

Bevezetés a Bioinformatikába

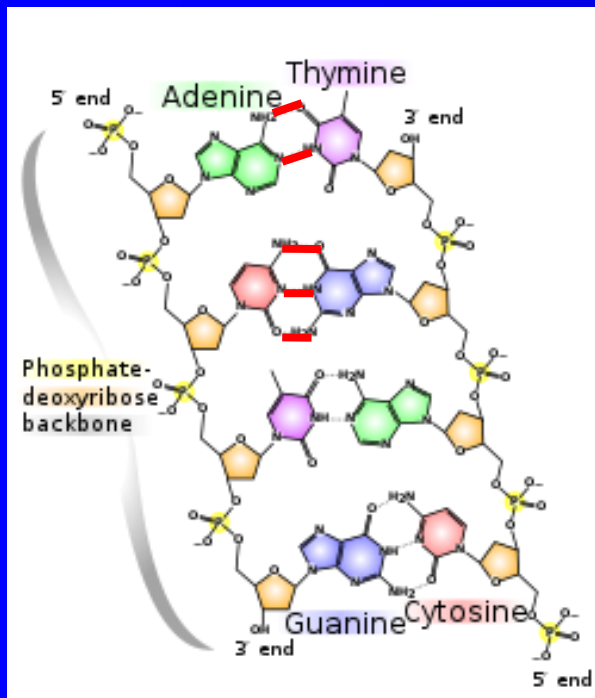
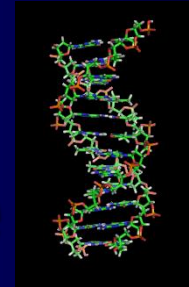
A nukleinsavak

Kozlovsky Miklós

kozlovsky.miklos@nik.uni-obuda.hu

6. Előadás

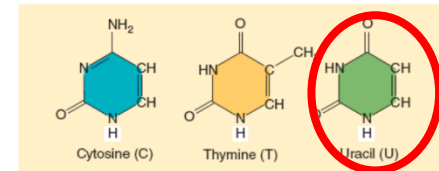
DNS szerkezete



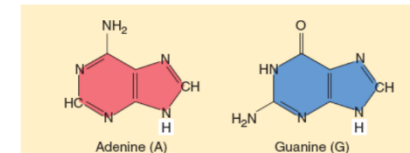
- A DNS-ben előforduló nukleotidok három egymáshoz kapcsolódó elemből állnak:
- egy nitrogéntartalmú szerves bázisból:
- Purinok: adenin - A, guanin - G
- Pirimidin: timin - T, citozin - C,
- egy pentózcukorból (dezoxiribóz) és
- egy foszfátcsoportból
- =hidrofil cukorfoszfát gerinc
- Komplementaritás – bázis párosodás:
- A--T és G---C

