

A DNS mentén mozgó motorfehérjék processzivitása

Szakdolgozat
biológia alapszak, biológus szakirány

készítette:
Szabó Judit Eszter

témavezető:
Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs
Biokémiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2009

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés	4
2. A replikáció	6
3. Replikatív polimerázok processzivitása	8
3.1. Polimerázok	8
3.2. A processzivitási kapcsok	9
3.2.1. A processzivitási kapcsok szerkezete	9
3.2.2. A diffúziós mechanizmusok szerepe a processzivitási kapcsok működésében	12
3.2.3. Clamp loading	13
4. A replikatív helikázok processzivitása	19
4.1. A helikázok	19
4.2. A helikázok processzivitása	21
4.3. A helikázok processzivitását kialakító tényezők	21
4.3.1. Oligomerizáció	21
4.3.2. A primáz hatása	22
5. Primáz szerepe a DNS replikációban	24
5.1. A primáz	24
5.2. A primáz és a helikáz kapcsolata	24
5.3. Primer „handoff”	25
6. A vezető és a követő szál szintézis összehangolása	26
7. Következtetés	27
8. Összefoglalás	29
9. Summary	30
Felhasznált irodalom	31
Köszönetnyilvánítás	33

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Magyarázat
ATP	adenozin trifoszfát
bp	bázispár
CLP	Clamp Loading Protein
CTD	C Terminális Domén
dNTP	dezoxi nukleotid trifoszfát
dsDNS	kétszálú DNS
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
HBD	Helikáz kötő domén
HCV	Hepatitisz Vírus C
HSV	Herpesz szimplex vírus
kb	kilobázis
nt	nukleotid
NTD	N terminális domén
NTP	nukleotid trifoszfát
OF	Okazaki- fragment
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDB	Protein Data Bank
Pol I-V	Polymerase I- V
PPi	pirofoszfát
RFC	Replication Factor C
SF1-3	Superfamily I-III
ssDNS	egyszálú DNS
TBD	tioredoxin kötő domén
trx	thioredoxin
wt	vadtípus

1. Bevezetés

A DNS örökítőanyag szerepét csak különböző enzimek közreműködésével tudja betölteni. A replikáció, a transzkripció, a rekombináció és a DNS hibajavítás mind elengedhetetlenek ahhoz, hogy a DNS-ben tárolt információ megfelelő módon kifejeződjön, illetve tovább örökítődjön. Az ezekben a folyamatokban szerepet játszó enzimek között számos motorprotein található, melyek definíció szerint kémiai energiából (amely leggyakrabban NTP hidrolízisből származik) mechanikai energiát hoznak létre. Jelentős részük processziven működik, azaz több enzimciklust is végrehajt a szubsztráthoz való kapcsolódás után, disszociáció nélkül. A processziv működés során a DNS motorok a DNS mentén adott irányban transzlokálódnak, ehhez használva fel az átalakított energiát.

Összehasonlítva a DNS motorokat a „klasszikus” sejtvázmotorokkal (miozin, kinezin, stb.) számos hasonlóságot és különbséget találhatunk. Mindkét enzimtípus valamilyen polimer mentén mozog (aktin, mikrotubulus; illetve DNS), NTPáz aktivitással rendelkezik, melyet a polimer kötése befolyásol. Jellemző, hogy ezek az enzimek oligomer formában működnek. Különbségek főleg a „sín” eltérő szerkezetéből adódnak. A DNS többszörösen negatívan töltött polielektrolit, ezért a DNS- protein interakciók erősen sókoncentráció-függők. További különbség, hogy míg az aktin azonos monomerekből, a mikrotubulus pedig heterodimerekből épül fel, oly módon, hogy a polimer szerkezete egységesnek mondható, addig a DNS a 4 féle bázis eltérő sorrendjének köszönhetően rendkívül változatos lehet. A duplex DNS szerkezete jobbmenetes hélix, mely rendelkezik egy kis és egy nagy árokkal, melyek a fehérjék számára megkülönböztethetők, és bennük a bázisok és azok sorrendje is felismerhető. A négyféle bázis eltérő sorrendje a polimerben jellemző szekvenciákat hoz létre. Adott DNS szekvenciákhoz specifikusan is kötődhetnek fehérjék (Moore és Lohman, 1995; Lohman és Bjornson, 1996).

A DNS a sejtben általában két formában van jelen: stabil kétszálú duplexként, vagy egyszálú formában. Az egyszálú DNS a cukorfoszfát váz orientációja alapján polaritással jellemezhető. A kétszálú DNS-re ez nem jellemző, mivel két ellentétes lefutású láncból áll. A motorfehérje – nukleinsav interakciókban általában szerepel egyszálú DNS; a motor mozgásirányát ennek polaritásával jellemezzük (Moore és Lohman, 1995).

Mind a DNS motorok, mind a klasszikus motorfehérjék között találunk processziv és disztributív enzimeket.

A processzivitás DNS motorok esetén számszerűleg jellemezhető a katalizált folyamatban érintett bázispárok átlagos számával az enzim egyszeri kötődésére

vonatkoztatva. A processzivitás mértékében nagy különbségek lehetnek. A legtöbb hibajavításban részt vevő enzim processzivitása viszonylag kicsi (200-2000 bp). Ezzel szemben a replikációban részt vevő fehérjék akár több mint 20 000 bázispár hosszúságában is működhetnek disszociáció nélkül (pl. E. coli bakteriofág T4 polimeráz) (Breyer és Matthews, 2001).

Annak, hogy egy enzim, jelen esetben DNS-motor mennyire processzív, fontos szerepe lehet. A replikáció esetén például szükséges, hogy a repliszóma a DNS-t ne kis szakaszokban, hanem processziven, disszociáció nélkül másolja, hiszen a másolás kezdőpontja kötött, a polimeráz holoenzim, illetve repliszóma összeépülése és DNS-hez kapcsolódása energiaigényes folyamat (Fang és mtsai, 1999), illetve ha az enzim idő előtt leválik a DNS-ről, nem tud újra megfelelően kapcsolódni, hogy folytassa a megkezdett folyamatot. A folyamatos disszociáció és reaszociáció nem csak energetikailag lehet kedvezőtlen, de kinetikailag is lassítja a folyamatot. Hibajavításban résztvevő enzimek esetén ilyen mértékű processzivitás nem szükséges. Ezeknek a fehérjéknek a működése a genomiális DNS egészéhez viszonyítva csak lokális. A hibajavító és replikációs folyamatok eltérő processzivitásában fontos szerepe lehet az egyes fehérjék más proteinekkel történő fizikai és funkcionális kölcsönhatásainak (Xi XG, 2007).

A replikációban résztvevő fehérjék között több motorprotein is található, melyek általánosan nagy processzivitással rendelkeznek. Szakdolgozatomban ezek működését, processzivitását szeretném részletezni. A repliszóma multiprotein jellege, a folyamat komplexitása és fontossága, a benne szereplő enzimek nagy processzivitása, illetve a téma iránti fokozott érdeklődés következtében megjelent nagyszámú publikáció alkalmassá teszi a replikációt a processzivitás kialakításában általánosan szerepet játszó tényezők bemutatására.

2. A replikáció

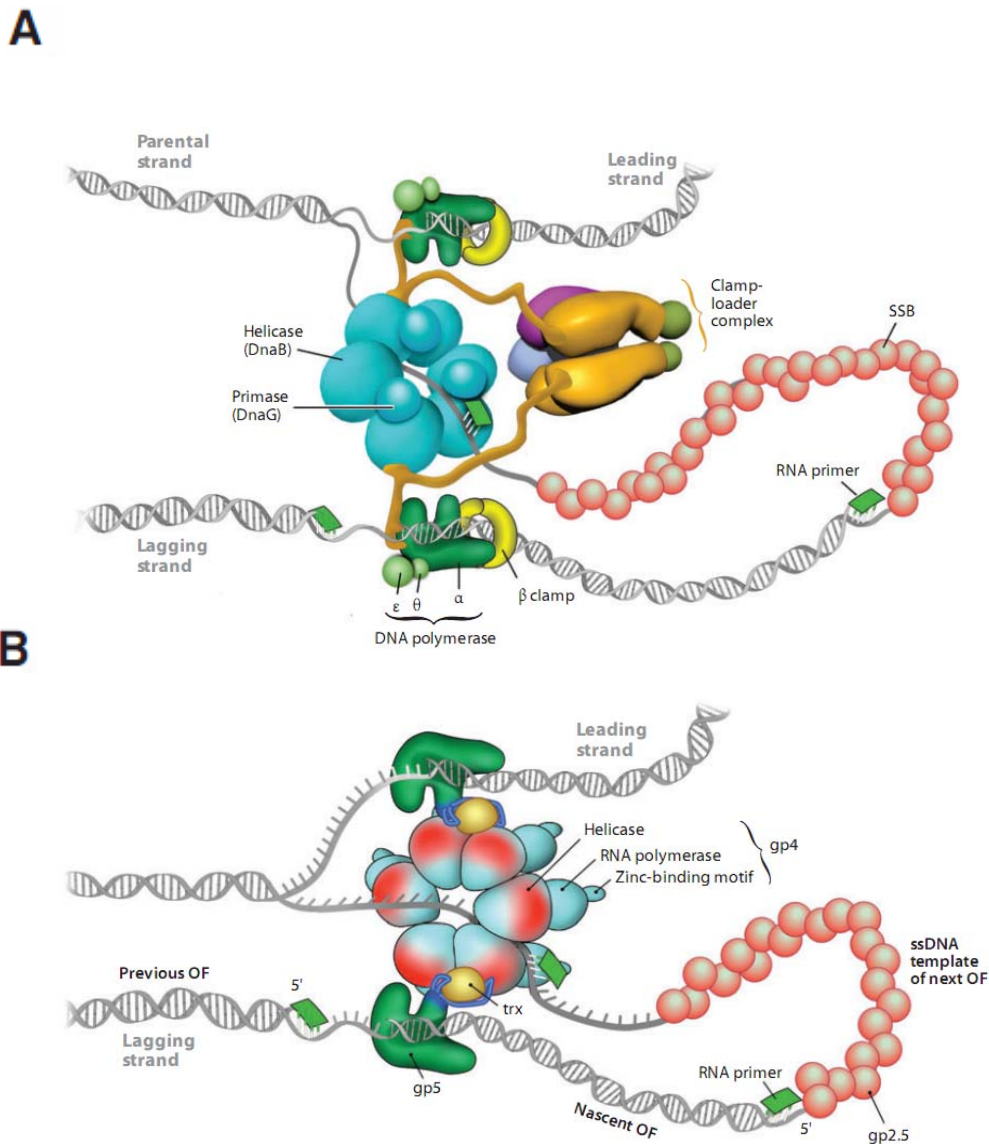
A genetikai információ megfelelő továbbadásában az egyik legfontosabb folyamat az örökítő anyag replikációja, melyet a repliszóma multiprotein komplex végez. Ez magában a másolásban aktív motorfehérjékből és a komplex összeépülésében és összetartásában fontos járulékos proteinekből áll. Processzivitás szempontjából a replikatív motorokat vizsgálhatjuk külön- külön, illetve az egész komplexet tekintve beszélhetünk a repliszóma vagy a replikáció processzivitásáról is. A repliszóma összetettségéből fakadóan a replikáció folyamatát általában egy-egy vagy néhány proteint kiragadva vizsgálják. Ezekből a kísérletekből adódóan számos, akár nagymértékben különböző processzivitás és katalitikus sebesség értéket tartalmaz az irodalom az egyes fehérjékre. Ez is azt mutatja, hogy a repliszóma komplexben a fehérjék közötti interakciók rendkívül fontosak a hatékony DNS másolás megvalósulásához.

