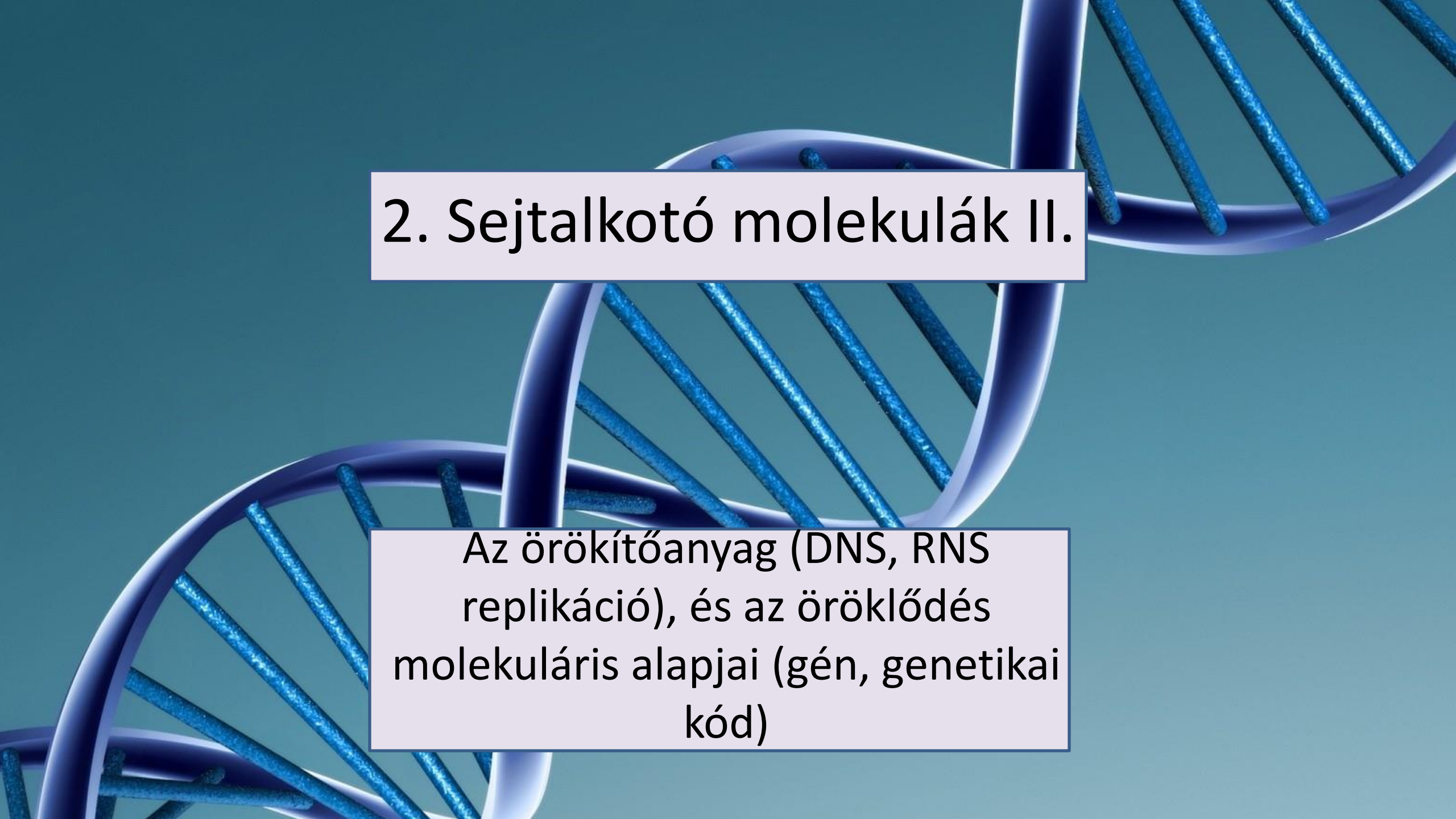




2. Sejtalkotó molekulák II.

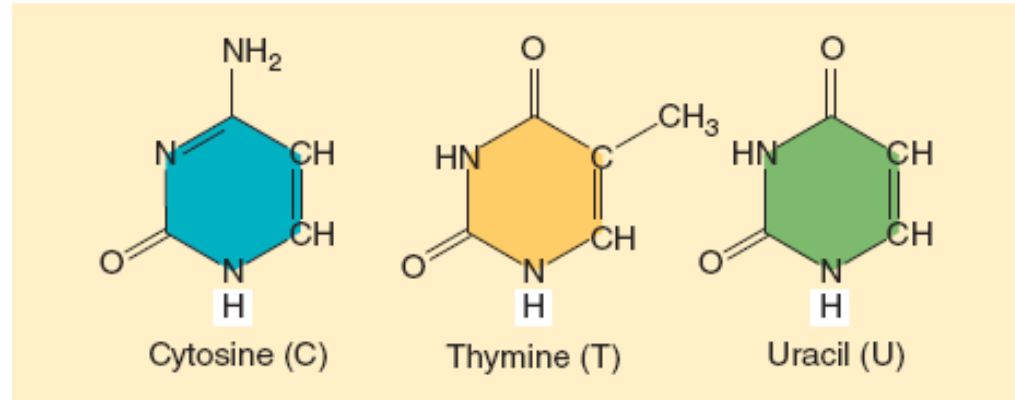
Az örökítőanyag (DNS, RNS replikáció), és az öröklődés molekuláris alapjai (gén, genetikai kód)

2.1 Nukleotidok, nukleinsavak

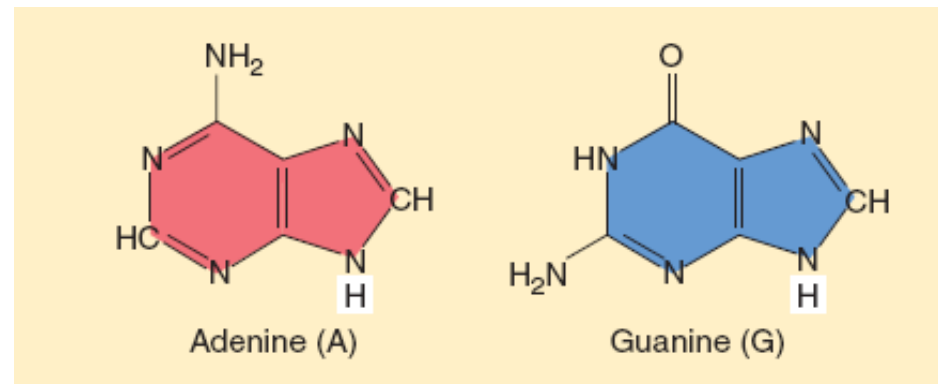
- Információátadás (örökítőanyag)
- Információs egység (gén)
- Dezoxiribonukleinsav (DNS), ribonukleinsav (RNS)
- Energiahordozók (ATP, GTP, ADP stb...)
- Redoxfolyamatok (NAD, FAD)
- Sejtmagban, mitokondriumban, plasztiszban (DNS), retrovírusok örökítőanyaga RNS
- rRNS, tRNS, mRNS, miRNS, siRNS, fehérjék

