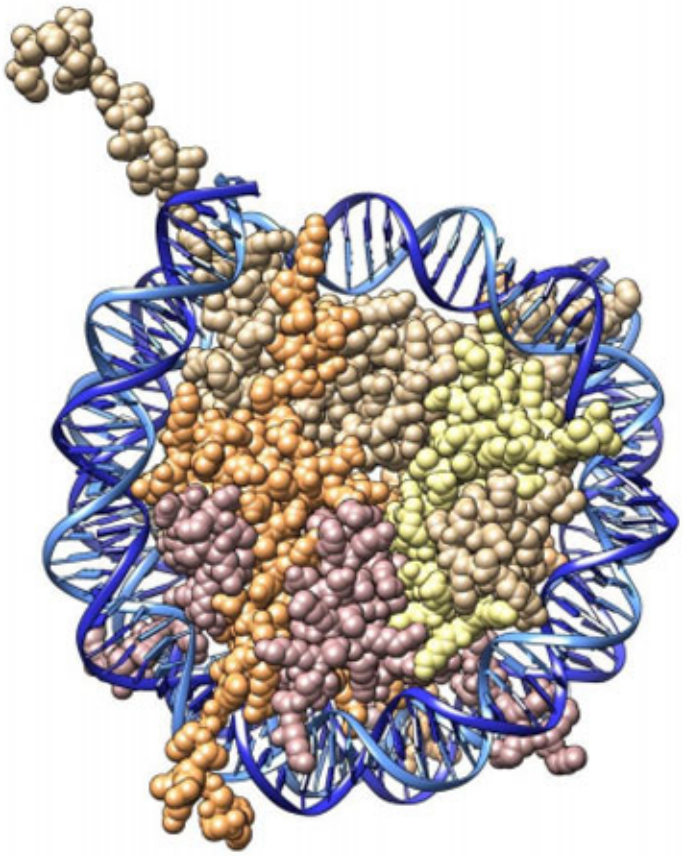
EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR



A BIOKÉMIA ÉS A MOLEKULÁRIS BIOLÓGIA ALAPJAI

NYITRAY LÁSZLÓ
PÁL GÁBOR

A biokémia és molekuláris biológia alapjai

Nyitray László
Pál Gábor

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A biokémia és molekuláris biológia alapjai

írta Nyitray László és Pál Gábor
szerkesztette:
Nyitray László
Pál Gábor
szakmai konzulens:
Hegyi György
az ábrákat készítette:
Micsonai András
szakmai lektor:
Asbóth Bence
Szerzői jog © 2013 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Tartalom

Előszó x
1. Általános bevezető 1
1.1. A biokémia fő témakörei 1
1.1.1. Szerkezeti biokémia 1
1.1.2. Bioenergetika és enzimológia 1
1.1.3. Molekuláris biológia 2
1.2. Az élővilág egysége, az élőlények felépítésének, működésének közös vonásai, alapelvei 2
1.2.1. A sejt, mint működési alapegység 3
1.2.2. Az élőlények alacsony entrópiájú állapotot tartanak fent 3
1.2.3. Az élőlények elemi kémiai összetétele hasonló 4
1.2.4. Az élőlények alapvető molekuláris összetétele 5
1.2.5. Az élőlényekre legjellemzőbb makromolekulák: a kombinatorikus építkezés alapelve 5
1.2.6. Specifikus, dinamikus molekuláris felismerések másodlagos kötésekkel 7
1.2.7. Az élőlényekben a kémiai reakciókat enzimek katalizálják 7
1.2.8. A sejtek molekuláris felépítése hierarchikus 7
1.2.9. Az örökletes információ tárolásának és kifejezésének közös alapelve 8
1.2.10. Önreprodukció és változatosságteremtés 8
1.2.11. A makromolekuláris önszerveződés alapelve 8
1.2.12. Az ATP, mint energiavaluta 9
1.2.13. Molekuláris motorok és molekuláris gépek 9
1.3. Dimenziók a biokémiában 9
1.3.1. A fizikai kiterjedés mérettartománya 10
1.3.2. Időtartamok skálája 11
1.3.3. A biokémia területére jellemző energiatartományok 12
1.3.4. A biokémia területére eső tömegértékek 13
1.3.5. Az élőlények genomjának információtartalma 14
2. Kémiai alapok 16
2.1. Az élő szervezetek alapvető vegyülettípusai 16
2.1.1. Az atomokból kémiai kötések révén vegyületek jönnek létre 16
2.1.2. A szén központi szerepe 17
2.1.3. Funkciós csoportok 17
2.1.4. A molekulák, funkciós csoportok ábrázolása 20
2.2. A szerves vegyületek háromdimenziós szerkezete: konformáció és konfiguráció 21
2.2.1. Konfiguráció I.: geometriai (cisz-transz) izoméria 22
2.2.2. Konfiguráció II.: királis centrumok és optikai izoméria 22
2.2.3. Konformáció 26
2.3. Az élő szervezetekben lejátszódó fő reakciótípusok 27
2.3.1. Oxidáció-redukció 29
2.3.2. Szén-szén kötés hasadása nukleofil szubsztitúcióval 30
2.3.3. Molekulán belüli csoportátrendeződés 33
2.3.4. Csoporttranszfer reakciók 34
2.3.5. Kondenzációs reakciók vízkilépéssel 35
2.4. A másodlagos kölcsönhatások (kötések). 36
2.4.1. A másodlagos kölcsönhatásokról általánosságban 36
2.4.2. A másodlagos kölcsönhatások típusai 37
2.4.3. Molekuláris felismerés gyenge másodlagos kötésekkel 43
2.5. A víz alapvető tulajdonságai és biokémiai szerepei 45
2.5.1. A víz fő fizikokémiai adatai 45
2.5.2. A víz, mint oldószer 46
2.5.3. A hidrofób hatás (effektus) 47
2.5.4. Ionegyensúlyok vizes közegben 50
2.5.5. Sav-bázis reakciók vizes közegben 52
2.5.6. Puffer-hatás 56
2.5.7. Biológiai pufferek 58
2.5.8. Biokémiai kísérletekben használt pufferek 60

