

# 12.

A DNS szerkezete,

**DNS szintézis = replikáció,**

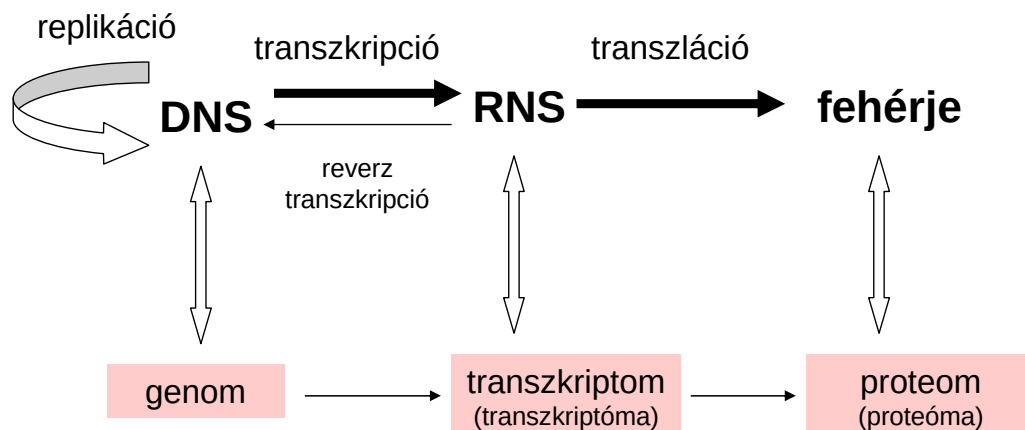
a rekombináció és a DNS hibák  
kijavítása

1

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Visszatekintés:

Az információáramlás iránya makromolekulák között  
(A molekuláris biológia centrális dogmája)



**Replikáció:** A DNS megkettőződése DNS polimeráz enzimek segítségével

**Transzkripció:** RNS szintézise DNS templátról az RNS polimeráz segítségével

**Reverz transzkripció:** bizonyos vírusok genetikai anyaga egyszálú RNS, amely a reverz transzkriptáz enzim segítségével íródik át DNS-sé

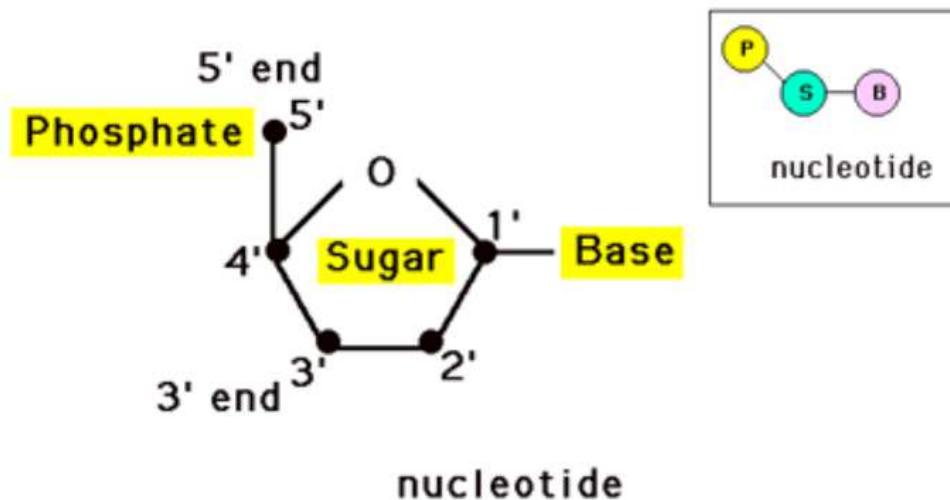
**Transzláció:** A fehérje szintézise RNS templátról a riboszómákon.

2

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Visszatekintés:

A nukleinsavak (DNS, RNS) alkotóelemei a nukleotidok

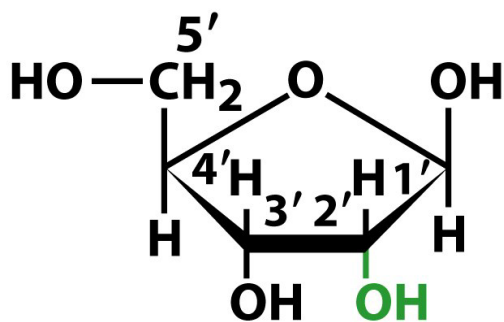


3

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Visszatekintés:

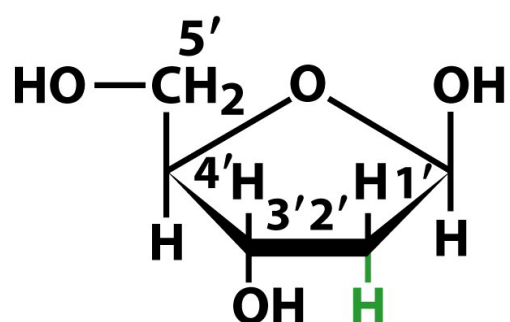
Az RNS és DNS molekulákban található cukrok



**Ribose**

Unnumbered figure pg 42 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

ribóz



**Deoxyribose**

dezoxiribóz

4

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

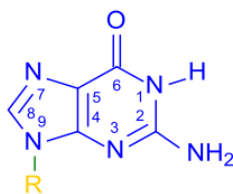
## Visszatekintés:

Az RNS és DNS molekulákban található bázisok

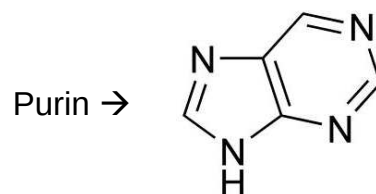
### Purines



Adenine

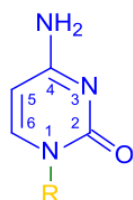


Guanine

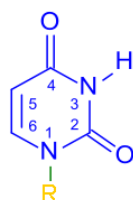


**RNS:** A C G **U**

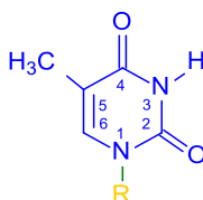
### Pyrimidines



Cytosine

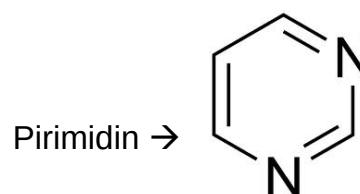


Uracil



Thymine

**DNS:** A C G **T**



5

## A Chargaff szabályok

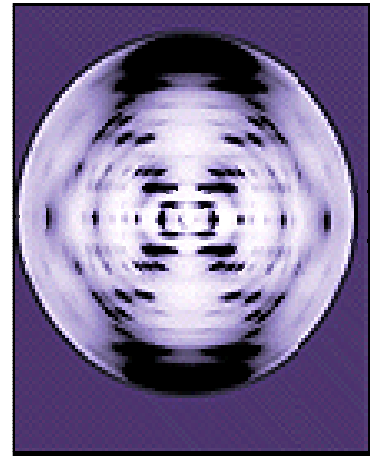
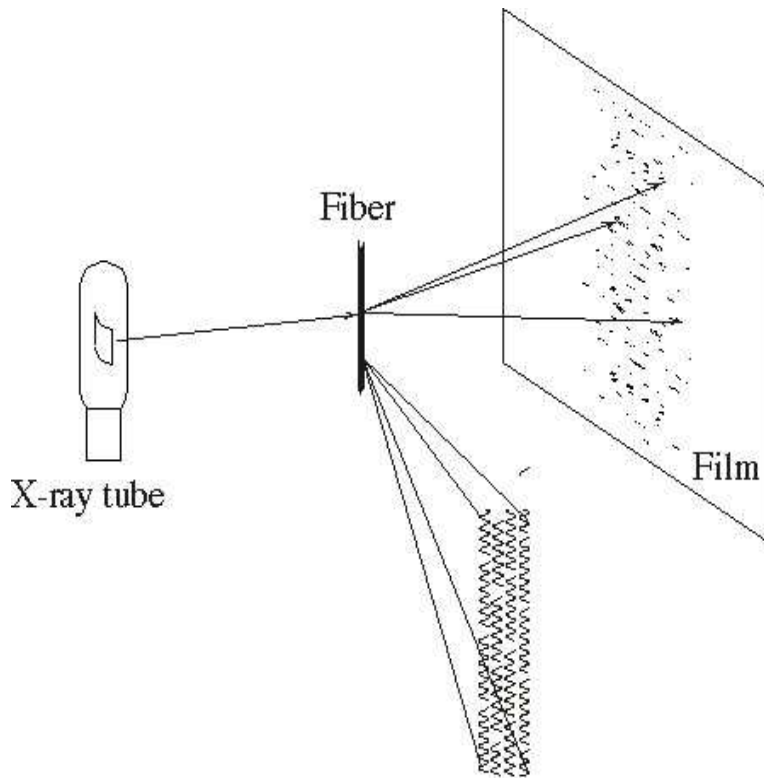
Különböző élőlényekből kivonható DNS összetételének vizsgálata érdekes törvényszerűségeket tárt fel. A törvényszerűségeket Erwin Chargaff ismerte fel:

1. Az élőlényekből származó DNS-ekben a **pirimidin nukleotidok (T + C)** mennyisége egyenlő a **purin (A + G)** nukleotidok mennyiségével.
2. 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.