A replikáció az élővilágban univerzálisan jellemző tulajdonságokkal bír. Ezek közé tartozik a szemikonzervativitás, a templátfüggés, az 5'-3' irányú nukleinsav polimerizáció és ennek, illetve a két DNS-szál antiparalell irányú lefutásának következményeként a két szál eltérő, de koordinált másolása. A replikációs villa haladási irányával megegyező orientációjú szál szintézise folyamatos (vezető szál), míg a másik szál másolása szakaszosan, ún. Okazaki fragmentumokban történik (követő szál). Mivel a replikációt a két szál esetében ugyanazon proteinkomplex végzi, a hatékonyság érdekében fontos a két szál megfelelő koordinálása, melynek egyik fő eleme a követő szál oly módon történő kihurkolódása, ami a replikációs villa egyirányú továbbhaladását biztosítja (1. ábra).

Minden replikációs komplexben megtalálható motorfehérje a duplex két szálának elválasztásáért felelős helikáz, a nukleotid polimerizációért felelős DNS polimeráz és a működését főleg a követő szálon végző primáz. Általánosan jellemző az egyszálú DNS kötő fehérjék jelenléte. Sok esetben a repliszóma részét képezik a komplex összeépüléséért felelős proteinek is. Maga a polimeráz is többnyire egy több alegységes komplex (a továbbiakban polimeráz holoenzim), mely tartalmazza a katalitikus, nukleinsav szintézist végző polimeráz magot (a továbbiakban polimeráz), egy a processzivitásért felelős fehérjét („clamp”), és egy motor komplexet („Clamp loading protein”, mostantól CLP), mely előbbi a DNS-re helyezi, illetve a polimerázhoz kapcsolja (1. ábra).

A replikáció „logikája” a különböző taxonokban azonos, ennek következtében a résztvevő enzimek struktúrája is sok hasonlóságot mutat. A mechanizmus részleteiben, illetve a repliszóma összetételében, az azt alkotó proteinek komplexitásában azonban számos eltérés lehet. Ugyanez igaz a processzivitás kialakításában szerepet játszó alegységekre, illetve a

köztük lévő interakciókra (Hamdan és Richardson, 2009).



1. ábra

A, *E. coli* replikációs villa modellje (Hamdan és Richardson, 2009)

A szülői DNS (parental strand) elválasztását a DnaB helikáz végzi, a két elválasztott szálát a DNS polimeráz III holoenzim végzi. A holoenzim magja a három alegységes katalitikus magból (α - polimeráz, ϵ - exonukleáz, θ), β processzivitási gyűrűből és a CLP-ből áll. A holoenzim két katalitikus magot és processzivitási gyűrűt tartalmaz. Az egyik a vezető (leading strand), a másik a követő szál (lagging strand) szintézisét végzi. A DnaG primáz a helikázzal kapcsolódva primer (RNA primer: RNS primer) szintézist katalizál. Az ssDNS régiót SSB (ssDNS binding: egyszálú DNS-kötő) protein fedi.

B, *E. coli* T7 bakteriofág replikációs modellje (Hamdan és Richardson, 2009)

A repliszóma a gp5 DNS polimerázból, a hexamer gp4 helikáz- primázból, a gp 2.5 egyszálú DNS-kötő fehérjéből és a processzivitási faktorként funkcionáló *E. coli* thioredoxinból áll. A DNS polimerizációt a helikázhoz asszociált gp5/trx komplex végzi. A gp4 primáz része RNS polimeráz (RNA polymerase) és Zn-kötő (Zinc-binding motif) doménből áll.

3. Replikatív polimerázok processzivitása

3.1. Polimerázok

A replikációban a nukleinsavsintézisért felelős enzimek templátfüggő polimerázok. Annak ellenére, hogy az élővilágban számos változatuk létezik, eltérő folyamatokban vesznek részt (replikáció, különböző DNS javítási folyamatok, nick-translation) és szekvenciájuk is viszonylag változatos, alapfelépítésük megegyezik. Térbeli szerkezetüket egy jobb kézfejhez szokás hasonlítani. „Palm”, „thumb” és „fingers” (tenyér, hüvelyk, ujjak) doménre oszthatóak.

A nukleinsav szintézis során a polimerázok a primer 3' végéhez kötnek. A bejövő dNTP az aktívhelyhez kötődve a primer utolsó nukleotidjával π - π kötés révén illeszkedik, a templát szállal pedig Watson-Crick szabályok szerinti hidrogénkötéseket hoz létre. A nukleotid az α és β foszfát között hasítódik Mg ionok segítségével, a primer 3' OH csoportja és a bejövő nukleotid α foszfát csoportja között észter kötés jön létre. A nukleotid kötéshez és hidrolízishez kapcsolatosan a polimerázban konformáció változások mennek végbe, melyek során a „fingers” domén helyzete változik. Az ujjak zárodása és nyitódása központi szerepet tölt be a működési mechanizmusban. A dNTP megfelelő illeszkedése a DNS lánchoz lassú konformáció változást eredményez, mely során a komplex záródik. Ez elengedhetetlen feltétele a kémiai reakciónak, azaz a hidrolízisnek és az új foszfodiészter kötés kialakulásának. A reakció végbemenetele szükséges az ujjak nyitódásához, ami pedig a pirofoszfát (PP_i) elengedésének és a transzlokációnak alapfeltétele (Keller és Brozik, 2005).

A kísérletek azt mutatják, hogy a polimerázok önmagukban nem vagy csak kis mértékben (10-15 nt) processzívek. A replikációban szükséges processzivitásukat (1. táblázat) különböző fehérje-interakciók biztosítják.

A polimeráz neve	Folyamat amelyben részt vesz	Járulékos proteinek jelenléte	Processzivitás (nt / kötés)	Szerkezet	Genom mérete (nt)*	Forrás
Polimeráz I	Replikáció (követőszál nick- translation; plazmidok), javítás	önmagában	15- 20	E. coli	5,528,445	Camps és Loeb, 2004
		pol III repliszóma elemei	400- 500			
Polimeráz II.	Hibajavítás	önmagában	20			Bonner és mtsai, 1992***
		β gyűrű és γ-komplex	1600			
Polimeráz III.	Kromoszóma replikáció	holoenzim	> 50000			Kornberg és Baker 1992 **
Polimeráz IV	Hibajavítás	önmagában	distributív			Kobayashi és mtsai, 2002***
		β gyűrű és γ-komplex	50-500			
Polimeráz V	Hibajavítás	önmagában	6-8			Tang és mtsai, 2000***
		RecA	10500			
gp5	Replikáció	holoenzim	17 000	T7 fág	39937	Hamdan és Richardson, 2009
gp43	Replikáció	holoenzim	> 20000	T4 fág	168903	Kornberg és Baker 1992 **

* NCBI adatbázisa alapján: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes>

** „Breyer és Matthews, 2001. A structural basis for processivity”-ben található táblázatból

***A jelölt cikkeket az irodalomjegyzékben nem tüntettem fel, mert csak adatgyűjtésre használtam őket. Jegyzékük alább olvasható:

Bonner, C.A. Stukenberg, P.T., Rajagopalan, M., Eritja, R., O'Donnell, M., McEntee, K., Echols, H., Goodman, M.F. (1992) Processive DNA synthesis by DNA polymerase II mediated by DNA polymerase III accessory proteins. Journal of Biological Chemistry; Volume 267, Issue 16, 1992, Pages 11431-11438
Sawami Kobayashi, Michael R. Valentine, Phuong Pham, Mike O'Donnell, and Myron F. Goodman. (2002) Fidelity of Escherichia coli DNA Polymerase IV. J. Biol. Chem. Vol.277, Issue37, 34198-34207
Tang M, Pham P, Shen X, Taylor JS, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF. (2000) Roles of E. coli DNA polymerases IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. Nature; 404(6781):1014-8

1. táblázat: *E. coli* és *E. coli* bakteriofág polimerázok processzivitása

A táblázat az *E. coli* polimerázaira, az *E. coli* T7 bakteriofág gp5 és az *E. coli* T4 bakteriofág gp43 polimerázára vonatkozó adatokat tartalmaz. A polimerázok processzivitása mellett feltüntettem a DNS anyagszere-folyamatot, amelyben részt vesznek, illetve az egyes organizmusok genomméretét. Ez utóbbi a processzivitás és a genom méret összehasonlítását szolgálja.

Látható, hogy az enzimek processzivitását különböző „fehérje környezetben” vizsgálták, illetve hogy bizonyos járulékos proteinek (többnyire β gyűrű és γ komplex) jelenléte a processzivitást jelentősen befolyásolja

3.2. A processzivitási kapcsok

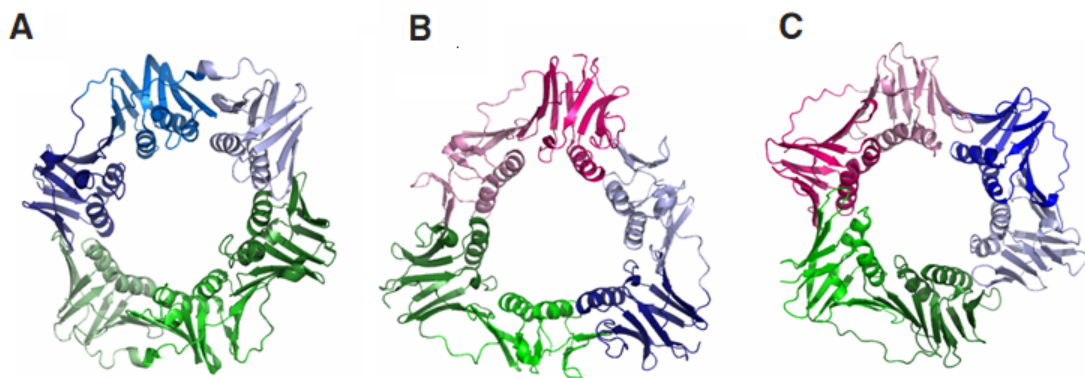
3.2.1. A processzivitási kapcsok szerkezete

A legrégebben ismert processzivitási faktorok közé tartoznak a szakirodalomban „sliding clamp”-ként emlegetett, polimerázokhoz kapcsolódó, DNS-t körülfogó fehérjék (továbbiakban DNS bilincs / kapocs, processzivitási kapocs) (2. ábra). Ezek működésének lényege, hogy a replikáció folyamán zárt, vagy közel zárt struktúrát alkotnak a templát körül

önmagukban (Pol II, Pol III családba tartozó polimerázok esetén) (Hamdan és Richardson, 2009), vagy a polimerázzal közösen (pl. *E. coli* T7 bakteriofág, HSV polimerázok esetén), ami által topológiailag meghatározó módon kötnek a DNS-hez. Polimerázzal való kötésük a katalitikus egységet közvetve, de stabilan kapcsolja a DNS-hez. Ez utóbbi kötés az aktívhelytől független, így a szintézist magát nem befolyásolja. A fent leírt DNS-protein, protein- protein interakciók lehetővé teszik a szabad transzlokációt, miközben a szintézist végző motor és a DNS kapcsolata fennmarad.