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.5.9. A víz, mint reakciópartner 60
3. A termodinamika alapjai 62
3.1. A termodinamika alapfogalmai 62
3.2. A termodinamika első főtétele 64
3.3. Az entalpia fogalmának bevezetése 65
3.4. A termodinamika második főtétele 67
3.4.1. Az entrópia fogalmának statisztikus bevezetése 69
3.4.2. A szabadentalpia bevezetése 70
3.4.3. A szabadentalpia változás és a maximális nem-térfogati munka 73
3.4.4. A kémiai reakciókat kísérő szabadentalpia változás 74
3.4.5. Standard körülmények a biokémiában 77
3.4.6. Kapcsolt kémiai reakciók 79
4. Aminosavak, peptidkötés, a fehérjék elsődleges és másodlagos szerkezete 81
4.1. A 20 (+2) fehérjealkotó aminosav 81
4.1.1. Apoláros, alifás oldalláncú aminosavak 85
4.1.2. Aromás oldalláncú aminosavak 86
4.1.3. Poláros, töltést nem hordozó oldalláncú aminosavak 86
4.1.4. Pozitív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak 87
4.1.5. Negatív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak 88
4.2. Az aminosavak disszociációs állapotai 89
4.2.1. Disszociábilis csoportot nem tartalmazó oldalláncú aminosavak izoelektromos pontja 90
4.2.2. Disszociábilis csoportot tartalmazó oldalláncú aminosavak izoelektromos pontja 91
4.3. Peptidkötés, polipeptidek, fehérjék 93
4.3.1. A polipeptidlánc alaptulajdonságai 93
4.3.2. Fehérjeszerkezeti szintek: primer (elsődleges) szerkezet 95
4.3.3. A fehérjék mérettartománya 95
4.3.4. Egyszerű és összetett fehérjék 96
4.3.5. A peptidkötés szerkezete és tulajdonságai 97
4.3.6. A fehérje főlánc (peptidgerinc) konformációjának geometriai jellemzése 99
4.4. Fehérjeszerkezeti szintek: másodlagos szerkezet 101
4.4.1. A másodlagos szerkezetek kísérletes igazolása 103
4.4.2. A jobbmenetes α-hélix szerkezet 103
4.4.3. A β-lemez szerkezet 105
4.4.4. β-kanyarok 107
4.5. A fibrilláris fehérjék térszerkezete 110
4.5.1. A keratin 110
4.5.2. A selyem fibroin 113
4.5.3. A kollagén térszerkezete 114
5. A fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete 117
5.1. A fehérjék térszerkezet-vizsgálata 117
5.1.1. A biológiai objektumok vizualizálásának jelentősége 117
5.1.2. Szerkezet-meghatározás röntgendiffrakcióval 117
5.1.3. Szerkezetmeghatározás mágnesen magrezonanciával 119
5.2. A fehérjék harmadlagos szerkezete 121
5.2.1. A globuláris fehérjék szerkezetének alapvető közös vonásai 121
5.2.2. A globuláris fehérjék hierarchikus szerkezeti felépítése 123
5.2.3. Fehérjeszerkezeti motívumok 123
5.2.4. Domének 125
5.3. Fehérje térszerkezeti típusok 125
5.4. A fehérje térszerkezet stabilitása 131
5.5. A fehérje térszerkezet kialakulása 132
5.5.1. A fehérjék letekeredése, az „*unfolding*”. 132
5.5.2. Az Anfinsen-kísérlet 134
5.5.3. A fehérjék feltekeredése: a Levinthal-paradoxon 137
5.5.4. A fehérjék feltekeredése: a folding tölcsér 137
5.6. A fehérjék negyedleges szerkezete 139
5.6.1. A negyedleges szerkezet lehetséges előnyei 140
6. Fehérjék izolálása és fehérjevizsgáló módszerek 142