6

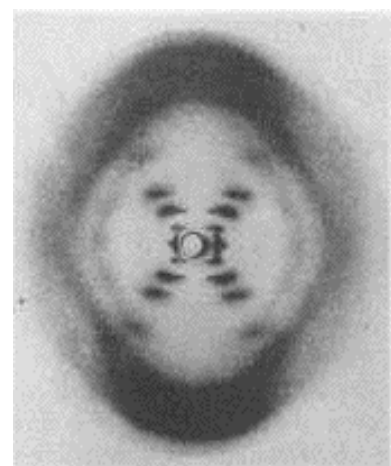
## A DNS röntgen diffrakciós képe (R. Franklin és M. Wilkins, 1953)



7

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobo József

## A DNS (B forma) röntgen diffrakciós képe (R. Franklin és M. Wilkins, 1953)



- A röntgen diffrakcióval kapott adatok azt jelezték, hogy
- a molekula fonálszerű,
  - a fonál két párhuzamos szerkezetből áll.
  - egyenletes átmérőjű,
  - spirál alakú.

8

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobo József

## Visszatekintés:

A DNS térszerkezetét Watson és Crick oldotta meg 1953-ban.



A modell kidolgozása során merészen összeillesztették a röntgen diffrakciós adatokat, a Chargaff szabályokat és a DNS és alkotórészeiről felhalmozódott kémiai ismereteket oly módon, hogy a modell eleget tehessen az örökítő anyag által támasztott követelményeknek.

9

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

NO. 4356 April 25, 1953

NATURE

737

equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

<sup>1</sup> Young, F. B., Gerrard, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1920).

<sup>2</sup> Longuet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astro. Soc., Geophys. Supp.*, **5**, 285 (1949).

<sup>3</sup> Von Arx, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanog. Meteor.*, **11** (3) (1950).

<sup>4</sup> Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, **2** (11) (1905).

### MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

#### A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

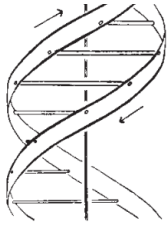
A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey<sup>1</sup>. They kindly made their manuscript available to us in advance of

is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis

dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's<sup>2</sup> model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at

738

NATURE

April 25, 1953

VOL. 171

King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON  
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of



11

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

## Visszatekintés: Bázispárosodás elve

A :: T  
G :: C

Térkitöltés:  
purin - pirimidin párok  
illeszkedő H-hidak

Kötés: foszfodiészter

A kettősszalú DNS komplementer  
szálakból épül fel, ezeknek iránya van:

5' ...ACCGAGTTCGGTCAT... 3'  
3' ...TGGCTCAAGCCAGTA... 5'

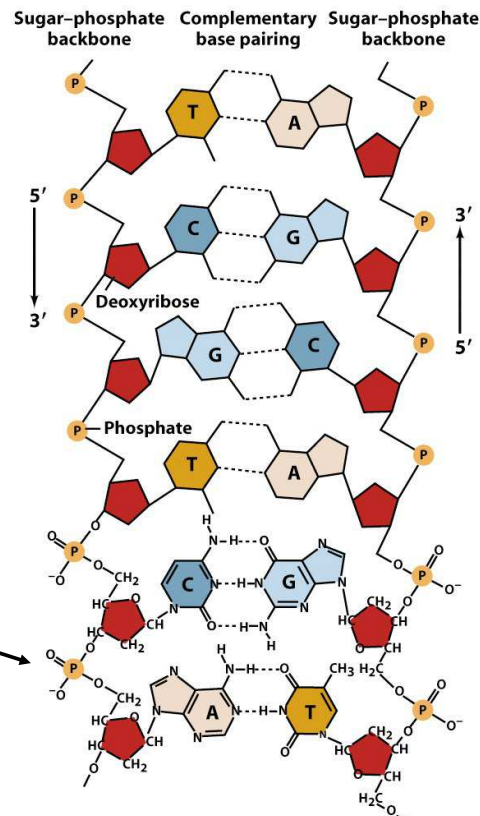


Figure 3-8 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

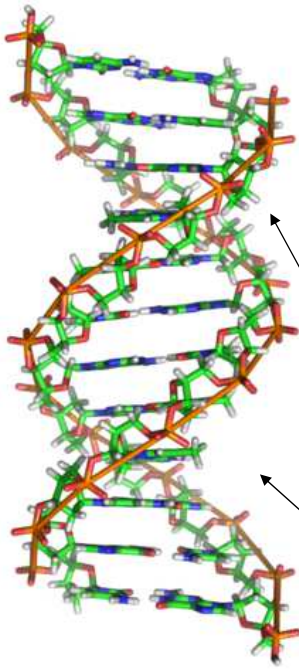
12

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

## Visszatekintés:

### A B-DNS szerkezete

(A Watson-Crick féle modell szerkezet kb. ugyanez.)



Jobbkezes hélix.

A cukor-foszfát váz van kívül a bázisok belül

A bázisok síkja közel merőleges a tengelyre

Emelkedés / bázis = 3.4 Å

~ 10 bázis = egy fordulat (360°)

Átmérő ~ 20 Å

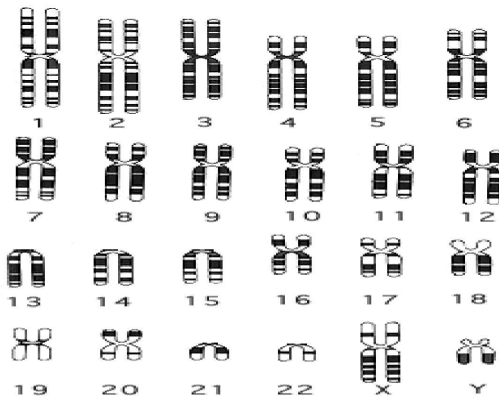
Minor groove (kis árok)

Major groove (nagy árok)

13

## Visszatekintés:

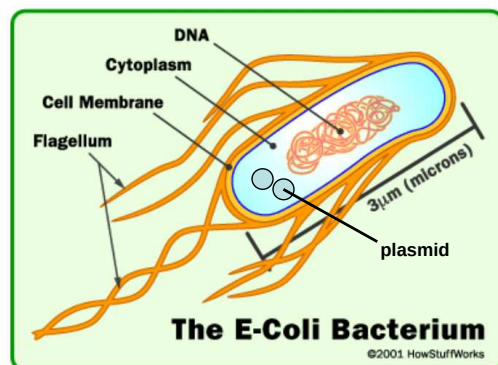
### Az emberi és az E. coli DNS



#### Emberi:

lineáris kettősszalú DNS  
többszörösen strukturált  
kromoszómák (~3.4 Gbp)  
(diploid sejt: 6.8 Gbp)

Mitokondriális DNS:  
cirkuláris ds DNS  
(~16.6 kbp)



#### E. coli:

Cirkuláris kettősszalú  
kromoszóma (~4.6 Mbp)

#### Plazmid:

Kicsi cirkuláris kettősszalú  
extrakromoszómális DNS  
(~2-100 kbp)

14

## A DNS többféle másodlagos szerkezetet vehet fel

Az élőlényekben és vizes oldatban a „B” forma a leggyakoribb, ebben a bázisok síkja majdnem merőleges a cukor-foszfát gerincre.

Dehidrált körülmények között egy tömörebb „A” forma jön létre, melyben a bázisok síkja megdől.