A DNS és az RNS

- Bázisok
 - Pirimidin

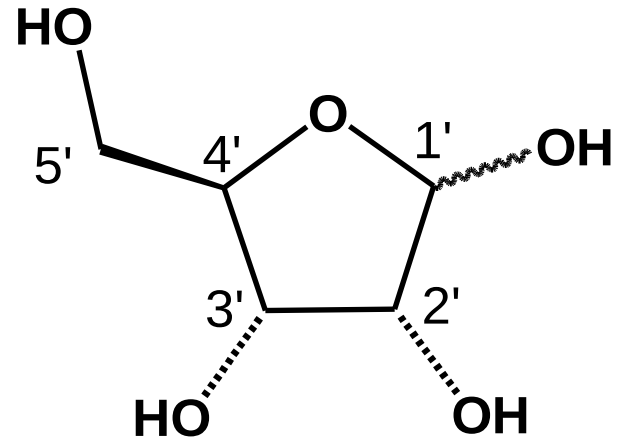


- Purin

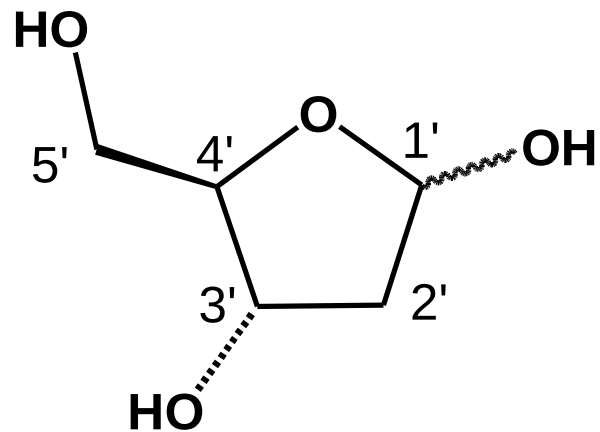


- Cukoregység

– Ribóz

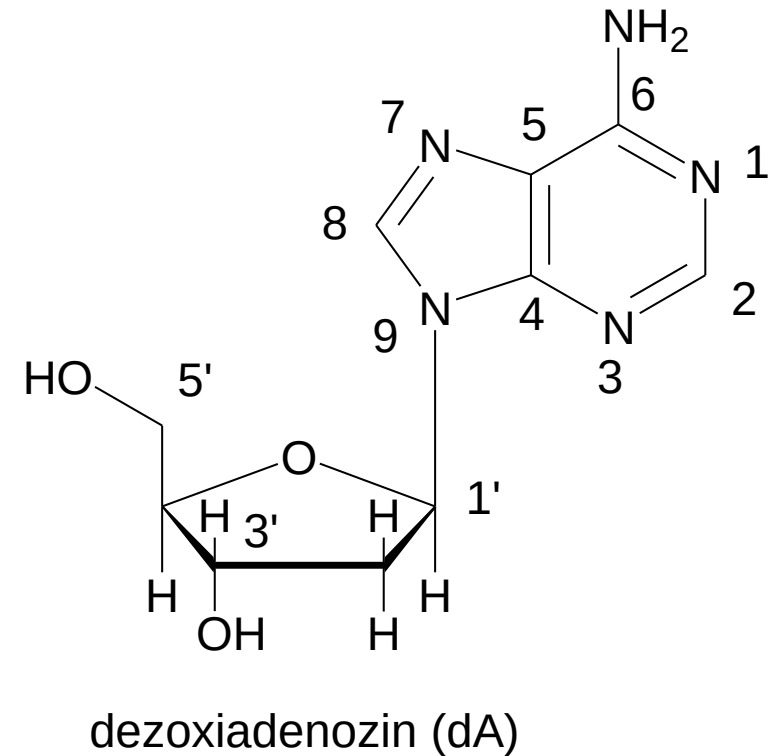


– Deoxiribóz



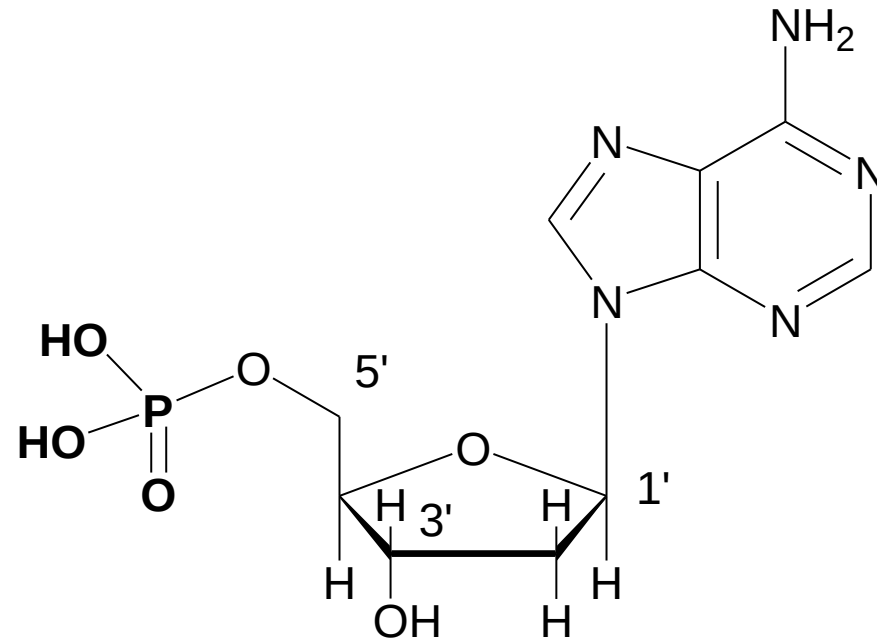
Nukleozidok

- Bázis + cukor
 - Dezoxiadenozin (adenin+dezoxiribóz)
 - Dezoxiguanozin (guanin + dezoxiribóz)
 - Uridin (uracil + ribóz)
 - Dezoxicitidin (citozin + dezoxiribóz)
 - Dezoxitimidin (timin + dezoxiribóz)



Nukleotidok, nukleinsavak

- Nukleotid: Nukleozid + foszfát
(a nukleozid foszfát észtere)



deoxiadenozin 5'-foszfát

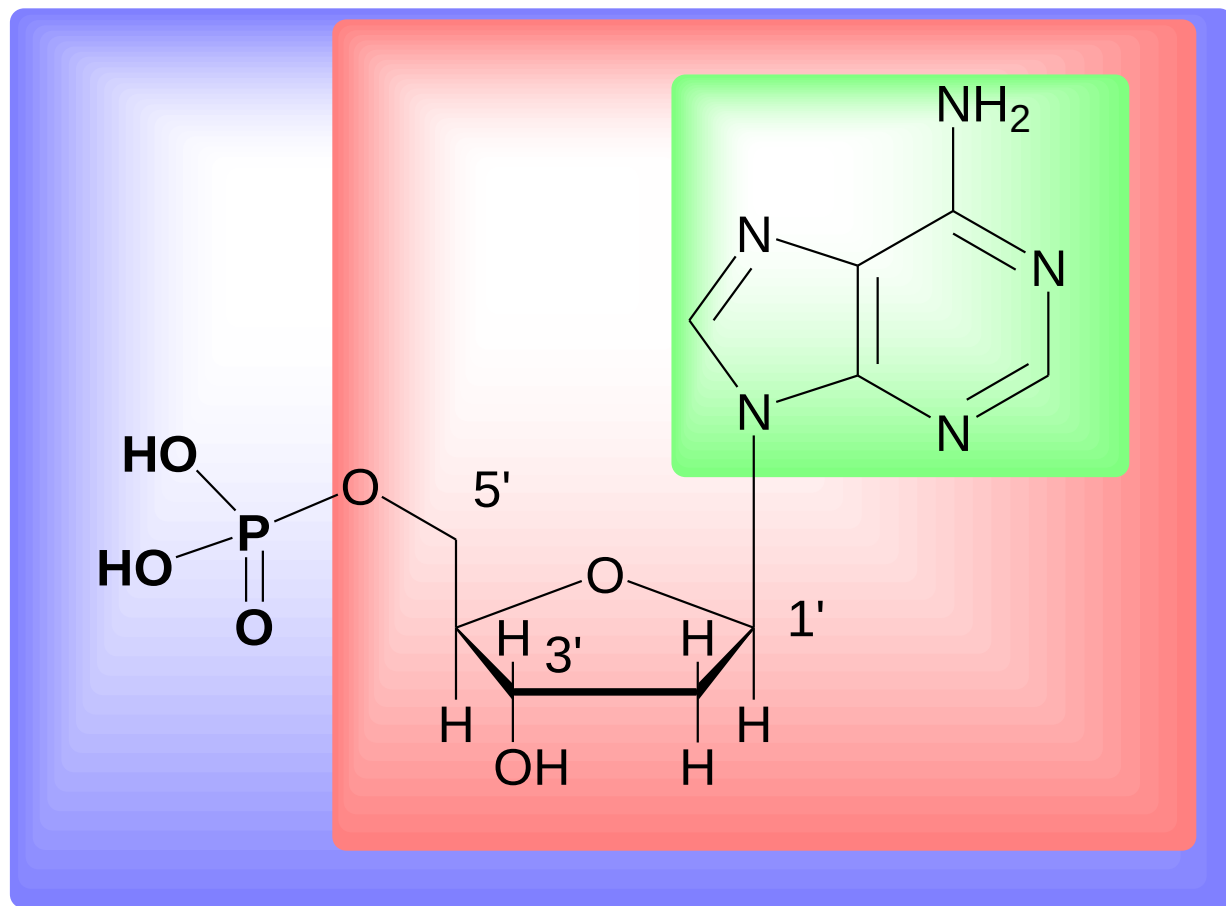
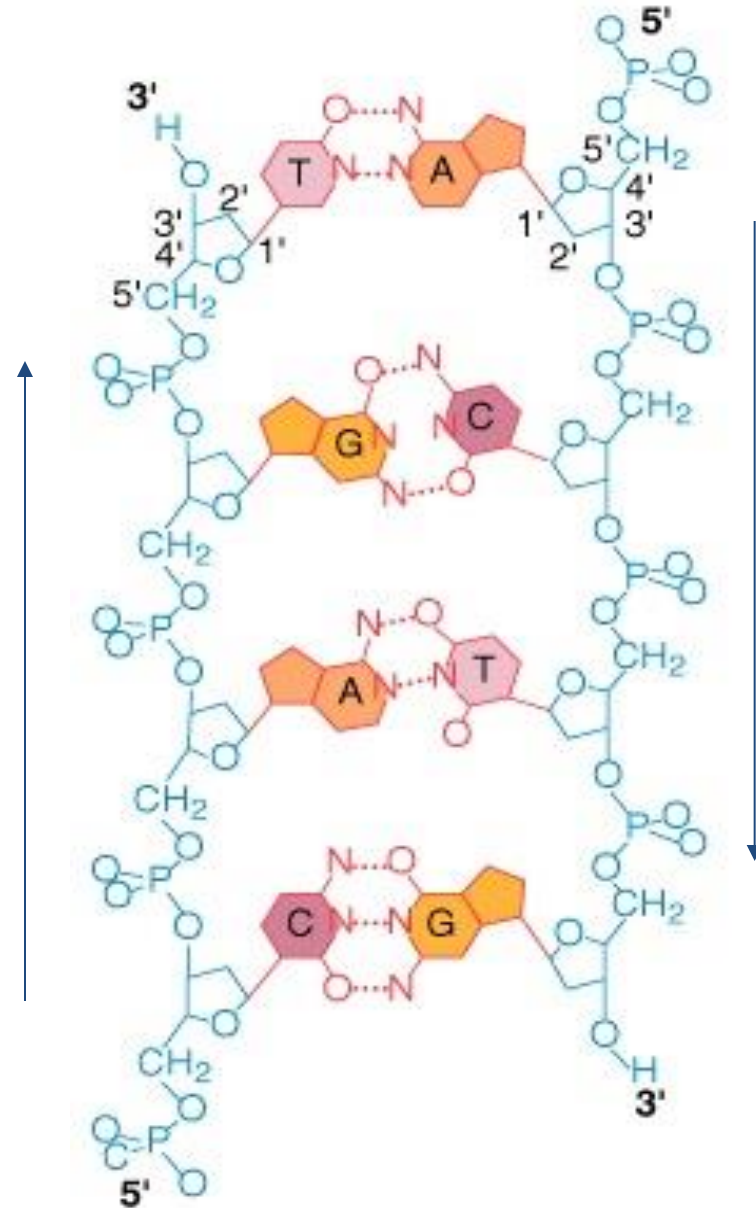


Diagram illustrating the components of a nucleotide:

- NUKLEOTID** (entire structure)
- NUKLEOZID** (sugar and base)
- BÁZIS** (nitrogenous base)

A DNS szerkezete (Watson és Crick 1953)

- Hidrofil cukor-foszfát gerinc kívül, hidrofób bázisok belül – **kettős hélix**
- Minden bázispár egy purint, (A vagy G) és egy pirimidint, (T vagy C) tartalmaz (**Chargaff szabályok**).
- Az A-T párt 2, a G-C párt 3 hidrogén-híd stabilizálja.
- A két szál **komplementer** (meghatározza és kiegészíti egymást).
- Irányultság 5', 3' vég
- Az **antiparallel** irányultságot a cukor 5→3' iránya adja.



