

A DNS szerkezete, replikációja és hibajavítása eukarióta sejtekben

Dr. Pankotai Tibor, egyetemi docens

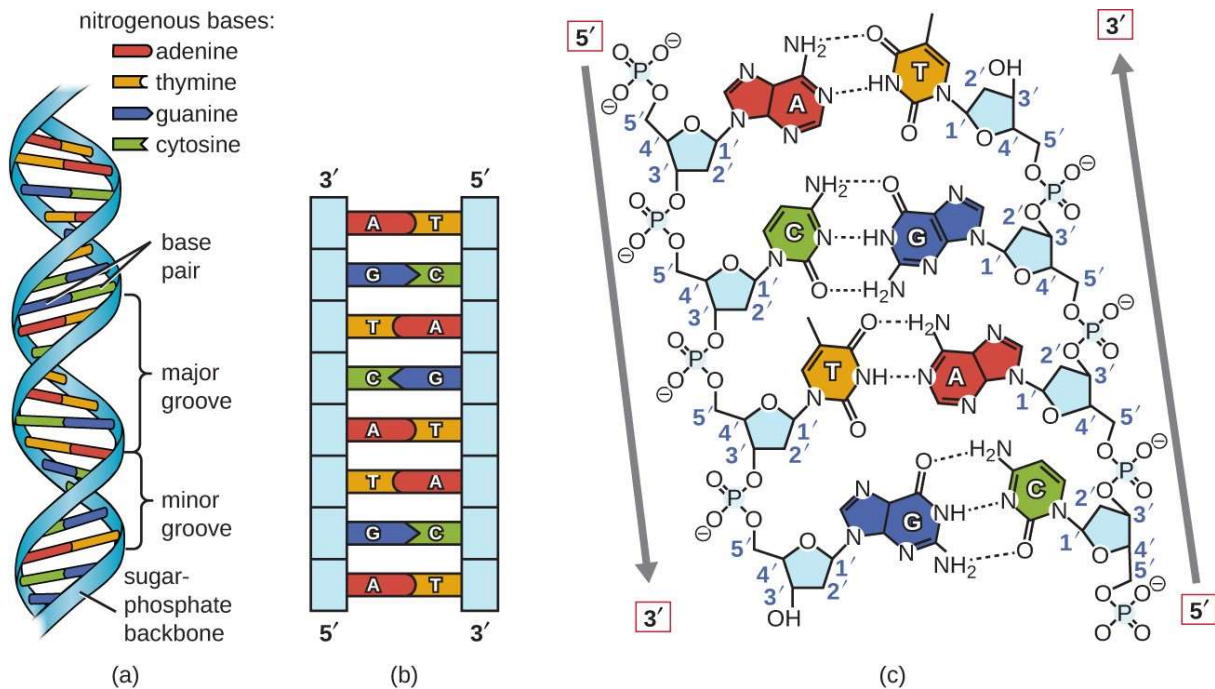
BBTE, Haladó Genetika

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projektazonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Olvasási idő: 45 perc.

A DNS szerkezete, replikációja és hibajavítása eukarióta sejtekben

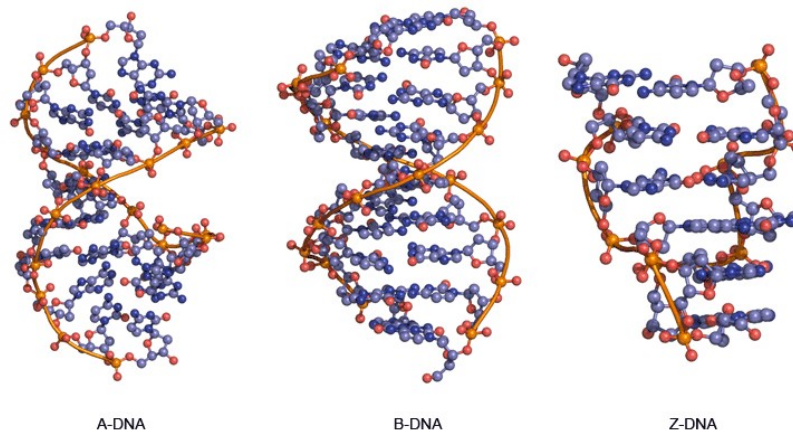


1. ábra: A DNS szerkezete - <https://courses.lumenlearning.com>

A DNS szerepe és szerkezete: A DNS (dezoxiribonukleinsav) a sejtmagban található információ hordozó makromolekula, amely az egyed tulajdonságainak örökítéséért, valamint a sejtben termelődő fehérjék kódolásáért és kifejeződéséért felelős. A DNS alkotóelemei a nukleotidok, amelyek nitrogén tartalmú heterociklusos purin és pirimidin bázisokból (adenin - A, timin - T, guanin - G és citozin - C), pentózból (2-dezoxi- β -D-ribóz) és foszforsavból (H_3PO_4) épülnek fel. Watson és Crick modellje szerint a fiziológias állapotban előforduló DNS egy jobbra csavarodó, antiparallel lefutású kettős hélix, amely a cukorfoszfat gerincből és az egymással komplementer bázisokból áll. Ezen szerkezet megtartásában különböző kémiai kötések stabilizálják a DNS molekulát:

- Foszfodiészter kötések alakulnak ki az egyik nukleotid dezoxiribózának 5' foszfát (PO^3^-) csoportja és a következő nukleotid dezoxiribóz komponensének 3' hidroxil ($-OH^-$) csoportja között.
- Glikozidos kötések találhatóak a bázisok és cukrok között.
- H-hidak kapcsolják össze a szemközti bázisokat: adenin és timin között kettő, míg guanin és citozin között három hidrogén híd található. A bázisok közötti hidrogén híd kötések mennyisége hatással van a DNS szálak szétválásának energiámenyiségére, így befolyásolják a DNS olvadási pontját is.

