

Nukleinsavak, transzkripció, transláció

Dr. Gyórfy Andrea PhD

Experimentális Toxikológia Szakképzés
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar

Nukleinsavak, transzkripció, transzláció 1.

I. A DNS

- A DNS szerkezete
- A DNS replikációja prokariótákban és eukariótákban
- Az eukarióta kromoszóma
- A sejtciklus szabályozása, tumorsupresszor gének
- Extranukleáris DNS
- A DNS-károsodások javítása
- Mutációk
- Rekombináció

Nukleinsavak, transzkripció, transzláció 2.

II. AZ RNS és a transzkripció

- RNS-típusok
- Transzkripció a prokariótákban
 - Transzkripciós egységek
 - Szabályozás
 - Az elsődleges átírat érése
- Transzkripció eukariótákban
- Eukarióta transzkripciós faktorok
- Az rRNS és tRNS transzkripciója eukariótákban

Nukleinsavak, transzkripció, transzláció 3.

III. Transzláció

- A kódszótár
- A translációban részt vevő elemek
- Polipeptidláncok szintézise
 - Prokariótákban
 - Eukariótákban
- A kész fehérjék irányítása és poszttranszlációs módosulások
- Fehérjeszintézis a mitokondriumokban
- **Ajánlott irodalom**

A DNS szerkezete 1.

DNS: biológiai információ

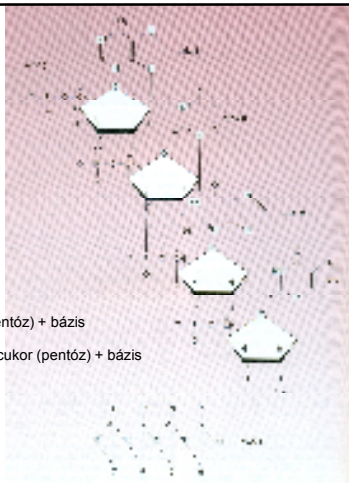
- Fehérjék szerkezete, szabályozás
- 3 betűs kód
- Vírusokban RNS is lehet
- Az információáramlás iránya általában („centrális dogma”):
DNS » RNS » fehérje

A DNS szerkezete 2.

- **DNS:** nukleotidokból álló polimer
- **Nukleotidok:** dezoxi-ribonukleotidok (RNS: ribonukleotidok)
- **Bázisok:** adenin, guanin, citozin, timin (RNS: timin helyett uracil)
 - Bázissorrend: információ
- **Váz:** nukleotidok közötti foszfodiészter-kötések (3'OH-5'OH)
 - 5'-vég: általában foszfátészter, 3'-vég: 3'OH
 - Konvenció: 5'-3' felírás

A DNS elsődleges szerkezete

Nukleozid = cukor (pentóz) + bázis
Nukleotid = foszfát + cukor (pentóz) + bázis



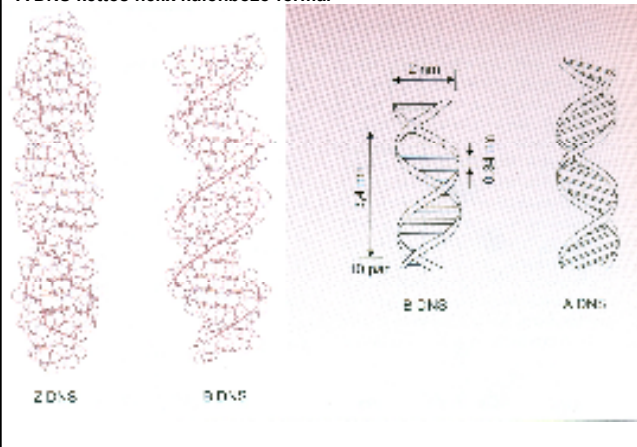
A DNS szerkezete 3.

- Helikális szerkezet (neutrális pH, magas sócc.)
- Kettős helix (általában így fordul elő)
- Antiparallel láncok, köztük hidrogénhidak (komplementer bázispárok között, A=T, G≡C)
- A DNS olvadáspontja: az a T, ahol ezen H-hidak 50%-a felbomlik
- Hibridizáció: DNS-RNS, RNS-RNS

A DNS szerkezete 4.

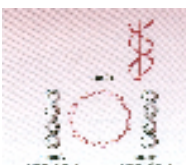
- **B-forma**
 - a leggyakoribb, *in vivo* és vizes oldatban
 - jobbméretes
 - váz kívül, bázisok belül
 - Ø 2 nm
 - egy csavarulat-10 nukleotid
 - nagy és kis árok (nagy árok: szabályozó fehérjék bekapcsolódása!)
- **A-forma:** alacsony sócc. és alacsony nedvesség, egy csavarulat-11 nukleotid
- **C-forma:** egy csavarulat-9 nukleotid
- **Z-forma:** főleg a szabályozásért felelős régiókban, cikk-cakkos váz, balmenetes, egy csavarulat-12 nukleotid, csak egy árok

A DNS kettős helix különböző formái



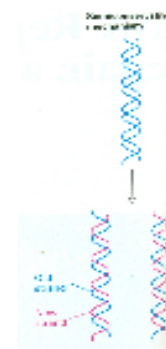
A DNS szerkezete 5.

- **Cirkuláris DNS:** prokarióta genom, eukarióta mitokondriális DNS
- **Lineáris DNS:** eukarióták nukleáris DNS-e
- **Topológiai izomerek:** szupertekercsek
 - Pozitív: a kettős helix csavarulataival egyirányú, zárt szerkezet
 - Negatív: ellentétes irányú, lazább szerkezet
 - Relaxált DNS
 - DNS-topoizomerázok (ATP-igényes)
 - Topoizomeráz I: DNS-relaxáció, topoizomeráz II: negatív szupertekercs
 - I-es típus (csak egy szál), II-es típus (mindkét szál)
 - DNS-giráz: baktériumok cirkuláris DNS-ébe negatív szupertekercs, DNS-replikációban fontos



DNS-replikáció prokariótákban 1.

- Kettős helix, komplementer bázisok: mindkét szál ugyanazt az információt tartalmazza
- **Replikáció:** a szétvált kettős helix mindkét láncáról külön-külön komplementer, antiparallel lefutású új lánc keletkezik
- A replikáció szemikonzervatív: az új láncok egyike a szülői lánc, a másik az új



DNS-replikáció prokariótákban 2.

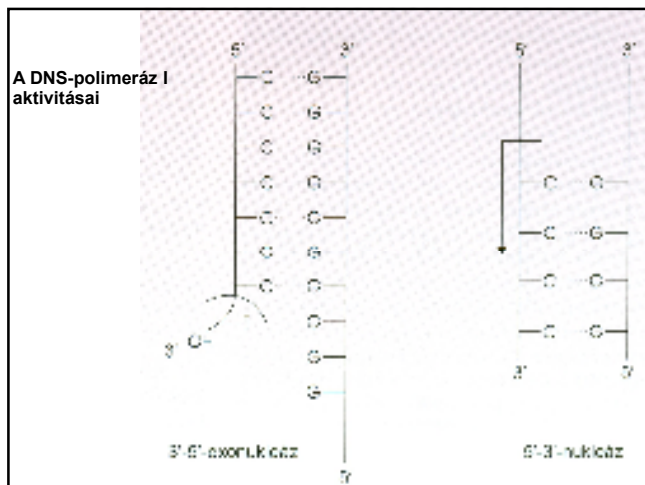
- **A szintézis iránya:** 5'-3' (templát olvasása 3'-5')
- **Szükséges elemek:** dNTP-k (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Mg²⁺, templát DNS, primerek, DNS-dependens DNS-polimeráz, DNS-ligáz
- **Primerek:**
 - Indító láncok, a polimeráz nem tudja létrehozni az első néhány nukleotid egység közötti foszfodiészter-kötéseket
 - A templáttal komplementer DNS- vagy RNS-lánc, szabad 3' OH-val
 - 4-10 nukleotidnyi hosszúságú
 - A primáz szintetizálja (ez RNS-polimeráz)

DNS-replikáció prokariótákban 3.