A DNS elsődleges szerkezete

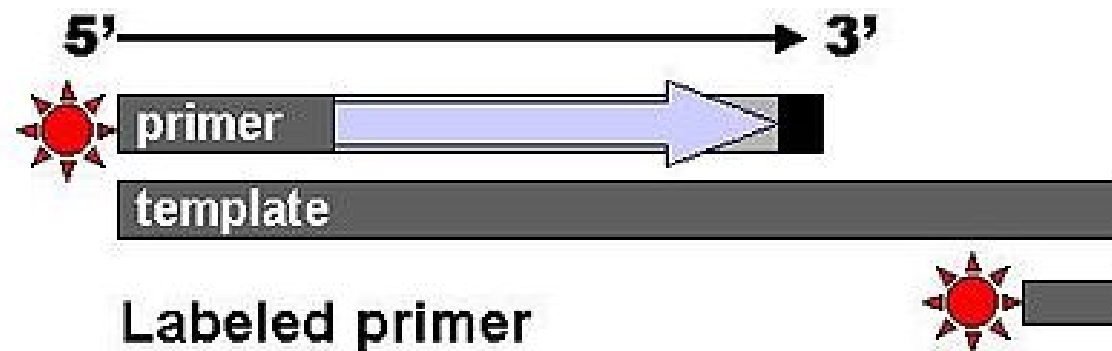
- Bázis sorrend
- Komplementaritás
- Szekvenálás
 - Sanger módszer
 - Humán genom projekt (HGP)
 - 1992-2003

DNS szekvenálás

- Frederick Sanger (1977)
- Igazságügyi biotechnológia, orvosdiagnosztika
- DNS-szál feldarabolása (**restrikciós endonukleázok** – kettős szál hasítása szálon belül)
- Denaturáció (ssDNA): templát szál: 3' → 5'
- Hozzávalók: DNS **primer**, dNTP, ddNTP (3' C sem tartalmaz OH-t), DNS polimeráz
- ddNTP-nél megáll a szintézis
- Jelzés módja szerint 3 módszer

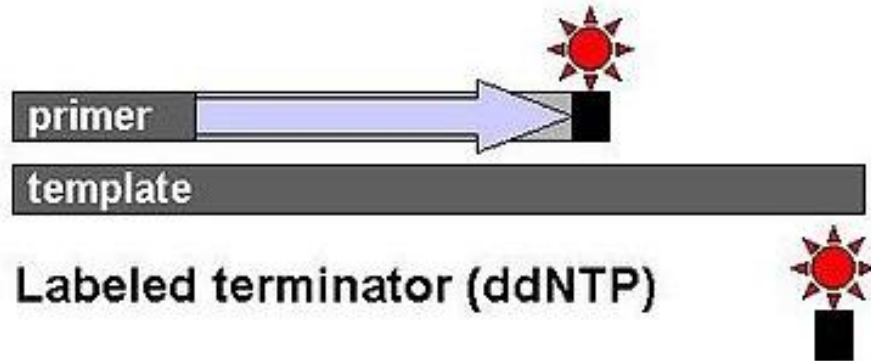
1. Módszer – primer jelölés

- A templátot négyfelé osztják
- Mindhez adnak jelzett primert, polimerázt, dNTP-t, és egyiket a ddNTP-ből (ddA, ddT, ddC, ddG)
- Különböző hosszúságú szakaszok keletkeznek, gélelektroforézissel elválaszthatók
- Az utolsó (3') nukleotid valamelyik ddNTP lesz)



2. módszer

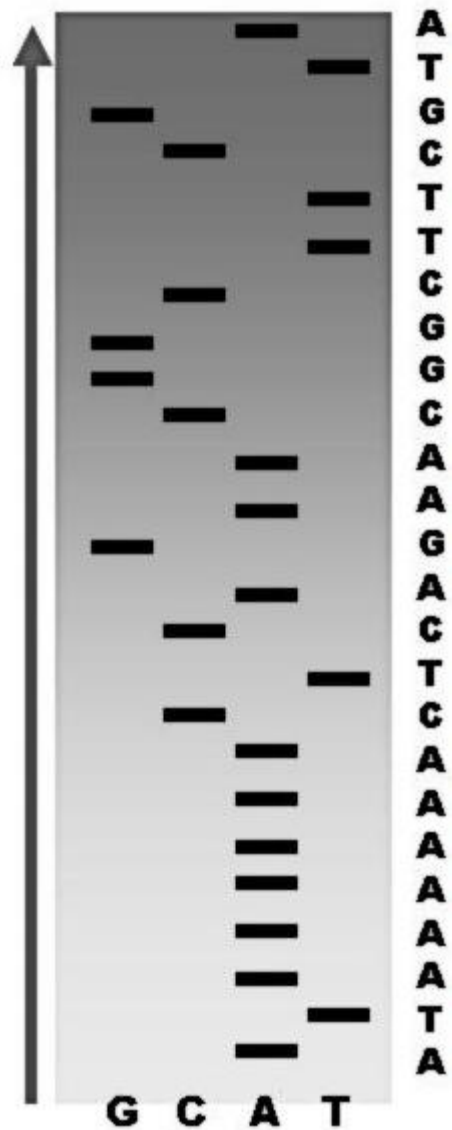
- A templátot négyfelé osztják
- Mindhez adnak primert, polimerázt, dNTP-t, és egyiket a jelzett ddNTP-ből (ddA, ddT, ddC, ddG)
- Különböző hosszúságú szakaszok keletkeznek, gélelektroforézissel elválaszthatók
- Az utolsó (3') nukleotid jelzett ddNTP lesz)



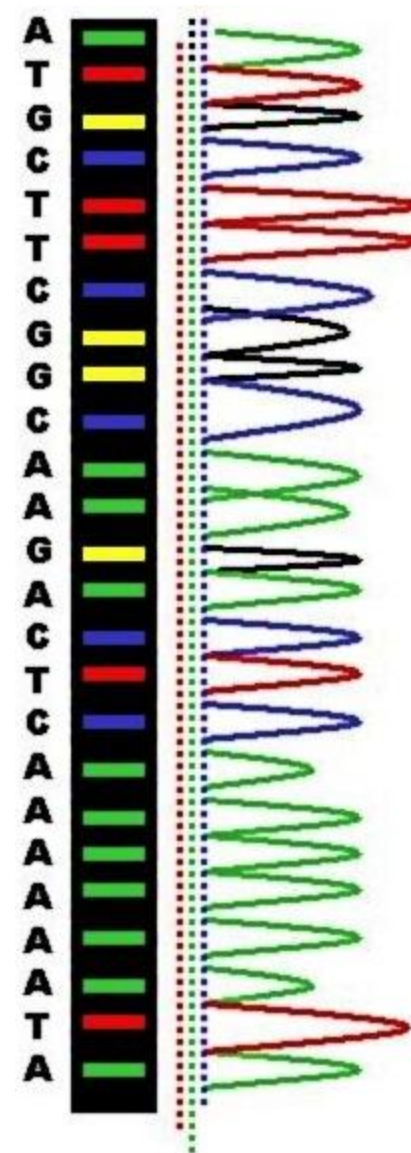
3. módszer

- A templátot **NEM** kell négyfelé osztani
- Hozzáadnak primert, polimerázt, dNTP-t, és különbözően jelzett ddNTP-eket (ddA, ddT, ddC, ddG)
- Mindegyik ddNTP más jelzést visel (fluoreszcens)
- Különböző hosszúságú szakaszok keletkeznek, gélelektroforézissel elválaszthatók
- Az utolsó (3') nukleotid jelzett ddNTP lesz)

Eredmény



1., 2. módszer



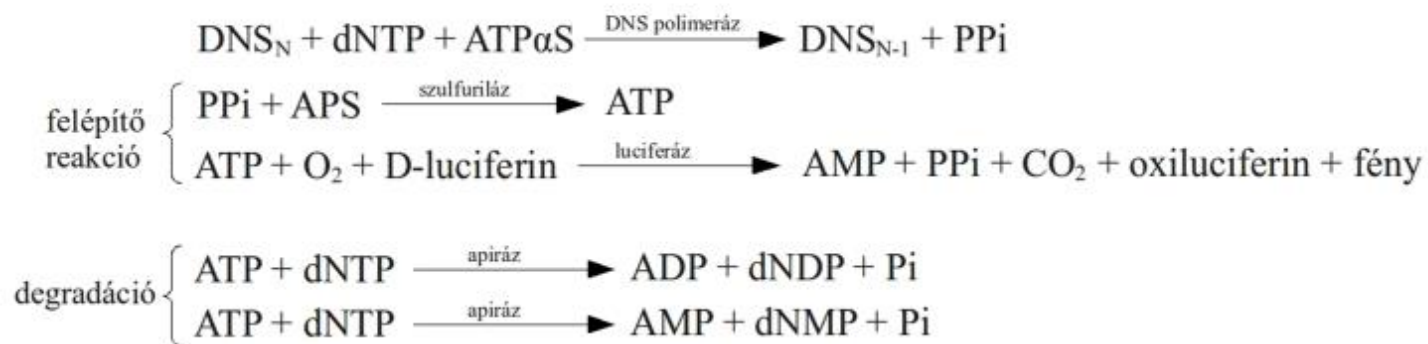
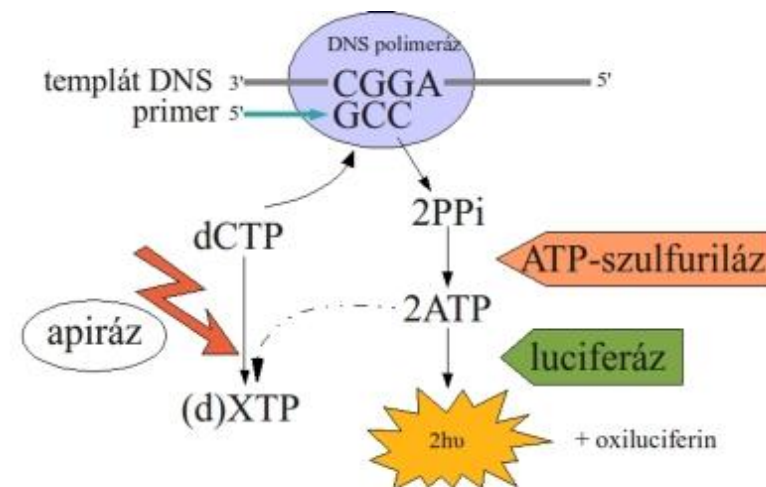
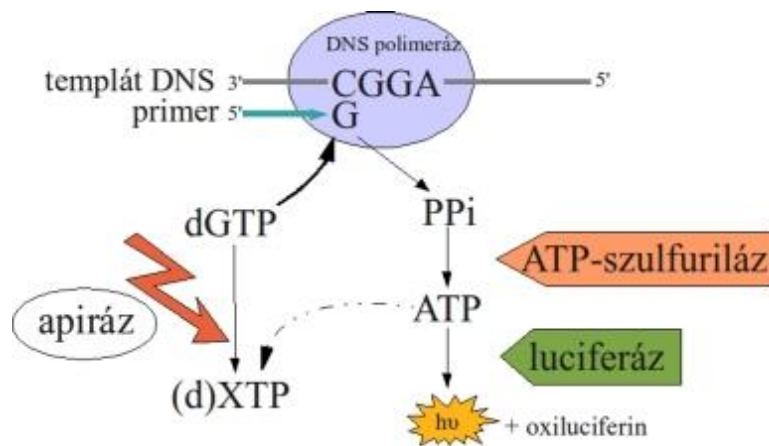
3. módszer