A DNS a sejtben három szerkezetben fordulhat elő - A, B és Z DNS szerkezet -, melyek térbeli elhelyezkedésében lényeges különbségek mutatkoznak. Az 5'-3' és 3'-5' irányultságú DNS százból alkotott antiparallel α -hélix 3-dimenziós szerkezetében megfigyelhetjük a nagy és kis



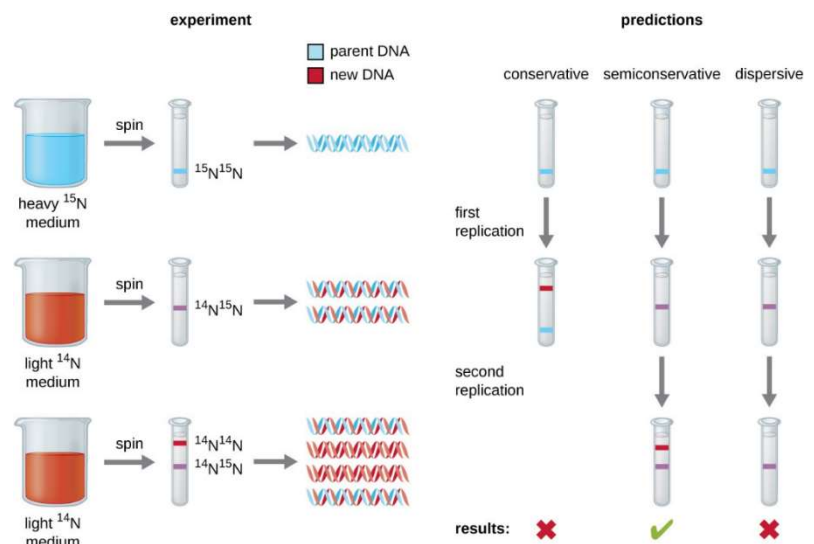
2. ábra: A DNS térbeli szerkezetei - <https://courses.lumenlearning.com>

árkok megjelenését, amelyek különböző DNS kötő fehérjéknek (transzkripció, replikáció és DNS hibajavítást szabályozó fehérjék) biztosítanak specifikus kötődést.

A molekuláris biológia alapja, a centrális dogma kimondja, hogy a DNS-ről a transzkripció során RNS képződik, majd arról fehérje transzlálódik. Kivételt képeznek ez alól a retrovírusok, amelyek örökítő anyaga az RNS, melyről reverz transzkripcióval DNS íródik át. Bármely kettős szálu DNS-re igazak a Chargaff- szabályok, amely szerint a purin és pirimidin bázisok száma megegyezik ($A+G=C+T$). A komplementaritás elve miatt az adenin és timin, illetve a guanin és citozin mennyisége is megegyezik.

Szemikonzervatív replikáció:

Meselson és Stahl 1958-ban folytatott kísérletében ^{15}N -t tartalmazó táptalajon növesztettek E. coli sejteket, majd a baktériumokat normál ^{14}N táptalajra helyezték át és az első, majd a második osztódás után DNS-t izoláltak a sejtekből. CsCl segítségével gradiens centrifugálást végeztek, így vizsgálták a keletkezett DNS molekulák sűrűségét. A felvetésüket igazolta, hogy csak az első osztódás után

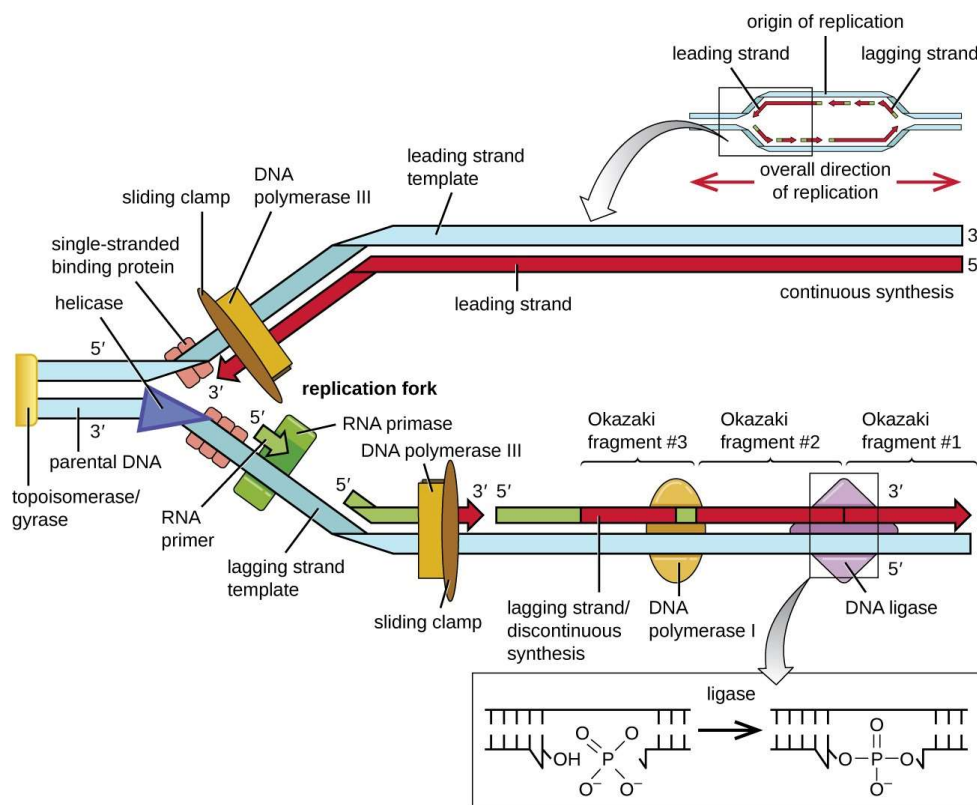


3. ábra: Meselson-Stahl kísérlet - <https://courses.lumenlearning.com>

köztes sűrűségű DNS (fele „nehéz, fele „könnyű” DNS lánc), a második osztódás után pedig köztes és könnyű sűrűségű DNS keletkezett. Ezzel bebizonyították, hogy a DNS replikáció szemikonzervatív, tehát az újonnan szintetizált kettős hélix egyik szála az eredeti/szülői DNS

szál, a másik pedig az újonnan szintetizált DNS szál, mivel a replikáció során a DNS két szála elválnak egymástól és templátként szolgálnak az új, velük komplementer szálak szintéziséhez.