Hosszú GCGCGC.... ismétlődések a Z formát vehetik fel, amely balmenetes, zezugos lefutású és megnyúlt. (Z= zig-zag: a foszfátokra nézve)

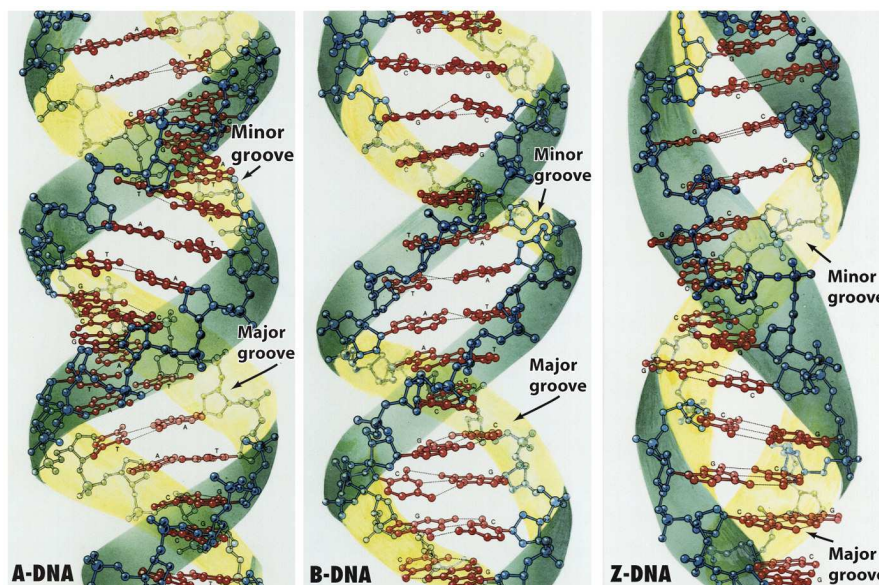
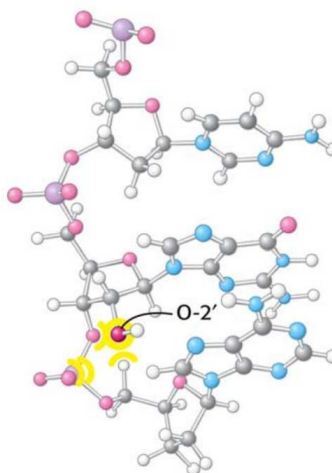


Figure 23-2a Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

15

## Az RNS kettős hélix és DNS-RNS hibridek többsége „A” szerkezetű

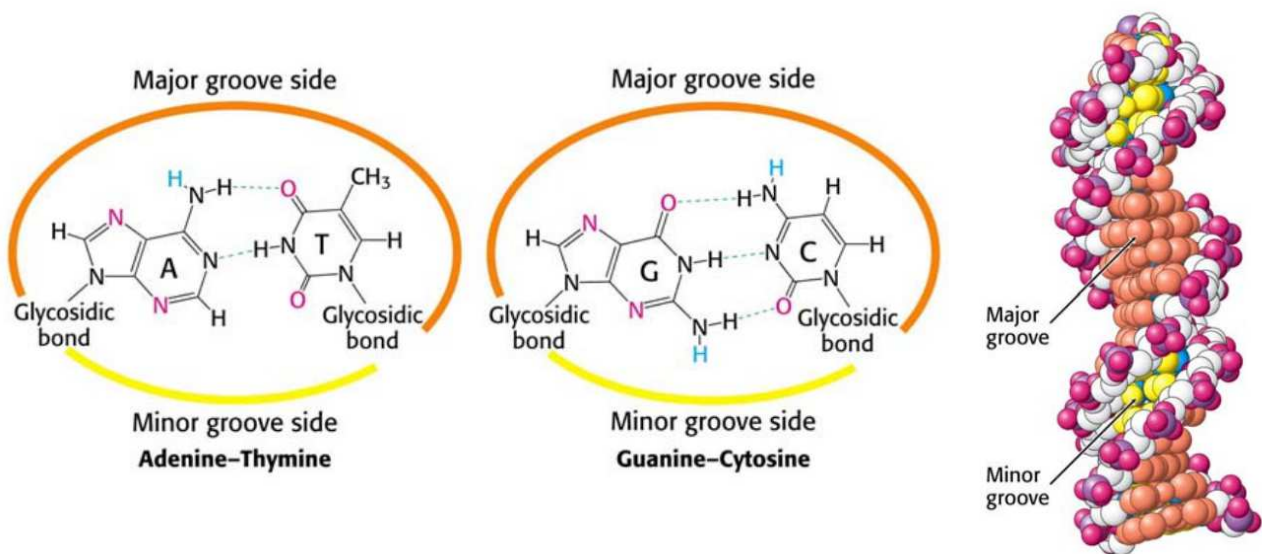
A ribóz 2'-hidroxil csoport



A ribóz 2' OH csoportja nem kompatibilis a „B” szerkezettel.

16

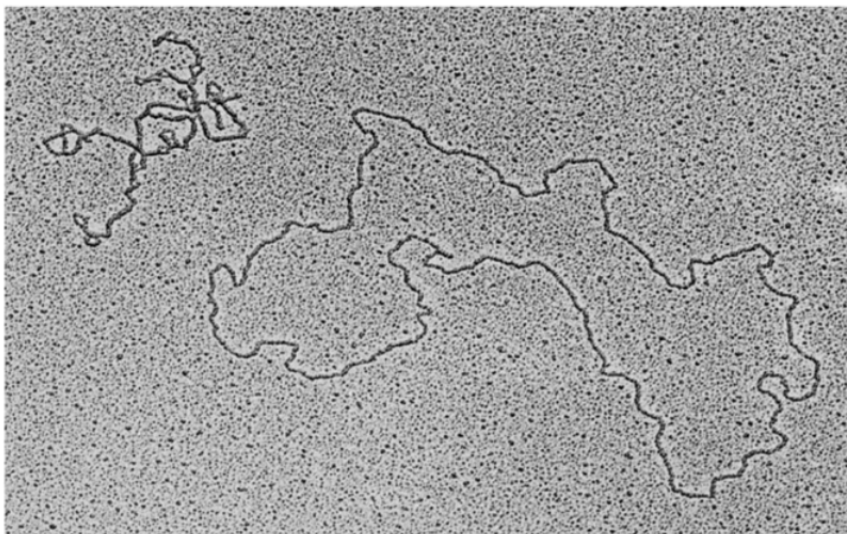
## A DNS árkok (major – minor groove)



Az árkokban lévő bázisok szabad csoportjai H-hidakat tudnak kialakítani fehérjékkel.