Teljes DNS szál szekvenciája

- Több restrikciós enzimmel generált hasítási mintázat
- A restrikciós endonukleázok által generált fragmensek összerakása az átlapoló szekvenciák segítségével

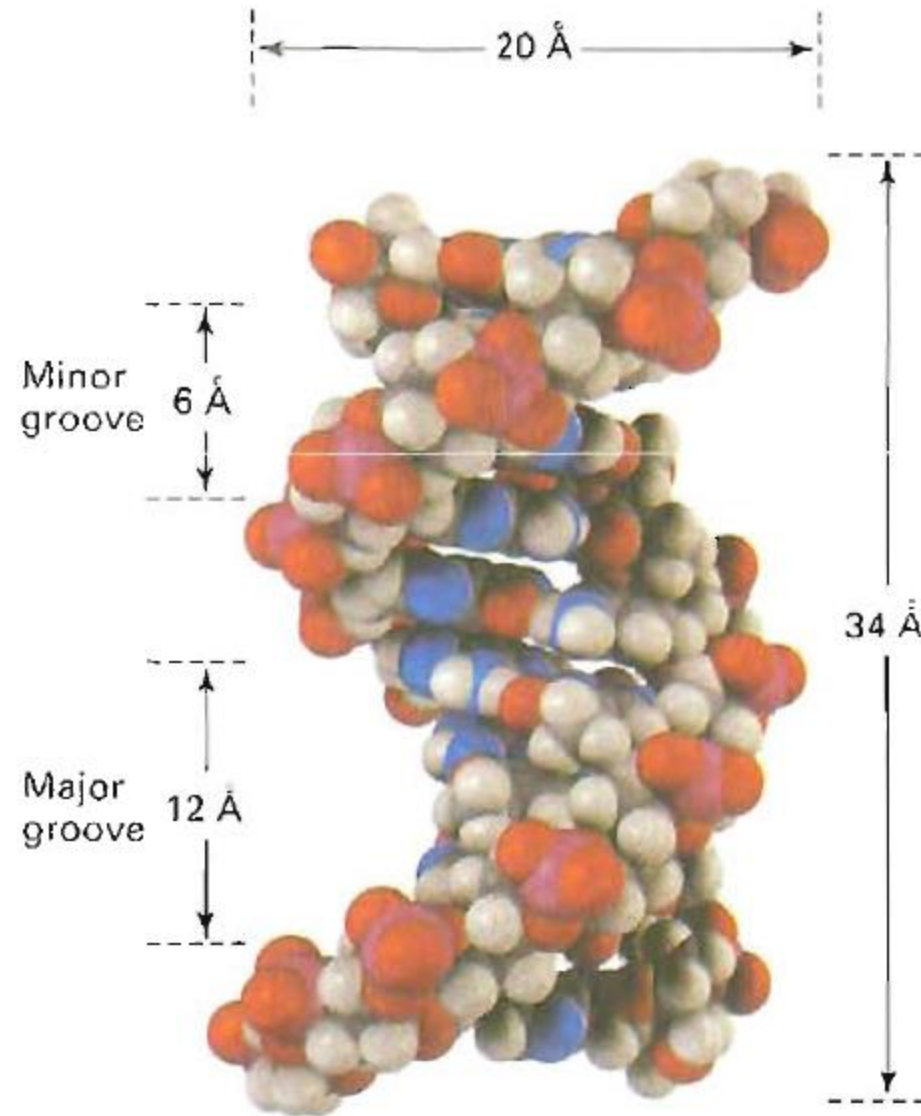
Új generációs szekvenálás - piroszekvenálás

- Teljesen eltér a Sanger-féle szekvenálástól
- Egyszerre csak egy nukleotidot adnak a templáthoz, vagy beépül, vagy nem
- Ha beépül, pirofoszfát keletkezik, ami egy kemilumineszcens folyamatot indít el
- Ha van felvillanás, akkor az azon a helyen, az adott bázis van
- Szilárd hordozón, vagy folyadékfázisban
- Gyors, de csak rövidebb szakaszokra jó



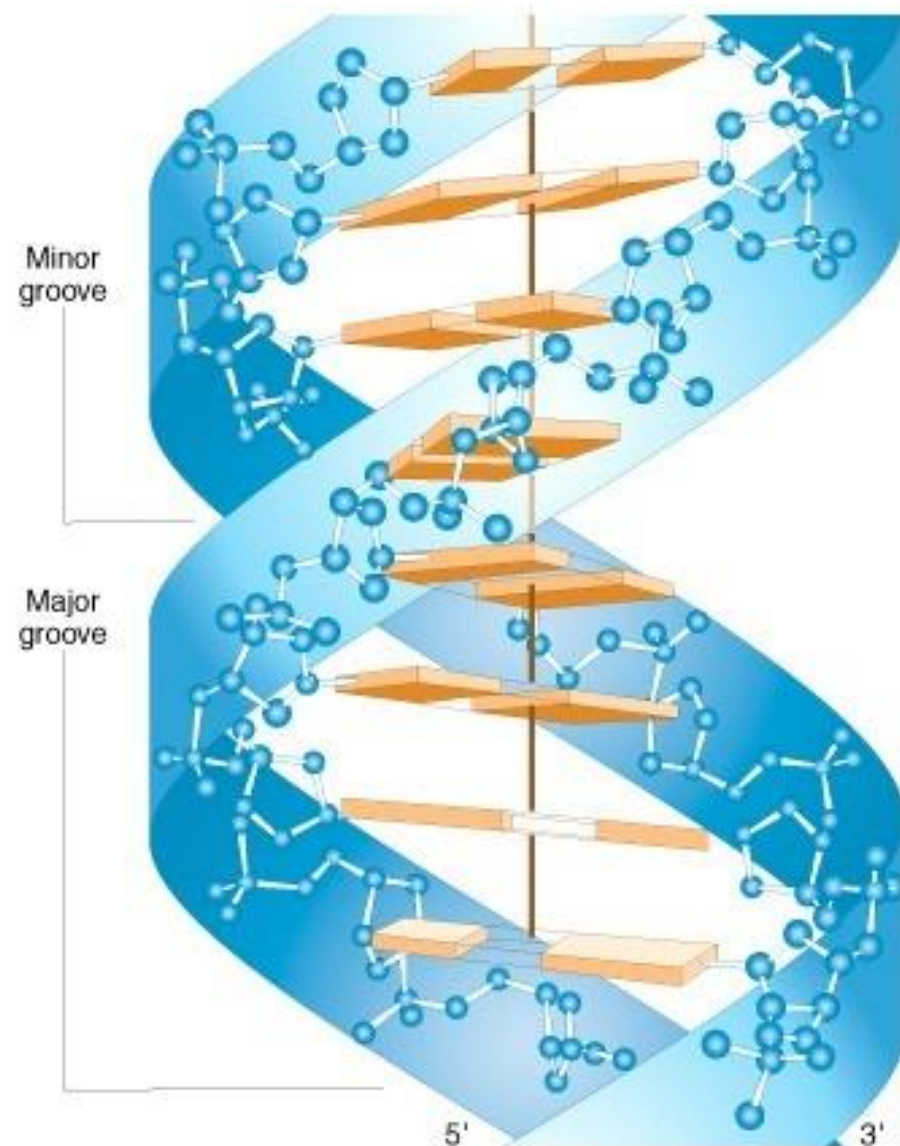
A DNS másodlagos szerkezete: kettős spirál

- A méretek angström-ben ($1\text{\AA} = 0,1\text{ nm}$)
- 10 bázisonként egy teljes fordulat



A DNS kettős spirál létra modellje

- A cukor gyűrű síkja majdnem merőleges a bázisok síkjára
- A víztaszító bázisok szoros egymásra fekvése a víz kiszorítása által stabilizálja a szerkezetet
- A hidrofil cukor-foszfát gerinc kölcsönhat a sejt vízmolekuláival.
- A DNS-kötő fehérjék és egyéb interkalátorok csak a **barázdákban** kapcsolódhatnak a bázisokhoz.



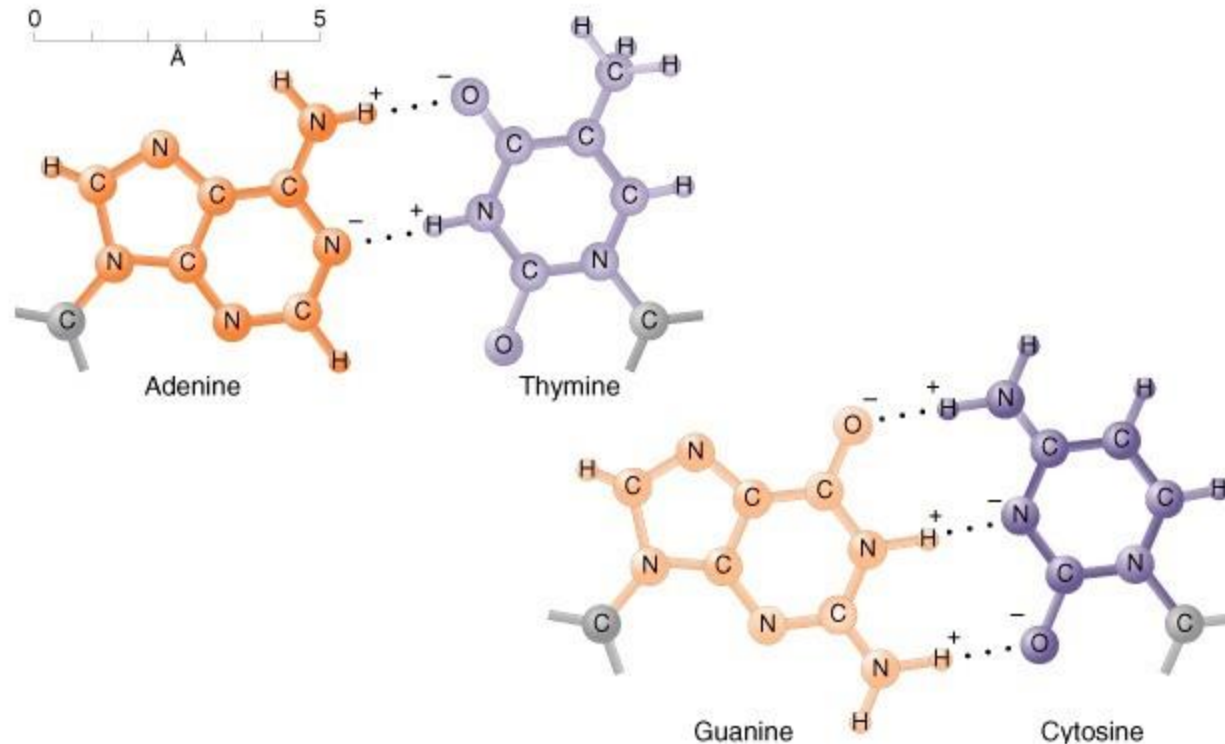
A Chargaff szabályok (Erwin Chargaff 1955)

