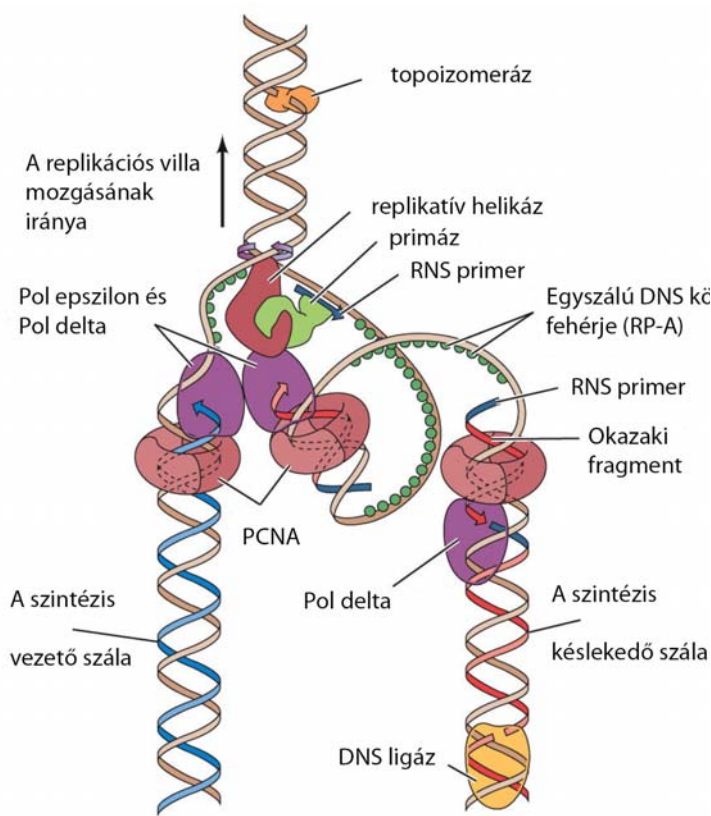
módon a TLS polimerázok nem mutatnak különösebb hibát a PRR során, ebből feltételezhetően a PRR-nek nem a TLS út a domináns módja (Prakash, 1981). A harmadik episztázis csoportba tartoznak a Rad5, Ubc13 és Mms2 gének, ezek mutációit hordozó élesztő sejtek nem képesek a posztreplikációs reparációra (Torres-Ramos és mtsai, 2002). Genetikai adatok alapján a Rad5 út a károsodások átírásának hibamentes útját kínálja (Xiao és mtsai, 2000, Zhang és Lawrence, 2005).

A replikációs villa és a Rad6/18 út biokémiája

A Rad6/18 út szubsztrátja a blokkolt replikációs villa. Maga a replikációs villa kifejezés arra utal, hogy mivel a replikáció során mind a két szál egyszerre szintetizálódik, ezért a DNS szintézise során a DNS szerkezetének egyszerre része a két szintetizálódó szál, és a még nem szintetizálódott duplex, amely így együtt valóban emlékeztet egy villa-szerű struktúrára (lásd Bell és Dutta összefoglaló munkáját, 2002). Esszenciális komponense a replikációs villának egy helikáz, amely a DNS szintézis végpontjai előtt haladva folyamatosan szétválasztja a szülői duplexet. Ezt a feladatot az MCM2-7 heterohexamér komplex végzi, ami a szokásos klasszifikáció szerint egy SF6 helikáz komplex (Singleton és mtsai 2007). Nyilvánvalóan esszenciális része a replikációnak a replikatív polimeráz, ami nem önállóan végzi a feladatát, hanem közvetlenül kapcsolódik a PCNA nevű fehérjekomplexhez. A PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) egy gyűrű alakú homotrimer, ami körbeveszi a DNS-t és egyfajta platformként szolgál számos DNS metabolizmusban szerepet játszó enzim, mint például a DNS polimerázok számára (Haracska és mtsai, 2001b; Moldovan és mtsai, 2007, Shivji és mtsai, 1995, Zhuang és mtsai, 2008). Ahhoz, hogy a zárt PCNA gyűrű kapcsolódjon a DNS-hez az szükséges, hogy a replikációs factor-C (RF-C, heteropentamer) fehérjekomplex a zárt homotrimert ATP függő módon felnyissa, és a templát primer 3' végére rögzítse azt. Maga a primer egy rövid RNS molekula, ezt a primáz enzim (polimeráz alfa) szintetizálja és az első deoxinukleotid a primer 3' végén kezdi el a DNS lánc szintézisét. A késlekedő szál szintéziséhez bizonyosan szükséges a primáz folyamatos jelenléte a replikációs villában. Az RNS természetesen nem marad a replikáció után az örökítőanyag része, azt egy 5'-3' exonukleáz/endonukleáz (FEN1) és egy ribonukleáz (*RNase H*) eltávolítja, majd a rést egy DNS polimeráz feltölti és a folytonossági hiányt egy DNS ligáz foltozza be. A replikatív helikáz előrehaladása egy állandóan újraképződő topológiai feszültséget generál a DNS ben, amit folyamatosan topoizomerázok relaxálnak. A replikációs factor-A (RP-A, heterotrimer) szerepe a replikáció során képződő egyszálú régiók

megkötése és azok stabilizálása. Azt is látnunk kell, hogy a replikáció szubsztrátja nem a csupasz DNS, hanem a kromatin. Bizonyosan állítható, hogy a kromatin átrendezése a replikációs villa előtt, és a nukleoszómális szerkezet újrendezése a születő szálakon szintén lényeges mozzanat a replikáció során (Papamichos-Chronakis és Peterson, 2008; Shimada és mtsai, 2008; Vincent és mtsai, 2008). Meg kell jegyeznünk, hogy ugyan az egyes replikációs faktorok önálló egységek, de a replikáció kontextusában koordináltan működnek együtt és formálják azt a gépezetet, melyre replikációs apparátusként hivatkozunk.

Annak ellenére, hogy a DNS replikációja évtizedek óta rendkívül intenzíven kutatott folyamat, az ezzel kapcsolatos tudásunk napjainkban is folyamatosan bővül; újabb és újabb fehérjékről és komplexeikről derül ki a replikációs villában betöltött szerepük. Jellemző példája a replikációval kapcsolatos hiányos tudásunknak, hogy mindössze a közelmúltban derült ki, hogy a számos eukarióta DNS polimeráz közül *in vivo* a DNS polimeráz epsilon a vezető szál, és a DNS polimeráz delta a késlekedő szál polimeráza, mindegyik enzim egyébként egy-egy több alegységből álló fehérjekomplex része (McElhinny és mtsai, 2008; Pursell és mtsai, 2007; Liu és Warbrick, 2006). Jelenleg felmérni sem tudjuk azt, hogy mennyire komplikált folyamat is a DNS replikációja, és ebből magától értetődően következik, hogy ugyanilyen keveset tudunk arról, hogy mi történik a replikációs villával, ha a gépezet DNS károsodással találkozik, már persze azon kívül, hogy a DNS szintézise a hibánál leáll. A blokkolt replikációs része egy PCNA trimerre hasonlító de három különböző molekulából, a Rad17, Mec3 és Ddc1 fehérjékből álló heterotrimer, aminek a szerepe az, hogy az S-fázis előrehaladását folyamatosan ellenőrző apparatus felé továbbítsa azt az információt, hogy a replikáció megállt, és nem folytatódhat a sejtciklus (Majka és Burgers, 2004). A Rad17/ Mec3/Ddc1 komplex a PCNA trimerhez hasonlóan kapcsolódik a replikációs villához, de nem az RF-C, hanem egy másik heteropentamer rögzíti a templáthoz (Majka és mtsai, 2006). Bizonyosan részei a blokkolt replikációs villának a Rad6/Rad18 útban szerepet játszó fehérjék is. Azt, hogy van-e olyan komponense a normálisan működő replikációs villának, ami nem része a blokkolt replikációs villának egyáltalán nem ismert, de feltételezhető, hogy a blokk hatékony processzálásához szükséges az, hogy a szubsztrát ne egy olyan komplikált szerkezet legyen, mint a teljes replikációs apparátus és a szubsztrát komplexe, azaz a repliszóma.



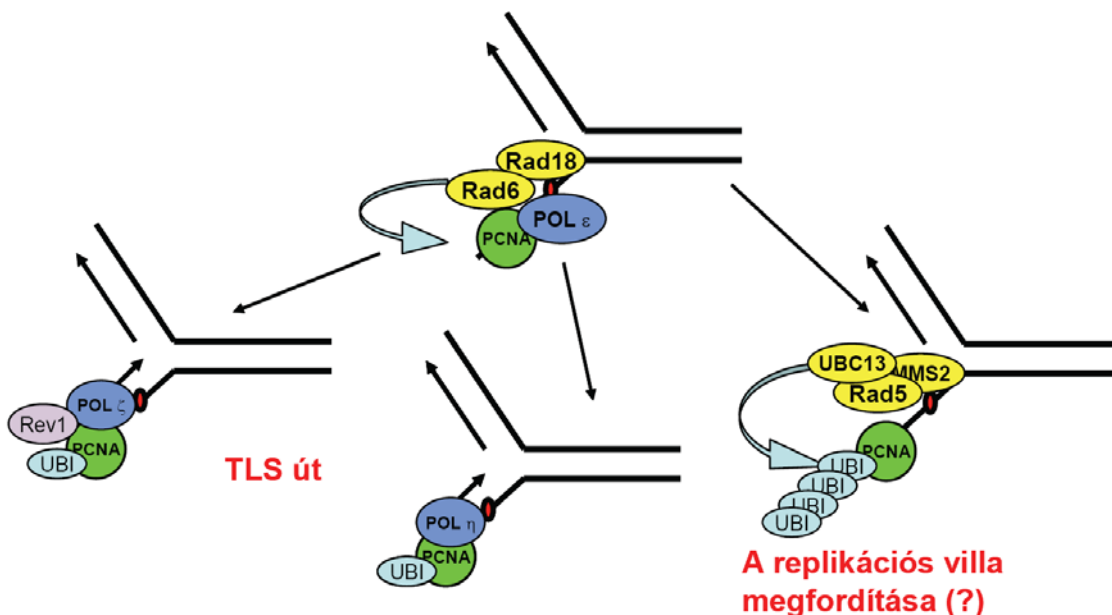
3. ábra Az ábrán a repliszóma szerkezetének sémája látható. A könnyebb áttekinthetőség miatt nincsenek feltüntetve az RF-C, FEN-1 és az RNáz H fehérjék, továbbá a fehérjekomplexek egyes alegységei sincsenek külön ábrázolva, valamint az egyes komplexek közötti interakciók közül is csak néhány van bemutatva. Ezen interakciók egyike a két replikatív polimeráz közötti interakció, mely normális körülmények között a késlekedő és a vezető szál szintézisének összehangolásáért felelős. Ennek az interakciónak a valószínűsíthető topológiai következménye az, hogy késlekedő szál a villa bázisán egy hurkot formál. Ez a szerkezet a szó szoros értelmében immáron kevésbé emlékeztet egy villára,

mint amennyire egy trombitára (*trombone model*). A model a “The Cell” című könyv (ASM Press and Sinauer Associates Inc, 4th edition) készült.

Az többé-kevésbé ismert, hogy a replikációs villában milyen biokémiai folyamatokat vezényel a Rad6/Rad18 út. A Rad6/Rad18 fehérjekomplex egy ubikvitin konjugáló enzim és egy ubikvitin ligáz komplexe (Bailly és mtsai, 1997). DNS károsodás hatására ez a komplex egyszerűen ubikvitilálja a PCNA molekulát (Haracska és mtsai, 2006; Hoega és mtsai, 2002). A jelenlegi elképzelések szerint a PCNA monoubikvitilálása valahogy elősegíti azt, hogy a replikatív DNS polimeráz lecserélődjön a TLS polimerázok valamelyikére (Zhuang és mtsai, 2008). Számos újabb adat arra utal, hogy a PCNA nem az egyetlen szubsztrátja a Rad6/Rad18 komplexnek, hanem az RFC, a Rad17/Mec3/Ddc1 heterotrimer és maga a Rad6/Rad18 is Rad6/Rad18 függő módon ubikvitilálódhat (Fu és mtsai, 2008; Notenboom és mtsai, 2007; Tomida és mtsai, 2008). Bizonyos, hogy a replikatív polimerázok és a TLS polimerázok is ubikvitilálódhatnak, de az nem világos, hogy ezekben az esetekben is a Rad6/Rad18 komplex működik-e ubikvitin ligáz-konjugáló enzim komplexként (Bienko és mtsai, 2005; Plosky és mtsai, 2006). Gyanítható, hogy

ezen módosításoknak szerepe lehet abban a folyamatban, amely során a TLS polimerázok átveszik a replikatív polimeráz szerepét, genetikai adatok azonban egyelőre csak a PCNA ubikvitilálásának szerepét igazolták a villa menekítése során (Hoege és mtsai, 2002, Acharya és mtsai, 2007).

A Rad6/Rad18 úton belül a Rad5 út a valódi PRR út (Gangavarapu és mtsai, 2006; Torres-Ramos és mtsai, 2002). A Rad5 egy ubikvitin ligáz ami az Ubc13/Mms2 ubikvitin konjugáló enzimkomplex-szel együtt képes a már monoubikvitilált PCNA poliubikvitilálására (Hoege és mtsai, 2002). Az így szintetizálódott poliubikvitin lánc nem a proteolitikus degradációra kijelölt fehérjék esetén megszokott Lys48-as elágazású lánc, hanem az ubikvitin Lys63 aminosaván ágazik el (Hoege és mtsai, 2002). Ez az elágazás bizonyosan nem a degradációra jelöli meg a fehérjét, de hogy mi is pontosan a szerepe, azt nem tudjuk. Annyit biztosan tudunk, hogy a Rad5 ubikvitin ligáz funkciójában hibás élesztő sejtek ugyanannyira defektívek a PRR-ben, mint azok a sejtek, amelyekből a teljes Rad5 fehérje hiányzik (Gangavarapu és mtsai, 2006). A 4. ábra a Rad6/Rad18 episztázis csoporton belül az egyes utak egymáshoz való viszonyát, és az egyes utakhoz rendelhető biokémiai aktivitást tünteti fel.



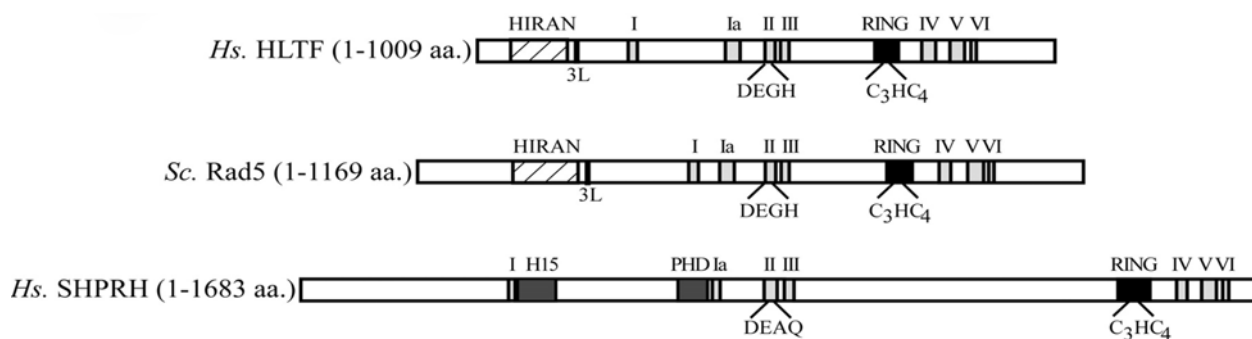
4. ábra A képen a Rad6/Rad18 episztázis csoport biokémiájával és genetikájával kapcsolatos ismereteink vázlatos összegzése látható. A blokkolt replikációs villa menekítése során bekövetkező valamennyi folyamat abszolút

mértékben függ a Rad6/Rad18 heterodimer ubikvitin (UBI) ligáz-konjugáló enzimkomplex működésétől. Az enzim egyik szubsztrátja bizonyosan a PCNA molekula, amely monoubikvitilálása vagy a Rev1-Pol zeta, vagy a Pol éta TLS utakon keresztül lehetővé teszi a károsodott bázis átírását. A Rad5 ubikvitin ligáz és Ubc13-Mms2 ubikvitin konjugáló enzimek együttesen poliubikvitilálhatják a monoubikvitilált PCNA momotrimert az ubikvitin 63. számú lizinjén keresztül. Ez a változás a replikációs villa menekítését egy nem TLS úton teszi lehetővé, és feltételezhető, hogy a Rad5 út a replikációs villa megfordításával működik.

A Rad5 és a replikációs villa megfordítása

Az, hogy a Rad5 út a replikációs villa megfordításával működhet az alábbi megfigyelések támasztják alá. Először is, a Rad5 út a Rad6/Rad18 úton belül egy hibamentes út, és a replikációs villa megfordítása magától értetődően a károsodás hibamentes átírását teszi lehetővé (Xiao és mtsai, 2000; Zhang és Lawrence, 2005). Másodszor, sikerült izolálni a polimeráz delta katalitikus alegységét kódoló gén, a Pol3 egy olyan allélját, ami szintén defektív a PRR-ben; emlékezzünk arra, hogy egy DNS szintézis lépés része annak a modellnek, ami a replikációs villa menekítését annak megfordításával magyarázza, és a Pol3 mutáns feltételezhetően ebben a lépésben defektív (Torres-Ramos és mtsai, 1997). Harmadszor, élesztőben is igazolható volt, hogy károsodott plazmidok *in vivo* replikációja során konzervatív DNS szintézis történik, a folyamat genetikai hátterének vizsgálata pedig azt is tisztázta, hogy a Rad5 hiányában ez a mechanizmus nem működik (Zhang és Lawrence, 2005). Ezek alapvetően indirekt bizonyítékok a mechanizmus részleteit illetően, és direkt bizonyítékot az szolgáltatna, ha biokémiaileg is igazolni lehetne azt, hogy az episztázis csoport valamelyik tagja képes a reakció katalízisére, akár önmagában, akár egy fehérjekomplex tagjaként. Ezzel együtt, mivel belátható a Rad5 út és a konzervatív DNS szintézis kapcsolata, és mert a konzervatív DNS szintézis valószínű magyarázata a replikációs villa megfordítása, ezért a PRR út, még pontosabban a Rad5 fehérje legvalószínűbben a replikációs villa megfordításán keresztül működik. Ez természetesen nem feltétlenül jelenti azt, hogy a reakciónak a Rad5 a valódi végrehajtója, de ezt a feltevést látszik alátámasztani az a tény, hogy a Rad5 fehérje jelentős hasonlóságot mutat helikáz funkciójú fehérjékkel, filogenetikailag a helikáz nagycsaládok közül az SF2-be sorolható, azon belül pedig a SWI/SNF2 családjába tartozik (Flaus és mtsai, 2006; Johnson és mtsai, 1992). Figyelemreméltó tulajdonsága a Rad5 fehérjének, hogy a III. és a IV. helikáz motívumok között egy RING finger motívum található, amely az Ubc13/Mms2 ubikvitin konjugáló enzimkomplex megkötésében játszik szerepet (5. ábra). Mind a két hasonló szerkezetű humán fehérjéről be lehetett látni, hogy a Rad5 funkcionális

homológjai, legalábbis abból a szempontból, hogy a humán homológok is ligázai a monoubikvitilált PCNA poliubikvitilálásának *in vivo* és *in vitro* egyaránt (Motegi és mtsai, 2006, Unk és mtsai, 2006; Unk és mtsai, 2008). Úgy látszik, hogy a helikáz domének közé beágyazott RING-finger a SWI/SNF2 családon belül külön alcsaládot definiál (Flaus és mtsai, 2006).



5. ábra A képen a Rad5 fehérje és a humán homológjai szerkezetének sematikus ábrázolása látható. Római számok jelölik a konzervált helikáz motívumokat, RING felirat utal a RING-finger motívumra. DEGH és DEAQ utal a nukleotid kofaktor kötésében kulcsszerepet játszó motívum szekvenciájára. A 3L egy Leu-zipzár szerű motívumra utal. A HIRAN domén funkciója ismeretlen, de számos egyéb, a DNS reparációjában szerepet játszó fehérjében fellelhető (Iyer és mtsai, 2006). Ez a két motívum hiányzik az SHPRH fehérjéből, mely azonban két olyan motívumot is tartalmaz, ami mind a Rad5-ből, mind a HLTF-ből hiányzik. Ezek egyike egy olyan motívum (H15) mely a hiszton H1 és H5 fehérjékben fordul elő, a másik pedig egy PHD-finger, amely más fehérjékben a hiszton H3 kötésében játszik szerepet, különös tekintettel a metilált H3-ra (Eberharter és mtsai, 2004; Li és mtsai, 2006; Wysocka és mtsai, 2006). Ezen motívumok szerepe az SHPRH fehérje működésében jelenleg ismeretlen.

Jelen dolgozat tárgyának szempontjából rendkívül lényeges, hogy a Rad5 valóban egy DNS függő ATPáz, és hasonlóan az ubikvitin ligáz funkcióban defektív mutánsához, *in vivo* az ATPáz defektív mutáns is teljesen képtelen a poszt-replikációs reparációra (Gangavarapu és mtsai, 2006; Johnson és mtsai, 1994). Azok a kísérletek azonban, amelyek a Rad5 helikáz aktivitásának bizonyítását célozták meg nem jártak sikerrel (Johnson és mtsai, 1994). A gondolatmenet a Rad5 és a replikációs villa megfordításának mechanisztikus kapcsolatáról ezen a tényen látszólag összeomlik, úgy tűnik, mintha a Rad5 genetikája és biokémiája nem lenne konzisztensen fedésbe hozható.

Összefoglalás

Foglaljuk össze tehát amit tudunk: eukariótákban a posztreplikációs reparáció (PRR) egy olyan mechanizmus, ami lehetővé teszi a DNS károsodások által blokkolt replikációs villa menekítését. A mechanizmus lényege, hogy mivel a DNS szintézise során a vezető szál blokkja nem jár a késlekedő szál szintézisének blokkjával, ezért lehetőség van arra, hogy a blokkolt szál szintézise folytatódjon az újonnan szintetizálódott késlekedő szálat használva templátként. Ehhez a replikációs villa olyan átrendeződése szükséges, amely genetikai kontrolljáért élesztőben a Rad6-Rad18 fehérjékkel megjelölt út felelős, még pontosabban annak az úgynevezett Rad5 ága. A Rad5 fehérje egy ubikvitin ligáz és egy DNS függő ATPáz, mind a kettő aktivitása nélkülözhetetlen a PRR-ben. A Rad5 DNS függő ATPáz funkciója arra utal, hogy ez a fehérje lehet az a helikáz, ami a replikációs villában a szálak közötti kapcsolatok átrendezésével létrehozza a villa megfordítását. Éppen csak bizonyosan nincs helikáz aktivitása és ez úgy tűnik kizárja annak a lehetőségét, hogy direkt szerepe lenne a “csirkeláb” létrehozásában.

Célkitűzések

Jelen munka célja annak a lehetőségnek a kritikus újravizsgálata, hogy a Rad5 fehérjének nem indirekt, hanem direkt szerepe van a replikációs villa megfordításában. Kissé másképpen megfogalmazva, a szándékunk szerint a Rad5 genetikája és biokémiája közötti szakadékot kívántuk betömni, azzal a motivációval, hogy amennyiben ez lehetséges, akkor biokémiai magyarázatát adjuk a villa megfordítása során történő eseményeknek. A kísérletes munka tervezése során próbáltunk arra a tényre támaszkodni, amit biztosnak tarthatunk, azaz: a Rad5 ATPáz aktivitásának szerepe van a replikációs villa megfordításában; ugyanakkor próbáltunk megfedkezni arról, amit a villa megfordításának mechanizmusáról csak sejtethetünk, azaz arról, hogy azt feltétlenül egy DNS helikáznak kell végrehajtania.

Ehhez feladatunk volt egy olyan kísérlet rendszer létrehozása, amely a replikációs villa *in vitro* modellje, és lehetőséget ad a villa megfordulásának észlelésére. Szándékaink szerint ezen rendszer az elképzelhető legegyszerűbb modellje kell legyen az *in vivo* szituációnak, ezért ezeket a szubsztrátokat oligonukleotidokból állítjuk elő.

Amennyiben a kísérleti rendszer adott, akkor nyílik lehetőség annak a tesztelésére, hogy *in vitro* a homogenitásig tisztított Rad5 fehérje szükséges, és elégséges-e a modellrendszerben a villa megfordítására. Ha igen, akkor részletesen vizsgáljuk a reakció biokémiai tulajdonságait, ideértve a szubsztrát kötésének a specifitását, a kofaktor szükségességét, és a reakció kinetikáját.

Ha az előzőekben megfogalmazott célok alapján a Rad5 olyan biokémiai aktivitása azonosítható, amely összefüggésbe hozható az *in vivo* szerepével, akkor megkíséreljük a kísérleti rendszerünk olyan átalakítását, mely a korábbi minimalista rendszerhez képest jobban közelíti a replikációs villa *in vivo* szerkezetét. Ehhez olyan méretű replikációs villa modell szubsztrátot hozunk létre, ahol a villa megfordulása akár több száz bázispárnyi is lehet. Ebben az esszenciálisan független kísérleti rendszerben szintén megvizsgáljuk a Rad5 aktivitását.