– Pirimidin

Csak RNS-ben

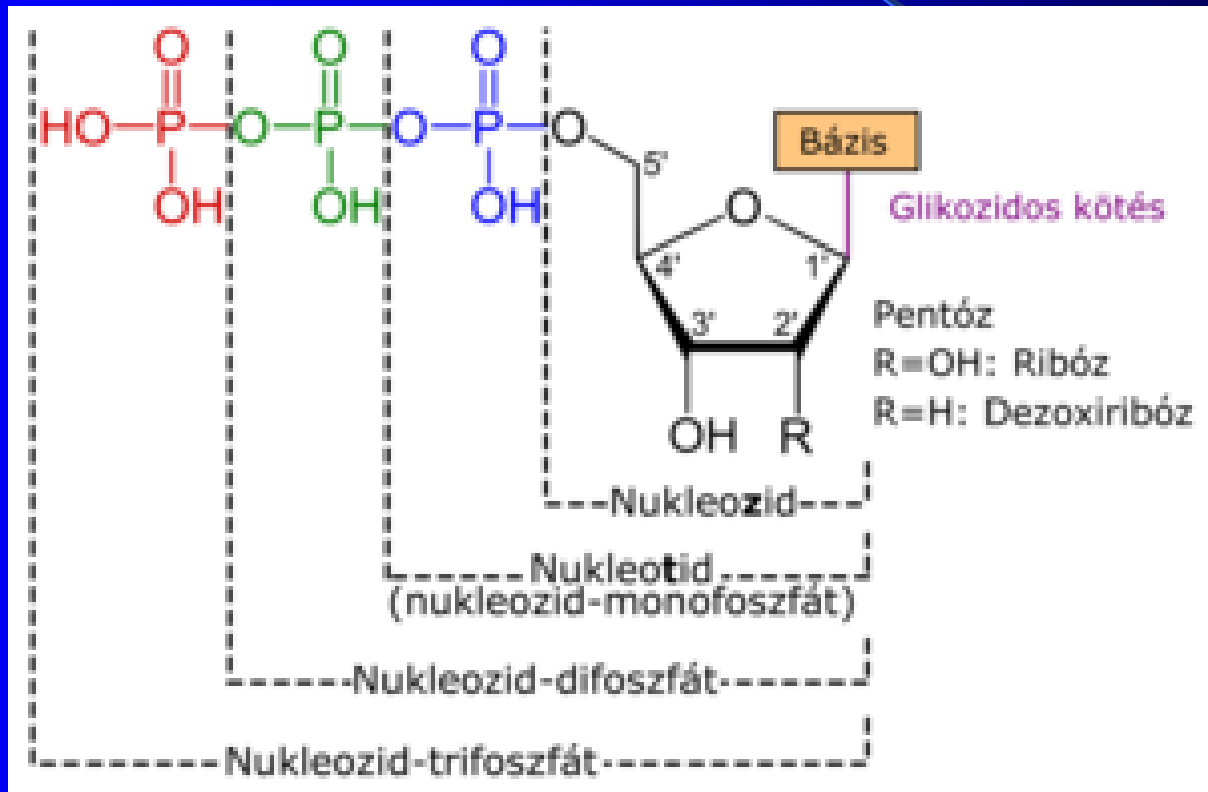


– Purin



Képek forrása: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Dezoxiribonukleinsav>

Dns egységei



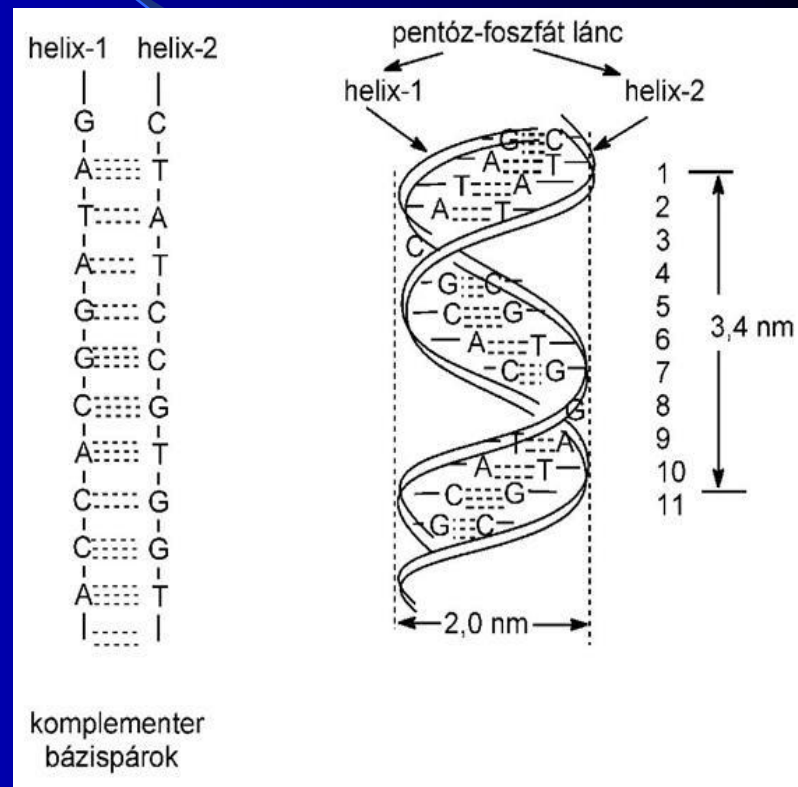
Kép forrása: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Nukleozid>

CHARGAFF Szabályok (1955)