- **DNS-dependens DNS-polimerázok**
 - DNS-polimeráz III: replikáció
 - Szintetikus aktivitás
 - 3'-5' exonukleáz aktivitás
 - DNS-polimeráz I: javítás, replikációs segédenzim
 - Szintetikus aktivitás
 - Korrekciós 3'-5' exonukleáz aktivitás
 - Hibajavító 5'-3' exonukleáz aktivitás
 - Klenow-fragment: nincs 5'-3' exonukleáz aktivitás

DNS-replikáció prokariótákban 4.

- A primerhez hozzáépülnek a **további dNTP-k:**
 - DNS (n nukleotid)+dNTP » DNS (n+1 nukleotid)+PPi
- **Hibajavítás:**
 - DNS-polimeráz III (korrekciós 3'-5' exonukleáz aktivitás), az újonnan beépített dNTP és a minta megfelelő bázisa közötti H-hidak kialakulása alapján
 - DNS-polimeráz I (hibajavító 5'-3' exonukleáz aktivitás)



DNS-replikáció prokariótákban 5.

- **DNS-ligáz:**
 - Két DNS-lánc összekapcsolása vagy egy lánc körré zárása egy foszfodiészter-kötéssel („nick” megszüntetése)
 - Energiaforrás: NADH-NAD⁺
 - Javításban és rekombinációban is fontos

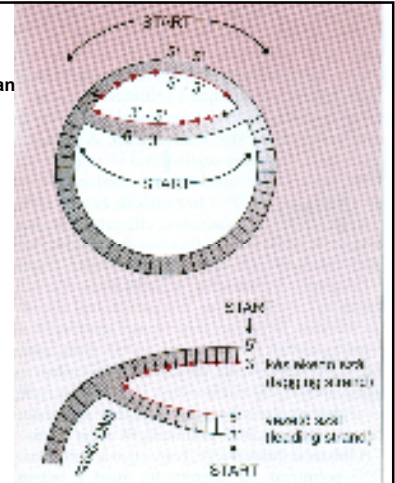
DNS-replikáció prokariótákban 6.

- **Startpont**
- **Replikációs villa**
 - A szülői DNS kettős helix folyamatosan felnyílik
 - Y-alakú: a középső szár a még érintetlen szülői DNS, a két elágazó szár a két szülői-új kettős helix
 - Cirkuláris DNS: két replikációs villa

DNS-replikáció prokariótákban 7.

- **Startpont:** a szülői DNS egyik láncának 5', a másik láncnak pedig a 3' vége
- Emlékeztető: a szintézis iránya: 5'-3' (templát olvasása 3'-5')
- Folyamatos szintézis ezért csak a szülői szál 3' vége felől lehet, az erről szintetizálódó új szál neve „**vezető lánc**”
- A startpontban 5'-végű szülői láncról a szintézis megszakításokkal, a startpont irányában folyik, 1000-1500 nukleotidnyi DNS-szakaszok (Okazaki-fragmentumok) keletkezése közben; ez lesz az ún. „**késlekedő lánc**”
- A vezető lánchoz elég egy primer, a késlekedő lánchoz viszont annyi primer kell, ahány darabból az áll
- Mindkét láncot ugyanaz a DNS-polimeráz III szintetizálja (két aszimmetrikus kar)

DNS-replikáció prokariótákban és a replikációs villa



DNS-replikáció prokariótákban 8.

- **Repliszómák:** a replikációhoz szükséges fehérjék együttese
- **Startpont** (oriC DNS-szakasz) » hozzá dnaA fehérjék kötődnek » DNS lokális olvadása » helix destabilizáló fehérjék (SSB) bekötődése » **iniciációs buborék** képződése » dnaC és dnaB fehérjék bekötődése » helikáz aktivitás
- **DNS-giráz:** negatív szupertekercsek

A DNS-replikáció iniciációja prokariótákban

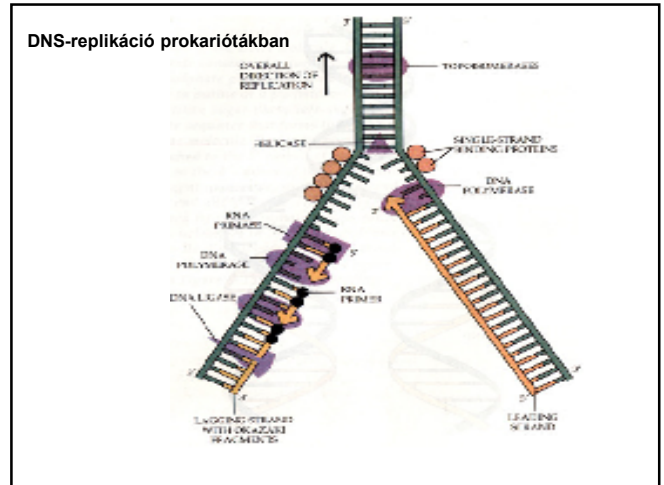
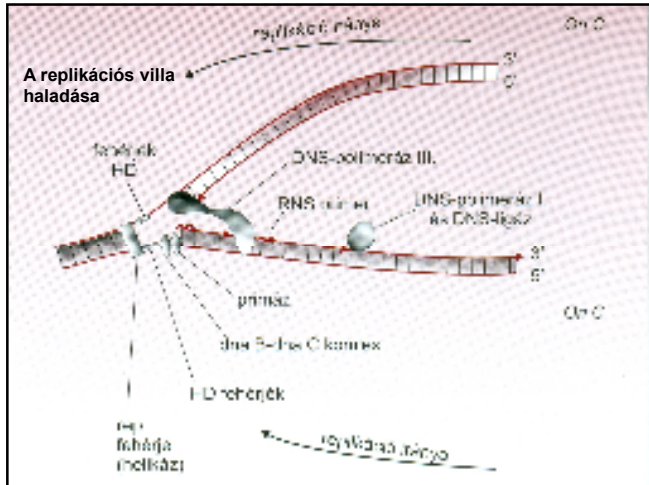


DNS-replikáció prokariótákban 9.

- **Primoszómák:** a dnaB-dnaC komplexhez ún. N-fehérjék, majd a primáz (dnaG) kötődik
- A primoszóma kezdi meg az RNS-primer szintézisét a vezető szálon
- Primoszóma + DNS-polimeráz III + rep fehérjék = Repliszóma
- (rep fehérjék: helikáz aktivitás)
- 1 repliszóma / 1 replikációs villa

DNS-replikáció prokariótákban 10.

- **DNS-polimeráz I** (5'-3' exonukleáz aktivitás)
 - Primerek eltávolítása
 - Okazaki-fragmentumoknál: a második fragmentum szintézisékor le kell bontani az első primerjét, és helyére megfelelő dNTP-eket kell tenni; az utolsó foszfodiészter-kötés létrejöttét a DNS-ligáz katalizálja
 - A láncok egyesítése a startpontban és a replikációs villák találkozásakor



DNS-replikáció prokariótákban 11.