Az eukarióta (PCNA- Proliferating Cell Nuclear Antigen) és a prokarióta (Eubacteria: polimeráz holoenzim β alegység; Archea: PCNA) DNS kötő processzivitási faktorokra egyöntetűen a hat doménből álló, gyűrű alakú szerkezet jellemző. Ez a hatdoménes szerkezet jelenthet kétdoménes homotrimert (PCNA: 2. ábra C) vagy háromdoménes homodimert is (β -kapocs: 2. ábra A) (Wyman és Botchan, 1995; Kelman és mtsai, 1998; Georgescu és mtsai, 2008). Hasonló szerkezet figyelhető meg a T4 bakteriofág gp45 fehérjéje esetén is, mely szintén processzivitási gyűrűként működik (2. ábra B) (Wyman és Botchan, 1995; Kelman és mtsai, 1998).

A kapcsok harmadlagos, térbeli szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat, annak ellenére is, hogy a szekvenciális egyezés kis mértékű: az eukarióta és a prokarióta processzivitási kapcsok aminosav szekvenciája közötti hasonlóság mindössze 10 %, sőt az eukarióta csoporton belüli egyezés is mindössze 30-40 % (Wyman és Botchan, 1995).



2. ábra: Processzivitási gyűrűk szerkezete

A, *E. coli* polimeráz holoenzim III β alegysége (PDB: 3d1e). A β homodimer alegységeit zöld, illetve kék színnel jelöltem. Az egyes alegységek doménjeit az alegységnek megfelelő színek árnyalataival színeztem

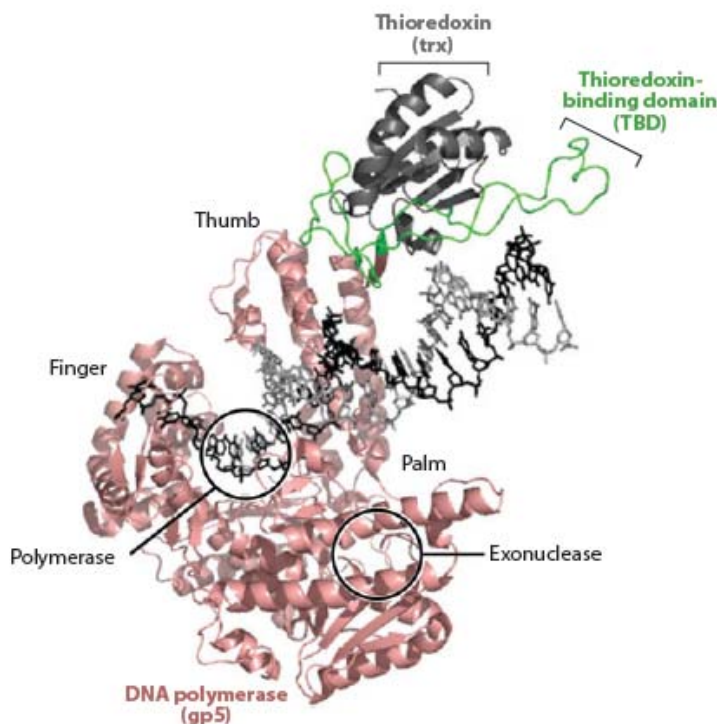
B, Bakteriofág T4 gp45 processzivitási gyűrűje (PDB: 1czd). A gp45 homotrimer formájában működik. Az egyes alegységek zöld, kék illetve pink színűek. A domének az előzőekhez hasonlóan vannak jelölve.

C, *Sulfolobus solfataricus* PCNA gyűrű (pdb: 2hii) homotrimer. Színek az előzőeknek megfelelően.

Az ábrákon megfigyelhető a domének, és a teljes fehérjék hasonló szerkezetűje. A belső, DNS-sel érintkező oldalt α -hélixek, míg a külső oldalt β redők formálják.

Az ábrákat a Pymol program segítségével készítettem a megjelölt PDB fájlok felhasználásával.

A PCNA és a β esetén is az alegységek „fej-farok” orientációban kapcsolódnak egymáshoz, oly módon, hogy a DNS-sel érintkező központi csatornát összesen 12 α -hélix határolja. A külső oldalt antiparalell elhelyezkedésű β -láncok fedik (2. ábra). Az alegységek C terminális felszínén hidrofób fehérjekötő zseb található, ide köt a DNS-szintézist végző polimeráz, a bilincset a DNS-re felcsatoló enzim („clamp loader”), illetve számos más fehérje, melyeknek a replikáció, illetve a sejtosztódás szabályozásában szerepük lehet (Wyman és Botchan, 1995; Georgescu és mtsai, 2008) (Jelentőségét 1. később). A nemrégiben (2008) kokrisztallizált *E. coli* β kapocs- DNS komplex alapján a proteinkötő zseb képes mind ssDNS, mind dsDNS kötésére, utóbbira azonban csak ssDNS/dsDNS határon. Ez a jelenség fontos a „clamp loading” folyamatban (1. később).



3. ábra: *E. coli* T7 bakteriofág gp45/trx komplex DNS-sel.

(Hamdan és Richardson, 2009)

Az ábrán rózsaszínnel jelölve látható a gp45 polimeráz. A „Palm” (Tenyér), „Fingers” (Ujjak) és „Thumb” (Hüvelyk) feliratok a polimeráz megfelelő doménjeit jelölik. A „Polymerase” és „Exonuclease” jelölések a polimeráz és az exonukleáz aktívcentrumokat mutatják. A thioredoxin szalagmodellként. A gp45 az ábrán a thioredoxin (fekete) processzivitási faktoral komplexben látható. A thioredoxin kötő domén (TBD) (zöld) a polimeráz „thumb” régiójában található. A DNS duplex fekete illetve szürke „pálcika” modellel van feltüntetve.

Más szupercsaládokba tartozó (főleg virális) polimerázok esetén hasonló elven működő, de eltérő megoldásokat találunk.

Az *E. coli* T7 fág polimeráza (gp5) alacsony processzivitással (1-15 nt (Hamdan és Richardson, 2009)) rendelkezik. Az *E. coli* thioredoxin fehérje jelenlétében a processzivitásban 80-szoros növekedés figyelhető meg (Kelman és mtsai, 1998). A thioredoxin jelenléte a gp5 DNS-hez tartozó disszociációs állandóját nagymértékben lecsökkenti: K_d (gp5) = 70 nM; K_d (gp5/trx) = 3 nM (Hamdan és Richardson, 2009).

Az *E. coli* DNS polimeráz I. családba tartozó gp5 homológ a családba tartozó polimerázok

Klenow fragmentumával, de ahhoz képest tartalmaz egy 71 aminosav hosszú toldalékot, ami egy hurkot képez a H és a H1 jelzésű α -hélixek között. A H-H1 hurok a „hüvelyk” régióban található. Az enzimnek ez a része köti a thioredoxint (TBD: thioredoxin-kötő domén); ennek hiányában a processzivitásban megfigyelt növekedés sem jelentkezik, még thioredoxin jelenlétében sem (Kelman és mtsai, 1998) (3. ábra).

A thioredoxin szerkezete nem gyűrű alakú – hiszen eredeti funkciója nem a replikáció processzivitásának biztosítása –, a polimerázzal közösen azonban közel zárt struktúrát alkothat. Valószínű, hogy a két fehérje kapcsolata flexibilis, tehát a komplex záródni is képes működés közben (Kelman és mtsai 1998). Az egyik feltevés szerint a thioredoxin a TBD-n kívül a polimeráz exonukleáz doménjével is képes kapcsolatot létrehozni, ezáltal gyűrű alakú, „clamp”-szerű struktúrát létrehozva. Egy másik modell alapján a trx bázikus aminosavainak segítségével kiegészíti a polimeráz DNS-kötő régióját, ezáltal erősítve a DNS- polimeráz kapcsolatot (Hamdan és Richardson, 2009).

Számos más vírus polimeráza is kis proteineket használ a processzivitás megvalósításához. A szintén *E. coli* bakteriofág T3 hasonlóan a T7-hez thioredoxint köt (Hamdan és Richardson, 2009); a Herpes Simplex Vírus (HSV) processzivitási faktora, az UL42 dsDNS kötő protein (a vírus saját fehérjéje) (Kelman és mtsai, 1998). Ezek a proteinek lehetnek virális vagy gazdasejt eredetűek is. Esetükben a processzivitási faktor energiaigényes DNS-re csatolását végző CLP-re nincs szükség (Komazin-Meredith és mtsai, 2008).

3.2.2. A diffúziós mechanizmusok szerepe a processzivitási kapcsok működésében

A DNS menti diffúzió jól elkülöníthető a motorfehérjék által végzett egyirányú, energiaigényes transzlokációtól. A diffúziós mechanizmusoknak azonban fontos szerepük lehet a DNS-kötő kapcsok közvetítette processzivitásban, annak ellenére, hogy itt konkrét diffúzióról nem beszélhetünk, mivel a mozgást a polimerázok aktivitása hajtja.

A DNS menti diffúziót, illetve annak típusait Berg foglalta össze 1981-ben. Elkülönített egydimenziós és háromdimenziós DNS menti diffúziót. Utóbbi esetben a fehérje DNS-en történő helyváltoztató mozgását a DNS-ről való disszociáció, majd egy eltérő, távoli, nem meghatározott helyen bekövetkező reasszociáció eredményezi. Az egydimenziós mozgás alatt Berg pozicionálisan koordinált mozgást ért. Ennek 2 fajtáját különíti el, a „sliding”-ot

(„csúszás”) és a „hopping”-ot („ugrándozás”). A sliding helikális útvonalon történő mozgást jelent, mely során a fehérje elektrosztatikus kapcsolatok révén végig kötve marad a nukleinsavhoz. A hopping-ot erősebb kötés jellemzi, a helyváltoztatást mikroszkópos disszociációk és reasszociációk sorozata eredményezi, mely során a makroszkópikus kötés fennmarad. A mikroszkópikus disszociáció definíció szerint azt jelenti, hogy a fehérje csak olyan mértékben távolodik el a DNS-től, hogy a kationok vissza tudjanak kötni a negatíván töltött cukorfoszfát-vázhoz (Berg és mtsai, 1981).