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.1. A spektroszkópia alapjai 142
6.1.1. Minőségi meghatározás: spektrumok 144
6.1.2. Mennyiségi meghatározás: a Lambert-Beer törvény 144
6.2. A sejtek feltárása és a fehérjék izolálása 145
6.2.1. A sejtek feltárása 145
6.2.2. Sejtfrakcionálás 146
6.2.3. Centrifugálás 146
6.2.4. Fehérjék durva frakcionálása 151
6.3. Kromatográfiás eljárások 156
6.3.1. Ioncserés kromatográfia 156
6.3.2. Fehérjék elválasztása méret szerint: gélszűrő kromatográfia 158
6.3.3. Reverz-fázisú kromatográfia: fehérjék elválasztása hidrofób jelleg alapján 159
6.3.4. Affinitás-kromatográfia 159
6.4. Elektroforetikus eljárások 160
6.4.1. Az elektroforézisről általánosságban 160
6.4.2. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) 162
6.5. Aminosav összetétel analízis 171
6.6. A fehérjék szekvenálás 174
6.6.1. Sanger módszerének lényege, és jelentősége 174
6.6.2. Aminosav csoportok egyenkénti eltávolítása az N-terminálisról: az Edman-módszer 175
6.6.3. A diszulfidhidak pozíciójának meghatározása 177
7. A fehérjeműködés paradigmája: mioglobin és hemoglobin 179
7.1. A fehérjék működésének általános jellemzői 179
7.2. Az oxigénkötés alapvető problémaköre 179
7.3. A mioglobin és a hemoglobin összehasonlítása 181
7.4. A reverzibilis ligandum-kötés általános matematikai leírása 184
7.5. Az egyszerű szállítófehérje problémája 187
7.6. A kooperativitás jelensége, és matematikai leírása 188
7.7. A hemoglobin kooperatív oxigénkötésének Hill-diagramja 190
7.8. A hemoglobin Hill-diagramjának értelmezése 192
7.8.1. A kooperativitás szekvenciális modellje 193
7.8.2. A kooperativitás összehangolt modellje. 193
7.9. A hemoglobin szerkezetének és működésének részletes bemutatása 194
7.10. A hemoglobin anyagcserefüggő szabályozása, a Bohr-effektus 198
7.11. A hemoglobin oxigénkötésének anyagcserétől független szabályozása 200
7.12. A magzati hemoglobin működése 202
7.13. Egy örökletes betegség, a sarlósejtes anémia 203
8. Az enzimműködés alapjai 205
8.1. Az enzimek specifitása 205
8.2. Kofaktorok 206
8.3. Az enzimek osztályozása 208
8.4. Az enzimkatalízis termodinamikai alapjai 209
8.5. Az enzimkatalízis molekuláris mechanizmusa 216
8.5.1. Fémion katalízis 216
8.5.2. Általános sav-bázis katalízis 218
8.5.3. Kovalens katalízis 219
9. Enzimkinetika 226
9.1. A Michaelis-Menten kinetika első modellje 226
9.2. A Michaelis-Menten kinetika továbbfejlesztett modellje 229
9.3. A kezdeti sebesség értékek és a fő kinetikai paraméterek meghatározása. 235
9.4. Enzimgátlás típusok 238
9.4.1. Kompetitív gátlás 238
9.4.2. Unkompetitív gátlás 240
9.4.3. Kevert típusú gátlás 242
10. Szénhidrátok 244
10.1. Monoszacharidok 244
10.2. Diszacharidok 246
10.3. Poliszacharidok 246

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

10.3.1. Glikózaminokligánok ... 249
10.4. Glikokonjugátumok ... 250
10.4.1. Peptidoglikánok ... 250
10.4.2. Proteoglikánok ... 251
10.4.3. Glikoproteinek ... 253
10.5. A „cukorkód” és jelentősége ... 254
10.5.1. Specifikus szénhidrátkötő fehérjék: lektinek ... 255
11. Lipidek és biomembránok ... 260
11.1. Zsírsavak és neutrális zsírok ... 260
11.2. Membránalkotó lipidek ... 262
11.2.1. Glicerofoszfolipidek és szfingolipidek ... 263
11.2.2. Glikolipidek ... 264
11.2.3. Koleszterin ... 265
11.2.4. Éterlipidek ... 266
11.3. Egyéb lipidek: jelátviteli molekulák, kofaktor, pigmentek ... 267
11.3.1. Jelátviteli lipidek ... 267
11.3.2. Lipofil vitaminok és származékaik ... 268
11.3.3. Kofaktorok, pigmentek egyéb lipidek ... 269
11.4. A lipidek vizsgálati módszerei ... 270
11.5. Biomembránok ... 271
11.5.1. A biomembránok általános tulajdonságai ... 271
11.5.2. Membránfehérjék és szerepük ... 273
12. Nukleinsavak ... 283
12.1. A nukleinsavak kémiai felépítése ... 283
12.2. A nukleinsavak örökítő szerepének bizonyítása ... 293
12.2.1. A Griffith-kísérlet ... 293
12.2.2. Az Avery-MacLeod-McCarty kísérlet ... 294
12.2.3. A Hershey-Chase kísérlet ... 295
12.2.4. A Chargaff szabályok ... 297
12.3. A DNS térszerkezetének Watson-Crick modellje ... 297
12.3.1. A Watson-Crick modell megalkotásának rövid története ... 297
12.3.2. A Watson-Crick modell részletes ismertetése ... 298
12.3.3. A komplementaritás következménye ... 302
12.3.4. A Watson-Crick modellt igazoló biofizikai mérések ... 303
12.3.5. A DNS magasabbrendű szerkezeti formái ... 305
13. Replikáció (DNS szintézis) és DNS-hibajavítás ... 317
13.1. A centrális dogma ... 317
13.2. A DNS replikációval kapcsolatos alapvető kérdések ... 318
13.3. A Meselson-Stahl kísérlet: a DNS replikáció szemikonzervatív ... 319
13.4. A Cairns-kísérlete: az origó és a replikációs villa kimutatása ... 322
13.5. A DNS szintézis kémiája ... 325
13.6. Az Okazaki-fragmentumok ... 326
13.7. DNS-polimerázok ... 327
13.8. A replikáció iniciációs fázisa ... 332
13.9. A replikáció elongációs fázisa ... 333
13.10. A replikáció terminációs fázisa ... 336
13.11. A prokarióta és eukarióta replikáció összevetése ... 337
13.12. DNS hibajavítás ... 339
13.12.1. Az Ames-teszt ... 341
13.12.2. Mutáció típusok ... 342
13.12.3. A fő DNS hibajavító mechanizmusok ... 347
14. Transzkripció (RNS szintézis) ... 356
14.1. A transzkripció és a replikáció hasonló vonásai ... 357
14.2. A prokarióta RNS-polimeráz, a prokarióta transzkripció iniciációs fázisa ... 358
14.3. A transzkripció elongációs fázisa ... 363
14.4. A transzkripció terminációs fázisa ... 364
14.5. A prokarióta és eukarióta transzkripció összevetése ... 366