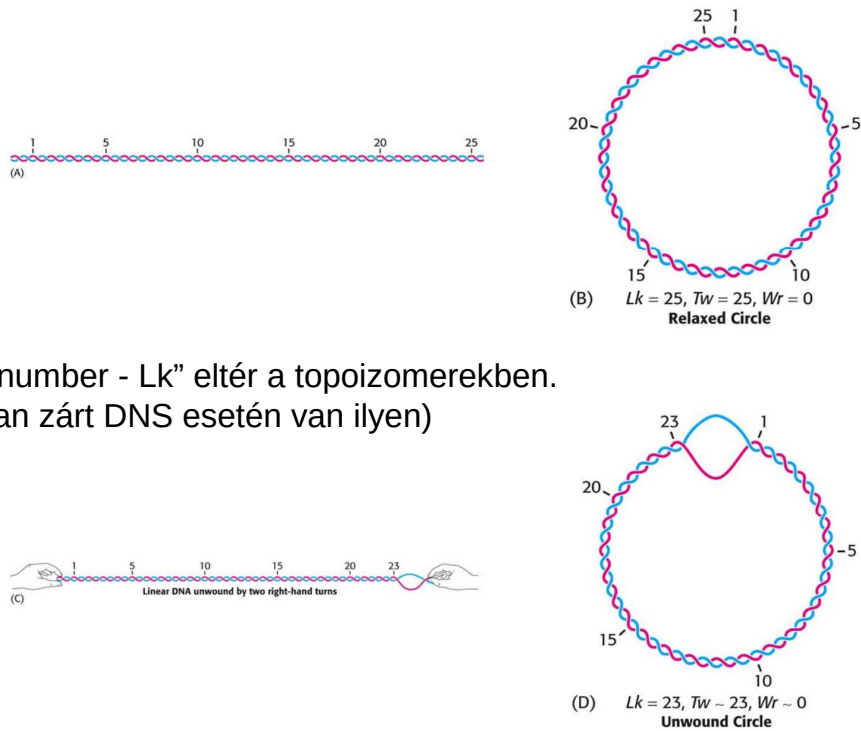
17

## Szuperhelikális és relaxált plazmid DNS



18

# Topológiai izomerek: a DNS részleges kicsavarása

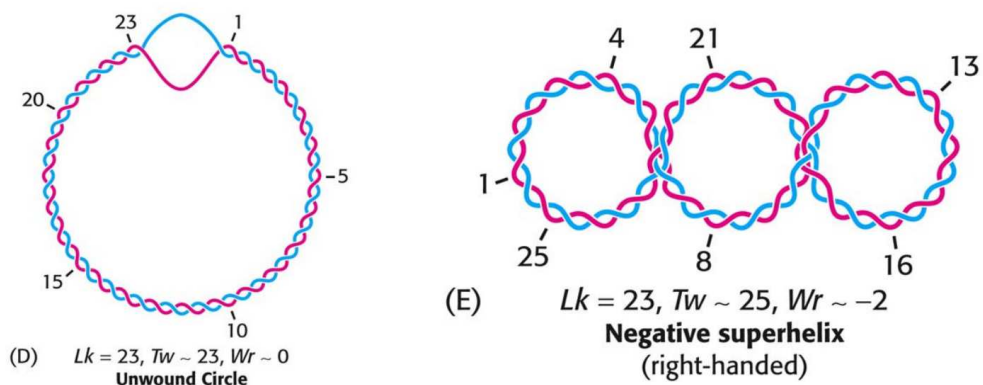


A „linking number - Lk” eltér a topoizomerekben.  
(cirkulárisan zárt DNS esetén van ilyen)

19

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## A részben kitekert DNS superhelikális formát vesz fel



Wr: „writhe” – superhelikális csavarok száma

20

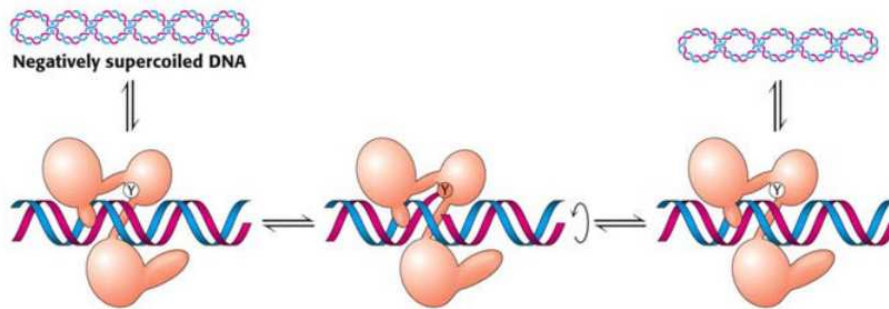
2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

# Topoizomerázok

Topoizomeráz I: csökkenti a szuperhélixek számát → relaxáció

Topoizomeráz II: növeli a szuperhélixek számát: → ATP-t igényel

## A topoizomeráz I működése



Csak 1 szálát vág el !

21

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## A replikáció problémái:

### 1., Sokszor:

Egy ember fejlődése során kb. 45-50-szer osztódnak a sejtjei.

### 2., Gyorsan:

~ 1000 nukleotid/**másodperc** (szálanként, *E. coli* DNS polim. III )

(1000 nukleotid/**perc** sebesség mellett egy *E coli*  $4.6 \times 10^6$  bp méretű genomja kb. 3 napig replikálna !)

3., **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  $10^{-10}$ .

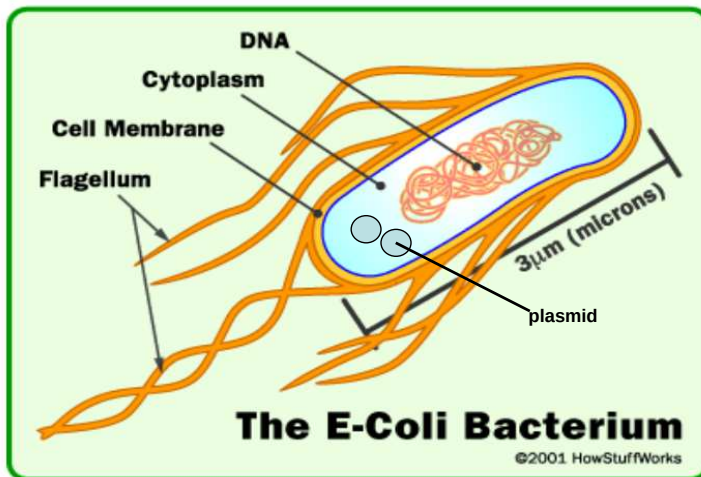
Vagyis a  $3.4 \times 10^9$  bp genom méretű emberi sejt átlagos osztódása során **0, vagy 1** új mutáció keletkezik replikációs hiba folytán.

22

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Modell organizmus: *E. coli*

A legpontosabban ennek a replikációs mechanizmusát ismerjük



Akár 40 percenként osztódik.

$4.6 \times 10^6$  bp  
cirkuláris DNS

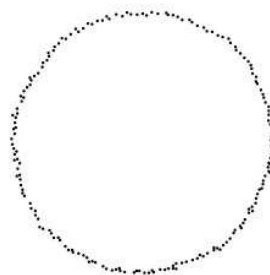
Hány nukleotid pár  
szintetizálódik  
másodpercenként?

A továbbiakban elsősorban az *E. coli* enzimekről lesz szó !

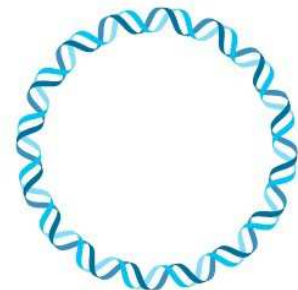
23

## Az *E. coli* DNS replikációjának első „fotója” (1963)

Replikálódó *E. coli*  
táptalajhoz  $^3\text{H}$  timidint  
adva a DNS-be beépült  
rádióaktivitás a hibrid  
szálak  
autoradiogramján  
kimutatható.

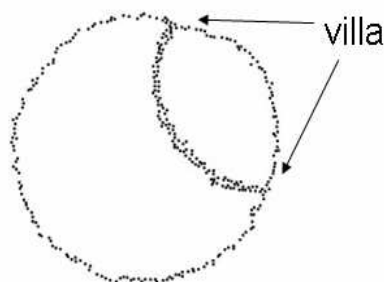


Autoradiograph

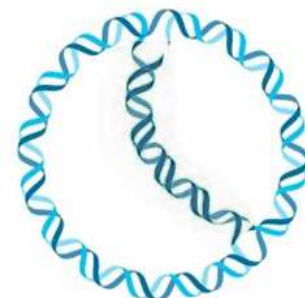


Interpretation

A következő replikációs  
ciklus során a képződő  
új kettős spirál mindkét  
szála radioaktívan jelölt  
lesz.