Végül pedig, amennyiben a Rad5 biokémia szerepe a villa megfordításában igazolható, abban az esetben megvizsgáljuk, hogy mi a mechanisztikus alapja ezen aktivitásának. Ennek során tisztázzuk, hogy a fehérje egyszálú, avagy kétszálú transzlokázként működik-e.

Anyagok és módszerek

Oligonukleotid alapú replikációs villa, és egyéb modell szubsztrátok

A dolgozatban leírt oligonukleotid alapú szubsztrátok összeolvasztását az esetek döntő részében egy lépésben hajtjuk végre. Az oligonukleotidokat gamma-³²P ATP és T4 polinukleotid kináz (Fermentas) használatával végjelöljük, és a reakcióelegyet 10 percig 70 °C-on inkubáljuk azért, hogy a kinázt inaktiváljuk. Az ekvimoláris mennyiségű komplementer oligonukleotiddal kiegészített reakciókat 95°C-ra fűtött száraz-blokk termosztátba helyezünk, és a fűtés lekapcsolása után hagyjuk a blokkot szobahőmérsékletre lehűlni. Ez a stratégia több oligo egyidejű összeolvasztására is alkalmas, az egyetlen kivétel a homolog villa, amely összeállítása során először a villát alkotó két heteroduplexet hozzuk létre, majd a két reakciót összekeverjük, és 42 °C-ról hagyjuk szobahőmérsékletre lehűlni.

A preparálás során a szubsztrátokat valamennyi esetben gélből tisztítjuk. A tisztítás során a mintákat 6%-os poliakrilamid gélen (30:0.8 akrilamid: N,N bisz-akrilamid) 1X Tris-borát elektroforézis puffert (89mM Tris-bázis, 89 mM bórsav, pH 8.3) használva megfuttatjuk. Autoradiográfiával azonosítjuk a szubsztrátok helyét a gélen, és a szikével kivágott géldarabkákat 20mM Tris-HCl pH7.0, 10mM MgCl₂, 2mM DTT és 100ug/ml BSA összetételű pufferben áztatjuk a következő napig, amikor is a szubsztrátokat kis alikvotokra osztjuk, és használatig -20 °C-on tároljuk. Az alikvotozás egyedül a homolog villa esetén esszenciális, a többi szubsztrát 4 °C-on is tárolható, és legalább 2 héten keresztül használható anélkül, hogy a minősége látványosan romlana.

A kísérletek során felhasznált oligonukleotidok nevét és szekvenciáját a függelék tartalmazza. A függelékben ugyancsak megtalálható az egyes szubsztrátok szerkezete szekvencia szintű részletességgel (Függelék, 1-4. ábra).

Plazmid méretű replikációs villa modell szubsztrát

A szubsztrát előállításához két plazmidot használunk, mind a kettő Leonard Wu szívességéből áll rendelkezésünkre (Ralf és mtsai, 2006). Mind a két plazmid, pG68 és pG46, eredete a pUC18 plazmidra vezethető vissza. A pG68 hét egymást követő példányban tartalmazza a BbvCI restrikciós endonukleáz felismerőhelyét úgy, hogy az egyes hasítóhelyek 4-6 bázispárra találhatók egymástól. A pG46 mindössze annyiban különbözik a pG68-tól, hogy az első és a hetedik BbvCI hely egyetlen nukleotidjának megváltoztatása miatt ezen a plazmidon csak öt felismerőhelye van a BbvCI-nek. A pG68SapI(Het) plazmidot úgy hoztuk létre, hogy a pG68 SapI helyére klónoztuk az O1301 és O1302 nevű oligonukleotidok összeolvasztásával létrehozott szekvenciát. A BbvCI restrikciós endonukleáz egy heterodimer, amely mindkét alegysége önállóan is aktív, de külön-külön csak a felismerőhelyük egyik szálát képesek hasítani. Mivel az egyes felismerőhelyek nagyon közel helyezkednek el egymáshoz, ezért a hasítás után, ha azt csak az egyik alegységgel végeztük, az egyik szálon 11-13 nukleotid hosszúságú oligok találhatók, amelyek a plazmidok további tisztítása során egyszerűen elvesznek, de a BbvCI felismerőhelyek a másik szálon érintetlenek maradnak. Az eredmény egy olyan plazmid ami egy rést tartalmaz az egyik szálon (Függelék, 5. ábra).

A szubsztrát előállítása során az egyik plazmidot (pG46) a BbvCI enzim Nt.BbvCI (New England Biolabs; NEB) nevű alegységével hasítjuk, ami egy 46 nukleotid hosszúságú folytonossági hiányt hoz létre a plazmidon (pG46B). A másik plazmid (pG68) Nb.BbvCI (NEB) emésztése egy 64 nukleotidnyi rést hoz létre (pG68A), ami komplementer a pG46B megfelelő részével. A hasítási procedúra a reakció termékeinek agaróz gélen történő elválasztásával követhető. Ezt követően a pG46B plazmid 5' foszfátját alkalikus foszfatáz kezeléssel eltávolítjuk, és a reakciót a Qiagen cég gél extrakciós kitjével megtisztítjuk. A pG68A plazmidot XhoI restrikciós endonukleázzal megemésztetjük, ez közvetlenül a BbvCI hasítóhelyek mellett ismeri fel a plazmidot, majd hasonlóan az előbb leírtakhoz megtisztítjuk. Az így kapott lineáris plazmidot pG68AXh-nak nevezzük. A pG46B plazmid radioaktívan jelölhető gamma-³²P ATP és T4 polinukleotid kináz (Fermentas) használatával, az így kapott plazmidot nevezzük pG46B'-nak. Jelölés után a pG46B' plazmidot megtisztítjuk a nem beépült radioaktivitástól. Ennek során szintén használhatjuk a Qiagen cég gél extrakciós kitjét. A függelék 5. ábrája szekvencia szintű

részletességgel tünteti fel a pG68 és pG46 plazmidok releváns szekvenciáját, illetőleg az Nb.BbvCI és Nt.BbvCI hasítás után létező szerkezeteket.

A szubsztrát összeolvasztásakor 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂ és 5mM DTT oldatban összekeverjük a pG46B' plazmidot a pG68AXh kis feleslegével. A reakciót 53 °C-os szárazblokk termosztátba helyezzük, majd kikapcsoljuk a termosztátot és hagyjuk, hogy az elegy szobahőmérsékletre lehűljön. Bár a szubsztrát összeolvadása nem kvantitatív, de Rad5 enzimikus aktivitásának vizsgálatát megcélzó kísérletek során a reakció interpretálását a cirkuláris pG46B' jelenléte nem komplikálja, hiszen az annak linearizálásával létrejövő termék is túl nagy ahhoz, hogy az hosszan elmozdulhasson az elektroforézis során (14. és 15. ábra) Tapasztalatunk szerint ezért a szubsztrát nem igényel további tisztítási lépést. A függelék 6. ábrája a model szubsztrát kapcsolódási pontját illusztrálja szekvencia szintű részletességgel.

A kétszálú DNS transzlokáció szubsztrátjainak előállítás

A kétszálú DNS transzlokáció vizsgálatára az általunk használt kísérletes rendszer (*triple-helix displacement*) nem előzmények nélküli, a hármass DNS helixet ilyen jellegű tesztre már korábban kifejlesztették (Saha és mtsai, 2002). A korábbi kísérleti rendszerben a triplex formáló oligo (TFO) egy poli dC-dT szekvencia volt, azonban ez többféle keretben is képes a célszekvenciához olvadni. A mi kísérleti rendszerünkben a TFO oligo (O1377) a dC és dT nukleotidok nem monoton ismétlődő polimere, ami jobban definiált szubsztrát létrehozását teszi lehetővé.

A szubsztrát létrehozása során a két oligonukleotid összeolvasztásával, és az egyszálú region Klenow feltöltésével létrehozott duplexet BamHI/SalI emésztés után pUC19 azonos helyeire klónoztuk. Az egyik ilyen plazmid (pIL1828), melyet az O1356 és O1424 oligonukleotidok használatával állítottunk elő, két egymásba ágyazott BbvCI felismerőhelyet tartalmaz közvetlenül a triplex formáló szekvencia előtt. A BbvCI heterodimer bármely alegysége a szubsztrátot oly módon hasítja, hogy az az emésztett szálon hat nukleotidnyi folytonossági hiányt hoz létre. A másik plazmid (pIL1829), melyet a fentiekhez hasonlóan, de az O1356 és O1425 oligok felhasználásával hoztunk létre szintén két BbvCI helyet tartalmaz, de a két hely közé beépítettünk egy PvuII helyet. A BbvCI heterodimer bármely alegysége a szubsztrátot oly módon hasítja, hogy az az emésztett szál 12 nukleotidnyi folytonossági hiányát hozza létre.

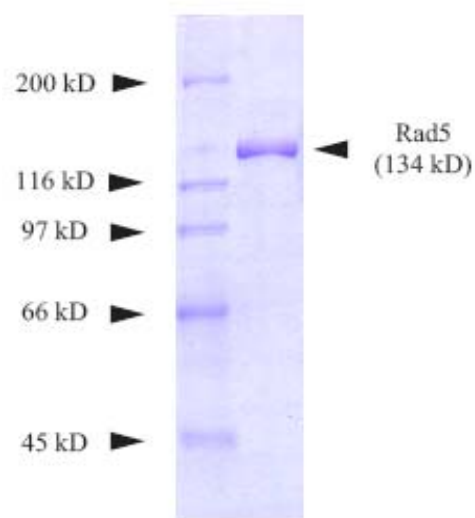
A kísérletekben használt szubsztrátokat úgy állítjuk elő, hogy a célszekvenciát a plazmidról az O1107 és O1108 primerek használatával PCR reakcióval amplifikáltuk és a terméket megtisztítjuk. Bármely szükséges enzimatikus manipulálását a fragmentnek még a TFO hozzáolvasztása előtt elvégezzük, és a terméket újra megtisztítjuk. A radioaktívan végjelölt TFO-t a célszekvenciával 45mM MES-NaOH pH5.5, 15mM MgCl₂ tartalmú pufferben összekeverjük, az elegyet 50 °C-ra fűtött szárazblokk termosztátba helyezzük, és a termosztát kikapcsolása után a blokkot hagyjuk szobahőmérsékletre lehűlni. A szubsztrátokat minden esetben gélen tisztítjuk. A tisztítás során a mintákat 10%-os poliakrilamid gélen (30:0.8 akrilamid: N,N bisz-akrilamid) elektroforézis pufferként 40mM Tris-acetát pH5.5, 5mM Na-acetát, 1mM MgCl₂ oldatot használva választjuk el. Autoradiográfiával azonosítjuk a szubsztrátok helyét a gélen, és a szikével kivágott géldarabkákat 15mM Tris-HCl pH6.8, 10mM MgCl₂ és 1mM DTT, 100ug/ml BSA összetételű pufferben áztatjuk a következő napig. A szubsztrát további tisztítási lépést nem igényel és ha 4 °C-on tároljuk, akkor is legalább 2 héten keresztül használható anélkül, hogy a minősége látványosan romlana. A függelék szekvencia szintű részletességgel tartalmazza az eredmények részben bemutatott szubsztrátok szerkezetét (Függelék, 7. ábra).

A Rad5 tisztítása

A Rad5 expressziójára élesztő sejteket (BJ54.65) és egy élesztőben fenntartható expressziós vektort (pBJ842) használunk. Az élesztő sejt auxotrof a leucinra és az expressziós plazmid tartalmazza a leu2-d gént, ez szolgál a transzformánsok szelekciójára –LEU táptalajon. A Rad5 fehérje expressziójára szolgáló plazmidban a Rad5 cDNS-e a GST (glutathione S-transferase) kódoló régióját követi úgy, hogy a két szekvencia között a PreScission proteáz felismerőhelye helyezkedik el. A fehérje expressziója galaktózzal indukálható.

A Rad5 tisztítása során a transzformánsokat –LEU tápfolyadékban indukáljuk 0.2 % galaktózzal 10 órán keresztül. Ezt követően a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, és a pelletet az ülepített sejtek térfogatával megegyező térfogatú feltáró pufferben (50mM Tris-HCl pH7.5, 50mM KCl, 500mM NaCl, 10 % szukróz, 0.5mM EDTA, 1mM DTT) felfuszpendáljuk. A szuszpenziót folyékony nitrogénbe cseppentjük és a fagyott labdacsokat elektromos kávédarálóval porrá törjük. Hagyjuk a port felolvadni, majd alapos centrifugálás után az extraktot 50-100 mikroliter glutation gyöngyön (GE Healthcare) átcsorgatjuk. A gyöngyöt háromszor 1 milliliter feltáró

pufferrel, majd 1 milliliter PreScission pufferrel (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT) mossuk. A gyöngyöket 100 mikroliter PreScission puffer és 1-2.5 mikrogramm GST-PreScission proteáz jelenlétében 4 °C-on inkubáljuk másnap reggelig, amikor a gyöngy felülűszót összegyűjtjük, alikvotozzuk, és -80 °C-on tároljuk. Egy tipikusnak mondható tisztítás SDS-poliakrilamid gél elektroforézis utáni eredménye látható a 6. ábrán. A Rad5 ATPáz mutáns fehérjében a 681. és 682. aminosavak helyett (aszparaginsav és glutaminsav) helyett mindkét esetben alanin található. Azt, hogy ez a fehérje valóban nem DNS függő ATPáz kísérletesen is beláttuk (Blastyák és mtsai, 2007). Az ATPáz defektív fehérjét a vad típusú Rad5-tel megegyező módon tisztítjuk; abban a kísérletben, ahol a vad típusú Rad5 és az ATPáz mutáns Rad5 fehérje együtt szerepel, olyan preparátumait használtuk a két fehérjének, melyeket egymással párhuzamosan tisztítottunk. Mind a Rad5, mind a Rad5 ATPáz defektív mutáns expressziós vector (pIL101 és pIL668) Louise Prakash és Satya Prakash szívességéből áll rendelkezésünkre.



6. ábra A képen a tisztított Rad5 preparátum látható 8%-os SDS poliakrilamid-gél elektroforézis és Coomassie BB festés után. A marker fehérjék (500ng mindegyik) molekulásúlyát feltüntettük. Az egyes fehérjékre nyílhegy mutat a gélen.

A dolgozatban kontrollként használt RecQ5béta tisztításához használt expressziós vektor Pavel Janscak szívességéből áll rendelkezésünkre. Tekintve, hogy a RecQ5béta részletes vizsgálata nem tárgya a jelen értekezésnek, ezért a fehérje tisztításával kapcsolatban a szerzők eredeti cikkére utalok (Garcia és mtsai, 2004).

A Rad5 DNS kötésének és enzimatis aktivitásának vizsgálata oligonukleotid alapú replikációs villa, és egyéb modell szubsztrátokon

A Rad5 aktivitásának vizsgálata során használt kísérleti kondíciók alapja a 20mM Tris-HCl pH7.0, 10% glycerol, 1mM DTT és 100ug/ml BSA összetételű puffer. Valamennyi esetben a szubsztrát koncentrációja körülbelül 0.5nM, ez hozzávetőlegesen 10-20 ezer cpm radioaktivitásnak felel meg 10 mikroliteres reakciónként. A gél retardáció vizsgálata során a reakcióelegy nem tartalmaz kofaktort, és a minták elektroforézise során 4.5%-os akrilamid gélt és 0.5X TB elektroforézis puffert használunk. Az elektroforézis után a gélt fixáljuk, szárítjuk és az eredményt PhosphorImager Analyzer (Molecular Dynamics) használatával elemezzük.

Korábbi kísérletek alapján a Rad5 fehérje és az ATP közötti interakció disszociációs konstansa körülbelül 0.5mM (Johnson és mtsai, 1994). Azért, hogy a kofaktor mennyisége ne limitálja a reakciót, a legtöbb olyan kísérletben, mely a Rad5 ATP függő aktivitásának vizsgálatát célozza meg a kofaktor (Fermentas, R0441) koncentrációja 5mM volt. Az egyetlen kivétel a “csirkeláb” szerkezet mozgatása, ahol a bemutatott kísérletben az ATP koncentrációja 1mM volt. Minden reakció a kofaktorral egyező koncentrációban tartalmazott $MgCl_2$ -ot is. A reakciókat jégen mérjük össze, és a Rad5 mindig az utolsóként hozzáért komponense az elegynek. A reakciókat 37 °C-on inkubáljuk 5 percig, majd azonos térfogatú Stop-pufferrel (10% glycerol, 1% SDS, 0.02% brómfenolkék, 1mg/ml Proteináz K) leállítjuk és újabb 5 percig inkubáljuk. Ezt követően a reakció termékeit 10%-os poliakrilamid gélen 1X Tris-borát elektroforézis puffert használva választjuk el.

A Rad5 enzimatis aktivitásának vizsgálata plazmid méretű replikációs villa modell szubsztráton

Ezek a reakciók annyiban különböznek az előzőekben leírtaktól, hogy a reakciókat az összemérés után két mikroliterenként alikvotozzuk, és csak ezután kezdjük inkubálni 37 °C-on. Öt perc után a reakciókat jégre helyezzük, és kiegészítjük 12 mikroliter alkalmas restrikciós endonukleázzal, melyet előzőleg a gyártó által ajánlott pufferben 2U/12 mikroliter koncentrációra hígítottunk. Az emésztéseket 45 percig inkubáljuk 37 °C-on, a reakciókat Stop-pufferrel leállítjuk, majd a reakció termékeit 6%-os natív akrilamid gélen, a szokásos módon választjuk el. Abban az esetben, amikor az elegy egyszálú DNS kötő fehérjét is tartalmazott (E. coli SSB; GE Healthcare) azt még

a Rad5 előtt hozzáadtuk a DNS szubsztráthoz. Azt, hogy az általunk használt kísérleti körülmények között az SSB valóban képes egyszálú DNS kvantitatív megkötésére gél retardációs kísérletben igazoltuk, ez a kontrol kísérlet nincs bemutatva a dolgozatban.

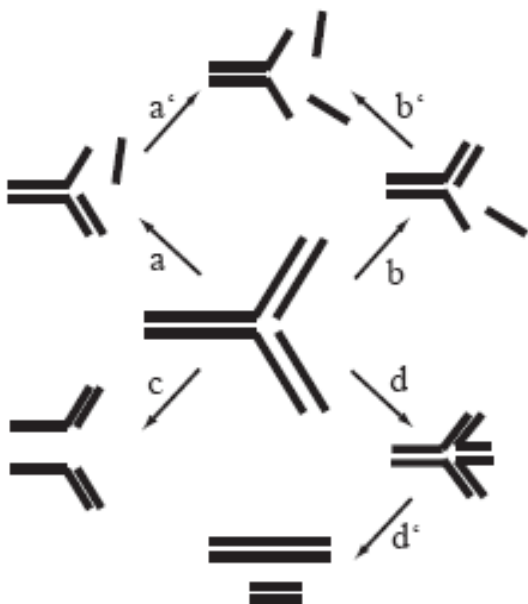
A Rad5 kétszálú DNS transzlokáz aktivitásának vizsgálatára (triple helix displacement assay)

Ezen reakciók összeállítása nem különbözik a korábban leírtaktól. A termékek elválasztásának kondícióit a transzlokáz aktivitás vizsgálatára szolgáló szubsztrátok preparálása kapcsán ismertettük.

Eredmények

Elméleti megfontolások

A kísérleti rendszer tervezésekor alapos megfontolás után a következő racionális feltevést fogalmaztuk meg. Látni kell, hogy a villa megfordításának kezdeti lépése, az újonnan szintetizálódó szálak letekeredése alapvetően konzisztens egy olyan mechanizmussal, amit egy DNS helikáz hajt végre. A közvetlenül ez után kialakuló szerkezet mozgatása azonban alapvetően ellentétes egy helikáz által katalizált reakcióval; ennek feladata ugyanis a párosodott szálak közötti kapcsolat megszüntetése, és nem azok egy új szerkezetté átrendezése. Könnyen belátható, hogy *in vivo* a replikációs villa, és *in vitro* a replikációs villa lényeges aspektusainak modellje számtalan különböző módon processzálódhat; a villa megfordítása mindössze egy ezen lehetőségek közül, és az egyes lehetőségek kölcsönösen kizárják egymást (7. ábra). Egy olyan biokémiai rendszernek, melyet azzal az igénnyel hozunk létre, hogy a villa megfordítását tanulmányozzuk számolnia kell azzal a lehetőséggel, hogy a vizsgálandó enzim nem helikáz, és a kísérleti rendszernek képesnek kell lennie arra, hogy a villa megfordítását megkülönböztesse a villa más módon történő processzálásától.



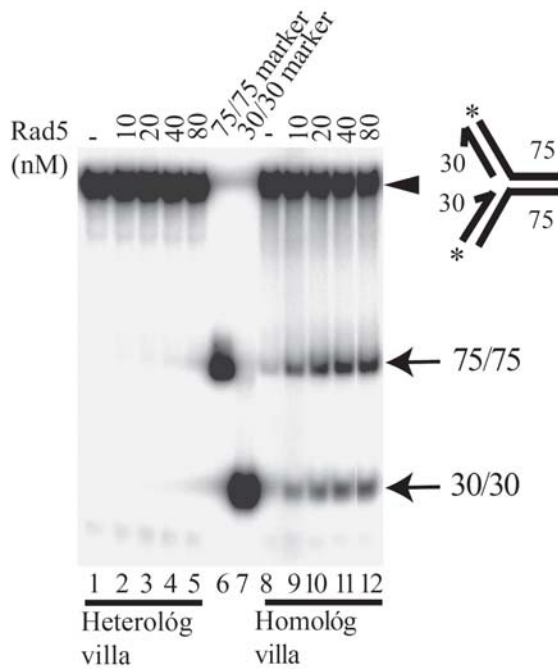
7. ábra A replikációs villa, és annak *in vitro* modellje szubsztrátja lehet helikázoknak és/vagy a villa megfordítását végző enzimnek. Az ábra a villa átrendeződésének a szubsztrát integritására gyakorolt következményeit illusztrálja. Az „a” és „b” mutatja azt a lehetőséget, amikor a születő szálak valamelyike leválik a villáról; „a” és „b” ezen reakciók termékeinek további processzálódását illusztrálja. További lehetőség a villa szülői szálak mentén történő szétválása („c”). A „d” lehetőség a villa megfordítására utal, véges hosszúságú szubsztráton a reakció eredménye két kétszálú termék („d”). Vegyük észre, hogy a villa megfordítása és az egyéb módon történő processzálása egymást kizáró reakciók.

A villa megfordításának feltétele az, hogy szülői szálak komplementerek legyenek, csak ebben esetben képzelhető el a csirkeláb szerkezet kialakulása. Természetesen egy ilyen homológ villa is szubsztrátja lehet egy helikáznak. Ha a szülői szálak nem komplementerek az ilyen heterológ szerkezet csak helikáz-szerű módon processzálódhat. Ha a modell szubsztrátunk nem túlságosan nagy, akkor a reakció teljesen végbemegy; egy helikáz szálakká bontja a villát a 7. ábrán látható módon, a villa megfordítása eredményeként pedig két kétszálú terméké alakítja. Tegyük fel, hogy a Rad5 csak helikáz, ez a lehetőség akkor sem zárható ki, ha irodalmi adatok ezt nem támasztották alá, hiszen elképzelhető, hogy a Rad5 DNS kötése specifikus egy adott DNS szerkezetre, és az aktivitása ilyenformán nem feltétlenül lesz nyilvánvaló a kanonikus helikáz szubsztátokon. Ebben az esetben nem várhatunk különbséget a heterológ és a homológ villa enzimikus átalakítása során. Ha feltesszük, hogy a Rad5 képes a villa megfordítására és helikáz aktivitása is van; ebben az esetben a homológ villán kapott eredmény a két külön aktivitás eredményének a szuperpozíciója lesz. Ebben az esetben a homológ szubsztrát hatékonyabb processzálása lehet indikatív a villa megfordítására. Végül pedig, tegyük fel, hogy a Rad5 csak és kizárólag a villa megfordításának képességével rendelkezik, ebben az esetben nem fogunk aktivitást megfigyelni a heterológ villán, de a homológ villa Rad5 függő módon kétszálú termékekké alakul át. Ha a fentieket kiegészítjük azzal a hipotézissel, hogy a Rad5 *in vitro* is szükséges és elégséges a villa megfordításához, akkor kezd kirajzolódni egy alkalmas biokémiai kísérleti rendszernek a képe; azaz a feladatunk annak vizsgálata, hogy homogenitásig tisztított Rad5 fehérje képes-e ATP függő módon replikációs villa modell szubsztrátok processzálására olyan módon, mely mód konzisztens a modell szubsztrát megfordításával.