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

14.5.1. Fő különbségek a prokarióta és az eukarióta mRNS keletkezésének szabályozásában 367
14.6. Az eukarióta RNS-polimeráz II működése 368
14.6.1. Az eukarióta RNS-polimeráz II és a preiniciációs komplex 368
14.7. Transzkripció gátlószerei 371
14.8. Az eukarióta gének mozaikos felépítése 372
14.9. Splicing mechanizmusok 375
14.9.1. Az I. és II. csoport, az önhasító intronok (*self-splicing*) 375
14.9.2. A III. csoport és a spliceoszómák 375
14.10. Az alternatív splicing 378
14.11. Az eukarióta mRNS 5'-végének processzálása 379
14.12. Az eukarióta mRNS 3' végének processzálása 380
14.13. A riboszómális RNS-ek érése prokariótákban és eukariótákban 381
14.14. A tRNS-ek érése prokariótákban és eukariótákban 383
15. A genetikai kód feltörése 386
15.1. A genetikai kód megfejtését megalapozó ismeretek 386
15.1.1. A fehérjeszintézis helyének azonosítása 386
15.1.2. Az adapter RNS (tRNS) azonosítása 387
15.1.3. Az információt közvetítő, hírvivő RNS (mRNS) azonosítása 388
15.1.4. A genetikai kód triplet voltának felismerése 389
15.1.5. A kód nem átfedő 390
15.1.6. Egyetlen érvényes leolvasási keret van 390
15.2. A genetikai kód feltöréséhez vezető kísérletek 391
15.2.1. Az első tripletek jelentésének feltárása mesterséges homopolimer RNS-ekkel 391
15.2.2. A random nukleotid keveréses módszer 392
15.2.3. Szintetikus trinukleotid módszer: a Nirenberg-Leder kísérlet 392
15.2.4. Khorana repetitív ismétlődéseket tartalmazó szintetikus RNS módszere 394
15.3. A genetikai kódszótár szabályos szerkezete 395
15.3.1. A kodon-aminosav hozzárendelés szabályossága 396
15.3.2. Degenerált kód és lötyögő kodon-antikodon kapcsolat 397
15.4. A genetikai kód majdnem tökéletesen univerzális 400
16. Transzláció (fehérjeszintézis) 402
16.1. A fehérjeszintézis és az mRNS-leolvasás iránya 402
16.1.1. A fehérje az N-terminálistól a C-terminális felé szintetizálódik 402
16.1.2. Az mRNS 5'→ 3'-irányban olvasódik le 403
16.2. A fehérjeszintézis első fő szakasza, az aminosavak aktiválása és tRNS-hez kötése 404
16.2.1. A tRNS-ek közös tulajdonságai, és másodlagos szerkezete 405
16.2.2. Az aminosav aktiválás lépései 406
16.2.3. A tRNS specifikus felismerése a szintetáz által 411
16.3. A fehérjeszintézis riboszómális szakasza 412
16.3.1. A riboszómák térbeli és funkcionális felépítése 412
16.3.2. A transzláció lánckezdése (iniciáció) 415
16.3.3. Lánchosszabbítás (elongáció) 417
16.3.4. Lánczárás (termináció) 423
16.4. Az eukarióta transzláció néhány jellegzetessége 424
16.5. Transzláció gátlószerek 424
16.6. A fehérjeszintézis energiamérlege 425
17. A fehérjeműködés szabályozása 426
17.1. A fehérjeműködés lényege 426
17.2. Allosztérikus fehérjék/enzimek 429
17.2.1. Az allosztérikus fehérjék általános tulajdonságai 429
17.2.2. Példa egy allosztérikus enzimre: aszpartáz-transzkarbamoiláz 431
17.3. Reverzibilis kovalens szabályozása 434
17.3.1. Reverzibilis foszforiláció 435
17.3.2. Protein-kináz családok 436
17.3.3. A cAMP-függő protein-kináz (protein-kináz A) működése 437
17.4. Irreverzibilis kovalens szabályozása 439
17.4.1. Fehérjék aktiválása proteolitikus hasítással 440