A processzivitási kapcsok mozgása az egydimenziós diffúzióknak felel meg. Az általánosan használt „sliding clamp” kifejezés azonban nem feleltethető meg a „sliding” mechanizmusnak, a processzivitási kapcsok diffúziója kevésbé vizsgált téma. Ez alól kivételt képez például a HSV polimerázának processzivitási faktora (UL42), mely a „hopping” módszert „használja”. Az elvégzett kísérletekben a sókoncentráció és a DNS-hossz a DNS-hez asszociált fehérje kötésének féléletidejére gyakorolt hatását vizsgálták különböző módszerekkel. Az eredmények azt mutatják, hogy a látszólagos disszociációs állandó függ a sókoncentrációtól; ill. magas só koncentráción a DNS hosszától is, ami valóban megfelel a hopping mechanizmusnak. Alacsony sókoncentráción a diffúzió lassú az elektrosztatikus és más jellegű kölcsönhatások miatt. Magas sókoncentráción a kationok DNS-hez kötődése gyengíti ezeket a kölcsönhatásokat, a fehérje mikroszkópikusan disszociál, mobilitása ezáltal megnő. Ez lehetőséget teremt arra, hogy rövid időn belül egy, a közelben lévő helyen újra kössön. Magas sókoncentráción a látszólagos disszociációs állandó alacsony, a DNS kötött és szabad állapot között az energia különbség nagy, a makroszkópos disszociáció valószínűsége csökken.

A diffúziós sebesség a replikáció sebességénél nagyobb, így a processzivitási faktor nem lassítja le a polimeráz, a sebességet a polimerizáció szabja meg.

A nem gyűrű alakú processzivitási faktorok esetén a „hopping” mechanizmusnak, és az alacsony disszociációs állandónak fontos szerepe lehet (Komazin-Meredith és mtsai, 2008).

3.2.3. Clamp loading

A processzivitási kapcsok gyűrű alakúak, DNS-re épülésük a gyűrű felnyitását megköveteli. A homooligomer szerkezet rendkívül stabil, a β esetén pl. $K_d < 50$ nM a dimerre nézve (Jeruzalmi és mtsai 2001a). Ez az elektrosztatikus és hidrofób interakciók révén létrejövő erős kapcsolat az oka annak, hogy a jellemzően inkább oligomer formában jelenlévő

fehérje DNS-re csatolása energiaigényes folyamat. A kapcsolót az ún. „clamp loader” proteinek (CLP-k) helyezik a DNS-re a repliszóma összeépülésekor, illetve az új Okazaki fragmentum szintézisének megkezdésekor.

Az Eubacteria csoportra jellemző β kapcsolóhoz tartozó ilyen CLP az ún. γ -komplex, mely szintén a polimeráz holoenzim alegysége. A komplex összetétele a következő: γ/τ : δ : δ' : χ : ψ = 3:1:1:1:1 (Lovett, 2007). A γ , τ , δ , δ' alegységek kör alakú struktúrát formálnak, mely a δ' - δ kapcsolat révén záródik (Jeruzalmi és mtsai, 2001b). A γ , τ , δ' ATPáz aktivitással rendelkezik, a τ -nak a polimeráz kapcsolásában van szerepe, a δ pedig a β kölcsönható partnere (Jeruzalmi és mtsai, 2001b). A γ és a τ ugyanazon gén (DnaX) terméke, a τ egy C terminális régióval hosszabb; ez felelős a polimeráz kötéséért. A χ és a ψ az SSB proteinnel létesítenek kapcsolatot, illetve elősegítik a primáz-polimeráz váltást a követő szálon, a komplex működéséhez nem esszenciálisak (Jeruzalmi és mtsai, 2001a; Lovett, 2007).

A $\gamma:\delta:\delta' = 3:1:1$ összetételű γ -komplex, illetve a δ alegység β -val alkotott komplexének kristályszerkezetéből a mechanizmus sok részletére fény derült (Jeruzalmi és mtsai, 2001a; Jeruzalmi és mtsai, 2001b). A komplex egy ATPáz motorfehérje, mely ATP kötés hatására nyitott konformációt tud felvenni: a δ helyzete oly módon változik, hogy a komplextől mintegy eltávolodik, így képes kölcsönhatni a β -val. A δ - β komplex szerkezetének vizsgálatai azt mutatják, hogy a δ kötésének hatására a β -ban olyan konformáció-változás jön létre, amely gyengíti a dimerben a β -alegységek közötti kölcsönhatást, ezáltal annak nyitódását okozva. A δ nem a dimerizációs felszínen, hanem attól távolabb, a proteinkötő zsebbe kötődik.

A β -kapocs felcsatolásában jelentős szerepe van a β DNS-kötésének is. A δ -hoz hasonlóan az ssDNS a β proteinkötő zsebébe illeszkedik, ezáltal elősegítve a β - δ kapcsolat megszűnését és a clamp záródását a DNS körül. A β -primerizált DNS kapcsolat biztosítja azt is, hogy a β ne mozduljon el a kezdőpontból a polimeráz kötése előtt (Georgescu és mtsai, 2008).

Az *E. coli* esetén a β felcsatolása tehát a következőképpen zajlik: A γ -komplex egyik τ -vagy γ -alegysége ATP-t köt, melynek hatására a komplexben olyan konformáció változás jön létre, amely lehetővé teszi a δ -alegység számára a β -dimer kötését, mely annak felnyílásához vezet. A β ezután a primer-templáthoz köt. Ez a DNS kötés stimulálja a γ -komplex ATPáz aktivitását. Az ATP-hidrolízis újabb konformáció-változást eredményez a komplexben: a δ elengedi a β -t, a dimer – most már a DNS-hez kapcsolva – záródik. A kapocs a primerhez kötődik, a DNS mentén elmozdulni nem tud. Következő lépésként a CLP τ -alegysége a polimerázt (a holoenzim α -alegységét) a β -gyűrűhöz kapcsolja. A polimeráz szintén a

hidrofób proteinkötő zsebhez kapcsolódik, ezáltal a kötött primer kompetitora. A polimeráz kötésének hatására a DNS a kapocs központi csatornájába helyeződik át. A β -dimer – a polimerázhoz igazodva – most már képes elmozdulni a DNS mentén (Georgescu és mtsai, 2008; Hamdan és Richardson, 2009).

Az eukarióták esetén a CLP funkciót az RFC (Replication Factor C) fehérje látja el, mely a gamma komplexhez hasonlóan 5 alegységből áll. Összeségében a szekvencia hasonlóság a γ -komplex és az RFC között csekély, de az RFC 2-5 alegység és a γ , τ , δ' ; illetve a δ és az RFC 1 között már jelentős hasonlóság mutatható ki. A δ -hoz hasonlóan az RFC 1 a processzivitási kapocssal hat kölcsön. A CLP-knek a processzivitási faktorról kapcsolódó alegységeit „wrench”-ként (franciakulcs, csavarkulcs) is emlegetik, utalva a felnyitás mechanizmusára. A különböző „wrench”-ek aktívhelyei konzerváltak (Jeruzalmi és mtsai, 2001a és 2001b).

3.3. Dinamikus processzivitás

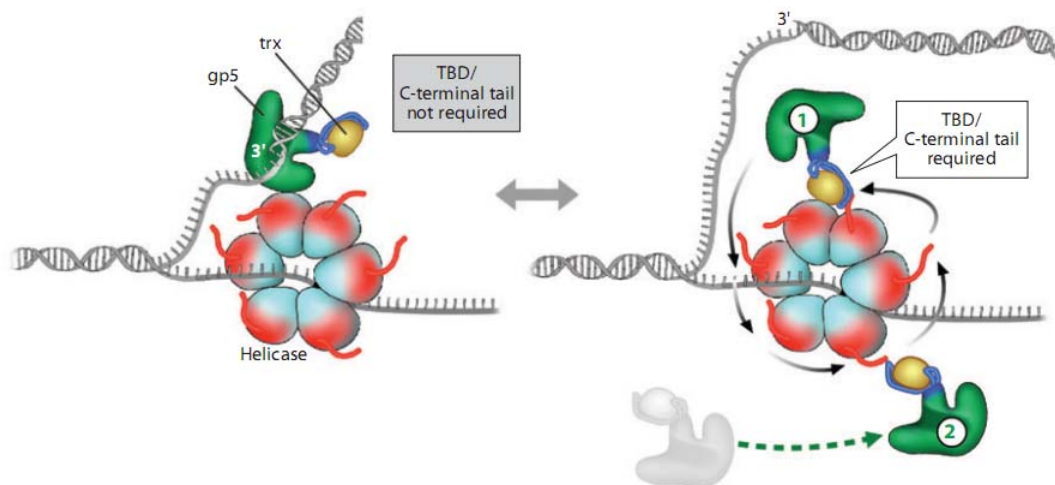
Újabb vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a polimeráz még a processzivitási kapocssal „felszerelve” sem éri el maximális processzivitását. T7 fág esetén pl. a gp5/trx komplex kötésenként 700-1000 nukleotid szintézisére képes (Hamdan és mtsai, 2007). Ez egy nagyságrenddel még mindig kevesebb a T7 fág replikációs komplex esetén mért legmagasabb processzivitásnál (17 kb). A gp5/trx komplexet kiegészítve a fág replikatív helikázával, mely a gp4 jelzést viseli a mért processzivitás már eléri a 17 kb értéket. A növekedést nem az okozza, hogy az adott processzivitású gp5/trx komplex egy a DNS-hez sokkal jobban kötődő fehérjéhez kapcsolódik, hiszen a gp4 processzivitása önmagában mindössze 60-350 nukleotid. Az interakció nemcsak a processzivitásra, hanem a fehérjék működésének átlagos sebességére is hatással van. Míg a gp4 átlagos sebessége 15-30 nt/s, a thioredoxin kötött gp5 polimerázé pedig 220 nt/s, addig a gp5/trx/gp4 komplex sebessége 165 nt/s körüli érték (Hamdan és Richardson, 2009).

A gp5/trx/gp4 komplex stabilitása ssDNS jelenlétéhez kötött. Kétféle kötési módot feltételeznek: egy erősebb DNS-függőt, és egy gyengébb DNS-függetlent. Az erősebb kapcsolat mibenléte még nem tisztázott. A gyengébb kötésért a gp4 monomerek 17 C-terminális savas aminosava, illetve a C-terminális fenilalanin felelős. Az ezzel kapcsolatot létesítő partner a polimerázban a TBD-ben található. A trx jelenléte stimulálja a polimeráz-helikáz kapcsolat létrejöttét – trx nélkül a gp5-helikáz komplex processzivitása mindössze 5

kb –, ami azt mutatja, hogy a trx a gp4 helikázzal kialakuló kapcsolatban is fontos szerepet játszik. A kapcsolatot a helikáz C-terminális régiójával összesen 3 bázikus hurok hozza létre.

A gyenge kötés eliminálása – a C terminális régió eltávolítása, a savas aminosavak bázikusra cserélése vagy a terminális Phe módosítása által – a processzivitásban jelentős, ötszörös csökkenést mutat. Ez arra enged következtetni, hogy a gp5/trx/gp4 komplex meg növekedett processzivitásnak oka nem a létrejövő komplex nagy stabilitásában, azaz nem az erős kötésben keresendő.