A Rad5 aktivitása oligonukleotid alapú replikációs villa modell szubsztrátokon

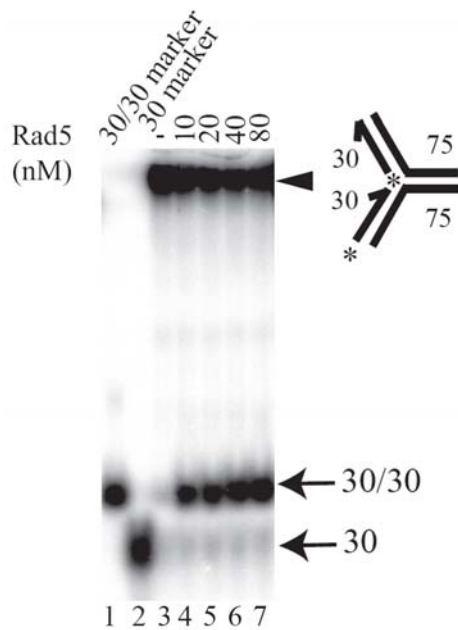
Azért, hogy az előbb részletezett elméleti lehetőségek között választani tudjunk replikációs villa modell szubsztrátokat konstruáltunk oligonukleotidokból. Az egyik villa homológ, azaz a villa karjai egymás komplementerei, a másik villánk heterológ. A villák mindkét karja 30 bázispár hosszú és a szülői szálnak megfelelő régió 45 bázispár hosszú. A villák radioaktív jelölése során az újonnan szintetizálódó vezető szál modelljének megfelelő oligot, és a késlekedő szállal komplementer oligot jelöltük meg. ATP jelenlétében inkubáltuk ezeket a szubsztrátokat Rad5 fehérjével, és a reakció termékeit poliakrilamid gélen elválasztottuk. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy a Rad5 nem képes a heterológ villa processzálására; ez összhangban van a korábbi

megfigyelésekkel, mely szerint a Rad5 nem helikáz. Ezzel szemben a Rad5 képes volt a homológ villa szétszerelésére kétszálú termékekké (8. ábra). Ez egyértelműen arra utal, hogy a Rad5 képes a villa megfordítására, de nem olyan módon, hogy helikázként működik.



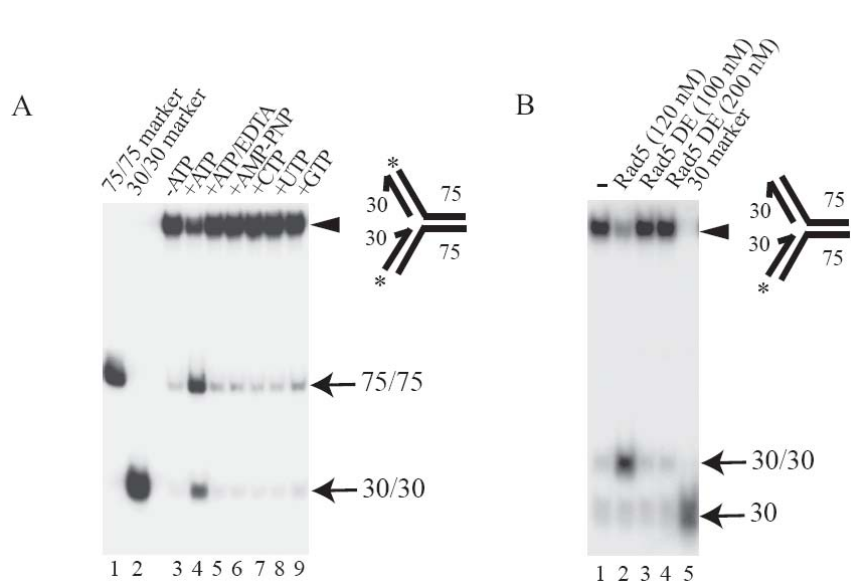
8. ábra A kísérlet a Rad5 aktivitását mutatja be heterológ és homológ replikációs villa model szubsztráton. Azt, hogy az egyes reakciókban mely szubsztrátot használtuk az ábra alján megjelöltük; az egyes reakciókat egyedi számozás is jelöli. Az egyes reakciókban használt enzimkoncentrációt az ábra tetején tüntettük fel. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. A radioaktívan jelölt 5' véget csillag jelöli, az újonnan szintetizálódó szálakat modellező oligonukleotidok esetén pedig nyíllal jelöltük a szál 3' végét. Ugyancsak nyíllal jelöltük a kísérletben használt DNS markerek pozícióját, ezen markerek a kétszálú 75mer, és kétszálú 30mer voltak (6-os és 7-es számokkal jelölve). A Rad5 jól láthatóan katalizálja a homológ villa konverzióját kétszálú termékekké, de nem hat a heterológ villa szerkezetére.

Ha a reakciót helyesen interpretáljuk, akkor az olyan homológ villa szubsztráttal, amelyen csak az újonnan szintetizálódó szálakat jelöltük meg, csak a kisebb kétszálú terméket fogjuk megfigyelni. Ez valóban így is volt, és ez a kísérlet egyben azt is kizárta, hogy a kísérlet során a homológ villa processzálódásának egyéb útja is létezne, mint például az, hogy heteroduplexekké szétszerelődik (9. ábra). Logikailag ez a következtetés nyilvánvaló kell legyen abból a tényből is, hogy a heterológ villát a Rad5 nem képes szétszerelni.



9. ábra A kísérlet során a Rad5 aktivitását teszteltük olyan homológ replikációs villa model szubsztráton, ahol csak az újonnan szintetizálódó szálakat modellező oligonukleotidokat jelöltük radioaktívan, ez utóbbit csillaggal jelöltük, míg az oligók 3' végére nyílhegy utal. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. Az egyes reakciókat egyedi számozás is jelöli, és az ábra tetején feltüntettük a reakcióban használt Rad5 koncentrációt. Nyíllal jelöltük a kísérletben használt DNS markerek pozícióját, melyek kétszálú 30mer, és egyszálú 30mer voltak (1-es és 2-es számokkal jelölve). Ezen homológ villa szétszerelődése után csak a kétszálú 30mer terméket lehet megfigyelni, de az egyszálú 30mert nem. Az eredmény arra utal, hogy a Rad5 nem képes a villát annak megfordításán kívül más módon is processzálni.

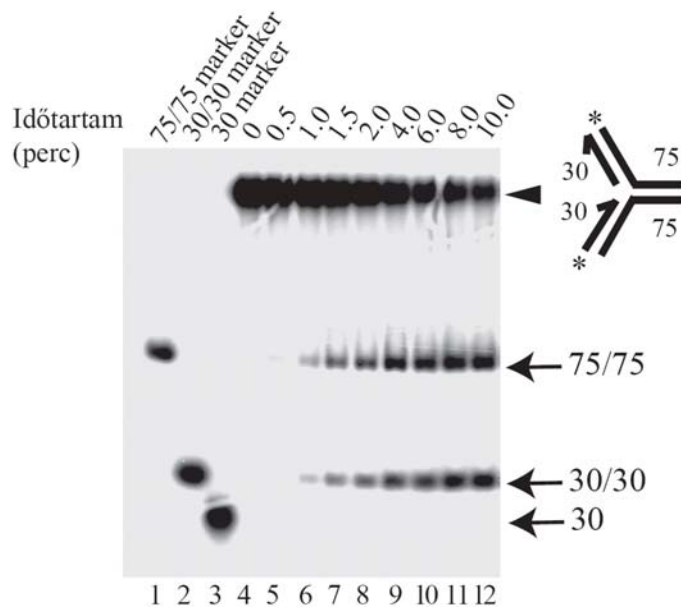
A reakcióhoz magnézium és ATP elengedhetetlenül szükséges, ez utóbbit más ribonukleotiddal nem lehet helyettesíteni. Ugyancsak sikerült belátnunk, hogy a Rad5 működéséhez a kofaktor hidrolízise szükséges, hiszen az ATP-t nem lehet annak nem hidrolizálható analógjával (*5'-adenylyl- β,γ -imidodiphosphate*, *AMP-PNP*) helyettesíteni (10. ábra, A panel, 6. reakció). A Rad5 fehérjében a nukleotid kofaktor kötéséért felelős DEGH motívum AAGH-ra változtatása megszünteti a fehérje ATPáz aktivitását, és a mutáns fehérje immáron nem képes a modell szubsztrát átalakításának katalízisére (Blastyák és mtsai, 2008) (10. ábra, B panel). Ebből következően az általunk megfigyelt aktivitás a Rad5 fehérje sajátja, és nem a preparátumban esetleg előforduló kontamináció következménye.



10. ábra Az ábra a Rad5 reakció kofaktor függését illusztrálja, és azt, hogy a megfigyelt aktivitás a Rad5 saját aktivitása. Az ábra „A” részén bemutatott kísérletben a Rad5 aktivitását olyan homológ replikációs villa model szubsztráton teszteltük, ahol az egyik újonnan szintetizálódó szálat és a vele ellentétes szülői szálat modellező oligonukleotidokat jelöltük radioaktívan; a „B” részén

bemutatott kísérletben csak a szintézis késlekedő szálanak modellje hordoz radioaktivitást. A radioaktív jelle csillag, az újonnan szintetizálódó szálat modellező oligonukleotidok 3' végére nyílhegy utal. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. Az egyes reakciókat az ábra mindkét részén egyedi számozás jelöli. Az ábra „A” részén bemutatott kísérletben a Rad5 koncentrációja 120nM volt. A kofaktor koncentrációja 5mM volt és a reakciók a kofattal egyező mennyiségű MgCl₂-t is tartalmaztak. A kivétel az 5. számú reakció, amelyben a MgCl₂-t 10mM EDTA-val helyettesítettük. DNS molekulásúly markerként kétszálú 75mert és kétszálú 30mert használtunk (1-es és 2-es számmal, valamint nyíllal jelölve). A kísérlet demonstrálja, hogy a Rad5 aktivitásához Mg-ion, ATP és a kofaktor hidrolízise elengedhetetlenül szükséges. Az ábra „B” részén bemutatott kísérletben a vad típusú Rad5, és az ATPáz funkcióban defektív fehérje (Rad5 DE) aktivitását hasonlítottuk össze. A fehérjék koncentrációját az ábra tetején tüntettük fel. Az ábra „A” részéhez hasonlóan jelöltük a DNS marker pozícióját, mely ebben az esetben egy 30mer oligo volt (5-ös számmal jelölve). A kísérlet azt demonstrálja, hogy az általunk megfigyelt aktivitás a Rad5 fehérje sajátja, és nem a fehérje preparátumot szennyező aktivitás következménye.

A fenti kísérletek eredményéből nem nyilvánvaló, hogy a Rad5 működése során nem arról van-e szó, hogy az egyes villák helikáz-szerű módon szétszerelődnek ugyan, de az egyes szálak gyorsan párosodnak is a megfelelő komplementer szekvenciával. Ezt a lehetőséget a reakció kinetikájának vizsgálata cáfolta, ennek során ugyanis azt találtuk, hogy a 11. ábrán látható módon jelölt homológ villa processzálása során a két kétszálú termék precízen azonos kinetikával jelenik meg, de egyszálú DNS intermedier nem figyelhető meg a reakció menete során (11. ábra).

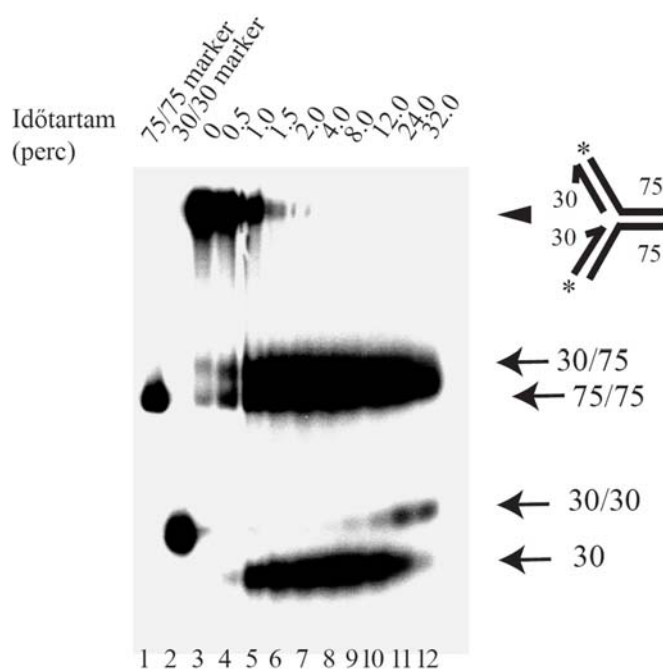


11. ábra Az ábra a Rad5 által katalizált reakció kinetikáját mutatja be. A kísérlet során a Rad5 (25nM) aktivitását teszteltük olyan homológ replikációs villa model szubsztráton, ahol az egyik újonnan szintetizálódó szálát és a vele ellentétes szülői szálát modellező oligonukleotidokat jelöltük radioaktívan (csillaggal jelölve). Az újonnan szintetizálódó szálakat modellező oligonukleotidok 3' végére nyílhegy utal. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. A kísérletben a reakció inkubálása során az egyes időpontokban mintát vettünk és vizsgáltuk a

processzált szubsztrát mennyiségét. Az egyes reakciókat az ábra alján egyedi számozás jelöli, és a reakciók hosszát az ábra tetején tüntettük fel. DNS molekulásúly markerként kétszálú 75mert, kétszálú 30mert és egyszálú 30mer oligonukleotidot használtunk (1-es, 2-es és 3-as számmal, valamint nyíllal jelölve). A kísérlet során azt figyeltük meg, hogy a két kétszálú termék precízen ugyanazzal a kinetikával jelenik meg, és a reakciónak egyszálú DNS nem intermediere. Mindez arra utal, hogy a szubsztrát processzállásakor az egyes szálak átrendezése precízen összehangolva történik.

Ezen a ponton érdemes megjegyezni, hogy más laboratóriumok véleménye szerint az SF2 nagycsaládba tartozó RecQ helikázok képesek lehetnek a replikációs villa megfordítására, legalábbis ez lenne levonható a humán RecQ fehérjék vizsgálatából. Ez a következtetés azon alapul, hogy ha parciálisan homológ villákat inkubálnak, mondjuk a RecQ5 béta fehérjével, akkor az inkubálás után olyan termékeket is meg lehet figyelni, amelyek a villa megfordítására utalnak (Ralf és mtsai, 2006; Machwe és mtsai, 2007; Kanagaraj és mtsai, 2006; Machwe és mtsai, 2006). Ez arra utalhat, hogy a RecQ családba tartozó fehérjék helikázok és(!) villamegfordító enzimek lennének egyszerre. Nem kívánom részletezni azt, hogy a RecQ családba tartozó fehérjék miért nem lehetnek *in vivo* azok az enzimek, amelyek a villa megfordításáért felelősek. Ezen a ponton csak visszautalok arra, hogy a reakció végeredménye önmagában nem utal egyértelműen a reakció mechanizmusára, ezért újrazivsgáltuk a RecQ5 béta aktivitását az általunk használt homológ villán úgy, hogy követtük a szubsztrát processzállódásának a kinetikáját. A kísérlet eredménye arra utal, hogy az egyes termékek

megjelenése és a szubsztrát fogyása kinetikailag teljesen különböző folyamatok eredménye. (8. ábra). Mivel a RecQ5 béta által katalizált reakció során mindössze másfél perc alatt elfogy az összes szubsztrát, de a kétszálú 30mer csak jóval ez után jelenik meg, ezért feltételezzük, hogy a RecQ5 béta működése során a villa először változatos módon, mindazonáltal teljesen szétszerelődik oligogokká, heteroduplexekké. Ezt követően az egyes termékek összeolvadhatnak oly módon, hogy a villa megfordítását illetően diagnosztikus kétszálú 30mer is megfigyelhető, azonban ebben az esetben ennek megjelenése a szubsztrát processzálasától alapvetően független esemény (12. ábra, 6. és 10. reakciók). Ahhoz, hogy a RecQ5 béta által katalizált reakció mechanizmusát minden részletében helyesen interpretálhassuk szükséges lenne a kísérlet sokkal körültekintőbb markerelése, mint például a parciális villák és az egyszálú 75mer marker alkalmazása. Ennek hiányában is alappal jelenthető ki, hogy a RecQ5 bétának bizonyosan nincs villamegfordító aktivitása, és a szakirodalomban ezt illetően fellelhető következtetések alapvetően hibásak. Az eredmény demonstrálja, hogy reakció kinetikájának vizsgálata az adott kísérleti elrendezésben elengedhetetlen, továbbá azt, hogy az a Rad5 által katalizált reakció mechanizmusának részleteit illetően valóban informatív.



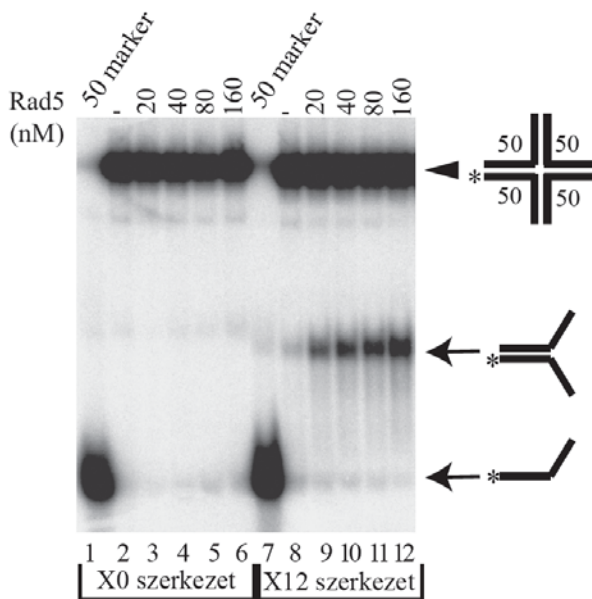
12. ábra Az ábra a RecQ5béta helikáz hatását mutatja által katalizált reakció kinetikáját mutatja be olyan homológ replikációs villa model szubsztráton, ahol az egyik újonnan szintetizálódó szálát és a vele ellentétes szülői szálát modellező oligonukleotidokat jelöltük radioaktívan. A radioaktív jelre csillag, az újonnan szintetizálódó szálakat modellező oligonukleotidok 3' végére nyílhegy utal. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. A kísérletben a reakció inkubálása során az egyes időpontokban mintát vettünk és vizsgáltuk a processzált szubsztrát mennyiségét. Az egyes reakciókat az ábra alján egyedi számozás jelöli, és a reakciók hosszát az ábra tetején tüntettük fel. DNS

molekulasúly markerként kétszálú 75mert és kétszálú 30mert használtunk (1-es és 2- számmal, valamint nyíllal jelölve). Ugyancsak nyíl jelöli a reakció termékei közül az egyszálú 30mert és a 30/75 parciális heteroduplexet; ezek

pozíciójára egyéb kísérleteink alapján egyértelműen lehet következtetni. Vegyük észre, hogy bár az összes szubsztrát elfogyott a reakció indítását követő 1.5 perc múlva (6. reakció) a kétszálú termék csak 12 perc elteltével (10. reakció) jelenik meg. Ez egyértelműen arra utal, hogy a RecQ5béta nem a villa megfordításával processzálja a szubsztrátot.

A Rad5 aktivitása a „csirkeláb” szerkezet modelljén

A replikációs villa megfordítása után kialakuló négykarú szerkezet alapvetően különbözik a kiindulási szerkezettől, de bizonyosan szubsztrátja a reakciónak. Ebből következően a Rad5 képes kell legyen olyan szubsztrát mozgásának katalizálására (*branch migration*), mely modellje a „csirkeláb” szerkezetnek. Kiemelendő, hogy ebben az esetben is igaz, hogy a négykarú szerkezet mozgatása és helikáz-szerű szétoldása bizonyosan kompetitív mechanizmusok; a Rad5 fehérjétől a fentiek fényében azt várjuk, hogy mozgassa a szubsztátot, ami mozgatható, de ne legyen hatása a statikus szerkezetre. Megvizsgáltuk tehát a Rad5 hatását egy olyan négyszálú szerkezeten ahol a négy kar között nincs homológia, és egy olyan szerkezeten, ahol a karok homológok; ez utóbbi esetben szükséges, hogy a szubsztrát spontán mozgását limitáljuk azzal, hogy legalább a négy kar vége ne legyen teljesen homológ. Ez a tény sajnos nyilvánvalóan csökkentette ennek a szubsztrátnak az értékét abból a szempontból, hogy mennyire jó modellje a megfordított villának. A kísérlet eredménye a 13. ábrán látható, mely szerint a Rad5 nem hat arra a négyszálú szerkezetre (X0), ahol a karok között nincs homológia, de képes a mozgatható szerkezet (X12) processzálására (13. ábra). Lényeges megjegyezni, hogy a Rad5 ebben a kísérleti elrendezésben lényegesen kevésbé hatékony összehasonlítva azzal az aktivitással, amit a homológ villán figyelhetünk meg (10. ábra, „B” panel, 2 reakció, összehasonlítva a 13. ábra 12. reakciójával). A legvalószínűbb magyarázata ennek, hogy a szerkezet mozgatása során a Rad5 nem képes leküzdeni a karok végén található heterológiát, és ezért a szubsztrát spontán szétolvadása ezeken a pontokon elengedhetetlen feltétele a termék megfigyelésének. Mindazonáltal, ezen kísérleti rendszer korlátait nem szem elől tévesztve is nyilvánvaló, hogy a Rad5 képes a „csirkeláb” szerkezet modelljének a mozgatására, de nem annak egyéb módon történő átalakítására.



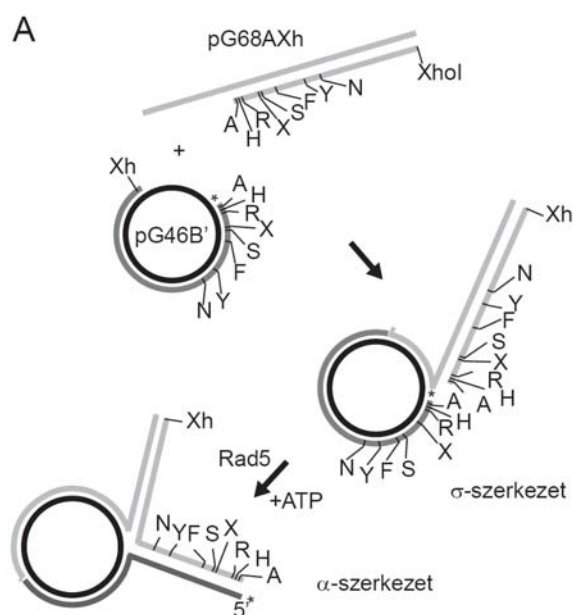
13. ábra Az kísérlet a Rad5 „csirkeláb” mozgató képességét (*branch migration activity*) demonstrálja. A teszt során egy teljesen heterológ (X0), és egy parciálisan heterológ szerkezeten (X12) vizsgáltuk azt, hogy a Rad5 képes-e bármelyik szerkezet processzálására. Azt, hogy az egyes reakciókban mely szubsztrátot használtuk az ábra alján megjelöltük; az egyes reakciókat egyedi számozás is jelöli. Az egyes reakciókban használt enzimm koncentrációt az ábra tetején tüntettük fel. A modell szubsztrátot nyílhegy jelöli, és feltüntettük az egyes oligonukleotidok hosszát. A radioaktívan jelölt 5' véget csillaggal jelöltük meg. DNS markerként egyszálú 50mer oligonukleotidot használtunk.

A kísérlettel kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy a parciálisan heterológ szerkezet nem tökéletes modellje a „csirkelábnak”, ugyanis a szubsztrát stabilitása érdekében a karok vége 19-20 bázispárnyi darabon heterológ. Amennyiben ez a szerkezet szimmetrikusan processzálódik, a reakció terméke egy Y-alakú molekula lesz; ha aszimmetrikusan, akkor az egyik lehetőség az egyszálú 50mer képződése lesz. Az ezeknek a lehetőségeknek megfelelő szerkezetek pozícióját a gélben nyíl jelöli. A kísérlet eredménye arra utal, hogy a Rad5 képes a „csirkeláb” szerkezet vándorlását katalizálni, de nem képes annak egyéb módon történő processzálására.

