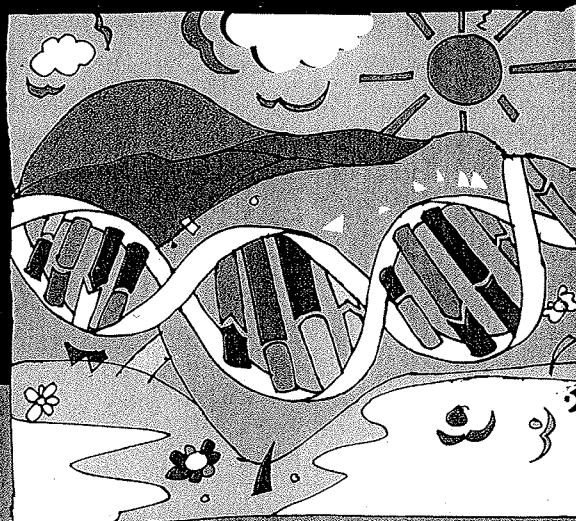


Dr. Mandl József

# B I O K É M I A

Aminosavak, peptidek, szénhidrátok,  
lipidek, nukleotidok, nukleinsavak,  
vitaminok és koenzimek



Semmelweis Kiadó

## 4. NUKLEOTIDOK – NUKLEINSAVAK

Írta: Dr. Staub Mária

A nukleinsavak az élő szervezetek funkciójában a genetikai információ tárolásának és továbbításának molekulái, a fehérjékkel együtt gyakran *információs makromolekuláknak* nevezzük őket. A nukleinsavak minden sejt fontos alkotóelemei, a sejtek szárazanyag tartalmának 5–15 %-át képviselik. Az elnevezés onnan származik, hogy a dezoxiribonukleinsavak (DNS) először a sejtmagból izolálták (nukleusz), de ma már tudjuk, hogy mind a DNS, mind az RNS a sejt más organellumaiban is előfordul. A nukleinsavak nukleotid egységekből épülnek fel, hasonló elv alapján, mint a fehérjék az aminosavakból. Az információs makromolekulákat megkülönbözteti egymástól az építőkövek milyensége, ill. sorrendje, így a fehérjék esetében a hús aminosav szekvenciája, az aminosavegységek R csoportjai, azok térbeli elrendeződése. A nukleinsavak esetében a megkülönböztető építőkövek a heterociklusos gyűrűt tartalmazó négy bázis, ezek szekvenciája valamint a polinukleotid lánc másodlagos szerkezete.

Az egész élővilág esetében a DNS genetikai szerepe bizonyított. Napjainkban eukariota sejtekbe is tudnak tisztított DNS-szakaszokat juttatni (transzfekció), amelyek integrálódnak a gazda DNS-be, és új tulajdonságok, új enzimek jelennek meg a sejtben. A legizgalmasabbak azok a kísérletek, amelyekben a bevitt gének nem csak egy sejtben, hanem egy egész állatban megnyilvánulnak. Egérpetesejtbe mikro-injekcióval juttatták be a patkány növekedési hormon génét. A megtermékenyített petesejtből származó utódok (*transzgenikus egér*) sejtjeiben a növekedési hormon génje nem csak beépült, hanem működött is, amit bizonyít, hogy az új gént hordozó egyedek kétszer nagyobbra nőttek, mint a szülők. Velezületett súlyos anyagcsere-betegségek, kimutatott genetikai károsodások esetében is megtörténtek az első próbálkozások az ép gén bevitelére (génterápia), ami az oki gyógyítás irányában egy hatalmas lépés lehetne. A génterápia bevezetéséig azonban még nagyon sok feladat áll a kutatók előtt, a genetikai anyag sejten belüli szerkezetének, expressziójának a pontos megismerésében.

A kísérletek tehát nem csak azt bizonyították, hogy a DNS, a genetikai anyag az eukariotákban is átvihető különféle fajok között, hanem azt is, hogy funkcióját is megőrzi az új egyedben.

A teljesség kedvéért meg kell említenünk, hogy az élő szervezetek túlnyomó többségében a DNS az öröklődő tulajdonságokat hordozó anyag, néhány vírus esetében ezt a szerepet azonban az RNS tölti be. Az általános törvényszerűség tehát az, hogy az öröklődő tulajdonságokat hordozó anyag mindig nukleinsav.

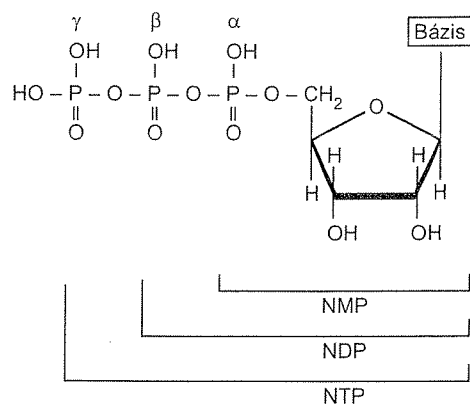
Az információtartalom a DNS-ben óriási. Egyetlen embrionális sejtben ugyan csak néhány pikogram DNS van, ez azonban mintegy 100 000 különböző fehérje információjáért felelős. Ezt a hatalmas „kódolókapacitást”, az információs bank működését, átfordítását az egyedre jellemző tulajdonságokká, azaz a fenotípus megnyilvánulását elsősorban a DNS kémia szerkezete határozza meg.

### 4.1. A nukleinsavak építőkövei

A DNS-t felépítő egységeket dezoxiribonukleotidoknak, az RNS-t felépítő egységeket pedig ribonukleotidoknak nevezzük. Minden nukleotid három részből áll:

- 1) N-tartalmú heterociklusos bázisból, amely purin- vagy pirimidinszármazék;
- 2) egy pentóz egységből, ami ribóz vagy dezoxiribóz;
- 3) foszforsavból.

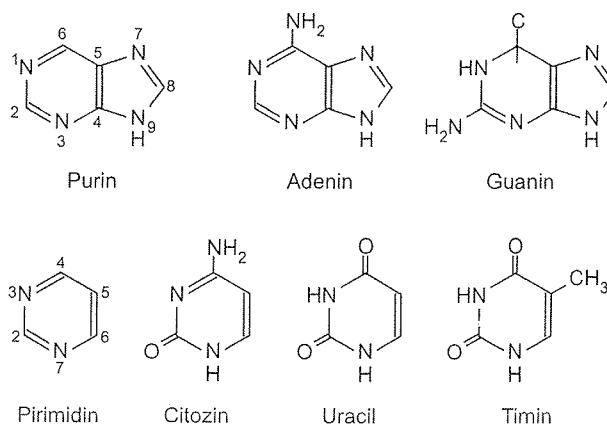
A nukleotidok általános képletét mutatja a 4-1. ábra.



4-1. ábra

A nukleotidok általános képlete

A DNS-ben négy dezoxiribonukleotid fordul elő, amelyek a heterociklusos bázisban különböznek egymástól, hasonlóan az RNS-t négy ribonukleotid egység építi fel. A purinbázisok mindkét nukleinsavban az adenin és a guanin, a pirimidinbázisok a DNS-ben, a citozin és a timin, az RNS-ben, a citozin és az uracil. A purin- és pirimidinbázisok képletét mutatja a 4-2. ábra. a purin- és pirimidinvázat a szokásos számozással.

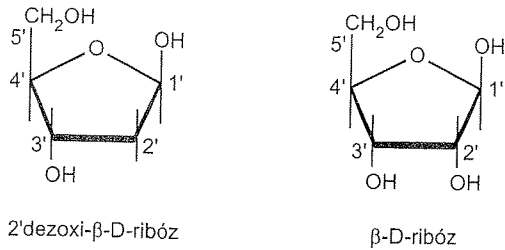


4-2. ábra

A purin- és pirimidin-gyűrű és a nukleo-bázisok

A két nukleinsav között a legfőbb különbség a cukor komponensben van, a DNS-ben 2'-dezoxi-D-ribóz, az RNS-ben D-ribóz fordul elő (4-3. ábra). A pentóz szénatomjainak a számozását a mellé írt vesszővel különböztetjük meg a bázis atomjainak számozásától.

A pentózok a heterociklusos bázisokhoz  $\beta$ -N-glikozidos kötéssel kapcsolódnak. A  $\beta$ -N-glikozidos kötés a cukor 1'-szénatomja és a puringyűrű 9-es N atomja, illetve a pirimidingyűrű 1-es N atomja között jön létre. A nukleinsavak nukleotidjaiban a foszfátcsoport a pentóz 5' szénatomjához kapcsolódik észterkötéssel. A szervezetben uralkodó pH-nál a foszfát észterek anion formában vannak jelen.

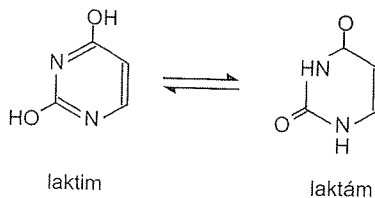


4-3. ábra  
A DNS és RNS cukor komponensei

### 4.1.1. A purin- és pirimidin bázisok

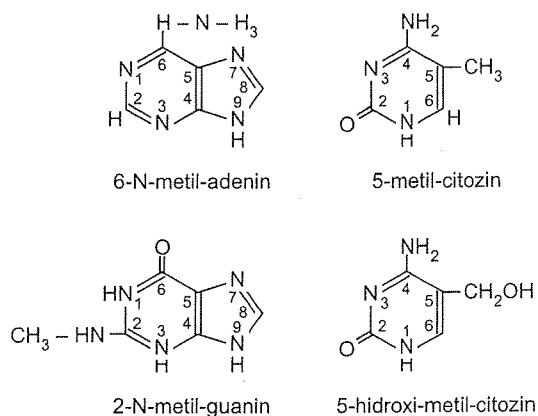
A purinváz egy pirimidin- és egy imidazolgyűrű kondenzációjával jön létre. Mindkét gyűrűnek kifejezett aromás jellege van, így a purin is aromás vegyület. A sejtekben a szabad nukleotid bázisok csak nyomokban fordulnak elő, az eukariota sejtek nem is tudják hasznosítani az extracelluláris szabad pirimidin bázisokat. A pirimidingyűrű planáris szerkezetű molekula, a puringyűrű is csak kissé tér el a planáris szerkezettől. A bázisoknak a planáris szerkezete, a hidrogénkötést kialakító képessége a biológiai funkció szempontjából rendkívül fontos. A nukleinsavakban előforduló pirimidinszármazékok az Uracil, Timin és a Citozin; a purinszármazékok az Adenin és a Guanin (4-2. ábra). A bázisok nevét általában nagybetűvel írják és a név első betűjével rövidítik. A DNS-ben a hidrogénkötések kialakításában a purin gyűrű 1-es N, és a pirimidingyűrű 3-as helyén lévő -NH-csoportok játszanak szerepet. A funkcionális csoportok közül pedig az Adenin, Guanin és Citozin aminocsoportjai és az erősen elektronegatív oxigénatomok vesznek részt a hidrogénkötésekben.

A pirimidin- és purinbázisok vízben nagyon rosszul oldódnak, enyhén bázikus molekulák. A környezet pH-jától függően két tautomér formában is előfordulhatnak. Neutrális pH-nál a bázisok laktám formája a stabilabb, külső hatásokra azonban a laktim forma is kialakulhat a nukleinsavban, ami a molekula információ tartalmát változtathatja meg, és a mutációk egyik oka lehet. A 4-4. ábrán látható az uracil tautomerizációja.



4-4. ábra  
Az uracil tautomer formái

A fent említett négy bázison kívül kis mennyiségben ún. minor vagy ritka bázisok is előfordulnak a nukleinsavakban. Ilyen ritka bázisok a 5-metil-citozin, 5-hidroxi-metil citozin, 6-N-metiladenin, 2-N-metil-guanin, pseudo-uridin stb. A ritka bázisok elsősorban a tRNS-ben fordulnak elő, azok bázistartalmának kb. 10%-át teszik ki. Eddig mintegy ötven különféle ritka bázist mutattak ki, a legegyszerűbb ritka bázisok láthatók a 4-5. ábrán. A ritka bázisok a nukleinsav másodlagos módosításával jönnek létre és fontos szerepük van egyes szakaszok információtartalmának megváltoztatásában.



4-5. ábra  
Ritka bázisok

A metilált bázisok a DNS-ben fordulnak elő, funkcionális jelek bizonyos fehérjék számára, amelyek a DNS-szintézis indításához vagy rekombinációjához szükségesek. A metilcsoportok a kész DNS-re kerülnek, az S-adenozil-metionin (SAM) és Dam-metiláz enzim (adenint metilál), illetve Dem-metiláz (citozin oldalláncot metilál) közvetítésével.

A bázisok jellegzetes fényelnyelést mutatnak 250-280 nm hullámhosszúságú tartományban. Ezt a tulajdonságot fel lehet használni a bázisok, nukleozidok és nukleotidok, sőt a nukleinsavak mennyiségi mérésére és a nukleinsavak szerkezetváltozásának követésére.

#### 4.1.2. A nukleozidok

A nukleozidok bázisokból és cukorból állnak, ennek alapján ribonukleozidokról és dezoxiribonukleozidokról beszélhetünk. A sejtek ezeket is alacsony koncentrációban tartalmazzák, és a nukleotidok hidrolízisének termékei. Az extracelluláris nukleozidokat a sejtek hasznosítják, nukleotidokká foszforilálják. Vízben jobban oldódnak, mint a megfelelő szabad bázisok, lúggal szemben a glikozidos kötés ellenálló. Savval szemben a purin nukleozidok érzékenyebbek, mint a pirimidin nukleozidok. A molekulában történő tájékozódás érdekében nem csak a bázisok atomjait számozzuk meg (4-2. ábra), hanem a ribóz atomjait is, amelyeket vesszővel különböztetünk meg a bázis atomjaitól (4-3. ábra). A nukleinsavakban előforduló nukleozidok neve: adenzin-dezoxiadenozin; guanozin-dezoxiguanozin; uridin – dezoxiuridin; citidin – dezoxicitidin; és timidin. Az utóbbi dezoxitimidint jelent, amely a DNS-ben fordul elő, kis mennyiségben a tRNS-ben ribo-timidin is előfordul. A nukleozidok nevét általában kisbetűvel írjuk, összefoglalva a 4-1. táblázatban láthatók.

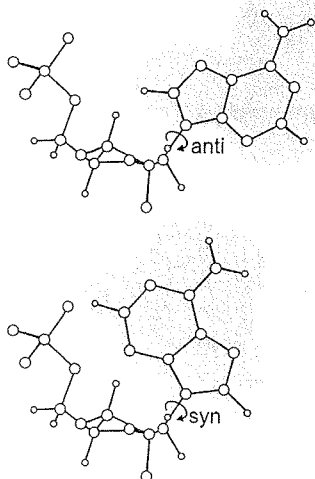
4-1. táblázat Bázisok, nukleozidok és nukleotidok

Bázis	Nukleozid	Nukleotid	RNS	DNS
			RNS	DNS
Adenin	Adenozin	Adenilsav	AMP	dAMP
Guanin	Guanozin	Guanilsav	GMP	dGMP
Citozin	Citidin	Citidilsav	CMP	dCMP
Timin	Timidin	Timidilsav		dTMP
Uracil	Uridin	Uridilsav	UMP	

### 4.1.3. A nukleotidok

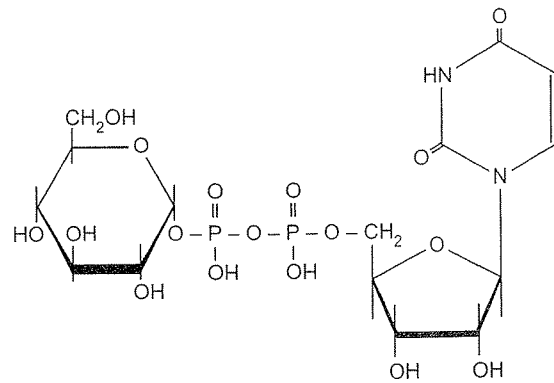
A nukleotidok a nukleozidok foszforsavval alkotott észterei, a nukleinsavak építőkövei, de szabad formában is jelentős mennyiségben megtalálhatók a sejtekben. A foszforsav észterkötéssel kapcsolódik a cukor komponens bármely  $-OH$  csoportjához, neutrális pH-nál a foszfát két negatív töltéssel rendelkezik. A molekulában két planáris gyűrű található, az egyik a ribofuranóz, a másik a bázis gyűrűje. A két gyűrű az egyik lehetséges konformációban a ribofuranóz-gyűrű 2'-hidrogén vagy hidroxil csoportja közel kerül a purin 3-as N atomjához, illetve a pirimidinek 2-es O atomjához. Ezt nevezik „*syn*” konformációnak, az ettől  $180^\circ C$ -al elfordított állapotot pedig „*anti*” konformációnak (4-6. ábra). Az utóbbi esetben a bázis és a cukor az N-glikozidos kötés ellentétes oldalán van, egymástól távol. Ez a konformációs lehetőség jelentősen befolyásolja a polinukleotid másodlagos szerkezetét. Ez azt is jelenti, hogy az N-glikozidos kötés mentén a két gyűrű viszonya megváltozhat nemcsak a nukleotidban, hanem a makromolekulában is, másszóval az N-glikozidos kötés mentén a két gyűrű elfordulhat.

