

## A KULCSTÓL A BULLDÓZERIG: SZÁRNYAS HÉLIX DOMÉNEK FUNKCIONÁLIS ADAPTÁCIÓJA DNS-KÖTŐ FEHÉRJÉKBEN

*Harami Gábor, Gyimesi Máté, Kovács Mihály*

*ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék  
ELTE-MTA „Lendület” Motorenzimológiai Kutatócsoport  
[www.mk-lab.org](http://www.mk-lab.org)*

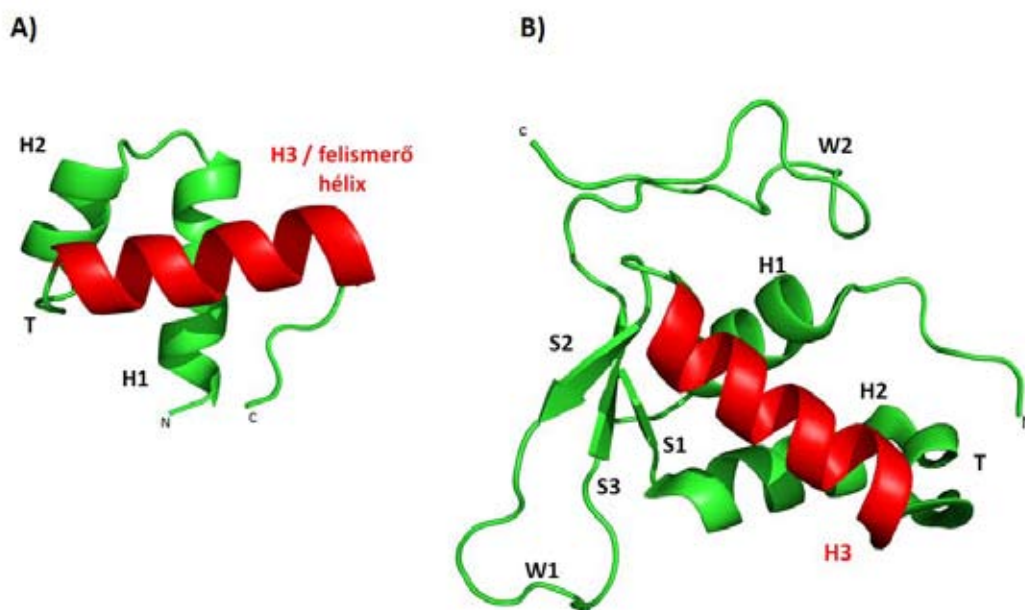
### Összefoglalás

Motorenzimológiai kutatócsoportunk egyik fő érdeklődési területe a RecQ családba tartozó DNS-helikázok molekuláris működése és ennek szerepe a genomkarbantartó folyamatokban. A RecQ helikázok nélkülözhetetlen szereplői a DNS-hibák homológ rekombináción (HR) alapuló javításának. E működés alapfeltétele a RecQ helikázok összetett DNS-szerkezetek felismerésére és feldolgozására való képessége. A felismerés és feldolgozás mechanizmusa és szerkezeti alapjai azonban az intenzív vizsgálatok ellenére nagyrészt felderítetlenek. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a sokféle DNS-kötő fehérjében – így a RecQ helikázokban is – megtalálható szárnyas hélix (winged helix, WH) domén kulcsszereplője a DNS-szerkezetek felismerésének. E domén több száz fehérje – főként transzkripciós faktorok – esetében szekvencia-specifikus kettős-szálú (double-stranded, ds) DNS-kötést („kulcs”-funkciót) tesz lehetővé. Közelmúltbeli felfedezések azonban azt sugallják, hogy a WH domén a RecQ helikázokban különböző DNS-száltalálkozások és szálszerkezetek szekvencia-aspecifikus felismerésére és szétválasztására („bulldózer”-funkcióra) adaptálódott. Jelen összefoglalónkban a WH domének szerkezeti sajátosságait a RecQ helikázokban betöltött, mások és magunk által felderített funkcióival összekapcsolva mutatjuk be.

### A WH domén felépítése

A hélix-fordulat-hélix (*helix-turn-helix*, HTH) szerkezeti motívumot közel 3000 ismert fehérjében – az azonosított nukleinsav-kötő fehérjék mintegy harmadában – azonosították [1]. A motívumban két  $\alpha$ -hélix között egy rövid fordulat található (1A. ábra). A kanonikus HTH motívumban a két  $\alpha$ -hélix tengelye egymással mintegy 120°-os szöveget zár be. E hélixekhez ( $H_2$  és  $H_3$ ) a legegyszerűbb HTH motívumok esetében is legalább egy további (az említettekhez képest N-terminálisan elhelyezkedő)  $\alpha$ -hélix ( $H_1$ ) csatlakozik, rendszerint egy hurokrégiónt keresztül. A fordulatot követő hélix ( $H_3$ ) történeti okokból a felismerő (*recognition*) hélix nevet kapta, mivel számos fehérjében közvetlenül a szekvencia-specifikus nukleinsav-felismerésben játszik szerepet. A HTH motívum mindkét irányban további másodlagos szerkezeti elemekkel bővíthet. A járulékos elemek alapján számos HTH-áltípust azonosítottak [1]. Egy addig ismeretlen HTH-variációt tartalmazó DNS-kötő domént fedeztek fel a hepatocita nukleáris faktor 3 (HNF-3) máj-specifikus transzkripciós faktor család egyik tagjában 1993-ban [2]. A HNF-3 $\gamma$  fehérje DNS-kötő doménje három  $\alpha$ -hélixből (amelyek közül a fordulat

a  $H_2$  és  $H_3$  elemek között található), három  $\beta$ -szálból ( $S_1$ - $S_3$ ) és két viszonylag nagy méretű hurokból ( $W_1$  és  $W_2$ ) épül fel  $H_1$ - $S_1$ - $H_2$ - $T$ - $H_3$ - $S_2$ - $W_1$ - $S_3$ - $W_2$  sorrendben (1B. ábra). A szerzők e szerkezetet – a  $H_3$  felismerő hélixet mintegy „szárnyként” (*wing*) ölelő hurkok ( $W_1$  és  $W_2$ ) konformációjától inspiráltnak – szárnyas hélix doménnek nevezték el [2]. A HNF-3 $\gamma$  WH doménjének felfedezését követően számos, hasonló domént tartalmazó fehérjét azonosítottak. A WH-ként, illetve egyes esetekben wHTH (*winged helix-turn-helix*) néven besorolt domének közül sok esetében hiányzik a  $W_2$  elem, illetve előfordulnak további szerkezeti variációk is [3]. E különbségek alapján a SCOP adatbázisban jelenleg 84 különböző WH doméntípust tartanak számon [1,3].