A Rad5 aktivitása plazmid méretű replikációs villa modell szubsztráton

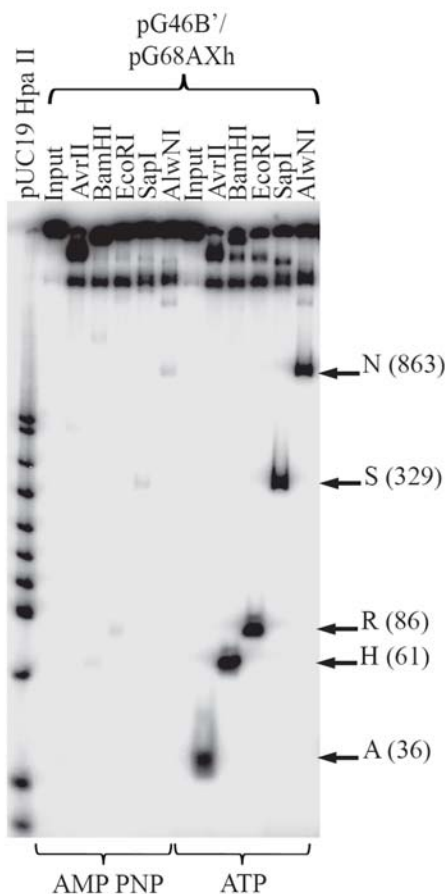
A replikációs villa vezető szálának a blokkja nem feltétlenül jelenti a késlekedő szál szintézisének a blokkját; *in vivo* ez a jelenség nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a replikációs villa megfordulása produktívan járuljon hozzá a blokkolt replikáció menekítéséhez. Ebből következően a blokkolt replikációs villa aszimmetrikus, a két születő szál hossza nem egyezik úgy, mint az a fentebb használt oligo alapú modell szubsztrátok esetén megegyezett (Cordeiro-Stone és mtsai, 1997; Cordeiro-Stone és mtsai, 1999; Pages és Fuchs, 2003; Svoboda és Vos, 1995). Továbbá, a replikációs villa megfordítása *in vivo* olyan mértékű, hogy a „csirkeláb” középső újja akár a 4 kilobázis hosszúságot is elérheti (Higgins és mtsai, 1976). Ahhoz, hogy az *in vivo* replikációs villa szerkezetének ilyen aspektusait is modellezni tudjuk szükséges volt egy olyan replikációs villa modell szubsztrát előállítás, amely aszimmetrikus, és több kilobázis méretű. Ezt a szubsztrátot két, lényegében azonos szekvenciájú, plazmid molekula

összeolvasztásával hoztuk létre (Ralf és mtsai, 2006). Technikailag ez úgy oldható meg, hogy mindkét plazmid tartalmazza a BbvCI restriktív endonukláz felismerőhelyeit, mégpedig közvetlenül egymás után több hasítóhelyet is. A BbvCI két alegység heterodimerje, mind a két alegység önmagában is aktív, de csak az egyik szál hasítására képes. A szubsztrát előállítása során az egyik plazmidot (pG46) a BbvCI enzim Nt.BbvCI nevű alegységével hasítottuk, ami egy 46 nukleotid hosszúságú folytonossági hiányt hoz létre a plazmidon (pG46B). A másik plazmid (pG68) Nb.BbvCI emésztése egy 64 nukleotidnyi rést hoz létre (pG68A), ami komplementer a pG46B megfelelő részével. A radioaktívan jelölt pG46 plazmid (pG46B') és a linearizált pG68A (pG68AXh) összeolvadásával létrejövő szerkezet az ábrán illusztrált módon modellje egy olyan replikációs villának, ahol a késlekedő szál 14 nukleotiddal hosszabb, mint a modell szubsztrát vezető szála (14. ábra, „A” panel). A radioaktív jel a villa megfordítása során a cirkuláris környezetből átvándorol a „csirkeláb” középső újjára, amit restriktív emésztéssel követhetünk. A kísérlet eredménye egyértelműen arra utalt, hogy a Rad5 képes ATP függő módon ennek a modell szubsztrátnak a megfordítására, és a villa megfordulásának a mértéke összemérhető az *in vivo* megfigyelésekkel (14. ábra, „B” panel).



14. ábra Az ábra „A” része a kísérlethez használt szubsztrát szerkezetét illusztrálja. A két komplementer plazmid összeolvadása replikációs villára emlékeztető szerkezetet hoz létre (szigmoid-szerkezet), ahol az egyik kar, amelyik a szintézis vezető szálának a modellje lineáris, a másik kar, amelyik radioaktív (csillaggal jelölve) cirkuláris környezetben helyezkedik el. A villa ATP és Rad5 függő megfordulása (a szigmoid szerkezet alfa szerkezetté alakulása) követhető az alapján, hogy egyedi restriktív hasítóhelyek a reakció során a cirkuláris környezetből a lineárisba kerülnek át a „csirkeláb” középső újjaként. Az egyedi restriktív helyeket betűkkel rövidítve adjuk meg az alábbiak szerint: AvrII: A; BamHI: H; EcoRI: R; BsaXI: X; SapI: S; AflIII: F; BseYI: Y; AlwNI: N; XhoI: Xh.

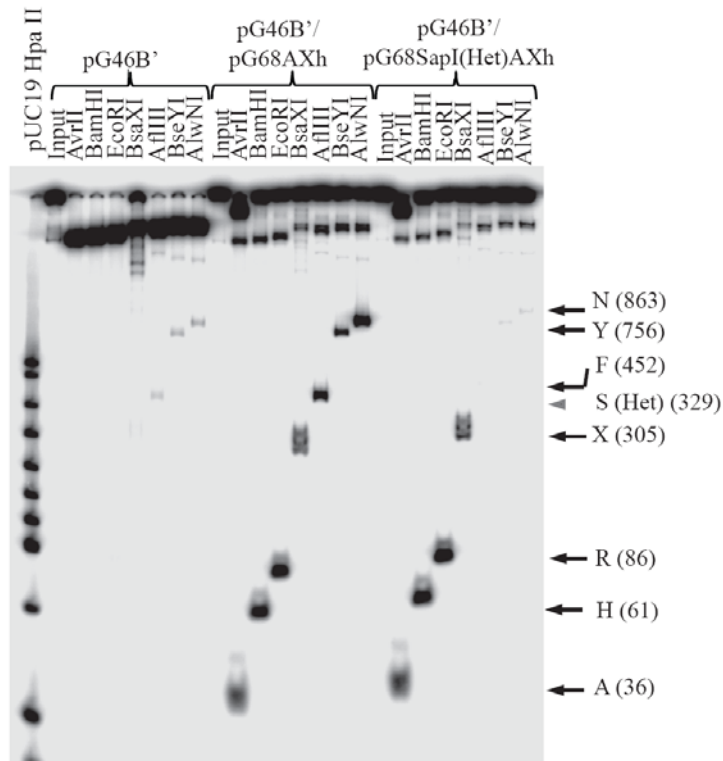
B



Az ábra „B” része azt demonstrálja, hogy a Rad5 (80nM) ATP hidrolízisével képes a plazmid méretű replikációs villa model szubsztrát (pG46B'/pG68AXh) megfordítására. Az aktivitás monitorozására használt restrikciós endonukleázok nevét az ábra tetején tüntettük fel, és a kép mellett nyíl, valamint a használt enzim nevének a rövidítése jelöli a hasítási termék pozícióját. Zárójelben a hasítási termék méretét tüntettük fel. Radioaktívan végjelölt pUC19 HpaII DNS létrát használtunk molekulasúly markerként.

A kísérlet eredményeként jól látható, hogy a „csirkeláb” középső újja akár 863 bázispár hosszú is lehet. Ez összemérhető azzal a becsléssel, amit az *in vivo* reakció mértékére adhatunk.

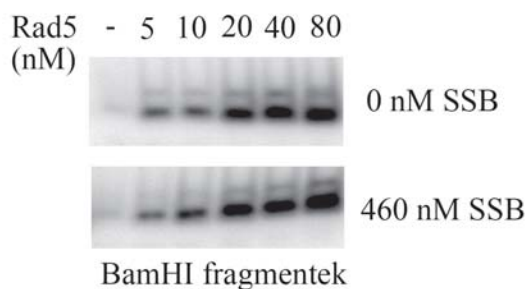
Az, hogy a reakció egy „csirkeláb” intermedieren keresztül zajlik feltételezi azt, hogy a villa megfordítása során az egyes restrikciós helyek egy bizonyos sorrendben jelennek meg a „csirkeláb” középső újján, azaz a reakció progresszív. A korábban ismertetett kísérleteink arra utalnak, hogy a Rad5 nem képes átlépni viszonylag kisméretű szekvencia heterológiákon. Ebből az következik, hogy a plazmid méretű szubsztráton egy ilyen heterológia meg kell, hogy állítsa a szubsztrát további processzálását. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára a pG68 plazmid SapI helyére egy 30 bázispárnyi heterológ szekvenciát építettünk be (pG68SapI(Het)) és a fentiekben részletezett módon létrehoztuk a heterológiát hordozó plazmid méretű szubsztrátot (pG46B'/pG68SapI(Het)AXh). A kísérletben valóban jól látható volt, hogy bár ez a változás alapvetően nem érinti a szubsztrát processzálhatóságát, de azokat a restrikciós termékeket, amelyek a villa heterológián túlterjedő megfordítására utalnak nem lehetett megfigyelni (15. ábra). Ez a kísérlet igazolja, hogy a Rad5 által katalizált reakció progresszív.



15. ábra Az ábra a plazmid méretű replikációs villa modell szubsztrát megfordításának progresszív mechanizmusát demonstrálja. A Rad5 koncentrációja valamennyi reakcióban 80nM volt. A kísérletben használt szubsztrátok, és a reakció monitorozására használt restriktív endonukleázok nevét az ábra tetején tüntettük fel. A kép mellett nyíl, valamint a használt enzim nevének ábra szerinti rövidítése jelöli a hasítási termék pozícióját. Zárójelben a hasítási termék méretét tüntettük fel. Radioaktívan végjelölt pUC19 HpaII DNS létrát használtunk molekulaszúly markerként. A kísérlet során a pG46B' szolgált negatív kontrollként. A pG46B'/pG68AXh szubsztrát a reakció pozitív kontrollja, ebben az esetben a szubsztrát megfordításának útjában nem áll

szekvencia heterológia. A pG46B'/pG68SapI(Het)AXh szubsztrát egy 30 bázispárnyi heterológiát tartalmaz a pG68 SapI helyére építve (szürke nyílhegy jelöli). A kísérlet eredménye alapján a heterológia „előtt” elhelyezkedő DNS szál része a „csirkeláb” középső újjának, de az azt „követő” szál már nem; erre utal, hogy az AflIII, BseYI és AlwNI enzimek hasításának megfelelő lineáris termékeket a pG46B'/pG68SapI(Het)AXh a szubsztrát processzálása során nem figyelhetjük meg. A tény, hogy a villa megfordítása a heterológián elakad azt implikálja, hogy a reakció mechanizmusa progresszív.

A plazmid méretű szubsztráton is megkíséreltük belátni, hogy a reakció nem jár a szubsztrát jelentős széttekerődésével. Ha jelentősebb hosszúságú egyszálú DNS intermediere lenne a reakciónak, akkor egyszálú DNS kötő fehérjék jelenléte stabilizálhatja ezt az állapotot és megakadályozhatja az egyes szálak összeolvadását a csirkeláb középső újjává. A kísérlet során a villa megfordítását a szubsztrát BamHI hasításával követtük, és az egyszálú DNS kötő fehérje amit használtunk az *Escherichia coli* SSB (single stranded DNA binding protein) fehérjéje volt (16. ábra). Az egyszálú DNS kötő fehérje semmilyen hatással nem volt a Rad5 által katalizált reakcióra, ebből következően a reakció mechanizmusának nem része az egyes DNS szálak extenzív letekeredése.

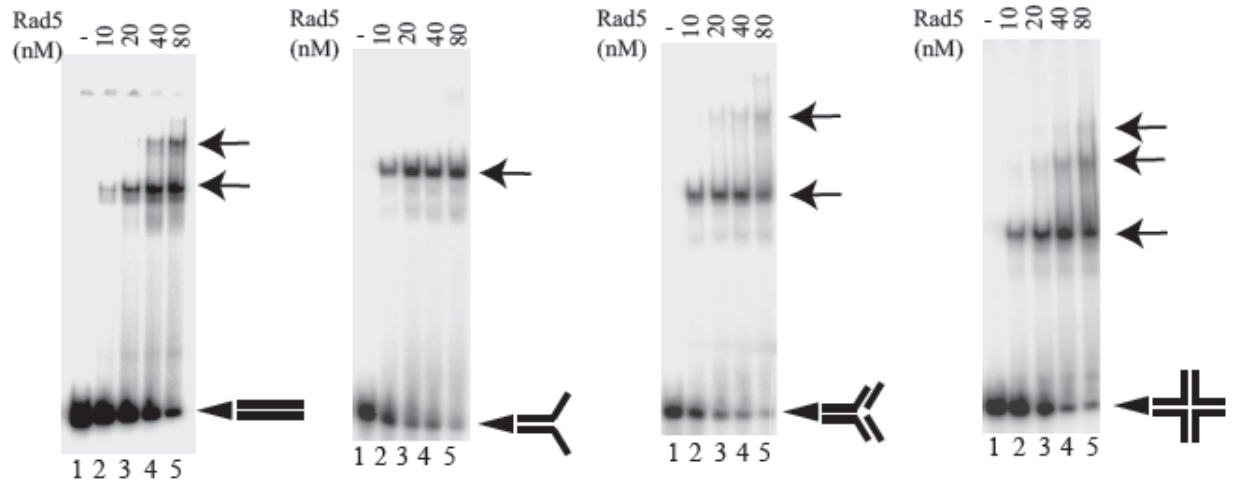


16. ábra A bemutatott kísérlet során a Rad5 aktivitását teszteltük plazmid méretű replikációs villa modell szubsztráton egyszálú DNS kötő fehérje jelenlétében. A pG46B'/pG68AXh szubsztrát megfordítását BamHI emésztéssel monitoroztuk. Az egyes reakciókban használt enzimkoncentrációt az ábra tetején, az egyszálú DNS kötő fehérje mennyiségét (E. coli SSB) pedig a kép jobb oldalán tüntettük fel. Az SSB jelenléte nem gátolta a Rad5 aktivitását, ami arra utal, hogy a reakció mechanizmusának

nem része az egyes DNS szálak extenzív letekeredése.

A Rad5 DNS kötésének vizsgálata

A heterológ és homológ villa megkülönböztetéséből nyilvánvaló kell legyen, hogy a Rad5 aktivitása nem azért korlátozódik a replikációs villa megfordítására, mert a replikációs villa az egyetlen szubsztrát amit köt; a szubsztrátspecifitás feltehetőleg a reakció mechanizmusából következik. Nem megkerülhető azonban az a lehetőség, hogy a specifitásnak része a szubsztrát struktúraspecifikus kötése; ez már csak azért is izgalmas lehetőség, mert lehetőséget kínál annak megértésére, hogy miként azonosíthatja a Rad5 a leendő szubsztrátját *in vivo*. Gél retardációs kísérletben teszteltük a Rad5 kötését kétszálú 75mer DNS-hez, Y-villához, heterológ szimmetrikus villához és statikus „csirkeláb” modell szubsztrátokhoz (17. ábra, „A”-„D”). A kísérlet eredménye szerint a Rad5 egyformán jól köti mind a négy szubsztrátot. Ez arra utal, hogy a Rad5 nem struktúraspecifikus fehérje, és a kötőhelye lehet bármilyen kétszálú DNS. A számos egyéb szubsztrát mellett, amit hasonló kísérletben teszteltünk egyedül az egyszálú DNS szubsztrátokat nem kötötte a Rad5 (nem bemutatott adat). Ez összhangban van azzal a korábbi eredménnyel és saját kísérleteinkkel is, hogy a Rad5 nem egyszálú DNS transzlokázként, azaz nem helikázként működik.

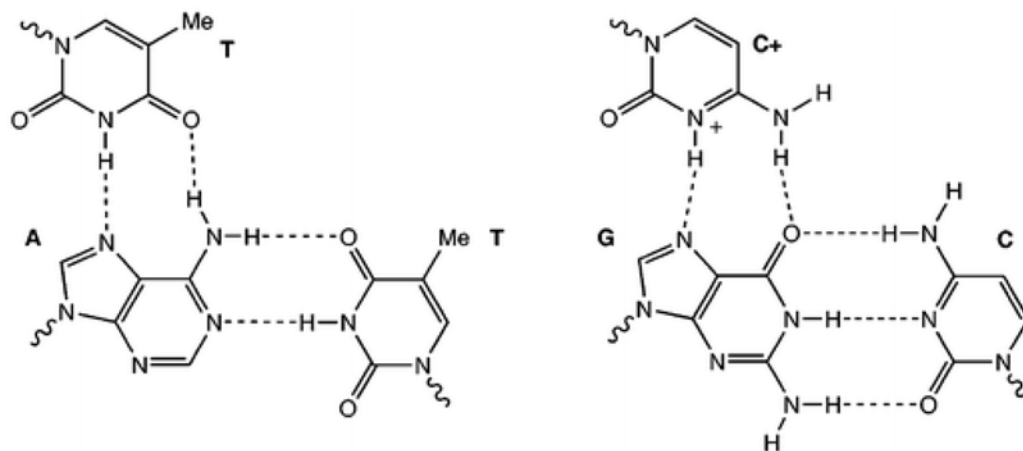


17. ábra A kísérlet során a Rad5 kötését teszteltük kétszálú 75mer DNS, Y-villa, heterológ szimmetrikus villa és statikus „csirkeláb” (X0) modell szubsztátokon (A-D). Az ábra feltünteti a radioaktívan jelölt szubsztátok sematikus szerkezetét, és nyílhegy mutatja a szubsztát pozícióját az autoradiogramon. Az egyes reakciókat egyedi számozás is jelöli és az ábra tetején feltüntettük a reakcióban használt Rad5 koncentrációt. Nyíl jelöli a DNS-protein komplexek pozícióját. Vegyük észre, hogy a szubsztát telítése mind a négy kísérletben hasonló, és az a Rad5 koncentráció, amely a próba 50 százalékának megkötéséhez szükséges mind a négy esetben körülbelül 20nM volt. Ez arra utal, hogy mind a négy szubsztátot közel egyforma erősséggel köti a Rad5. Néhány esetben több DNS-fehérje komplexet is felismerhetünk. Azt a feltevést, hogy a Rad5 felismerőhelye egy legalább 25 nukleotid hosszú kétszálú DNS lenne, alátámasztja, hogy azokon a szubsztátokon figyelhetjük meg több DNS-fehérje komplex kialakulását, melyek több ilyen kötőhelyet kínálnak a Rad5 számára.

A Rad5 kétszálú DNS transzlokáz aktivitásának vizsgálata

Mivel az előzőekben beláttuk, hogy a Rad5 kétszálú DNS-hez nem struktúraspecifikusan köt, ezért felvetődik, hogy a funkcióját a kettős hélix mentén mozogva látja el, azaz elképzelhető, hogy a Rad5 egy kétszálú DNS transzlokáz. Az egyszálú DNS transzlokáz aktivitás próbája, hogy a vizsgált fehérje képes-e a kettős hélix széttekerésére olyan módon, ami függ a duplex régió túlnyúló egyszálú DNS-től, ez utóbbi ugyanis a transzlokáció valódi szubsztátja, és nem a kettős hélix aminek, a széttekeredését követjük. Hasonlóképpen, a kétszálú DNS transzlokáz aktivitás próbája, hogy a vizsgált fehérje képes-e hármasszálú hélix széttekerésére oly módon, hogy annak feltétele a hármasszálú hélixen túlnyúló kétszálú DNS jelenléte (Saha és mtsai, 2002). A DNS, mint triplex váratlannak tűnhet, de kísérletesen létrehozható ilyen szerkezet, ennek az alapja az,

hogy a DNS bázisai nemcsak a jól ismert Watson-Crick módon képesek egymással párosodni, hanem az úgynevezett Hoogsteen felszínükkel is. A triplexben két szál a Watson-Crick felszínén keresztül párosodik, és a harmadik szál a Watson-Crick felszínével párosodik a vele komplementer szál Hoogsteen felszínével. Ezt a lehetőséget az alábbi ábra illusztrálja (18. ábra).

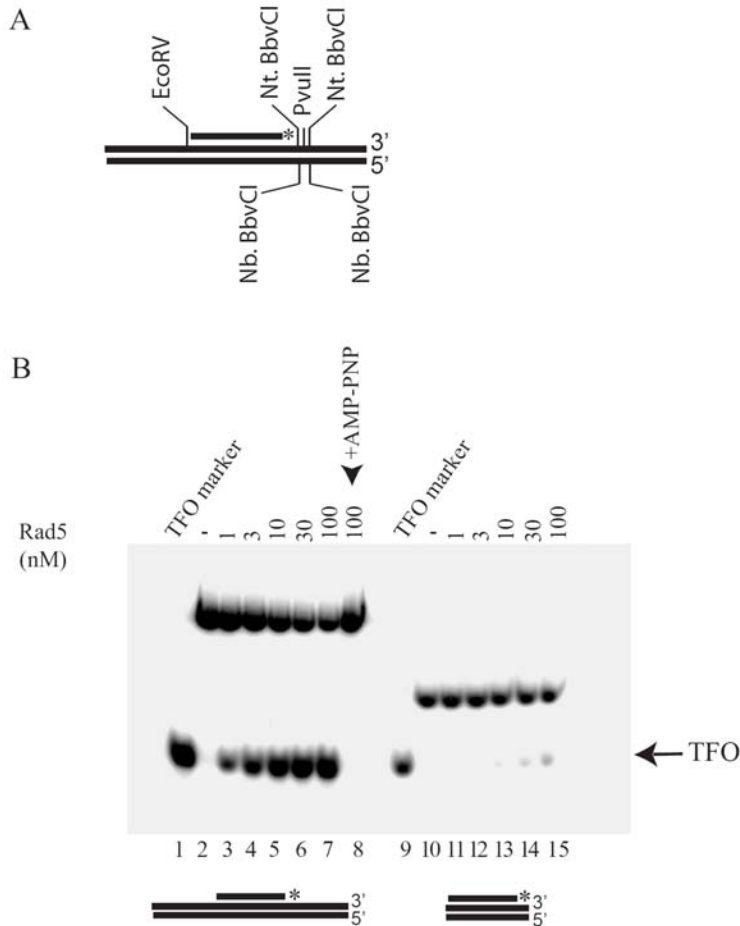


18. ábra A kép a triplex DNS-ben az egyes bázisok között kialakuló hidrogénkötéseket mutatja be. A T-A-T tripletben az adenin felett elhelyezkedő timin a Watson-Crick felszínével párosodik az adenin Hoogsteen felszínével. A C⁺-G-C triplexben a guanin felett elhelyezkedő protonált citozin Watson-Crick felszíne alakítja ki a guanin Hoogsteen felszínével hidrogénkötést.

Az általunk használt szubsztrát esetén a kétszálú DNS transzlokációt a radioaktívan jelölt triplex formáló oligo (TFO) eltávolításával követhetjük (19. ábra, „A” panel). A kísérlet alapján, melyet a 19. ábra mutat be, a Rad5 valóban egy kétszálú DNS transzlokáz, amely aktivitása ATP hidrolízisét igényli (19. ábra, „B” panel). Számos megfigyelés támasztja alá, hogy az adott kísérleti rendszerben a Rad5 szubsztrátja a kétszálú DNS és nem a triplex maga. Először is, a triplex két oldalán található kétszálú régió csonkolása drasztikusan csökkenti a TFO eltávolítását (19. ábra, „B” panel). Másodszor, ha a triplex egyik oldalán a túlnyúló duplexet csonkoljuk, és a másik oldalon közvetlenül a triplexet megelőzően akár az egyik, akár a másik szálon létrehozunk egy 12 nukleotidnyi rést, akkor az szintén gátja a Rad5 működésének ezeken a szubsztrátokon (19. ábra, „C” panel).

Érdekes jelenséget figyelhetünk meg, ha a rés méretét 6 nukleotidra csökkentjük, ennek hatása a két szálon ugyanis nem egyforma. Ha a rés a 3' hidroxil végű szálon van, akkor az teljesen

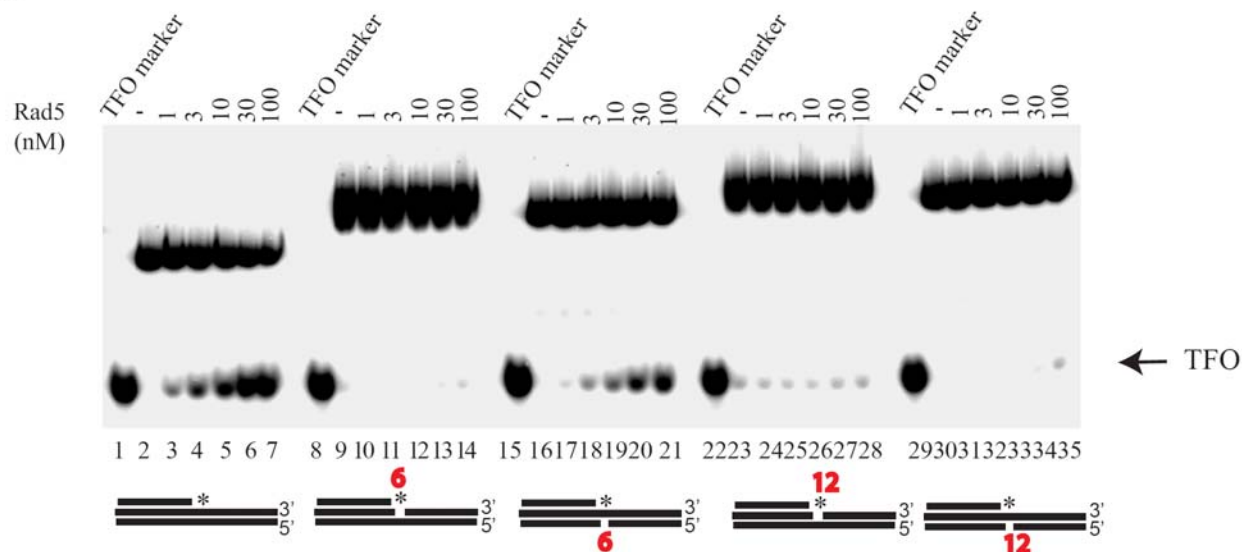
megakadályozza a Rad5 transzlokációját, de az azonos nagyságú folytonossági hiány a másik szálon nincs ilyen hatással (19. ábra „C” panel).