A nukleotidok legfontosabb szerepe, hogy prekurzorai a DNS- és RNS-szintézisnek. A nukleinsav-szintézis során az NTP-k a molekula végén lévő pirofoszfát hidrolízise után



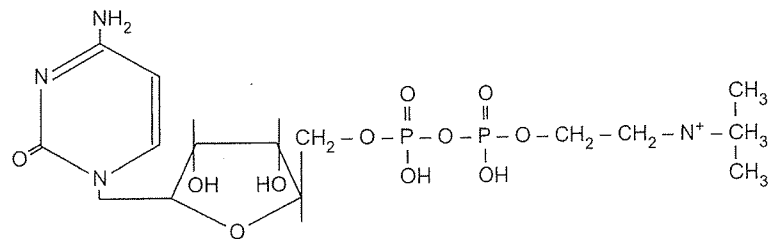
4-6. ábra

Az „*anti*” (leggyakoribb) és „*syn*” konformáció a nukleotidokban

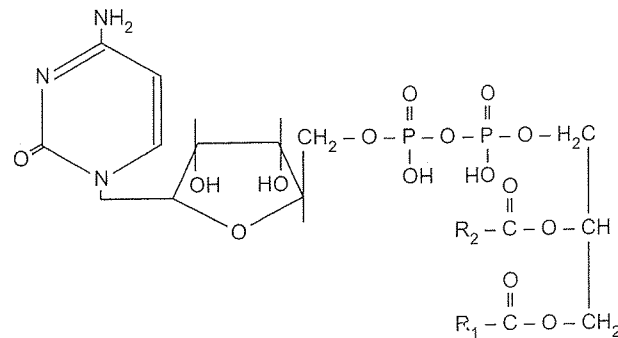


**4-7. ábra**  
UDP-glukóz (uridin-difoszfát-glukóz)

monofoszfát egységként polimerizálódnak makromolekulává. Valamennyi funkciójukban a nukleotidok  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfát-savanhidrid kötés kémiai energiája használódik fel új kovalens kötések kialakításához.



CDP-kolin (citidin-difoszfát-kolin)



CDP-DAG (citidin-difoszfát-diacyl-glicerol)

**4-8. ábra**  
CDP-DAG (citidin-difoszfát-diacyl-glicerol)

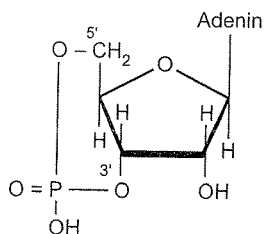
A nukleotidok a sejtekben kis részben monofoszfátok, nagyjából difoszfátok és trifoszfátok formájában fordulnak elő. Az általános képlet a 4-1. ábrán látható, rövidítésük pedig: NMP-dNMP; NDP-dNDP; NTP-dNTP. A pentóz gyűrű 5'-OH csoportjához, észterkötéssel kapcsolódó első foszfátot alfa, a savanhidrid kötéssel kapcsolódó másodikat béta, a harmadikat gamma-foszfátnak nevezzük. A nukleotid di- és trifoszfátok kétértékű kationokkal komplexeket képeznek, a sejtekben  $Mg^{2+}$  komplexek formájában fordulnak elő. A NTP-k és NDP-k koncentráció meghatározásának legegyszerűbb módja a nukleotidkeverék hidrolízise 1,0 N HCl jelenlétében 100°C-on, ilyen körülmények között csak a gamma és a béta foszfát hidrolizál a nukleotidról, amit foszfát-ion meghatározással mérhetünk.

A sejtben szabadon előforduló nukleotidok különböző funkcióval rendelkeznek. Az ATP a kémiai energia tárolásának és transzportjának fontos anyaga. A sejtlégzés során ADP-ből ATP keletkezik, és ebben a formában tárolódik a tápanyagok elégetése során keletkezett energia. A nukleotidoknak egy másik fontos szerepe, hogy egyes anyagcsere-folyamatokban „aktívnak”, magasabb energiájú formába juttatnak molekulákat. Az uridin-trifoszfát (UTP) a polisziaridok bioszintézisében tölt be ilyen szerepet, az UDP-glukóz (4-7. ábra) a szintézis kiindulási anyaga.

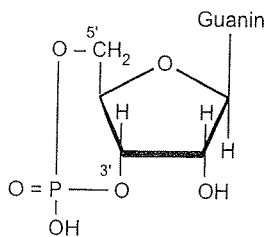
Hasonló szerepet tölt be a citidin-trifoszfát (CTP) a membránok foszfolipid bioszintézisében. Egyik ilyen intermedier a citidin-difoszfát-kolin (CDP-kolin) és a citidin-difoszfát-diacil-glicerol (CDP-DAG) (4-8. ábra).

A nukleotidok, így az ADP számos koenzimnek is alkotórésze (NAD, FAD), amelyekről külön fejezetben szólnunk.

Az anyagcsere-folyamatok szabályozásában is résztvesznek nukleotidszármazékok, amelyek rendkívül kis koncentrációban fordulnak elő a sejtekben. Számos hormon úgy fejt



cAMP (adenozin 3',5'-ciklikus foszfát)



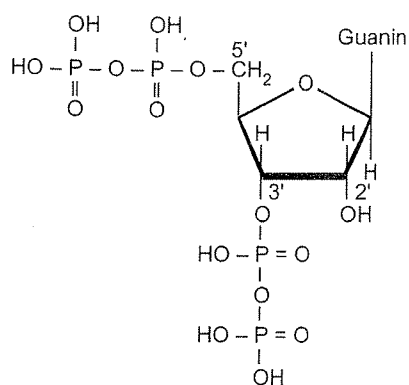
cGMP (guanozin 3',5'-ciklikus foszfát)

## 4-9. ábra

cGMP (guanozin 3',5'-ciklikus foszfát)

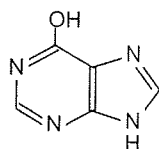


4. NUKLEOTIDOK – NUKLEINSAVAK

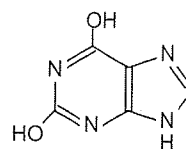


4-10. ábra

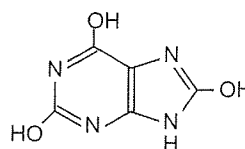
ppGpp (guanozin 5'-difoszfát 3'-difoszfát, guanozin tetrafoszfát)



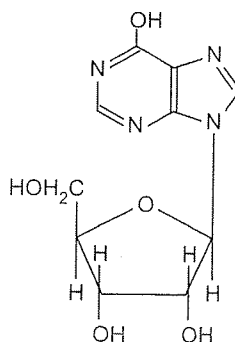
Hipoxantin  
(6-hidroxi-purin)



Xantin  
(2,6-dihidroxi-purin)



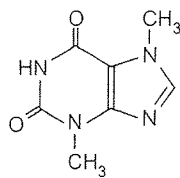
Húgysav  
(2,6,8-trihidroxi-purin)



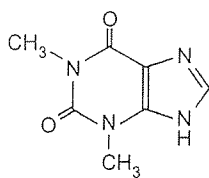
Inozin

4-11. ábra

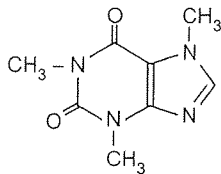
Nukleotid anyagcsere közti és végtermékei



Theobromin  
(3,7-dimetil-xantin)



Teofilin  
(1,3-dimetil-xantin)



Koffein  
(1,3,7-trimetil-xantin)

**4-12. ábra**  
A xantin metilszármazékai

i hatását, hogy kötődve a célsejthez, kiváltja a ciklikus-adenozin monofoszfát (cAMP) szintézisét ATP-ből. A cAMP további szabályozási folyamatsort indít el a sejtekben, fokozva egyes fehérjefoszfotiláló enzimek működését. Másik két a szabályozásban kitüntetett nukleotid a guanozin-3', 5'-ciklikus monofoszfát (cGMP) és a guanozin-tetrafoszfát (4-9., -10. ábra). Az előbbi számos extracelluláris hatást, az utóbbi a baktériumok géntranszkripcióját szabályozza.

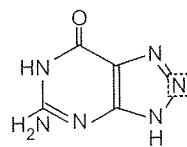
Anyagcsere folyamatokban is számos nukleotid fordul elő. A purin- és pirimidinnukleotidokat minden sejt képes maga előállítani a szénhidrát és aminosav anyagcsere köztitermékeiből, ezeket az anyagcsere folyamatokat „de novo” bioszintetikus útnak nevezzük. A urin bioszintézis egyik fontos köztiterméke az inozin (4-11. ábra), illetve az inozin-mofoszfát (IMP). A purinnukleotidok szintézisének és lebontásának köztitermékei a hipoxantin (6-hidroxi-purin), és a xantin (2,6,-dihidroxi-purin) valamint a húgysav (2,6,8-trihidroxi-purin) szintén purin származék (4-11. ábra).

Növényekből izolálható számos olyan anyag (alkaloid), amelyek élettani hatását annak köszönheti, hogy purinszármazék. A legismertebbek a kakaóból származó theobromin (3,7-dimetil-xantin), a tealevélből származó theofilin (1,3-dimetil-xantin) és a kávéban előforduló koffein (1,3,7 - trimetil-xantin) (4-12. ábra).

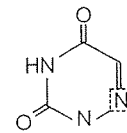
#### 4.1.4. Bázis- és nukleozidanalógok

A természetes bázisokkal, nukleozidokkal nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutató együletek tartoznak ebbe a csoportba. Jelentőségük, hogy a hasonlóság miatt az élő szervezetekben, a sejtekben helyettesíthetik a természetes nukleozidokat, ez a helyettesítés azonban nem tökéletes, emiatt gátolják a nukleotid anyagcserét vagy a polinukleotidok szintézi-

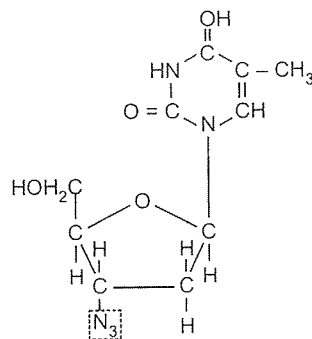
#### 4. NUKLEOTIDOK – NUKLEINSAVAK



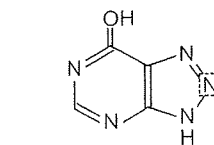
8-azaguanin



6-azauracil



3'-azido-2',3'-dideoxi-timidin  
(AZT)



Allapurinol  
(4-hidroxi-pirazo-pirimidin)

#### 4-13. ábra

#### Aza- és azidoszarmazékok

sét. Ezeket az anyagokat széles körben alkalmazzák az anyagcsere-folyamatok pontos megismerését célzó biokémiai kutatásokban, de ami ennél is fontosabb a humán kemoterápiában, azzal a céllal, hogy a daganatos sejtek nukleinsav-szintézisét, osztódását gátolják.

A nukleozid analógok a sejtekben általában nukleotid hiányt okoznak, mivel gátolják a bioszintézis valamely pontját, amely végül nukleinsav-szintézis és sejtosztódás-gátlásban realizálódik. A nukleoid anyagcserét gátló nukleozidanalógokat *antimetabolitoknak* is szokás nevezni. Vannak olyan analógok, amelyek beépülhetnek a nukleinsavakba is. Az analógot tartalmazó nukleinsav azonban kémiai szerkezetváltozások miatt nem tudja betölteni funkcióját (pl. a másoló rendszer működését zavarja), ilyen módon vezet a sejtosztódás gátlásához.

A vírusok (antivirális szerek) és az emlős sejtek szaporodását gátló gyógyszerek (citosztatikumok) legnagyobb része a nukleozidanalógok csoportjába sorolható, alapját képezik a daganatos és vírusos betegségek kemoterápiás kezelésének. Nagyon fontos követelmény a nukleozidanalógokkal szemben, hogy lehetőleg csak a daganatsejtre vagy a vírussal fertőzött sejtre hassanak. Mivel az alapvető biokémiai folyamatok csaknem azonosak az ép, daganatosan transzformált vagy a vírussal fertőzött sejtekben, ezt a feltételt a legnehezebb teljesíteni. Ez az oka annak, hogy ebbe a csoportba tartozó anyagok általában minden sejt osztódását gátolják, károsítva ezzel a szervezet számos fontos funkcióját, elsősorban a vörös- és fehérvérsejtek képződését a csontvelőben.

#### Az aza- és azidoszarmazékok

Ezekben a szarmazékokban a purin- vagy pirimidinyűrűben egy szénatom helyett, nitrogénatom található. Ilyen szarmazék a 8-aza-guanin vagy 8-aza-guanozin, amelyek be-

épülhetnek az RNS-be, így gátolják a fehérjeszintézist. A 6-aza-uracil és a 6-aza-uridin az UMP-szintézist gátolják (4-13. ábra). Gyakorlatilag minden természetes bázisnak előállították az aza-származékát. Az Allopurinol (4-hidroxi-pirazo-pirimidin) is ide sorolható, amely gátolja a purinanyagcsere végtermékének, a húgysavnak a felhalmozódását a közvényben (4-13. ábra).

Az utóbbi évek legveszélyesebb vírusfertőzésének, az immunrendszert károsító AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) betegségnek a leghatásosabb gyógyszere is azidoszármazék,  $N_3$ -at tartalmaz a dezoxiribózgyűrűben a 3'-OH csoport helyett (azido-timidin = AZT). A betegséget okozó HIV vírus (Human Immunodeficiency Virus) szaporodását gátolja, a vírus reverz transzkriptáz enzim gátlásával (4-13. ábra), miután a sejtben trifoszfátá alakult.

##### Tioszármazékok

A természetes nukleo-bázis OH-csoportja helyett -SH (szulfhidril, merkaptó) csoport van. Ilyen vegyület a 6-merkaptó-purin, amely a hipoxatin (6-hidroxi-purin) analógja. A sejtekben az AMP és GMP szintézisét gátolja, aminek következménye a nukleinsav szintézis gátlás (4-14. ábra). Az azatioprinből a sejtek 6-merkaptopurint készítenek, ezért alkalmazható citosztatikumként, illetve immunszuppresszív szerként a szervátültetésekénél.

##### Halogénszármazékok

A pirimidinek körében a leggyakoribbak. A halogén atom leggyakrabban a pirimidinyűrű 5-ös C-atomjához kapcsolódik, ahová a metilcsoport a timinben. Az 5-F-származékok a F-atom kis mérete miatt az uracil analógjai (4-14. ábra), míg a Cl-, Br- és I-származékok az atomok nagyobb térkitöltése miatt a -CH<sub>3</sub>-csoport, így a timin analógjai. A halogén-pirimidinek dezoxiribóz-származékai a DNS-szintézist gátolják. Beépülhetnek a DNS-be, ezzel mutációkat okozhatnak. Az 5-I-dezoxiuridin oldatát például szemcseppeként iaszználják vírusos kötőhártya-gyulladás kezelésére (4-14. ábra).