- **Plazmidok:**
 - Kis cirkuláris DNS
 - A nagy cirkuláris DNS-től függetlenül is replikálódhatnak
 - Három típus:
 - F-faktor (szexfaktor) – szexdukción
 - R-faktor (rezisztenciafaktor) – antibiotikumok ellen
 - Kolicinogén faktor
 - Transzpozonok
 - pl. az R-faktorok, egy R-plazmidon több transzpozon is lehet - multirezisztencia
 - olyan DNS-darabok, amelyek másolatai a DNS-en belül vagy DNS-szálok között „ugrálnak”
 - Változó hossz
 - Transzpozáz: a beékelődést katalizálja, a transzpozonon belül van a génje
 - Inzerciói szekvencia: a transzpozon két végén fordítottan ismétlődő szekvenciák, a beilleszkedéshez szükségesek

DNS-replikáció eukariótákban

- Az eukarióta DNS lineáris és hosszabb
- A replikáció egyszerre sok startponton indul el
- A vezető és a késlekedő szálon két különböző DNS-polimeráz működik (vezető szál: δ -DNS-polimeráz; késlekedő szál: α -DNS-polimeráz)
- További DNS-polimerázok: β -polimeráz (javítás), γ -polimeráz (extranukleáris DNS)
- Az eukarióta DNS-polimerázoknak nincs saját exonukleáz aktivitásuk – külön nukleáz enzimek
- DNS-ligáz: ATP-ADP

Az eukarióta kromoszóma 1.

- Az eukarióta DNS annyi molekula, ahány kromoszóma van a sejtben (humán: 46)
- Nyugvó (nem osztódó) sejtekben minden kromoszóma egy molekula lineáris DNS-nek felel meg
- **Kromoszóma**=feltekeredett DNS+fehérjék
- Feltekeredés: összecsomagolás, génaktivitás
- Fehérjék: hiszton- és nem-hiszton (polimerázok, regulátorok stb.) fehérjék

Az eukarióta kromoszóma 2.

- **Hisztonok:**
 - Bázikus fehérjék
 - Konzervatív felépítés
 - „Core-hisztonok”: H2a, H2b, H3, H4
 - A hisztonfehérjék az S-fázisban szintetizálódnak
 - A hisztonok megoszlása konzervatív: a régi hisztonok a vezető láncot tartalmazó DNS-re kerülnek, az újak pedig a késlekedő szálakat tartalmazóra

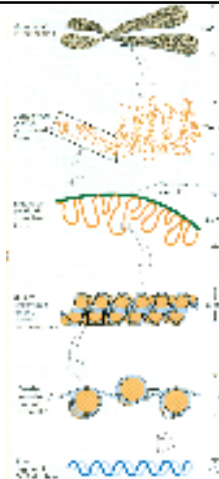
Az eukarióta kromoszóma 3.

• Nukleoszóma:

- Kb. 200 bázispáronként ismétlődik
- 2 „core-hisztin” komplexből áll
- Korong alakú, amire a DNS kb. 150 bp hosszúságban feltekeredik
- Kapcsoló DNS: kb. 50 bp két nukleoszóma között
- H1-hisztin: a DNS-hez és a „core-hisztinok”-hoz is kötődik, kompaktál (ez utóbbi foszforilációfüggő)



Metafázisban levő eukarióta kromoszóma



Az eukarióta kromoszóma 4.

• Telomerek:

- Az eukarióta kromoszómák végein, védik a kromoszómák végét
- Ezek nélkül a kromoszóma a replikációk során állandóan rövidülne, annyival, amilyen hosszú a legutolsó primer volt az 5' végén
- A késlekedő szál templátjának 3' végét ezért a telomeráz meghosszabbítja, de ezek nem szükségesek a késlekedő szálon, így nem baj, ha nem szintetizálódnak a késlekedő szál 5' végén
- A 3' vég túlnyúló szimpla DNS-szál, guaninban gazdag, ismétlődő szekvenciákat tartalmaz
- Felőtt soksejtű szervezetek differenciált szomatikus sejtjeiben nem expresszálódnak a telomeráz (replikációk max. száma?)
- Két replikáció között ún. telomervégi fehérje fedi

A sejtciklus szabályozása, tumorszupresszor gének 1.

• Sejtciklus:

• Interfázis (két mitózis között):

- G1-fázis: fehérjeszintézis, megszabja a sejtciklus hosszát
- S-fázis: DNS-replikáció
- G2-fázis: a diploid sejt felkészül az osztódásra

• G0-fázis:

- G1-fázisból tud kialakulni, nyugvó, nem szaporodó sejtek
- Ezek a sejtek növekedési faktorok hatására beléphetnek a szaporodási ciklusba

A sejtciklus szabályozása, tumorszupresszor gének 2.

• A sejtciklus szabályozása:

- G1/S határon:
 - Ciklin D, ciklin E
 - Ciklindependens protein-kináz 2 és 4
- G2/M határon:
 - Ciklin B
 - Ciklindependens protein-kináz 1

A sejtciklus szabályozása, tumorszupresszor gének 3.

- **Protoonkogének:** ép sejtekben előforduló, a növekedés élettani serkentését szolgáló fehérjéket kódoló gének; szerkezeti/expressziós hibájuk daganatképződéshez vezetnek
- **Tumorszupresszor gének:** Rb-fehérjét, p16 fehérjét, p53 fehérjét kódoló gének, az általuk kódolt fehérjék a sejtproliferációt gátolják, kiesésük daganatképződéshez vezet

Extranukleáris DNS

- **Eukariótákban:** mitokondrium, kloroplasztisz
- **Mitokondriális DNS:**
 - Cirkuláris
 - A mitokondriális fehérjék kb. 5%-át kódolja
 - A sejtciklustól függetlenül replikálódik
 - Anyai ágon öröklődik („Éva-hipotézis”)

A DNS-károsodások javítása 1.

- **A DNS sérülését kiváltó hatások:**
 - Ionizáló sugárzások
 - UV-fény
 - Kémiai hatások
- **DNS-sérülések:**
 - Bázisok változása
 - Bázisok elveszése (pl. depurinizáció)
 - Felesleges bázisok beékelődése
 - Timin-dimerek keletkezése
 - A bázisok oldalláncainak dezaminációja
 - Foszfodiészter-kötések hasadása
 - Keresztkötések létrejötte

A DNS-károsodások javítása 2.

- Károsodás az egyik szálon: ez még a replikáció előtt javításra kerülhet
- Károsodás mindkét szálon / a javítás elmaradása replikáció előtt: a hiba rögzül, a DNS-bázisszekvencia mindkét szálon megváltozik » mutáció
- Minél több helyen károsodik a DNS, illetve minél gyakrabban, annál kisebb a valószínűsége annak, hogy az összes hiba javításra kerül

A DNS-károsodások javítása 3.

- **A javítófolyamatokban részt vevő enzimek:**
 - Specifikus glikozidázok (idegen bázisok felismerése és eltávolítása)
 - Specifikus endonukleázok (sérült nukleotid kivágása)
 - DNS-polimeráz I (prokarióták) (exonukleáz, „gap” befoltozása)
 - β -DNS-polimeráz (eukarióták) („gap” befoltozása)
 - DNS-ligáz („nick” megszüntetése)

A DNS-károsodások javítása 4.