- Az élőlényekből származó DNS-ekben a pirimidin nukleotidok ($T + C$) mennyisége egyenlő a purin ($A + G$) nukleotidok mennyiségével.
- A T mennyisége egyenlő az A -val, és C mennyisége egyenlő G -vel.
- Azonban $A + T$ és $C + G$ mennyiségek nem feltétlenül egyenlők, azok aránya jellemző az élőlényre amiből a DNS származik (faj specifikus).

A bázispárosodás módja

A négy lehetséges purin-pirimidin bázispárból (A-T, A-C, G-C, G-T) csak kettő, az A-T és a G-C felel meg Chargaff második szabályának.

Watson és Crick kimutatta, hogy csak az A-T és G-C bázispárok képesek hidrogén-hidakkal a modellbe illő módon összekapcsolódni.

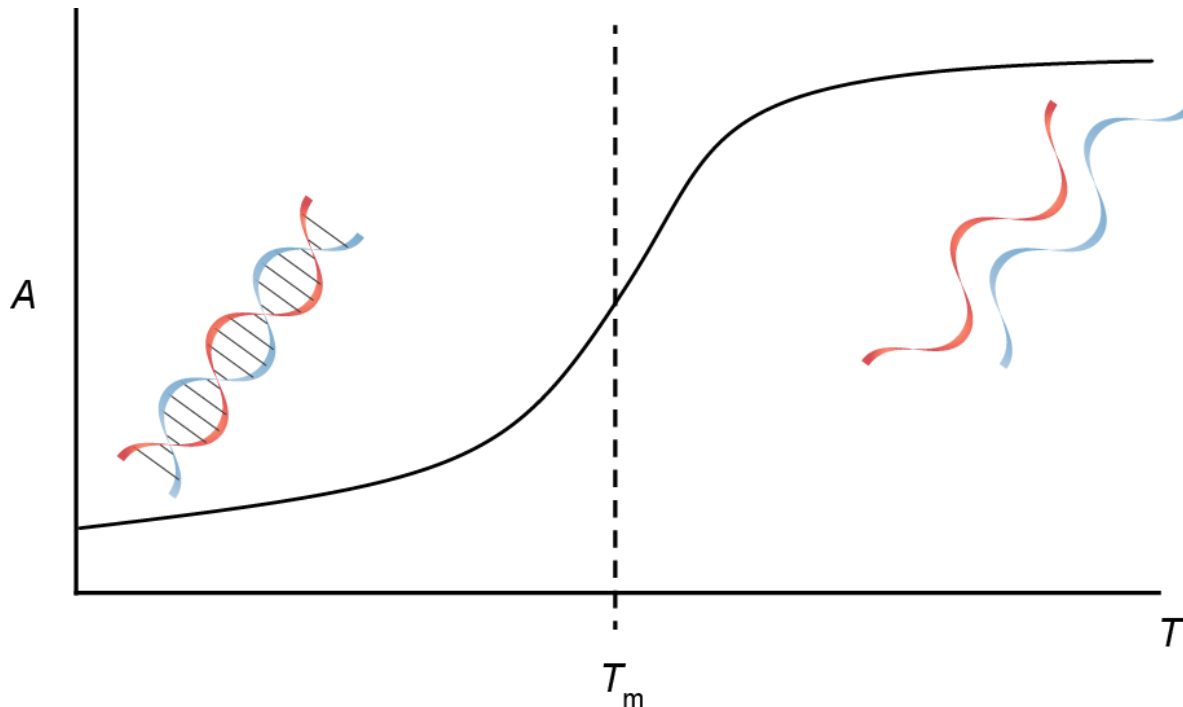


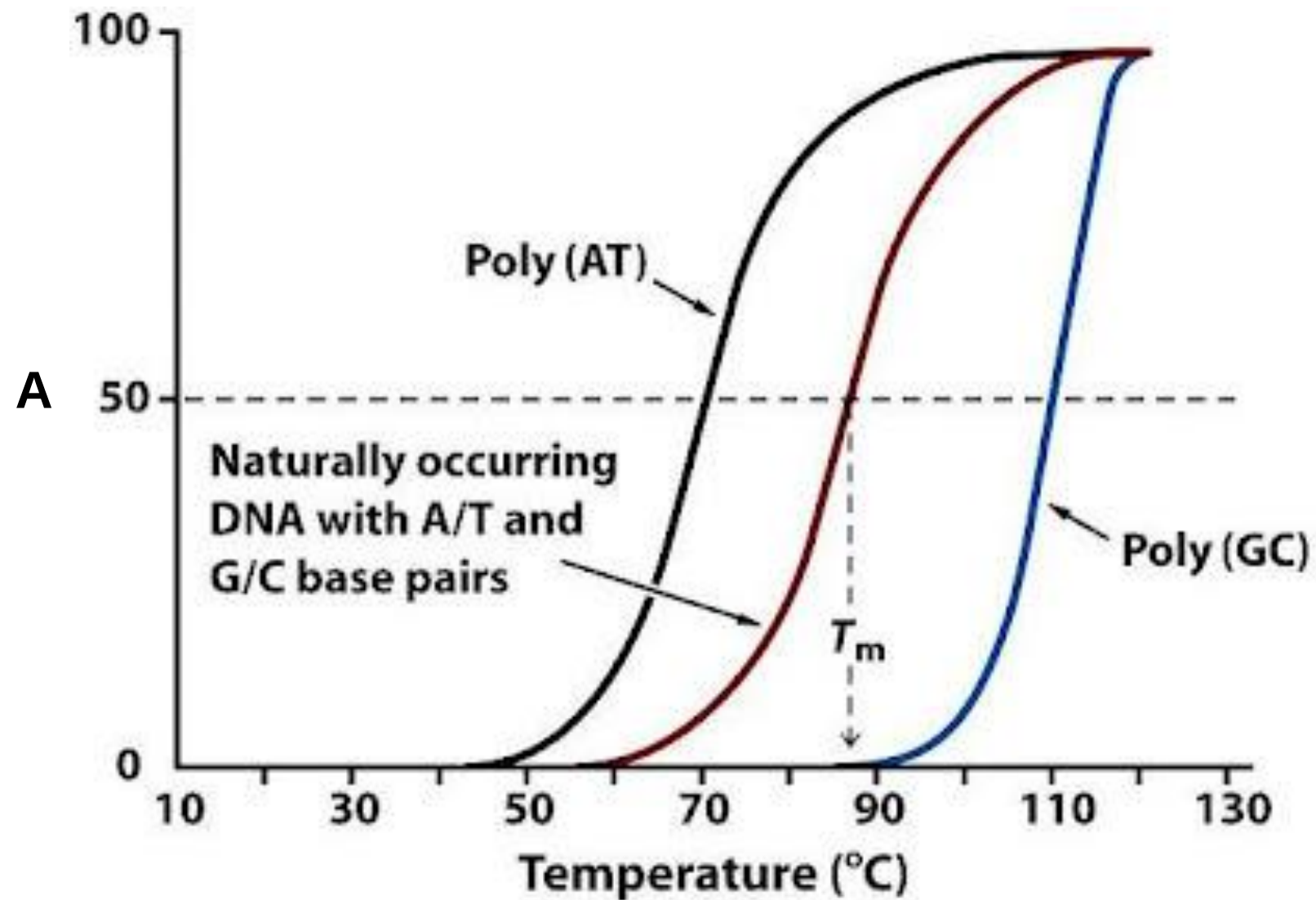
A DNS stabilitása

- GC vs AT (három, vagy két H-híd)
- Elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatások
- π – π Stacking
- **Olvadáspont** (T_m): a DNS szál fele kettős, fele egyszálú (denaturáció (disszociáció), rehibridizáció, (renaturáció, anelláció)