A fenti eredmények (illetve más fehérjéken megfigyelt jelenségek) alapján állították fel a következő modellt. A polimerázok valójában disztributív, vagy csak kis mértékben processzív enzimek. Ezt alátámasztja az is, hogy tisztított formában a különböző polimerázok processzivitására csak alacsony értékeket mértek. A komplexekben mért magas processzivitásokat az teszi lehetővé, hogy ha a katalitikus egység disszociál, egy új polimeráz helyettesíti. Ez a csere a replikációban nem okoz fennakadást, sőt gyakori esemény, a replizóma működésének processzivitását, ezáltal hatékonyságát biztosító folyamat, melyet a komplexen belüli interakciók tesznek lehetővé (Yang és mtsai, 2004; Lovett, 2007; Hamdan és mtsai 2007; Hamdan és Richardson, 2009).



4. ábra: Kétféle kötési mód az *E. coli* T7 bakteriofág gp4 helikáza és a gp5/trx komplex között (Hamdan és mtsai 2007)

A baloldali ábrán a gp4 helikáz (Helicase felirattal jelölve) a gp5/trx komplexet a C-terminális régiótól függetlenül köti. Ez a fajta kötés lehetővé teszi a nukleinsav polimerizációt.

A jobb oldali ábrán a C-terminális régióhoz kapcsolt gp5/trx komplexek láthatóak. Ez a fajta kötés az előbbinél gyengébb, elektrosztatikus jellegű. Szerepe a polimeráz kicserélődésében lehet. Ha a DNS-t éppen másoló polimeráz disszociál a DNS-ről ezzel a fajta kötéssel a helikáz C-terminális régiója a replikáció villa közelében tarthatja vagy lehetővé teszi, hogy az oldatból pótlódjon.

T7 fág esetén a fentieket a helikáz- polimeráz kapcsolat biztosítja. Nukleinsav szintézis közben a polimeráz az erős kötési mód segítségével kapcsolódik a helikázhoz. Ha a polimeráz disszociál a DNS-ről, akkor a kapcsolat átvált a DNS-független, gyengébb, elektrosztatikus kötésre. Ez a mechanizmus egyrészt képes megakadályozni a disszociált enzim eltávolodását a replikációs komplextől, lehetővé téve azt, hogy az újrakössön a DNS-hez; másrészt a helikáz „tartalék” polimerázokat is köthet (a helikáz hexamer formában van jelen; hat polimeráz-kötő régióval rendelkezik), amik az éppen aktív polimeráz disszociációja esetén helyettesíthetik azt (5. ábra) (Hamdan és mtsai, 2007; Hamdan és Richardson, 2009).

T4 fág gp43 replikációs polimeráz processzivitásának vizsgálata folyamán is hasonló eredményekre jutottak. A T4 fág replikációs komplex féléletideje a DNS-en 9-15 perc, ami erősen processzív replikációnak felel meg (a genom teljes megkettőződése kb. 15 percet igényel). Emellett ismert, hogy a repliszóma rendkívül dinamikus komplex. Ez teszi lehetővé például a követő szál Okazaki fragmentumokban történő szintézisét, de más folyamatokban, pl. a transzkripcióban szerepet játszó fehérjék is kapcsolatba kerülhetnek a repliszómával. Ezt a „flexibilitás kontra processzivitás” problémát vizsgálták vad típusú (wt) és mutáns polimerázok felhasználásával. Egy olyan aktív hely mutánst, melynek repliszómához kapcsolódása a DNS-szintézis leállást eredményezi, arra használtak, hogy megfigyeljék, vajon a replikációt végző polimeráz disszociál-e a komplexről, vagy valóban oly mértékben processzív, hogy képes 9-15 percig a DNS-hez, illetve a komplexhez kötve maradni. Ha a wt polimeráz disszociál, az utólag hozzáadott mutáns enzim helyettesítheti a komplexben, ami a replikáció leállítását eredményezi. A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a wt polimeráz mind a vezető, mind a követő szál esetében 1 perc alatt kicserélődik a mutáns enzimre. Ha a kísérletet a polimeráz egy C-terminális régió nélküli mutánsával végezték el, a csere nem következett be. A C-terminális régió a gp45 processzivitási gyűrűhöz való kapcsolódásért felelős, ami feltételezi, hogy a kapcsolatnak szerepe van az aktív polimeráz váltásban. Az eredmények alapján feltételezték, hogy a T7 helikáz-polimeráz kapcsolathoz hasonlóan, a gp45 kapocs és a gp43 polimeráz között is kétféle kötési mód létezik, ami lehetővé teszi a cserét (Yang és mtsai, 2004). Más elképzelés szerint a polimeráz ebben az esetben is a helikázzal kapcsolódik a T7 fágban megismert mechanizmushoz hasonlóan. Ez a kapcsolat ezidáig nem ismert (Hamdan és Richardson, 2009).

Utóbbi elképzelés alapjául szolgál, hogy ilyen helikáz-polimeráz kapcsolat az *E. coli* replikációs rendszerében is létezik (bár a kapcsolat közvetett), és ennek szerepe van a polimeráz kicserélődésben. Ez a közvetett kapcsolat a γ -komplex τ -alegységén keresztül jön

létre, melynek C terminális része két doménre osztható fel (IV, V). Közülük a IV domén a polimeráz holoenzim α -alegységét, az V domén pedig a DnaB helikáz C terminális régióját köti (1.a ábra). A τ IV doménje és a polimeráz között kétféle, egy erősebb és egy gyengébb kötési módot figyeltek meg, ami feltételezhetően a polimeráz váltásban játszik szerepet (Hamdan és Richardson, 2009).

Valószínűnek tűnik, hogy a normál replikációban résztvevő γ -komplex 3 τ -alegységet tartalmaz. Ez lehetővé teszi azt is, hogy a replikációs komplexben egyszerre 3 polimeráz legyen jelen. A DnaX gén termékeire nézve különböző összetételű γ -komplexeket vizsgálva azt tapasztalták, hogy a 3 τ -t tartalmazó CLP esetén a replikáció 60%-kal gyorsabb az egy γ -t és 2 τ -t tartalmazónál, illetve, hogy előbbi esetben az Okazaki fragmentumok rövidebbek, mint az utóbbiban. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a γ -komplex 3 τ -t tartalmaz. (Korábban a tisztított fehérje elektroforetikus mintázata alapján azt feltételezték, hogy a komplexben a γ -alegység szerepel nagyobb arányban, és ennek következtében ez az, ami a CLP működésében esszenciális. Ez valószínűleg a fehérjetisztítási eljárás műterméke volt, ugyanis a τ C-terminális extrarégiójából kifolyólag nagyobb mértékben van kitéve proteolízisnek (extracelluláris OmpT proteáz), mint a γ . Ily módon a proteolízis következtében a τ pontosan azzal az extrarégióval lesz rövidebb, ami a γ alegységtől megkülönbözteti. Emiatt a γ -tól elektroforézissel el nem különíthető fragmentek keletkezhetnek.) Amennyiben a repliszómában valóban három τ , illetve polimeráz van jelen, az megkönnyíti mind a követő szálon történő fragment váltást, mind a polimeráz kicserélődést, sőt akár templátváltást is lehetővé tehet a replikáció során (Lovett, 2007).

A dinamikus, de ugyanakkor processzív replikáció fontos elemei a processzivitási kapcsolatok, melyek esetén szintén kétféle kötési módot feltételeznek. Amint az feljebb már említésre került, a processzivitási gyűrűk proteinkötő zsebébe számos fehérje képes kötni: β clamp esetén a polimeráz III α -alegységen kívül a Pol I, II, IV, V (Hamdan és mtsai, 2007; Lovett, 2007); a γ -komplex δ alegysége, a DNS ligáz I (López de Saro és O'Donnell, 2001; Lovett, 2007), és a MutS (mismatch repair recognition factor) (López de Saro és O'Donnell, 2001; Lovett, 2007). Hasonlóan a β -hoz, a PCNA gyűrűnek is számos interakciós partnere van (López de Saro és O'Donnell, 2001; Lovett, 2007). Ezek a fehérjék mind a replikációhoz, illetve más DNS-anyagcsere folyamatokhoz köthetőek, pl. a hibajavításhoz. A processzivitási gyűrűket molekuláris „toolbelt”-ként is emlegetik, melynek szó szerinti jelentése „szerszámos öv”. A kifejezés utal arra, hogy a clamp szimultán több faktort köthet és vihet magával a replikáció során. Ezek a faktorok a replikáció közbeni hibajavításban szerepet játszhatnak. A β gyűrűhöz egyszerre több fehérje is képes kapcsolódni, megfigyeltek pl. olyan

komplexet, amelyben a β -hoz egyszerre kapcsolódik egy Pol IV és a Pol III. A komplexben valószínűleg az egyik polimeráz éppen disszociál, míg a másik éppen hozzá kapcsolódik a processzivitási gyűrűhöz a τ segítségével (Lovett, 2007).

Ezzel párhuzamosan számos alkalommal megfigyelték, hogy az egyébként kis processzivitású nem replikatív polimerázokat a replikációs komplex elemei (rendszerint a processzivitási gyűrűvel és a CLP-vel folytatva a vizsgálatok) serkentik (l. 1. táblázat). *E. coli* Pol I esetében – mely tisztítva 15-20 nukleotid után disszociál – például mértek 700 nt processzivitást is. Ez alapján állították fel azt a modellt, amely szerint a pol I-nek fontos szerepe lehet bizonyos plazmidok replikációja mellett a rekombinációs hibajavításban is (Camps és Loeb, 2004).

Összefoglalva tehát az újabb eredmények azt mutatják, hogy önmagukban a polimerázok disztributív enzimek: processzivitással, pontosabban dinamikus processzivitással a holoenzim/ repliszóma, vagy a replikáció jellemezhető.

Mi a jelentősége ennek? A replikáció processzivitásának jelentőségéről volt már szó a bevezetésben. Ezek a szempontok ugyanúgy fennállnak dinamikus processzivitás esetén is, azonban ez a dinamika újabb lehetőségeket is felvet. Lehetővé teszi például, hogy amennyiben a replikáció elakad például egy DNS léziónál, a normál polimeráz hibajavító enzimre cserélődjön le, anélkül, hogy az egész komplex disszociálna. A hibás rész befejezése után visszacserélődhet a replikatív polimeráz, és a másolás nagyobb fennakadás nélkül folytatódhat. A mechanizmus felveti a kérdést, hogy néhány, korábban posztreplikatívnak gondolt javító mechanizmus nem zajlik-e egy időben a replikációval.

Mivel a nagy processzivitásúnak gondolt replikatív helikázok disztributív, illetve kis processzivitással rendelkező enzimeknek bizonyultak, feltehetően ilyen szempontból nem különböznek a kis processzivitásúnak tartott hibajavító polimerázoktól. A processzivitás mértékét annak a folyamatnak a kiterjedtsége határozza meg, amelyben részt vesznek. Az egyes enzimek „bevetése” a replikáció során szabályozott.