- **p53 tumorszupresszor fehérje:**
 - DNS-károsodás hatására mennyisége megnő
 - A sejteket nem engedi S-fázisba addig, amíg meg nem történik a javítás
 - Ha a sérülések túl nagyok, és nem javíthatóak, elősegíti az érintett sejtek apoptózisát

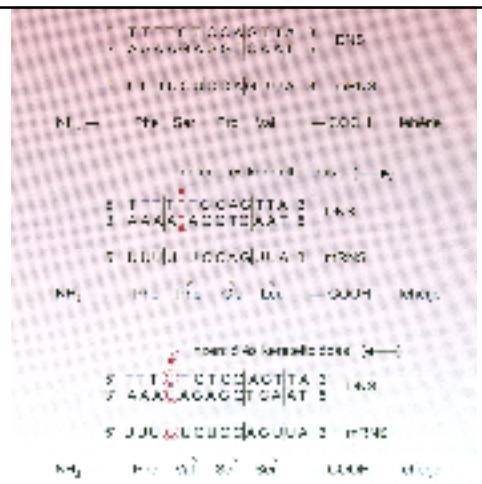
A DNS-károsodások javítása 5.

- „Mismatch repair”: a DNS-polimeráz tévedésének utólagos javítása, addig, amíg az új lánc nincs metilálva
- Teljes láncdarabok kimetszése (akár 1000 bp)

Mutációk 1.

- **Mutáció:** ha a DNS mindkét láncának megváltozott a bázisszekvenciája
- **Pont-mutáció:** egyetlen bázispár változott
 - Szubsztitúció: az eredeti bázispár helyére másik került
 - Tranzíció: egy pirimidinbázis helyére egy másik pirimidinbázis kerül, vagy az egyik purinbázis helyére egy másik purinbázis
 - Transzverzió: egy pirimidin helyére purinbázis kerül (vagy fordítva)
 - Deléció: egy nukleotid kiesése
 - Inzerció: egy többlet-nukleotid beépülése
- **Kereteltolódással („frame shift”) járó mutáció:** ha a deléció/inzerció a DNS fehérjéket kódoló szakaszain történik (a kodonok vesszőmentesen helyezkednek el!)

Kereteltolódással járó mutációk



Mutációk 2.

- **Ames-próba:**
 - Mutagén hatás kimutatására
 - Vizsgálat: egy kérdéses anyag hatására 10^9 hisztidinhiányos baktériumból hány alakul át hisztidin termelésére képes baktériummá, azaz hány baktérium lesz képes szaporodni hisztidin nélkül (ez az ún. szupresszor mutáció jelensége)
 - Kiegészítés: a máj-biotranszformáció hatásának szimulálása citokróm p450 rendszert tartalmazó májkivonattal

Rekombináció

- **Rekombináció:** egy új DNS-molekula képződése különböző eredeti DNS-darabokból
 - Általános genetikai rekombináció: homológ DNS-szakaszok cseréje két kettős szálú szülői DNS között (javítási lehetőség is)
 - Transzpozíció: egy gén mozgása az egyik DNS-molekuláról a másikra, vagy kromoszómán belül (transzpozonok!)
- Példák: vírus DNS integrálódás a gazdasejt genomjába, Ig-gének kialakulása, labor

RNS-típusok 1.

- Emlékeztető: DNS » RNS » fehérje
- **Messenger RNS (mRNS):** a DNS-től a riboszómákhoz szállítja a fehérjék elsődleges szerkezetére vonatkozó információt
- **Riboszomális RNS (rRNS):** a riboszómák felépítésében vesz részt
- **Transzfer RNS (tRNS):** a kodonokat a megfelelő aminosav-szekvenciára átfordító adapter molekulák

RNS-típusok 2.

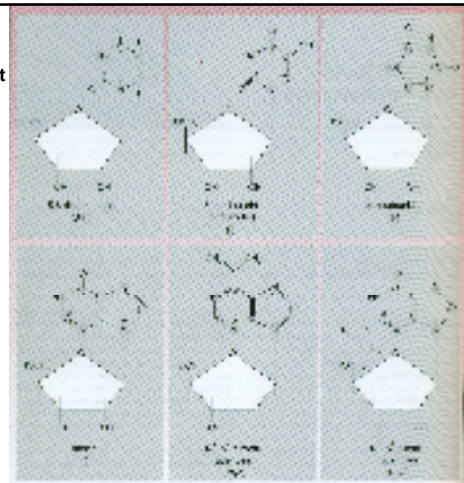
- **További típusok eukariótákban:**
 - Heteronukleáris RNS (hnRNS): az érett mRNS előanyagai
 - Kisméretű nukleáris RNS (snRNS): szerep az mRNS éréseben
 - Kisméretű citoplazmái RNS (scRNS): riboszómák irányítása az endoplazmatikus retikulumhoz
 - Mitokondriális rRNS és tRNS

RNS-típusok 3.

• Az RNS-ek szerkezete:

- Egyszálú, lineáris
- Elsődleges szerkezet: meghatározott bázisszekvencia, foszfodiészter-kötésekkel összekapcsolt polinukleotid lánc
- Másodlagos szerkezet (helikális szakaszok, hajtűk)
- Harmadlagos szerkezet (pl. tRNS)

Módosított bázisokat tartalmazó RNS-nukleozidok



Transzkripció prokariótákban 1.

- **Az RNS-szintézis iránya:** 5'-3' (a DNS-minta olvasása: 3'-5')
- **Komplementaritás elve:** a szintetizálódó RNS polaritása és bázisszekvenciája ugyanolyan, mint a minta DNS-szállal komplementer másik DNS-szálé (kivétel: timin helyett uracil)
 - Pozitív (kódoló, „sense”) DNS-szál: bázisszekvenciája ugyanaz, mint a képződött RNS-é
 - Megjegyzés szerint egy génszakasz szekvenciájának megadásakor csak a pozitív szál szekvenciáját adjuk meg, balról jobbra, 5'-3' irányban
 - Negatív (templát, „antisense”) DNS-szál: a minta DNS-szál, amelyről az RNS átíródott

Transzkripció prokariótákban 2.

- **A transzkripcióhoz szükséges elemek:**
 - DNS-dependens RNS-polimeráz
 - NTP (ATP, GTP, CTP, UTP)
 - Mg^{2+}
 - A reakció sémája:
 - $RNS(n \text{ nukleotid}) + NTP \gg RNS(n+1 \text{ nukleotid}) + PPi$

Transzkripció prokariótákban 3.

- **DNS-dependens RNS-polimerázok:**
 - Nem igényelnek primert
 - Nincs nukleáz aktivitásuk, így hibajavításra sem képesek
 - „core” enzim: 4 alegység (DNS-kötés, NTP-kötés) + szigma-alegység (transzkripció specifikus iniciációs helyének felismerése)=holoenzim