19. ábra Az ábra a Rad5 ATP függő kétszálú DNS transzlokáz aktivitását demonstrálja. Az ábra „A” panelje a kísérlethez használt triplexek szerkezetét illusztrálja. A triplex bázisán feltüntettük az egyes szubsztrátok preparálása során felhasznált restriktív enzimek felismerőhelyeit. Valamennyi kísérletben a triplex formáló oligot (TFO) jelöltük radioaktívan (az ábrán csillaggal jelölve); azt, hogy az egyes reakciókban mely szubsztrátot használtuk az ábra alján a szubsztrát sematikus képével illusztráljuk. A triplex bázisán a folytonossági hiány méretére a 6-os, vagy a 12-es szám utal (pirossal szedve). Az egyes reakciókat egyedi számozás is jelöli. Az egyes reakciókban használt enzimkoncentrációt az ábra tetején tüntettük fel. DNS markerként radioaktív TFO (34mer) szolgált.

Az ábra „B” részén a Rad5 kétszálú DNS transzlokáz aktivitását hasonlítottuk össze egy olyan triplexen, amely a triplex régió túlnyúló kétszálú régiót tartalmaz, és egy olyanon, ahol a kétszálú túlnyúló régiót eltávolítottuk. Az eredmény alapján a triplex régióval szomszédos kétszálú DNS részlet szükséges, hogy a triplex ATP és Rad5 függő disszociációját megfigyelhessük.

C



Az ábra „C” részén a Rad5 kétszálú DNS transzlokáz aktivitását hasonlítottuk össze olyan triplexeken, ahol a triplex régió túlnyúló kétszálú régió intakt, vagy annak az egyik, illetve a másik szálán meghatározott nagyságú folytonossági hiányt hordoz. Az eredmény arra utal, hogy bár a duplex két szála nem egyenértékű a transzlokáció során, de alapvetően mindkét szál épsége szükséges ahhoz, hogy az hatékonyan végbemehessen.

Ennek a magyarázataként azt feltételezzük, hogy a Rad5 fehérje minimum két ponton képes a DNS-sel interakcióba lépni, és az egyik DNS kötő domén (domén „A”) jórészt csak a kétszálú DNS egyik szálával lép interakcióba, a másik (domén „B”) pedig mind a kettővel egyformán. Abban az esetben, ha a domén „A” az, ami a transzlokáció során elől halad, és megszakad annak a DNS szálnak a folytonossága amihez köt, akkor ez érthető módon gátja lesz a fehérje továbblépésének. A másik szál kisméretű folytonossági hiánya ebben az esetben nyilvánvalóan nem jelent akadályt. A modell szerint a domén „A” által felismert szál úgy működik, mint a transzlokáció vezető szála és a Rad5 azon 3'-5' polaritással mozog. Úgy gondoljuk, hogy a domén „B” számára azért nem akadály a DNS hat nukleotidnyi folytonossági hiánya, mert az, hogy az egyik szállal egy ekkora darabon nem alakít ki interakciót, az nem befolyásolja a másik szál kötését. Nem hagyható azonban figyelmen kívül, hogy bár az egyik szál folytonossági hiánya súlyosabb következménnyel jár a transzlokációra, mint a másik szál folytonossági hiánya, a leghatékonyabban mégis az intakt szubsztrát processzálódott a kísérlet során; hasonlítsuk csak össze az ábrán a 2-től 7-ig számozott reakciókat a 16-tól 21-ig számozott reakciókkal (19. ábra, „C” panel). Ez arra utal, hogy a hatékony transzlokációhoz mindkét DNS szál integritása

szükséges. Az, hogy a Rad5 mekkora méretű folytonossági hiányt képes átlépni bizonyosan összefüggésben van azzal, hogy mekkora lépéseket tesz a transzlokáció során. Ennek a jelentőségére az eredmények megvitatásakor térünk rá.

Az eredmények megvitatása

A Rad5 működésének modellje

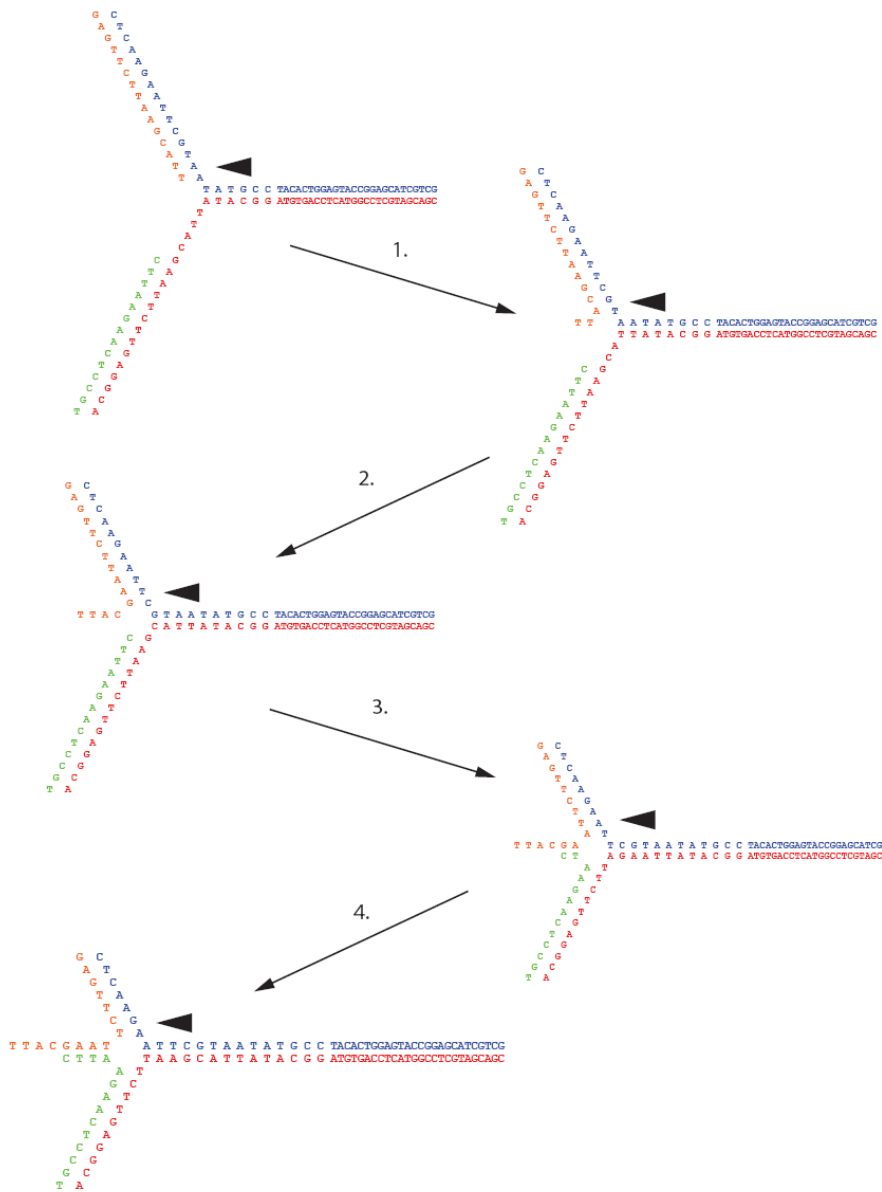
A Rad5, hasonlóan más SWI/SNF2 családba tartozó fehérjékhez egy kétszálú DNS transzlokáz. A SWI/SNF2 családba tartozó fehérjék jó részének a feladata a kromatin szerkezetének átrendezése (*chromatin remodeling*) és ehhez a feladathoz a DNS transzlokáz aktivitásuk szolgáltatja a mechanisztikus alapot (Lusser és Kadonaga, 2003). Lényeges megjegyezni, hogy kevés kivétellel ezek az enzimek multiprotein komplexek motor alegységeként látják el a feladatukat, és az izolált motor alegységnek általában nincs, vagy csak nagyon limitált hatása van a kromatin struktúrájára (Saha és mtsai, 2002). Az általunk azonosított aktivitás a Rad5 sajátja, *in vitro* legalábbis nem igényli járulékos fehérjék jelenlétét.

Hogyan lehet képes egy kétszálú DNS transzlokáz a villa megfordítására, hiszen ezt a funkciót inkább várnánk el egy helikáztól? Mi azt feltételezzük, hogy a Rad5 aktivitása a replikációs villán biokémiailag leírható lehet a kromatin szerkezetének átrendezése mintájára úgy, mint a DNS szálak átrendezése (a *chromatin remodeling* mintájára: *DNA strand remodeling*, *DSR*). Látni kell azonban, hogy ez egy nagyon speciális transzlokázt igényel, elvileg ugyanis nincs akadálya annak, hogy egy DNS transzlokáz a replikációs villa egyik száláról egyszerűen átlépjen a másik szálra, és tegye azt anélkül, hogy komplementer szálak párosodását megváltoztatná. Valóban, az ismert kromatin átstrukturáló komplexek és DNS transzlokázok közül egyetlen egy enzimről tudunk, aminek a DNS szerkezetére a Rad5 aktivitására némileg emlékeztető hatása lenne, számosról pedig bizonyosan tudjuk, hogy nincs ilyen szerepe. Az említett kivétel a Rad54 fehérje, aminek a szerepe a rekombinációban a Holliday szerkezet vándorlásának katalízise (Bugreev és mtsai, 2007; Bugreev és mtsai, 2006). A hasonlóság a Rad5-tel azonban meglehetősen felületes, hiszen a Holliday szerkezet vándorlásának nincs olyan termodinamikai akadálya, mint amit a villa megfordítása jelent.

Modellünk szerint a Rad5 a villa megfordítása során a még nem replikálódott szülői szálát ismeri fel és a transzlokáció során a replikációs villa elágazási pontja felé halad (20. ábra). (Be kell látnunk ugyanis, hogy bármelyik növekvő szálon a transzlokációnak végpontja lesz a

szintetizálódó DNS utolsó beépült nukleotidja, azaz ahol a kétszálú DNS folytonossága megszűnik). Amikor a Rad5 eléri a villa elágazási pontját a továbbhaladás útjában két dolog áll, az egyik a szintetizálódó szál maga, és az a tény, hogy az elágazásnál a DNS nem formál kettős hélixet. Ezt követően a Rad5 DSR aktivitása eltávolítja a szintetizálódott szálát a komplementerétől, mindazonáltal az elágazási pontban immáron hidrogénkötést nem formáló nukleotidok párosodása elengedhetetlenül szükséges az elágazási pont zárásához. Ha ez feltétele a további transzlokációnak, akkor az megmagyarázza azt, hogy miért nem viselkedik a Rad5 fehérje helikázként, hiszen minden egyes lépésben annyi hidrogénkötés szakad fel a szülői és az újonnan szintetizálódó szál között, amennyi hidrogénkötés kialakul a két szülői szál között. *In vivo* a Rad5 ilyen ciklusokon keresztül távolíthatja el a blokkolt replikációs villa késlekedő szálát és ér el a vezető szál 3' végéhez, a replikációs blokk pozíciójához. A vezető szál eltávolítását elképzelhetjük hasonló mechanizmus alapján, mint ahogy a késlekedő szál eltávolítását.

Ha a két szál alapvetően független módon tekerődik le, akkor mi hozza létre a „csirkeláb” középső újját? Nem feltétlenül kell komplikált mechanizmusra gondolni akkor, ha feltételezzük, hogy a folyamat apró lépésekkel halad, ebben az esetben ugyanis a komplementer születő szálak mindig elég közel lesznek egymáshoz, hogy a kapcsolat akár spontán kialakuljon. Másképp megfogalmazva, ha a lépések mérete mondjuk 5 nukleotid, akkor a két születő szál komplementer része bizonyosan nem kerül távolabb egymástól, mint amit ez a távolság a térben jelent. Az, hogy az *in vitro* reakcióra nincs hatással az *E. coli* egyszálú DNS kötő fehérjeje azt mutatja, hogy a lépés mérete bizonyosan kisebb, mint ezen fehérje minimális kötőhelye. Még közelebbi becslést adhatunk a lépés méretére, ha felidézzük, hogy a kétszálú DNS transzlokáz kísérlet szerint egy 12 nukleotidnyi folytonossági hiány a DNS bármely szálán megakadályozza a fehérje további transzlokációját. Tekintettel arra, hogy a transzlokáció során a DNS-hez minimum két ponton kapcsolódnia kell az enzimnek, ezért a lépés mérete valószínűleg kisebb, vagy egyenlő, mint 6 nukleotid. A 20. ábrán bemutatott modell szerkesztésekor feltételeztük azt, hogy a lépés mérete kettő nukleotid.



20. ábra A modell a replikációs villa megfordulásának egyes lépéseit illusztrálja. A szintézis késlekedő szálát narancssárga, a vezető szálát zöld, a szülői szálakat kék és piros szín jelöli. A kiindulási villa késlekedő szála 4 nukleotiddal hosszabb, mint a vezető szál. A nyílhegy a Rad5 mozgásának irányát jelzi a transzlokáció során. A modell szerkesztése során feltételeztük, hogy a Rad5 a transzlokáció során minden egyes lépéssel két nukleotidnyi távolságot tesz meg. A képen bemutatott négy lépés sorrendjét számozott nyilakkal jelöltük.

Azt követően, hogy a polimeráz feltöltötte a „csirkeláb” középső újját, a négyszálú szerkezet mozgatásával a replikációs villa helyreáll. Ezen szerkezet mozgatásához a Rad5 elégségesnek látszik, de annak iránya immáron ellentétes kell legyen a villa megfordításának irányával. Arra,

hogy mi az a döntés, ami a vándorlás irányát megszabja és szükség esetén megváltoztatja, nos, erre a modell ebben a formájában nem ad választ.

A modell alapvetően egy olyan villa megfordítását írja le, ami nem károsodott, de úgy gondoljuk, hogy a károsodott villa megfordítása is így mehet végbe. Az ilyen szerkezetek processzálása során válhat lényegessé az egyes lépések mérete abból a szempontból, hogy bizonyos gyakori DNS hibák, mint az UV indukált pirimidin dimerek két nukleotidot is érintenek egyszerre. Ha a transzlokáció során az egyes lépések mérete nagyobb, mint maga a károsodás, akkor a villa megfordítása során a Rad5 képes lehet ezeken átlépni. Ezért úgy becsüljük, hogy a Rad5 lépéseinek a mérete feltehetőleg nagyobb, mint két nukleotid. Érdekes megjegyezni, hogy az élesztő sejtekben bizonyos ismétlődő szekvenciák, jellemzően két nukleotidnyi ismétlődések lényegesen instabilabbak, mint a genom többi része. Rad5 hiányában ez ilyen szekvenciák stabilabbak, azaz a Rad5 működése elősegíti ezen szekvenciák instabilitását {Johnson, 1992 114 /id}. Ez némileg összecseng a Rad5 működéséről kialakított modellünkkel; ha a lépések mérete mindössze néhány nukleotid és a csirkeláb középső újja spontán alakul ki, akkor ez a mechanizmus pontosan az ilyen rövid, mindössze néhány nukleotid hosszúságú ismétlődő szekvenciák instabilitását segítheti elő azzal, hogy lehetőséget ad a replikáció során a templát-primer egy elcsúszott keretű összeolvadására. Lehetséges, hogy ez az a kockázat amit a sejt a replikációs villa komplikált átrendezéséért kénytelen vállalni.

Lényeges megjegyezni, hogy a villa megfordításának fentebb ismertett modellje lényegében csak azt képes leírni, hogy a DNS szerkezet miként változik a Rad5 által katalizált reakció során, de nem informatív azt illetően, hogy a Rad5 fehérjével mi is történik az egyes lépésekben. A modell szándékolta minimalista abban az értelemben, hogy a létező legkevesebb „speciális” funkciót tulajdonítja a Rad5 fehérjének. Nem része a modellnek az, hogy a Rad5 interakciója a villával milyen, az adott struktúrára specifikus módon valósul meg. A tény, hogy a Rad5 nem struktúraspecifikus DNS kötő fehérje arra utalhat, hogy a replikációs villa megfordulása során a szubsztráttal kialakított interakciójának nem feltétlenül része a szintézis késlekedő és/vagy vezető szálával kialakított interakció, azaz nincs olyan speciális DNS kötő doménje a fehérjének, ami csak a villa megkötésénél játszik szerepet. Elképzelhető azonban, hogy a Rad5 fehérje egyes DNS kötő doménjei közötti kapcsolat flexibilis annyira, hogy képes áthidalni a villa elágazási

pontját és a produktív Rad5-szubsztrát komplexben a Rad5 egyszerre alakít ki a szülői és az újonnan szintetizálódó szálakkal DNS-fehérje interakciót. Hasonlóan nem világos, hogy az egyes újonnan szintetizálódó szálak eltávolítása miként történik; működhet-e úgy a Rad5, mint egy molekuláris méretű véső, vagy csak azt használja ki, hogy a DNS végek környékén a hidrogénkötések akár rövid ideig tartó megszűnése is lehetővé teheti azt, hogy a fehérje újabb lépést tegyen és ezzel megakadályozza a végek visszaolvadását. Végezetül, feltételeztük ugyan, hogy a „csirkeláb” középső ujja akár spontán is kialakulhat, de ezzel együtt elképzelhető, hogy a Rad5 rendelkezik egy olyan doménnel, ami az egyes szálakat a villa mozgatása során végig olyan pozícióban tartja, ami azok párosodását elősegíti. Minden olyan mechanisztikus részlet, ami a fehérje egy bizonyos „speciális” funkcióját igényli tárgya lehet a jövőben olyan jellegű vizsgálatoknak, melyek ezen funkciók specifikus inaktiválását célozzák meg. A Rad5 fehérje humán homológjainak szerepe bizonyos tumorok képződésében megalapozottnak látszik, ezért az ilyen jellegű vizsgálatok bizonyosan nem csak az alap kutatás, hanem az eredmények alkalmazása szempontjából sem érdektelenek (Moinova és mtsai, 2002; Motegi és mtsai, 2006; Sood és mtsai, 2003; Unk és mtsai, 2006; Unk és mtsai, 2008). Sajnos a szakirodalom jelenlegi állása szerint a SWI/SNF2 családon belül egyelőre egyedül a Rad54 fehérje egy részletének a kristályszerkezete ismert és ez nem teszi lehetővé, hogy általában erre a családra, és különösen a Rad5 működésére vonatkozóan általános mechanisztikus modellt javasolhassunk (Thoma és mtsai, 2005).

A Rad5 és a klasszikus helikázok viszonya

Hosszú éveken keresztül elfogadott volt az a következtetés, hogy a Rad5 nem játszhat direkt szerepet a replikációs villa megfordításában, hiszen nincs helikáz aktivitása. A dolgozatban ismertetett eredmények közvetlen hozadékai azon elméleti megfontolásunknak, hogy a Rad5 a villa megfordítása során esetleg nem helikázként működik. A kísérleteink fényében érdemes végiggondolni, hogy az eredmények mennyiben igazolják a kezdeti koncepciókat, azaz a Rad5 funkciója milyen módon illeszthető bele a klasszikus helikáz definícióba, avagy mennyiben határolható el attól.

Nyilvánvaló, hogy a reakció, legalábbis a mikroszkópikus részleteket illetően a két DNS lánc közötti Watson-Crick párok megszűnésével jár; ilyen értelemben a Rad5 feltétlenül helikáz. Látnunk kell azonban, hogy a replikációs villa megfordulása során a kezdeti és a végállapotot

összehasonlítva a Watson-Crick párok számának nettó változása zero. Ebből a szempontból a Rad5 már világosan különbözik a helikázoktól, melyek működése során a Watson-Crick párok száma folyamatosan csökken. Továbbá, az ismert DNS helikázok egyszálú DNS transzlokázok, a Rad5 pedig kétszálú DNS transzlokáz, hasonlóan a kromatin szerkezetének átrendezéséért felelős enzimkomplexek működéséhez. A triplex szubsztrát processzálása annyiban feltétlenül hasonlít a kanonikus helikáz szubsztrátok processzálásához, hogy ennek során is csökken a hidrogénkötések száma, habár ezek Hoogsteen, és nem Watson-Crick párok. Ez a kísérleti elrendezés azonban bizonyosan nem definiálhat helikázként egy fehérjét, mert ebben az esetben, *reductio ad absurdum*, a kromatin szerkezetének átrendezését végző enzimek is helikázok lennének, ami nyilvánvalóan nem így van. A Rad5 funkciójának klasszifikációja a fentiek fényében nyilvánvalóan problémát jelent.

A helikáz funkciójú fehérjék „halmazát” nyilvánvalóan az definiálja, hogy mi azon fehérjéknek a közös tulajdonsága, amelyeket helikáznak nevezünk. Ha ezt a közös tulajdonságot a kísérletes megközelítés felől próbáljuk megragadni, akkor látnunk kell, hogy a helikáz kifejezés alapvetően egy adott fehérje azon képességére utal, hogy képes a kanonikus helikáz szubsztrátok helikáz-szerű processzálására; azaz: a helikázok olyan egyszálú DNS transzlokázok, amelyek a helikáz aktivitás vizsgálatára használatos kísérleti elrendezésben helikázként viselkednek. Mindezek miatt, a Rad5 fehérje funkciójára helikáz aktivitásként hivatkozni bizonyosan nem korrekt abban az értelemben, hogy bár a helikáz jelző némileg leíró a fehérje működésére nézve, de bizonyos követelményeket is támaszt annak biokémiai viselkedésével kapcsolatban, mely követelményeknek a Rad5 nem felel meg. A Rad5 villamegfordító aktivitását ismertető közleményünkben magunk is elkövettük a hibát, hogy a Rad5 aktivitására helikáz aktivitásként hivatkozunk, de a helikáz klasszifikációval való szakításunkat csak a közlést követő kísérleteink, nevezetesen a kétszálú DNS transzlokáz aktivitás felismerése tette véglegessé (Blastyák és mtsai, 2007). A Rad5 aktivitásának jelenlegi ismereteink szerinti korrekt definíciója valami olyasmi, hogy „kétszálú DNS transzlokáz, mely aktivitása a replikációs villa megfordulására specifikus”; ezt kétségkívül nehéz egyetlen szóval összefoglalni, de ebben a formájában a kifejezés kellően leíró a fehérje működésére nézve.

Összességében, a helikáz definíció a jelenlegi értelmezések szerint egyszerűen túl szűk ahhoz, hogy azt a Rad5 aktivitásának leírására egyértelműen alkalmazni lehessen, bár a kifejezés egy meglehetősen tág értelmezése szerint a Rad5 is egy helikáz. A jövőre nézve elképzelhetőnek tartjuk, hogy a helikáz kifejezés szerkezet és funkció szerinti tagolása megszüntetheti a fentebb vázolt problémákat oly módon, hogy “A típusú” enzimként hivatkozhatnánk azokra a klasszikus értelemben vett helikázokra, amelyek egyszálú DNS transzlokázok és képesek a kanonikus helikáz szubsztrátok processzáására; jelenlegi ismereteink szerint ilyen az összes SF1 nagycsaládba tartozó fehérje, de valamennyi másik nagycsaládban találhatunk “A típusú” enzimeket. A “B típusú” enzimek lehetnének azok a kétszálú DNS transzlokázok, amelyek funkciója nem DNS-fehérje interakciók, hanem a Rad5 fehérjéhez hasonló módon DNS szubsztrátok szerkezetének az átrendezése. Bizonyosan külön kategóriát jelentenek azok a transzlokázok, amelyek DNS-fehérje interakciók megváltoztatására specializáltak, ezek lehetnének a “C” és “D” típusú enzimek attól függően, hogy egyszálú, vagy kétszálú DNS transzlokázról van-e szó. Az “E” típusú helikáz-szerű fehérjék azok az enzimek lennének, amelyek nem transzlokázok, mint például a MOT1. Egy ilyen osztályozás szerint a Rad5 SF2 “B típusú” enzim, a nukleoszóma-DNS interakciót átrendező enzimek pedig az SF2 “D típusú” enzimek.