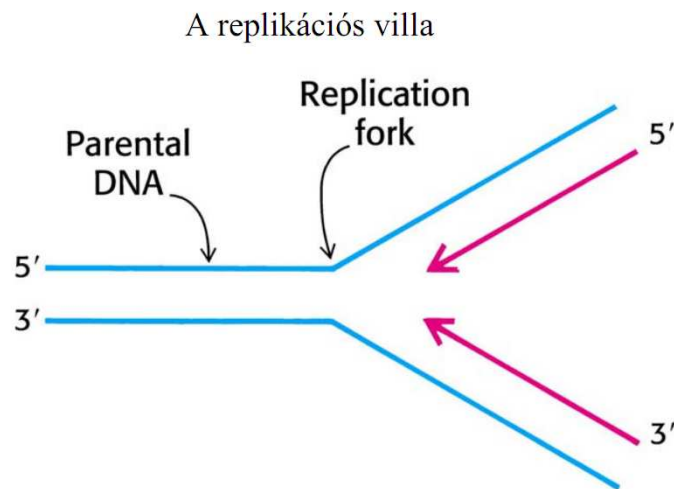
Autoradiograph  
Theta (θ) szerkezet



Interpretation

24

## A replikáció látszólagos haladása „kis felbontásban”

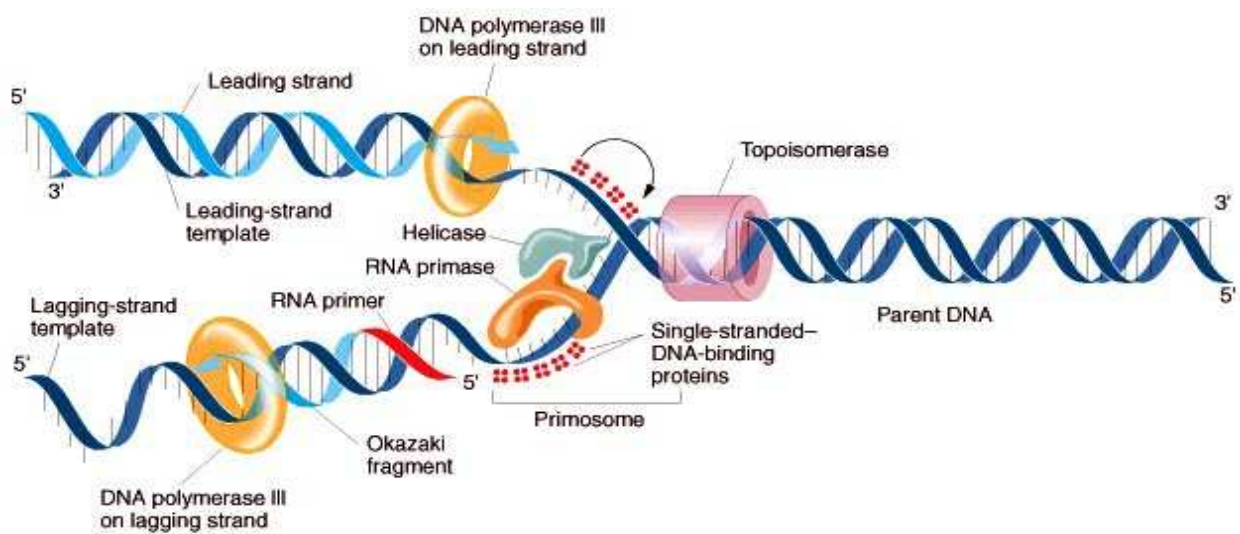


A DNS polimerázok 5'→3' irányban működnek. [Hogyan lehetséges ez?](#)

25

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Az *E. coli* DNS replikációjában résztvevő enzimek



26

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## Replikációs enzimek:

Topoizomerázok: a kitekert DNS-ben levő feszültség oldása

Helikáz: a kettős szál kitekerése

SSBP: az egyszálú DNS stabilizálása (single-stranded DNA binding protein)

Primáz: RNS primer biztosítása

Ligáz: a szálak összekapcsolása

**DNS polimerázok: szintézis**

27

## YouTube videó

Replikáció: **How DNA Copies Itself**

<http://www.youtube.com/watch?v=5Vefal0LrgE>

28

## E. coli DNS polimerázok

A DNS **polimeráz III** (*pol III*) végzi a replikációs szintézist.

a DNS **polimeráz I** (*pol I* vagy Kornberg enzim) elemésztí az RNS primereket és befejezi a lemaradó szál szintézisét.

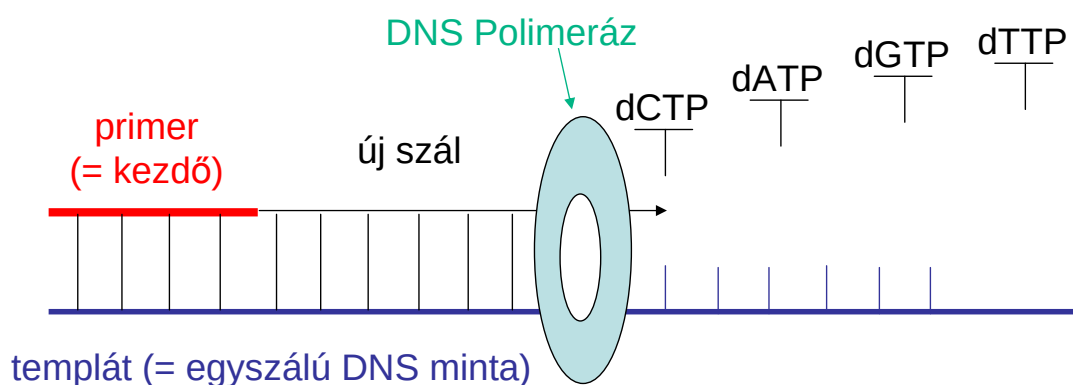
|                                  | pol I | pol III |
|----------------------------------|-------|---------|
| 5' → 3' polimerizáció            | +     | +       |
| 3' → 5' exonukleáz (hibajavítás) | +     | +       |
| 5' → 3' exonukleáz               | +     | -       |
| molekula/sejt                    | 400   | 10      |

**Nemcsak szintézist, hanem a hibajavítást is végeznek !**

29

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## A DNS polimerázok általános működése



A DNS polimerázok az egyes szálú DNS **templátra** (minta) azt kiegészítő (komplementer) szálát szintetizálnak a rendelkezésre álló nukleotid trifoszfátokból. A szálát azonban elkezdni nem tudják, csak hosszabbítani. A kezdéshez egy rövid kezdő (**primer**) szakaszra van szükségük.

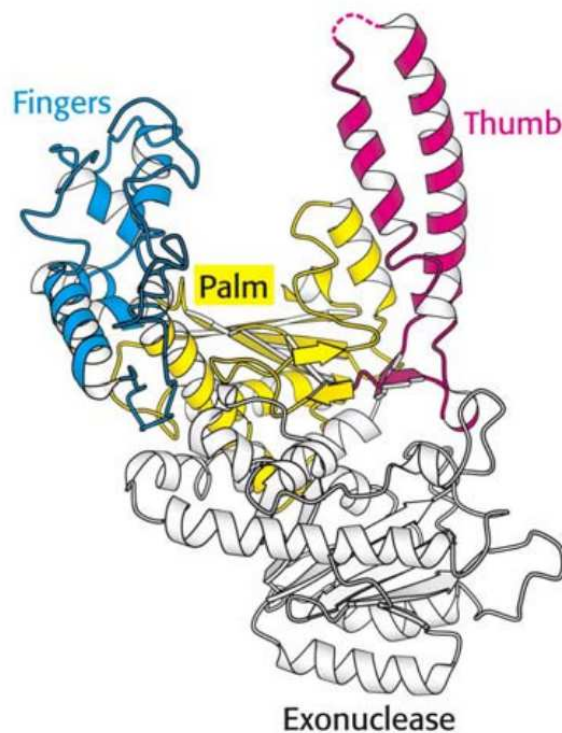
30

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## A DNS polimerázok modell enzime: E. coli DNS polimeráz nagy fragmentum (Klenow)

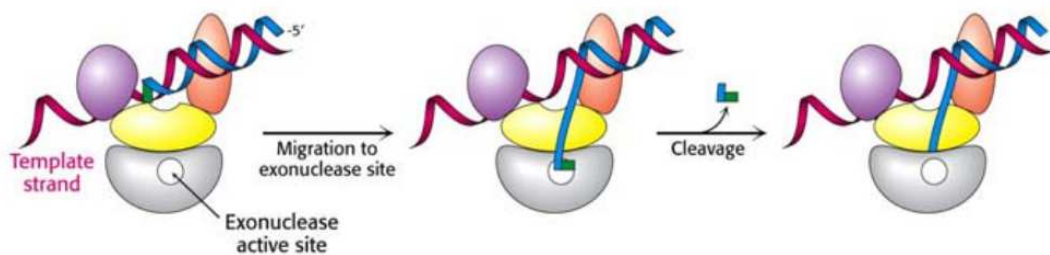
A DNS polimeráz I  
nagy (Klenow) fragmense

**Kesztyű alakú**



31

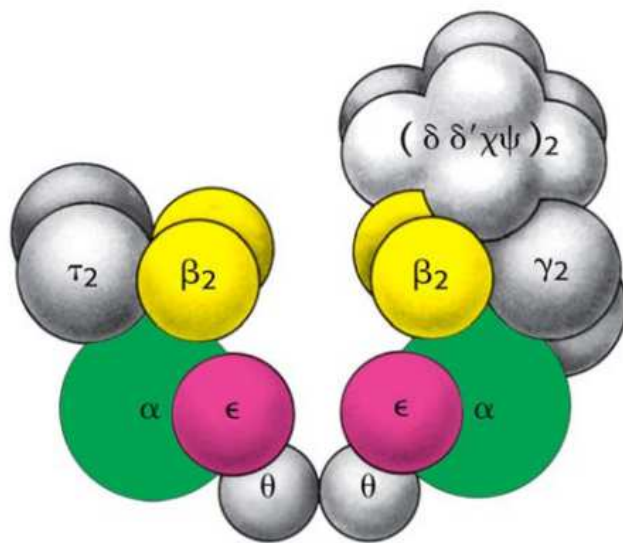
## Hibajavító (proofreading) mechanizmus



Ha hibás bázis épül be az nagyobb valószínűséggel  
válk le a polimeráz egységről és vágódik ki.