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

17.5. Fehérje izoformák, izoenzimek 442
18. A génexpresszió szabályozása 444
18.1. A génexpresszió szabályozás általános elvei 444
18.1.1. A transzkripciós faktorok DNS-felismerése 446
18.2. Prokarióta génexpresszió szabályozás 451
18.2.1. A lac-operon működése 453
18.2.2. A Trp-operon és az attenuáció 458
18.3. Eukarióta génexpresszió szabályozás 460
18.3.1. A komplex genom komplex szabályozást igényel 460
18.3.2. Kromatin átrendeződés, remodellálás (*remodeling*) 461
18.3.3. Eukarióta transzkripciós faktorok, kofaktorok, komplexek 466
18.3.4. Szteroid hormonok hatásmechanizmusa 469
18.4. Génexpresszió szabályozás a transzláció szintjén 472
18.4.1. Az állatok vasion anyagcseréjében szerepet játszó mRNS-ek szabályozása 472
18.5. Szabályozott mRNS lebomlás: RNS interferencia 474
19. A géntechnológia alapjai 477
19.1. A géntechnológia célja és módszerei 477
19.2. Rekombináns DNS előállítása és felszaporítása: molekuláris klónozás 478
19.2.1. Restrikciós endonukleázok, a rekombináns DNS előállítás legfontosabb eszközei 478
19.2.2. Rekombináns DNS *in vitro* előállítása 480
19.2.3. A molekuláris klónozás lépései 482
19.2.4. A vektor DNS-ek típusai 484
19.2.5. Rekombináns DNS könyvtárak 492
19.3. Hibridizációs technikák 495
19.3.1. A Southern- és Northern-blot technika és az RFLP módszer 496
19.3.2. DNS-chip (*microarray*) technika 497
19.4. Polimeráz láncreakció (PCR) 498
19.5. DNS-szekvenálás 500
19.5.1. A Sanger-féle láncterminációs (didezoxi-) szekvenálás 501
19.5.2. Automata fluoreszcens szekvenálás 503
19.5.3. Új-generációs szekvenálás 503
19.6. Irányított *in vitro* mutagenezis 504
19.6.1. Hely-specifikus mutagenezis Kunkel-módszerrel 505
19.7. Rekombináns fehérjék előállítása 506
19.7.1. Prokarióta expressziós rendszerek 507
19.7.2. Rekombináns fehérjék előállításának további lehetőségei 508
19.8. Transzgenikus élőlények és génterápia 509
19.8.1. Transzgenikus állatok 509
19.8.2. Transzgenikus növények 511
19.8.3. Génterápia 512
19.9. Célzott génmódosítás *in vivo*: génkiütés és géncsendesítés 514
19.9.1. Génkiütés (*knockout*) egérben 514
19.9.2. Géncsendesítés (*gene silencing*, *knockdown*) 516
20. A bioenergetika alapjai és az anyagcsere áttekintése 519
20.1. Általános bevezető 519
20.2. Az egyes anyagcsere folyamatok szabályozásának általános alapelvei 522
20.3. Az egyes enzimatikus lépések szabályozásának módjai 523
20.4. Az allosztérikus szabályozás alapelve, és fő előnyei 524
20.5. Az ATP központi szerepe 526
20.6. Az ATP energiatároló képességének szerkezeti okai 527
20.7. Csoportátvitel ATP-ről kapcsolt reakciókban 528
20.8. Az ATP-keletkezés szubsztrát-szintű foszforilálással 531
20.9. ATP biztosítja a többi nukleozid-trifoszfát létrejöttét 533
20.10. Redoxreakciók 533
20.11. Példa egy összetett anyagcsere útvonalra: a tápanyagok aerob lebontása, vagyis a sejtlégzés áttekintése. 536
20.12. Összefoglalás 537
A. Függelék 539

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az e-jegyzethez kapcsolódó animációk 539

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Előszó

Ezt az elektronikus tankönyvet azért írtuk, hogy szilárd alapot nyújtsunk a biokémia és molekuláris biológia csodálatos világa iránt érdeklődő olvasó számára. Természettudósok generációinak kutatásai nyomán a biokémia és molekuláris biológia területére sorolható ismeretanyag olyan hatalmasra nőtt, hogy annak teljes, részletekbe menő összefoglalása, illetve az olvasó oldaláról tekintve annak befogadása lehetetlen feladat lenne. Egy tankönyvnek természetesen nem is az a célja, hogy az összes ismeretet az olvasó elé tárja. A cél sokkal inkább az adott szakterület (aktuális szemlélet szerint) legfontosabb tényanyagának és az egyes tények között fellelhető összefüggéseknek, általános törvényszerűségeknek az ismertetése.

A biokémia és molekuláris biológia teljes spektrumát felölelő, gazdagon illusztrált, nagyalakú angolszász tankönyvek terjedelme meghaladja az ezer oldalt. A széles spektrumon kívül a nagy terjedelem másik oka az, hogy a legtöbb ilyen tankönyv rendkívüli részletességgel tárgyalja az egyes tématerületeket.

A biokémia és molekuláris biológia alapjai című elektronikus tankönyvet egy, a fentiekhez hasonlóan átfogó és részletes, többkötetes mű első részének szánjuk. Céljához híven és szándékaink szerint ez az első könyv a legalapvetőbb kérdéseket tekinti át, amivel megalapozza a biokémiai jellegű tárgyakat tanuló hallgatók számára a későbbi tanulmányaikat. Természetesen kisebb terjedelemben, egykötetes formában is tárgyalható lenne a biokémia és molekuláris biokémia, amennyiben az ismeretek teljes spektrumát megtartjuk, de minden területről csak felszínes információt nyújtunk. Egy ilyen ismeretterjesztő megközelítésnek is megvannak az előnyei. Szélesebb palettát kínál az olvasónak azzal a szigorú kikötéssel, hogy alaposabb tudás átadása, mélyebb megértés biztosítása helyett inkább az érdeklődés felkeltésére szolgál.

Mivel egyetemi tankönyvet készítettünk, mi inkább azt a megközelítést választottuk, hogy a széles spektrumból az első kötet számára kiemeltük az általunk legfontosabbnak tartott témákat, és ezekről alapos ismereteket igyekeztünk nyújtani. A célunk az volt, hogy minden fejezet megalapozott, érthető legyen, és az egyes fejezetek logikus rendben, egymásra épülve kövessék egymást. Ez az elektronikus tankönyv ezáltal lerakja a később megírandó kötetek alapjait.