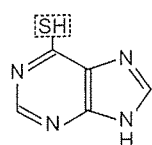
##### Cukorszármazékok

A ribóz- vagy dezoxiribózgyűrű helyett egy másik szénhidrát van, vagy a ribózgyűrűt nödosítják. Az akut leukémiák kezelésében alkalmazzák az arabinozil-citozin-t (ara-C). Ez nukleozid a sejtekben ara-CTP-vé alakul a megfelelő kináz enzimek segítségével, és ez a lCTP analógjaként gátolja a DNS-szintézisért felelős DNS-polimerázt (4-15. ábra).

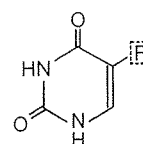
A di-dezoxi-származékokban a ribóz-gyűrűben nem csak 2'-es, hanem a 3'-as C-atomon is hiányzik az -OH csoport. Ezek a származékok beépülnek a DNS-be, de azután leállítják a lánc további építését, elongációját, így gátolva a DNS-szintézist. Minden nukleozid i-dezoxi-származékát előállították, melyeket a DNS-szekvencia meghatározásában használnak. A 2'-3'-didezoxicitidint (ddC) az AIDS kezelésében is bevezették (4-15. ábra).

Napjainkban a leghatásosabb vírus elleni gyógyszer is cukorszármazék, a ribóz helyett a bázishoz egy hidroxi-etoxi-metil csoport kapcsolódik. A 9-(2-hidroxi-etoxi-metil)-uanin (acyclovir, ACV, Zovirax, 4-15. ábra) a herpes-vírusok specifikus gátlószere, amely ezért jelentős, mert nem toxikus egyéb sejtekre. Szelektivitása annak köszönhető, hogy csak vírus tudja aktív metabolittá alakítani a nukleozid analógot, amely gátolja a vírus DNS szintézisét. A gazdasejt foszforiláló enzime nem aktiválja az analógot, így nem is lesz toxikus a gyógyszer a vírussal nem fertőzött sejtekben.

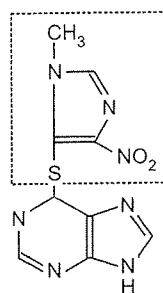
4. NUKLEOTIDOK - NUKLEINSAVAK



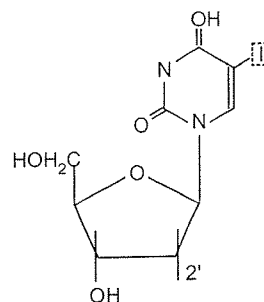
6-mercaptapurin



5-fluoruracil



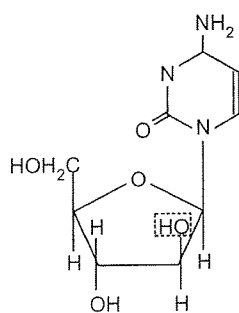
Azotioprin



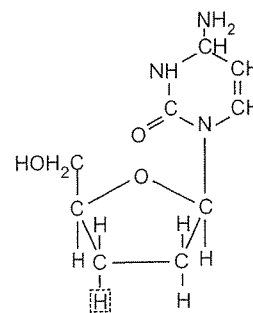
5-I-2'-deoxi-uridin

4-14. ábra

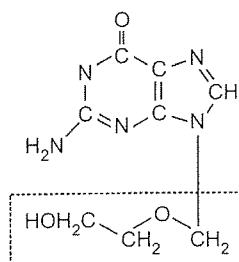
Tio- és halogénszármazékok



Arabinozil-citozin  
(Ara-C)



2',3'-dideoxycitidin  
(ddC)



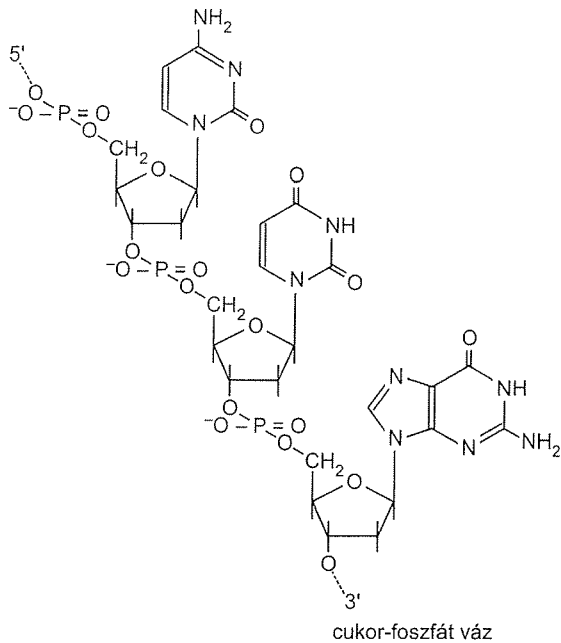
9-(2-hidroxi-etoximetil)-guanin  
(Acyclovir)

4-15. ábra

Cukorszármazékok

## 4.2. A polinukleotid lánc elsődleges és másodlagos szerkezete

A nukleinsavakat nukleotid monofoszfát egységek építik fel, polinukleotid láncot alkotva. A polinukleotid lánc gerincét ribóz-foszfát vagy dezoxiribóz-foszfát egységek ismétlődése képezi. A pentóz gyűrűnek az 5'-hidroxil csoportja foszfát-észter kötéssel kapcsolódik a szomszédos ribóz gyűrű 3'-hidroxil csoportjához. Így a foszfodiészter-ribóz gerincet a molekulában 5'-3' diészter kötések tartják össze. A nitrogént tartalmazó bázisok kilógnak a foszfodiészter-ribóz gerincből (4.16. ábra).

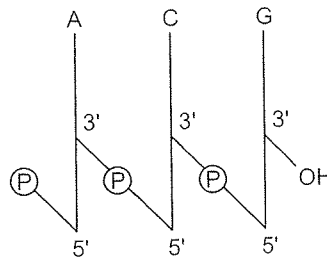


4-16. ábra

A polinukleotid lánc cukor-foszfát váza és a bázisok

A polinukleotid láncnak az utolsó nukleotidja a lánc egyik végén szabad 5' foszfát-csoporttal, a másik végén szabad 3'-hidroxil csoporttal végződik. A polinukleotid lánc bázisszekvenciáját 5'-> 3' irányban írjuk fel megállapodás szerint, azaz az 5' véget a bal oldalra, a 3' véget a jobb oldalra írjuk. A nukleinsav molekulának az elején szabad 5'-P, a végén pedig szabad 3'-OH csoport van, ezt nevezzük a molekula *polaritásának*. A polinukleotid lánc felépítésének az elve azonos a DNS és az RNS molekula esetében.

A rövidebb láncokat oligo-nukleotidoknak nevezzük, rövidítésük különféleképpen történhet. Egyik lehetőséget mutatja a 4-17. ábra.



4-17. ábra  
ACG trinukleotid

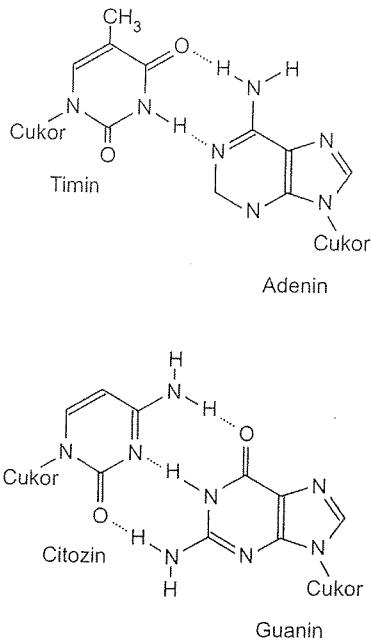
Az ábrán látható betűk (A, C, G) a bázisokat jelentik, a függőleges vonal ribózt vagy a dezoxiribózt, a P pedig a foszfodiészter kötést, a trinukleotid rövidítése pApCpG vagy ACG. A megállapodás szerint az ACG szimbólum azt jelenti, hogy a dezoxiadenozinnak szabad 5'-foszfát vége van, a dezoxiguanozinnak pedig 3'-OH vége.

Ha a DNS- vagy RNS-láncot építőelemeire bontjuk nukleozid-monofoszfátokat kapunk. A foszfodiészter kötések hasítása a lánc bármelyik végén elkezdődhet. A körülmények határozzák meg azt, hogy a keletkezett nukleotidok a foszfát-csoportot a ribóz 5' vagy a 3' végén tartalmazzák. Tehát a nukleinsavbontás végtermékei nukleozid-3'-monofoszfátok vagy nukleozid-5'-monofoszfátok lehetnek. A nukleozid-monofoszfátoknak nukleozid 5'-trifoszfáttá kell alakulni a sejtben, hogy a polinukleotid lánc, az RNS vagy DNS szintézisének clóanyagai, prekursorai legyenek. A nukleinsavakat szintetizáló enzimek, a DNS- vagy RNS-polimerázok csak nukleozid 5'-trifoszfátokat tudnak prekuzorként felhasználni a nukleinsav szintéziséhez. A polinukleotid lánc szintézise úgy történik, hogy egy nukleozid trifoszfátból pirofoszfát lehasadása után (ez szolgáltatja az energiát) a nukleozid-5'-monofoszfát egység kapcsolódik egy indító rövid oligo-nukleotid lánc 3'-OH végéhez. A nukleotid monofoszfát egységeket összekötő foszfodiészter kötések a nukleázok tudják elhasítani egy vízmolekula felhasználásával. A nukleázok vagy a lánc végén (exonukleázok) vagy közti diészterkötések hasítanak (endonukleázok). A bázishoz viszonyítva a hasítás lehet proximális (p-exonukleáz), amely 5'-P-végeket vagy disztális (d-exonukleáz), ami 3'-P-végeket eredményez. Például a kígyóméreg foszfo-diészteráz 5'-P-dNMP-t, míg a lép hasonló enzime 3'-P-dNMP-kre bontja a DNS-t. Az egyszerű nukleázok nem specifikusak a bázisokra, bármely láncvégi vagy láncközi kötést hasítanak a polinukleotid láncban. Léteznek azonban baktériumokban rövid nuklotidszekvenciára specifikus nukleázok, amelyeket **restrikciós endonukleázoknak** nevezünk, nélkülük a génmanipulációt, a DNS-rekombinációs technikát nem lehetett volna megvalósítani. Példákat az Orvosi biokémia könyvben találunk.

#### 4.2.1. A DNS kettős helix

Miután 1944-ben kiderült, hogy a DNS felelős a genetikai információ továbbításáért, szerkezetének kutatása nagy intenzitással megindult. James Watson és Francis Crick 1953-ban leírták, hogy a dezoxiribonukleinsav kettős hélix szerkezettel rendelkezik. A kettős hélix modellt a tisztított DNS röntgendiffrakciós vizsgálataira, valamint annak kémiai analizésére alapozták.

A röntgendiffrakciós felvételek azt mutatták, hogy a DNS natív állapota a dupla hélix.



**4-18. ábra**

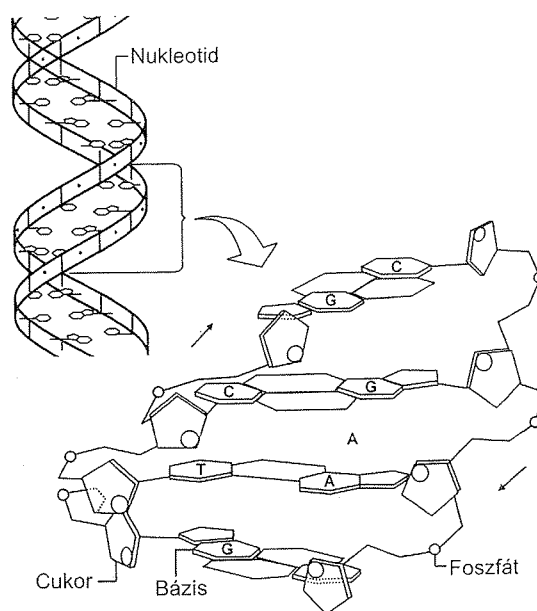
A komplementer bázispárok a H-kötésekkel

melyben két polinukleotid lánc van egymásra feltekerve. A hélix szerkezete szabályos, a ántekeredés egy teljes fordulata 3,4 nm távolságban van. Mivel az egyes nukktodok egy-nástól való távolsága 0,34 nm, egy fordulatra 10 nukleotidpár esik. A kettős hélix átmérője 2 nm.

A DNS-oldat sűrűségéből lehetett arra következtetni, hogy a natív hélix két polinukleotid láncot kell hogy tartalmazzon. A hélix átmérője is azt mutatta, hogy két bázispár helyezkedik el egymással szemben, úgy hogy pirimidinnel szemben mindig purin, illetve purinnal szemben mindig pirimidinbázis fér csak el az adott molekulaátmérő esetén. A kémiai analízisek azt is mutatták, hogy függetlenül az egyes bázisok mennyiségétől, G és C bázisok aránya mindig hasonló az A és T bázisok arányához. Az egyes DNS-ek bázisösszetételét a G+C bázisok arányával szokták jellemezni. A DNS-ek bázisösszetétele az élő szervezetek között jelentősen változik, a prokariotákban az A-T-előfordulás 25-75% között változik, emlősökben ez az érték kiegyensúlyozottabb, 45-53% között mozog.

A kettős hélix két polinukleotid láncának iránya ellentétes, *antiparallel*, azaz az egyik lánca 5'→3', a másik lánca 3'→5' irányban halad. A láncokat hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások tartják össze. Az ellentétes láncok illeszkedése nagyon pontos, az A-T bázispárokat két hidrogénkötés, a G-C bázispárokat pedig három hidrogénkötés tartja össze (4-18. ábra). A bázisok illeszkedését nevezzük a bázisok, illetve a DNS-láncok *komplementaritásának*. A DNS kettős hélix a komplementer szerkezetnek köszönhetően ugyanazt az információt tartalmazza.





4-19. ábra

A lapos bázispárok merőlegesen, a cukor-foszfát vázra

A specifikus bázispárok kialakulásában a bázis-tautomerizációnak nagyon nagy jelentősége van. Az elektron és protonvándorlás az -OH-csoport és a gyűrű N-atom között minden bázis számára két tautomer - a laktim (enol) és laktám (oxo) - formát tesz lehetővé (4-4. ábra). A kettős hélixben a bázisok laktám formában vannak (4-4. ábra).

A bázisok tárgyalásánál láttuk, hogy azok planáris szerkezetűek. Az egymás fölött elhelyezkedő planáris bázispárokat apoláros és hidrofób kölcsönhatások tartják össze, amelyek jelentősen hozzájárulnak a kettős hélix stabilitásához a hidrogénkötéseken kívül (4-19. ábra).

A bázisok hidrofób tulajdonsága, az aromás gyűrűk elektronszerkezete az egyik legfőbb motiváló erő a polinukleotid lánc helikális szerkezetének kialakításában. Már az egy-  
szálú polinukleotid lánc esetében is az egymás fölött elhelyezkedő lapos gyűrűk minden poláros molekulát, vizet kizárnak a környezetükből, viszont apoláros kölcsönhatásokkal kapcsolódnak egymáshoz (stacked), mintegy prizmái építve fel a hosszú láncból, felvéve a legstabilabb szerkezetet, a hélixet. Ebben a helikális szerkezetben a foszfátok negatív töltéséhez kationok, a sejtben  $Mg^{2+}$  ionok kapcsolódnak. Extrém körülmények között, melyek a hidrofób kölcsönhatásokat károsítják, a szabályos hélix szerkezet megszűnik, rendezetlen „random coil” állapot alakul ki. A DNS egyes rövid szakaszai a sejtben lehetnek egy-  
szálú formában, azonban a DNS tömege kettős hélix formájában van.

A DNS kettős hélix kialakulása során a molekula külső felszínén helyezkednek el a foszfát cukor egységek, amelyekről negatív töltése van a DNS-felületnek. A negatív töltés semlegesítését végezhetik fémionok, ez az oka annak, hogy a DNS NaCl-ban jobban oldódik, mint vízben. A sejtben a negativitás kompenzálására szolgálnak a bázikus aminosavakban gazdag fehérjék, a hisztonok, amelyek a DNS „csomagolásáért”, kondenzálásáért is felelősek.

A DNS-hélix felszínén, a két lánc tekeredése során, mivel a bázispárok glikozidos kötése nem pontosan egymással szemben helyezkednek el, kialakul egy kis árok és egy nagy árok. A kettős hélix tengelye mentén a bázispárok kb.  $36^\circ$ -kal fordulnak el a szomszédos bázispárhoz képest. Mivel egy teljes fordulat  $360^\circ$ -ot jelent, tíz bázispár fér el egy teljes fordulatban.