Transzkripció prokariótákban 4. Transzkripciós egységek

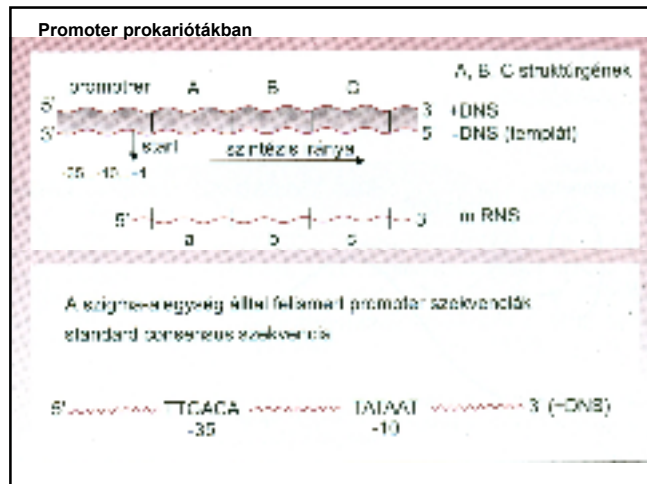
- **Promoter:**
 - A transzkripció specifikus iniciációs helyét felismerő DNS-szakasz
 - Minden transzkripciós egység kezdete
 - A transzkripciós egység 5' végén van
 - Fehérjét nem kódol
 - Tartalmazza a DNS-dependens RNS-polimeráz kötőhelyét
 - Szabályozó fehérjék kötőhelyei
 - Erős promoterek: konszenzus szekvencia, szigma-alegység nagy affinitással kötődik hozzá
 - Gyenge promoterek: a konszenzustól eltérő szekvencia, a szigma-alegység kisebb affinitással kötődik

Transzkripció prokariótákban 5. Transzkripció egységek

• Promoter (folytatás):

- Polipeptidláncot nem kódol
- -10-es szekvencia (Pribnow-box): TATAAT
- -35-ös szekvencia: TTGACA

(transzkripció startpontja: +1-es nukleotid, ettől felfelé [5' vég felé] negatív, lefelé pozitív számok)



Transzkripció prokariótákban 6. Transzkripció egységek

• Struktúrgének:

- A promoter régió után helyezkednek el
- Egy-egy adott polipeptidláncot kódolnak (cisztronok)
- Minden polipeptidlánc struktúrgénjéből csak egy van a genomban
- Policisztronos transzkripció egység: egy promoter irányítása alatt több polipeptidláncnyi gén kerül átírásra – policisztronos mRNS (pl. egy anyagcsereú enzimek)

Transzkripció prokariótákban 7.

• A transzkripció lépései:

1. Az RNS-polimeráz bekötődése a promoteren és a transzkripció iniciációja
2. Elongáció
3. Termináció

Transzkripció prokariótákban 8.

• Iniciáció:

- Az RNS-polimeráz holoenzim bekötődik a promoterekhez » Zárt promotor komplex
- Nyitott promotor komplex (a DNS kettős helix egy rövid szakaszon széttekeredik)
- Az új RNS első nukleotidja általában purinbázist tartalmaz
- Amint az első és a második nukleotid között kialakul a foszfodiészter-kötés, a szigma-faktor disszociál a komplexről

Transzkripció prokariótákban 9.

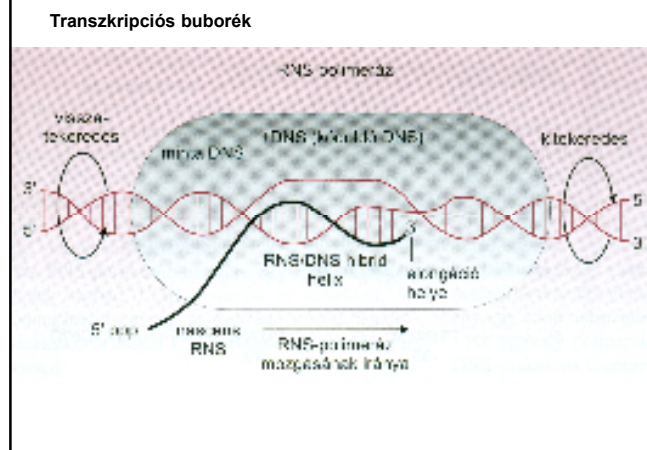
• Elongáció:

- A szintézis aktuális helyén a DNS kettős helix széttekeredik
- A minta DNS-szállal (negatív szál) komplementer RNS épül fel
- DNS-RNS hibrid
- A kész RNS leválik a DNS-ről
- A DNS visszatekeredik
- Prokarióták: már a transzkripció közben megindul a transláció

Transzkripció prokariótákban 10.

• Termináció:

- Terminációs szekvencia a transzkripció egységek végén, ami az RNS-re átíródva hajtúszzerű képződményt hoz létre (palindrom szerkezet) (egy esetben emellett még egy ún. rho-fehérje is szükséges)
- RNS-DNS hibrid disszociál
- Az RNS-polimeráz leválik a DNS-ről



Transzkripció prokariótákban 11.

• Az elsődleges átírat módosulása:

- Egyes darabok kimetszése (snRNS, ribozim): rRNS, tRNS, mRNS
- Bázisok metilációja: rRNS, tRNS
- Timin, hipoxantin kialakulása: tRNS
- Pszeudouridin szerkezet: tRNS
- CCA szekvencia a 3' végen: tRNS

Transzkripció prokariótákban 12.

• Antibiotikumhatások:

- Aktinomycin D (eukariótákra is hat!): kötődik a DNS kettős helixhez, akadályozza a transzkripciót
- Rifampicin: gátolja a transzkripció iniciációját

Transzkripció prokariótákban 13. A transzkripció szabályozása

- Az mRNS élettideje rövid (T1/2: néhány perc)
- **Konstitutív mRNS-szintézis:** csak attól függ az időegység alatt termelt mRNS mennyisége, hogy a promóter erős vagy gyenge
- **Változó sebességű mRNS-szintézis:** a transzkripció iniciációjának sebességét szabályozó fehérjék
 - Promóteren, vagy a promóter és struktúrgének közötti szakaszon kötnek be
 - Specifikus DNS-szekvenciákat ismernek fel
 - Általában allosztérikus ligandok
 - Negatív vagy pozitív irányú szabályozás

Transzkripció prokariótákban 14. A transzkripció szabályozása

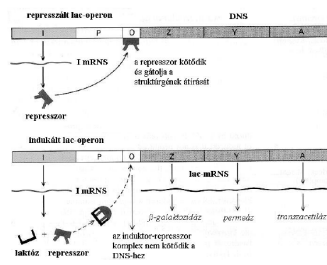
- **Transz-regulációs elem:**
 - A regulátor fehérjét kódoló gén
 - Bárhol lehet a DNS-en, akár egy másik DNS-molekulán is (maga a fehérje a citoplazmában termelődik, és onnan jut a megfelelő génszakaszhoz)
- **Cisz-regulációs elem:**
 - Azok a DNS-szakaszok, amelyekhez regulátor fehérje tud kötődni
 - Ugyanazon a DNS-en kell lennie, mint a transzkripció egységnek; ezen belül is pontosan meghatározott helyen
 - Ezek a DNS-szakaszok fehérjét nem kódolnak

Transzkripció prokariótákban 15. A transzkripció szabályozása

• Induktív szabályozás:

- Operátor: cisz-regulációs elem, egy transzkripció egységén belül a promoteren, illetve a promoter és a struktúrgének között
- Operon: egy adott operátor és az ahhoz kötődő represszor fehérje szabályozása alatt álló transzkripció egység
- A represszor fehérjét kódoló gén transz-elem
- A represszor fehérje általában csak szabad formában tud kötődni
- Induktor molekula: a represszor fehérje allosztérikus ligandja (induktor-represszor komplex)
- Pl. adaptív / induktív enzimrendszerek (laktóz-operon, arabinóz operon, galaktóz operon, triptofán operon)

A laktóz-operon szerkezete és működése



Transzkripció prokariótákban 16. A transzkripció szabályozása

• Represszív szabályozás:

- A represszor fehérje csak allosztérikus ligandjával, a korepresszonnal együtt tud csak kötődni az operátorhoz
- Pl. az operon által kódolt enzimek működésének végterméke feleslegben van jelen

Transzkripció prokariótákban 17. A transzkripció szabályozása

• Attenuátoron keresztüli szabályozás:

- A transzkripció idő előtt befejeződik, még mielőtt a struktúrgének átíródnának
- Az attenuátor régió a promoter és a struktúrgének között helyezkedik el
- Jel: a feleslegben levő aminosavval töltött tRNS
- Pl. triptofán-, hisztidinszintézis

Transzkripció prokariótákban 18. A transzkripció szabályozása

• Pozitív regulátor fehérjéken keresztüli szabályozás:

- Ezek a fehérjék elősegítik a transzkripció iniciációját
- Pl. cAMP-CAP komplex (CAP: cAMP-akceptor fehérje), katabolit-represszió

Transzkripció eukariótákban 1.