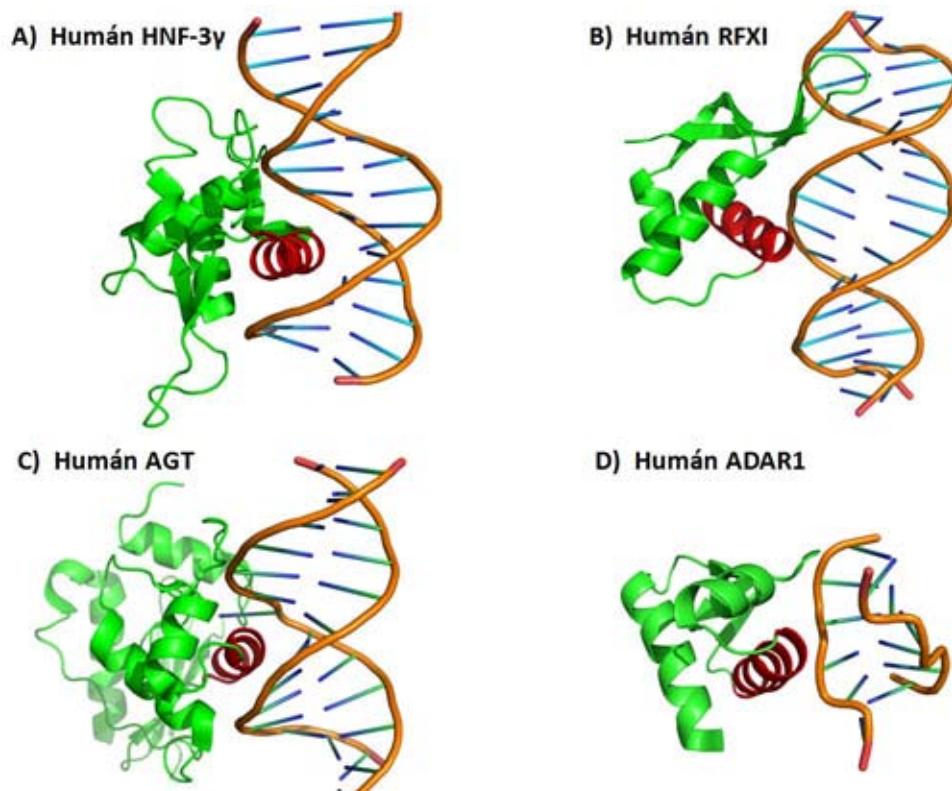


**1. ábra. A HTH motívum (A) és a WH domén (B) felépítése.** (A) A humán Pax5 transzkripciós faktor kristályszerkezetében (1k78) megfigyelhető, három  $\alpha$ -hélixet ( $H_1$ - $H_3$ ) tartalmazó HTH (helix-turn-helix) motívum. A C-terminális  $\alpha$ -hélix (piros,  $H_3$ ) szekvencia-specifikus dsDNS-felismerésben betöltött szerepe alapján a „felismerő hélix” nevet kapta. A HTH motívumra jellemző fordulat (T) a felismerő hélixet előzi meg. (B) A humán HNF-3 $\gamma$  transzkripciós faktor szárnyas hélix doménjének kristályszerkezete (1vtn). A szerkezetben megtalálható hurkokat „szárnyak” (*wing*,  $W_1$  és  $W_2$ ) nevezték el.

### A WH domén adaptációja: a kulcstól...

A WH domént funkcionálisan először szekvencia-specifikus dsDNS-kötő szerkezeti elemként azonosították. A HNF-3 $\gamma$  transzkripciós faktor esetében a specificitás a WH domén felismerő ( $H_3$ ) hélixének töltéssel rendelkező aminosav-oldalláncai és a DNS-bázisok nagy árok felőli csoportjai közötti kölcsönhatások révén valósul meg (2A. ábra). A  $W_2$  – és feltehetőleg a  $W_1$  – szárny további DNS-kötő felületet alkot azáltal, hogy képes a kis árokhoz illeszkedve kötéseket létesíteni a DNS cukorfoszfát-gerincével [2]. A felismerő hélix és a nagy árok közötti kölcsönhatás kanonikusnak tekinthető a szekvencia-specifikus dsDNS-felismerést végző WH-doménes fehérjék körében [3].

A fenti kanonikus DNS-kötési móddal szemben az RFX1 transzkripciós faktorban a  $W_1$  szárny lép kapcsolatba a DNS nagy árkával, míg a felismerő hélix – eredeti nevével ellentétben – nem járul hozzá a szekvencia-specifikus dsDNS-felismeréshez, hanem a kis árokkal létesít gyenge kölcsönhatást (2B. ábra) [4].



**2. ábra. WH domének DNS-kötési módjai.** (A) „Kanonikus” DNS-kötési mód figyelhető meg a humán HNF-3 $\gamma$  transzkripciós faktor WH doménjének dsDNS-sel alkotott komplexében (1vtn). A felismerő hélix (piros) a DNS nagy árkába köt. A  $W_1$  és  $W_2$  szárnyak további kötőfelszínt alkotnak. (B) A humán RFX1 transzkripciós faktor (1dp7) a HNF-3 $\gamma$ -étől eltérő DNS-kötési módot mutat: a szekvencia-specifikus dsDNS-felismerés a  $W_1$  szárny és a DNS nagy árkának kölcsönhatása révén valósul meg. (C) A humán AGT fehérje az alkilált guanin bázisokat ismeri fel. Az AGT WH doménjének felismerő hélice a DNS kis árkába köt (1t38). (D) A humán ADAR1 fehérje  $Z\alpha$  WH doménje Z-DNS-hez köt (1qbj). A felismerő hélix és a  $W_1$  szárny a Z-DNS cukorfoszfat-gerincével alakít ki kapcsolatokat.