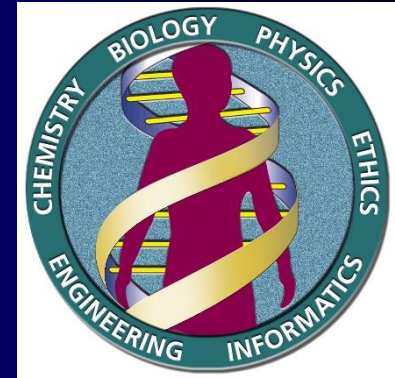
- Az élőlényekből származó DNS-ekben a pirimidin nukleotidok (T + C) mennyisége egyenlő a purin (A + G) nukleotidok mennyiségével
- A T mennyisége egyenlő az A-val, és C mennyisége egyenlő G-vel
- Azonban A + T és C + G mennyiségek nem feltétlenül egyenlők, azok aránya jellemző az élőlényre amiből a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

DNS szerkezete

- Elsődleges szerkezet: a DNS bázissorrendje = szekvencia
- Másodlagos szerkezet: kettős spirál (10 nukleotid=1 fordulat)
- Harmadlagos szerkezet: a kettőshélix megtekeredik, tovább csomagolódik



Human genome projekt



1990-ben elindított átfogó kutatás
15 évet és 3 milliárd dollárt szántak

A projekt feltárta a teljes emberi genomot egészen a nukleotidok (bázispárok) szintjéig,

azonosította a géneket. Az emberi genom a petesejt vagy hímivarsejt teljes genetikai tartalma. A humán genom a Homo sapiens genomja. 23 kromoszómapárból és kb. 3 milliárd DNS bázispárból áll

A teljes humán genom bázissorrendjét nagyjából 2001-re határozták meg
= 3 gigabyte-nyi betű, kb 30 ezer gén

Az egyes emberek 3 milliárd bázis hosszúságú DNS-ének bázissorrendje nem teljesen azonos,

átlagosan minden ezredik bázisban eltérnek egymástól.

→ Két random Homo sapiens 3 millió helyen különbözik egymástól,
kb 30 millió helyen egy csimpánztól, azaz 99,9% és 99% a hasonlóság.

HGP (Sanger szekvenálás) vs Celera (Craig Venter, shotgun szekvenálás)

Genetikai kód

RNA codon table

1st position	2nd position				3rd position
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr stop stop	Cys Cys stop Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Amino Acids

Ala: Alanine
Arg: Arginine
Asn: Asparagine
Asp: Aspartic acid
Cys: Cysteine
Gln: Glutamine
Glu: Glutamic acid
Gly: Glycine
His: Histidine
Ile: Isoleucine
Leu: Leucine
Lys: Lysine
Met: Methionine
Phe: Phenylalanine
Pro: Proline
Ser: Serine
Thr: Threonine
Trp: Tryptophane
Tyr: Tyrosine
Val: Valine

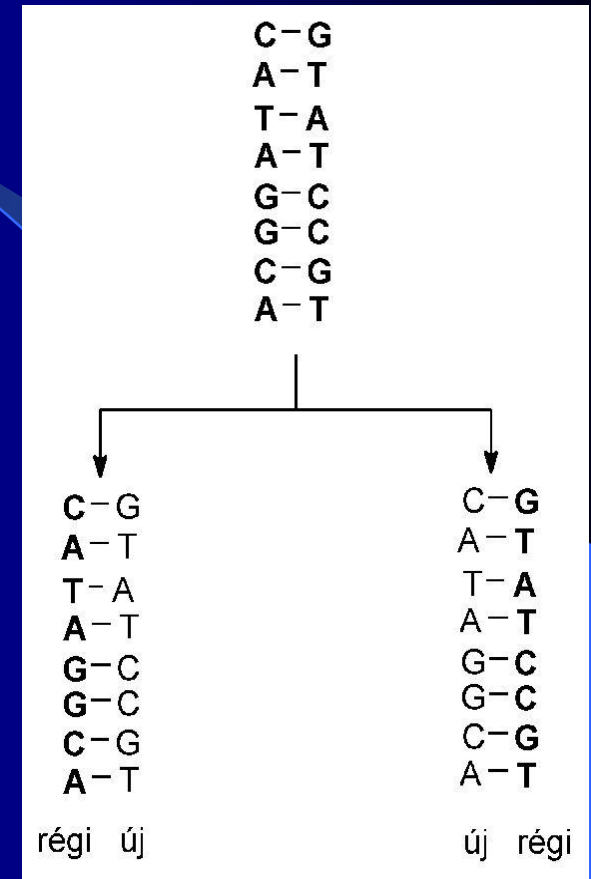
- DNS → mRNS → aminosavak → fehérjék
- Nukleotid triplet (=kodon) → 1 aminosav
- 4 bázis kombinációi 64 tripletet eredményeznek →
 - 61 értelmes kodon,
 - 3 bázishármas (UAA, UAG, UGA) = *STOP*kodon
 - Redundáns - egy aminosavat több bázishármas is kódolhat
 - „löttyög” (wobble) a harmadik pozícióban