32

## A munka javát a DNS polimeráz III holoenzim végzi

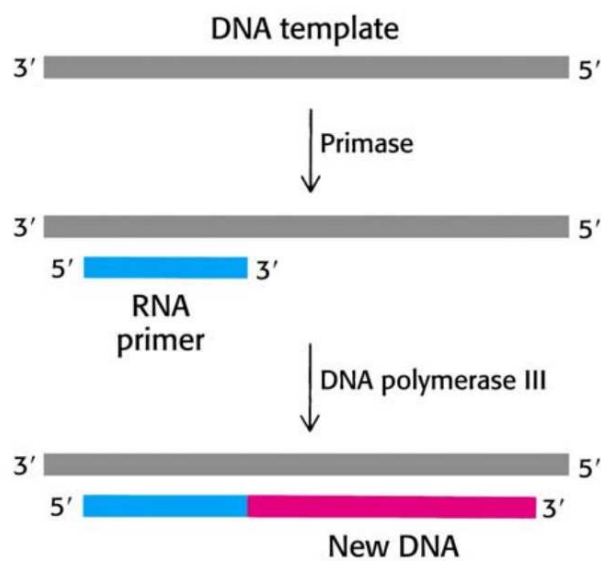


1000 nukleotid beépítése  
másodpercenként

33

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

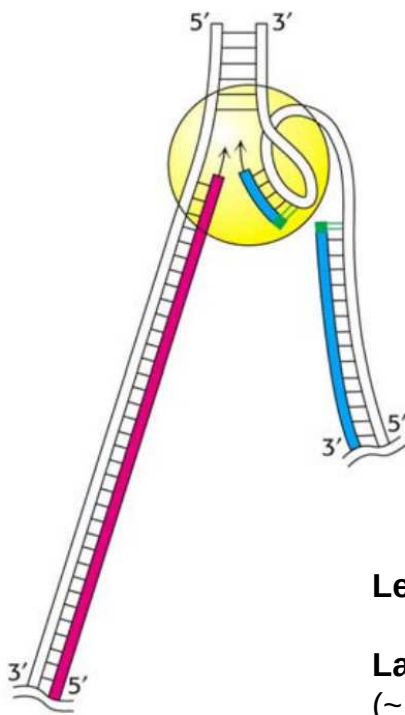
## A proofreading aktivitás miatt a DNS polimerázoknak primerre van szükségük



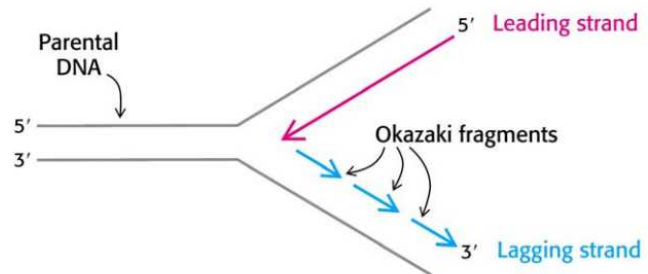
34

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás- Dobó József

## A DNS polimeráz III működése



Okazaki-fragmensek



**Leading strand (vezető szál):** folyamatos szintézis

**Lagging strand (követő szál):** **szakaszos** szintézis  
(~ 1000 bp) → **Okazaki** fragmentumok

35

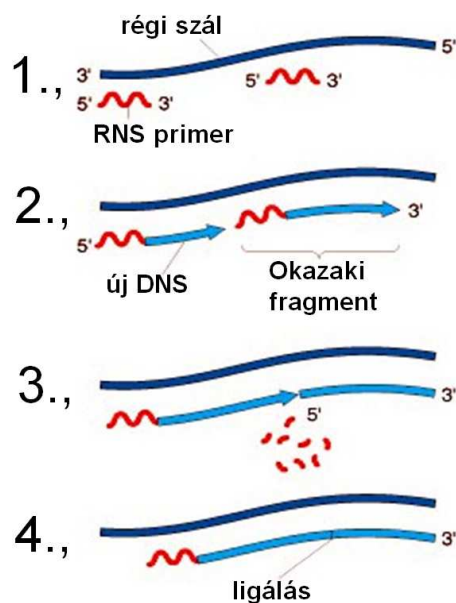
## A követő szál befejezése.

Az Okazaki fragmentumok elkészülte után a **DNS polimeráz I** kitölti a réseket

A **DNS polimeráz I** 5' → 3' nukleáz komponense eltávolítja az RNS primereket.

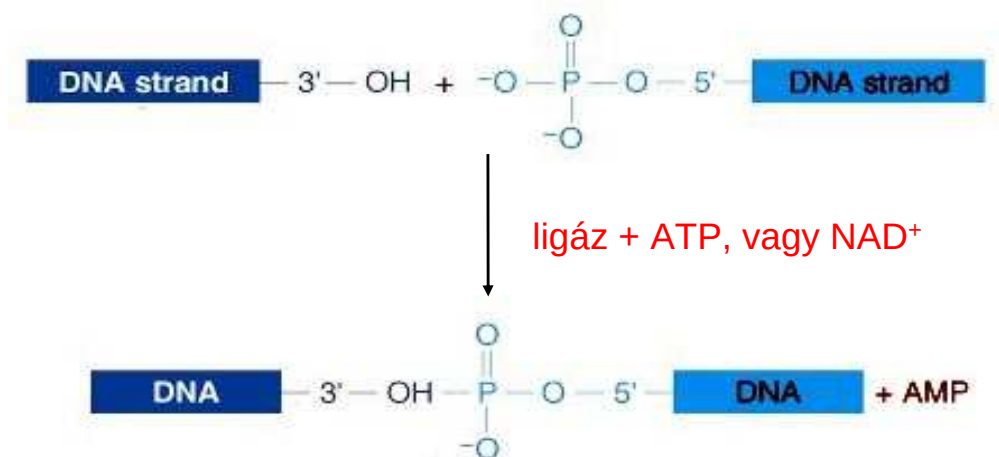
A ligáz összekapcsolja a fragmentumokat.

### Az elmaradó szál szintézise:



36

## A DNS ligáz működése

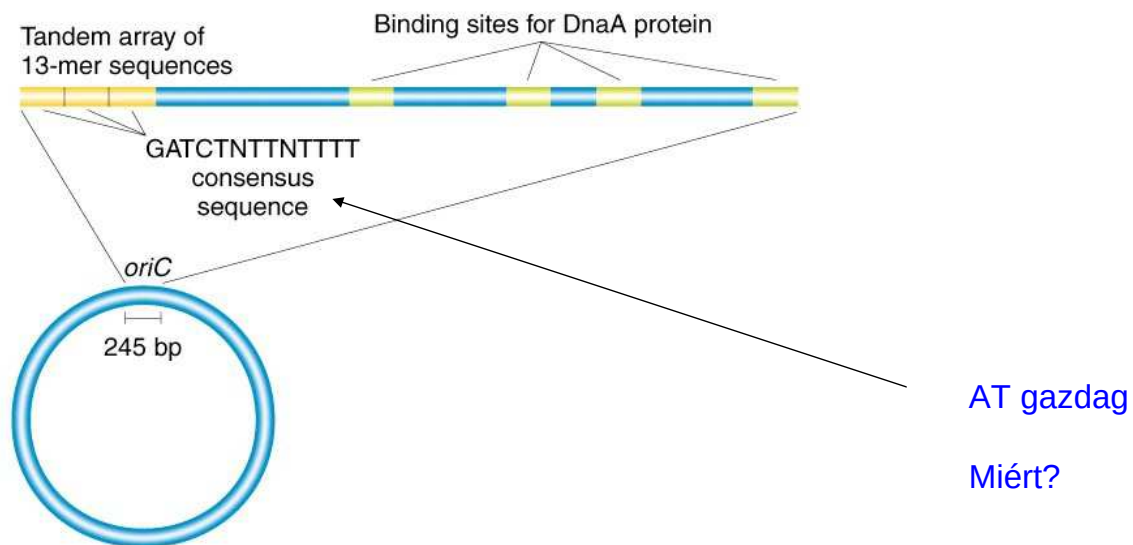


Érdekesség: az *E. coli* ligáznál NAD<sup>+</sup> hidrolízise biztosítja az energiát  
eukarióták, vírusok, archeák: ATP kell

37

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

## A replikációs kezdőpont (origó).



A replikációnak kitüntetett kezdőpontja (origója) van. Az ***E. coli*** egyetlen replikációs origója, az *oriC*, 245 nukleotidpár hosszú.