Egy további DNS-kötési módozat figyelhető meg az AGT ( $O_6$ -alkilguanin-DNS metiltranszferáz) fehérjékben, amelyek a DNS alkilált guanin bázisait ismerik fel, és az alkilcsoport irreverzibilis eltávolítását végzik [5]. Az AGT-k esetében a katalitikus oldalláncokat hordozó felismerő hélix a kis árokba fekszik és azzal gyenge kölcsönhatást létesít (2C. ábra). A DNS-sel létesített kölcsönhatások nagy részét a felismerő hélixet szekvenciálisan megelőző és követő hélixeknek a DNS cukorfoszfat-gerincével alkotott kapcsolataik teszik ki [5].

A WH domén funkcionális adaptációjának szélsőséges módjával találkozunk a humán ADAR1 (dsRNS adenozin dezamináz) fehérje  $Z\alpha$  doménjének esetében [6]. Az ADAR1 a mRNS információ-tartalmát módosítja az adenin bázisok oxidatív

dezaminálása (inozinná alakítása) révén. A feltehetőleg toborzó funkciójú Za WH domén specifikusan kötődik a balmenetes Z-DNS-szakaszokhoz, amelyek az RNS-polimeráz aktivitása során keletkezhetnek az mRNS-átírás helyén [6,7]. A Za domén felismerő hélice és  $W_1$  szárnya főként a Z-DNS cukorfoszfát-gerincével lép kölcsönhatásba (2D. ábra); az egyetlen bázis-specifikus kölcsönhatás egy Z-DNS-specifikus *syn* konfigurációjú guaninnal jön létre.

A WH domén nukleinsav-kötő funkciója mellett szerepet játszik intra- és intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is. Az E2F4-DP2 heterodimer transzkripciós fehérjekomplex mindkét alegységének felismerő hélice ( $H_3$ ) a kanonikus (HNF-3 $\gamma$  típusú) DNS-kötés mellett kapcsolatba lép a másik alegység  $H_1$  hélixével, lehetővé téve a dimerizációt [8]. A Fok1 endonukleázban három, egymást követő WH domén található, amelyek közül az N-terminális felőli két WH domén kanonikus (HNF-3 $\gamma$ ) típusú, szekvencia-specifikus dsDNS-kötést valósít meg [9]. Ezzel szemben a C-terminális WH domén a DNS-től távolabb helyezkedik el és feltehetőleg az intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában jut szerephez. A humán RPA (replikációs protein A, egyszálú DNS-kötő fehérje) heterotrimer 32 kDa-os alegységében található WH domén eddigi ismereteink alapján nem lép kapcsolatba a DNS-sel; ehelyett kölcsönható felszín biztosít számos partnerfehérje számára [10].

A fenti példák alátámasztják, hogy a WH domén szerkezete a funkcionális adaptáció szekvencia- illetve szerkezet-specifikus DNS-kötéstől a fehérje-fehérje kölcsönhatásokig terjedő széles spektrumát tette lehetővé. Az alábbiakban látni fogjuk, hogy a fentieken túlmenően e doméntípus a helikáz enzimek DNS-szerkezetátalakító mechanokémiai működésében is hasznos alkatrésznek bizonyul.

### ...a bulldózerig

A helikázok az ATP-hidrolízisből származó szabadentalpiát a kettősszálú nukleinsav-szakaszok szálainak – önmagában energetikailag kedvezőtlen – szétválasztására hasznosítják. A szálszétválasztó aktivitás az egyszerűbb DNS-szerkezetek (pl. tompa végű vagy egyszálú (*single-stranded*, ss) túlnyúlást tartalmazó dsDNS) mellett *in vivo* gyakran bonyolultabb struktúrák, például HR-köztitermékek – háromszálú D-hurok és négyszálú Holliday-kereszt szerkezetek – feldolgozását teszi lehetővé.

A helikázok hatodik szupercsaládjába tartozó RuvB enzim két hexamer gyűrűje a RuvA és RuvC fehérjékkel együtt alkotja a Holliday-kereszt szerkezeteket mozgó (*branch migration*) és feloldó (*resolution*) rezolváz komplexet [11]. A RuvB helikázban az N-terminális, AAA+ típusú motordomént egy WH domén követi [12]. Mutációs vizsgálatok alapján a WH domén nélkülözhetetlen szerepet játszik a Holliday-szerkezetek felismerésében, jóllehet izolált formában nem képes DNS kötésére [13]. A RuvB DNS-kötött kristályszerkezete ismeretlen, ám a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a RuvABC holoenzim WH doménjei a Holliday-kereszt két átellenes szárát alkotó dsDNS-ágakkal lépnek kölcsönhatásba. A RuvB WH domén felismerő hélixének és  $W_1$  szárnyának elektrosztatikus sajátosságai alapján feltételezhető, hogy a WH domén kanonikus módon, de szekvencia-aszpecifikusan kötődik a dsDNS-régiókhöz és ezáltal „szálvezető”