A blokkolt replikációs villa processzáálásának következményei

Általában igaz, hogy egy adott károsodás több reparációs mechanizmus szubsztrátja lehet, és ez igaznak látszik a tolerancia mechanizmusokra is. Bizonyosan állítható, hogy a blokkolt replikációs villa processzáálására nem a villa megfordítása az egyetlen mód, elméleti megfontolások alapján a homológ rekombináció tűnik úgy, mint a villa menekítésének egy alternatív útja (Ralf és mtsai, 2006; San és mtsai, 2008). Alkalikus szukróz grádiensen azonban a homológ rekombinációban mutáns sejtek (a Rad52 episztázis csoport tagjai) kevésbé defektívek a poszt-replikációs reparációban (Prakash, 1981). Eukariótákban a Rad52 episztázis csoport egyik tagja, a Rad51 fehérje feladata a rekombináció első lépésének végrehajtása. A rekombináció során egy egyszálú szekvencia „támadja” a vele komplementer kettős hélixet és ezen támadó szál leszorítja a vele megegyező szekvenciájú szálát a kettős hélixről, ezt a reakciót katalizálja a Rad51 (San és mtsai, 2008). Élesztőben egy egyszálú DNS transzlokáz, az Srs2 fehérje szerepe a rekombináció gátlása a blokkolt villán, teszi ezt úgy, hogy az egyszálú DNS-re gyöngyfűzészerűen felfűződött Rad51 molekulákat eltávolítja (Ulrich, 2001; Friedl és mtsai,

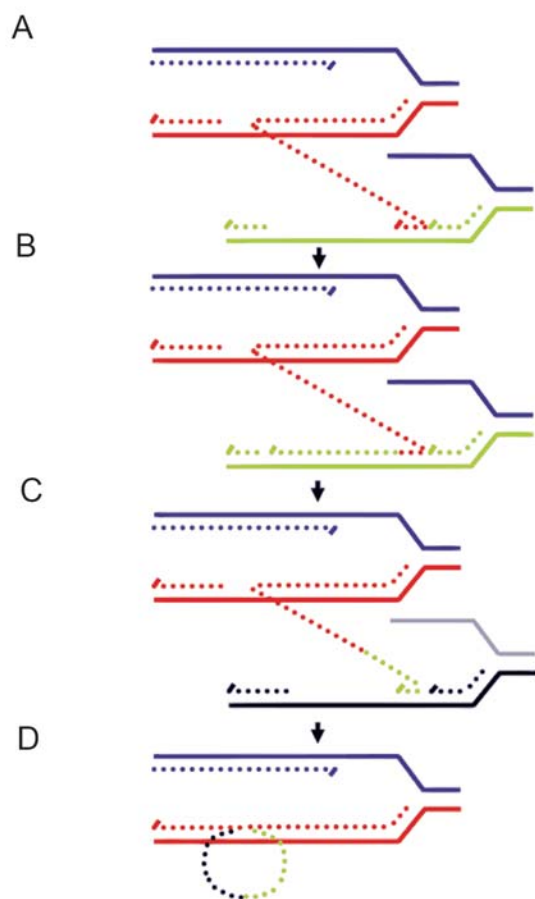
2001; Veaute és mtsai, 2003; Krejci és mtsai, 2003). A tény, hogy külön mechanizmus evolválódott a rekombináció gátlására arra utal, hogy a villa rekombinációs menekítésének jelentős kockázata van.

Magasabbrendű eukariótákban a genom szerkezetének átrendezése számos esetben közvetlen oka lehet különböző megbetegedéseknek, ugyanis bizonyos gének kópiaszámának változása önmagában a sejt egészének működésére van hatással. Bizonyos esetekben a genom egészének instabilitása az, ami a megbetegedés alapvető jellemzője; a rosszindulatú tumorok genomja olyan mértékig átrendeződött lehet, hogy az akár több száz genomi régió kópiaszámának változását eredményezheti. A genom instabilitása általában jellemző a tumorokra, és a tumor eredete szempontjából számos esetben nehéz eldönteni, hogy mely gének mutációi a közvetlen okai a tumoros fenotípusnak („*driver*” mutációk) és melyek azok, amelyek mutációinak nincs közvetlen hatása a tumor kialakulására, azaz csak a genom instabilitásának mintegy melléktermékei („*passenger*” mutációk) (Parsons és mtsai, 2005; Wood és mtsai, 2007).

A humán genom több mint 5 százaléka tartalmaz ismétlődő elemeket, és a genomi átrendeződések jelentős része ilyen szekvenciákat érint. Számos esetben lehet szinte bázispáryi pontossággal ugyanazt az átrendeződést azonosítani olyan páciensekben, akik között nincs leszármazási kapcsolat, ez arra utal, hogy a szekvenciák közötti homológia az egyik oka a genom átrendeződésének (*recurrent rearrangements*). Bizonyosnak látszik ilyen esetekben, hogy a nem allélikus homológ rekombináció volt az oka a genom átrendeződések egy részének {Lupski, 2004; Lupski és Stankiewicz, 2005; Stankiewicz és Lupski, 2002}. Nem teljesen világos azonban, hogy a replikációnak mi a genom instabilitásában betöltött szerepe, azaz, hogy az illegitim rekombináció mennyiben a replikációs villa menekítésének a következménye.

Nemrégiben a Pelizaeus-Merzbacher megbetegedésben (*Pelizaeus-Merzbacher disease, PMD*) szenvedő páciensek proteolipid protein 1 nevű (PLP1) génjének az analízise egy alapvetően új mechanizmusra mutatott rá, melynek a szerepe a genom instabilitásában általános lehet (Lee és mtsai, 2007). Általában a PLP1 gén duplikációja, ritkábban a PLP1 delécióna a PMD oka, a PMD pedig egy neurodegeneratív elváltozás; jelen mondanivalónk szempontjából csak az érdekes, hogy ennek a megbetegedésnek az oka a PLP1 gén környezetének olyan átrendeződése, amely a

PLP1 gén kópiaszámát érinti. PMD páciensek PLP1 génjének szekvenenciaanalízise alapján az átrendeződések minden esetben mások voltak (*non-recurrent rearrangements*), bár minden esetben érintették a PLP1 gén szomszédságában található ismétlődő szekvenciák valamelyikét. Az átrendeződések minden esetben túl komplikáltak voltak ahhoz, hogy egyszerű rekombinációval megmagyarázható lett volna a létrejöttük; általában nagy duplikációkat kisebb deléciók és normális kópiaszámú elemek szakítottak meg. Valamennyi átrendeződés interpretálható volt annak a feltételezésével, hogy a replikáció során a replikációs villa szétszerelődött, és az egyik újonnan szintetizálódott szál egy akár néhány bázispárnyi homológiát használva bekötött egy másik replikációs villa szülői szálához, és a szintézis innen folytatódott. Ezt követően a hibrid villa is szétszerelődhet és egy ugyancsak akár néhány bázispárnyi mikrohomológiát használva egy újabb replikációs villához kötődhet, majd vissza az eredeti replikációs villa templát szálához; ezt az esetet illusztrálja a 21. ábra. Ez akár többször is megismétlődhet, és attól függően, hogy az adott villa előtt, avagy mögötte haladó villára vált a letekeredett szülői szál, a folyamat eredménye deléció, vagy duplikáció; ha pedig innen vissza az eredeti villára, az nem jár kópiaszám változással (Lee és mtsai, 2007).



21. ábra Az ábra a replikációs villa szétszerelődésének és a szintézis során előforduló templátváltásnak a következményei illusztrálja. Az ábra “A” részén a blokkolt replikációs villa (sötétkéssel és pirossal jelölve) késlekedő szála (szaggatott vonal jelöli) letekeredik és akár néhány nukleotidnyi homológ szekvenciát használva támadja egy másik villa szülői szálát (zölddel jelölve). A villa ilyen szétszerelődését bizonyosan egy helikáz hajtja végre. A letekeredett szál a szülői szálát templátként használja (“B”), majd a hibrid késlekedő szál újra támadhat egy másik villát is (szürke és fekete színekkel jelölve) és azt templátként használhatja, hasonlóan az előző eseményhez (“C”). Ha a késlekedő szál ezt követően visszavált az eredeti villára, akkor a fenti mechanizmus végeredménye az lesz, hogy két duplikálódott szekvenciát egy normális kópiaszámú követ. Lényeges megjegyezni, hogy a duplikáció eredete nem feltétlenül a kiindulási villa

közvetlen genomi környezete. Lee és munkatársai adatai szerint a replikáció során a villa váltása többször is megtörténhet, ami még sokkal komplikáltabb genomi átrendeződésekhez vezethet (Lee és mtsai, 2007).

A duplikációk és deléciók akár 190 kilobázisnyi DNS szakaszt is érinthetnek; ez még akkor is a villa nagyon extenzív széttekeredésére utal, ha feltételezzük, hogy *in vivo* a replikációs villák a sejtmag egy bizonyos részében, azaz egymáshoz topológiailag rögzítetten helyezkednek el. Távolról sem bizonyos, de mindenesetre reális hipotézis, hogy a templátváltásban és a mikrohomológiák összeillesztésében a homológ rekombinációs apparátusnak, legalábbis a Rad51-nek szerepe van, ennek a szubsztrátja ugyanis egyszálú DNS. Ezen a ponton válhat nyilvánvalóvá annak a jelentősége, hogy miért lenne rendkívül veszélyes egy olyan mechanizmus, ami a replikációs villa menekítését következetesen egy olyan helikázzal valósítaná meg, ami a replikációs villa átstrukturálását egy kevésbé összehangolt módon, hosszú egyszálú DNS darabok exponálásán keresztül valósítaná meg.

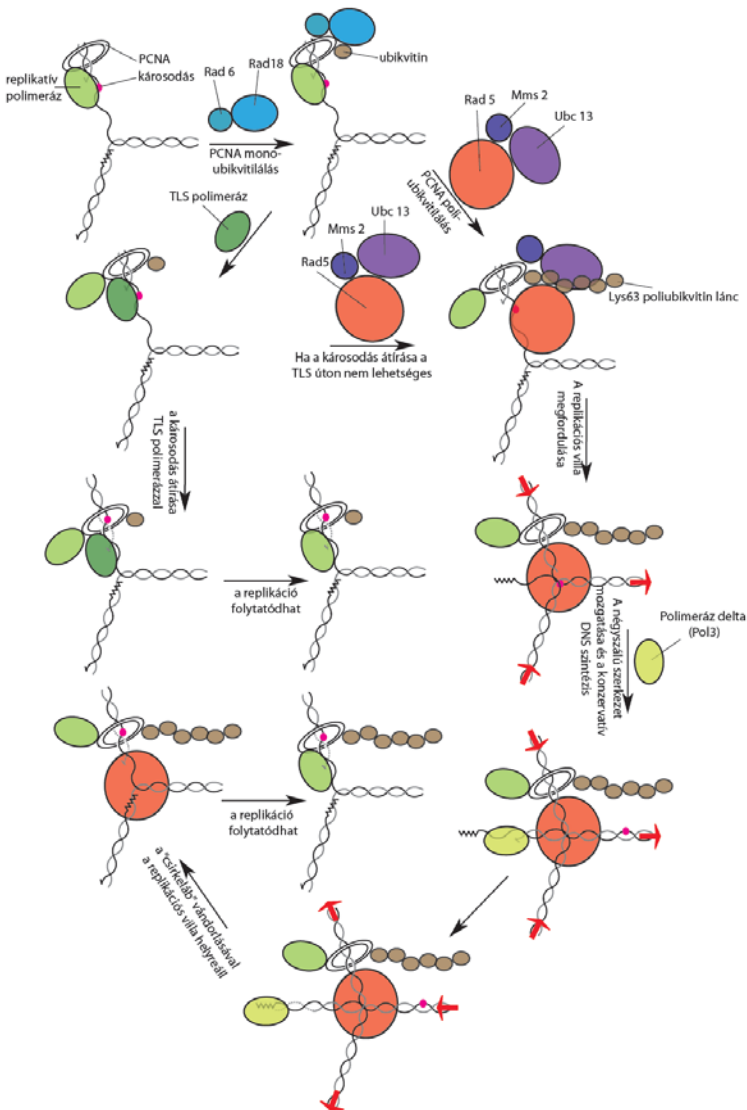
A Rad5 hiányában az élesztő genom szerkezete instabillá válik, és legalább az egyik humán Rad5 homológ hiányáról bizonyosan lehet tudni, hogy hasonló hatása van kultúrált sejtek genomjára (Motegi és mtsai, 2006; Smith és mtsai, 2004). Véleményünk szerint a genom instabilitásának az oka ilyen esetekben az, hogy a Rad5 hiányában a blokkolt replikációs villák olyan módon processzálódnak, mely mód kockázata a templát szál replikációs villák közötti váltása, annak összes következményével. Mindezekből az is következik, hogy a blokkolt replikációs villa menekítésének a Rad5 út az egyik legbiztonságosabb módja lehet.

Amire a modell nem adhat választ

Részben érintettünk már olyan kérdéseket, melyeket a modell nem válaszol meg, azaz a modell leíróképessége korlátos. Ez lényegében a korai biokémiai modellek összességére igaz, a modellek fejlődése olyan irányban halad, hogy az *in vivo* szituációt egyre jobban közelítik; a folyamatok biokémiai megértésének végső próbája, ha azokat rekombináns komponensekkel rekonstruálni tudjuk. Az általunk vizsgált folyamat, a DNS károsodás által blokkolt replikációs villa menekítése a megértés ilyen fokától még rendkívül messze van. Nem hagyható figyelmen kívül az a komplexitás, amit az jelent, hogy a replikáció környezete a kromatin, azaz a

replikációs villa menekítésének szubsztrátja nem a csupasz DNS, hanem a szerkezet és vele együtt a replikációs apparátus maga. Nyitott kérdés, hogy a Rad5 hogyan ismeri fel ebben a környezetben a szubsztrátját, hiszen a saját eredményeink szerint nincs szerkezet-specifikus DNS kötése. Ebből a szempontból lényegesnek tűnik, hogy a Rad5 számos olyan fehérjével képes fizikai interakcióba lépni, amelyek részei a blokkolt replikációs villának, ilyen a PCNA és a Rad6/Rad18 komplex (Ulrich, 2003; Ulrich és Jentsch, 2000). Ez komolyan felveti azt, hogy *in vivo* a szubsztrátfelismerés fizikai alapja a blokkolt replikációs villa fehérjével kialakított interakciók sokasága.

A modell szerint a Rad5 a szülői szálon haladva fordítja vissza a villát, de tekintve a vezető és a késlekedő szál szintézisének szétkapcsolódását a villa elágazási pontja és a replikációs blokk helye bizonyosan nem esik egybe. A Lys63 konjugált poliubikvitin láncok alapvetően lineáris szerkezetek, ezért lehetségesnek tartjuk, hogy egy ilyen lánc a replikációs villa kontextusában segítheti a Rad5 és a szülői szál interakcióját; valahogy úgy képzelhetnénk el ezt a láncot, mint a liánt, amin Tarzan ugrált fáról fára a dzsungelben (Tenno és mtsai, 2004; Varadan és mtsai, 2004). Okkal képzelhetjük el azt is, hogy azok a fehérjék amelyek a primer végével lépnek interakcióba, ilyen a PCNA, gátolják a villa megfordítását. Lehetséges, hogy a PCNA poliubikvitilálása megtisztítja a villát a Rad5 működésének útjából. Ez utóbbi lehetőség nem feltétlenül csak Rad5 függő módon valósulhat meg, hanem akár úgy is, hogy azok a fehérjék, amelyek monoubikvitilált formájukban részei a replikációs villának poliubikvitilálódhatnak olyan módon, hogy a poliubikvitin lánc elágazási pontja a Lys48. Ez a módosítás a szóban forgó fehérjét annak proteolízisére jelöli meg, és valóban fellelhető némi utalás a szakirodalomban azt illetően, hogy a proteozómának a DNS károsodások reparációjában, még pontosabban a poszt-replikációs reparáció során is szerepe van (Takezawa és mtsai, 2008; Podlaska és mtsai, 2003). Szintén nem elhanyagolható kihívás annak a megértése, hogy mi szabályozza azt, hogy a TLS út, vagy a Rad5 út működjön. Valamennyi kérdés visszavezethető arra, hogy jelenleg keveset tudunk az *in vivo* kontextusról és a folyamat szabályozásáról. A közeli jövő fontos feladata lesz ezen aspektusok érdemi vizsgálata. A 22. ábra a Rad6/Rad18 út működésének a modelljét a jelen dolgozatban közölt eredményekkel kiegészítve mutatja be.



22. ábra A kép a Rad6/Rad18 út működésével kapcsolatos ismereteink vázlatos összefoglalása. A modell szerint a PCNA monoubikvitilálása vagy egyből a TLS út felé tereli a blokkolt replikációs villát, vagy a TLS út kihagyásával közvetlenül a Rad5 út felé. A dolgozat 4. ábrájához képest ez a modell hangsúlyt helyez arra, hogy a replikációs villa menekítésének lehetőségei nem egymástól függetlenek utakon mennek végbe, hanem az egyes utak átjárhatóak, hiszen a TLS út sikertelensége esetén a PCNA poliubikvitilálása még mindig lehetőséget ad a Rad5 út működésére. Egyértelműen része immáron a modellnek az, hogy a Rad5 út a replikációs villa megfordításával működik. Észre kell vennünk, hogy a TLS úton menekített, és a Rad5 úton menekített villán a PCNA ubikvitilációs státusza különbözik. Ha a PCNA deubikvitilálása szükséges a normális repliszóma helyreállításához, akkor az gyaníthatóan különböző módon zajlik le a két esetben. A modellt illusztráló kép Pintér Lajos munkája.

Magasabbrendűekben a Rad5 két homológját lehetett azonosítani, mind a kettő ligáza a monoubikvitalált PCNA poliubikvitalálásának, de eddigi eredményeink szerint csak a HLTF nevű fehérje képes a replikációs villa megfordítására *in vitro* (Unk és mtsai, 2006; Unk és mtsai, 2008; valamint eddig nem közölt eredményeink). Emésztőrendszeri daganatok körülbelül 50 százalékában a gén promótere hipermetilált és inaktív (Moinova és mtsai, 2002). Ez alapján úgy tűnik, hogy a gén inaktivációja valamilyen szerepet játszik a tumorgenezisben; mi azt tartjuk valószínűnek, hogy ezen gén funkciójának hiányában a nem biztonságos villa menekítő mechanizmusok működésének következményeként a genom instabilitásának növekedése vezet a daganatos elváltozáshoz, azaz a HLTF hiánya a „drivere” a folyamatnak. Bár a másik homológ, a benne felismerhető domének első betűinek használatával SHPRH-nak rövidített fehérje villamegfordító aktivitását nem sikerült igazolnunk, az tény, hogy kultúrált daganatsejtek közel 10 százalékában azonosítani lehetett a gén mutációit (Sood és mtsai, 2003). Kultúrált emberi sejtek genomja rendkívül instabillá válik az SHPRH fehérje expressziójának gátlása hatására (Motegi és mtsai, 2006). Úgy tűnhet, hogy a HLTF és az SHPRH nem valódi homológok, hanem paralógok; a magasabbrendű eukariótákban egyáltalán nem szokatlan az ilyen jellegű komplikáció. Bizonyos, hogy egyszerűsége folytán az élesztő genetikai rendszer és biokémia a jövőben is változatlanul a legfontosabb eszközünk lesz a poszt-replikációs reparáció megértésére, akkor is, ha valójában bizonyos emberi betegségek mélyebb megértésének a lehetősége az, ami a PRR fontosságát hatványozottan alátámasztani látszik, és azt izgalmassá teszi.

Összefoglalás

A poszt-replikációs reparáció, és azon belül a replikációs villa megfordításának modellje több mint 30 éves múltra tekint vissza. Ez alatt a 30 év alatt számos kutató munkájának eredményeként sikerült tisztázni azt, hogy mi a genetikai alapja a PRR-nek, melyek azok a gének amelyek fehérjetermékei nélkülözhetetlenek a blokkolt replikációs villa menekítéséhez, és számos esetben sikerült biokémiai funkciót is ezekhez hozzárendelni. Érdekes módon pont a villa megfordításának effektorát nem lehetett azonosítani biokémiaiilag; ehhez, mint azt az előzőekben bemutattuk, szükséges volt annak a hipotézisnek az elvetése, hogy a villa megfordítását végző enzim helikáz kell legyen. Nem lehet azonban eléggé kihangsúlyozni, hogy ez a lépés csak úgy volt lehetséges, hogy a PRR genetikája kellően biztos alapot kínált a szakításhoz. Bármilyen tudományos újdonságot is jelent az értekezésben részletezett munka, a konklúzióhoz közvetve kutatók tucatjainak munkája is szükséges volt. Köszönet Nekik ezért!

A dolgozat alábbiakban részletezett tudományos szempontból lényegesebb új eredményei a következők:

I. Létrehoztunk egy olyan kísérleti rendszert, amely segítségével világosan megkülönböztethető a replikációs villa modell szubsztrátok processzálásának helikáz-szerű, és villamegfordító módja. Ezt a kísérleti rendszert kihasználva elsőként sikerült igazolnunk, hogy a Rad5 fehérje képes *in vitro* a replikációs villa modell szubsztrát megfordításának katalízisére, mely reakcióhoz ATP hidrolízise szükséges.

II. Bemutattuk, hogy a Rad5 képes plazmid méretű replikációs villa modell szubsztrát megfordítására oly módon, hogy a reakció mértéke összemérhető az *in vivo* eseményekre adható becsléssel. Ezen a szubsztráton igazoltuk, hogy a Rad5 által katalizált reakció progresszív.

III. Bemutattuk, hogy a Rad5 egy kétszálú DNS transzlokáz, és a hatékony transzlokációhoz mind a két szál integritása szükséges, habár nem egyenlő mértékben. Az eredményeink alapján a replikációs villa megfordulásának olyan modelljét javasoljuk, mely megmagyarázhatja azt, hogy a Rad5 kétszálú DNS transzlokázként miként katalizálhatja ezt a reakciót.

Thesis of Ph. D

Introduction and aims

Eukaryotic cells have evolved sophisticated means to recognize and repair damaged DNA. While these mechanisms are remarkably efficient, damaged DNA can often be left unrecognized for a long time. Such unrepaired DNA lesions in the template strand can block the progression of the replication fork and arrest cells in S-phase leading to fatal consequences. Discontinuity of replication upon DNA damage was experimentally demonstrated indeed, but the results also revealed a mechanism by which the single-stranded gaps can be sealed during S-phase. This process is referred to as post-replicative repair (PRR). Later, it turned out that damaged bases are persistent after PRR, thus, it is not a repair but rather a bypass (damage tolerance) mechanism in strict sense.

To identify genes responsible for PRR in yeast, various mutant strains were examined for their ability to resolve the single-stranded gaps created after UV irradiation. These studies established that PRR is dependent upon RAD6 and RAD18 genes, whose protein products form a ubiquitin ligase and conjugation enzyme complex. Although the mechanisms associated with the Rad6–Rad18 heterodimer are not fully understood, the requirement of RAD6 and RAD18 genes for damage-induced mutagenesis indicates that mutagenic bypass by Trans-Lesion Synthesis (TLS) polymerases is one of the tolerance mechanisms. However, successful TLS depends on the chemistry of the damaged base and whether the particular polymerase can handle it. Considering the myriads of possible DNA lesions damage bypass by TLS polymerases is unlikely to occur in all the cases, and indeed, strains mutant for TLS polymerases show no spectacular defect in PRR. This indicates the existence of a major alternative bypass mechanism.

Upon DNA damage, a considerable portion of DNA is replicated in a conservative manner, so that the nascent strand could template DNA synthesis. In order to provide a plausible explanation for this puzzling result and to explain the mechanism of PRR the model of the replication fork reversal was invoked. During this process the nascent strands anneal to form a template-primer junction allowing further extension of the blocked leading strand using the newly synthesized

lagging strand as template. The resulting four-way junction structure resembles of a chicken-foot, a term widely used for its description. Resetting the fork by branch migration of the “chicken foot” completes bypass of the lesion. Importantly, since the intact nascent strand is used for damage bypass, this process may independent on the chemical nature of the damage. As a consequence, template switching by fork reversal must be an essentially error-free mechanism.

PRR is mainly mediated by the error-free sub-branch of the RAD6/RAD18 pathway, which is composed of the RAD5, MMS2, UBC13 and POL30 genes. Rad5 acts as a ubiquitin ligase for the Ubc13/Mms2 ubiquitin-conjugating enzyme complex. The substrate of this reaction is PCNA, already monoubiquitylated by Rad6/Rad18. How polyubiquitylated PCNA can coordinate PRR is unknown, however, Rad5 mutant for its E3 function is as defective in PRR as the strain carries the complete deletion for this gene.

Rad5 consist of seven conserved helicase-like motifs and belongs to the SWI/SNF2 superfamily of proteins. Members of this family are DNA dependent ATPases and Rad5 indeed possesses such an activity. DNA dependent ATPase activity is also a hallmark of enzymes involved in various DNA metabolic processes such as unwinding double stranded DNA. Fork reversal requires rearrangement of DNA strands around the growing point of the replication fork, thus Rad5 seemed to be a promising candidate for the effector of this process, which supposed to be performed by a helicase. Supporting this notion, Rad5 mutant for its ATPase function shows complete defect in PRR. Moreover, the *in vivo* role of Rad5 in fork reversal has already been demonstrated. Nevertheless, despite the above mentioned clues Rad5 does not possess a helicase activity.

The main goal of this thesis is the detailed biochemical analysis of Rad5 in order to understand its role in replication fork reversal. Our central hypothesis was that Rad5 may perform fork reversal without any inherent helicase activity. Based on this idea we formulated the specific aims that are listed below.