Replikáció: A DNS megkettződésének folyamata a sejtciklus S fázisában. A polinukleotid lánc szintézisekor a DNS-függő DNS polimeráz 5'-3' irányban dezoxiribonukleotid-trifoszfátokat (dNTP) épít be az újonnan szintetizálódó DNS szálba, az ehhez szükséges energiát pedig a beépülő nukleotid-trifoszfát 2 foszfát csoportjának a hidrolízise szolgáltatja. A DNS duplikáció igen gyors és pontos folyamat, prokariótákban 500-1000 nukleotid, míg eukariótákban 50-100 nukleotid épül be másodpercenként az újonnan szintetizálódó DNS szálba. Eukariótákban a prokariótákhoz képest lassabb szintézis a kromatin szerkezet miatt figyelhető meg. A replikáció során fontos a genetikai információ állandóságának megtartása, de ugyanakkor lényeges a változékonyság biztosítása is. Humán sejtekben a replikáció során 3 hibás nukleotid épül be az új DNS szálba, azaz $1/10^9$ nukleotidonként figyelhető meg az eredeti szekvenciától eltérő nukleotid beépülése. A replikáció során a hibajavítást a DNS polimeráz exonukleáz aktivitása és a Mismatch Repair (MMR) folyamata biztosítja.

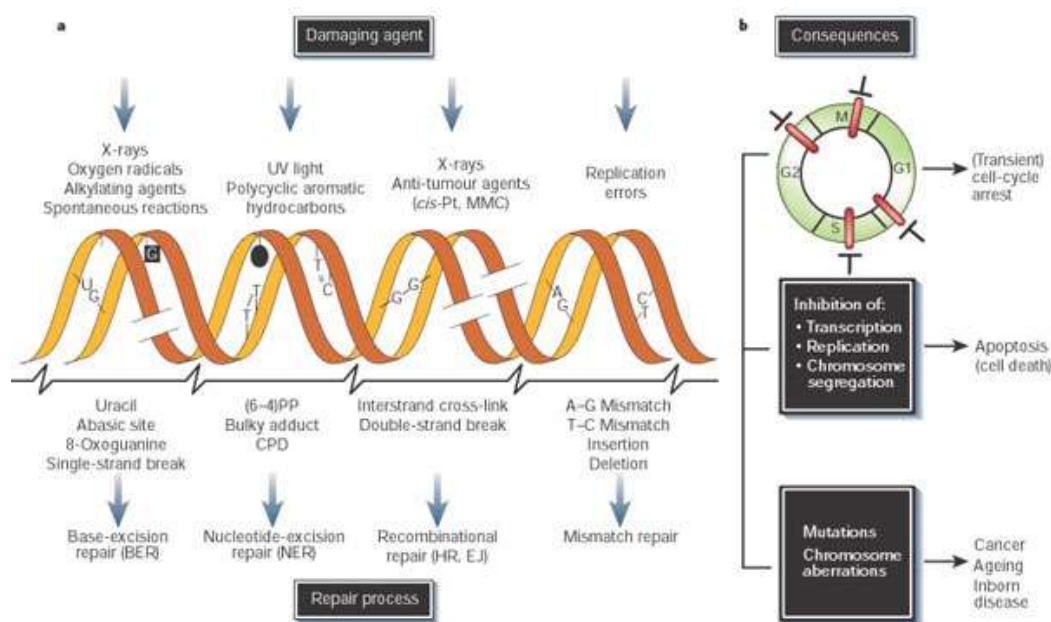


4. ábra: Replikációs villa felépítése - <https://courses.lumenlearning.com>

Replikáció lépései: A DNS megkettződéséhez a kettős szál felnyílására van szükség, amit a helikázok végeznek, a keletkező egyes szálakat pedig az SSB (single strand binding) proteinek stabilizálják. Szükség van továbbá a topoizomeráz I és II enzimekre is a túltekeredés elkerülése miatt. A kettős szálú DNS felnyílása után a replikációt a DNS polimeráz önmagában nem képes elindítani, szükség van RNS primerekre (~10 nukleotid), amelyek a bázispárosodás elve szerint kapcsolódnak a DNS adott szakaszához. Prokariótákban a primáz, eukariótákban pedig a polimeráz α végzi a primer szintézist. A primerek kötődése után elindulhat a polimerizáció, vagyis az új dNTP-k beépülése a DNS polimeráz III által. Megkülönböztetünk vezető és

késlekedő szál a szintézis során, amikor is a vezető szál folyamatosan szintetizálódik 5'-3' irányban, míg a késlekedő szál szakaszokban szintetizálódik. A késlekedő szálon figyelhetők meg az ún. Okazaki fragmentumok, amelyek a replikációhoz szükséges RNS primerekből és a közöttük található új DNS szakaszból állnak. Prokariótákban az Okazaki fragmentumok 1000-2000, míg eukarióták esetében 100-200 nukleotid hosszúak. A DNS polimeráz folyamatos DNS szintetizáló képességét a „csúszó kapocs” szerkezetének köszönheti (processzivitás). Miután a DNS polimeráz III elvégezte feladatát, a DNS polimeráz I eltávolítja a primereket (RNáz aktivitás) 3'-5' exonukleáz aktivitása révén, majd helyettesíti dNTP-k segítségével 5'-3' polimeráz aktivitása révén. Ezután egy DNS ligáz a szakaszokban szintetizálódott DNS részleteket összekapcsolja NADPH és ATP felhasználásával. A replikáció során kialakul egy jellegzetes struktúra, vagyis a replikációs villa.

DNS károsító ágensek és genomstabilitás: Az élő sejtekben rendkívül fontos feladat a genom stabilitás fenntartása, valamint a DNS eredeti szekvenciájának megőrzése. A genom karbantartása komplex feladat, mivel a környezetből (exogén) és sejten belüli (endogén) forrásokból érkező DNS károsító hatások következtében egyetlen sejtben napi 10^3 - 10^6 DNS károsodás jön létre. Exogén hatás lehet az UV sugárzás, γ -sugárzás, α -részecskék,



5. ábra: DNS károsító hatások és az általuk kiváltott sejtválaszok - Hoeijmakers, J. H. J. és mtsai.