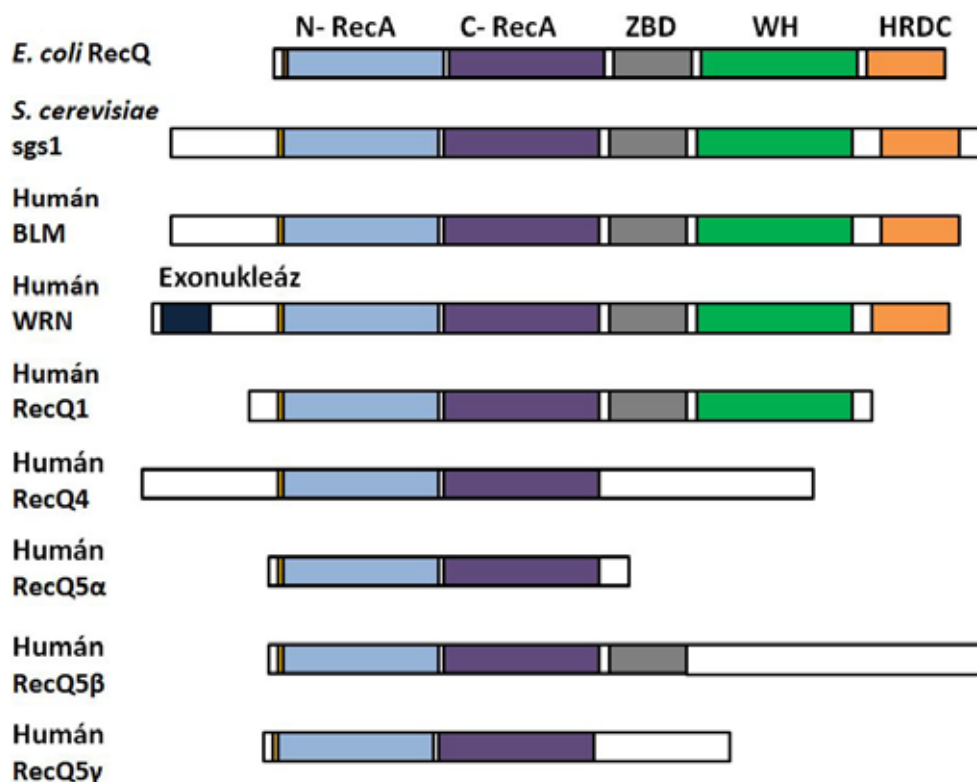
funkciót tölt be [12].

A második helikáz szupercsaládba tartozó RecQ család tagjai minden élő szervezetben megtalálhatók, és központi szerepet töltenek be a DNS-károsodások HR-n alapuló hibamentes javításában [14]. Az emberi genom öt RecQ helikáz kódol: a RecQ1, BLM, WRN, RecQ4 és RecQ5 enzimeket. A RecQ helikázok DNS-hibajavításban betöltött központi szerepét tükrözi, hogy az öt paralóg közül háromnak a mutációihoz súlyos klinikai tünetegyüttesek társíthatók. A BLM helikáz mutációi a Bloom szindrómát, a WRN-é a Werner szindrómát, míg a RecQ4-é a Rothmund-Thomson szindrómát okozzák. E betegségek jellegzetes tünetei között szerepel a felgyorsult öregedés és a különböző ráktípusokra való fokozott hajlam [15].

DNS-hibajavító működésüket a RecQ helikázok sokrétű molekuláris aktivitásaik révén fejtik ki. A dsDNS szálainak szétválasztása mellett ezen aktivitások között szerepel az egyszálú DNS-túlnyúlások létrehozásához szükséges nukleolitikus folyamat (*resection*) elősegítése [16-18], a rekombináz nukleoprotein-szálak szétbontása [19], illetve ezek szálcserélő aktivitásának elősegítése [20], a D-hurkok felbontása [21], ssDNS-szakaszok párosítása [22], illetve a kettős Holliday-szerkezetek megoldásához (*dissolution*) vezető, topoizomerázokkal együttműködésben végzett konvergens hídmozgatás (*convergent branch migration*) is [23]. E sokrétű aktivitások végrehajtása komplex fehérje-architektúrát igényel, ami a RecQ helikázok doménszerkezetében is tükröződik. Valamennyi RecQ enzim tartalmazza a két tandem RecA-típusú doménből álló helikáz magrégiót, amely az ATP-hidrolitikus kémiai reakciót az ssDNS-szálon történő egyirányú tovahaladás (transzlokáció) mechanikai eseményéhez kapcsolja. A RecA doméneket a család tagjainak nagy részében ZBD (*zinc-binding domain*, Zn<sup>2+</sup>-kötő domén), WH és HRDC (helikáz és RNázD C-terminális) domének követik (**3. ábra**) [24]. A ZBD nélkülözhetetlen a RecQ helikázok megfelelő feltekeredéséhez, és feltehetőleg szerepet játszik a DNS kötésében is [19,25,26]. A HRDC domén funkciójáról kevés ismerettel rendelkezünk. Az *E. coli* RecQ enzim HRDC doménje képes kötődni az ssDNS-hez; feltételezések szerint e domén szerepet játszik a szálszétválasztás során felszabaduló ssDNS-szálak újrapárosodásának meggátolásában [27]. A WRN és BLM helikázok esetében a HRDC domén DNS-szerkezet-felismerő funkcióját is kimutatták [28].

Más HR-fehérjékhez hasonlóan a RecQ helikázok is nagy affinitással kötődnek komplex szerkezetű HR-köztitermékekhez és hibajavítási célstruktúrákhoz: D-hurkokhoz, Holliday-keresztekhez, replikációs villákhoz és G-tetraplexekhez [14]. E DNS-szerkezetek felismerésének mechanizmusa azonban a RecQ helikázok 1983-as felfedezése óta még mindig jórészt felderítetlen [24]. Az utóbbi években publikált adatok arra utalnak, hogy a család legtöbb tagjában megtalálható WH doménnek sajátos szerepe van a DNS-szubsztrátok szálszerkezet-specifikus felismerésében és átalakításában. Ez alapján a funkcionális adaptáció különleges példájának képe kezd kirajzolódni.

A RecQ helikázok WH doménjének másodlagos szerkezeti elemei valamennyi ismert esetben H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>-T-H<sub>4</sub>-S<sub>1</sub>-W<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>-H<sub>5</sub> sorrendben követik egymást: a szer-