- Az eukarióta génekben nem csak kódoló szakaszok (**exonok**) vannak, hanem nem kódoló szakaszok (**intronok**) is
 - Az emberi genomnak csak kb. 10%-a kódoló fehérjét
- Az intronnak megfelelő szakaszok az érett mRNS-ben már nincsenek meg
- A genomon belül gyakoriak az **ismétlődő szekvenciák**

Transzkripció eukariótákban 2.

• DNS-dependens RNS-polimerázok:

- RNS-polimeráz I: rRNS szintézis (18S, 5,8S, 28S)
- RNS-polimeráz II: fehérjét kódoló gének transzkripciója
 - α -amantin (gyilkos galóca [*Amanita phalloides*] toxinja): erősen gátolja az aktivitását
 - Önmagában nem tud a promoterhez kötődni, kellnek transzkripciós faktorok (transz-elemek)
 - „Enhancer” (erősítő) és „silencer” (csendesítő) cisz-elemek
- RNS-polimeráz III: tRNS, 5S rRNS
- Mitokondriumok: speciális RNS-polimeráz

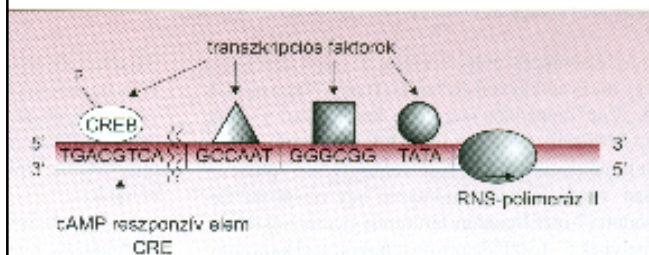


Transzkripció eukariótákban 3.

• Eukarióta promoter:

- Obligát transzkripciós faktorok kötődésére szolgáló konszenzus szekvenciák:
 - -25 szekvencia (TATA-box): TATA^A_TA^A_T
 - GC-box
 - CAAT-box (GG^T_CCAATCT)
- A **transzkripciós faktorok** nem csak a DNS-hez, hanem egymáshoz és az RNS-polimeráz II-höz is kötődhetnek

Promoter eukariótákban



Transzkripció eukariótákban 4.

• Az elsődleges átírat érése:

- A transzkripció terméke az elsődleges átírat (heteronukleáris RNS, hnRNS)
- Az exonoknak és az intronoknak megfelelő szekvenciákat is tartalmazza
- Érés folyamaton kell átmennie
 - Cap-képződés
 - poliA-farok kialakulása
 - Hasítás („splicing”)

Transzkripció eukariótákban 5.

• Cap-képződés:

- Az elsődleges átírat 5' végére 7-metil-guanin nukleotid kerül
- Az eredeti szekvencia első és második ribóza is metiléződik
- Védi az RNS-t a lebomlástól
- Szükséges a transzkripció iniciációjához
- Már a transzkripció terminációja előtt megtörténik

Transzkripció eukariótákban 6.

• poliA-farok kialakulása

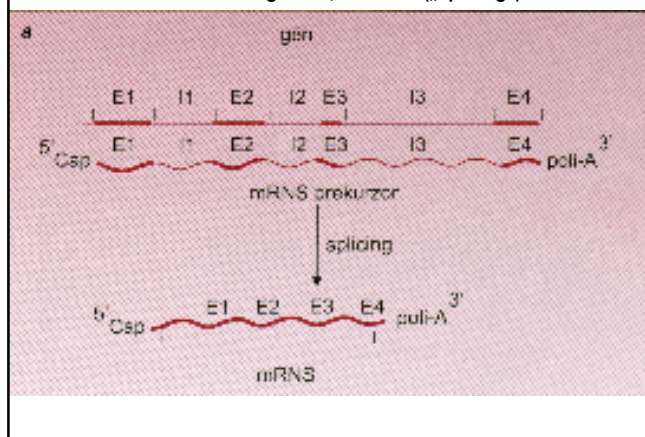
- A transzkripció terminációja után (terminációs jel: AAUAAA szekvencia átíródik, ez a poliA-hely)
- A terminációs jel után a terminátor régió is átíródik (kb. 20 nukleotid), majd az endonukleáz elvágja az átíratot
- A poliA-polimeráz kb. 250 nukleotidnyi láncot épít az átírat 3' végére (ATP-ből)

Transzkripció eukariótákban 7.

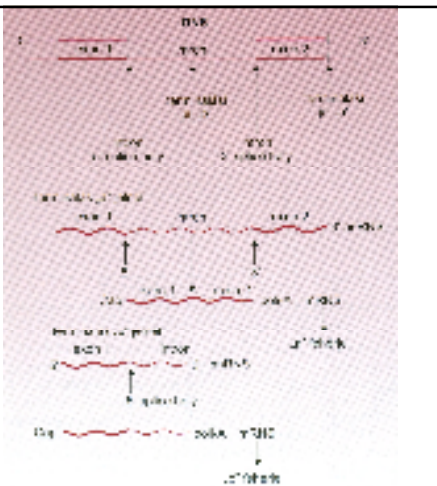
• Hasítás („splicing”):

- Szükséges helyek:
- 5'-splice hely (intron 5' végén)
- 3'-splice hely (intron 3' végén)
- Elágazódási hely (20-50 nukleotidnyira 5' irányban az intron 3' végétől)
- snRNS-ek végzik
- Alternatív hasítás eredményeképp egy DNS-szakaszról többféle fehérje is átíródhat

Exonok és intronok eukarióta génben; a hasítás („splicing”) mechanizmusa



Alternatív hasítás („alternative splicing”)



Eukarióta transzkripció faktorok 1.

- Aktív kromatin: lazább szerkezet
- DNS-metilációja
- Obligát transzkripció faktorok (TATA-boxhoz, GC-boxhoz, CAAT-boxhoz kötődnek)
- Specifikus transzkripció faktorok:
 - Cisz-elemekhez kötődnek (promoteren, enhanceren), pl. CRE, cAMP, szteroidok, AP-1
 - Általában dimérként működnek (homo-, heterodimerek)
 - Pozitív/negatív szabályozás
 - Regulációs kaszkádok
- Hisztonok acetilációja (lazább szerkezet)
- DNS-hez kötődő fehérjék

Eukarióta transzkripció faktorok 2.