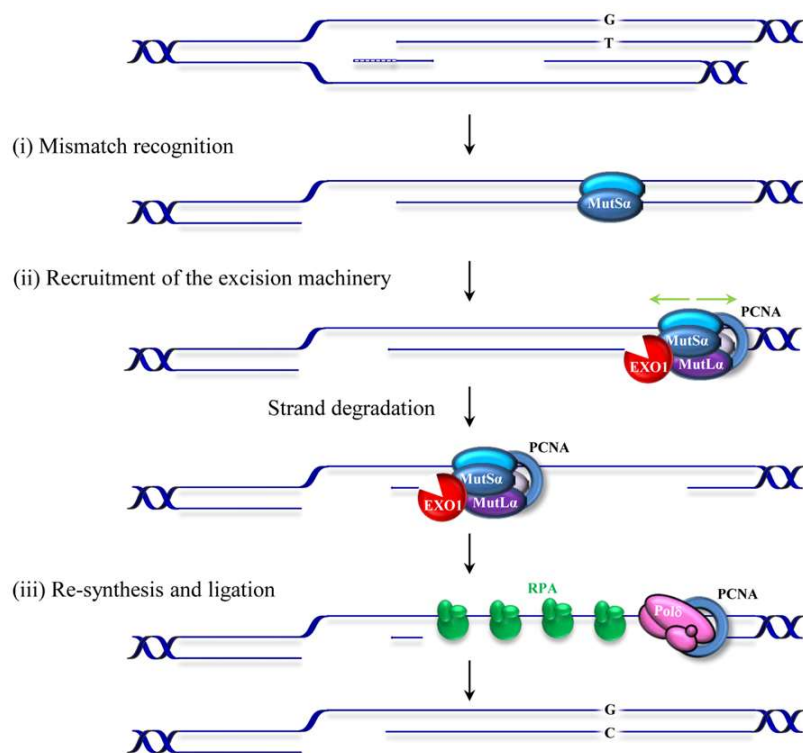
röntgensugárzás, lézer, nehézfém ionok, különböző kémiai vegyületek, interkaláló ágensek. Endogén károsító hatásnak tekinthetjük a normál metabolizmus közben felhalmozódott reaktív oxigén származékokat, a replikáció során képződött hibákat és a nukleotidok/bázisok spontán kémia változásait. A DNS sérülése során létrejöhetnek pontmutációk, kromoszóma szám és szerkezeti mutációk, deléciók és inszerciók.

DNS hibajavítás: A DNS károsító hatások okozta kromoszóma- és pontmutációk a DNS hibajavító útvonalak aktiválódását eredményezik, amelyek megszüntetik az adott DNS sérülést. Amennyiben a DNS hibajavító mechanizmusok működése zavartalan, a javításban résztvevő fehérjék felismerik a DNS sérülés környezetében szinte azonnal megjelenő PTM-eket (pl. γ H2AX), amelyek jelzéseként és/vagy kapcsolódási felszínként szolgálnak a különböző

hibajavító fehérjéknek. A DNS sérülés érzékelését követően egy ún. DNS hibajavítási fókusz alakul ki a DNS törés környezetében, ahol nagy mennyiségű hibajavító fehérje halmozódik fel. A DNS hibajavítás során szükséges fehérjék szigorúan szabályozott sorrendben kötődnek a sérült DNS régióhoz, valamint további hibajavító fehérjével is komplexet alkotva a DNS eredeti szekvenciáját állítják helyre.

DNS hibajavító útvonalak: A DNS károsító ágensek DNS hibák létrejöttét eredményezhetik, amelyet a DNS hibajavító mechanizmusok képesek helyreállítani. A sérülések lehetnek egyes szálú DNS törések, amelyet a Bázis-kivágó hibajavítás (BER) és Nukleotid-kivágó hibajavítás (NER) vagy az Össze nem illő párok javítása (MMR) útvonal kulcsfehérjéi fognak érzékelni, majd javítani. Az egyes szálú DNS töréseket a sejt aránylag nagy biztonsággal képes kijavítani, mivel az eltávolított hibás nukleotidok helyett a komplementaritás elve szerint az újak beépülhetnek. A kettős szálú DNS törések (DSB) javításáért elsődlegesen két fontos útvonal felelős, a Nem-homológ végek összekapcsolódása (NHEJ) és a Homológ rekombináció (HR) útvonal. A DSB-k sokkal veszélyesebbek az egyes szálú DNS töréseknél, mivel a genetikai információ egy részének elvesztése vagy mutációk beépülése nagyobb valószínűséggel történik meg, abból adódóan, hogy az 5'-3' és 3'-5' cukor-foszfát gerinc folytonossága megszűnik az adott pozícióban.)