Kép forrása: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Code>

<https://youtu.be/98s4nnD-leQ>

replikáció

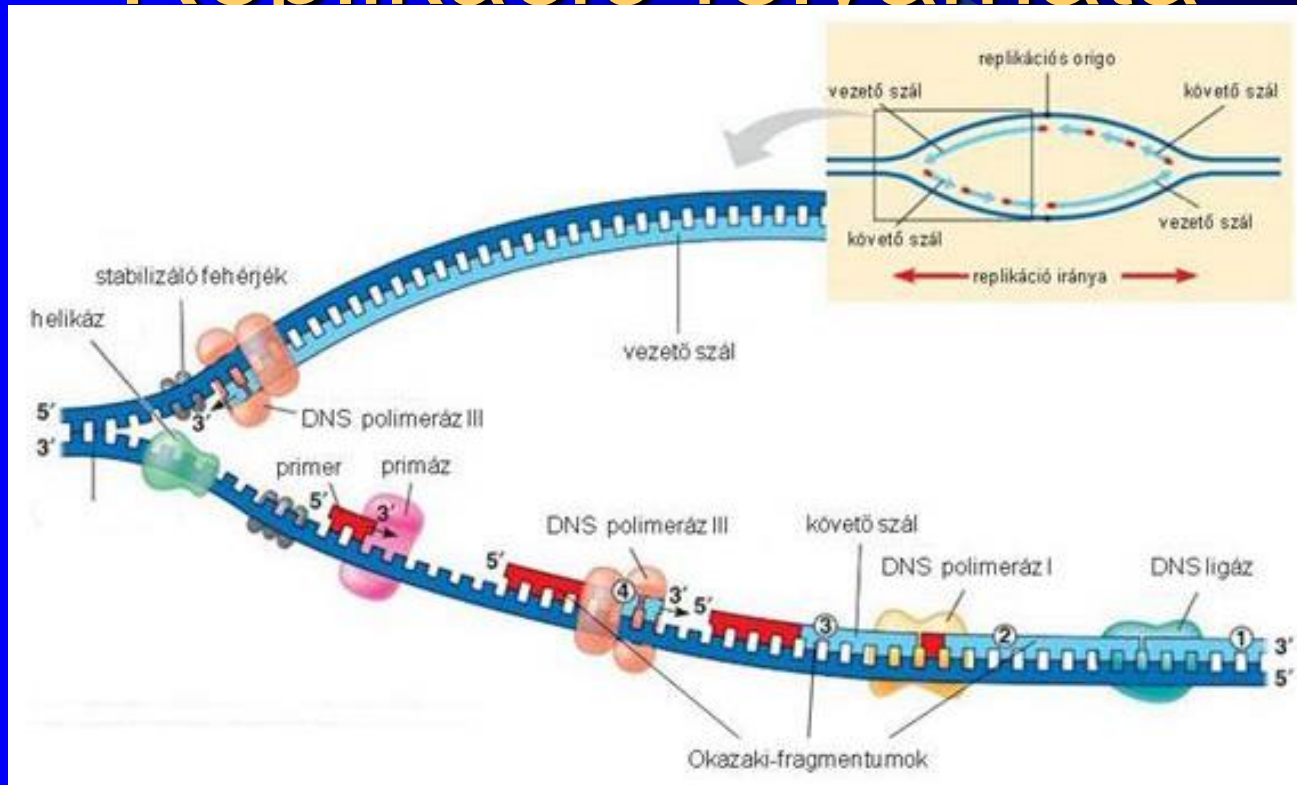
- DNS megkettőződése, a duple hélix szerkezet szétcsavarodik, mindkét szál mellé egy új szintetizálódik
- Szemikonzervatív replikáció (egyik DNS szál mindig az anyasejtből származik)
 - Az egyik mindig eredeti szál (template)
 - 3'→5' irányú olvasás, 5'→3' irányú szintézis
 - A template és az új szál antiparallel lefutású
- Indítólánc (Primer) szükséges
 - Első néhány nukleotid szintetizálásához
 - Szabad 3'OH vég
- Okazaki fragmentumok
- E. coli baktériumot fertőző T4 fág : 749 nukleotid/sec beépítés
- Hiba: DNS polimerázok 1/10 millió bázis hiba
- Hibajavítás (proofreading) után 1/1 milliárd bp hiba