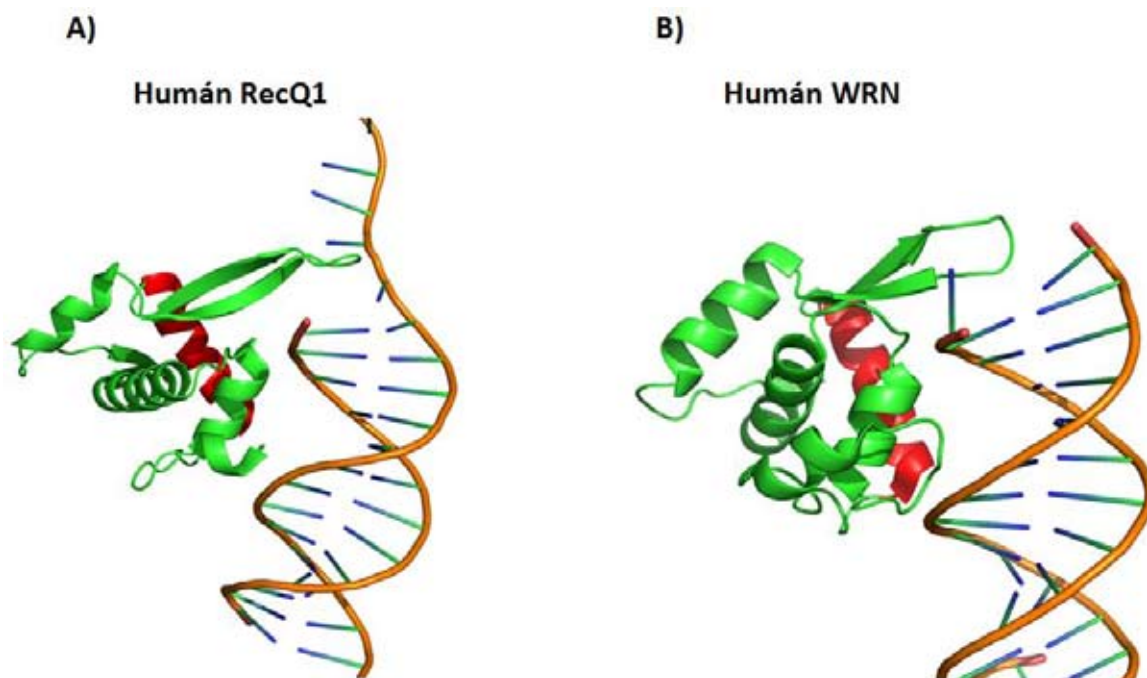
**3. ábra. A RecQ család tagjainak sematikus (nem hosszarányos) doméntérképe.**

A két RecA domén (világoskék és sötétkék) alkotja a helikáz magrégiót. A család tagjainak többsége tartalmaz ZBD (zinc-binding domain, Zn<sup>2+</sup> kötő domén, szürke), WH (winged helix, szárnyas hélix, zöld) és HRDC (helikáz és RNázD C-terminális domén, narancs) doméneket. A RecQ családban egyedülálló módon a humán WRN fehérje N-terminális exonukleáz domént is tartalmaz. A humán RecQ5 fehérjének három splice-formája ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ismert.

kezetből a HNF-3 $\gamma$  típusú transzkripció faktoroknál megfigyelhető W<sub>2</sub> szárny hiányzik. E konzervált felépítés ellenére a RecQ-családbeli WH domének aminosav-szekvenciája alacsony fokú konzerváltságot mutat a RecA motordoménéhez képest [24]. Az öt humán RecQ-homológ különböző élettani folyamatokban vesz részt, amelyek során az egyes enzimek különféle komplex DNS-szerkezetek feloldozását végzik [29,30]. Hipotézisünk alapján a WH domének szekvenciális és finomszerkezeti különbségei hozzájárulhatnak a RecQ enzimek funkcionális diverzitásához. A WH domén szerkezet-specifikus DNS-felismerésben betöltött szerepét támasztja alá, hogy a humán BLM helikáz izolált ZBD + WH régiója hasonló affinitással kötődik G-tetraplex szubsztrátokhoz, mint a teljes hosszúságú fehérje [31]. A humán RecQ5 $\beta$  helikázról, amelyből természetes módon hiányoznak a WH és HRDC domének (3. ábra), kimutatták, hogy az csak egyszerű DNS szerkezetek felbontására képes [32].

A WH domén meglepő DNS-kölcsönhatási módja figyelhető meg a humán RecQ1 helikáz RecA + ZBD + WH régiójának ssDNS-túlnyúlással rendelkező dsDNS jelenlétében megoldott kristályszerkezetében (4A. ábra) [33].

A szerkezetben a WH domén  $\beta$ -hajtú eleme (S<sub>1</sub>-W<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>) az ssDNS-dsDNS csatlakozási ponthoz nyúlik, miközben a hajtú csúcsán elhelyezkedő tirozil oldallánc a