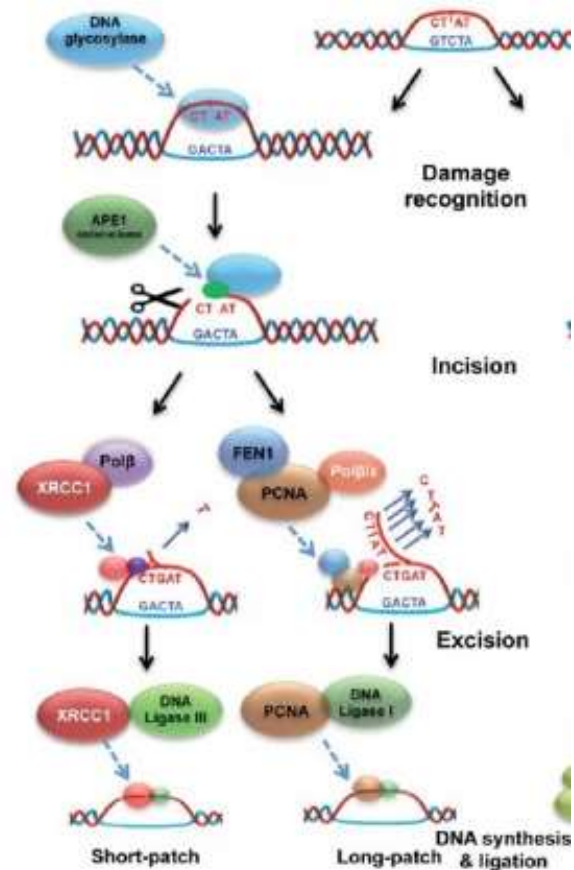
MMR: Mismatch hibajavító útvonalban résztvevő fehérjék a DNS szintézis során fellépő össze nem illő párok hibajavítását végzik. Egyetlen nukleotid hibás párosodása esetén a MutS α , míg 2-14 össze nem illő bázis kapcsolódása esetén a MutS β komplex kötődik a DNS-hez elsőként. A MutL α a MutS komplexhez kötődik, amely konformáció változáson megy keresztül, így egy csúszó kapocsként képes elmozdulni a DNS szálon a hibás bázispárosodások keresése érdekében. Ezt követően a Mlh1 és Pms2 kapcsolódik. A Mut fehérjék az alapján tesznek különbséget a szülői és újonnan szintetizálódott DNS szál között, hogy a szülői DNS szál metil-csoportokat tartalmaz, az új szálon pedig az Okazaki fragmentumok miatt nick-eket találhatók, illetve szabad 3' véggel rendelkeznek. A hibás bázispárosodás pozíciójának azonosítása után az Exo1 endonukleáz – az Msh2 s Mlh1 fehérjével kapcsolatot létesítve – eltávolítja a hibás DNS fragmentumot, mintegy 100-300 nukleotid hosszúságú szakaszon. Az egyes szálú szülői DNS-t az RPA fehérje stabilizálja, amíg



6. ábra: MMR - Javier Pena-Diaz és mtsai.

a DNS polimeráz δ a PCNA és RFC fehérjék közreműködésével szintetizálja a naszcens DNS szálat, majd a DNS ligáz I összekapcsolja a nickeket.

BER: A DNS bázisainak kémiai módosulása esetén (oxidáció, depurináció, deamináció, alkiláció, egyes szálú DNS törés - SSB) a DNS hélix szerkezetében torziós feszültség keletkezik, amelyet a BER útvonalban résztvevő fehérjék állítanak helyre. Két BER útvonalat különböztetünk meg, az ún. short-patch és a long-patch útvonalat, melyek közti választást a DNS glikoziláz specifitása és a sejt típusa nagyban meghatározza. A short-patch útvonal során a DNS hélix disztorzióját a DNS glikoziláz enzim érzékeli, amely eltávolítja a sérült bázist a cukor és a bázis közti N-glikozidos kötés hasításával, így egy abázikus helyet hagyva maga után. Az APE1 endonukleáz az XRCC1 segítségével az abázikus helyhez kötődik, majd dezoxiribóz-foszfát 5' foszfodiészter kötését hasítva nicket hoz létre a DNS cukor-foszfát gerincében. Ezt követően a DNS Polimeráz β exonukleáz aktivitása révén, a 3' foszfodiészter kötés felbontásával eltávolítja a hibás nukleotidot, míg polimeráz aktivitása révén feltölti a kialakult gap-et az ép szálat templátként használva. A folyamat végén a DNS Ligáz I létrehozza foszfodiészter kötetést, így helyreállítja a



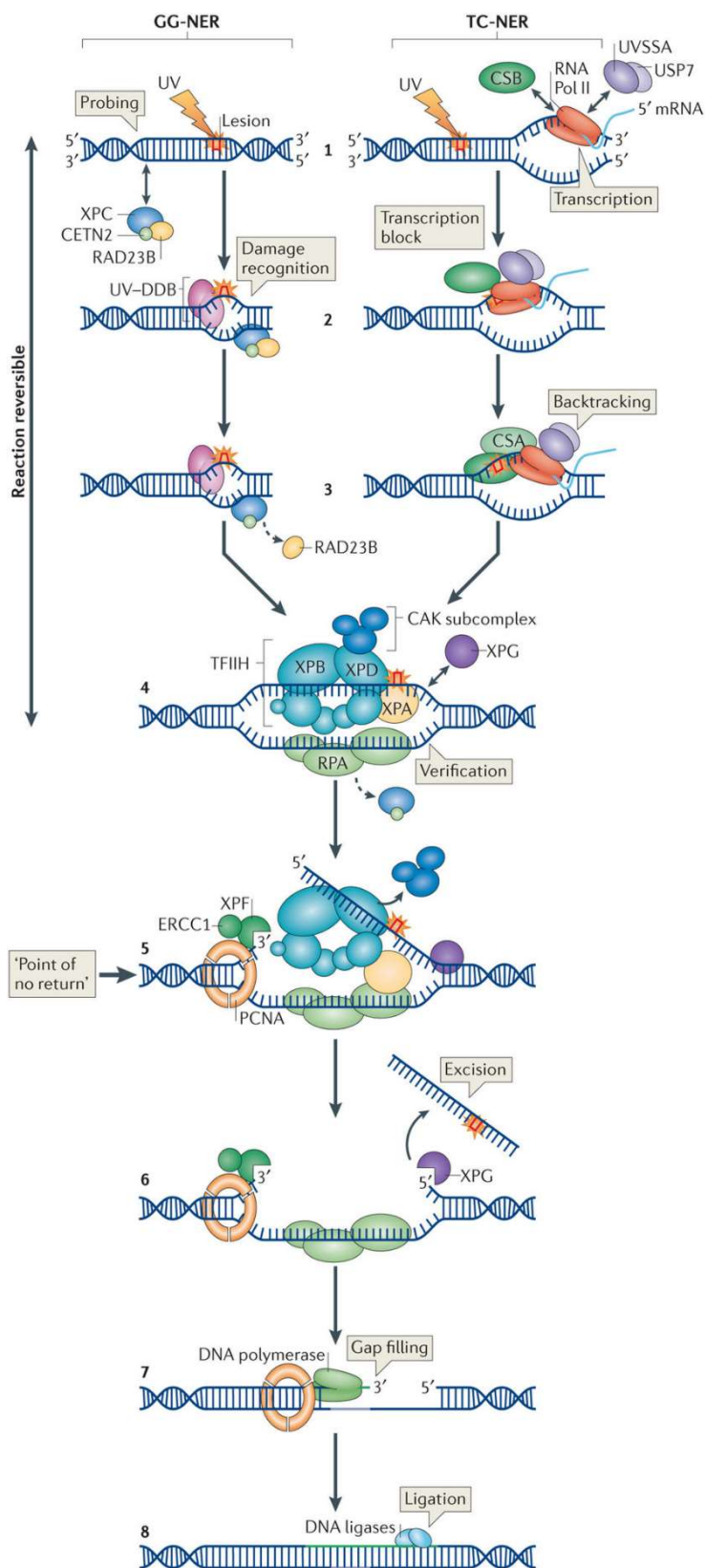
7. ábra: BER - Eric W.-F. Lam és mtsai.