4. A replikatív helikázok processzivitása

4.1. A helikázok

A helikázok motorfehérjék, melyek (d)NTP hidrolízis által generált konformációváltozások segítségével egy adott irányban transzlokálódnak a nukleinsav mentén, miközben

szétválasztják annak két szálát. Replikációban a helikáz aktivitás biztosítja az ssDNS templátot a primáz és a polimeráz számára.

A helikázok jellemzően ATPáz fehérjéknél előforduló RecA (helikázok SF1 és SF2 családja) vagy AAA+ (helikázok SF3 családja) -szerű harmadlagos struktúrát mutatnak. Mindhárom családban megtalálhatóak a helikáz funkció ellátáshoz szükséges, konzervált motívumok, azaz nukleinsavkötő, nukleotidkötő (Walker motívumok) és a konformációváltás továbbításáért, felerősítésért felelős szakaszok. A nukleinsav kötése történhet mind a cukorfoszfát-vázon, mind a bázispárokon keresztül. A kötés helye befolyásolja, hogy a helikáz nukleinsav specifikus: a foszfát vázon keresztül kötő helikázok ssDNS-hez és dsDNS-hez hasonló affinitással kötnek, míg a bázisokkal kölcsönhatóak inkább az ssDNS-t részesítik előnyben. A nukleotid kötőhely és a DNS kötőhely között allostérikus kapcsolat áll fenn, a nukleotid kötés befolyásolja a helikáz DNS kötési affinitását, a DNS kötés pedig serkenti a hidrolízist (Xi XG, 2007).

A DNS helikázok döntő többsége ssDNS-hez köt, így működésük megkívánja annak jelenlétét. Egy részük a duplex 3' végéhez kapcsolódó ssDNS régió jelenlétét, míg más részük 5' ssDNS vég jelenlétét igényli. Ez a fajta preferencia jellemzi az adott helikáz transzlokációs polaritását is. Ennek a polaritásnak az *in vitro* történő meghatározására egy közepesen ssDNS régiót tartalmazó duplex DNS-t használnak. A helikáz az ssDNS-hez köt. Ha az ssDNS régió 3' vége felé eső duplex régiót választja el, 5'-3' helikázzal van dolgunk; amennyiben pedig az 5' végen található régiót, akkor a helikáz 3'-5' transzlokációs polaritással jellemezhető (Lohman és Bjornson, 1996).

Replikációban a helikáz többnyire a követő szálhoz kapcsolódik, és ennek orientációját tekintve 5'-3' irányban transzlokálódik (Hamdan és Richardson, 2009).

A bázispárok közötti hidrogénkötések helikázok általi felnyitására mind passzív, mind aktív mechanizmust javasoló modellek születtek. A passzív mechanizmus esetén a bázispárok átmeneti szétválása az ss/ds DNS határon a termikus energia hatására spontán is bekövetkezik; a helikáz szerepe ennek az állapotnak a transzlokáción keresztül történő stabilizálásában van. A duplex szétválasztása abban az esetben aktív, ha a helikáz a bázispárok destabilizációjában közvetlenül részt vesz. A különböző modellek különböző helikázok vizsgálata során keletkeztek; valószínű, hogy a helikázok körében mind aktív (T7 gp4, HCV NS3), mind passzív mechanizmusok (T4 gp45, Rep) előfordulnak (Moore és Lohman, 1995; Lohman és Bjornson, 1996; Xi XG, 2007).

4.2. A helikázok processzivitása

A helikázok körében találunk erősen processzív motorokat (pl. RecBCD: 39 kbp (Dillingham és mtsai, 2005), T7 fág gp4 helikáz gp4/gp5/trx komplexben: 17kb (Hamdan és Richardson, 2009)) és kevésbé processzíveket (pl. UvrD: 255 bp egy molekula vizsgálatban (Dillingham és mtsai, 2005), HCV NS3: 40bp (Rajagopal és Patel, 2008)). Általánosságban elmondható, hogy a replikatív helikázokra jellemző a nagy processzivitás. A protein-protein kapcsolatoknak a helikázok processzivitásának kialakításában is fontos szerepe van (pl. T7 gp4 processzivitása önmagában kicsi, l. feljebb).

4.3. A helikázok processzivitását kialakító tényezők

4.3.1. Oligomerizáció

Sok helikáznál figyeltek meg aktivitást monomer formában, legtöbbjük azonban *in vivo* oligomerként működik. Sokukra a hexamer forma jellemző. Ebben az esetben a helikáz a DNS-t gyűrűként fogja közre, aminek szerepe lehet a processzivitásban is: csökken a transzlokációkor történő disszociáció valószínűsége (Lohman és Bjornson, 1996; Xi XG, 2007).

Az oligomerizáció emellett lehetőséget teremt az alegységek kooperatív működésére, ami végső soron hatékonyabb aktivitáshoz vezethet. T7 fág gp4 helikáza esetén figyelték meg a kooperáció DNS függését. Az egyes alegységekben, nem összehangolt módon, de DNS-kötetlen állapotban is végbemehet nukleotid-hidrolízis. Amennyiben a helikáz ssDNS-t köt, az egyes alegységekben szekvenciálisan történik a nukleotid-hidrolízis; mindig abban az alegységben, amely éppen a DNS-t köti. A kooperáció létrehozásában szerepe lehet annak, hogy az alegység-alegység interakciók a nukleotidkötő helyet is érintik, illetve feltétlenül szükséges a központi csatornában helyet foglaló bázikus hurkok és az aktívhely közötti kommunikáció is. Az e feladatot ellátó aminosavakat ezidáig még nem azonosították (Hamdan és Richardson, 2009).

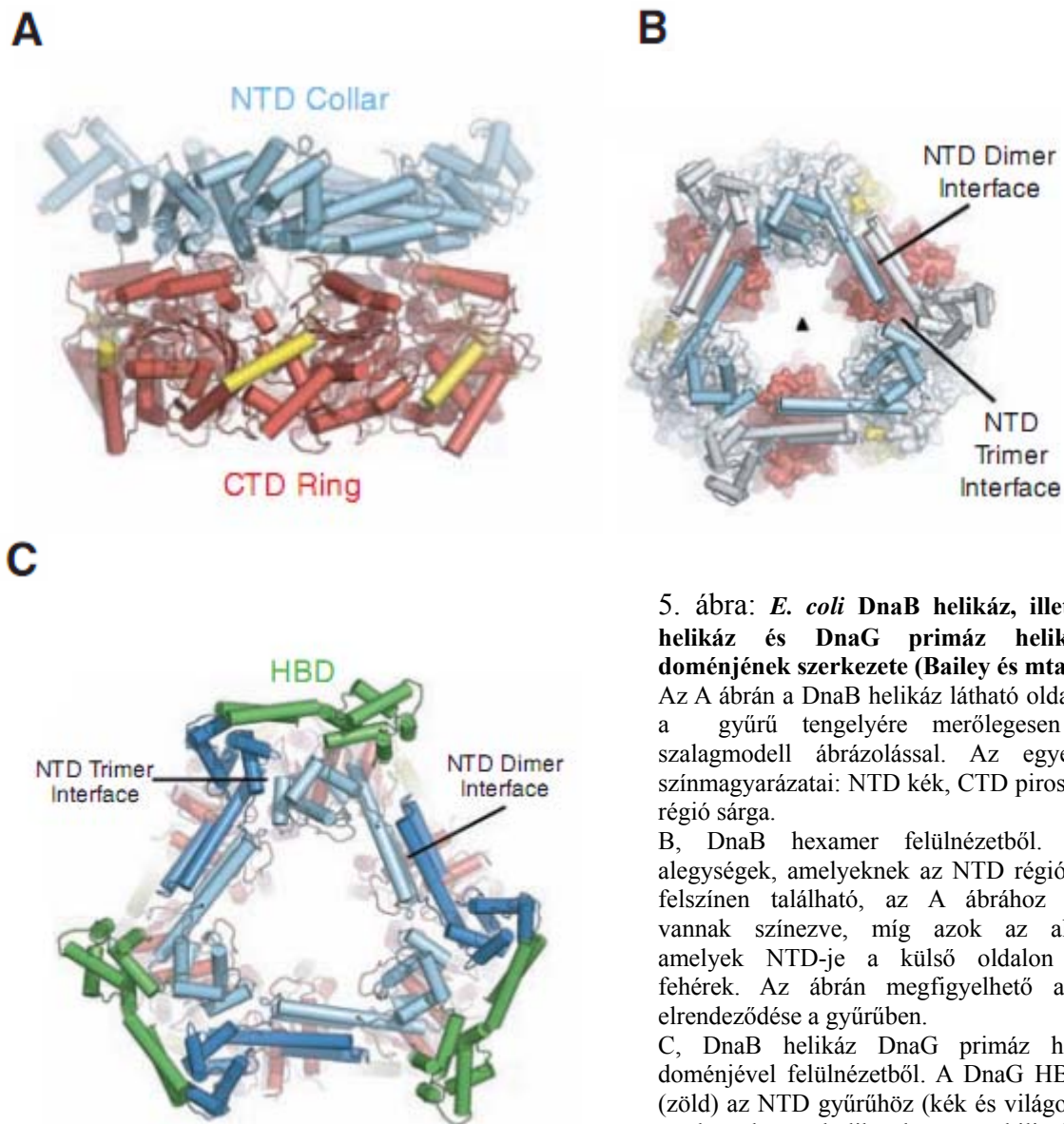
Az oligomerizáció nem csak a helikáz saját aktivitását befolyásolhatja. Replikáció esetében például a replizóma többi elemének működésére is hatással van: a korábban említett polimeráz-váltás T7 fágban csak akkor valósul meg, ha a hexamer mind a hat C-terminális régiója jelen van (Hamdan és Richardson, 2009).

4.3.2. A primáz hatása

A polimerázzal való közvetlen vagy közvetett kapcsolódás mellett nagyon fontos a primázzal való kapcsolat. *E. coli*-ban az ún. primoszómában, melyet a DnaB helikáz és a DnaG primáz alkot, a DnaB növeli és szabályozza a DnaG primer szintézisét, a DnaG pedig növeli a DnaB NTPáz és helikáz aktivitását (Bailey és mtsai, 2007; Hamdan és Richardson, 2009).

A DnaB-DnaG HBD (helikázkötő domén) komplex kristály szerkezete (5. ábra) azt mutatja, hogy a primáznak jelentős szerepe van a helikáz hexamer formájának stabilizálásában. A DnaB „kétemeletes” gyűrűt formál hexamerként. A második gyűrűt az N terminális rész alakítja ki (NTD- N-terminális domén), mely a hexamer képzéshez és a DNS két szálának elválasztásához elengedhetetlen, a helikáz aktivitásban azonban közvetlenül nem vesz részt. Az NTD-k egy része a saját alegység C-terminális doménjén (CTD), másik részük a szomszéd CTD-n helyezkedik el. Az NTD-k párokat alkotnak; a hexamer trimert alkotó dimerekből áll. A gyűrű kétrétegű: minden párban található egy belső és egy külső NTD, ami alapján az N terminális gyűrű akár két trimerre – egy belsőre és egy külsőre – is felosztható. A CTD-t és az NTD-t összekötő szakasz minden esetben kapcsolódik a szomszéd alegység CTD-jéhez. A primáz stabilizáló szerepe abban van, hogy az NTD párokat fixálja, ugyanis egy primáz HBD-je két NTD-hez kapcsolódik, az egyik subdomén a belső alegységhez, a másik a külsőhöz (Bailey és mtsai, 2007).