Replikáció enzimei

- **Helikáz** -Szétcsavarja a DNS kettős spiráljának szálait a replikációs villánál
- **DNS-polimeráz** Az egyszálú DNS nukleotidsorrendje alapján 5'-3' irányban második szálát szintetizál. Ezenkívül hibaellenőrzést és -javítást is végez. A sejten belül többféle polimeráz létezik, mindegyik a maga külön feladatával
- **DNS-kapocs** Az a protein, amely megakadályozza a DNS-polimeráz leválását a DNS-ről
- **Egyszálú DNS-kötő fehérjék** A replikációs villa egyszálú DNS-hez kötve megakadályozzák a kettős spirál és a másodlagos struktúrák újraformálódását és a szálak térbeli eltávolításával gyorsítják a replikáció sebességét
- **Topoizomeráz** Megszüntetik a kettős spirál másodlagosan felcsavart szerkezetét
- **DNS-giráz** Más néven topoizomeráz II. Enyhítik a torziós feszültséget a DNS-spirálban
- **DNS-ligáz** Összeköti a DNS-szálak végeit (például az Okazaki-fragmentumokat).
- **Primáz** A szintézis elkezdéséhez szolgáltat kezdőpontot a polimeráz számára
- **Telomeráz** Az eukarióta kromoszómák végén található telomerekhez ad ismétlődő rövid szekvenciákat, ezáltal a sokszor osztódó össejtek élettartamát meghosszabbítja

Replikáció folyamata



http://morgansbio205.weebly.com/uploads/1/3/6/5/13658882/2926827_orig.jp

Teloméra

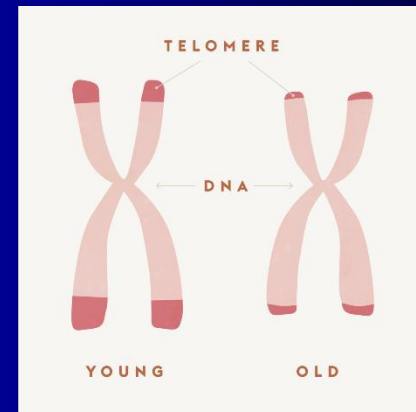
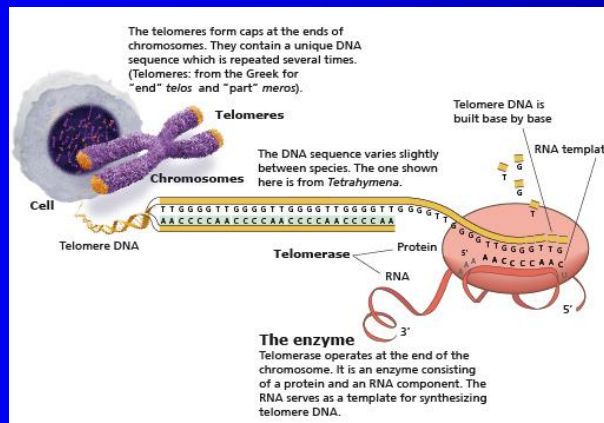
Elizabeth Blackburn, Carol Greider & Jack Szostak, 2009 Orvosi nobel-díj

Kromoszómát alkotó DNS-szál két végén található rövid, többszörösen ismétlődő szakasz (embernél és emlősállatoknál a TTAGGG kód ismétlődik több ezerszer).

Szerepe kettős:

- megakadályozza, hogy a kromoszómavégek összetapadjanak
- a sejtosztódás során védi a DNS-t a folyamatos rövidülés káros hatásaitól

Enzim= telomeráz



<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2009/illustrated-information/>