DNS cukorfoszfát gerincét. A long-patch útvonal esetében egyetlen nukleotid helyett 2-15 nukleotidot távolít el és cserél ki a DNS polimeráz β , δ és ϵ a PCNA közreműködésével. A hibás nukleotidokat az XRCC1 által a sérülés helyére irányított FEN1 endonukleáz távolítja el, majd a nicket a DNS ligáz I kapcsolja össze.

NER: Az UV sugárzás és különböző kémiai ágensek hatására létrejövő és ciklobután-pirimidin dimerek, 6-4-pirimidin-pirimidon és ciklopurinok javításáért felelős útvonal a NER, melynek két típusát különböztetjük meg, a Globális genom NER-t (GG-NER) és a Transzkripció kapcsolt NER-t (TC-NER). A TC-NER a transzkripcióban aktív régiók hibajavításáért felelős, míg a GG-NER az egész genomban, heterokromatikus és eukromatikus régiókban egyaránt megfigyelhető. A két útvonal közti lényeges különbség a DNS sérülés érzékelésében mutatkozik. A GG-NER esetében az XPC-RAD23B vagy az UV-DDB komplex érzékeli a DNS sérülést, míg a TC-NER esetében az elakadó RNS polimeráz II iniciálja az útvonalat. A GG-NER első lépéseként az XPC-RAD23B komplex a sérülés helyére vándorol. Az XPC érzékeli a hibát és az ép DNS szárhoz kötődik a törés közelében, míg a RAD23B stabilizálja a komplexet

és segíti az XPC kötődését. Hasonlóan zajlik az érzékelés az UV-DDB komplex esetében is. A TC-NER a transzkripcionálisan aktív DNS szakaszokon történő hibákat képes felismerni és javítani. A transzkripció elongáció lépése során az RNS polimeráz II (RNAPII) a törés helyén transzkripciós blokkot érzékelve elakad (stalling), majd a CSB, UVSSA és USP7 fehérjékkel átmeneti komplexet alkotva, az RNAPII ún. reverz transzlokáción (backtracking) esik át, annak érdekében, hogy a NER komplex felépülhessen. A GG-NER és TC-NER útvonal lépései inentől megegyeznek. A következő faktor a TFIIH, amely az XPC-RAD23B komplexszel fizikai kapcsolatot létesítve lokalizálódik a sérülés helyére. Az XPB a TFIIH komplex részeként segíti a kötődését, majd szintén a TFIIH részeként az XPD felnyitja a DNS-t helikáz aktivitása révén. Ezt követően az XPC-RAD23B disszociál és a preiniciációs komplex felépülhet. A következő, egymástól függetlenül belépő tagok az XPA, RPA és XPG fehérjék. Az RPA stabilizálja az ép egyes szálú DNS-t, majd az XPA a törés helyére irányítja az ERCC1-XPF komplexet, amely az XPG közreműködésével a hibás szálát eltávolítja. A kivágott oligonukleotiddal egyidejűleg távozik a core NER komplex is. Ezt követően a DNS polimeráz κ , δ és ϵ a PCNA, RPA és RFC komplex segítségével az ép DNS szálát templátként használva feltölti a gap-et. A folyamatot lezárva a DNS ligáz I/III az XRCC1 közreműködésével összekapcsolja a nick-et.

NHEJ: Az ionizáló sugárzások (pl. röntgensugárzás) és citosztatikus drogok hatására bekövetkezett kettős szálú DNS törések hibajavítását a NHEJ útvonalban résztvevő fehérjék végzik. Az NHEJ a sejtciklus bármelyik fázisában működőképes, ezért a nagyobb valószínűséggel aktiválódó hibajavító útvonalnak tekinthető. A DNS károsodást a NHEJ útvonalban egy eddig még nem



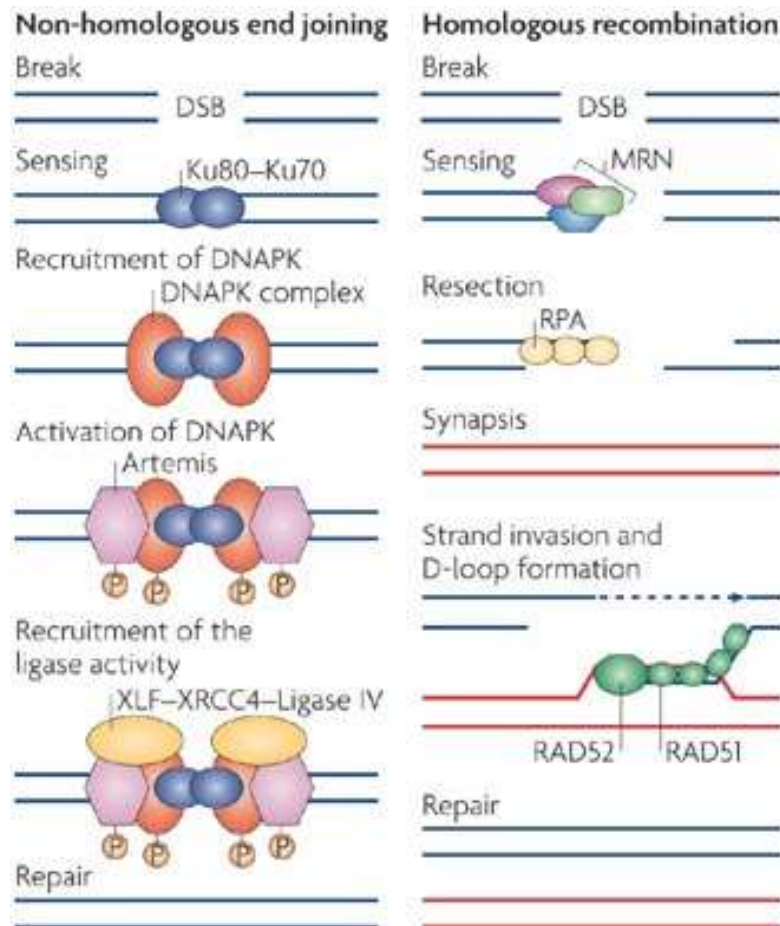
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