• DNS-hez kötődő fehérjék:

- Helix-kanyar-helix szerkezetű fehérjék
- Cinkujjas fehérjék (4 Zn^{2+})
- Leucinzipppzár (a regulációs fehérjék dimerizációját segíti elő)
- Sejten belüli hormonreceptorok (pl. szteroid, PMH, D-vitamin)
- Foszforiláció-defoszforilációval szabályozott transzkripció faktorok (pl. CREB, fos, jun)
- p53 fehérje, Rb-fehérje

Az rRNS és tRNS transzkripciója eukariótákban

- **rRNS:**
 - Eukarióta riboszóma: Nagy alegység: 28S, 5,8S, 5S rRNS; Kis alegység: 18S rRNS
 - A 28S, 5,8S és 18S rRNS-ek egyetlen elsődleges átíratként szintetizálódnak, majd az átírat hasítódik
 - rRNS ribózok metilációja
- **tRNS:**
 - Elsődleges átírat hasítása
 - Utólagos nukleotid hozzáadás
 - Nukleozidok módosulása
 - Metilezés
 - Hipoxantin, dihidrouracil, pszeudouridin

Transzláció – A kódszótár 1.

- DNS » mRNS » Fehérje
- **Kodonok:** az mRNS-en 5'-3' irányban egymást folyamatosan követő nukleotidhármasok; egy-egy nukleotidhármas egy-egy adott aminosavat kódol
- 64 lehetséges kodon van, így lehet, hogy
 - egyes aminosavakat több kodon is kódol (azaz a genetikai kód „degenerált”), illetve hogy
 - vannak ún. „nonsense” (nem kódoló) kodonok, ilyenek a stopkodonok (UGA, UAG, UAA)

Transzláció – A kódszótár 2.

- **AUG kodon**
 - Met kódolása
 - Startpont
- A polipeptidlánc első aminosava (az NH₂-végen) mindig **metionin** (prokariótákban formilmetionin)
- **Olvadási keret:** a startkodon első nukleotidjától a stopkodonig
- A kódszótár **univerzális**

Kódszótár

	első hely 5' vég			második hely			harmadik hely 3' vég					
	U	C	A	G	U	C	A	G	U	C	A	G
U	UUU	UUC	UUA	UUG	UUU	UUC	UUA	UUG	UUU	UUC	UUA	UUG
	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG
	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG
	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG	UUA	UUG
C	CUU	CUC	CUA	CUG	CUU	CUC	CUA	CUG	CUU	CUC	CUA	CUG
	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC
	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC
	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC	CUC
A	AUU	AUC	AUA	AUG	AUU	AUC	AUA	AUG	AUU	AUC	AUA	AUG
	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA
	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA
	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA	AUA
G	GUU	GUC	GUA	GUG	GUU	GUC	GUA	GUG	GUU	GUC	GUA	GUG
	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC
	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC
	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC	GUC

A transzlációban részt vevő elemek 1.

- **A transzláció elemei:**
 - mRNS, rajta a kodonok
 - transzlációs faktorok
 - tRNS, rajta az antikodon
 - aminoacil-tRNS-szintetázok
 - riboszómák

A transzlációban részt vevő elemek 2.

- **mRNS és kodonok**
 - 5'-3' irányban folyamatosan, megszakítás nélkül („vesszőmentesen”) kódolja a polipeptidláncot annak NH₂-végétől a COOH-vége felé
- **Prokarióta mRNS:**
 - Policisztronos mRNS
 - Startjel (iniciátor kodon): AUG
 - Startjel előtt a riboszóma kis alegységének 16 S rRNS-ével komplementer régió
 - Stopkodon (több is lehet egymás után)
- **Eukarióta mRNS:**
 - Csak egy polipeptidláncot kódol
 - 5' végen Cap
 - Startjel: AUG, előtte nem kódoló szakasz
 - Stopkodon, utána nem kódoló szakasz, majd poliA-farok

A transzlációban részt vevő elemek 3.

- **Transzlációs faktorok:**
 - Különbőféle fehérjék
 - A transzláció különböző szakaszában van szerepük

A translációban részt vevő elemek 4.

- **tRNS:**
 - Másodlagos szerkezet: „lóhere” alak
 - Négy hurok:
 - I., II., IV.: konstans szerkezet
 - III.: variábilis, megszabja a molekula nagyságát
 - 5' vég foszforilált, 3' végén CCA nukleotid-szekvencia
 - Harmadlagos szerkezet: L-alak (5' és 3' vég közel kerül, H-hidak)
 - Antikodon-hurok (II. hurok): 7 nukleotidból áll (antikodon: ebből 3 nukleotid)
 - Kodon-antikodon lötyögés: a kodon 3. helyen levő bázisa és az antikodon 1. helyen levő bázisa között nem szabályos bázispárosodások is lehetnek (pl. U-G, inozinsav-U/C/A) » nem minden kodonhoz tartozik külön tRNS
 - Kapcsolatot tud kialakítani az aminoacil-tRNS-szintetázzal is és a riboszómákkal is

A tRNS szerkezete, hurkok



A translációban részt vevő elemek 5.

- **Aminoacil-tRNS-szintetázok:**
 - A tRNS és az antikodonjának megfelelő aminosav közötti kapcsolat kialakulásának specifitásáért felelős (minden aminosavhoz külön enzim, ami felismeri a specifikus tRNS-t)
 - Kétlépéses reakciót katalizál:
 1. Aminosav-aktiválás (ATP, aminoacil-AMP)
 2. Az aktivált aminosav átvitele a specifikus tRNS-re (AMP)
 - ATP+aminosav+tRNS » aminoacil-tRNS+AMP+PPi

A translációban részt vevő elemek 6.

- **Riboszómák:**
 - Prokarióták: 70 S (nagy alegység 50 S, kicsi 30 S)
 - Eukarióták: 80 S (nagy alegység 60 S, kicsi 40 S)
 - Inaktív állapotban a két alegység disszociál
 - Ismétlődő riboszómaciklus: a két alegység ciklikus asszociációja-disszociációja kíséri a folyamatos fehérjeszintézist

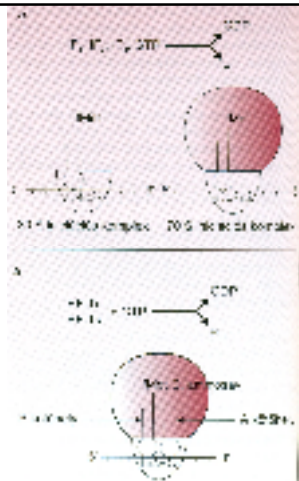
Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 1.

- **Három lépés:**
 1. Iniciáció
 2. Elongáció
 3. Termináció

Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 2.

- **Iniciáció:**
 - 30 S iniciációs komplex:
 - mRNS
 - Riboszóma kis alegysége
 - Startjelhez (AUG) kapcsolódik az iniciátor tRNS antikodonja (közben a szállított Met formileződik)
 - 70 S iniciációs komplex
 - GTP
 - Iniciációs faktorok (IF1, IF2, IF3)
 - Már a teljes riboszómát tartalmazza
 - Két kötőhely: P (peptidil) és A (aminoacil)
 - AUG kodon és az illeszkedő formil-Met-tRNS a P-kötőhelyre kerül
 - Az A-kötőhelyen van a második aminosav kodonja

Polipeptidláncok szintézise
prokariótákban,
iniciációs komplexek



Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 3.

• Elongáció:

- 3 lépésből áll, annyiszor ismétlődik, ahány peptidkötés van a polipeptidláncban
- **1. lépés:**
 - Bekötődik a második aminosavat hordozó aminoacil-tRNS az A-kötőhelyre (GTP, EF-Tu elongációs faktor)
 - EF-Tu GTP-GDP ciklusa időigényes, ami segíti a transláció pontosságát (a nem teljesen komplementer tRNS-nek van ideje disszociálni)
 - EF-Ts: szükséges az EF-Tu működéséhez

Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 4.