<https://www.parsleyhealth.com/blog/telomeres-stay-young-aging/>

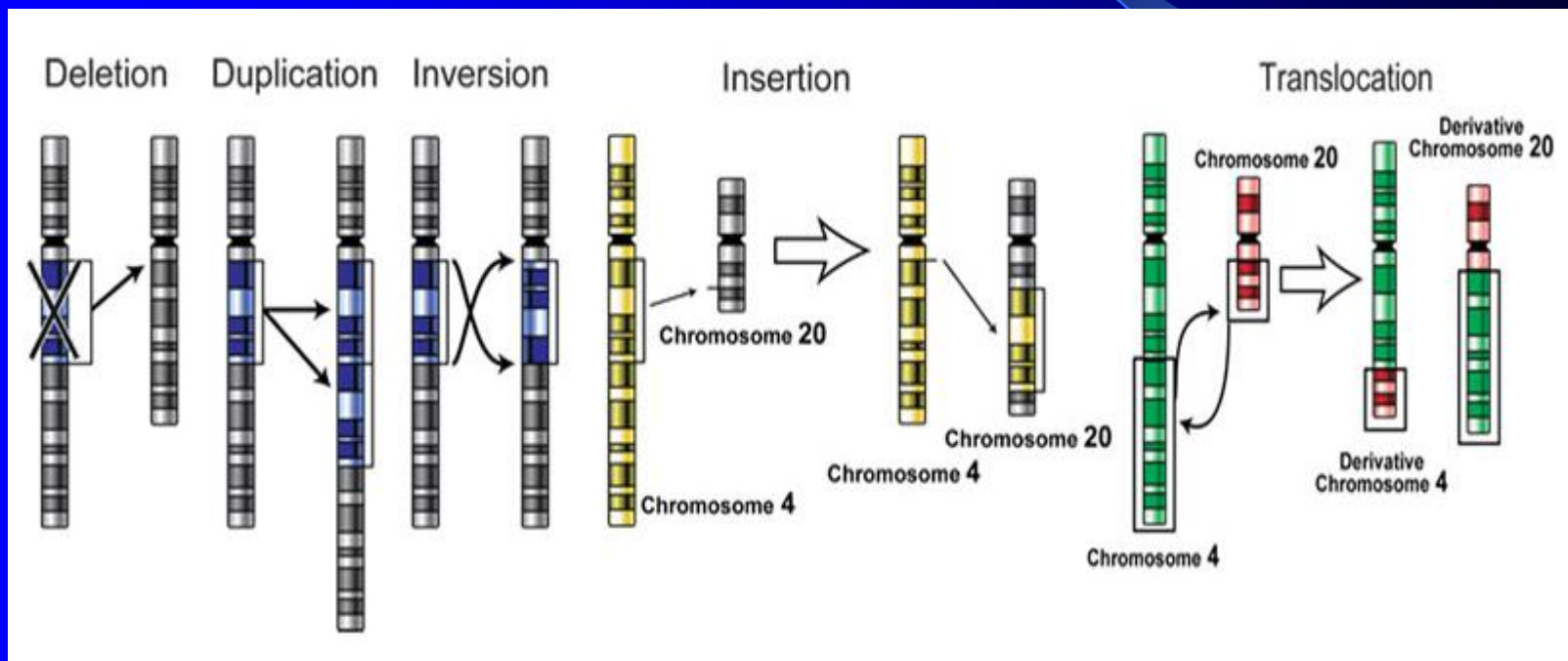
Mutáció

A sejt örökítő anyagának (DNS-nek) megváltozása, és ezáltal a sejtmagban hordozott információ megváltozása

- Típusai:

- Pontmutáció (SNP- single nucleotide polymorphism): 1 nukleotid hiba
- Génben lévő, kódoló SNP-k:
 - Nem-szinonim (missense, más értelmű vagy nonsense, azaz értelmetlen stop kodon)= fenntartja vagy megváltoztatja a fehérje szerkezetét
 - Szinonim (csendes) = fenntartja vagy megváltoztatja a splicing-ot
- Génben lévő, nem-kódoló SNP-k:
 - Szabályozó SNP-k
 - Intronban lévő SNP-k