8. ábra: NER - Jan H. J. Hoeijmakers és mtsai.

azonosított faktor ismeri fel, majd a törött DNS végekhez a Ku70/80 heterodimer komplex kötődik a DNAPK-nak dokkoló helyet biztosítva, így a fizikai közelségben tartja a sérült DNS végeket. A két DNS szál között a DNAPK doménjei ún. hidat formálnak, így alakulhat ki a kapcsolat a sérült DNS végek között. A DNAPK autofoszforyláció révén aktiválódik, majd foszfát csoportot helyez az Artemis endonukleázra, amely komplementer DNS végeket alakít ki, lehetővé téve, hogy az XRCC4, Cer-XLF és PAXX fehérjék által a törés helyére irányított DNS ligáz IV összekapcsolja a sérült DNS szálakat.

HR: A HR a sejtciklus S és G2 fázisaiban aktív hibajavító folyamat, mivel az aktivációjához és a hibajavításhoz szükség van a templátként használt homológ szekvenciák jelenlétére. A DSB megjelenése után a törést az MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) komplex ismeri fel az ATM által S139-es pozícióban foszforylált H2AX hiszton variánsan keresztül (γH2AX). Az útvonalban elsőként kötődő MRN komplex a törött DNS végeket egyes szálú DNS-sé (ssDNS) alakítja a CtIP fehérje közreműködésével. Ezt követően az EXO1 és DNA2 összehangoltan működve további hosszabb 3' ssDNS szakaszokat hoz létre. Az ssDNS-t az RPA stabilizálja, amely elősegíti a RAD51 fehérje kötődését is. A RAD51-ssDNS filament az intakt testvér kromatida komplementer szakaszával kapcsolatot létesít, így kialakítva a D-hurok szerkezetet. A DNS szintézis során a DNS polimeráz δ által beépített nukleotidok kapcsolódnak a 3' ssDNS véghez. Ezt a második hibridizációs eseményt követően a követő szál szintézise is elindul. Végezetül a kialakult dupla Holliday szerkezet (HJ) felbomlása kétféle módon következhet be:

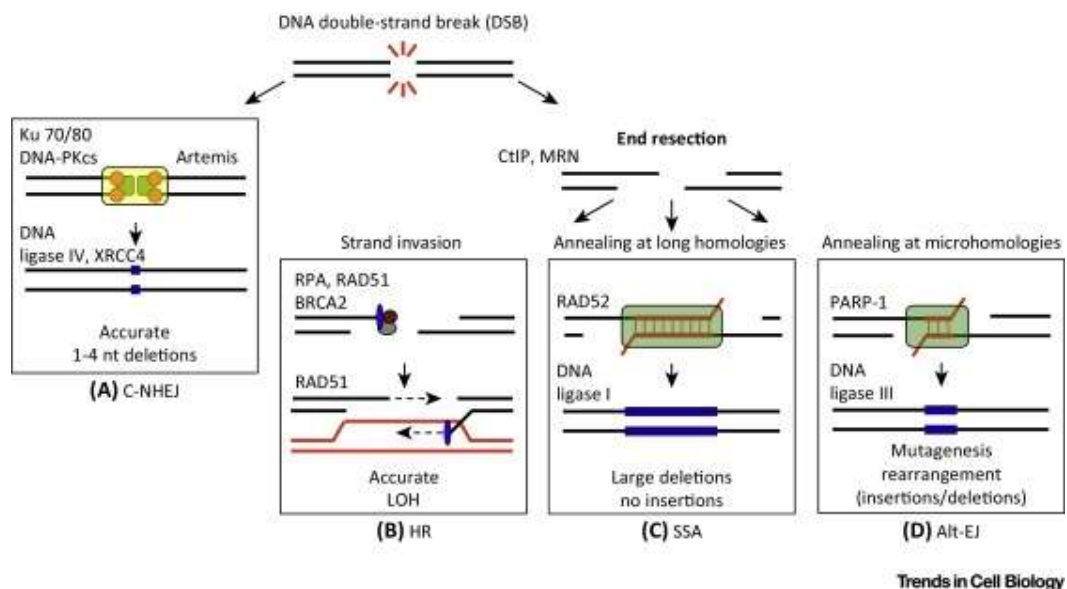
(I.) mindkét HJ a kereszthíd vándorlás során horizontális vagy vertikális irányban oldódik fel, ebben az esetben nincs crossover, vagy (II.) a két HJ ellenkező irányban oldódik fel, így crossover következik be a két kromatida között. A HR egyik altípusa az SDSA útvonal megegyezik a HR útvonallal a D-hurok szerkezet kialakulásáig, azonban az Srs2 helikáz megakadályozza a dupla HJ létrejöttét, így egy ún. háromszálú DNS struktúra alakul ki, mivel csak az egyik sérült DNS szál kapcsolódik a homológ párjához. Az SDSA



9. ábra NHEJ és HRR – Evo soutoglou és mtsai.

lezárásakor nincs crossover, csak visszarendeződés figyelhető meg. A HR útvonalak lezárásaként a HJ-k feloldódását követően a nickeket a DNS Ligáz IV kapcsolja össze.