A DNS olvadáspontja

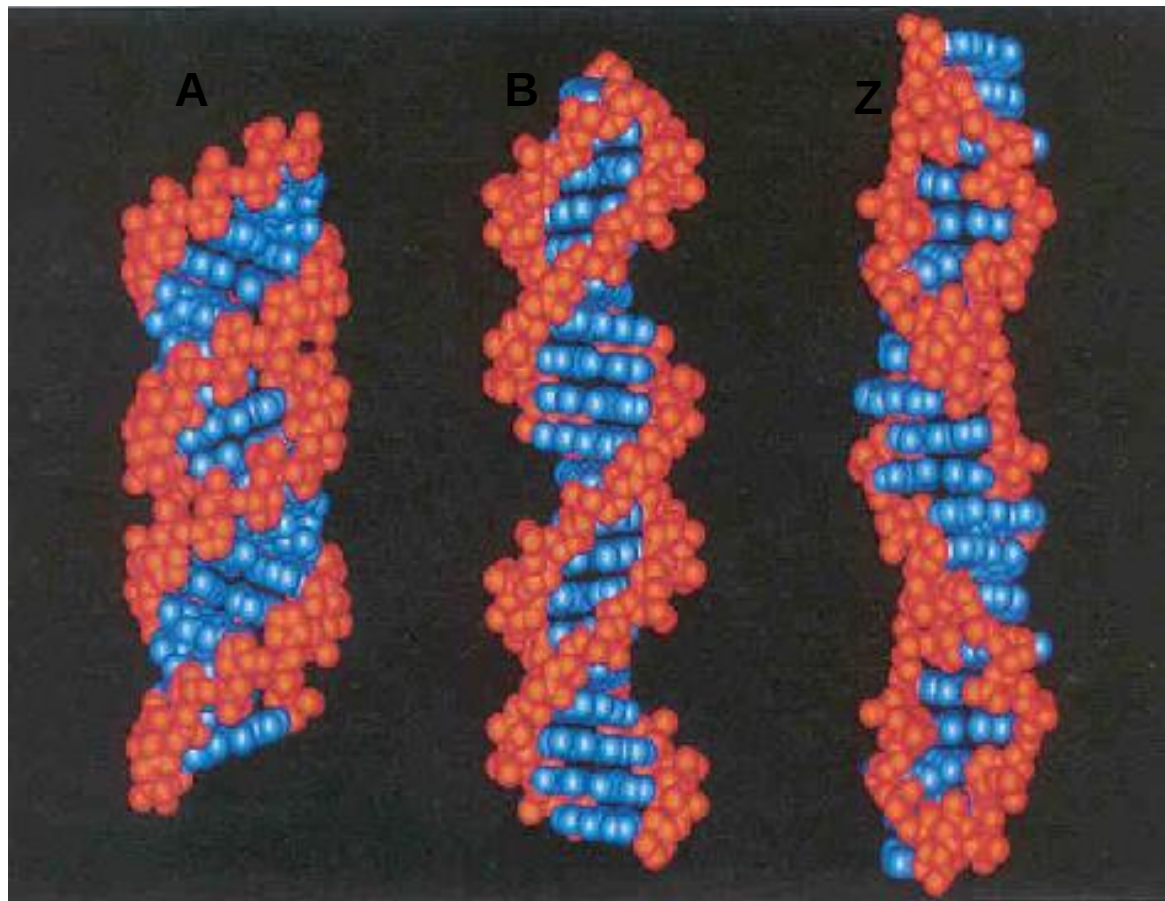
- Abszorbancia (egyszálú DNS-nek magasabb az abszorbanciája)
- Fluoreszcencia (interkalátor festékek, pl. Sybr green, etídium-bromid, daunomicin)





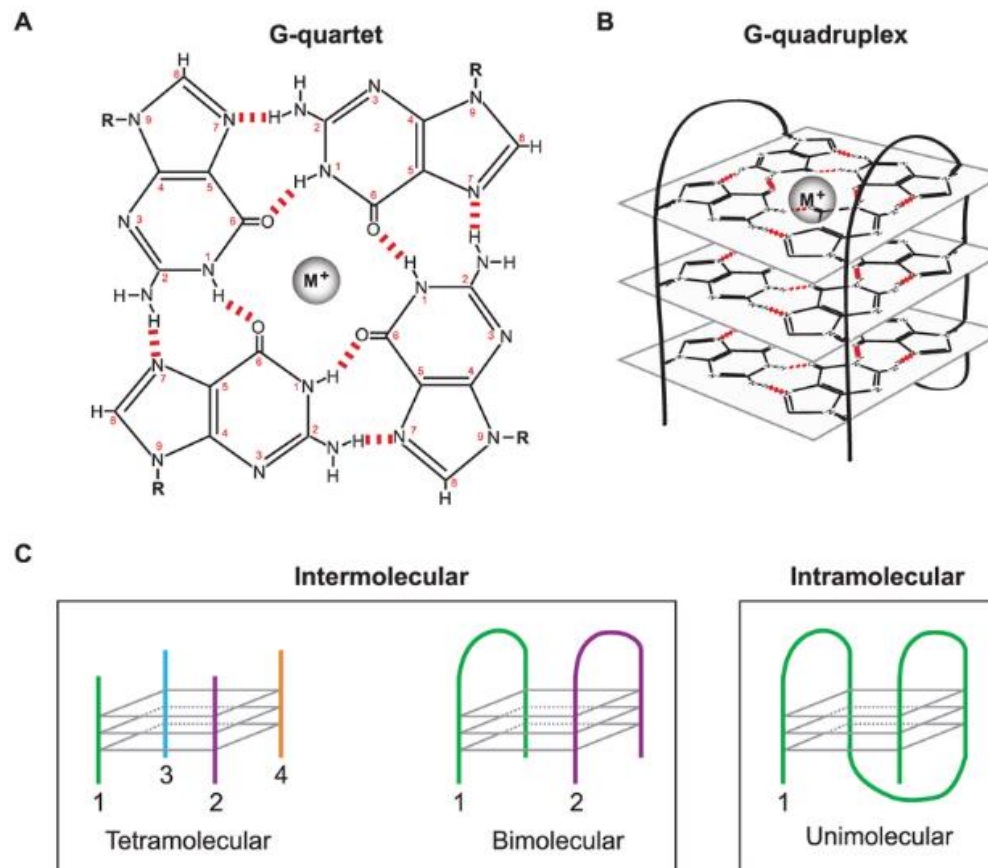
Egyéb DNS szerkezetek

- Az élőlényekben és vizes oldatban a „B” forma a leggyakoribb, ebben a bázisok síkja majdnem merőleges a cukor-foszfát gerincre.
- Dehidratált körülmények között egy tömörebb „A” forma jön létre, melyben a bázisok síkja megdől.
- Hosszú GCGCGC.... ismétlődések a Z formát vehetik fel, amely balmenetes, cikk-cakkos lefutású és megnyúlt.



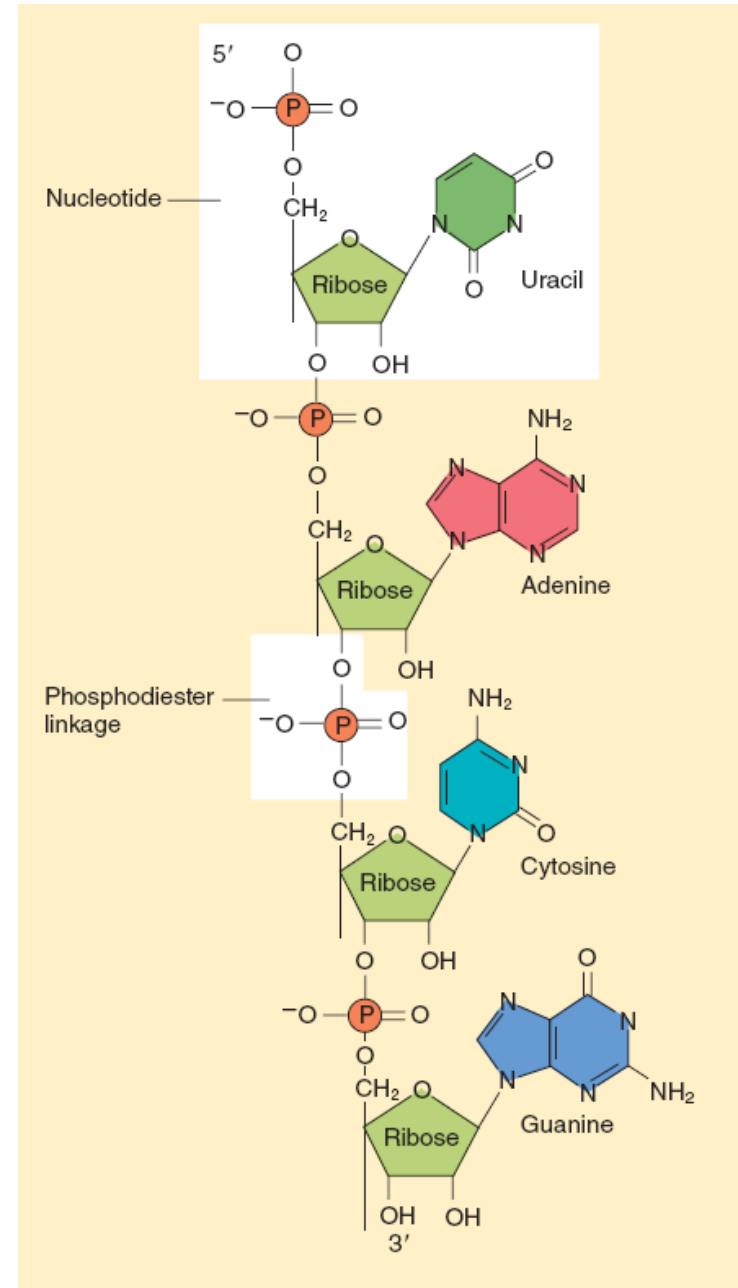
Egyéb DNS szerkezetek

- G-tetrád (G-quadruplex)
- 1, 2 vagy 4 szálból
- Paralell, antiparalell
- G-gazdag régiók
- Hoogsteen H-kötés
- Kromoszómák végein (telomer régió - védekezés), génszabályozási régiókban
- Fémion (Kálium)