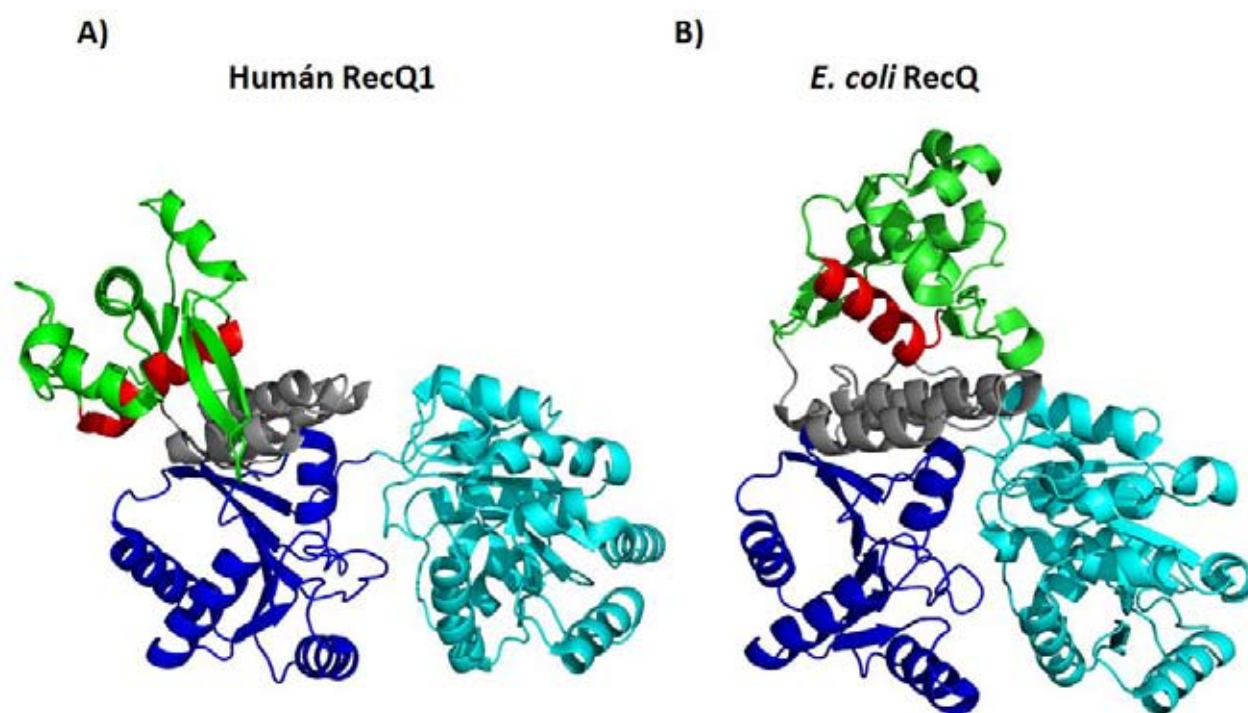


**4. ábra. A humán RecQ1 (2wwy, A) és WRN (3aaf, B) helikázok WH doménjének kölcsönhatása dsDNS-sel.** A RecQ1 és WRN helikázokban megtalálható, a transzkripciós faktorok felismerő hélixével azonos pozícióban lévő  $H_4$  hélix (piros) a DNS-től távolabb helyezkedik el. A WH-DNS kölcsönhatás a  $W_1$  szárnyon keresztül jön létre. A dsDNS utolsó bázispárja mindkét fehérje esetében szétválik a  $W_1$  szárny dsDNS-hez történő kötésének hatására. E szerkezeti megfigyelések alátámasztják a WRN és RecQ1 helikázok WH doménjének dsDNS-szálszétválasztásban betöltött elengedhetetlen szerepét.

dsDNS 5'-végi bázispárját mintegy „tolólapátként” kifordítja a kettős hélixből. Hasonló kölcsönhatás figyelhető meg a humán WRN helikáz izolált WH doménjének dsDNS jelenlétében megoldott kristályszerkezetében is (4B. ábra) [34]. A felismerő hélix a RecQ1 szerkezetben a ZBD és RecA domének közelében (5A. ábra), illetve – mind RecQ1, mind WRN esetében – a DNS-től távolabb helyezkedik el. A  $W_1$  szárnynak a RecQ1 helikáz DNS-szálszétválasztó működésében betöltött szerepét pontmutációs analízissel is igazolták: a szárny végén elhelyezkedő tirozin alaninra cserélése a szálszétválasztó aktivitás elvesztését okozta [33]. A WRN helikáz WH domént érintő különböző deléciói is a szálszétválasztó aktivitás csökkenését eredményeztek [35].

A WRN és RecQ1 helikázok WH doménjének fenti „tolólapát”-funkciója mindazonáltal nem általánosítható a teljes RecQ család esetében. Az *E. coli* RecQ enzim RecA + ZBD + WH régiójának kristályszerkezetében (5B. ábra) a  $W_1$  szárny csúcsán nem található aromás aminosav [36], illetve a szárnyrégió mutációi sem okozzák a dsDNS-szálszétválasztó aktivitás jelentős csökkenését [33]. A részben laboratóriumunkban kidolgozott DNS-szerkezetátalakító és nukleoproteinlebontó aktivitás-vizsgálatok [37 -39] révén kimutattuk, hogy egy, a WH domént nem tartalmazó csonka humán BLM helikáz konstrukció megőrzi az említett aktivitásokat [19]. A WH domén eltávolítása azonban jelentősen csökkentette az összetett DNS-szerkezetek feldolgozásának hatékonyságát, amely megfigyelés jelenleg folyó részletesebb vizsgálataink alapját képezi (publikálatlan adatok).

A fenti eredmények érdekes összefüggést láttatnak a  $W_1$ -régió konformációja és a szárnynak a DNS-szálszétválasztásban betöltött szerepe között. A RecQ1 és WRN helikázokban, amelyekben a  $W_1$  a szétválasztáshoz elengedhetetlenül szükséges tolólapátként funkcionál, a szárny jelentős hosszúságban  $\beta$ -hajtú konformációt vesz fel, míg a szárny nélkül is aktív *E. coli* RecQ helikáz szerkezetében a hajtú lényegesen rövidebb  $\beta$ -szálakat tartalmaz (5. ábra). Ezzel összhangban megfigyelhető, hogy a RecQ családon kívül számos más, első és második szupercsaládba tartozó helikázban található jelentős méretű  $\beta$ -hajtú szerkezet, amely tolólapát-szerepet játszik a DNS-szálak szétválasztásában. Az első szupercsalád tagjaiban, melyekben a motormagot az SF2 helikázokhoz hasonlóan két RecA-homológ domén alkotja, a tolólapát – a transzlokáció irányultságával összefüggésben – az első vagy második RecA doménben helyezkedik el [40].



**5. ábra. A humán RecQ1 (2v1x, A) és *E. coli* RecQ (1oyw, B) helikázok WH doménjeinek eltérő konformációi.** A két fehérje motorrégiója (RecA domének, világoskék és sötétkék) és ZBD doménje (szürke) nagymértékű szerkezeti hasonlóságot mutat, azonban a WH domén (zöld) szerkezete és orientációja eltérő. A humán RecQ1 helikáz WH doménjében található  $H_4$  hélix (piros) temetetlen helyezkedik el. Az *E. coli* RecQ helikáz  $H_4$  hélice felszíni pozíciót vesz fel, a  $\beta$ -hajtú elem ( $S_1$ - $W_1$ - $S_2$ , az ábrán a  $H_4$  mögött látszik) viszont jóval rövidebb, mint a humán RecQ1 helikázban (az ábrán a  $H_4$  hélix előtt) megfigyelhető.