• Elongáció, 2. lépés:

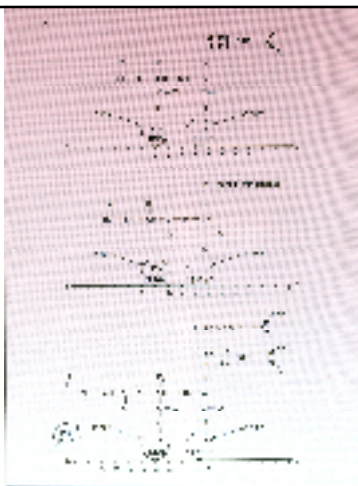
- A P-kötőhelyen levő iniciátor tRNS és az A-helyen bekötött aminoacil-tRNS által hordozott aminosavak között peptidkötés alakul ki (nem igényel külön E-t)
- A peptidkötés kialakulását a peptidil-transzferáz katalizálja
- A peptidkötés kialakulása után a kéttagú peptid a második aminosav tRNS-éhez (ami az A-kötőhelyen van) kötve helyezkedik el

Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 5.

• Elongáció, 3. lépés (transzlokáció):

- Az AUG kodon és az üres iniciátor tRNS legördül a P-helyről
- A P-helyre a második aminosavnak megfelelő kodon és a kéttagú peptidet hordozó tRNS kerül
- Az A-helyen megjelenik a harmadik aminosavat meghatározó kodon
- GTP
- EF-G (transzlokáz)

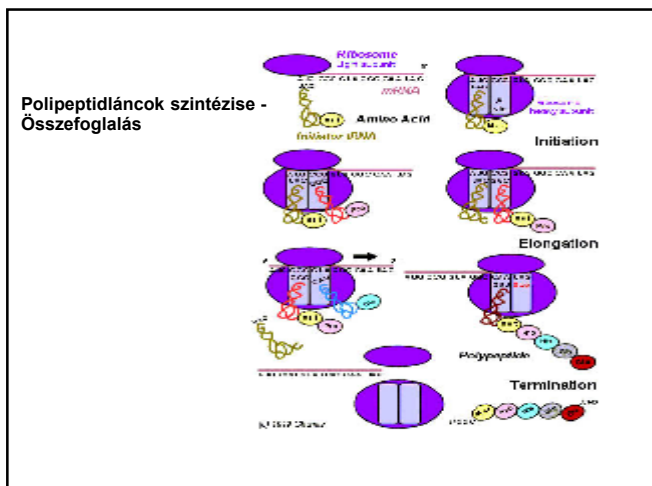
Polipeptidláncok szintézise:
az elongáció lépései



Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 6.

• Termináció:

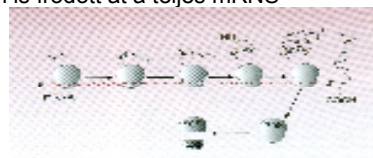
- Az A-helyen megjelenik valamelyik stopkodon
- Terminációs („release”) faktorok kötődnek a stopkodonhoz
- A peptidil-transzferáz lehasítja a polipeptidláncot az utolsó, ekkor a P-helyen levő tRNS-ről
- A polipeptidlánc felszabadul
- A riboszóma két alegysége disszociál



Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 7.

• Poliszómák:

- Egy megfelelő hosszúságú mRNS-en egyszerre több riboszóma is helyet foglalhat (egy riboszóma kb. 80 nukleotidnyi helyet foglal el)
- Ez a szerkezet stabilizálja az mRNS-t
- Prokarióták: már akkor kialakulhat, amikor még nem is íródott át a teljes mRNS



Polipeptidláncok szintézise prokariótákban 8.

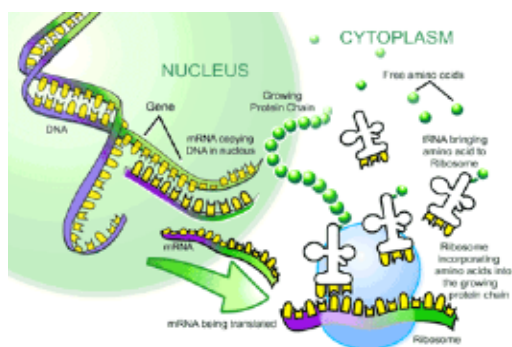
• Antibiotikumhatások:

- Sztreptomycin: iniciáció gátlása, kódtévesztés okozása
- Neomicin, gentamicin: kódtévesztés okozása
- Tetraciklinek: gátolják az aminoacil-tRNS bekötődését
- Klóramfenikol: gátolja a peptidil-transzferázt
- Eritromicin: gátolja a transzlokációt
- Puromicin (eukariótákra is hat!): korai láncterminációt okoz

Polipeptidláncok szintézise eukariótákban

- Eukarióta riboszómák
- Több translációs faktor (foszforilációk!)
- A kezdő Met nem formileződik
- Az eukarióta mRNS csak egy polipeptidláncot kódol, így egy startkodonja van (az 5' véghez legközelebbi AUG)
- A riboszóma kis alegysége a Cap-hoz kötődik, és 3' irányban mozogva keresi az AUG-t (ATP)

Polipeptidláncok szintézise eukariótákban



A kész fehérjék irányítása és posztranszlációs módosulások 1.

- Az újonnan szintetizálódott („nascens”) fehérjék magukon hordozzák azokat a jeleket, amelyek megszabják, hova kerüljenek a sejtben belül (pl. citoszol, plazmamembrán, lizoszóma, sejtmag, mitokondrium, kloroplasztisz)
 - Citoszol fehérjéi: a citoszolban levő szabad riboszómákon szintetizálódnak
 - Lizoszomális, plazmamembrán-, szekretálódó fehérjék: a durva felületű endoplazmatikus retikulum riboszómán szintetizálódnak
- **Szignál peptidszekvencia:** 13-36 aminosavból áll, a készülő polipeptidlánc (prefehérje) NH₂-végéhez közel van; később a szignál proteáz hasítja le
- Mitokondriális belépő szekvencia

A kész fehérjék irányítása és poszttranszlációs módosulások 2.

- A formil-Met deformileződik
- A láncvégi Met lehasad (akár már a szintézis befejezése előtt)
- Diszulfidhidak alakulnak ki (láncon belül és láncok között) (tekeráz enzim)
- Prolinok melletti peptidkötések cisz-transz izomerációja
- Acileződés hosszú szénláncú zsírsavakkal (membránhorgony)
- Foszforilálódás (szabályozás is)
- Szénhidrátkomponensek kötődése (» glikoproteinek)
- Glikozil-foszfatidilinozitol-csoport kötődése (EC-expresszió)

Fehérjeszintézis a mitokondriumokban

- Cirkuláris DNS, rRNS, tRNS és fehérjekódoló gének
- A prokariótákéhoz hasonló fehérjeszintetizáló apparátus
- Az univerzális genetikai kód itt nem teljesen érvényes, 4 kodonnak más az értelme

Ajánlott irodalom

- Ádám Veronika (szerk.): Orvosi Biokémia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2006
- Dr. Veresegyházy Tamás: Összehasonlító biokémia I. Az Állatorvos-tudományi Egyetem Jegyzete, Budapest, 1995
- Dr. Veresegyházy Tamás: Génsebészet. A SziE Állatorvos-tudományi Kar Jegyzete, Budapest, 2007
- Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell: Molecular Cell Biology. W.H. Freeman, NY, 2000

Köszönöm a figyelmet!