T7 fág esetében a helikáz és primáz kovalensen kapcsolt, egy gén termékei. A helikázt és a primázt összekötő kapcsoló régióknak az oligomerizációban szintén fontos szerepe van.



5. ábra: *E. coli* DnaB helikáz, illetve DnaB helikáz és DnaG primáz helikáz kötő doménjének szerkezete (Bailey és mtsai, 2007)

Az A ábrán a DnaB helikáz látható oldalnézetből, a gyűrű tengelyére merőlegesen irányból szalagmodell ábrázolással. Az egyes részek színmagyarázata: NTD kék, CTD piros, kapcsoló régió sárga.

B, DnaB hexamer felülnézetből. Azok az alegységek, amelyeknek az NTD régiója a belső felszínen található, az A ábrához hasonlóan vannak színezve, míg azok az alegységek, amelyek NTD-je a külső oldalon található, fehérek. Az ábrán megfigyelhető az NTD-k elrendeződése a gyűrűben.

C, DnaB helikáz DnaG primáz helikázkötő doménjével felülnézetből. A DnaG HBD régiója (zöld) az NTD gyűrűhöz (kék és világoskék), oly módon kapcsolódik, hogy stabilizálja annak elrendeződését.

4.3.3. Az egyszálú DNS-kötő fehérjék szerepe

Számos helikáz esetén kimutatták, hogy az egyszálú nukleinsavkötő proteinek jelenléte növeli hatékonyságukat. Hepatitisz vírus C NS3 fehérje helikáz doménjét *E. coli* SSB jelenlétében vizsgálva megállapították, hogy a hatékonyság-növekedés nem a sebesség, hanem a processzivitás növelésén keresztül történik. Az SSB valamilyen módon stabilizálja a helikázt a duplex elágazásánál. Ez vagy fizikai interakció, vagy olyan nukleinsav-struktúra létrehozása, amely kedvezően hat a helikáz DNS-kötésére. Más vírus helikázoknál is megfigyelték, hogy akár homológ, akár heterológ egyszálú nukleinsavkötő fehérje jelenléte növeli hatékonyságukat (Rajagopal és Patel, 2008).

5. Primáz szerepe a DNS replikációban

5.1. A primáz

A primáz egy DNS-függő RNS polimeráz, ami specifikus szekvenciáknál oligoribonukleotidot (5-20 nukleotid hosszúságú), ún. primert szintetizál a DNS polimeráz számára, amit az meghosszabíthat.

Rendelkezik egy Zn-kötő doménnel és egy RNS polimeráz doménnel. A primáz csak a megfelelő szekvenciáknál szintetizál primert. A DNS-en található felismerőhely kereséséért a Zn-kötő domén felelős, míg magáért az oligoribonukleotid szintéziséért az RNS polimeráz domén.

A két domént egy flexibilis régió köti össze. Ha a Zn- kötő domén nem specifikusan köt a DNS-hez, a primáz nyitott konformációban van jelen. A megfelelő szekvenciáknál a fehérje a flexibilis régión keresztül záródik. A primer szintézis csak ebben a zárt konformációban valósulhat meg (Hamdan és Richardson, 2009).

5.2. A primáz és a helikáz kapcsolata

A primáz alacsony ssDNS-affinitással rendelkezik. A helikázzal való interakció biztosítja számára az ssDNS-hez való kapcsolódást és a primáz aktívhelyének a helikáz aktivitás révén képződő ssDNS-hez orientálása révén a felismerőhely keresést. A DNS-t gyűrű alakban körülvevő helikáz és a kis processzivitású primáz között létrejövő kapcsolat alapvonásaiban a DNS polimeráz - processzivitási gyűrű fehérje-asszociációra emlékeztet.

A Zn-kötő domén és az RNS polimeráz domén közötti kölcsönhatás a primer szintézishez nélkülözhetetlen. Ennek a kapcsolódásnak két formája van. Alapállapotban az RNS polimeráz a saját Zn-kötő doménjéhez kapcsolódik. Ezt a formációt nevezik cisz módnak. Ún. transz módban az egyik alegység Zn-kötő doménje a szomszéd alegység RNS polimerázának katalitikus helyével alakít ki kapcsolatot. Utóbbit a helikázzal való kapcsolódás teszi lehetővé: az oligomerizáció biztosítja, hogy lokálisan több primáz alegység legyen jelen.

A primer első néhány nukleotidja cisz módban szintetizálódik, az oligonukleotid

maradék része pedig transz módban. Feltételezhető, hogy a transzmódban történő szintézis a helikáz működésében megállást okoz, aminek következtében a vezető szál szintézise is szünetel. A primáz a helikáz oligomer formájának stabilizálásában vesz részt, mint ahogyan az a DnaB és DnaG, illetve a T7 gp4 példáján is látható. A helikázokban az oligomerizáció fontos az alegységek katalitikus aktivitásának koordinálásában. A kapcsolódó primáz stabilizálja ezt az oligomerizációt. A transz módú szintézis talán olyan konformáció-változást okozhat, amely a helikáz aktív helyét is érinti, és így képes megállítani a fehérjét, és ez által egyben a vezető szál polimerázt is. Ez a két szál szintézisének koordinálásában rendkívül fontos, hiszen a primer szintézis a követő szálon a leglassabb esemény, T7 fágban például 6 másodpercet vesz igénybe (Bailey és mtsai, 2007; Hamdan és Richardson, 2009).

5.3. Primer „handoff”

A primáz nem csak megszintetizálja a polimeráz működéséhez szükséges oligonukleotid szakaszt, hanem annak felhasználását is elérhetővé teszi a polimeráz számára. A szakirodalomban ezt nevezik „primer handoff”-nak.

A primer szintézise után a Zn-kötő domén a templátot elengedi, az RNS polimeráz azonban nyitott formában kötve marad, a polimeráz aktívhelyén rögzíti az oligomert megfelelő pozícióban, mintegy átadva azt a további szintézisre majd disszociál a DNS-ről.

A primáz gyengén kötődik a DNS-hez, a primer-primáz komplex stabilizálásában a polimeráz „megérkezésig” az egyszálú DNS-kötő fehérje is részt vesz. T7 fágban ezt a funkciót a gp43 protein látja el. A gp43 C-terminális szakasza a helikáz szintén C-terminális, polimeráz-kötő régiójához hasonlóan savas oldalláncú aminosavakat tartalmaz és egy terminális fenilalaninnal is rendelkezik. Oldatban a gp43 dimer formában van jelen, terminális fenilalaninja az ssDNS-kötő helyet foglalja el. ssDNS-kötés hatására a C-terminális szakasz szabaddá válik, és más replikatív fehérjékkel is kapcsolatba léphet. Ahogyan az a helikáz polimerázkötő régiójához való hasonlatosság alapján feltételezhető, a gp43 képes kötni a gp5/trx komplexhez.

Az *E. coli* SSB protein a gp43-hoz hasonló C-terminális fenilalaninnal rendelkezik. Feltételezhetően ez az *E. coli* replikációjában is fontos.

Az ssDNS-t kötő proteinek interakciója a primázzal, polimerázzal és helikázzal, illetve *E. coli*ban a CLP-vel rendkívül fontos a primer primáztól polimeráznak való átadásában. *E. coli*ban az SSB stabilizálja a primer/primáz komplexet. A CLP (a χ és a ψ alegységen keresztül) a primer-primáz komplexet az SSB-vel azonos helyen képes kötni, így köztük

kompetíció van. Ha a komplex a CLP-hez kerül primáz elengedi primert, az felhelyezi a β -gyűrűt, majd a τ -alegység segítségével az új polimerázt. A fent leírt folyamat a replikáció koordinálásában fontos. (Hamdan és Richardson, 2009).

6. A vezető és a követő szál szintézis összehangolása

A replikációs processzivitás egyik nagy kérdése, hogy hogyan valósul meg a folyamatos szintézis a követő és vezető szál eltérő másolásának ellenére. A követő szálon szükséges, hogy a polimeráz az Okazaki fragmentumok (OF) határán elengedje a szubsztrátot, majd a következő fragmentumra „ugorjon”. Korábbi modellek („trombone” modell - Bruce Alberts) ezt a problémát a követő szál elektronmikroszkóppal is megfigyelhető kihurkolódásával (1. ábra), illetve a repliszómában a vezető és követő polimeráz különböző módon történő dimerizációjával (T4: diszulfidhíddal, *E. coli*: τ -n keresztül) magyarázták, mely kapcsolat megakadályozza a szubsztrátot elengedő követő polimeráz disszociációját a komplexről. A polimerázok disztributív volta és aktív kicserélődésük a magyarázat második részét szükségtelenné teszi.

A fent leírt elrendeződés azonban nem válaszolja meg teljes mértékben a két szál koordinációjával kapcsolatban felmerülő kérdéseket. Az OF elkészültével a repliszóma hátrahagyja az előzőleg szintetizált szakaszon a másolást végző polimerázt, illetve az ehhez kapcsolódó β -gyűrűt. A következő fragmentum szintézisét – miután a primáz megszintetizálja az új primert – új polimeráz kezd el, melyet pl. *E. coli*-ban a CLP τ -alegysége kapcsol a repliszómához, illetve az új β -kapocshoz, melyet szintén a γ -komplex helyez a DNS-re. Mindezekre az időigényes folyamatokra – melyek minden egyes OF kezdeténél lejátszódnak – a vezető szál esetében nincs szükség. Ez megfelelő koordináció nélkül a követő szál lemaradásához vezetne, ami a közös repliszóma elemek révén a komplex széteséséhez vezethetne. Ebben a koordinációban a helikáznak, a primáznak és az egyszálú DNS-t kötő proteinek is jelentős szerepe van.

Az új OF szintézisének fontos része a replikációs hurok elengedése. Ennek módjára két modellt állítottak fel. Az ún. „collision” (ütközés) modell szerint a replikációs hurok megszűnése az éppen szintézis alatt álló OF befejeztével történik. Ekkor a polimeráz disszociál, a repliszóma elengedi a hurkot, és új OF szintézise kezdődik meg. Az ún. „signaling” (jelátadó) modell szerint a hurok elengedése „jelhez” kötött, melyet a primáz

primerszintézise szolgálatat.