38

2015 - PPKE ITBK - Molekuláris bionika szak - Biokémia előadás - Dobó József

# Eukarióták

## Lineáris DNS

A végeken **telomerek** vannak

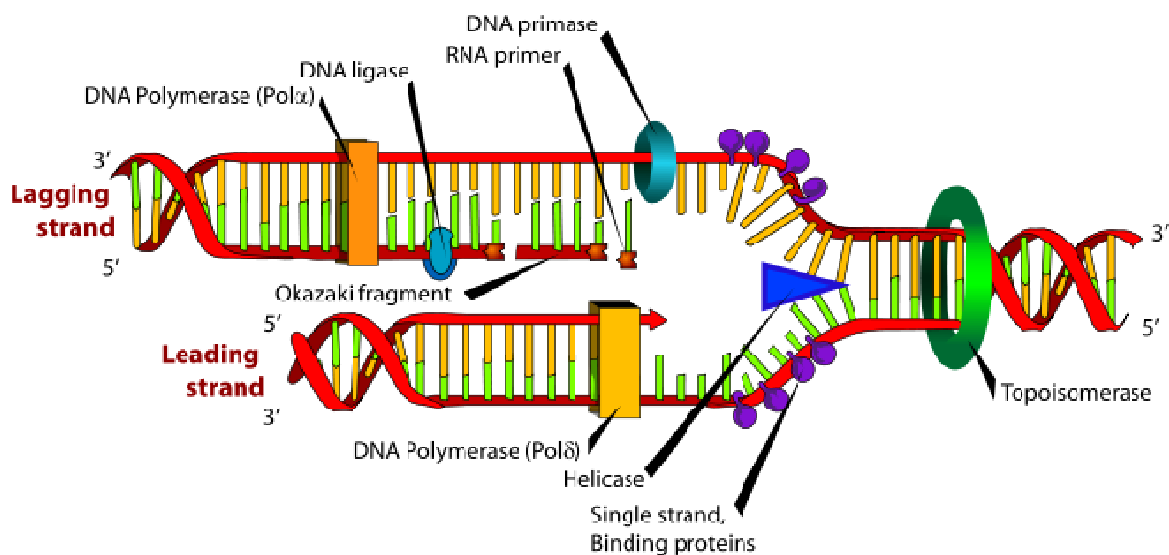
Az emberi DNS állományban kb. **30 000** replikációs origó található

Replikációs egység: replikon (az egyik origótól a másikig tart)

Élesztő replikációs origó: ARS (autonomously replicating sequence)

39

Eukarióta replikáció:  
Pol $\alpha$ , Pol $\delta$  az *E. coli* DNS polimeráz III alegységeinek megfelelő enzimek



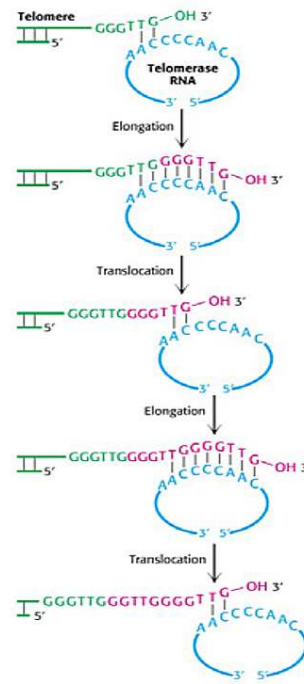
40

## A telomerek és a telomeráz enzim

A telomerek a kromoszómák végén levő ismétlődő szekvenciák.

A **telomeráz** egy speciális **reverz transzkriptáz**, ami a templátját magában hordozza!

A kor előrehaladtával a telomerek lerövidülnek, a telomeráz aktivitás csökken.



41

## Rekombináció

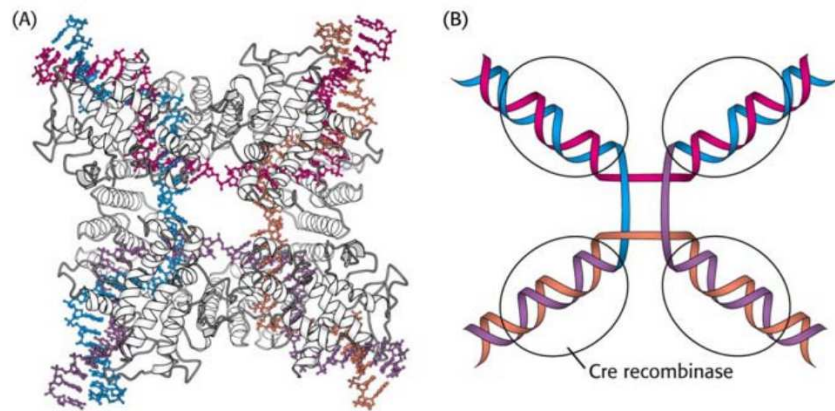


Általában homológ (hasonló) szegmensek között.