A későbbi részekben ismertetésre kerül majd a „klasszikus” biokémia fő területe, az anyagcsere is. Ezen kívül később a biokémiának és molekuláris biológiának azokat a speciális területeit is ismertetjük majd, amelyek meggyőződésünk szerint az egyetemi hallgatóink további molekuláris szintű tanulmányaihoz nyújtanak majd segítséget. Külön fejezetet szentelünk a motorfehérjék működésének, részletesebben tárgyaljuk a membrán csatornák és pumpák működését, a jeltovábbító útvonalak egyes típusait, az érzékelés molekuláris hátterét, a sejtciklus és az apoptózis molekuláris biológiáját, a molekuláris evolúció alapvonásait, végül betekintést nyújtunk a farmakobiokémiába is.

A tudományos megközelítés egyik alapvető jellemzője, hogy minden tudományos állítás igazságtartalma megkérdőjelezhető. Minden állítást csak addig fogadunk el, amíg az összhangban van a tapasztalatokkal. Ezért arra ösztönözzük az olvasót, hogy minden kijelentést fogadjon egyfajta egészséges kritikával, és gondolkozzon el azon, hogy vajon az nem mond-e ellent az addigi ismereteinek. Általános útmutatóként fontosnak tartjuk megjegyezni azt is, hogy mivel a biokémia számos olyan területtel foglalkozik, amely a széles közvélemény számára is izgalmas (betegségmechanizmusok feltárása, gyógyszerkutatás, orvosi és igazságügyi diagnosztika, evolúciókutatás stb.), ezért az elsajátítandó ismeretek egy része már nem szakmai forrásokból is ismert, esetleg triviális is lehet. Ennek ellenére arra biztatjuk az olvasót, hogy még a már ismerősnek tűnő információkat is kezelje újként, gondolkozzon el azok mélyebb jelentőségén, vegye észre, hogy milyen hatalmas intellektuális eredmény volt azok feltárása, és próbálja meg ezeket az ismereteket is egy nagyobb, egységes ismeretanyagon belül logikailag elhelyezni. Ennek elősegítésére a könyv számos fejezetében igyekeztünk a puszta információn kívül azt is bemutatni, hogy az adott ismeretanyagot milyen kísérleteken keresztül sikerült feltárni, bizonyítani. Ezen felül arra is törekedtünk, hogy felhívjuk a figyelmet a különböző fejezetekben leírt ismeretek szélesebb összefüggéseire.

Elektronikus tankönyvről lévén szó, igyekeztünk a szövegben minél több kereszthivatkozást elhelyezni, amelyek megkönnyítik az olvasó számára a már említett összefüggések könnyebb megtalálását és megértését. Néhány témakörhöz animáció kapcsolódik, amely angol nyelven mutat be egy-egy molekuláris biológiai folyamatot és a géntechnológiában fontos módszert. A biokémia és molekuláris biológia megértéséhez elengedhetetlen a makromolekulák térszerkezetének vizualizációja, a molekuláris grafikai programok legalább alapszintű ismerete. Erről a témakörről – a biokémia módszertanának gyakorlatorientált bemutatásával együtt – részletesebb ismeretek

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

talál az olvasó az ELTE Biokémiai Tanszék szerzőgárdája által írt két másik elektronikus tankönyvben („Bevetés a biokémiába gyakorlati jegyzet” és „Géntechnológia és fehérjemérnökség”).

Egy igazán jó tankönyv túl azon, hogy hasznos ismereteket tartalmaz, logikusan szerkesztett és könnyen követhető, a tények és összefüggések ismertetésén felül gondolatokat is ébreszt az olvasóban, felkelti annak kíváncsiságát, és új ismeretek szerzésére inspirál.

Azt, hogy ez a tankönyv mennyire felel meg a fenti kritériumoknak, csak az olvasók dönthetik el.

Pál Gábor és Nyitray László

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

1. fejezet - Általános bevezető

(szerző: Pál Gábor)

1.1. A biokémia fő témakörei

A biokémia szerteágazó tudományterület, vizsgálati köre mégis feloszthető bizonyos fő, bár élesen nem elkülönülő területekre. Nevéhez híven a biokémia igyekszik a kémia oldaláról vizsgálni és megérteni a biológiai rendszerek felépítését, ezek működését, a biológiai folyamatok molekuláris hátterét.

1.1.1. Szerkezeti biokémia

A biokémia egyik fő célja az, hogy azonosítsa az egyes életfolyamatokban résztvevő összes molekulát, feltárja ezek szerkezetét, és azt, hogy mi a funkciójuk. A biokémiai kutatások egyik fontos vezérelve, ami egyébként messze túlmutat a biokémián, hogy **a szerkezet meghatározza a funkciót**. Az anatómia, az élettan, a mérnöki tudományok, hogy csak néhányat említsünk, természetesen ugyanilyen értelemben központi fontosságúnak tekintik a szerkezet-funkció kapcsolatát.