Egyedi molekula vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy mindkét modell mechanizmusa megvalósul a replikációban. A replikációs hurok elengedésére az elsődleges jelet a primerszintézis szolgálatja. Ez megállítja a helikázt, a követőszál polimeráz disszociál, új OF szintézise inicializálódik. Ha a primáz nem találkozik a számára specifikus szekvenciával addig, amíg a polimeráz befejezi az adott OF szintézisét, a hurok elengedése ennek hatására következik be. A helikáz nem áll meg, a vezető szál szintézise tovább folyik. Ez lehetőséget ad a primáznak a további kötőhely keresésére. Ha ez bekövetkezik, akkor kezdődik el az új OF szintézise. Ez a kettős mechanizmus vezet rövidebb és hosszabb OF-hoz.

Ha a hurok elengedése primerszintézis hatására következik be, a naszcens OF befejezetlenül marad. Feltételezhetően a követő polimeráz ennek szintézisét folytatja, de a repliszómáról disszociálva. Szükséges processzivitását a clamp biztosítja (Leu és mtsai, 2003; Hamdan és Richardson, 2009).

7. Következtetés

A replikáció processzivitásának eredete a résztvevő fehérjék közötti sokrétű fizikai és funkcionális kapcsolatban keresendő. Emellett sok esetben megfigyelhető, hogy a processziv enzimek polimer-kötőhelye részlegesen vagy teljesen körülzárja szubsztrátját. Ez a körülzárás valószínűleg szükséges, de nem elégséges feltétele a processzivitásnak, hiszen számos olyan enzim van, amely beburkolja szubsztrátját, működése mégsem processziv (Breyer és Matthews, 2001).

A fehérje-fehérje kölcsönhatások fontos szerepét támasztja alá, hogy számos hasonló felépítésű és működésű, de eltérő folyamatokban szerepet játszó és ezáltal eltérő fehérje „környezettel” és interakciókkal jellemezhető enzim processzivitása nagymértékben különbözik. Erre például szolgálnak mind a helikázok, mind a polimerázok.

A polimerázok esetében láthattuk, hogy a replikációban résztvevő fehérjék a DNS-hez nem maradnak kötve: a folyamatos polimerizációt egy fajta dinamikus, aktív kicserélődés eredményezi. Ebből kifolyólag a nagy processzivitással rendelkező replikatív és a kis processzivitással jellemezhető hibajavító polimerázok közötti különbség mintegy eltűnik. Arra is látható példa, hogy a megfelelő körülmények (pl. processzivitási gyűrű jelenléte) biztosításával utóbbi enzimek processzivitása is nagymértékben növelhető.

Helikázok esetében is láthattuk, hogy mind a primázzal, mind a polimerázzal, mind az

egyszálú DNS-t kötő fehérjével való kapcsolódás hatással van a processzivitásra. Ezek az interakciók – az ssDNS kötő proteint leszámítva – a replizómán kívüli folyamatokból hiányoznak.

Emellett számos, korábban kis processzivitása miatt nem replikatívnak gondolt helikázról kiderült, hogy jelenléte a replikációban nélkülözhetetlen. Ezekben az esetekben a mért kis processzivitást talán az *in vivo* meglévő kölcsönható partnerek hiánya okozhatta (Rajagopal és Patel, 2008).

8. Összefoglalás

Az örökítőanyag másolásáért felelős komplex, a repliszóma több motorfehérjét is tartalmaz (polimeráz, helikáz, primáz), melyek működésük során (d)NTP hidrolízishez kötötten konformáció-változásokon mennek keresztül. E konformáció-változások teszik lehetővé transzlokációjukat a templát mentén, biztosítva a replikációs villa előrehaladását.

A replikáció hatékonyságához szükséges, hogy ezek az enzimek transzlokációjuk során ne disszociáljanak a komplexről, a templát szálak másolása folyamatos legyen. Erről gondoskodik a résztvevő enzimek processzivitása, melynek kialakításában a repliszómán belüli interakciók különösen fontosak.

A processzivitási faktorok a DNS-t körülzárva topológiailag a polimeráz holoenzim katalitikus alegységéhez kapcsolják a templátot. A CLP-k a polimeráz processzivitási gyűrűre kapcsolásában játszanak szerepet, ami különösen a követő szál esetén játszik fontos szerepet.

A polimeráz és a helikáz közötti interakciók nagymértékű processzivitás-növekedést okoznak a két önálló enzimet jellemző értékekhez viszonyítva. A polimeráz esetében ez a kapcsolat egy fajta „dinamikus processzivitást” tesz lehetővé. A DNS-ről a polimeráz néhány (10-15) nukleotidonként disszociál, de a helikáz segítségével vagy a repliszómához kötve marad és újrakapcsolódik a DNS-hez, vagy az oldatból egy új enzimre cserélődik, ami a processzivitási gyűrűn keresztül a DNS-hez kapcsolódik és fennakadás nélkül folytatja az előzőleg megkezdett szintézist. Tekintve a processzivitási gyűrűvel kölcsönható nagyszámú fehérjét, ez a megoldás lehetőséget nyújt a replikáció szabályozására és hibajavító polimerázok bevetésére is.

A processzív duplex elválasztásáért a többnyire oligomer formában működő helikázok felelősek. A processzivitást az oligomerizáció, az ezt stabilizáló primázzal kialakított kapcsolat és az ssDNS-kötő fehérje biztosítja.

A helikáz-primáz kapcsolat fontos szerepet játszik a vezető és követő szál másolásának koordinációjában is, mely a repliszóma disszociációjának elkerüléséhez elengedhetetlen.

A repliszómán belüli kapcsolatok rendkívül sokrétűek és összetettek, rajtuk keresztül bonyolult mechanizmusok valósulnak meg. A megfelelő processzivitáshoz ezeknek az interakcióknak a megléte, és a különböző részlépések megfelelő koordinációja szükséges.

9. Summary

The replisome is a multiprotein complex containing several motor proteins (viz. polymerase, helicase, primase), and being responsible for DNA replication. During the hydrolysis of (d)NTPs, conformational changes occur, providing the possibility of their translocation along the DNA chain, and the advance of the replication fork.

To ensure the continuity and thus the efficiency of replication, the above enzymes should not dissociate from the template during translocation. The processivity of the enzymes is therefore essential, which is ensured by the protein-protein interactions in the replisome.

Sliding clamps encircle the DNA and link it topologically to the polymerase. Clamp loader proteins attach the polymerase to the sliding clamp, which is important e.g. in the synthesis of a new Okazaki fragment on the lagging strand.

The helicase-polymerase interactions increase the processivity of these two enzymes compared to the separated proteins. In the case of the polymerase, this connection results in a so-called dynamic processivity. Although the polymerase dissociates from the DNA after the addition of several (10-15) nucleotides, it either remains bound to the replication fork *via* the helicase, or may be replaced by another polymerase molecule that can continue replication. Considering the numerous proteins interacting with the sliding clamp, this dynamic exchange of polymerases provides the possibility of regulation and repair during replication.

The oligomer helicases are responsible for the unwinding of the DNA duplex. Processivity is facilitated by oligomerisation, the interaction with the stabilizing primase, and the ssDNA binding protein. Helicase-primase interaction plays also an important role in the activity of primase. Furthermore, it is important in the coordination of the leading and lagging strand processes, being necessary to inhibit the dissociation of the replisome.

The interactions in the replisome are diverse and complex, and they are involved in complex mechanisms. These interactions are crucial for sufficient processivity of the key enzymes acting during replication.

Felhasznált irodalom

- Bailey S, Eliason WK, Steitz TA. (2007) Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science* 318:459–63
- Berg OG, Winter RB, von Hippel PH. (1981) Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry*. 20:6929–6948.
- Breyer WA, Matthews BW. (2001) A structural basis for processivity. *Protein Sci.* 10:1699–1711.
- Camps M, Loeb LA. (2001) When pol I goes into high gear: processive DNA synthesis by pol I in the cell. *Cell Cycle*. 3:116–118.
- Dillingham MS, Webb MR, Kowalczykowski SC. Bipolar (2005) DNA translocation contributes to highly processive DNA unwinding by RecBCD enzyme. *J Biol Chem*. 280:37069–37077.
- Fang L, Davey MJ, O'Donnell M. Replisome assembly at oriC, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell*. 4:541–553.
- Georgescu RE, Kim SS, Yurieva O, Kuriyan J, Kong XP, O'Donnell M. (2008) Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell*. 132:43–54.
- Gloria Komazin-Meredith, Rossen Mirchev, David E. Golan, Antoine M. van Oijen, and Donald M. Coen. (2001) Hopping of a processivity factor on DNA revealed by single-molecule assays of diffusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(31): 10721–10726
- Hamdan SM, Johnson DE, Tanner NA, Lee JB, Qimron U, Tabor S, van Oijen AM, Richardson CC. (2007) Dynamic DNA helicase-DNA polymerase interactions assure processive replication fork movement. *Mol. Cell*. 27:539–549.
- Hamdan SM, Richardson CC. (2009) Motors, switches and contacts in a replisome. *Annu Rev Biochem*. [Epub ahead of print]
- Jeruzalmi D, Yurieva O, Zhao Y, Young M, Stewart J, Hingorani M, O'Donnell M, Kuriyan J. (2001a) Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell*. 106:417–428.
- Jeruzalmi, D., M. O'Donnell, and J. Kuriyan. (2001b) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 106:429-441.
- Keller DJ, Brozik JA. (2005) Framework model for DNA polymerases.

Biochemistry 44(18):6877-88

Kelman Z., Hurwitz, J. and O'Donnell, M. (1998) Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure*, 6:, 121–125.

Leu FP, Georgescu R, O'Donnell M. (2003) Mechanism of the E. coli tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol Cell*. 11:315–327.

Lohman TM, Bjornson KP. (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65:169–214.

López de Saro FJ, O'Donnell M. (2001) Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(15):8376-80.

Moore K.J. and Lohman, T.M. (1995) Helicase-catalyzed DNA unwinding: energy coupling by DNA motor proteins. *Biophys. J.*, 68:, 180S–185S

S.T. Lovett, Polymerase switching in DNA replication, *Mol. Cell* 27 (2007), pp. 523–526.

Vaishnavi Rajagopal, Smita S. Patel. (2008) Single Strand Binding Proteins Increase the Processivity of DNA Unwinding by the Hepatitis C Virus Helicase. *J Mol Biol.* 376(1): 69–79.

Wyman, C., and Botchan, M. (1995). A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr. Biol.* 5:, 334-337

Xi XG. (2007) Helicases as antiviral and anticancer drug targets. *Curr. Med. Chem.* 14:883–915.

Yang J, Zhuang Z, Roccasceca RM, Trakselis MA, Benkovic SJ. (2004) The dynamic processivity of the T4 DNA polymerase during replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:8289–8294

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, aki lehetővé tette számomra, hogy szakdolgozatomat ebben a témakörben írjam és megismerkedhessek ezzel az érdekes témával illetve, hogy útmutatásával, észrevételeivel és tanácsaival segítette munkámat.

Szeretném megköszönni Panca Ritának a magyar nyelvi, Hollóczki Oldamurnak pedig az angol nyelvi lektorálást.

Köszönöm a családomnak és a barátaimnak a támogatást.