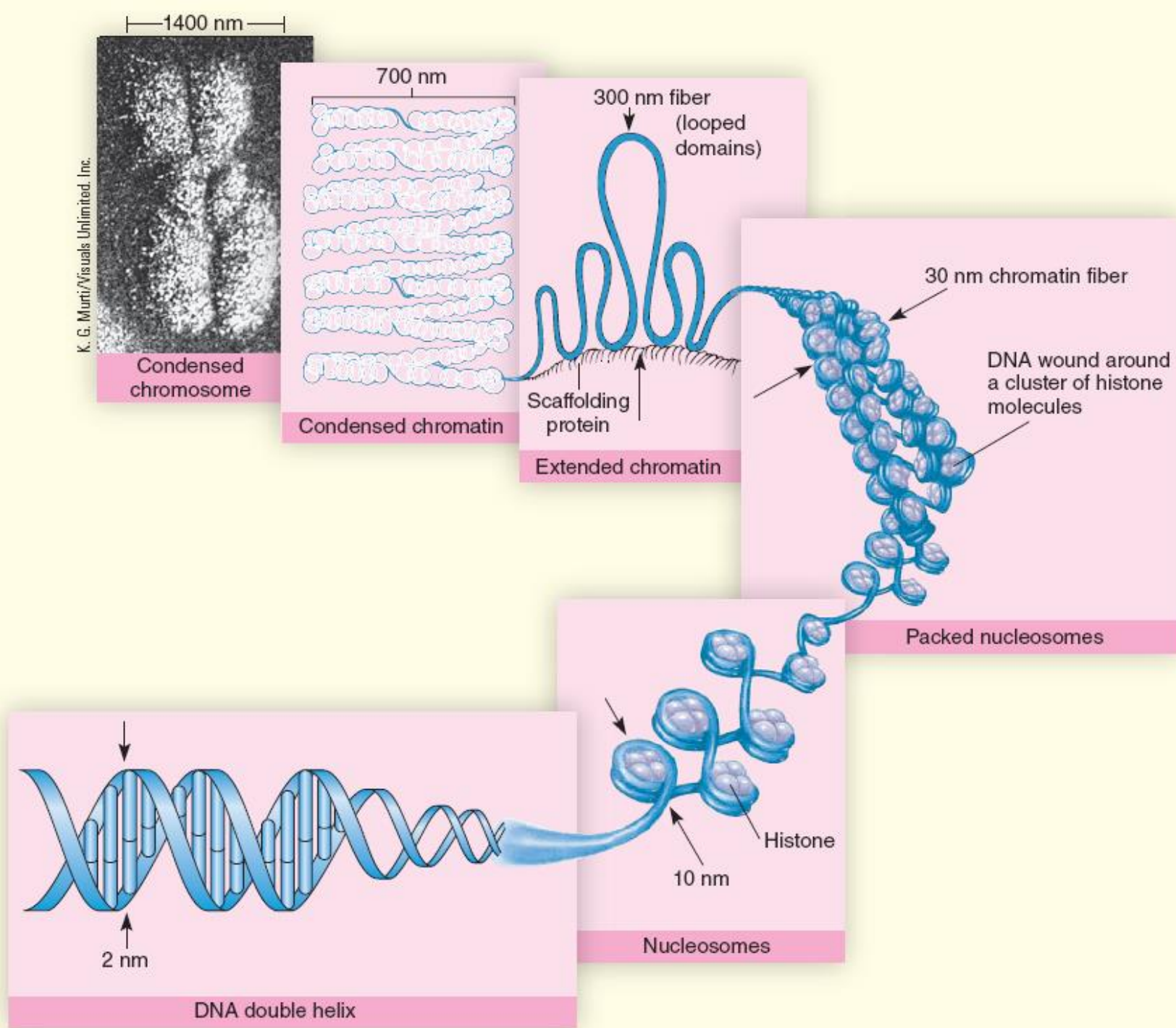
Ribonukleinsavak, RNS

- Cukor-foszfát gerinc (foszfodiészter kötés)
- A, G, C, U
- 5' → 3'
- Egyszálú, önmagával hibridizálódhat (pl. tRNS, siRNS)
- tRNS, rRNS, mRNS, miRNS, siRNS, ribozimok



A DNS harmadlagos szerkezete „csomagolása”

- egyenes szálú (eukarióták)
- cirkuláris (prokarióták, mitokondrium)
- „csomagolás” (szuperhélix, pl. kromoszómákban)



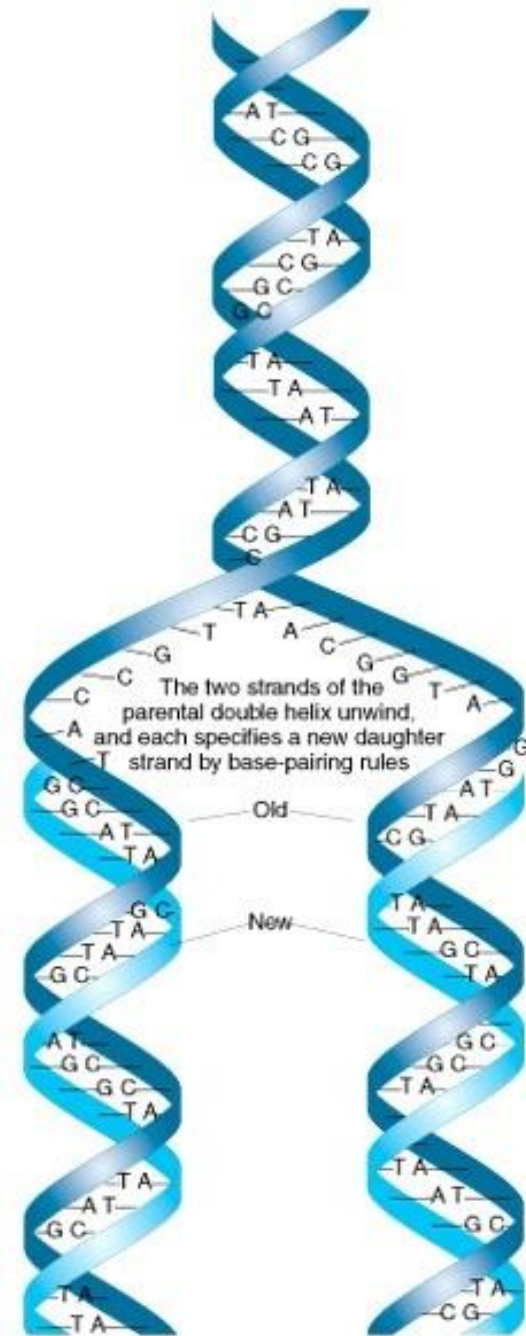
2.2 A DNS replikációja

Alapelvek

- Meselson és Stahl (1958) – **szemikonzervatív** replikáció (az új DNS kettős hélix egyik szála a régi, másik újonnan szintetizált)
- **Sokszor:** Egyetlen ember egyedfejlődése több millió sejtosztódást igényel.
- **Gyorsan:** 1200 nukleotid/perc

- **Pontosan:** A genom másolásánál csupán 1/ 100 000 000 (10^{-8}) replikációs hiba történik, melynek 99%-át a javító rendszer utólagosan kijavítja (Az átlagos mutációs ráta a replikáció végeztével 10^{-10})
- Vagyis a 10^9 bp genom méretű emberi sejt átlagos osztódása során 0-1 új mutáció keletkezik replikációs hiba folytán.

- A DNS kettős spirál szerkezetéből közvetlenül adódik a megkettőződés mikéntje.
- A bázispárosodás szigorú törvényéből az következik, hogy mind a két szál (templátként) szolgálhat
- A genetikai kódot a nukleotid sorrend adhatja.