Két polinukleotid lánc elvben jobb vagy bal menetes hélixet is képezhet, azonban a természetben a jobb menetes hélix fordul elő a legnagyobb mennyiségben, amit Watson-Crick hélixnek, az utóbbi időben pedig béta-DNS vagy *B-DNS hélix* konformációnak nevezünk.

A DNS molekulát évtizedeken keresztül csak bázis szekvencia hordozó, rigid láncnak tartották, amelyben a dupla hélix szerkezet állandó, és mindig a B-DNS konformációban fordul elő. Kiderült, hogy a dupla szálú szerkezet flexibilis, a körülményektől függően időnként egyszálú szakaszok, vagy a B-DNS-től eltérő kettős hélix szerkezetek is előfordulhatnak.

Korábban láttuk, hogy a kettős hélix kialakulása során a szomszédos bázispároknak (bp) az N-glikozidos kötés forgási lehetőséget biztosít, az egymáshoz viszonyított helyzet ezzel változhat. Ez a forgás (kb.  $36^\circ$ ) biztosítja a spirál kialakulását, amelyben egy teljes fordulatra átlagosan 10 bp jut. Pontosabb mérések azt mutatták, hogy ez a szerkezet nem ilyen merev, és a B-DNS-ben az egy fordulatra eső bp-ok száma (n) 10,0-10,6 között változik.

A továbbiakban vizsgáljuk meg, mi az alapja a DNS-hélix konformáció változásainak, az építőelemek, a nukleotidok szintjén.

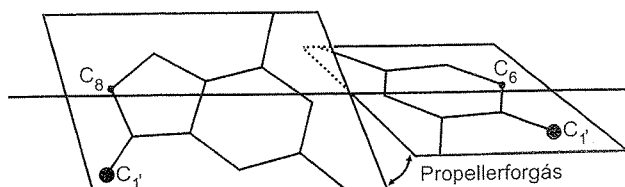
#### 4.2.2. A DNS szerkezet változások alapja

A DNS kettős hélix szerkezete, amit Watson és Crick írt le, az alábbi fő szerkezeti elemeken alapszik.

1. Két, ellentétes polaritású polinukleotid lánc egy közös tengely mentén jobb menetes kettős hélixet alkot.
2. A purin-és pirimidinbázisok a hélix belsejében, a cukor-foszfátok kívül helyezkednek el.
3. Az Adenin (A) Timinnel (T) alkot bázispárt, két hidrogénkötéssel. A Guanin (G) Citozinnal (C) három hidrogénkötéssel kapcsolódik bázispárrá az ellentétes láncon.
4. A kettős hélixet ezenkívül stabilizálják az egymás fölötti bázisok között fellépő hidrofób kölcsönhatások.

A Watson-Crick-modellt (mai neve  $\beta$ -DNS hélix) a DNS-szál röntgendiffrakciós felvételeiből alkották meg, amely a kettős hélix jellemző tulajdonságainak átlagos értékeit szolgáltatja. Későbbi technikák finomabb analízist tettek lehetővé, és kiderítették, hogy a kettős hélix szerkezeti paraméterei változnak a polimerben, attól függően, hogy milyen a bázisszekvencia egy-egy szakaszon.

Szintetikus DNS oligomérek analízise azt mutatta, hogy a láncon belül hatféle forgási lehetőség van, szemben a polipeptidlánc két forgási lehetőségével. A cukorgyűrű konformációs állapotai valamint a bázis helyzete a cukor gyűrűhöz képest azok a szerkezeti tulajdonságok, amelyek a polinukleotid másodlagos szerkezetét meghatározzák. A Watson-Crick kettős hélixben egy teljes fordulatra tíz bázispár esik, ez azt jelenti, hogy az egymás melletti



4-20. ábra

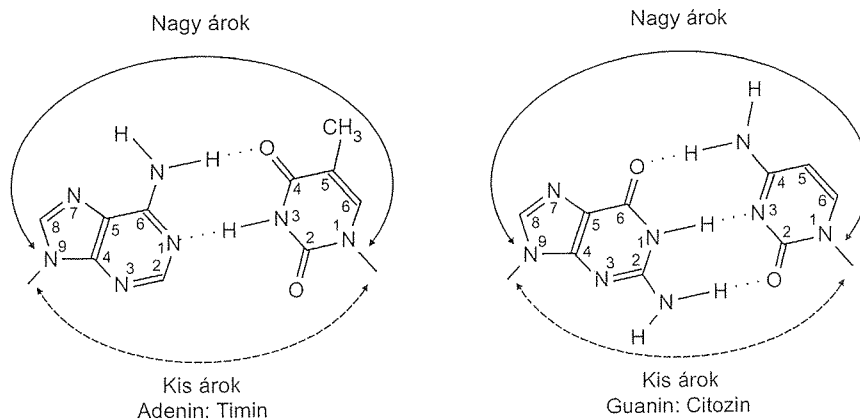
A bázispárok a DNS-ben nem teljesen koplanárisak

bázisok  $36^\circ$ -kal fordulnak a tengely mentén. Ez a forgásszög azonban  $28^\circ$ – $42^\circ$  között változhat, a helyi szekvenciáktól függően, ami természetesen meghatározza az egy fordulatra eső bázispárok számát.

A kettős hélix lokális bázis sorrendje határozza meg az ún. „propeller forgást” azaz a bázispár tagjainak ellentétes irányú elfordulását, ami a bázis-bázis kölcsönhatást fokozza egy láncon belül (4-20. ábra). A lokális változatosságnak egy másik fajtája az ún. „bázisgördülés”, ami a szomszédos bázisgyűrűk egymáshoz viszonyított helyzetét, billenését jelenti. Ezek a finom, lokális változások specifikus fehérjék hatására is létrejöhetnek.

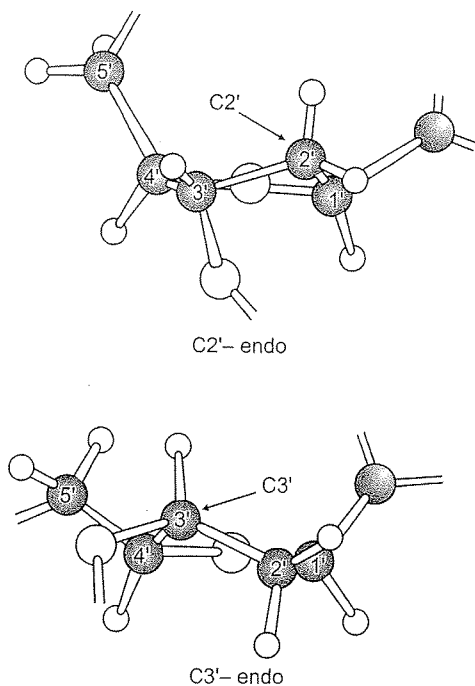
A  $\beta$ -DNS hélixben nem csak finom helyi szerkezetváltozások jöhetnek létre, amelyek a bázissorrendtől függenek, hanem a kettős hélix feltekeredhet, „super tekercs”-et hozva létre, anélkül, hogy a helyi szerkezet megváltozna, ezen kívül nagyobb ívek alakulhatnak ki. A molekulának ez a flexibilitása teszi lehetővé, hogy köralakot is felvegyen és hogy fehérjék köré feltekerve kompakt, kis térigényű formában (nukleosómák) tárolható legyen a sejtekben. Bizonyos szekvenciáknál (pl. AAAA) vagy fehérjék hatására a kompakt szerkezetből „kilógó” hurkok, „göndörödések” jöhetnek létre a DNS-ben.

A  $\beta$ -DNS kettős hélix felszínén a fehérjék számára két eltérő felismerőhely adódik, a „nagy árok” és a „kis árok”. A nagy árok 1,2 nm, a kis árok 0,6 nm széles. A kis árokban helyezkednek el a pirimidinek 2-es helyzetű O-atomjai (O-2) és a purinok N-3 atomjai, amelyek H-akceptorok lehetnek, a guanin C-2 aminos csoportja pedig H-donor lehet fehérjékkel kialakított H-kötésekben. A nagy árokban még több H-akceptor atom helyezkedik el, így az



4-21. ábra

A DNS felszín H-akceptor és H-donor csoportjai



4-22. ábra

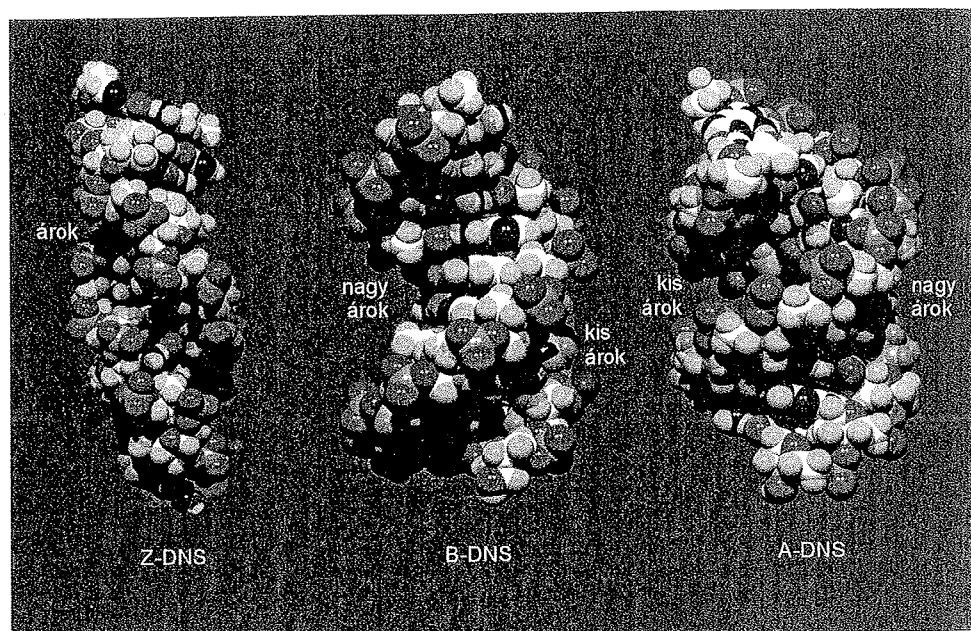
A furanóz gyűrű C2'-endo (B-DNS-ben) és C3'-endo (A-DNS-ben) konformációja

N-7 a purinokban, az O-4 a timinben és az O-6 a guaninban, H-donorok pedig az aminoscsoportok a C-6-on az adeninban és a C-4-en a citozinban. A jobb hozzáférhetőség és a H-kötés kialakítás jobb lehetősége miatt a nagy árok a fontosabb felszín a fehérjekötés szempontjából (4-19, 20, 21. ábra).

A nukleinsavakban további finomszerkezet-változások jöhetnek létre, amelyeket a cukor konformációja határoz meg. A ribo-furanóz gyűrűben három szénatom egy síkban van, a negyedik kiemelkedik ebből a síkból, amit borítékkonformációnak neveznek. A C2'-endo konformáció esetén a C2' atom, a C3'-endo konformációnál pedig a C3' atom emelkedik ki a gyűrű síkjából (4-22. ábra).

A B-DNS-ben C2'-endo pentóz egységek vannak, azaz a ribóz C2'-atomja a gyűrű síkja fölé emelkedik. Ha a D-ribóz C3'-endo konformációt vesz fel, a kettős hélix szerkezete megváltozik, a bázispárok a hélix tengelyére többé nem merőlegesek, 19°-kal eltérnek ettől a helyzettől. Ennek következménye, hogy a kettős hélix szélesebb, zömökebb lesz, a kis-árok csaknem eltűnik, ezt a DNS konformációt A-DNS-nek vagy A-hélixnek nevezzük, ami vízelvonással is létrejöhet a B-DNS-ből.

Az A-típusú jobb menetes dupla hélix nem csak a dupla szálú DNS-ben (dsDNS) jöhet létre. Dupla szálú RNS-szakaszok („hajttű” szerkezetnél), DNS-DNS hibrid molekulák leggyakrabban szintén A-típusú dupla hélix konformációban fordulnak elő. A ribóz 2'-OH csoportja nem engedi meg a B-DNS hélix kialakulását, csak az A szerkezetet teszi lehetővé. Néhány hélix típus jellemző paramétereit mutatja a 2. táblázat.



4-23. ábra

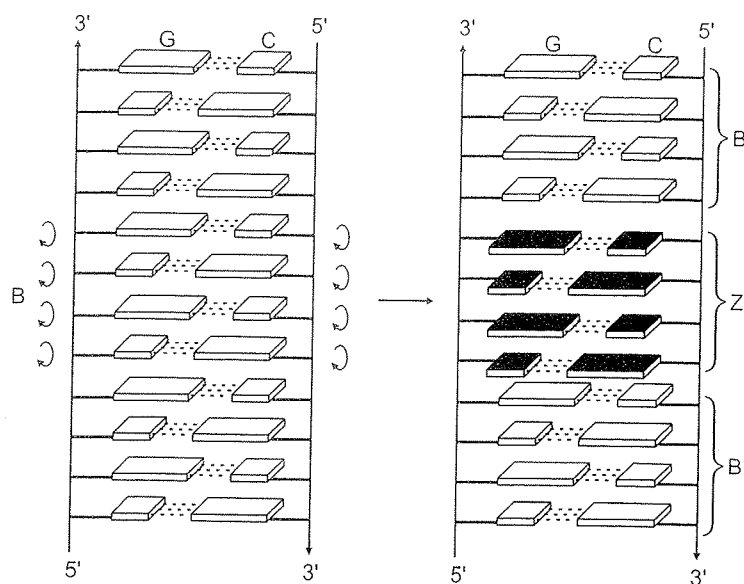
A különféle nukleinsav dupla hélixek

2. táblázat: A dsDNS hélix különböző formái

Hélix típus	bp./fordulat	Forgás/bp.	Hélix átmérő
A	11	+32,70°	2,3 nm
B	10	+36,00°	1,9 nm
C	9,33	+38,60°	1,9 nm
D	12	-30,0°	1,8 nm

A Watson-Crick dupla hélixnél nagyon eltérő szerkezetet vesz fel az a szintetikus hexanukleotid, amely CGCGCG bázisokból áll. Ellentétben az A és B hélixszel, ez a hélix bal menetes, a foszfátdiészter lánc cikk-cakk lefutású, innen kapta a Z-DNS nevet is. Az ismétlődő egységek ebben a formában inkább a dinukleotidok. A Z-DNS-ben csak egy mély árok van, a másik árok sekély. Az A, B és Z DNS-ek térkitöltő modelljét a 4-23. ábra mutatja.

A Z-DNS-konformációt a glikozidos kötés körüli szabad rotáció teszi lehetővé. A nukleotidoknál láttuk, hogy „syn” és „anti” konformációt tesz lehetővé a glikozidos kötés körüli forgás. A pirimidinnukleotidok leggyakrabban anti-konformációt vesznek fel, azaz a bázis és a cukor gyűrűje egymástól távol, a kötés két oldalán van. A purinnukleotidok anti- és syn-konformációban is lehetnek (4-6. ábra). Az A- és B-DNS-ben minden glikozidos kötés anti konformációban van. A Z-DNS-ben minden pirimidin anti- és minden purin syn-konformációban van. Purin-pirimidin ismétlődő szekvenciáknál a B-DNS időlegesen



4-24. ábra

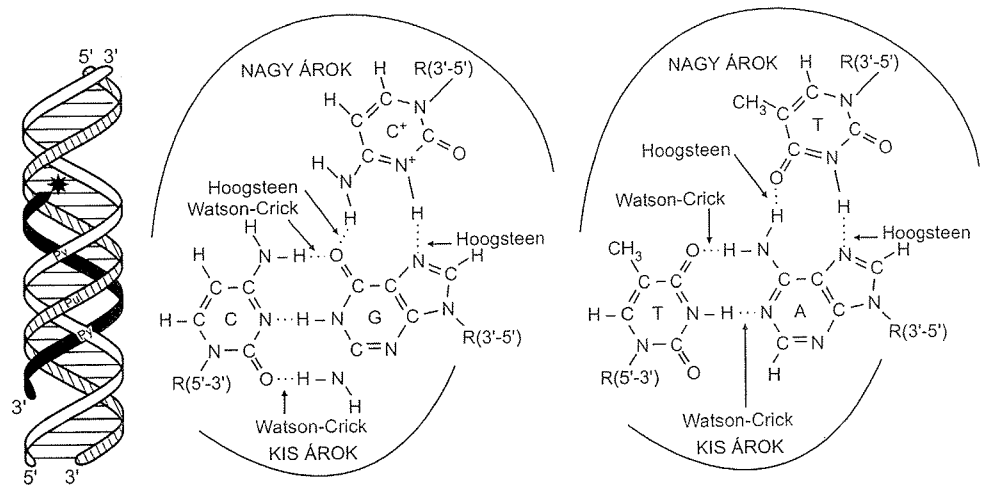
A B-DNS átalakulhat Z-DNS-sé a bázispárok átfordulásával

balmenetes Z-DNS konformációt vehet fel, amely termodinamikailag kevésbé stabil, mint a jobb menetes B-DNS. Az átalakulás lehetőségét mutatja 4-24. ábra, a jelölt szakaszon a bázispárok  $180^\circ$ -ot elfordulnak.