I. We have to set up an experimental system powerful enough to distinguish helicase-like processing of a replication fork from its reversal. In order to achieve this goal we compare the

activity of Rad5 on heterologous and homologous oligonucleotide based replication fork model substrates. If it is possible to detect any ATP dependent activity of Rad5 we will thoroughly characterize the reaction in order to gain insight into its mechanism.

II. In order to more closely approximate the *in vivo* situation we construct a replication fork which has kilobases long arms and asymmetry at the base of the fork. Using this experimental system we further characterize the mechanism of Rad5 by probing the progressive nature of the reaction.

III. In order to understand how Rad5 could perform replication fork reversal its substrate requirement during translocation along DNA will be tested. This set of experiments will decide between the possibilities whether Rad5 is a single-stranded, or a double-stranded DNA translocase.

Results and discussion

The biochemical data presented in the thesis give compelling evidences for a direct role of Rad5 in mediating error-free lesion bypass by replication fork reversal, a conclusion that is in keeping with genetic observations previously made by others. The novel findings of our work are listed below.

I. Using oligonucleotide based replication fork model substrates we showed that Rad5 is unable to unwind a model replication fork structure containing heterologous arms, however, it can process a model replication fork with homologous arms. The outcome of this reaction is fully consistent with the hypothesis that Rad5 has no helicase, but only fork reversal activity. We demonstrated that Rad5 processes a homologous fork in a highly concerted manner using the energy provided by hydrolysis of ATP. We also presented evidence for branch-migrating activity of Rad5

II: We found that Rad5 can process a plasmid sized asymmetric replication fork model substrate in an ATP dependent manner and could generate as long as 863 basepair regressed arm, the size that is comparable to the observed extent *in vivo*. We were able to demonstrate the progressive nature of the reaction. We also demonstrated that Rad5 acts without extensive disassembly of the fork.

III. We demonstrated the double-stranded DNA translocase activity of Rad5 and that the integrity of both strands in the double-stranded context is required for efficient translocation. We presented a model which may faithfully describe some important aspects of the fork reversal process and considers the advantages and disadvantages of the reaction.

Rad5 possesses the biochemical activity that is congruent with the tenets of the fork reversal model and was missed for a very long time. Rad5, as many but not all members of the SWI/SNF2

superfamily, is a double-stranded DNA translocase, which activity provides an important clue for understanding the fine mechanistic details of the for reversal reaction.

We propose that Rad5 can act similar to chromatin remodelling enzymes, but it removes DNA roadblocks during translocation; we use the term “DNA strand remodelling” to circumscribe this activity. This is not a far-fetched term, since chromatin remodelling, fork reversal and branch migrating activities are not ubiquitously shared within SWI/SNF2 family. Clearly, may all these activities stem from the common translocating activity the fine mechanistic differences appear to restrict the act of these enzymes to the appropriate *in vivo* context. Rad5 is just the second example for that SWI/SNF2 family members can perform strand transfer on structured DNA substrates. Our study may help to understand the function of those members that are clearly lack any chromatin remodeling activities.

Rad5 dependent template switching comprises as much as 90% of damage bypass events during replication, and the rate of gross-chromosomal rearrangements increases as much as 200-fold in its absence. This is what can be expected if stalled forks are resolved by non-safety mechanisms, such as at the price of fork collapse.

Increased genomic instability and consequent complex genomic rearrangements are hallmarks of malignantly transformed cells in higher order eukaryotes. The role of Rad5 in maintenance of genomic stability suggests that inactivation of its human counterparts can be a primary event which promotes the accumulation of mutations and rearrangements during formation of a stably transformed malignant clone. Future studies will very likely establish such a tumor-suppressor role for the human homologous of Rad5 and identify their role in the pathogenesis of human diseases.

Felhasznált irodalom

Abdel-Monem,M., Durwald,H., and Hoffmann-Berling,H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65, 441-449.

Abdel-Monem,M. and Hoffmann-Berling,H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 65, 431-440.

Acharya,N., Brahma,A., Haracska,L., Prakash,L., and Prakash,S. (2007). Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase η do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol. Cell Biol.* 27, 7266-7272.

Adler,J., Lehman,I.R., Bessman,M.J., Simms,E.S., and Kornberg,A. (1958). ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID. IV. LINKAGE OF SINGLE DEOXYNUCLEOTIDES TO THE DEOXYNUCLEOSIDE ENDS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 44, 641-647.

Auble,D.T. and Steggerda,S.M. (1999). Testing for DNA tracking by MOT1, a SNF2/SWI2 protein family member. *Mol. Cell Biol.* 19, 412-423.

Bailly,V., Lauder,S., Prakash,S., and Prakash,L. (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* 272, 23360-23365.

Bell,S.P. and Dutta,A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 333-374.

Bessman,M.J., Lehman,I.R., Simms,E.S., and Kornberg,A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* 233, 171-177.

Beukers,R., Eker,A.P., and Lohman,P.H. (2008). 50 years thymine dimer. *DNA Repair (Amst)* 7, 530-543.

Bienko,M., Green,C.M., Crosetto,N., Rudolf,F., Zapart,G., Coull,B., Kannouche,P., Wider,G., Peter,M., Lehmann,A.R., Hofmann,K., and Dikic,I. (2005). Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* 310, 1821-1824.

Blastyák,A., Pinter,L., Unk,I., Prakash,L., Prakash,S., and Haracska,L. (2007). Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol. Cell* 28, 167-175.

Bollum,F.J. and Setlow,R.B. (1963). Ultraviolet inactivation of DNA primer activity. I. Effects of different wavelengths and doses. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 599-607.

Bugreev,D.V., Hanaoka,F., and Mazin,A.V. (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 746-753.

Bugreev,D.V., Mazina,O.M., and Mazin,A.V. (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature* 442, 590-593.

Burma,S., Chen,B.P., and Chen,D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* 5, 1042-1048.

Chiapperino,D., Kroth,H., Kramarczuk,I.H., Sayer,J.M., Masutani,C., Hanaoka,F., Jerina,D.M., and Cheh,A.M. (2002). Preferential misincorporation of purine nucleotides by human DNA polymerase η opposite benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide deoxyguanosine adducts. *J. Biol. Chem.* 277, 11765-11771.

Cordeiro-Stone,M., Makhov,A.M., Zaritskaya,L.S., and Griffith,J.D. (1999). Analysis of DNA replication forks encountering a pyrimidine dimer in the template to the leading strand. *J. Mol. Biol.* 289, 1207-1218.

Cordeiro-Stone,M., Zaritskaya,L.S., Price,L.K., and Kaufmann,W.K. (1997). Replication fork bypass of a pyrimidine dimer blocking leading strand DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 272, 13945-13954.

David,S.S., O'Shea,V.L., and Kundu,S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.

Delagoutte,E. and von Hippel,P.H. (2002). Helicase mechanisms and the coupling of helicases within macromolecular machines. Part I: Structures and properties of isolated helicases. *Q. Rev. Biophys.* 35, 431-478.

Delagoutte,E. and von Hippel,P.H. (2003). Helicase mechanisms and the coupling of helicases within macromolecular machines. Part II: Integration of helicases into cellular processes. *Q. Rev. Biophys.* 36, 1-69.

diCaprioL. and Cox,B.S. (1981). DNA synthesis in UV-irradiated yeast. *Mutat. Res.* 82, 69-85.

Drablos,F., Feyzi,E., Aas,P.A., Vaagbo,C.B., Kavli,B., Bratlie,M.S., Pena-Diaz,J., Otterlei,M., Slupphaug,G., and Krokan,H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3, 1389-1407.

Eberharter,A., Vetter,I., Ferreira,R., and Becker,P.B. (2004). ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *EMBO J.* 23, 4029-4039.

Escargueil,A.E., Soares,D.G., Salvador,M., Larsen,A.K., and Henriques,J.A. (2008). What histone code for DNA repair? *Mutat. Res.*

Flaus,A., Martin,D.M., Barton,G.J., and Owen-Hughes,T. (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* 34, 2887-2905.

Friedl,A.A., Liefshitz,B., Steinlauf,R., and Kupiec,M. (2001). Deletion of the SRS2 gene suppresses elevated recombination and DNA damage sensitivity in rad5 and rad18 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 486, 137-146.

Fu,Y., Zhu,Y., Zhang,K., Yeung,M., Durocher,D., and Xiao,W. (2008). Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. *Cell* 133, 601-611.

Fujiwara,Y. and Tatsumi,M. (1976). Replicative bypass repair of ultraviolet damage to DNA of mammalian cells: caffeine sensitive and caffeine resistant mechanisms. *Mutat. Res.* 37, 91-110.

Gangavarapu,V., Haracska,L., Unk,I., Johnson,R.E., Prakash,S., and Prakash,L. (2006). Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 26, 7783-7790.

Garcia,P.L., Liu,Y., Jiricny,J., West,S.C., and Janscak,P. (2004). Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *EMBO J.* 23, 2882-2891.

Goosen,N. and Moolenaar,G.F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)* 7, 353-379.

Hanawalt,P.C. (2004). Density matters: the semiconservative replication of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 17889-17894.

Hanawalt,P.C. and RAY,D.S. (1964). ISOLATION OF THE GROWING POINT IN THE BACTERIAL CHROMOSOME. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 52, 125-132.

Haracska,L., Johnson,R.E., Unk,I., Phillips,B., Hurwitz,J., Prakash,L., and Prakash,S. (2001a). Physical and functional interactions of human DNA polymerase eta with PCNA. *Mol. Cell Biol.* 21, 7199-7206.

Haracska,L., Prakash,S., and Prakash,L. (2000a). Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. *Mol. Cell Biol.* 20, 8001-8007.

Haracska,L., Unk,I., Prakash,L., and Prakash,S. (2006). Ubiquitylation of yeast proliferating cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 6477-6482.

Haracska,L., Washington,M.T., Prakash,S., and Prakash,L. (2001b). Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase eta. *J. Biol. Chem.* 276, 6861-6866.

Haracska,L., Yu,S.L., Johnson,R.E., Prakash,L., and Prakash,S. (2000b). Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase eta. *Nat. Genet.* 25, 458-461.

Higgins,N.P., Kato,K., and Strauss,B. (1976). A model for replication repair in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 101, 417-425.

Hoegge,C., Pfander,B., Moldovan,G.L., Pyrowolakis,G., and Jentsch,S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Iyer,L.M., Babu,M.M., and Aravind,L. (2006). The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle* 5, 775-782.

Iyer,V.N. and Rupp,W.D. (1971). Usefulness of benzoylated naphthoylated DEAE-cellulose to distinguish and fractionate double-stranded DNA bearing different extents of single-stranded regions. *Biochim. Biophys. Acta* 228, 117-126.

Johnson,R.E., Haracska,L., Prakash,S., and Prakash,L. (2001). Role of DNA polymerase zeta in the bypass of a (6-4) TT photoproduct. *Mol. Cell Biol.* 21, 3558-3563.

Johnson,R.E., Henderson,S.T., Petes,T.D., Prakash,S., Bankmann,M., and Prakash,L. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-

binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol. Cell Biol.* 12, 3807-3818.

Johnson,R.E., Prakash,S., and Prakash,L. (1994). Yeast DNA repair protein RAD5 that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.* 269, 28259-28262.

Johnson,R.E., Washington,M.T., Prakash,S., and Prakash,L. (2000). Fidelity of human DNA polymerase eta. *J. Biol. Chem.* 275, 7447-7450.

Kanagaraj,R., Saydam,N., Garcia,P.L., Zheng,L., and Janscak,P. (2006). Human RECQ5beta helicase promotes strand exchange on synthetic DNA structures resembling a stalled replication fork. *Nucleic Acids Res.* 34, 5217-5231.

Krejci,L., Van,K.S., Li,Y., Villemain,J., Reddy,M.S., Klein,H., Ellenberger,T., and Sung,P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* 423, 305-309.

Lee,J.A., Carvalho,C.M., and Lupski,J.R. (2007). A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131, 1235-1247.

Lehman,I.R., Bessman,M.J., Simms,E.S., and Kornberg,A. (1958a). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 233, 163-170.

Lehman,I.R., Zimmerman,S.B., ADLER,J., Bessman,M.J., Simms,E.S., and Kornberg,A. (1958b). ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID. V. CHEMICAL COMPOSITION OF ENZYMATICALLY SYNTHESIZED DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 44, 1191-1196.

Lehmann,A.R. (1972). Postreplication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 66, 319-337.

Li,G.M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85-98.

Li,H., Ilin,S., Wang,W., Duncan,E.M., Wysocka,J., Allis,C.D., and Patel,D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442, 91-95.

Liu,G. and Warbrick,E. (2006). The p66 and p12 subunits of DNA polymerase delta are modified by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 360-366.

Loeb,L.A., Weymouth,L.A., Kunkel,T.A., Gopinathan,K.P., Beckman,R.A., and Dube,D.K. (1979). On the fidelity of DNA replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 43 Pt 2, 921-927.

Lohman,T.M., Tomko,E.J., and Wu,C.G. (2008). Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

Lupski,J.R. (2004). Hotspots of homologous recombination in the human genome: not all homologous sequences are equal. *Genome Biol.* 5, 242.

Lupski,J.R. and Stankiewicz,P. (2005). Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS. Genet.* 1, e49.

Lusser,A. and Kadonaga,J.T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 25, 1192-1200.

Machwe,A., Xiao,L., Groden,J., and Orren,D.K. (2006). The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry* 45, 13939-13946.

Machwe,A., Xiao,L., Lloyd,R.G., Bolt,E., and Orren,D.K. (2007). Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): holliday junction formation, the effect of leading

arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 35, 5729-5747.

Majka,J., Binz,S.K., Wold,M.S., and Burgers,P.M. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J. Biol. Chem.* 281, 27855-27861.

Majka,J. and Burgers,P.M. (2004). The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 78, 227-260.

Matsumoto,Y., Kim,K., Hurwitz,J., Gary,R., Levin,D.S., Tomkinson,A.E., and Park,M.S. (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 33703-33708.

McElhinny,S.A., Gordenin,D.A., Stith,C.M., Burgers,P.M., and Kunkel,T.A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol. Cell* 30, 137-144.

McGrath,R.A. and Williams,R.W. (1966). Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. *Nature* 212, 534-535.

McHugh,P.J., Spanswick,V.J., and Hartley,J.A. (2001). Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol.* 2, 483-490.

Meselson,M. (1964). ON THE MECHANISM OF GENETIC RECOMBINATION BETWEEN DNA MOLECULES. *J. Mol. Biol.* 9, 734-745.

Meselson,M. and Stahl,F.W. (1958). THE REPLICATION OF DNA IN *ESCHERICHIA COLI*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 44, 671-682.

Meselson,M., Stahl,F.W., and Vinograd,J. (1957). EQUILIBRIUM SEDIMENTATION OF MACROMOLECULES IN DENSITY GRADIENTS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 43, 581-588.

Minko,I.G., Washington,M.T., Kanuri,M., Prakash,L., Prakash,S., and Lloyd,R.S. (2003). Translesion synthesis past acrolein-derived DNA adduct, gamma - hydroxypropanodeoxyguanosine, by yeast and human DNA polymerase eta. *J. Biol. Chem.* 278, 784-790.

Minko,I.G., Washington,M.T., Prakash,L., Prakash,S., and Lloyd,R.S. (2001). Translesion DNA synthesis by yeast DNA polymerase eta on templates containing N2-guanine adducts of 1,3-butadiene metabolites. *J. Biol. Chem.* 276, 2517-2522.

Modrich,P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J. Biol. Chem.* 281, 30305-30309.

Moinova,H.R., Chen,W.D., Shen,L., Smiraglia,D., Olechnowicz,J., Ravi,L., Kasturi,L., Myeroff,L., Plass,C., Parsons,R., Minna,J., Willson,J.K., Green,S.B., Issa,J.P., and Markowitz,S.D. (2002). HMTF gene silencing in human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4562-4567.

Moldovan,G.L., Pfander,B., and Jentsch,S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, 665-679.

Motegi,A., Sood,R., Moinova,H., Markowitz,S.D., Liu,P.P., and Myung,K. (2006). Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J. Cell Biol.* 175, 703-708.

Notenboom,V., Hibbert,R.G., van Rossum-Fikkert,S.E., Olsen,J.V., Mann,M., and Sixma,T.K. (2007). Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res.* 35, 5819-5830.

Ohmori,H., Friedberg,E.C., Fuchs,R.P., Goodman,M.F., Hanaoka,F., Hinkle,D., Kunkel,T.A., Lawrence,C.W., Livneh,Z., Nohmi,T., Prakash,L., Prakash,S., Todo,T., Walker,G.C., Wang,Z., and Woodgate,R. (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol. Cell* 8, 7-8.

Pages,V. and Fuchs,R.P. (2003). Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science* 300, 1300-1303.

Papamichos-Chronakis,M. and Peterson,C.L. (2008). The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 338-345.

Parsons,D.W., Wang,T.L., Samuels,Y., Bardelli,A., Cummins,J.M., DeLong,L., Silliman,N., Ptak,J., Szabo,S., Willson,J.K., Markowitz,S., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Lengauer,C., and Velculescu,V.E. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436, 792.

Patel,S.S. and Picha,K.M. (2000). Structure and function of hexameric helicases. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 651-697.

Pettijohn,D. and HANAWALT,P. (1964). EVIDENCE FOR REPAIR-REPLICATION OF ULTRAVIOLET DAMAGED DNA IN BACTERIA. *J. Mol. Biol.* 9, 395-410.

Plosky,B.S., Vidal,A.E., Fernandez de Henestrosa,A.R., McLenigan,M.P., McDonald,J.P., Mead,S., and Woodgate,R. (2006). Controlling the subcellular localization of DNA polymerases iota and eta via interactions with ubiquitin. *EMBO J.* 25, 2847-2855.

Podlaska,A., McIntyre,J., Skoneczna,A., and Sledziewska-Gojska,E. (2003). The link between 20S proteasome activity and post-replication DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 49, 1321-1332.

Prakash,L. (1981). Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol. Gen. Genet.* 184, 471-478.

Prakash,S., Johnson,R.E., and Prakash,L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 317-353.

Prakash,S., Johnson,R.E., Washington,M.T., Haracska,L., Kondratyck,C.M., and Prakash,L. (2000). Role of yeast and human DNA polymerase eta in error-free replication of damaged DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 51-59.

Prakash,S. and Prakash,L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat. Res.* 451, 13-24.

Pursell,Z.F., Isoz,I., Lundstrom,E.B., Johansson,E., and Kunkel,T.A. (2007). Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* 317, 127-130.

Ralf,C., Hickson,I.D., and Wu,L. (2006). The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J. Biol. Chem.* 281, 22839-22846.

Resnick,M.A., Boyce,J., and Cox,B. (1981). Postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 146, 285-290.

Rupp,W.D. and Howard-Flanders,P. (1968). Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.* 31, 291-304.

Rupp,W.D., Wilde,C.E., III, Reno,D.L., and Howard-Flanders,P. (1971). Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 61, 25-44.

Saha,A., Wittmeyer,J., and Cairns,B.R. (2002). Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev.* 16, 2120-2134.

San,F.J., Sung,P., and Klein,H. (2008). Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu. Rev. Biochem.*

Savery,N.J. (2007). The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbiol.* 15, 326-333.

Setlow,R.B. and Carrier,W.L. (1964). THE DISAPPEARANCE OF THYMINE DIMERS FROM DNA: AN ERROR-CORRECTING MECHANISM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 226-231.

Setlow,R.B., Swenson,P.A., and Carrier,W.L. (1963). THYMINE DIMERS AND INHIBITION OF DNA SYNTHESIS BY ULTRAVIOLET IRRADIATION OF CELLS. *Science* 142, 1464-1466.

Shimada,K., Oma,Y., Schleker,T., Kugou,K., Ohta,K., Harata,M., and Gasser,S.M. (2008). Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr. Biol.* 18, 566-575.

Shivji,M.K., Podust,V.N., Hubscher,U., and Wood,R.D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* 34, 5011-5017.

Simpson,J.R., Nagle,W.A., Bick,M.D., and Belli,J.A. (1973). Molecular nature of mammalian cell DNA in alkaline sucrose gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 70, 3660-3664.

Singleton,M.R., Dillingham,M.S., and Wigley,D.B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 23-50.

Smith,S., Hwang,J.Y., Banerjee,S., Majeed,A., Gupta,A., and Myung,K. (2004). Mutator genes for suppression of gross chromosomal rearrangements identified by a genome-wide screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9039-9044.

Sood,R., Makalowska,I., Galdzicki,M., Hu,P., Eddings,E., Robbins,C.M., Moses,T., Namkoong,J., Chen,S., and Trent,J.M. (2003). Cloning and characterization of a novel gene,

SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region. *Genomics* 82, 153-161.

Stankiewicz,P. and Lupski,J.R. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18, 74-82.

Strauss,B., Scudiero,D., and Henderson,E. (1975). The nature of the alkylation lesion in mammalian cells. *Basic Life Sci.* 5A, 13-24.

Svoboda,D.L. and Vos,J.M. (1995). Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11975-11979.

Takezawa,J., Ishimi,Y., and Yamada,K. (2008). Proteasome inhibitors remarkably prevent translesion replication in cancer cells but not normal cells. *Cancer Sci.* 99, 863-871.

Taylor,J.H., WOODS,P.S., and Hughes,W.L. (1957). THE ORGANIZATION AND DUPLICATION OF CHROMOSOMES AS REVEALED BY AUTORADIOGRAPHIC STUDIES USING TRITIUM-LABELED THYMIDINE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 43, 122-128.

Tenno,T., Fujiwara,K., Tochio,H., Iwai,K., Morita,E.H., Hayashi,H., Murata,S., Hiroaki,H., Sato,M., Tanaka,K., and Shirakawa,M. (2004). Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* 9, 865-875.

Thoma,N.H., Czyzewski,B.K., Alexeev,A.A., Mazin,A.V., Kowalczykowski,S.C., and Pavletich,N.P. (2005). Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 350-356.

Tomida,J., Masuda,Y., Hiroaki,H., Ishikawa,T., Song,I., Tsurimoto,T., Tateishi,S., Shiomi,T., Kamei,Y., Kim,J., Kamiya,K., Vaziri,C., Ohmori,H., and Todo,T. (2008). DNA damage-induced ubiquitylation of RFC2 subunit of replication factor C complex. *J. Biol. Chem.* 283, 9071-9079.

Tornaletti,S., Maeda,L.S., and Hanawalt,P.C. (2006). Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1215-1220.

Torres-Ramos,C.A., Prakash,S., and Prakash,L. (2002). Requirement of RAD5 and MMS2 for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 22, 2419-2426.

Torres-Ramos,C.A., Prakash,S., and Prakash,L. (1997). Requirement of yeast DNA polymerase delta in post-replicative repair of UV-damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 25445-25448.

Ulrich,H.D. (2001). The srs2 suppressor of UV sensitivity acts specifically on the. *Nucleic Acids Res.* 29, 3487-3494.

Ulrich,H.D. (2003). Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J. Biol. Chem.* 278, 7051-7058.

Ulrich,H.D. and Jentsch,S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J.* 19, 3388-3397.

Unk,I., Hajdu,I., Fatyol,K., Hurwitz,J., Yoon,J.H., Prakash,L., Prakash,S., and Haracska,L. (2008). Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3768-3773.

Unk,I., Hajdu,I., Fatyol,K., Szakal,B., Blastyak,A., Bermudez,V., Hurwitz,J., Prakash,L., Prakash,S., and Haracska,L. (2006). Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 18107-18112.

Varadan,R., Assfalg,M., Haririnia,A., Raasi,S., Pickart,C., and Fushman,D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 7055-7063.

Veaute,X., Jeusset,J., Soustelle,C., Kowalczykowski,S.C., Le,C.E., and Fabre,F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* 423, 309-312.

Vincent,J.A., Kwong,T.J., and Tsukiyama,T. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 477-484.

Wang,G.G., Allis,C.D., and Chi,P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol. Med.* 13, 373-380.

Washington,M.T., Johnson,R.E., Prakash,S., and Prakash,L. (2000). Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3094-3099.

Watson,J.D. and Crick,F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Wood,L.D., Parsons,D.W., Jones,S., Lin,J., Sjoblom,T., Leary,R.J., Shen,D., Boca,S.M., Barber,T., Ptak,J., Silliman,N., Szabo,S., Dezso,Z., Ustyanksky,V., Nikolskaya,T., Nikolsky,Y., Karchin,R., Wilson,P.A., Kaminker,J.S., Zhang,Z., Croshaw,R., Willis,J., Dawson,D., Shipitsin,M., Willson,J.K., Sukumar,S., Polyak,K., Park,B.H., Pethiyagoda,C.L., Pant,P.V., Ballinger,D.G., Sparks,A.B., Hartigan,J., Smith,D.R., Suh,E., Papadopoulos,N., Buckhaults,P., Markowitz,S.D., Parmigiani,G., Kinzler,K.W., Velculescu,V.E., and Vogelstein,B. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108-1113.

Wood,R.D., Aboussekhra,A., Biggerstaff,M., Jones,C.J., O'Donovan,A., Shivji,M.K., and Szymkowski,D.E. (1993). Nucleotide excision repair of DNA by mammalian cell extracts and purified proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58, 625-632.