Mutációk típusai



Kép forrása: <https://microbenotes.com/types-of-mutations/>

Mutációk csoportosításai

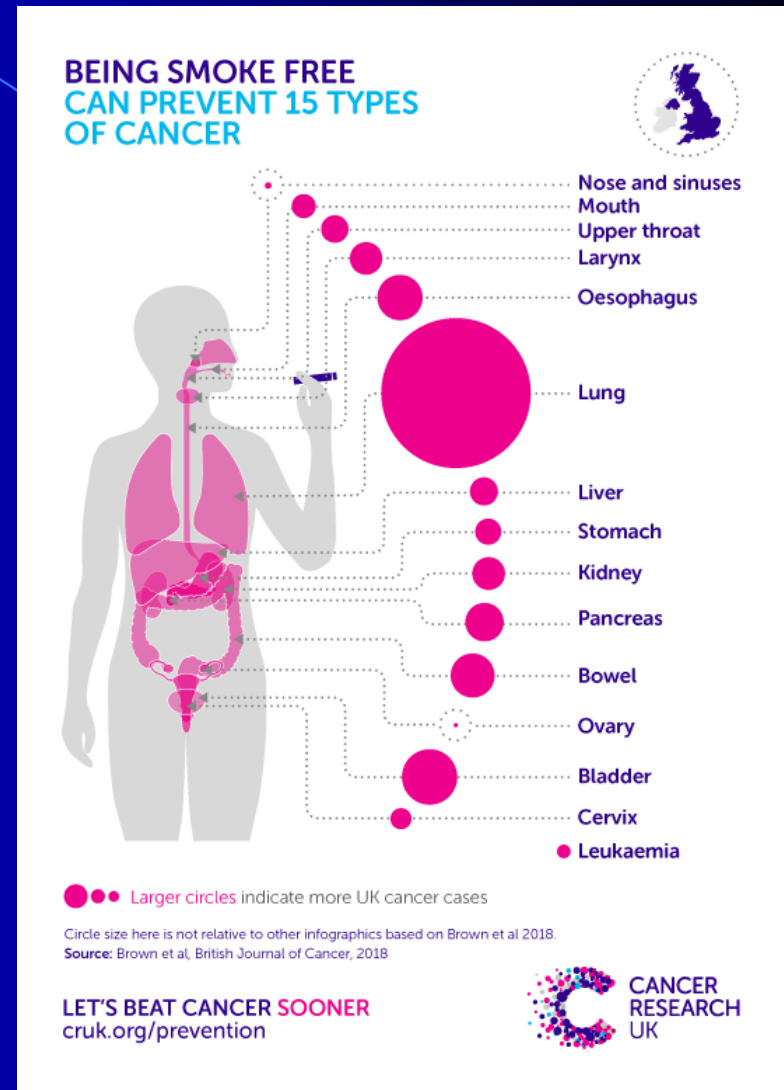
Többféle szempontból lehetséges:

- Szomatikus (testi sejt) vagy csírasejtes (germinális)
- Pontmutáció vagy nagyobb szerkezeti egységet érintő struktúrális változás (SV)
- Gén vagy kromoszómát érintő mutáció
- Spontán vagy indukált (pl. környezeti faktorok által)

Mutáció

● Mutáció okai

- Spontán mutáció
 - Sejten belüli endogén folyamatok (pl.:hőmozgás, polimeráz hibája folytán)
- Indukált mutáció
 - Ionizáló sugárzás (pl. UV, RTG)
 - Antibiotikumok
 - Kemikáliák, pl. szabad gyökök
 - Azbeszt
 - Tartósítószer
 - Dohányfüst! (7.357 komponens, 70 karcinogén = tumorkialakuláshoz hozzájáruló közülük)