42

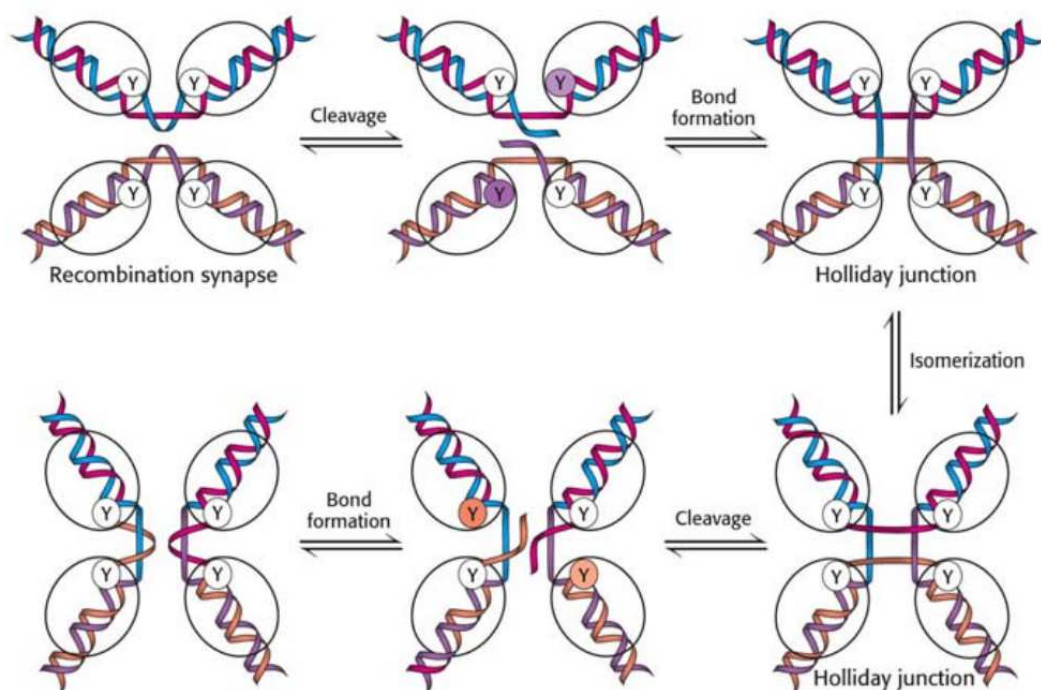
## A rekombináció mechanizmusa

### A Holliday keresztelágazás szerkezete



43

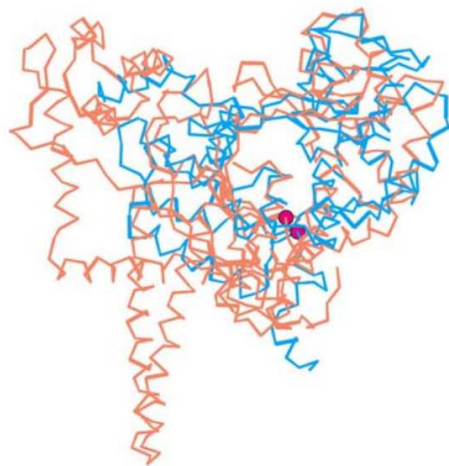
## A rekombináció mechanizmusa



44

# A rekombinááz és a topoizomeráz enzimek egymásnak szerkezeti homológjai

A Cre rekombinááz (kék) és a topoizomeráz I (narancs) szerkezeti homológiája



## Divergens evolúció:

egy közös régi alapszerkezetből fejlődtek ki az evolúció során

## Mi a konvergens evolúció?

45

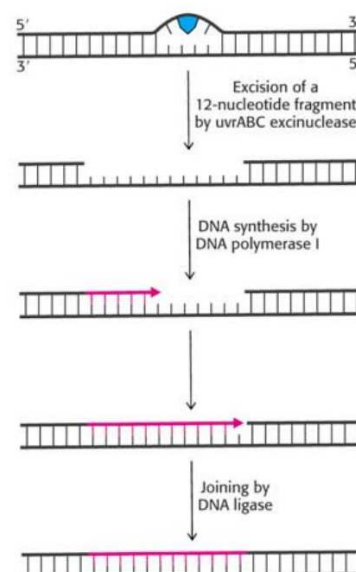
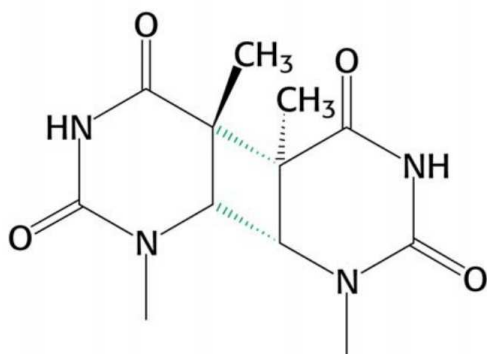
## Hibajavító mechanizmusok I.

### kivágó mechanizmus

Példa DNS hibára:

**timin dimer**

**UV** sugárzás hatására



46

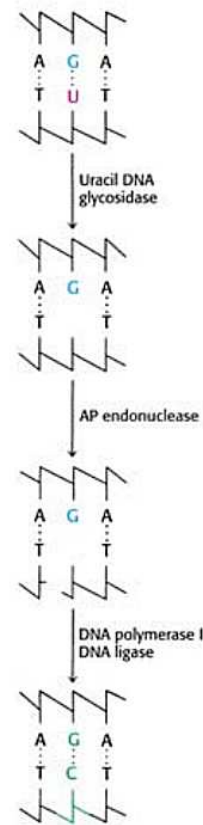
## Hibajavító mechanizmusok II.

### Bázis kivágás

#### Uracil DNS glikozidáz:

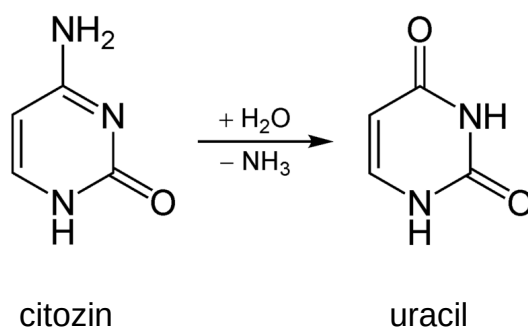
Kivágja a DNS-ből az uracilt.  
(báziskivágás)

Majd egy nukleáz elvágja a DNS szálát.



47

## Miért található a DNS-ben timin, az RNS-ben pedig uracil?



A **cytozin** a **legkevésbé stabil** bázis. Dezamináció révén átalakulhat uracillá. Ez mutációt eredményezhet! (U-G pár jön létre.)

Hibajavító enzimek képesek a DNS-ben levő uracilt kivágni, és a helyes bázist visszaépíteni.

Ha a DNS-ben is eleve uracil lenne, akkor a javító enzimek nehezen „tudnák” megkülönböztetni a hibás uracilt a jótól.

48

## Mutációk okozói

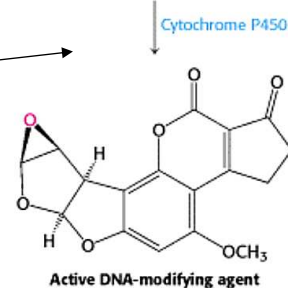
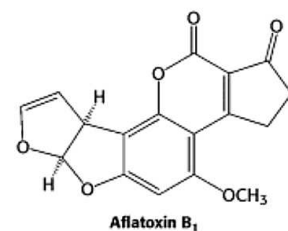
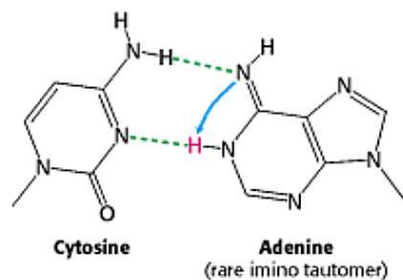
Másolási hiba (ritka)

**Tautomerizáció**

Kémiai bomlás (C → U) → korábban

UV fény (pirimidin dimerek) → korábban

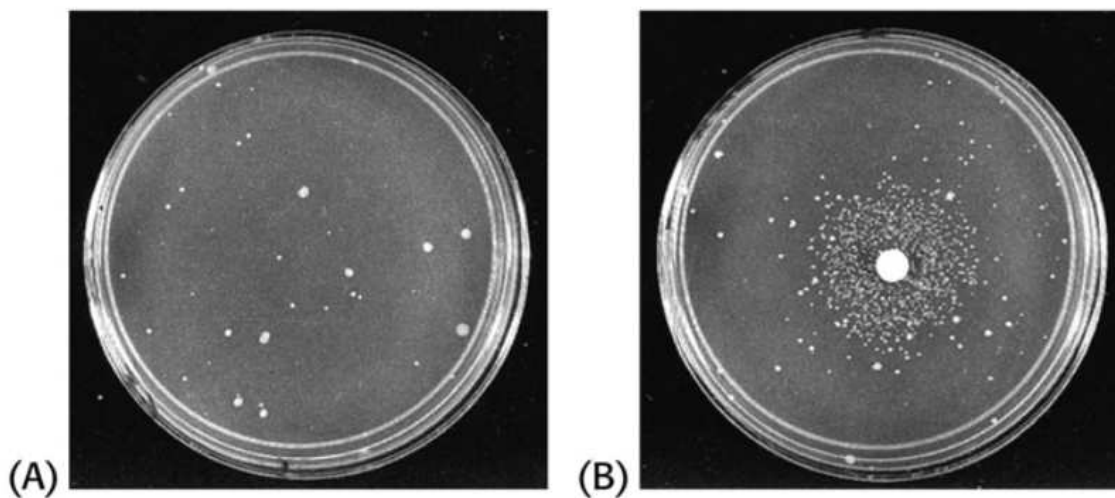
**Mutagén anyagok**



49

## Mutagén anyagok vizsgálata

### Ames teszt



His nélkül életképtelen mutáns Salmonella → a mutáció visszafordítása

50

# Amit tudni illik

A DNS szerkezete, a replikáció, a rekombináció és a DNS hibák kijavítása  
témakörökből

## Kémiai képletek:

A nukleotidok általános felépítése  
Egy purin és egy pirimidin bázis képlete (lehetőleg olyan ami  
komplementer párt képez)  
DNS vázlatos szerkezete

## Fogalmak:

DNS, replikáció, a bázispárosodás elve, templát, primer, 5' vég, 3' vég,  
proofreading (exonukleáz aktivitás), primáz, helikáz, topoizomeráz, DNS  
polimeráz, Okazaki fragmentum, replikációs origó, rekombináció,  
telomer, telomeráz

51

## Kapcsolódó könyvfejezet:

**J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry 5th edition  
W.H. Freeman and Co.**

**27. DNA replication, Recombination, and Repair**

52