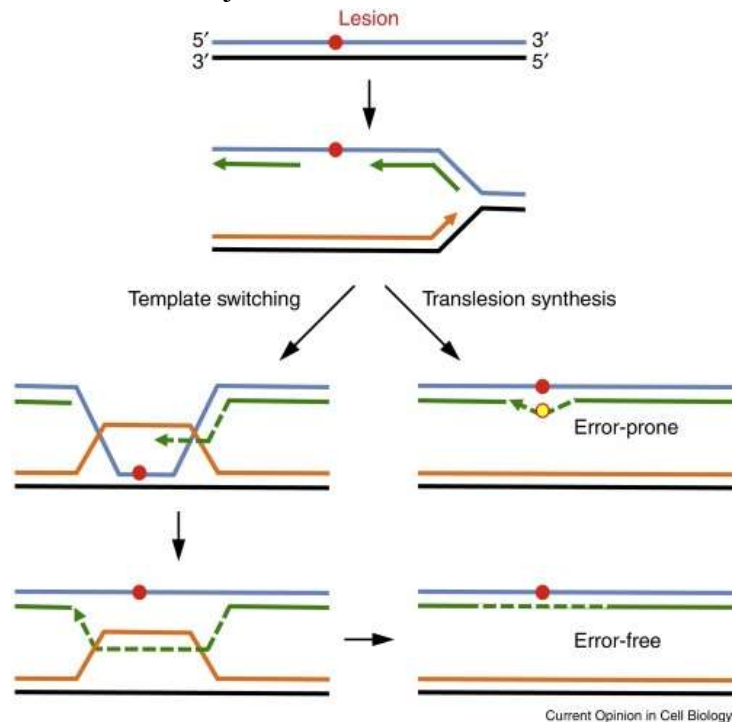
SSA és MMEJ: A HR és NHEJ útvonalak alternatívái: a ssDNS szálpárosodás (SSA) és a Mikrohomológia-mediált vég összekapcsolódás (MMEJ, másnéven a-EJ). Mindkét útvonal esetében a sérült DNS szálakat egyes szálú DNS-sé kell alakítani, mivel mikrohomológián alapuló útvonalak. Lényeges különbség a két útvonal között, hogy az SSA 100-400 nukleotid hosszúságú homológ DNS szakaszokat igényel a hibajavításhoz, az MMEJ akár 2-25 nukleotid méretű homológ DNS szakaszok segítségével is képes a kettős szálú DNS törések javítására. Közös pontja azonban mindkét mechanizmusnak, hogy a folyamat során létrejövő mikrodéléciók kialakulásának valószínűsége jelentősen nagyobb, mind az NHEJ mind a HR útvonalakhoz viszonyítva. Az SSA abban az esetben aktiválódik, ha a kettős szálú DNS törés két olyan repetitív DNS szakasz környezetében következik be, amelyek orientációja megegyezik. A törés megjelenése után az MRN komplex egyes szálú DNS-t alakít ki a CtIP fehérje közreműködésével - ahogyan a HR útvonalban is megfigyelhető -, majd a Rad52 és RPA fehérjék DNS-hez való kötődésével a repetitív szekvenciák hibridizálnak egymással, létrehozva egy ún. flap szerkezetet. Az útvonal harmadik lépéseként egy újabb hasítási lépés következik, amikor a repetitív régiók közötti DNS szakaszt (flap) eltávolítja az ERCC1/XLF komplex. A DNS szakaszokat feltételezhetően a DNS Ligáz III kapcsolja össze a folyamat végén. A Microhomology mediated end joining (MMEJ/a-EJ) kezdeti lépéseként a törött DNS szálakat a CtIP fehérje által foszforilált MRN komplex visszaemésztli, így komplementer DNS végeket hoz létre, majd a PARP1 és WRN komplex a DNS szálakat fizikai közelségben tartja, így a DNS Ligáz I/III összekapcsolja a törött DNS végeket. Az MMEJ még nem teljesen feltérképezett folyamat, azonban az S fázisban aktiválódó mechanizmus, amikor az NHEJ és HR is működőképes.



10. ábra: SSA és MMEJ - Alan D.D'Andrea és mtsai.

TS és TLS A replikáció során amikor a DNS-függő DNS polimeráz egy hibás nukleotidhoz érkezik, nem képes folytatni a szintézist, így blokk keletkezik, ami a replikációs villa összeesését eredményezheti. A replikáció során fellépő hibák javítására a MMR mechanizmusán kívül létezik egy ún. Templát váltás (TS) útvonal, amely az alacsony számban jelenlévő repetitív DNS szakaszok, duplikációk és tandem szekvenciák replikációjakor bekövetkező törések érzékelését követően aktiválódhat. Abban az esetben, ha replikációs villa megakad, az újonnan szintetizálódó DNS szálak vándorlása következik be, annak érdekében, hogy homológ DNS szakaszokat használva folytatódhasson a replikáció. Ebben az esetben két replikációs villában szintetizálódó naszcens DNS szakasz között alakul ki ún. mikrohomológia, így ezen szakaszok templátként szolgálnak a szintézis során. A replikációs blokk érzékelését követően egy másik mechanizmus, a Transzlézió szintézis (TLS) útvonal aktiválódása is bekövetkezhet, amely azonban nem a hiba kijavításáért felelős, hanem a rekombináció végbemenetelét segíti elő. A

TLS kezdeti lépéseként a DNS polimeráz disszociál a DNS-ről és egy ún. transzléziós polimeráz veszi át a helyét, amely képes áthaladni a törésen és a hibás szállal komplementer nukleotidokat épít be az újonnan szintetizálódó DNS szálba. A transzléziós polimerázok nem rendelkeznek 3'-5' exonukleáz aktivitással, így a fidelitásuk sokkal alacsonyabb a replikációt végző polimerázokénál. Mindkét útvonal – TLS, TS – esetében elmondható, hogy a pontmutációk és deléciók kialakulásának valószínűsége jelentősen nagyobb a fő hibajavító útvonalakéhoz képest.



11. ábra: TLS és TS – Ivan Psakhye és mtsai.