Hibajavítás

DNS-ben állandóan keletkeznek hibák

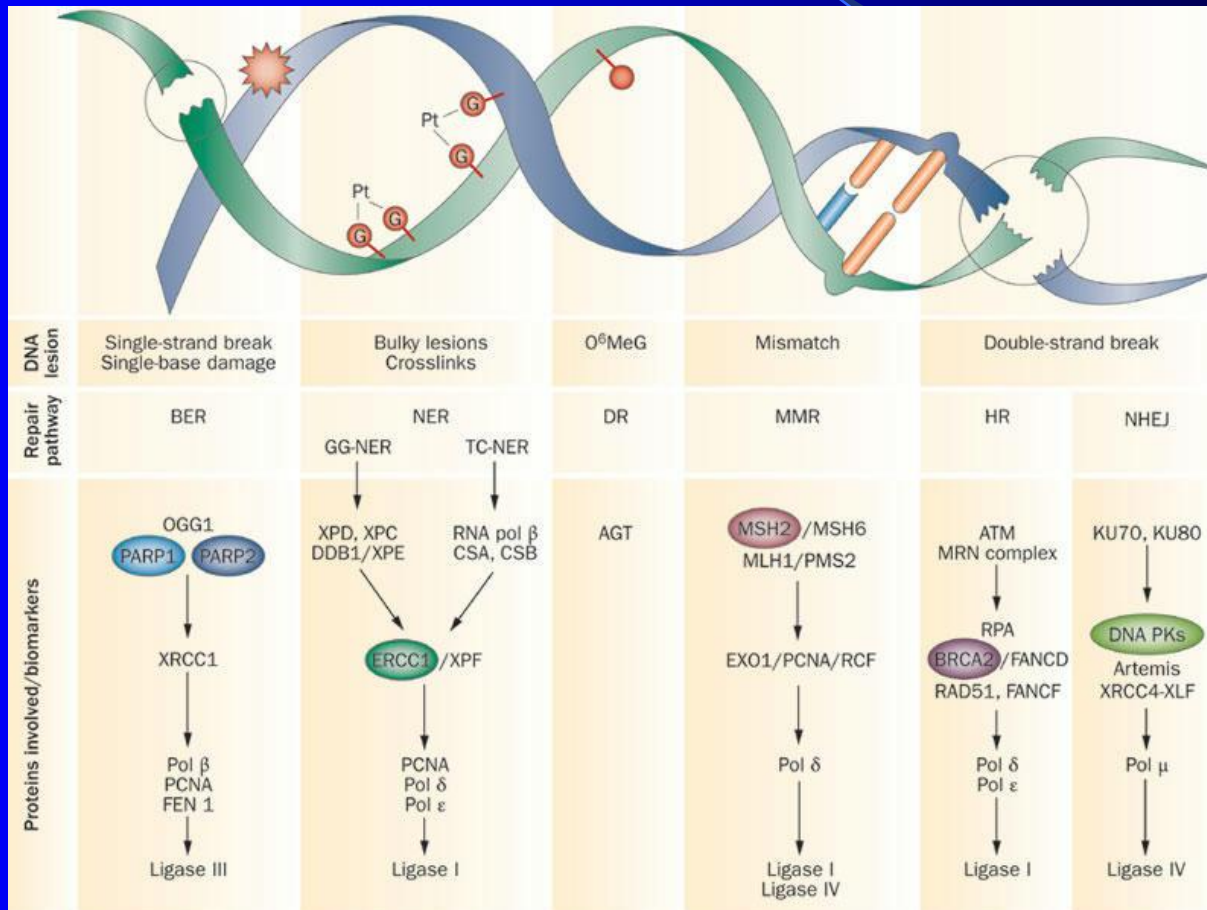
Következményei lehetnek:

- visszafordíthatatlan nyugvó állapot= öregedés
- apoptózis
- kontrollálatlan sejtosztódás, rák alakulhat ki
- Hibák keletkezése – hibajavítás egyensúlya (nem végtelen kapacitás)
- Ames próba: mutagén hatás kimutatása
 - Genetikailag pontosan feltérképezett hisztidin hiányos mutáns Salmonella baktériumtörzs
 - Vizsgálat: 10^9 hisztidinhiányos baktériumból hány alakul át hisztidint termelni képes baktériummá, azaz hány lesz képes szaporodni kívülről bevitt hisztidin nélkül

DNS hibajavítás

- **Egy szálát érintő károsodás**
- **Kivágó mechanizmusok:**
 - Báziskivágó javítás (base excision repair – BER), amely egyetlen oxidáció, alkiláció, hidrolízis vagy deamináció útján károsodott nukleotidot kijavítása
 - Nukleotidkivágó javítás (nucleotide excision repair – NER), amely 2–30 nukleotid hosszúságú károsodott szakaszokat javít ki. Pl. UV fény dimerizáció hatására
 - Össze nem illő párok javítása (mismatch repair – MMR), amely a DNS-replikáció és az azt követő rekombináció során keletkező hibás nukleotidpárokat javítja ki
- **Két szálát érintő károsodás**
- nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end-joining – NHEJ)
- HR – homológ rekombináció

DNS hibajavítás típusai



- Postel-Vinay, S., Vanhecke, E., Olaussen, K. et al. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 144–155 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.3>

DNS vizsgálati módszerek

- Célja:

- Betegségeket okozó mutációk felderítése
- Genetikai rizikófaktorok megismerése
- Farmakogenetika (gyógyszeres kezelésre adott válasz)
- Prenatális vizsgálat (pl. NIPT- non-invasive prenatal testing)
- Apasági vizsgálatok
- Igazságügyi vizsgálatok