A Z-konformáció kialakulását segíti a citozinok C-5-ös helyen történő metilálása, ami az eukarióta DNS-ben gyakran előfordul, ha a DNS nem íródik át. Hasonlóan kedvez a Z-DNS kialakulásának a negatív „super-coil” konformáció a cirkuláris DNS-ben (lásd később). Az eukarióta kromozómákban gyakran fordulnak elő ismétlődő purin-pirimidin szekvenciák, amelyek hordozzák a Z-konformáció lehetőségét. Specifikus ellenanyagokkal Z-DNS-re jellemző szakaszok láthatók is az eukarióta genomban, pontos funkciójuk nem ismert. A legújabb kutatások alapján a DNS kettős hélix „nyújtott” formában is létezik, 2-4 bp esik egy fordulatra (p-DNS).

### 4.2.3. DNS triplahelix kialakulása oligonukleotidok kötődésével

A Watson-Crick-bázispárok stabil hidrogénkötések kialakulásával jönnek létre az elektronpárdonor és elektronpár akceptor csoportok között. A timin bázisban az elektronpár donor a 2-es és 4-es helyzetű oxocsoport, amelyek közül azonban csak a 4-es oxo képez H-kötést az A-T bázispárban, az adenin 6-os  $\text{NH}_2$ -csoportjával (4.18. ábra), a 2-es oxo-csoport nem. A timinbázisban az elektronpár-akceptor csoport a pirimidingyűrű 3-as -NH-csoportja, amely részt vesz az A-T bázispár kialakításában. Ha mind a négy bázis esetében megvizsgáljuk, hogy hány H-kötés kialakítására lenne lehetőség, akkor azt találjuk, hogy többre, mint amennyi valójában a Watson-Crick bázispárokban létre jön. Hoogsteen az ötvenes években valamennyi lehetséges H-kötés kialakulást megfigyelte in vitro körülmények között. A DNS dupla hélix kialakulását azonban jól lehetett magyarázni az  $\text{A}=\text{T}$  és  $\text{G}\equiv$



4-25. ábra

A DNS tripla hélix- oligonukleotid kötődése a dsDNS-hez

C bázispárok, amelyek nem merítik ki a lehetséges H-kötéseket. Az utóbbi évek kutatásai kiderítették, hogy előfordulhat tripla DNS-hélix egyes rövid DNS szakaszokon, ott ahol homológ, azonos nukleotidszekvenciák fordulnak elő. Egy tripla DNS-hélix szakaszt mutat a 4-25. ábra, ahol a homopurin-homopirimidin dupla DNS-hélixhez stabilan tud kötődni egy homopirimidin (csak pirimidin bázisokból álló) oligonukleotid szakasz, amely a hélix nagy-árokban fekszik, *stabil tripla-hélixet* alkotva. A stabil szerkezetet a Hoogsteen-féle H-kötések biztosítják, amelyek a dupla DNS-hélixben lévő bázisok szabad elektronpár-donor és elektronpár-akceptor csoportjai között, valamint a homopirimidin oligonukleotid megfelelő csoportjai között jönnek létre (4-25. ábra). A DNS-ben megkülönböztetünk ennek alapján Watson-Crick H-kötéseket és Hoogsteen H-kötéseket (4-25. ábra). Azokon a DNS-szakaszokon, amelyek nem kötődik egy harmadik oligonukleotid szál, a szabad elektronpár-donor és elektronpár-akceptor csoportok specifikus fehérjékkel képezhetnek H-kötéseket, mint azt korábban említettük.

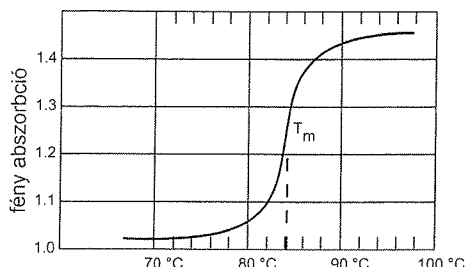
Azokat az oligonukleotid szekvenciákat, amelyek stabilan képesek kötődni meghatározott nukleotidszekvenciákhoz, „*antisense nukleinsavnak*” nevezik. Ezek az antisense oligonukleotidok, mivel mind a DNS-sel, mind az RNS-sel stabil kötést hozhatnak létre, több helyen is befolyásolhatják az információáramlást a DNS-től a fehérjéig. Hibridizálhatnak a DNS-hez, szabályozva a transzkripció elindítását, de kötődhetnek az újonnan szintetizált pre-RNS-hez is, szabályozva az RNS érését, illetve transzportját a magból. A specifikus oligonukleotid szekvenciák in vitro előállításuk ma már technikailag megoldott probléma, a sejten belül betöltött szerepük pontos tisztázása új terápiás lehetőséget is kínálhat.

### 3. A DNS szerkezetváltozásai

#### 4.3.1. DNS denaturálás és renaturálás

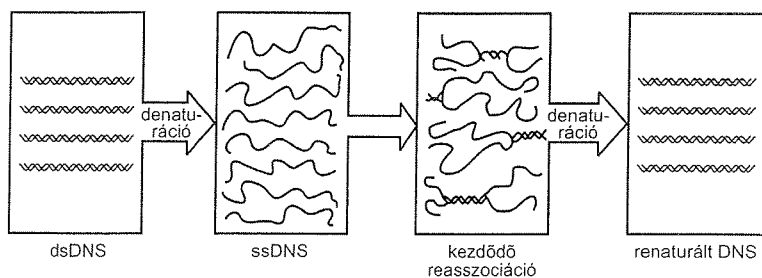
A DNS működése során gyakran jön létre szerkezetváltozás, így a DNS-replikáció során a DNS-szálak kitekerednek, és a másolás az egyszálú DNS-ről történik, anélkül, hogy a kovalens kötések szakadnának meg. Hasonlóan tekeredik ki a DNS oldatban is, melegítés, magas pH vagy magas sókoncentráció hatására, amikor a hőenergia, vagy a jelen levő ionok hidrogénkötéseket és az egyéb gyenge kölcsönhatásokat megszüntetnek. A két lánc teljes étketerését a DNS *denaturálásának*, *olvasásának* nevezzük. DNS-denaturálás egy szűk hőmérsékleti tartományban következik be, amit számos fizikai paraméter változása kísér. A leggyorsabban mérhető a DNS-oldat fényelnyelés-változása 260 nm-nél. A dsDNS fényelnyelése, ami a heterociklusos gyűrűktől származik, kb. 40 %-kal alacsonyabb, mint a szálú nukleotidok fényelnyelése. A jelenséget *hypochrom effektusnak* nevezzük, és a nukleotid bázis párok hidrofób kölcsönhatásából származik, ami a helikális szerkezetben jön létre. A hélix összeomlása a fényelnyelés növekedésével jár, amit *hiperchrom effektusnak* nevezünk. A szűk hőmérsékleti tartományt a középpontját (inflexiós pont), amelyen a DNS két szála széttekeredik, *olvasáspontnak* ( $T_m$  pont) nevezzük. A DNS-olvasáspont meghatározását mutatja a 4-26. és 4-27. ábra.

A  $T_m$  pont mérése többféle módszerrel is történhet. A  $T_m$  értéke több dologtól is függ, ezek közül első helyen a DNS GC bázispár tartalma áll, mivel ezt a két bázist három hidrogénkötés tartja össze, szemben az AT bázispárok két hidrogénkötésével, előbbi magasabb, utóbbi alacsonyabb  $T_m$  értéket eredményez. A DNS „olvasása” in vivo körülmények között is bekövetkezik, először az AT-gazdag szakaszokon, amit specifikus fehérjék segítenek.



4-26. ábra

A DNS denaturálása és a fényelnyelés növekedése



4-27. ábra

DNS-denaturálás és -renaturálás



nek. A dupla helix stabilitását befolyásolja a környezet, így a sókoncentráció és a pH is. A különféle eredetű DNS-ek olvadáspontja a 85–95°C között van, ha fiziológiai ionkoncentrációt biztosítunk.

A ssDNS (single strand vagy egyszálú DNS), amelyik a denaturáció során keletkezik, stabil, azonban bizonyos körülmények között a két komplementer szál újra összekapcsolódik, *renaturálódik* (4-27. ábra). Ez a tulajdonság az alapja egy nagyon fontos kísérleti technikának, a nukleinsav *hibridizálásnak*.

A lineáris dsDNS-molekulák, melyekről eddig beszéltünk, két szabad véggel rendelkeznek, ezek könnyen széttekerhetők, denaturálhatók. Mikroorganizmusokban, vírusokban, sőt emlőssejtekben azonban zárt, kör alakú DNS-molekulák vannak. Ilyen DNS-t tartalmaznak a mitochondriumok. A fiók DNS-ek vagy a *plazmidok*, melyek szintén dupla szálú, kör alakú DNS-molekulák, extránukleárisan helyezkednek el a sejtekben. Magasabb hőmérsékleten a két lánc között a H-kötések ebben a formában is elszakadnak, a két, kör alakú DNS-szál azonban nem tud teljesen kitekeredni, összekapcsolt egyszálú DNS-gyűrűk halmazát kapjuk a denaturáció után (*katenált DNS*), Abban az esetben, ha a natív, cirkuláris DNS-t behasítjuk mindkét láncon vagy csak az egyikben, a denaturáció során a két lánc teljesen széttekeredik. Ilyen hasítást készítenek a sejtben dezoxiribonukleáz enzimek (DNáz), amelyek egyetlen foszfodiészter kötést hasítanak el, gyűrű esetén újra zárják a molekulát.

### 4.3.2. A DNS-hibridizálás alapja a bázispároképzés

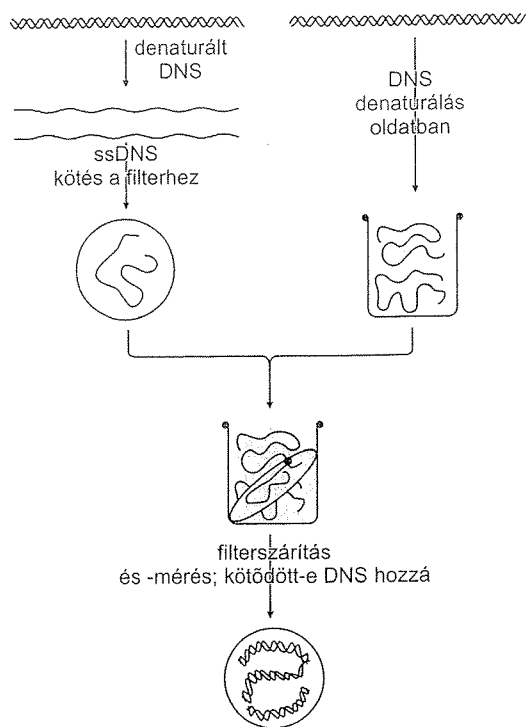
A DNS-denaturáció reverzibilis folyamat, renaturációnak nevezzük, amikor komplementer nukleinsavszálak (ssDNS) újra dupla hélixszé alakulnak (4-27. ábra). A renaturáció alapja, hogy a komplementer szálak között újra kialakuljanak a specifikus bázispárok. Ha a renaturáció különböző eredetű nukleinsavszálak vagy DNS és RNS között jön létre, *hibridizációról* beszélünk. A hibridizáció a szekvenciakomplementaritásnak nagyon pontos mérő módszere. A reakció lényege, hogy két egyszálú nukleinsav-preparátumot keverünk össze, és mérjük a keletkezett dupla szálú anyag mennyiségét.

A technikának rendkívül nagy a jelentősége az elméleti és alkalmazott orvostudományok és a molekuláris biológia területén. Ismert DNS- vagy RNS-minták (gének) segítségével kereshetjük meg a velük analóg komplementer szekvenciákat pl. a humán sejtekből izolált DNS-ben. A veleszületett, öröklődő betegségek születés előtti (prenatális) felismerésének, a genetikai kapcsolatok meghatározásának ma az egyetlen biztonságos módszere a nukleinsav-hibridizálás.

A DNS-hibridizálás kivitelezésére két lehetőség van:

1. oldatban való hibridizálás
2. szilárd hordozón, ún. filteren történő hibridizálás.

1. Az *oldathibridizálás*, mint az a nevéből is következik, úgy történik, hogy a két ssDNS-preparátumot oldatban keverjük össze. Kellő mennyiségű anyag esetében a hibridizálási reakciót a 260 nm fényelnyelés változásával is követhetjük. Ha kis mennyiségű anyagunk van (ez áll fenn gyakrabban), akkor a reakció követésének egyik lehetősége, hogy az egyik DNS-preparátum radioaktívan jelzett legyen. Ebben az esetben a dupla szálú DNS (dsDNS) mérésével határozhatjuk meg a hibridizáció mértékét. A dsDNS mennyiségének mérése vagy kromatográfias elválasztás útján történhet, vagy úgy, hogy az ssDNS-t, amelyik nem hibridizált duplaszálú DNS-sé, enzimatikusan lebontjuk, és csak a jelzett dsDNS-t mérjük. Az oldatban történő hibridizálás számos nehézséget is hordoz. Ebben az esetben a vizsgálandó dsDNS-t előbb denaturálni, azaz ssDNS-sé kell alakítani a hibridizálás előtt, ezután adjuk hozzá a vizsgálandó, jelzett ssDNS-t. Egy időben két reakció is lejátszódik. Az egyik reakció, hogy az



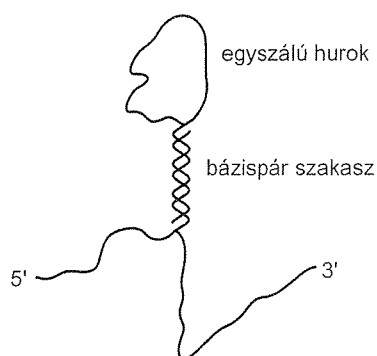
4-28. ábra  
Filter hibridizálás

eredeti komplementer, ssDNS-szálak renaturálódnak, a másik, hogy ezzel párhuzamosan történik a minta ssDNS hibridizációja is. A két reakció versengése miatt a hibridizáció mértékének mérése nehézkes.

2. A fenti nehézség kiküszöbölésére dolgozták ki a szilárd hordozón, szűrőn (filter) történő hibridizálást, amelyben az egyik DNS-preparátumot fixálják, hogy elkerüljék az oldatban bekövetkező renaturációt. A DNS fixálására a leggyakrabban a *nitrocellulózszűrőt* használják, amely nagyon jól köti a ssDNS-t, és nem köti a ssRNS-t. Ha a filterre egyszer ssDNS-t adszorbeálnak, különböző kezelések megakadályozzák a további egyszálú nukleinsavak kötődését. A 4-28. ábra mutatja a *DNS filter-hibridizálási módszert* amelyben a DNS-preparátumot először denaturálják, majd az ssDNS-t a filterhez kötik. Ezután adják hozzá a második denaturált DNS- (vagy RNS-) mintát, amelyek csak akkor kötődik a filterhez, ha komplementer az eredeti DNS-sel. Ha a másodszer adott DNS- vagy RNS-minta radioaktívan jelzett volt, a hibridizálás mértéke arányos a filterre kötött radioaktivitással. Ezt a módszert használják ma a leggyakrabban a biológiai és orvosi diagnosztikában.