A biokémia területén a szerkezet-funkció vizsgálatokra koncentráló tudományterületet manapság **szerkezeti biokémiá**nak, vagy **szerkezeti biológiá**nak nevezik. A szerkezeti biokémia fő célja, hogy atomi részletességgel tárja fel az egyes folyamatokban résztvevő makromolekulák térszerkezetét, ebből kiindulva leírja, hogy az egyes molekulák milyen kölcsönhatásokba lépnek egymással, és végül megmagyarázza, hogy mindez hogyan vezet az adott életjelenséghez. A kölcsönhatások egy tetemes része nem kovalens átalakulásokat, tehát nem kémiai reakciókat jelent, hanem egyes molekulák másodlagos kötőerőkön keresztül történő specifikus összekapcsolódását. Ez az összekapcsolódás lehet tartós, de lehet nagyon rövid idejű, dinamikus is. A szerkezetek feltárása, az egyes működési modellek kidolgozása természetesen számos tudományterület, fizika, kémia, biofizika stb. szoros együttműködését igényli. A makromolekulák atomi felbontású szerkezetét például fizikai módszerekkel, röntgenkrisztallográfiával illetve mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiával tárják fel (lásd **5.1.3. fejezet**).

A megértést leghatékonyabban megalapozó szerkezet-funkció vizsgálatok túllépnek a természetben található szerkezetek vizsgálatán. Ezekben a kísérletekben célzottan megváltoztatják az eredeti szerkezetet, majd ezek után megvizsgálják a szerkezeti változás pontos funkcionális hatását, és ebből következtetnek az eredeti funkcióra. Mivel az élőlények szinte minden folyamatában fehérjék játsszák a főszerepet, a fehérjéket pedig nukleinsavak kódolják, a szerkezeti biokémiai vizsgálatok fő alanyai is a fehérjék és a nukleinsavak.

A szerkezet-funkció vizsgálatoknak mintegy 30 évvel ezelőtt hatalmas lökést adott, hogy a **géntechnológia** segítségével lehetővé vált a fehérjék szerkezetének célzott, szisztematikus megváltoztatása. A fehérjét kódoló gén irányított mutagenezisével lehetővé vált, hogy egy fehérje bármely aminosavát bármely más aminosavval helyettesítsük. Ez a lehetőség indította útjára a szerkezeti biokémia egyik kiemelten sikeres ágát, amit manapság **fehérjemérnökség**nek neveznek (lásd Géntechnológia és fehérjemérnökség e-könyv).

1.1.2. Bioenergetika és enzimológia

A biokémia egy másik nagy területe az élő szervezetekben zajló kémiai átalakulásokra koncentrál. Itt tehát olyan kölcsönhatásokról van szó, amelyek kovalens kötések felszakadásához, újak kialakulásához, tehát kémiai átalakuláshoz vezetnek. A biokémiai reakciókkal két tudományterület, a **bioenergetika** és az **enzimológia** foglalkozik.

Minden élőlényben folyamatosan kémiai reakciók ezrei zajlanak. A reakciók nagy része a sejtanyagcsere körébe sorolható. A **sejtanyagcsere (metabolizmus)** egymással összefüggő kémiai reakciók összetett hálózata. Ezek révén a sejt folyamatosan felépíti, fenntartja és működteti rendkívül összetett szervezetét. Az anyagcserét két fő, egymással összefüggő, ellentétes irányú folyamat dominálja. A **lebontó folyamatok (katabolizmus)** során összetettebb molekulák kisebb molekulákra bomlanak. A lebontó folyamatok oxidációs lépései energiát szabadítanak fel, amelynek egy része redukált koenzimek és ATP formájában tárolódik. Az **ATP** az összes létező sejt **univerzális „energiavalutá**ja". Az ellentétes irányú **felépítő folyamatok**ban (**anabolizmus**) egyszerűbb molekulákból építi

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

fel a sejt a rá jellemző összetettebb molekulákat, és ehhez a lebontó folyamatokban keletkező ATP-t és a redukált koenzimeket használja fel. A két folyamat tehát szorosan összefügg, egymást feltételezi.

A **bioenergetika**, az anyagcsere kutatás fő célja az, hogy feltárja az adott élőlényben lejátszódó kémiai reakciókat, az ezek egymásutánjából szerveződő útvonalakat, megállapítsa ezek funkcióját és a szabályozásuk miként jét. Szintén a bioenergetika foglalkozik a biokémiai reakciók termodinamikai hátterével. A biokémikus arra kíváncsi, hogy milyen reakciók és folyamatok mennek végbe az élő rendszerekben spontán, mihez szükséges külső energiaforrás, és hogyan, milyen átalakulások során teremti elő a sejt a biokémiai folyamatokhoz hasznosítható energiát.

A kémiai átalakulások vizsgálatával kapcsolatos másik tudományterület, az **enzimológia** ezzel szemben mindig egy-egy konkrét reakcióra, vagy reakció típusra fókuszál. Ezek időbeni lefutását az enzimológia részterülete, az **enzimkinetika** vizsgálja. Mint említettük, minden sejtben egyidejűleg kémiai reakciók százai, ezrei játszódnak le. Ezek a reakciók a kémikus szemszögéből nézve alacsony hőmérséklet ellenére nagy sebességgel játszódnak le, ráadásul precízen szabályozottak. Amikor éppen szükség van rájuk, akkor végbemennek, amikor nincs rájuk szükség, esetleg éppenséggel kárt okoznának, akkor szünetelnek. A nagy reakciósebesség és a szabályozhatóság közös okra vezethető vissza. **A sejtekben zajló kémiai reakciókat enzimek,** döntő többségében **fehérjék,** néhány esetben **RNS molekulák katalizálják**. Az enzimológia fő célja az, hogy feltárja, az egyes enzimek milyen mechanizmussal gyorsítják az általuk katalizált kémiai reakciót. Ugyancsak fontos enzimológiai kérdés, hogy az egyes enzimek hogyan szabályozódnak. Mint látható, az enzimológia és a bioenergetika szorosan összefüggő területek, hiszen a bioenergetika által feltárandó kémiai reakciók mindegyikét, sőt, a biológiai folyamatok mindegyikét enzimek katalizálják.