További érdekes megfigyelés, hogy a WH domén az enzim többi doménjéhez viszonyítva jelentősen eltérő orientációban mutatkozik az *E. coli* RecQ és humán RecQ1 fehérjék kristályszerkezeteiben [33,36] (5. ábra). Az eddigi szerkezeti vizsgálatokban a WH domén orientációját az enzimekhez kötött ligandumok jelenléte nem befolyásolta (az *E. coli* RecQ szerkezetét ligandummentes és ATP $\gamma$ S (ATP-analóg) -kötött, míg a humán RecQ1-ét ADP- illetve DNS-kötött állapotban sikerült meghatározni). Az *E. coli* RecQ enzim WH doménjében a felismerő hélix felszíni pozícióban, míg a RecQ1-ben eltemetetlen helyezkedik el. Teljesen fel-



derítetlen probléma, hogy az ismert eltérő konformációk vajon a RecQ helikázok enzimek mechanizmusának különböző szerkezeti köztiállapotait képviselik, vagy pedig a konformációs különbségek izoforma-specifikusak, és a WH domén nem végez jelentős mozgást a helikáz működés során. E kérdés megválaszolására jelenleg folytatunk kísérleteket, amelyekben a WH és RecA doménekre helyezett pirén excimer fluoreszcens szenzorok segítségével kívánunk információt nyerni az enzimek konformációs mozgásairól, amelyekről jelenleg semmilyen adat nem áll rendelkezésre.

A teljesség kedvéért megemlítendő, hogy DNS-kötés mellett a RecQ helikázok WH doménjei fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására is képesek. Az *E. coli* RecQ helikáz kölcsönhatása az SSB (*single-stranded DNA binding*, ssDNS-kötő) fehérjével a WH doménon keresztül jön létre [41]. Számos, a WH doménon keresztül kölcsönható kötőpartnert azonosítottak a humán WRN és BLM helikázok esetében is [42,43].

### Kitekintés

A konzervált felépítésű WH domén számos funkció ellátására adaptálódott az evolúció során. Szerkezeti sajátosságai egyaránt lehetővé teszik a nukleinsavakkal és fehérjékkel való kölcsönhatást. A WH domén szerepe a RecQ helikázok genomkarbantartó működésében az utóbbi időben került az érdeklődés homlokterébe. A rendelkezésünkre álló adatok arra utalnak, hogy a WH domén a RecQ helikázokban az elágazó (széttartó) DNS-szálszerkezetek specifikus felismerését, az enzimek ilyen elemeket tartalmazó DNS-szubsztrátokhoz (HR-köztitermékekhez) való toborzását és e DNS-szerkezetek biológiailag hatékony feldolgozását teszi lehetővé. A WH domének szerkezetében és DNS-szálszétválasztásban betöltött funkciójában mutatkozó különbségek részben magyarázhatják a RecQ család tagjainak eltérő biológiai specificitásait. Elképzelésünk szerint a RecQ helikáz család tagjai két csoportra oszthatóak a WH domén DNS-szálszétválasztásban betöltött szerepe alapján. Az első csoportba a humán WRN és RecQ1 enzimek tartoznak, amelyekben a WH domén szárnya esszenciális tolólapátként funkcionál. A második csoport tagjai közé soroljuk a humán BLM és az *E. coli* RecQ helikázokat, amelyek alapvető szálszétválasztó aktivitásához a WH domén nélkülözhető, viszont e domén elősegíti a bonyolultabb DNS-szerkezetek hatékony felbontását. Csoportunkban jelenleg az *E. coli* RecQ és humán BLM helikázok WH doménjeinek szerepét vizsgáljuk enzimkinetikai és egyedi molekula-biofizikai módszerekkel. Reményeink szerint a WH domének sajátosságainak megismerése új nézőpontokkal fogja gazdagítani mind a genomkarbantartó folyamatok, mind a fehérje-nukleinsav kölcsönhatások megértését.

### Irodalomjegyzék

- [1] Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, **29(2)**: 231-262.
- [2] Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., Burley, S.K. (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364(6436)**: 412-420.

- [3] Gajiwala, K.S., Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10(1)**: 110-116.
- [4] Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B., Burley, S.K. (2000) Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature*, **403(6772)**: 916-921.
- [5] Daniels, D.S., Woo, T.T., Luu, K.X., Noll, D.M., Clarke, N.D., Pegg, A.E., Tainer, J.A. (2004) DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*, **11(8)**: 714-720.
- [6] Schwartz, T., Rould, M.A., Lowenhaupt, K., Herbert, A., Rich, A. (1999) Crystal structure of the Zalpha domain of the human editing enzyme ADAR1 bound to left-handed Z-DNA. *Science*, **284(5421)**: 1841-1845.
- [7] Wang, G., Vasquez, K.M. (2007) Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci*, **12**: 4424-4438.
- [8] Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C.O., Pavletich, N.P. (1999) Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev*, **13(6)**: 666-674.
- [9] Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., Aggarwal, A.K. (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature*, **388(6637)**: 97-100.
- [10] Deng, X., Habel, J.E., Kabaleeswaran, V., Snell, E.H., Wold, M.S., Borgstahl, G.E.O. (2007) Structure of the full-length human RPA14/32 complex gives insights into the mechanism of DNA binding and complex formation. *J Mol Biol*, **374(4)**: 865-876.
- [11] Dickman, M.J., Ingleston, S.M., Sedelnikova, S.E., Rafferty, J.B., Lloyd, R.G., Grasby, J.A., Hornby, D.P. (2002) The RuvABC resolvosome. *Eur J Biochem*, **269(22)**: 5492-5501.
- [12] Putnam, C.D., Clancy, S.B., Tsuruta, H., Gonzalez, S., Wetmur, J.G., Tainer, J.A. (2001) Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol*, **311(2)**: 297-310.
- [13] Ohnishi, T., Hishida, T., Harada, Y., Iwasaki, H., Shinagawa, H. (2005) Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J Biol Chem*, **280(34)**: 30504-30510.
- [14] Bernstein, K.A., Gangloff, S., Rothstein, R. (2010) The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annu Rev Genet*, **44**: 393-417.
- [15] Bohr, V.A. (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci*, **33(12)**: 609-620.
- [16] Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., Jackson, S.P. (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev*, **22(20)**: 2767-2772.
- [17] Cejka, P., Cannavo, E., Polaczek, P., Masuda-Sasa, T., Pokharel, S., Campbell, J.L., Kowalczykowski, S.C. (2010) DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, **467(7311)**: 112-116.
- [18] Nimmonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., Kowalczykowski, S.C. (2011) BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev*, **25(4)**: 350-362.
- [19] Gyimesi, M., Harami, G.M., Sarlós, K., Hazai, E., Bikádi, Z., Kovács, M. (2012) Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core