#### 4.4. Az egyszálú nukleinsavak másodlagos szerkezete

Az élővilágban a DNS legnagyobb tömege a kettős hélix konformációban van jelen, míg az RNS leggyakrabban egyszálú formában fordul elő. Vírusokban és átmeneti állapotban a DNS is lehet egyszálú formában, az RNS pedig gyakran kétszálú molekulaként fejt ki funkcióját, tehát mindkét nukleinsav lehet mindkét formában. Mint azt korábban említettük, a dupla hélix stabilitását a komplementer szálak közt fennálló kétfajta kölcsönhatás biztosítja:



4-29. ábra

Egyszálú nukleinsav másodlagos szerkezete

1. Az A-T és a G-C bázispárok közti hidrogénkötések
2. Az egymás fölötti bázispárok közötti apoláros kölcsönhatások.

Az egy szálú polinukleotid láncok rövidebb szakaszokban létrehozhatnak a lentihez hasonló stabil, dupla szálú szerkezeteket.

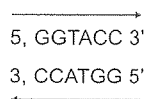
Az RNS elsődlegesen egyszálú nukleinsav, primer szerkezete hasonló elvek alapján épül fel, mint a DNS, azaz a polinukleotid lánc 5'→3' cukor-foszfát diészter kötésekkel van összekapcsolva, amelyben helyenként kialakuló bázispárosodások egyes szekvenciákat egy másik szekvenciához rögzíthetnek.

Azonos molekulában, ha egy adott bázisszekvenciát egy komplementer szekvencia követ, a lánc visszahajolhat, és egy antiparallel, kettős lánc alakulhat ki, amit „*hajtű-nek*” (hairpin) nevezünk. Ez a szerkezet egy dupla szálú helikális szakaszból, a törzsből, a melyet bázispárok tartanak össze, és egy egyszálú hurokból áll (4-29., 4-30. ábra).

Az egyszálú huroknak a nagysága változó lehet attól függően, hogy a komplementer bázisszekvenciák milyen távol vannak egymástól. A natív nukleinsavakban ezeknek a szerkezeteknek a vizsgálatára olyan nukleinsavbontó enzimeket (nukleáz) használnak, amelyek különbséget tesznek az egyszálú és dupla szálú nukleinsavak között. Ilyen szerkezetek előfordulhatnak a különféle RNS-fajtákban, és a DNS-ben is.

#### 4.4.1. A fordított ismétlések szerepe a másodlagos szerkezetben

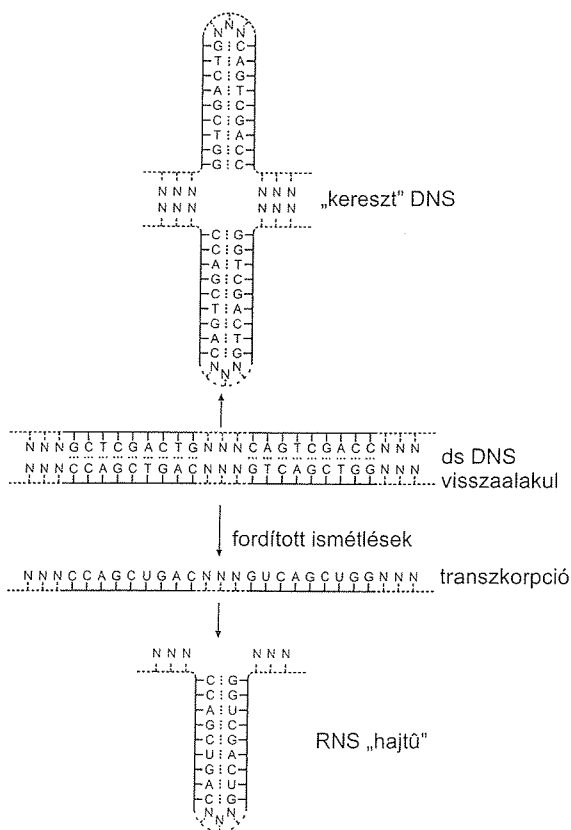
Az egyszálú nukleinsavakban, ha két egymással komplementer szekvencia fordul elő, ezek létrehozhatják a „hajtű” szerkezetet, mint ezt fent láttuk (4-29. ábra). Ha ilyen komplementer szekvenciák dsDNS-ben fordulnak elő és ezek a szekvenciák a két szálon ellentétes irányúak, „fordított ismétléseknek” nevezzük őket. Ezeket a „fordított ismétléseket”, ha a két szálon egyszerre fordulnak elő, „*palindroma*” szerkezetnek nevezzük. Ez tehát olyan nukleotidszekvencia, amely azonos irányból leolvasva a két szálon azonos bázissorrendet jelent. Palindroma szerkezet például a következő szekvencia:



amelyen, ha a leolvasás 5'→ 3' irányú bármely szálon, a szekvencia mindig GGTACC. A palindromaszekvenciákat úgy jellemezhetjük, mint olyan helyek a DNS-ben, amelyekre a „kettős szimmetria” szerkezet a jellemző. Ha egy vonalat húzunk a szimmetria-tengelybe, azt láthatjuk, hogy ugyanaz a szekvencia van jelen a tengely mindkét oldalán, ellentétes irányban. A DNS-t specifikus helyeken hasító enzimek az ún. *restrikciós endonukleázok* ilyen palindromaszekvenciákat ismernek fel és hasítanak. Ezek az enzimek tették lehetővé a DNS szekvencia meghatározást, a géntérképezést.

Az egyszálú és dupla szálú nukleinsavak másodlagos szerkezetének kialakításában a fordított ismétlések fontos szerepet játszanak. Egyszálú nukleinsavak esetében az ismétlések másolata komplementer, és a komplementer szekvenciák bázispárokat alkotva létrehozzák a hajtúszerkezetet (4-29. ábra).

Dupla szálú DNS esetében az egyik szálon elhelyezkedő komplementer szekvenciák csak akkor képeznek bázispárt, ha a két szál elválik egymástól. Az elvált szálaikon hajtúszerkezet alakulhat ki, az egymással szemben elhelyezkedő hajtúk „keresztformát” hoznak létre (4-30. ábra). Az ilyen „kereszt” formájú DNS szerkezetek létrejöttéhez energiabefektetés szükséges, hiszen a két nukleinsav-szálat el kell választani előbb. Kísérleti körülmények között gyakran megfigyelhető ilyen, „kereszt” formájú DNS képződés.



4-30. ábra

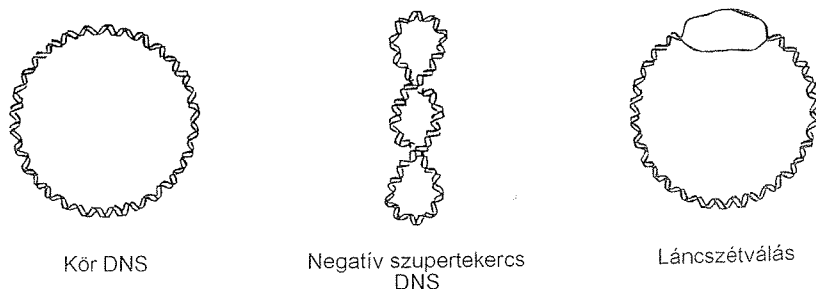
A „fordított ismétlések” a DNS-ben kereszt formát, az RNS-ben hajtút hoznak létre

#### 4.4.2. A zárt, cirkuláris DNS szerkezete

A DNS dupla hélix, amit eddig megismertünk, egy nyújtott, lineáris molekula. Az élő sejtekben a DNS nem rendelkezik szabad végekkel, a molekula zárt. Mikroorganizmusok, vírusok szabályos kör alakú DNS-t tartalmaznak. Magasabbrendűekben a DNS kromoszómákba szerveződik, amelyekben a DNS lineáris, de nincs szabad 5'-P és 3'-OH vége. Cirkuláris DNS-ek gyakran átmenetileg jelennek meg a replikáció, transzkripció során. *Szupertekercsnek* (Supercoilnak) nevezik azt a szerkezetet, ha a zárt, kettős gyűrű a térben saját tengelye körül feltekeredik. Könnyen szemléltethető ilyen szerkezet, ha két összetekert gumicsövet gyűrűvé zárunk, akkor másodlagos „szuper-csavarulatok” jönnek létre. Az ilyen szupertekercs szerkezet csak zárt, gyűrűs molekulában jön létre, mivel nyitott molekula spontán kitekередik. A szupertekercset a *DNS harmadlagos szerkezetének* is nevezik. A zárttság mindkét nukleotidlánra vonatkozik, ha csak az egyik láncon jön létre törés, a szupertekercs feszültsége oldódik, kitekередik. Azokat a molekulákat, melyekben nincs szupertekercs (akár zárt vagy nyitott), *relaxált* molekuláknak nevezzük. A szupertekercsnek két formája van. A *negatív szupertekercs* a dsDNS-t az óramutató járásával, azaz a jobb menetes hélixszel ellentétes irányba tekeri. Ez a tekeredés csökkenti a bázispárok egymáshoz viszonyított forgási szögét, lazítja, kitekeri a két láncot egymásból. A negatív szupertekercs DNS-t szokás alul-tekert, „lazán-tekert” DNS-nek is nevezni. Ha a szupertekercs miatt keletkezett feszültség elég nagy, ez a bázispárpézés megszűnéséhez, azaz a láncok szétválasztásához vezethet (4-31. ábra).

Abban az esetben, ha a szupertekercs a hélix tekeredésével megegyezik, „*pozitív szupertekercs*” szerkezetet kapunk. Az ilyen DNS-ben a fellépő másodlagos feszülések a kettős hélixet szorosabbá, túltekerítetté teszik. Ez a szerkezet *in vitro* előállítható, de a természetben nem fordul elő,

A szupertekercs szerkezet mennyiségi jellemzésére gyakran van szükség, mert ezek a szerkezeti változások a sejtben nem spontán alakulnak ki, a negatív szupertekercs energiabefektetést igényel, ami enzimek közvetítésével valósul meg. Tehát a szupertekercsek számának mérése a folyamat mérése szempontjából fontos. A negatív szupertekercs DNS mintegy energiát tárol, képes szerkezeti átalakulásokra külön energiabefektetés nélkül, amire a relaxált DNS nem képes. Az eddig vizsgált valamennyi genomban találtak negatív szupertekercs szerkezeteket. Ennek mértéke *in vivo* kb. 1 negatív fordulat 2 bázispáronként, ami 38 KJ/mol energiát jelent. A szupertekercs szerkezet kiterjedése egyensúly eredménye, amit a szupertekercset létrehozó és az azt feloldó enzimek biztosítanak. *Topológiai izome-*



4-31. ábra

Negatív szupertekercs DNS és oldódása

reknek nevezzük azokat a DNS-eket, amelyek csak a szupertekercs szerkezetben különböznek egymástól.

A szupertekercs szerepe a sejtben sokféle lehet. A legkézenfekvőbb a szerepe a DNS-kitekerésben, a szál szétválasztásban van, amit a 4-31. ábra is mutat. A DNS természetes negatív szupertekercsei azonban csak néhány bázispár szétválasztására elégségesek, mivel 10 bp szétválasztásához 50–200 KJ/mol energia szükséges. Rövid szakaszok széttekerése a DNS-replikáció megkezdésének a helyén, az ori-régióban fontos.

A széttekerés legextrémebb foka, ha a jobb menetes DNS teljesen széttekeredik, és bal-menetes dsDNS-sé alakul, azaz a B-DNS-ből Z-DNS lesz. Kísérletesen vizsgálták ezt a lehetőséget, és megállapították, hogy míg a folyamat elindításához 40 KJ/mol/bp szükséges, addig a GC bázispárban gazdag szakaszokon a Z-konformáció kiterjesztéséhez már csak 2,3 KJ/mol/bp energia kell, amit már biztosítani tud a negatív szupertekercs szerkezet.

#### 4.4.3. A zárt dsDNS helyi szerkezetváltozásai

A DNS helyi, kis szakaszokra vonatkozó szerkezetváltozásai rendkívül fontosak, a DNS minden funkcionális aktivitását meg kell hogy előzzék. A DNS duplázódása (replikáció), az átírása RNS-sé (transzkripció), egyes szakaszok átrendeződése (rekombináció), a magasabb rendű szerkezeti formák kialakulása, mind a kettős hélix megszűnését, a láncok széttekeredését igénylik. Mivel azonban a láncok nem egyszerűen egymás mellett fekszenek, hanem egymásba vannak tekerve, szétválasztásukhoz egymás körül el kell hogy forogjanak, ki kell tekeredjenek. A szabad végekkel nem rendelkező zárt DNS kitekerése úgy történhet, hogy míg az egyik szakaszon szétválnak a szálak, addig a távolabbi szakaszon pozitív szupertekercsek, sűrűbb menetek jönnek létre. A replikációs villa tovahaladása például a két lánc szoros, szupertekercselését hozná létre a lánc távolabbi végén. A széttekerés egyszerűen megoldható, ha az egyik lánc folyamatossága megszakad, letekeredik az intakt láncról, majd újra összekapcsolódik a két szabad vég. Ez a lánchasítás, -kapcsolás ismétlődhet a szükségletnek megfelelően. Az előző fejezetben említettük, hogy topológiai izomereknek nevezzük azokat a zárt dsDNS-szakaszokat, amelyek csak a feltekeredés mértékében, a harmadlagos szerkezetben különböznek egymástól. Azokat az enzimeket pedig, amelyek képesek ilyen izomereket létrehozni, *DNS-topoizomerázoknak* nevezik. A topoizomerázok egymásba át tudnak alakítani különböző DNS-topoizomereket. Vannak, amelyek negatív szupertekercs szerkezetet relaxálnak úgy, hogy egy DNS-szálat hasítanak átmenetileg (I. típusú topoizomerázok), vagy mindkét DNS-szálat hasítják (II. típusú topoizomerázok). A DNS giráz enzim egy olyan II. típusú bakteriális topoizomeráz, amelyik a relaxált, zárt, cirkuláris DNS-ben száz negatív szupertekercset tud kialakítani percenként, amihez a szükséges energia ATP hidrolíziséből származik. A DNS-giráz enzim a DNS-replikációhoz is szükséges.

### 4.5. A DNS-molekula hossza, információtartalma, másolása

A legegyszerűbb sejtekben is több ezer fehérje biztosítja az életfolyamatok összehangolt működését, ezek a fehérjék a DNS-ben vannak kódolva, ami feltételezi, hogy a DNS a leghosszabb molekula a sejtekben. Az *E. coli*-ban egyetlen cirkuláris dsDNS-molekula van, amely négy millió bázispárból (bp) áll, molekulatömege  $2,6 \times 10^6$  kilodalton. Az izolált DNS  $1,4 \times 10^6$  nm (1,4 mm) hosszú, átmérője azonban csak 2,0 nm. Izoláltak 2,1 cm hosszúságú  $6,2 \times 10^9$  bp-t tartalmazó DNS-molekulát is, rovar nyálmirigy kromoszómából. A molekula hossza makroszkopikus, átmérője azonban atomi méretű, tehát nagyon aszimmetrikus molekulával állunk szemben. Tulajdonságai, így a viszkozitás, sérülékenység összefüggnek ezzel az aszimmetrikus szerkezettel, amelyek megkülönböztetik a fehérjék hasonló tulajdonságaitól. A globuláris felületű 5-10 nm átmérővel rendelkeznek általában, de a kollagén, amelyik a leghosszabb fehérje, csak 300 nm hosszú. A legegyszerűbb szervezetek, a vírusok DNS-e is több ezer bázispárból áll, elektronmikroszkóp alatt hosszú fonál alakú, aszimmetrikus molekulaként látható. Az *E. coli* DNS ezerszer hosszabb, mint a sejt átmérője, tehát natív állapotban a dsDNS kompakt szupertekercsként összecsomagolva fér csak el a sejtben.

Az elektronmikroszkópos felvételek számos sejt, vírus esetében kör alakú, cirkuláris DNS-t mutattak, máskor pedig lineáris dsDNS-t találtak mint például a lambda fág esetében. Vírusoknál a nyugalmi állapotban a DNS általában lineáris, a replikáció során a gazdasejtben azonban cirkuláris molekulává záródik.