Wood,R.D., Araujo,S.J., Ariza,R.R., Batty,D.P., Biggerstaff,M., Evans,E., Gaillard,P.H., Gunz,D., Koberle,B., Kuraoka,I., Moggs,J.G., Sandall,J.K., and Shivji,M.K. (2000). DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 173-182.

Wysocka,J., Swigut,T., Xiao,H., Milne,T.A., Kwon,S.Y., Landry,J., Kauer,M., Tackett,A.J., Chait,B.T., Badenhorst,P., Wu,C., and Allis,C.D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.

Xiao,W., Chow,B.L., Broomfield,S., and Hanna,M. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* 155, 1633-1641.

Zhang,H. and Lawrence,C.W. (2005). The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 15954-15959.

Zhang,Y., Yuan,F., Presnell,S.R., Tian,K., Gao,Y., Tomkinson,A.E., Gu,L., and Li,G.M. (2005). Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* 122, 693-705.

Zhuang,Z., Johnson,R.E., Haracska,L., Prakash,L., Prakash,S., and Benkovic,S.J. (2008). Regulation of polymerase exchange between Pol ϵ and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5361-5366.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Haracska Lajosnak, Unk Ildikónak, Illésné Kovács Katinak, Pintér Lajosnak, és Hajdú Ildikónak; valamennyien hozzájárultak ahhoz, hogy a dolgozat eredményei ebben a formában elkészülhessenek. Azt, hogy ne foglalkozzunk azzal, hogy a Rad5-nek nincs helikáz aktivitása, hanem csak azért is vizsgáljuk meg a villamegfordító aktivitását Haracska Lajos és a dolgozat szerzője találta ki jó néhány sör elfogyasztása után. Kívánom, hogy valamennyi sörözésünk hozadéka hasonló eredmény legyen, mint amit a dolgozatban bemutatam!

A biológiában eltöltött hosszú évek alatt számos kolléga nyújtott olyan jellegű segítséget, vagy csak példát, ami nélkül ma nem lehetnék olyan biológus, mint amilyen vagyok. Köszönet ezért többek között Török Tibornak, Rakesh Mishrának, Gyurkovics Henriknek, Gausz Jánosnak, Francois Karch-nak, Udvardy Andornak, Raskó Istvánnak, Rauch Tibornak és még sokan másoknak.

Külön köszönettel tartozom Boros Imrének és Udvardy Andornak azért, hogy a dolgozatot még annak benyújtása előtt áttekintették. Kettőjük baráti, de mindazonáltal igen alapos kritikája bizonyosan csak előnyére szolgált a dolgozat végleges változatának.

Bármit is ér el azonban az ember az életben, köszönettel elsősorban a szüleinek, a családjának és barátainak tartozik. Édesanya, Édesapa, Nagyszüleim, Hugi, Zsani és Betti, Anita, Melinda, Barátaim!; köszönet valamennyiőtöknek!

Függelék

Az alábbi felsorolás az értekezésben bemutatott kísérletek során használt oligonukleotidok nevét és szekvenciáját tartalmazza:

O1054: AgCTACCATgCCTgCCTCAAgAATTCgTAA

O1056: TTACgAATCTTgAggCAGgCATggTAGCT

O1058: AgCTACCATgCCTgCCTCAAgAATTCgTAATAgCCTACTgAgTACCgAgCATCgTCgTgACTgggAAAAC

O1107: gTTTTCCCAgTCACgAC

O1108: CAggAAACAgCTATgAC

O1111: gTCggATCCTCTAGACAgCTCCATgATCACTggCACTggTAGAATTCggC

O1112: CAACgTCATAGACgATTACATTgCTACATggAgCTgTCTAGAggATCCgA

O1113: TgCCgAATCTACCAgTgCCAgTgATggACATCTTTgCCCACgTTgACCC

O1114: TgggTCAACgTgggCAAAgATgTCCTAgCAATgTAATCgTCTATgACgTT

O1115: gACgCTgCCgAATCTgCCTTgCTAggACATCTTTgCCCACgTTgACCC

O1116: CAACgTCATAGACgATTACATTgCTAggACATgCTgTCTAGAgACTATCgA

O1117: ATCgATAgTCTCTAGACAgCATgTCCTAgCAAgCCAgAATTCggCAGCgT

O1118: gTTTTCCCAgTCACgACgATgCTCCggTACTCCAgTgTAGgCATATTACgAATCTTgAggCAGgCATggTAGCT

O1175: gATCgTTgCATTCATTCTggAggCCTACgTATgCCTACTgAgTACCgAgCATCgTCgTgACTgggAAAAC

O1176: CCgTAggCCTCCAgAATgAATgCAACgATC

O1301: gCTCACCTggTAGTCgACTTACgTgATCg

O1302: AgCCgATCACgTAAgTCgACTACCAggTg

O1356: gTCATgCggTgTCgACTAC

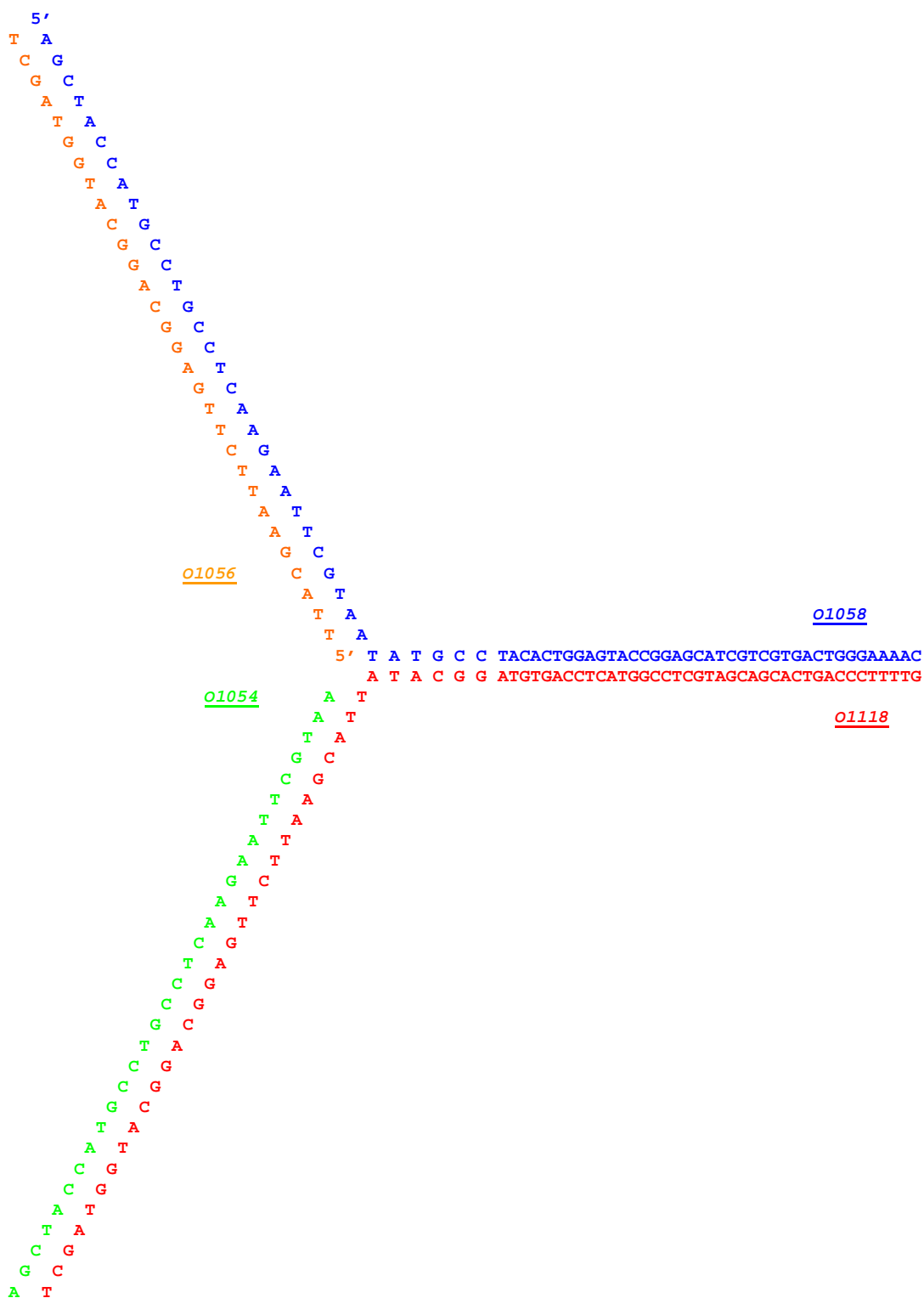
O1377: TCTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTCT

O1424: CATgATCAggATCCTCgATATCTTTCTTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTcctcagcctcagcgtAgTCgACACCgCATgAC

O1425:

CATgATCAggATCCTCgATATCTTTCTTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTcctcagcAGCTGCctcagcgtAgTCgACACCgCATgAC

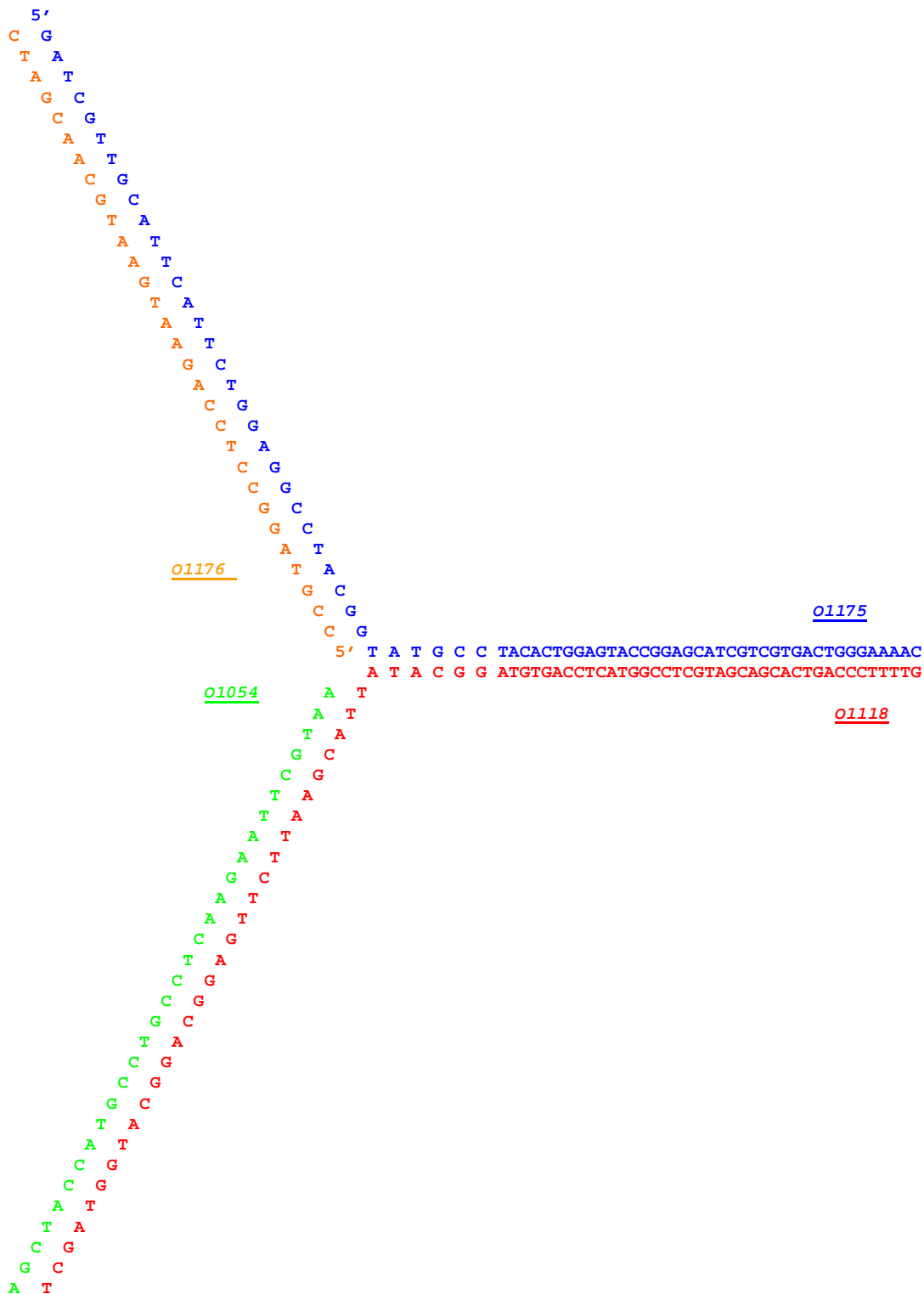
Oligonukleotid alapú homológ replikációs villa modell szubsztrát



Függelék, 1. ábra Az ábra a dolgozatban leírt oligo alapú replikációs homológ villa modell szubsztrát szerkezetét ábrázolja szekvencia szintű részletességgel. A narancssárgával jelölt oligo a szintézis késlekedő szálát, a zöld oligo a vezető szálát, a kék és piros oligók a szülői szálakat modellező szekvenciákat jelöli. A szekvenciával azonos színnel, dőlt betűvel szedve és aláhúzva

tüntettük fel az egyes oligonukleotidok nevét. Az O1058 és O1056 oligonukleotidok 5' végét külön megjelöltük.

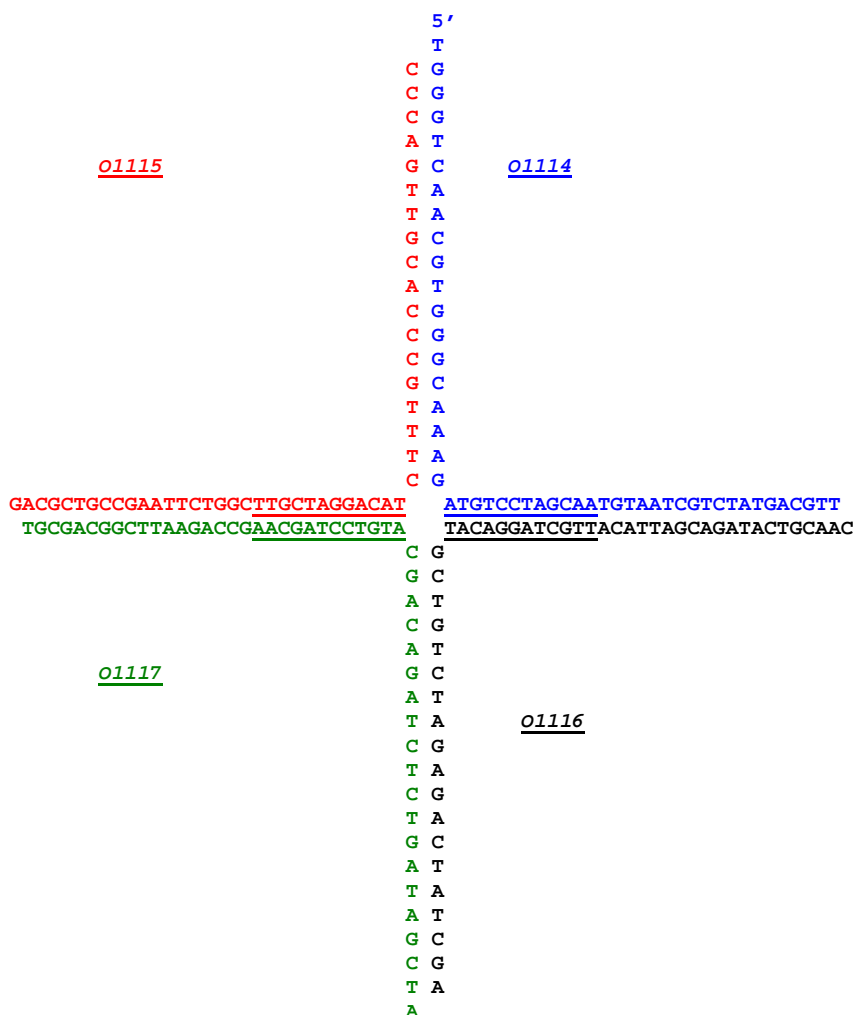
Oligonukleotid alapú heterológ replikációs villa modell szubsztrát



Függelék, 2. ábra Az ábra a dolgozatban leírt oligo alapú heterológ replikációs villa modell szubsztrát szerkezetét ábrázolja szekvencia szintű részletességgel. A narancssárgával jelölt oligo a szintézis késlekedő szálát, a zöld oligo a vezető szálát, a kék és piros oligók a szülői szálakat modellező szekvenciákat jelöli. A szekvenciával azonos színnel, dőlt betűvel szedve és

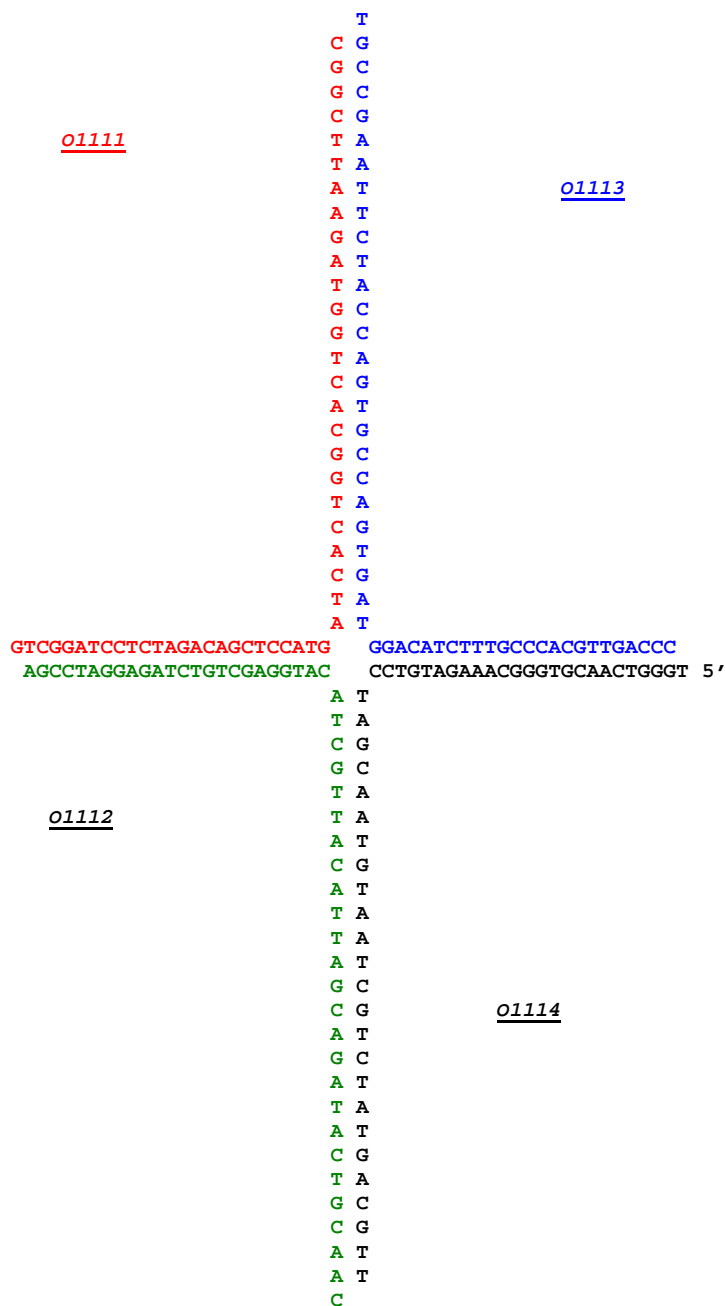
aláhúzza tüntettük fel az egyes oligonukleotidok nevét. Az 1175 és 01176 oligonukleotidok 5' végét külön megjelöltük.

Oligonukleotid alapú mozgatható „csirkeláb” modell szubsztrát



Függelék, 3. ábra Az ábra a dolgozatban leírt oligo alapú mozgatható (parciálisan homológ) „csirkeláb” modell szubsztrát (X12) szerkezetét ábrázolja szekvencia szintű részletességgel. A szerkezet sémáján aláhúzással és vastag szedéssel jelöltük a karok közötti homológiát. Az egyes szájakat különböző színnel jelöltük, azonos színnel, dőlt betűvel szedve és aláhúzva tüntettük fel az egyes oligonukleotidok nevét. A dolgozatban bemutatott kísérletek során az 01114 nevű oligot jelöltük radioaktívan, ennek 5' végét külön megjelöltük.

Oligonukleotid alapú statikus „csirkeláb” modell szubsztrát



Függelék, 4. ábra Az ábra a dolgozatban leírt oligo alapú statikus (heterológ) „csirkeláb” modell szubsztrát (X0) szerkezetét ábrázolja szekvencia szintű részletességgel. Az egyes szájakat különböző színnel jelöltük, azonos színnel, dőlt betűvel szedve és aláhúzva tüntettük fel az egyes oligonukleotidok nevét. A dolgozatban bemutatott kísérletek során az 01114 nevű oligot jelöltük radioaktívan, ennek 5' végét külön megjelöltük.

BbvCI: GCTGAGG
CGACTCC

Nb.BbvCI: GC TGAGG

Nt.BbvCI: CGACT CC

pG46

5' GGGTGACAGGCTCATGGATATGCTGAGAAATCGCTGAGGCGTAGCTGAGGACTAGTGCTGAGGGATCGCTGAGGTGTAGCTGAGGACGTACTGAGGTGCGTCAGC
3' CCCACTGTCCGAGTACCTATACGACTCTTTAGCGACTCCGCATCGACTCCTGATCA CGACTCCCTAGCGACTCCACATCGACTCCTGCATGACTCCACGCAGTCC

pG46 Nt.BbvCI

5' GGGTGACAGGCTCATGGATATGCTGAGAAATCGCTGAGGCGTAGCTGAGGACTAGTGCTGAGGGATCGCTGAGGTGTAGCTGAGGACGTACTGAGGTGCGTCAGC
3' CCCACTGTCCGAGTACCTATACGACTCTTTAGCGACT CCTGCA T GACTCCACGCAGTCC

pG68

5' GGGTGACAGGCTCATGGATATGCTGAGGAATCGCTGAGGCGTAGCTGAGGACTAGTGCTGAGGGATCGCTGAGGTGTAGCTGAGGACGTGCTGAGGTGCGTCAGC
3' CCCACTGTCCGAGTACCTATACGACTCCTTAGCGACTCCGCATCGACTCCTGATCA CGACTCCCTAGCGACTCCACATCGACTCCTGCA CGACTCCACGCAGTCC

pG68 Nb.BbvCI

5' GGGTGACAGGCTCATGGATATGC TGAGGTGCGTCAGC
3' CCCACTGTCCGAGTACCTATACGACTCCTTAGCGACTCCGCATCGACTCCTGATCA CGACTCCCTAGCGACTCCACATCGACTCCTGCA CGACTCCACGCAGTCC

Függelék, 5. ábra Az ábra a plazmid méretű replikációs villa modell szubsztrát előállításánál használt plazmidok szekvenciájának azon részletét mutatja, mely a szubsztrát előállításánál szempontjából releváns. Feltüntettük a BbvCI restrikciós endonukleáz felismerőhelyét (pirossal kiemelve), és azt, hogy az egyes alegységek hol hasítják ezt a szekvenciát. A pG46 és pG68 plazmidok szekvenciáján a BbvCI hasítóhelyeket szintén pirossal emeltük ki, és a pG46 plazmidon kézzel jelöltük meg azokat a báziscseréket, melyek az első és a hetedik BbvCI hasítóhelyet változtatják meg. Feltüntettük a pG68 Nb.BbvCI és a pG46 Nt.BbvCI hasítás eredményeként létrejött szerkezeteket, melyek a kétszálú DNS meghatározott hosszúságú folytonossági hiánya. Vegyük észre, hogy pG68 Nb.BbvCI és a pG46 Nt.BbvCI szerkezetek egyszálú szakasza komplementer.

pG46 plazmid első és hetedik BbvCI hasítóhelyeit érintő báziscseréket. Aláhúzás és zöld felkiáltójel jelöli a radioaktívan jelölt 5' véget. A dolgozatban leírt kísérlet során a bal oldali szerkezet változását követtük, ahol a késlekedő szál modellje 14 nukleotiddal hosszabb a szintézis vezető szálát modellező szekvenciánál.

részletességgel. A szubsztrátok alapjául szolgáló kétszálú DNS-t PCR reakcióval állítottuk elő az O1107 és O1108 oligokat primerként használva. Az amplifikálás során templátként használt plazmid nevét (pIL1828, vagy pIL1829) a szubsztrát szekvenciája mellett tüntettük fel. Ezt követően tüntettük fel a szubsztrát további preparálása során használt restrikciós endonukleázok neveit. A hosszabb szubsztrátok esetén a könnyebb áttekinthetőség miatt a szekvencia bal és jobb oldalát eltávolítottuk, és külön tüntettük fel (L/L' és R'/R, kék színnel szedve). Ugyancsak a könnyebb áttekinthetőség miatt a szubsztrát triplex régióját nagybetűvel és pirossal szedve tüntettük fel, a triplexen kívüli régió szekvenciája kisbetűvel szedett.