- region comprising the RecA and Zn-binding domains. *Nucleic Acids Res*, **40(9)**: 3952-3963.
- [20] Bugreev, D.V., Mazina, O.M., Mazin, A.V. (2009) Bloom syndrome helicase stimulates RAD51 DNA strand exchange activity through a novel mechanism. *J Biol Chem*, **284(39)**: 26349-26359.
- [21] Bachrati, C.Z., Borts, R.H., Hickson, I.D. (2006) Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res*, **34(8)**: 2269-2279.
- [22] Cheok, C.F., Wu, L., Garcia, P.L., Janscak, P., Hickson, I.D. (2005) The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **33(12)**: 3932-3941.
- [23] Plank, J.L., Wu, J., Hsieh, T.S. (2006) Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103(30)**: 11118-11123.
- [24] Vindigni, A., Marino, F., Gileadi, O. (2010) Probing the structural basis of RecQ helicase function. *Biophys Chem*, **149(3)**: 67-77.
- [25] Guo, R.B., Rigolet, P., Zargarian, L., Fermandjian, S., Xi, X.G. (2005) Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res*, **33(10)**: 3109-3124.
- [26] Liu, J.L., Rigolet, P., Dou, S.X., Wang, P.Y., Xi, X.G. (2004) The zinc finger motif of Escherichia coli RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J Biol Chem*, **279(41)**: 42794-42802.
- [27] Bernstein, D.A., Keck, J.L. (2005) Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure*, **13(8)**: 1173-1182.
- [28] Samanta, S., Karmakar, P. (2012) Recruitment of HRDC domain of WRN and BLM to the sites of DNA damage induced by mytomyacin C and methyl methanesulfonate. *Cell Biol Int*,
- [29] Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D. (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res*, **29(13)**: 2843-2849.
- [30] Popuri, V., Bachrati, C.Z., Muzzolini, L., Mosedale, G., Costantini, S., Giacomini, E., Hickson, I.D., Vindigni, A. (2008) The Human RecQ helicases, BLM and RECQ1, display distinct DNA substrate specificities. *J Biol Chem*, **283(26)**: 17766-17776.
- [31] Huber, M.D., Duquette, M.L., Shiels, J.C., Maizels, N. (2006) A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J Mol Biol*, **358(4)**: 1071-1080.
- [32] Garcia, P.L., Liu, Y., Jiricny, J., West, S.C., Janscak, P. (2004) Human RECQ5beta, a protein with DNA helicase and strand-annealing activities in a single polypeptide. *EMBO J*, **23(14)**: 2882-2891.
- [33] Pike, A.C.W., Shrestha, B., Popuri, V., Burgess-Brown, N., Muzzolini, L., Costantini, S., Vindigni, A., Gileadi, O. (2009) Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106(4)**: 1039-1044.
- [34] Kitano, K., Kim, S.Y., Hakoshima, T. (2010) Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure*, **18(2)**: 177-187.
- [35] von Kobbe, C., Thomä, N.H., Czyzewski, B.K., Pavletich, N.P., Bohr, V.A. (2003) Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J Biol Chem*, **278(52)**: 52997-53006.

- [36] Bernstein, D.A., Zittel, M.C., Keck, J.L. (2003) High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic core. *EMBO J*, **22(19)**: 4910-4921.
- [37] Gyimesi, M., Sarlós, K., Derényi, I., Kovács, M. (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **38(13)**:4401-4414.
- [38] Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*,
- [39] Gyimesi, M., Sarlós, K., Derényi, I., Kovács, M. (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res*, **38(7)**:e102.
- [40] Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P., Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, **20(3)**:313-324.
- [41] Shereda, R.D., Reiter, N.J., Butcher, S.E., Keck, J.L. (2009) Identification of the SSB binding site on E. coli RecQ reveals a conserved surface for binding SSB's C terminus. *J Mol Biol*, **386(3)**:612-625.
- [42] Lee, J.W., Harrigan, J., Opresko, P.L., Bohr, V.A. (2005) Pathways and functions of the Werner syndrome protein. *Mech Ageing Dev*, **126(1)**:79-86.
- [43] Sharma, S., Sommers, J.A., Wu, L., Bohr, V.A., Hickson, I.D., Brosh, R.M. (2004) Stimulation of flap endonuclease-1 by the Bloom's syndrome protein. *J Biol Chem*, **279(11)**:9847-9856.



Harami Gábor az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 2010-ben. Tanulmányait az ELTE Szerkezeti Biokémia PhD program keretei között folytatja, jelenleg másodéves hallgató. Munkáját Kovács Mihály kutatócsoportjában végzi. Fő kutatási területe a RecQ helikázok működési mechanizmusának felderítése szerkezet-funkció összefüggések vizsgálatával.



Gyimesi Máté az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 2004-ben. Tanulmányait az ELTE Biokémiai tanszékén folytatta, ahol a Szerkezeti Biokémia Doktori Iskolában, Málnási-Csizmadia András kutatócsoportjában 2008-ban szerzett PhD fokozatot. Munkáját 2012-ig a Kovács Mihály által vezetett Motorenzimológiai Kutatócsoportban folytatta az ELTE-n. Jelenleg a University of California (Davis) egyetemen dolgozik egy Marie Curie ösztöndíj támogatásával. Fő érdeklődési területe a genomkarbantartó funkciókat végző motorenzimek, ezen belül a DNS-hibajavításban szerepet játszó enzimek vizsgálata, továbbá a kromatinstruktúrát átalakító enzimek hatásmechanizmusának felderítése.



Kovács Mihály az ELTE-n szerzett biológusdiplomát 1998-ban. Tanulmányait az ELTE-n és a Leicesteri Egyetemen folytatta, 2002-ben kapott PhD fokozatot. Ezután három évig az USA-beli National Institutes of Health-ben dolgozott posztdoktorként. Jelenleg az ELTE Biokémiai Tanszékén az ELTE-MTA „Lendület” Motorenzimológiai Kutatócsoportot vezeti ([www.mk-lab.org](http://www.mk-lab.org)). Fő érdeklődési területe különböző biológiai motorok (aktomiozin rendszerek, DNS helikázok) működési és szabályozási mechanizmusainak, valamint mechanikai erők enzim-működésre gyakorolt hatásainak vizsgálata.