Az eukariota sejtek DNS-e három milliárd bázispárból épül fel. A tájékozódás megkönnyítésére megabázis (Mb) és kilobázis (Kb) egységekről szokás beszélni,

$$1 \text{ Mb} = 10^3 \text{ Kb} = 10^6 \text{ bázis (vagy bázispár)}$$

A hatalmas mennyiségű DNS az egyszerű eukariotákban (*Saccharomyces cerevisiae*; pékélesztő) és a legnagyobb sejtekben is kromoszómákba rendezve, csomagolva helyezkedik el. Az élesztőben 16 kromoszóma van, amelyek DNS-e 0,2-2,2 Mb közötti bázissal rendelkeznek. Magasabbrendűekből 76 Mb nagyságú DNS-molekulát is izoláltak egyetlen kromoszómából. A kromoszómákban a DNS egyetlen, el nem ágazó, lineáris polinukleotid lánc, amely egy-két nagyságrenddel hosszabb, mint az *E. coli* kromoszóma.

A DNS reverzibilisen denaturálható és renaturálható, mint ezt korábban láttuk. Az egyszálú DNS reaszociációs, renaturációs sebessége nagyon különböző, attól függően, honnan származik a DNS. A leggyorsabban az eukariotákból izolálható, ún. szatellita DNS reaszociál, amely a kromoszómák centromér részéből származik. Ez azt jelenti, hogy ebben a DNS-ben sokkal több azonos nukleotid szekvencia fordul elő, mint például az *E. coli* vagy a vírus-DNS-ben. A gyakran ismétlődő nukleotid-szakaszokat *repetitív szekvenciáknak* nevezzük, és ezek az eukariota genomban fordulnak elő nagy mennyiségben.

Az ismétlődések gyakorisága alapján az eukariota nukleotid szekvenciák három csoportba sorolhatók.

1. Nagyon gyakran (milliószor) ismétlődő, rövid, 300 bp hosszú szakaszok fordulnak elő. Ide sorolható a szatellita DNS, az Alu-szekvenciák (elnevezés a felismerő enzim alapján történt), amelyek minden emlős-DNS 10 %-át teszik ki.
2. Közepesen gyakran ismétlődő nukleotid szekvenciák a genom 20-30 %-át képviselik. Ilyen szekvenciákban vannak kódolva például a riboszóma RNS gének, a hiszton gének. Ezek 10-1000-szer ismétlődnek egy-egy genomban, speciestől függően.

3. A DNS legnagyobb tömegét (60-70 %) az ismétlés nélküli, egyedi nukleotid-szekvenciák képviselik. Ilyen gének például az ovalbumin gén, amely a tojásfehérje termeléséért felelős a madarak tojócsővében. Ide sorolhatók a hemoglobin alegységek génjei, amelyek néhányszor ismétlődnek retikulociták genomjában, és számos más fehérjét kódoló gének.

A genetikai anyagra a dinamikus alkalmazkodóképesség jellemző. így egyszer előforduló gének esetében, ha gátoljuk a gén termékét, az enzimet, a sejt képes az érintett gént megsokszorozni, a jelenséget *gén amplifikációnak* nevezik, és számos, egyszeres gén esetében kimutatták különleges körülmények között.

Az eukariota-DNS mintegy ezerszer több a bakteriális DNS-nél, mégis az aktív gének száma csak kb. ötvénszer több az eukariotákban, mint a mikroorganizmusokban. Az izolált géneknek is csak egy kis része felelős a fehérjekódért. Mai tudásunk szerint az emlős DNS-nek csak 2 %-a „működik”, íródik át fehérjékké. Az emberi genom közel hárommilliárd olyan bázispárt tartalmaz, amely nem fejeződik ki az élet során, a nagymennyiségű „felesleges” információ, feltehetően az evolúció során halmozódott fel.

## 4.6. Az RNS

Az előző fejezetekben láttuk, hogy a polinukleotid láncok, a DNS és az RNS alapvető szerkezeti elemei, a nukleotidok kapcsolódása nagyon hasonló, gyakorlatilag azonos elvek szerint történik mindkét makromolekulában. Ebben a fejezetben az építőelemekben található kémiai különbségekre térünk ki, elsősorban a DNS-től eltérő jellemző tulajdonságaira. Külön tárgyaljuk az RNS biológiai szerepét és az azt meghatározó szerkezeti különbségeket.

### Az RNS felépítése

A ribonukleinsav (RNS) purin és pirimidin ribonukleotid monofoszfát (NMP) egységekből épül fel, amelyeket 3'-5'-foszfodiészterkötések kapcsolnak össze, hasonlóan, mint a DNS-ben a dNMP-egységeket. A legfontosabb különbségek a DNS és RNS elsődleges kémiai szerkezetében az alábbiak:

- a) Az RNS-ben mindig ribózhoz kapcsolódnak a bázisok, szemben a DNS-ben előforduló 2'-deoxiribózzal.
- b) Az RNS-molekulák purin bázis tartalma azonos, míg pirimidin bázis tartalma különböző a DNS-től. Az RNS-molekulák nem tartalmaznak timin bázist, helyette az uracil található. Timin ribonukleotid ún. ritka bázisként előfordulhat kis mennyiségben a tRNS-ben, mint azt később látni fogjuk.
- c) Az RNS leggyakrabban egyszálú polinukleotid láncként fordul elő, szemben a DNS kettős lánccal. Azonban, mint azt korábban láttuk az egyszálú nukleinsavak szerkezeténél (4-29., 4-30. ábra), az RNS gyakran képez hajtúszerkezetet, ha komplementer, ellentétes polaritású szakaszok kerülnek egymás mellé.
- d) Mivel az RNS-molekula leggyakrabban egyszálú, a bázispárokra jellemző arány, ami a DNS-ben kimutatható, az RNS-re nem jellemző, azaz a G nem azonos C, az A pedig nem azonos a U bázis mennyiségével.
- e) A polinukleotid lánc savban hidrolizálva mind a DNS, mind az RNS esetében mononukleotidokat eredményez. Lúgban azonban csak az RNS hidrolizálható, a DNS ellenáll a lúgos hidrolízisnek. Ennek az az oka, hogy DNS-ben a ribóz 2'-OH



csoportja hiányzik, és nem tud a 2',3'-ciklikusdiészter-mononukleotid kialakulni a lúgos közegben. A lúggal szembeni érzékenységet az RNS kimutatására gyakran használják a diagnosztikában is.

#### 4.6.1. Az RNS biológiai szerepe

Az RNS-ben tárolt információt, ugyanúgy, mint a DNS esetében, a nukleotidszekvencia, a primer szerkezet hordozza. Az RNS szekvenciája komplementer a kódoló DNS-szállal (génekkal), amelyről az átírása, transzkripciója történt. A komplementaritás alapja a nukleinsav hibridizációs technikának is, amiről már korábban szó volt. Az RNS nem hibridizál a DNS gén másik szálával, a nem-kódoló szállal, viszont értelemszerűen szekvenciája megegyezik a nem-kódoló szál szekvenciájával.

A sejtekben előforduló RNS-féleségek többsége a fehérjeszintézisben vesz részt. A messenger RNS (mRNS) biztosítja a kódot, a mintát a fehérjeszintézishez. A riboszómákban három, illetve négy, különböző hosszúságú RNS van (rRNS), ezek elsősorban a szerkezet kialakulásához, a mRNS megkötéséhez szükségesek. A legkisebb molekulású RNS a transzfer RNS (tRNS), a fehérjeszintézis számára szállítja a mRNS mintában előírt aminosavat.

A DNS-genomról mindig sokkal több RNS szintetizálódik, mint ami végül a fehérjeszintézisben részt vesz, nagy része lebomlik. Az elsődleges RNS-molekulák bonyolult módosításon esnek át (RNS-processing), amely folyamat különösen intenzív az **eukarióta** sejtmagban. Ezekben a sejtekben találtak önálló funkciójú, nem a fehérjeszintézist szolgáló, kismolekulású RNS-molekulákat (snRNS — small nuclear RNA), amelyek 90-300 nukleotid-egységből állnak. Egyes snRNS-ekről kiderült, hogy az RNS-processzállásban **katalizátor** szerepük van.

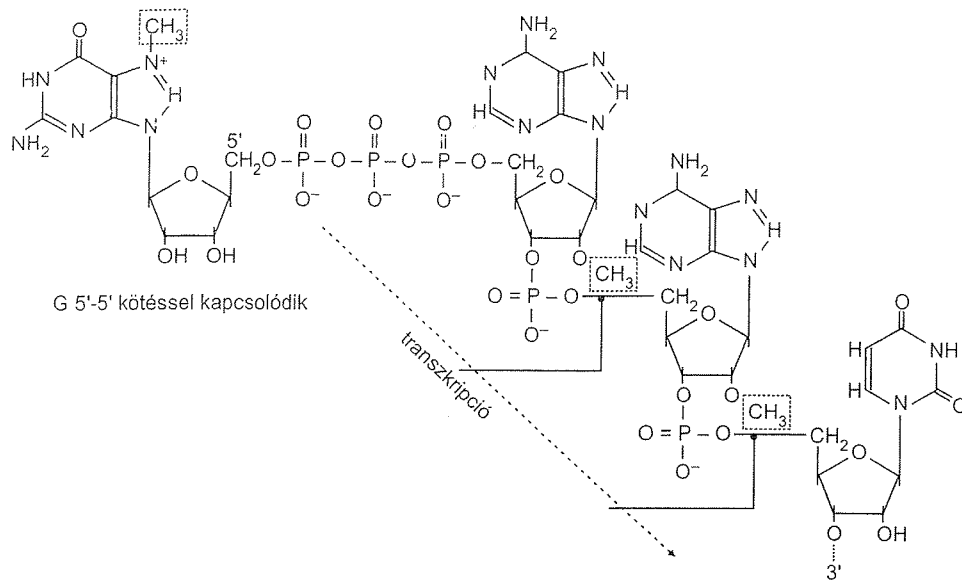
Az RNS számos állati és **növényi** vírusnak önálló genetikai anyaga is lehet, A klasszikus RNS-vírusok a szaporodási ciklusok során RNS-sé íródnak át a gazdasejtben. Van azonban az RNS vírusoknak egy speciális csoportja a „retrovírusok” amelyek tartalmaznak egy enzimet, a reverz transzkriptázt (RNS-függő DNS-polimeráz), amely ds DNS-sé írja át az RNS genomot. A dsDNS-sé átírt vírusgenom ilyen formában vagy integrálódhat a gazda DNS-be, vagy külső hatásra a genomból ki is válhat, és mint vírus önállóan replikálódhat. A retrovírusok az emlős szervezetekben tumort indukálhatnak, transzformálhatják a fertőzött sejtet.

#### 4.6.2. Az mRNS

A fehérjeszintézisben a mintát szolgáltatja a polipeptidlánc kialakulásához. A legheterogénebb RNS-csoport a molekula nagysága és élettideje tekintetében, van azonban néhány jellemző tulajdonság, amelyik minden mRNS-ben megtalálható, ezek a következők:

Az 5'-vége a mRNS-eknek minden esetben 7-metil-guanozin trifoszfát. A metil-GTP foszfát végéhez kapcsolódik a szomszédos 2-0-metil-ribonukleozid az 5'-OH csoportján keresztül. Ezt a kémiai szerkezetet nevezik *sapkának*, „mRNS-cap”-nek, szerepe a molekula 5'-végének védelme, valamint a fehérjeszintetizáló rendszer a molekulának ezt a végét ismeri fel (4-32. ábra).

A mRNS másik vége, a 3'-hidroxil vég 20-250 nukleotid tagból álló homopolimer, poli-adenilsavból áll, amit *poli(A)-farok*nak neveznek. A transzkripció befejezése után egy



4-32. ábra

A mRNS 5' vége több helyen metilálódik: „sapka”

külön enzim a poliadenilát-szintetáz készíti el a molekulának ezt a részét, feltehetően stabilizálja a mRNS-t. A poli(A)-farok nagyon fontos lehetőséget jelent a mRNS-ek tisztításában, mivel bázispárt képezve kötődik oligo(T)-cellulózhoz. Ezt az affinitás-kromatográfiai módszert széles körben alkalmazzák a mRNS-ek tisztítására a molekuláris genetikában.

Az emlős sejtmagból izolálható RNS-molekulák rendkívül heterogén molekulatömeggel rendelkeznek, prekursorai a funkcionális RNS-eknek, amelyek a citoplazmából izolálhatók. Ezt az RNS-csoportot *heterogén nukleáris RNS-eknek*, *hnRNS*) nevezik, átlagos molekulatömege  $10^7$  kDa felett van, míg a mRNS-ek átlagos molekulatömege  $10^6$  körül van. A folyamatot, amely az első transzkripció termékéből funkcióképes RNS-molekulát készít, *RNS-processzálnak* nevezik. Ez a folyamat nem csak a mRNS, hanem a tRNS és rRNS kialakulására is jellemző, és különösen intenzív az eukariota sejtekben. Az RNS-processzálnak több enzimatikus folyamat összehangolt működése, mint a nukleolitikus hasítás és összekapcsolás (ligálás); a sapkakészítés, „capping”; a terminálás; végül pedig egyes nukleotidok módosítása, metilálása stb. Az emlős sejtekben az átíródott RNS-nek 50-70%-a még a sejtmagban lebomlik, nem jut RNS formájában a citoplazmába.

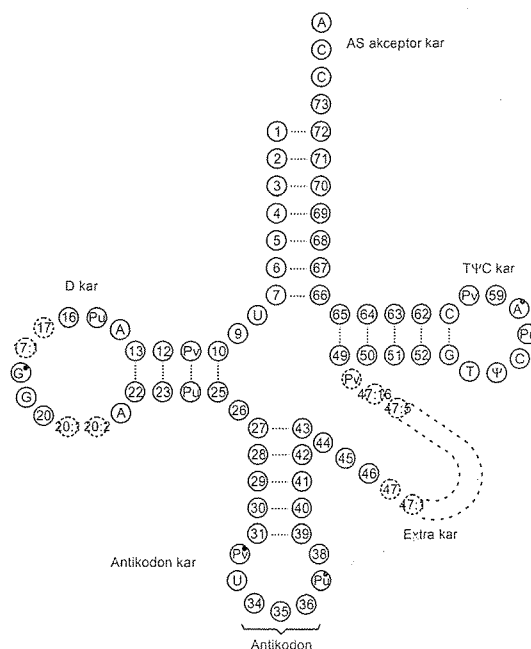
A DNS primer szerkezetének megismerése nyomán kiderült, hogy a genetikai információ nem folyamatos a DNS-láncon. Az aminosav-szekvenciát kódoló szakaszokat (*exonok*) olyan szekvenciák szakítják meg, amelyek nem jelennek meg a fehérjében (intronok). A transzkripció elsődleges terméke tartalmazza a genom teljes másolatát, az intronok az RNS-ből vágódnak ki, és az exonokat a splicing megfelelő sorrendbe összerakja. A bonyolult folyamatokban biztosan szerepet játszanak az snRNS-ek, amelyekről korábban szöveltünk. Két mechanizmust sikerült eddig megismerni az intronok eltávolítására. Az egyikben az úgynevezett U1 snRNS-ek (uracilban gazdag snRNS) egy meghatározott szekvenciája komplementer az exon-intron határon elhelyezkedő szekvenciákkal. Ehhez a komplementer szakaszhoz kapcsolódva a két exon egymáshoz közel kerül, az intron egy hurkot képez, és

ilyen formában kivágódik, majd a két exon összekapcsolódik. Az U1 snRNS szerepe tehát az, hogy megkeresve az exon-intron határon lévő komplementer (consensus) szekvenciákat, az intront kihurkolja. A folyamatban az U1 snRNS-en kívül fehérjék is részt vesznek ribonukleoprotein komplexeket alkotva, melyeket „*spliceosomá*”-nak hívnak, (ld. Orvosi Biokémia könyv)

A másik intronkivágási mechanizmus nem igényel fehérjét, az RNS maga „enzimként” működik (Ribozim). Mindezek a folyamatok az RNS-processzáshoz tartoznak és a magban zajlanak.