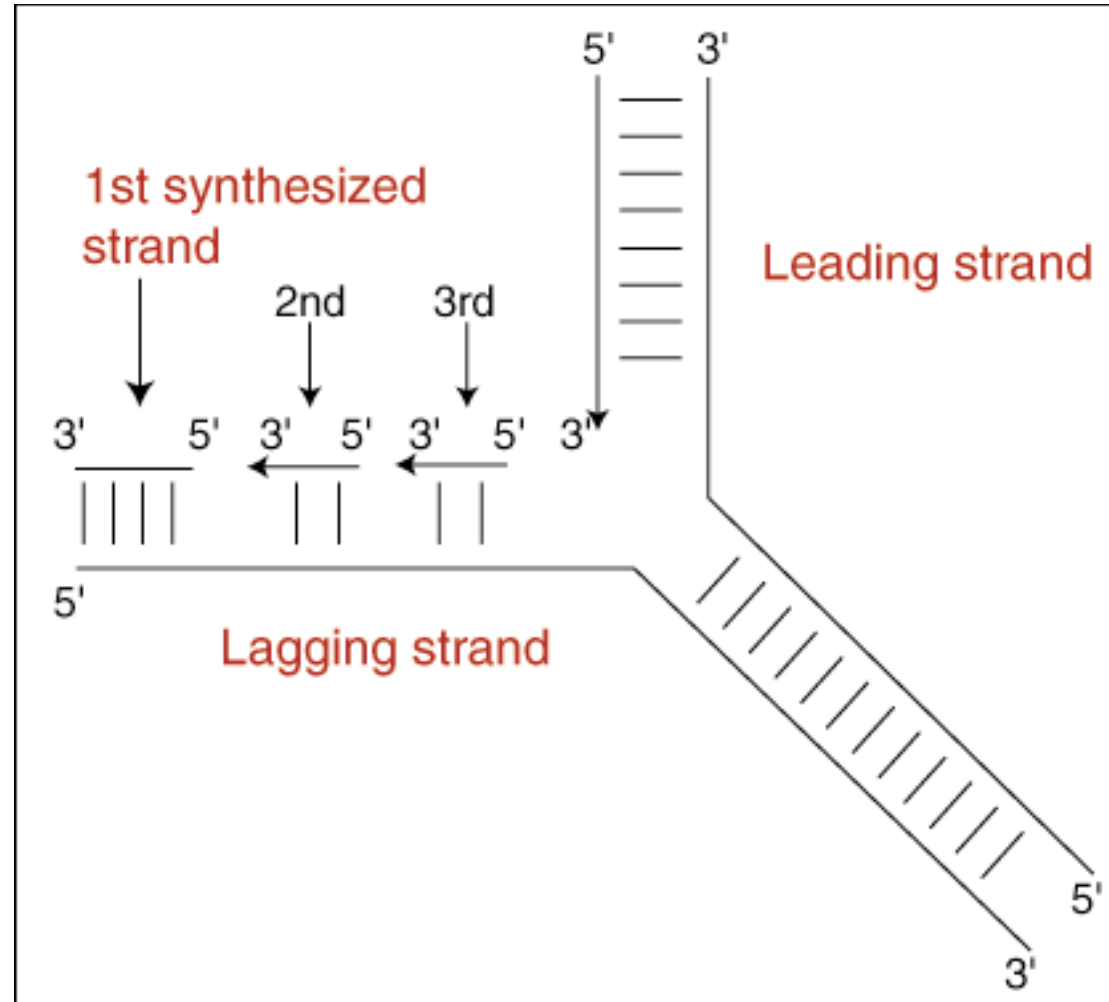


Enzimek

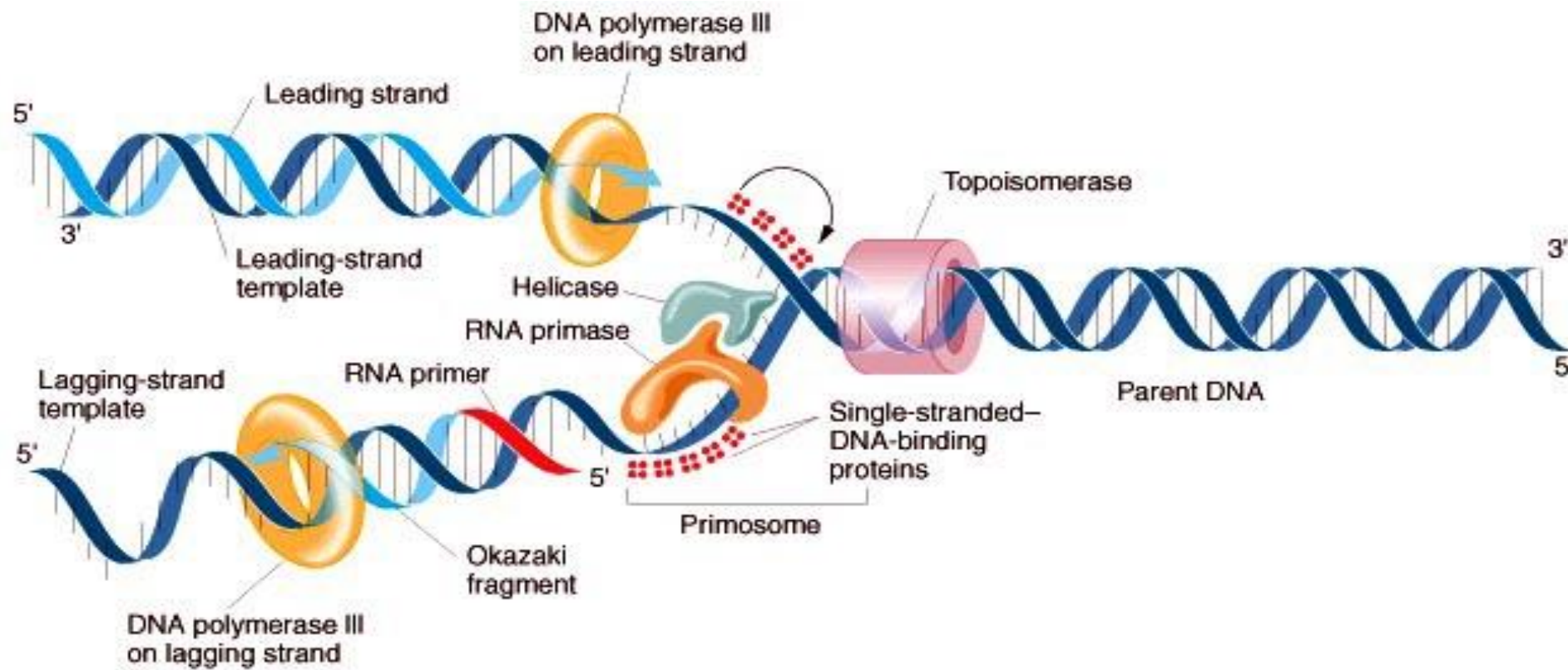
- **Topoizomeráz:** „letekeri” a DNS-t (pl. giráz) nukleáz+ligáz (*gátlók: Daunomicin, doxorubicin, SN38*)
- **Helikáz:** Szétszedi a kettős szálát (replikációs villa, cipzár)
- **Egyszálú DNS-t stabilizáló fehérjék** (SSB proteins) – ne rehibridizálódjon, ne bontsák le a nukleázok
- **DNS primáz** (DNS dependens RNS polimeráz): 5-14 nukleotid hosszú RNS primert szintetizál
- **DNS polimeráz** (DNS dependens DNS polimeráz 5' -> 3' irányban szintetizál, azaz a 3' -> 5' a templát)

A replikáció mechanizmusa

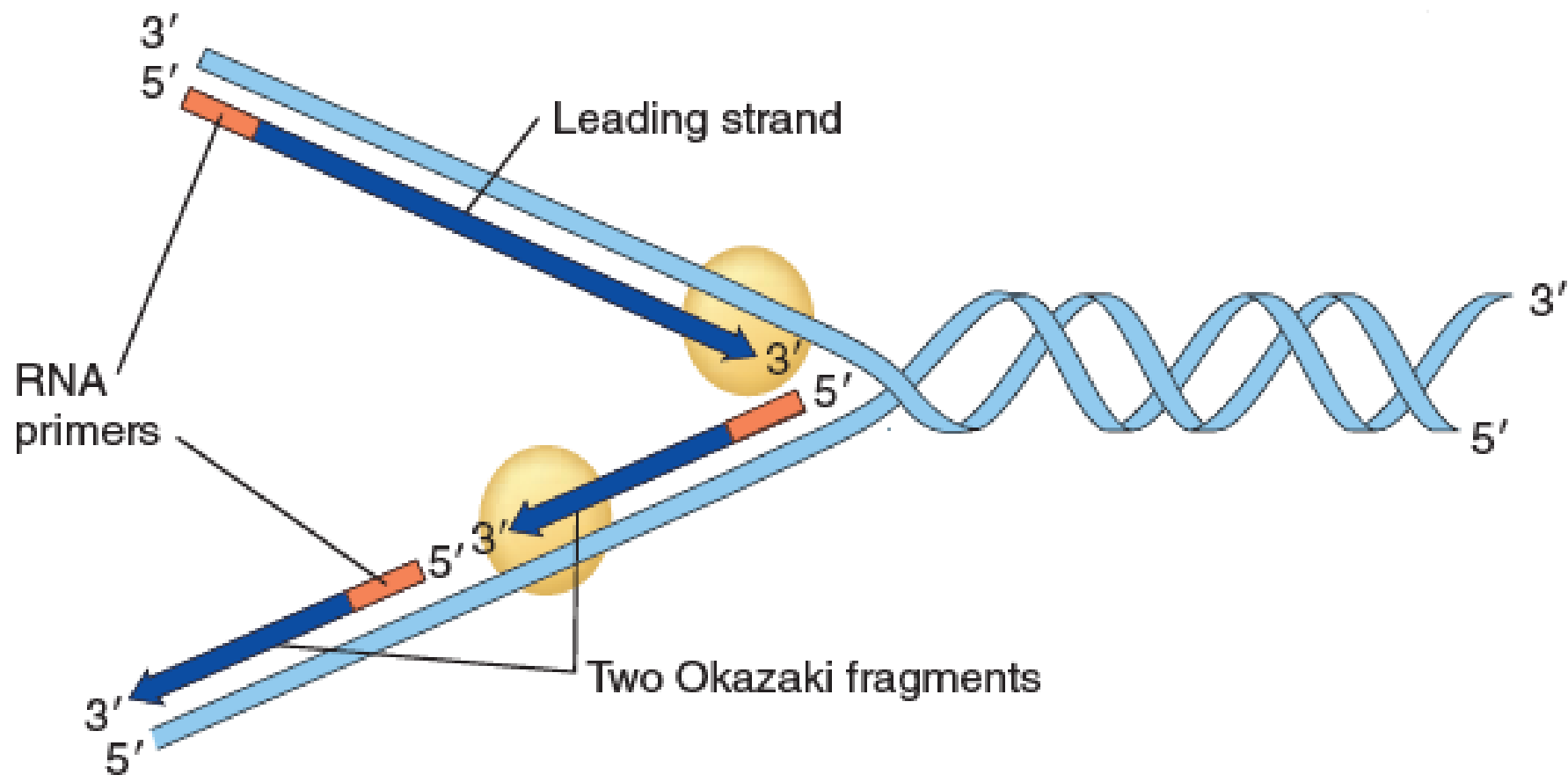
- Replikációs **origók**
- Cipzárként szétnyíló szál
- 5' → 3' irányú szintézis
- **Vezető, lemaradó szál**
(Okazaki fragmensek)



A replikáció enzimei



- RNS primáz elkezdi a szintézist
- DNS polimeráz (DNS dependens DNS polimeráz):
meglevő oligonukleotidot tovább építi, RNS primert
leemészt
- Az egyik szálon folyamatos a szintézis (vezető szál), a
másikon szakaszos (lemaradó szál)
- DNS ligáz: az Okazaki fragmenseket összerakja
- Cirkuláris DNS vs. Lineáris DNS



Telomerek

- A DNS szál (kromoszóma) vége, kromoszómák ne tapadjanak össze
- A DNS polimeráz nem írja át ezen szakaszokat végig
- DNS folyamatosan rövidül
- Tartalmaz-e információt vagy sem?
- Hosszú ismétlődő, nem kódoló szakaszok, minél hosszabb, annál többször tud osztódni a sejt (sejtek öregedése)
- Telomeráz: képes megújítani a telomer régiót (ivarsejtek, rákos sejtek, nem cirkuláris baktériumok) – telomeráz gén szabályozása

Hibajavítás

- Rossz nukleotid beépülése
- DNS polimeráz ha észleli, leszedi, javítja (kb. 1 hiba marad $10^9 - 10^{10}$ bázispárra)
- **Mismatch** felismerő enzimek (leemésztik a hibás bázist utána DNS polimeráz pótolja)
- DNS defektek, pl. Timin dimerek (UV sugárzás) – nukleotid kivágásos mechanizmus (Xeroderma pigmentosum)

Az öröklődés alapjai, gén, genetikai kód

- **Centrális dogma:** DNS-RNS-fehérje közti információáramlás
- Az információ a nukleinsavakban tárolva, a tulajdonság a fehérjék szintjén jelenik meg
- DNS-DNS (**replikáció**)
- DNS-RNS (**transzkripció**)
- RNS –fehérje (**transzláció**)
- RNS-RNS (**replikáció**)
- RNS-DNS (**reverz transzkripció**)

Gének

- **Gén:** az öröklődés molekuláris egysége (egy fehérjét, vagy RNS-t kódoló nukleinsav szakasz)
- **Genom:** egy szervezet teljes génkészlete (kromoszómákban)
- **Génexpresszió:** a kódok manifestálódása (fehérje, RNS)
- Gének aktív / nyugvó állapota (differenciáció, egyedfejlődés, miRNS, siRNS, hisztonok)

A genetikai kód

- **Triplet:** egy aminosavat kódoló DNS bázishármas (64)
- **Kodon:** a triplettel komplementer bázishármas az RNS-en
- Met, Trp egy kodon
- Lötyögés (Wobbling)

		Second letter					
		U	C	A	G		
First letter (5' end)	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU UCC Ser UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U	Third letter (3' end)
	C	CUU CUC Leu CUA CUG	CCU CCC Pro CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU CGC Arg CGA CGG	U	
	A	AUU AUC Ile AUA AUG Met or start	ACU ACC Thr ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U	
	G	GUU GUC Val GUA GUG	GCU GCC Ala GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU GGC Gly GGA GGG	U	

 = Stop codon
 = Start codon

A genetikai kód

- **Degenerált kód:** egy aminosavat több triplet is kódolhat
- **Start / stop kodonok**

		Second letter					
		U	C	A	G		
First letter (5' end)	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC UGA Stop UGG Trp	U C A G	Third letter (3' end)
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU Arg CGC CGA CGG	U C A G	
	A	AUU Ile AUC AUA AUG Met or start	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G	
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	U C A G	
		= Stop codon					
		= Start codon					