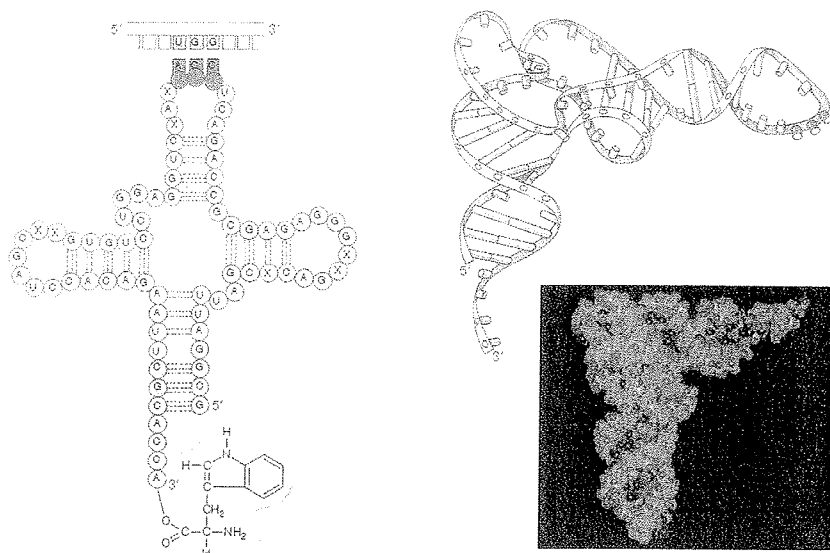
#### 4.6.3. A tRNS

A tRNS a fehérjeszintézisben leolvassa az mRNS-kódot, és szállítja a megfelelő aminosavat. Átlagosan 75 nukleotidból áll, és molekulatömege 25000 dalton. Minden sejtben legalább 20-féle tRNS-molekula van, de gyakran egy-egy aminosav szállításához több tRNS is rendelkezésre áll. A tRNS-ek nukleotidszekvenciája különböző, azonban számos közös tulajdonsággal rendelkeznek. A közös tulajdonságok közül a legjellemzőbb a tRNS-ek másodlagos szerkezete. A ribonukleotid láncon belül komplementer szakaszok, csavarulatok, hurkok vannak. A síkra vetített tRNS-formát „lóhere” formának nevezik. Négy fő szakasz található benne, amelyeket karoknak nevezünk, ezek közül három kar hurokban végződik. Az *akceptor-karon* egy szakasz kétszálú bázispárokat képez, és mindig CCA (5'→3') szekvenciával végződik, ez a molekula 3'-vége. Az akceptorkar adenozin 3'-OH csoportjához kapcsolódik majd a szállítandó aminosav karboxilcsoportja észterkötéssel. A másik három kar is tartalmaz bázispárokat, és ezen kívül hurokban végződnek.



4-33. ábra

A tRNS lóhereformája



4-34. ábra

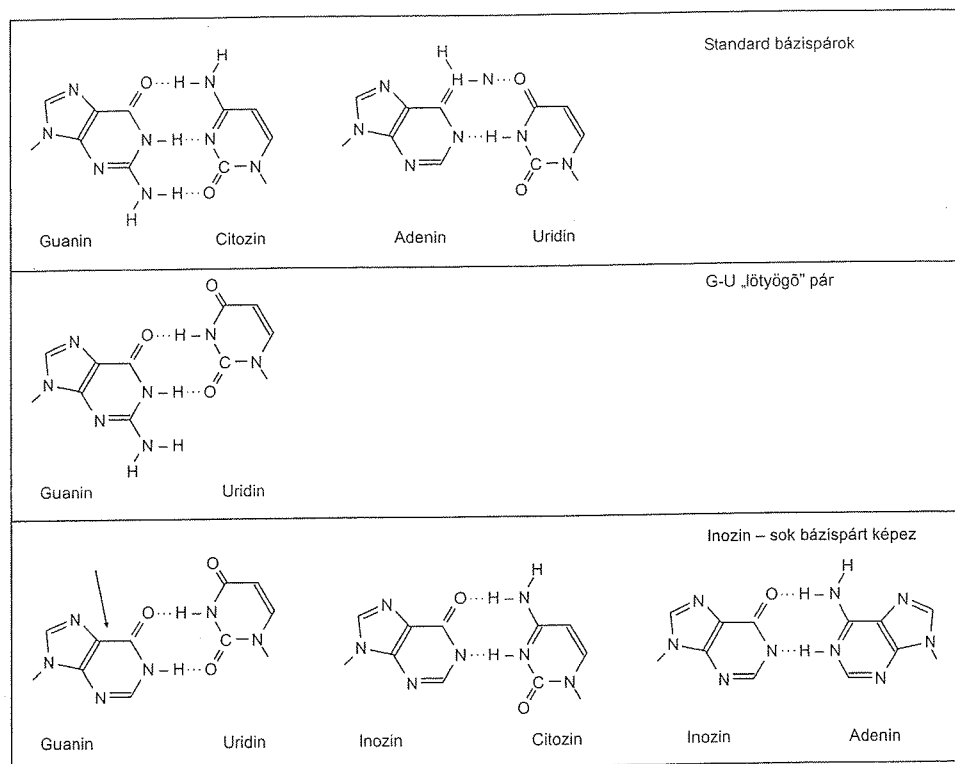
A tRNS térbeli szerkezete. Baloldalt a lóhere-forma, jobboldalt fenn az L-forma, jobboldalt alul az L-forma térhatású változata látható. A lóhere-formán a kodon-antikodon kapcsolat és a megkötött aminosav (ez esetben a triptofán és a hozzá tartozó kodon és antikodon) is látható.

Az *antikodon-kar* ismeri fel a mRNS-en az aminosavat kódoló nukleotid tripleteket, a *kodont*. A *D-kar* a nevét egy ritka bázistól, a dihidrouridin-től (4-33. ábra) kapta, az aminoacil-tRNS szintetáz enzim felismerésében van fontos szerepe. Hasonlóan ritka bázisok vannak a *TΨC karban* is (ribotimidin, pszeudouridin, ezért pszeudouridin karnak is nevezik), amely az amino-acil-tRNS-t a riboszómákhoz rögzíti. Van egy negyedik, kisebb kar is az ún. *extra kar*, amely nagyon változatos nukleotid-szekvenciát mutat. A legtöbb tRNS-ben ez a kar 3-5 bp hosszúságú (1-es típusú tRNS-ek), de van 13-21 bp hosszúságú extra kar is (2-es típusú tRNS-ek).

A négy karban elhelyezkedő bázispárszakaszok hossza minden tRNS-ben azonos: az akceptor-karban 7, a TTC és antikodon-karban 5-5 és a D-karban 3-4 bázispár van. A tRNS tényleges térbeli szerkezetét, az L-formát a 4-34. ábra mutatja.

Minden tRNS-ben az antikodon-tripleten kívül még legalább két nukleotid van, ami szerepet játszik a mRNS-kodon felismerésében. Ha a molekulában az 3'→5' irányba haladunk, mindig van egy változó bázis (N), ami általában egy módosított purin, ezután következik az antikodon (X.Y.Z), majd az antikodon után a szekvencia mindig egy pirimidin-primidin 5' nukleotidpáros. A 4.33. ábrán az antikodon nukleotid triplet a 34, 35, 36. nukleotid, amit megelőz a két pirimidin nukleotid (U, Pyr) és az antikodont követi a módosított purin (Pu) nukleotid. Az antikodon-kodon kapcsolódás a báziskomplementaritás alapján jön létre. Ez a kapcsolat nem tökéletes abban az esetben, ha az antikodon harmadik nukleotidja nem tökéletes bázispárja a kodon harmadik tagjának. A jelenséget a „kodon-antikodon lötyögés”-nek nevezik (4-35. ábra).

A genetikai kód leolvasásában csak az antikodonthurok játszik szerepet, az akceptor-karon lévő aminosav közömbös ebben a funkcióban.



4-35. ábra

A kodon-antikodon kapcsolat; a „löttyögés”

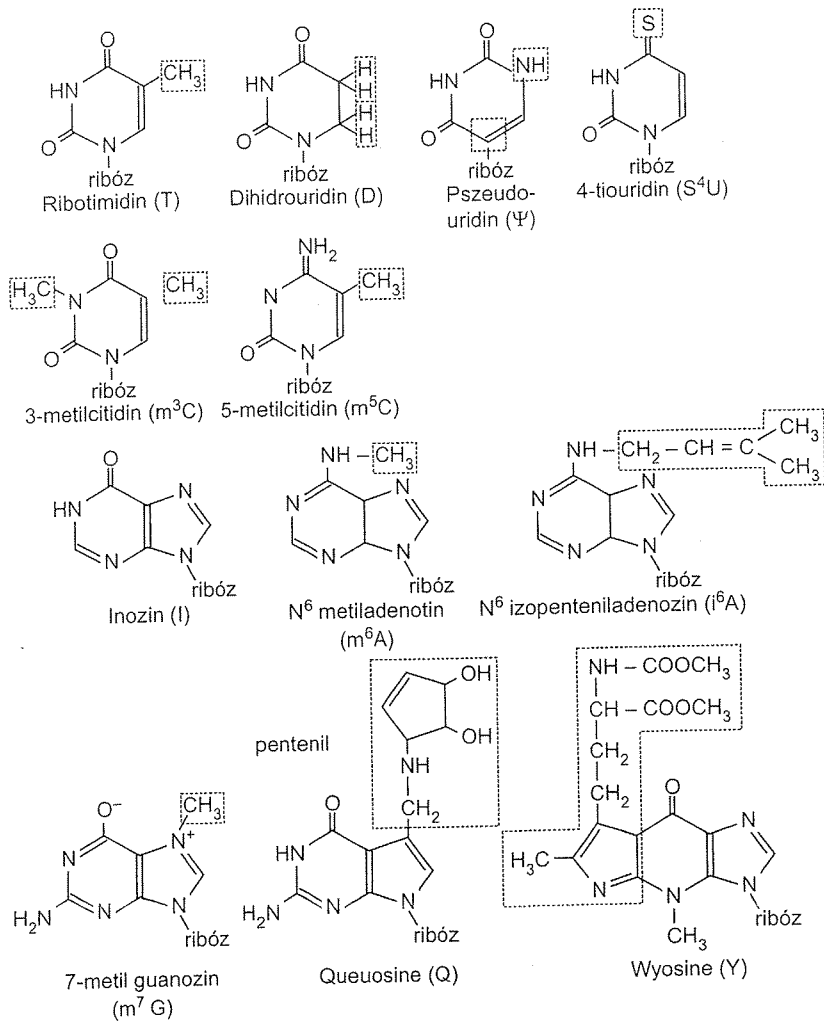
A tRNS-ben fordul elő a legtöbb, ún. ritka vagy módosított bázis, a gyakrabban előforduló ritka bázisok képlete a 4-36. ábrán láthatók, kiemelve a különbségeket.

#### 4.6.4. Az rRNS

A riboszómák a fehérjeszintézis fontos szerkezeti elemei, fehérjéből és RNS-ből épülnek fel. Hozzájuk kötődik az mRNS és tRNS is a peptidkötés kialakítása során. Az emlős riboszómák molekulatömege  $4,2 \times 10^6$  dalton, két fő nukleoprotein alegységből állnak: a nagy alegységből, amely  $2,8 \times 10^6$  (60S), és a kis alegységből, amely  $1,4 \times 10^6$  (40S) tömegű. A nagy alegység 50 specifikus fehérjéből és három rRNS-molekulából épül fel, amelyek jellemzői: 5 S rRNS; 5,8 S rRNS és 28S rRNS. A kis alegység 30 különböző fehérjéből és egyetlen RNS-molekulából épül fel, amely a 18 S rRNS (3-47. ábra).

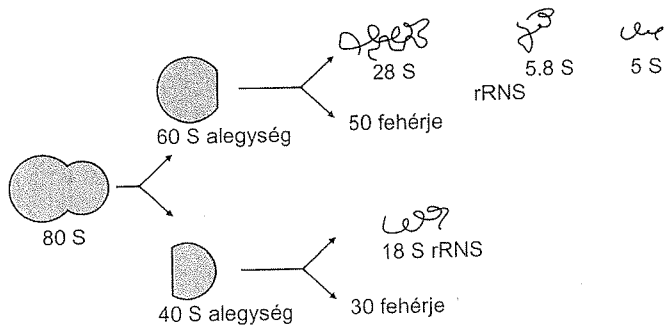
A prokariota riboszóma asszociált formája 70 S,  $2,8 \times 10^6$  molekulatömegű. A nagyobb alegység 50 S és két rRNS-t tartalmaz: 5 S rRNS (120 nukleotid) és 23 S rRNS (kb. 3000 nukleotid), ezenkívül mintegy 34-féle fehérjét tartalmaz. A kisebb alegységben (30 S) egyetlen 16 S rRNS (kb. 1500 nukleotid) és 21 fehérje található.

Az rRNS-ek, hasonlóan az mRNS-ekhez, processzállással alakulnak ki az elsődleges transzkripció termékéből. Valamennyi rRNS-molekula, az 5S rRNS kivételével egy közös 45S rRNS-prekursorból keletkezik az eukariota nukleoluszban.



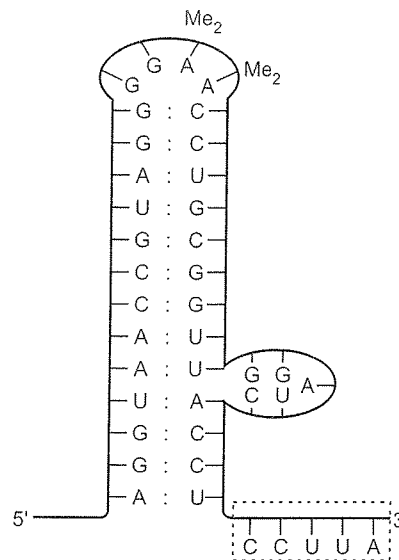
4-36. ábra

Módosított nukleotidok a tRNS-ben



4-37. ábra

Az eukariota riboszoma



4-38. ábra

Hurokképződés a 16S rRNS 3' végén

Az 5S rRNS is processzálassal alakul ki a saját prekurzorából. A nukleoluszban a másodlagos módosításokon (metilálás) is átesett, kész rRNS-molekulák a riboszómafehérjékkel együtt kialakítják a kész riboszómákat, amelyek a citoplazmába kerülve részt vesznek a fehérjeszintézis gépezetében. A szintézis végén a riboszómák felszabadulnak, és új fehérjeszintézisben vehetnek részt (riboszómaciklus).

Az rRNS-molekulák szerepe elsődlegesen a riboszómaszerkezet kialakítása. Egyetlen rRNS-ről, a kis alegység 18S rRNS-ről (prokariotákban 16S RNS) tudjuk azt, hogy a 3'-végén elhelyezkedő 3-9 nukleotid az mRNS riboszómákhoz történő kötésében is fontos szerepet játszik (4-38. ábra), a start-kodon előtti szekenciával komplementer, ahhoz kötődik. A 4-38. ábra 3]6SrRNS-nek azt a szakaszát mutatja, amelyik konzervatív az élővilágban, és a mRNS megkötésében vesz részt. A konzervatív szakasz a két metil-csoportot tartalmazó adenintől (A-Me<sub>2</sub>) a 3'-végéig terjed, és alig mutat különbséget az eukariota 18S rRNS-hez képest.

#### 4.6.5. A snurp-ok

A három fő RNS-féleségen kívül a sejtmag és a citoplazma tartalmaz még nagyszámú, kis molekulatömegű, labilis RNS-eket. Ezek az RNS-féleségek 90-300 nukleotidból állnak és 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> darab van belőlük sejtenként. Ezek a kis RNS-darabok leggyakrabban fehérjékkel együtt fejtik ki hatásukat a génátírás szabályozásában, az RNS-processzálassal. Angol nevük rövidítéséből snurp-oknak nevezik ezeket a ribonukleoprotein komplexeket (small nuclear ribonucleoprotein particles - snurp), Néhány ilyen snurp szerepét pontosabban is ismerjük, így például az U7-snurp a hiszton mRNS 3'-végének pontosságáért felelős. Az U<sub>i</sub>-snurp az rRNS-kialakulásban az intronok eltávolításában vesz részt (lásd mRNS).