1.1.3. Molekuláris biológia

Szintén a biokémia klasszikus vizsgálati területének számít annak molekuláris szintű megértése, hogy az örökletes biológiai információ miként tárolódik, hogyan adódik át generációról generációra, és milyen mechanizmusokon keresztül jut érvényre.

A kifejezetten az örökletes információ tárolására, kódolására, kifejeződésére vonatkozó vizsgálatok olyan koherens gondolatkört jelentettek, hogy emiatt érdemesnek bizonyult „molekuláris biológia” néven ezt a témakört külön tudományterületként definiálni. Bár nehéz, és talán nem is célszerű pontos definíciót adni a molekuláris biológia mibenlétére, talán jól jellemezhető ez a terület azzal, hogy egyfajta határtudomány, a biokémián kívül a genetikával és a sejtbiológiával is átfed. Anekdotaként érdemes megjegyezni, hogy a világhírű Francis Crick a molekuláris biológia definiálása körüli meddő vitát a maga részéről azzal zárta le, hogy: "a molekuláris biológia az, amivel a molekuláris biológusok foglalkoznak".

Azt azért leszögezhetjük, hogy a klasszikus értelemben vett **molekuláris biológia** a **biológiai információ áramlásá**val foglalkozik, amelynek a lényegét szintén Francis Crick fogalmazta meg 1958-ban, az ún. **centrális dogma** kifejezés bevezetésével (ami egyébként, mint azt később Crick is elismerte, kissé szerencsétlen megfogalmazás, hiszen semmi köze nincs a teológia megkérdőjelezhetetlen állításaihoz). A centrális dogmáról, illetve a biológiai információáramlás folyamatairól (replikáció, transzkripció, transzláció) későbbi fejezetekben (lásd **1.2.9.**, **13. , 14. és 16. fejezetek**) részletesen lesz szó, itt csak annyit említünk meg róla, hogy az eredeti állítás arra vonatkozott, hogy a DNS szekvenciában tárolt információ kizárólag a fehérje szekvencia irányába áramolhat, fehérje szekvenciából visszafelé nem.

1.2. Az élővilág egysége, az élőlények felépítésének, működésének közös vonásai, alapelvei

A természetkedvelő embert az élővilág szemlélésekor elsőre alighanem az nyűgözi le, hogy az milyen sokszínű. Az egyes fajok szinte végtelennek tűnő változatosságban népesítik be a Földet. Vajon túl azon, hogy élnek, és szaporodnak, mi közös lehet egy tölgyfában és egy baktériumban vagy éppenséggel egy ámbráscetben? Az emberi megismerés folyamatában hatalmas időszaknak kellett eltelnie, mire világossá vált, hogy a látványos, sokszor csak felszínes különbségek mögött milyen **alapvető közös vonások** állnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Mindezen közös vonások oka Charles Darwin világrengető evolúciós elmélete, vagyis a fajok közös eredete alapján ma már triviálisnak tűnik. A közös alkotóelemek és működési mechanizmusok oka az, hogy az összes ma létező élőlény egyetlen, több milliárd éve kialakult élőlény leszármazottja. Az **evolúciós szemlélet** áthatja a biológia minden ágát, így a biokémiát és a molekuláris biológiát is.

A molekuláris biológia kialakulásának egyik, ha nem első mérföldköve a DNS kettősspirál szerkezetének, majd a genetikai kódnak a megfejtése volt. Kiderült, hogy az örökletes információ egyszerű, digitális módon tárolódik a DNS-ben, és egy szabályrendszer alapján kódol fehérjéket. Az evolúció molekuláris szinten, kvantitatív módon tetten érhető a DNS generációról generációra történő örökletes megváltozásában. Az egyes fajok evolúciós távolsága számszerűsíthetővé vált. A molekuláris biológia vívmányai új utakat nyitottak az evolúció mechanizmusainak értelmezésében, a fajok leszármazási útjainak rekonstruálásában. A fenti eredményeket nem kis részben a géntechnológiai és bioinformatikai módszertani forradalomnak köszönhetjük, melynek részleteiről a már említett Géntechnológia és fehérjemérnökség e-könyvben tájékozódhatnak az olvasók.

Ebben az alfejezetben részletesebben is áttekintjük a minden élőlény felépítésére, működésére közösen jellemző tulajdonságokat, alapelveket.

1.2.1. A sejt, mint működési alapegység

Az első mikroszkópok kifejlesztését követően Robert Hooke, korának nagyhatású tudósa és feltalálója saját fejlesztésű mikroszkóppal vékonyra szelt parafa dugóban elsőként fedezte fel a sejteket. Erről 1665-ben publikált nagy sikerű Mikrográfia (*Micrographia*) című könyvében számolt be. Az angol *cell* (cella) kifejezés is az ő nevéhez fűződik. Amikor kortársa, a holland Anton van Leeuwenhoek szintén saját fejlesztésű mikroszkóppal felfedezte a baktériumokat, egysejtű állati és növényi szervezeteket, Robert Hooke volt az, aki a felfedezéseit igazolta. Mindezek után mintegy 200 évvel Matthias Jakob Schleiden, Theodor Schwann, Rudolf Virchow és mások munkássága nyomán kialakult a **sejtelmélet**. E szerint minden élőlény egy vagy több sejtből áll, minden sejt már létező korábbi sejt kettéosztódásából keletkezik (*Omnis cellulae cellula)*, az élő szervezetek döntő életfunkciói, például az anyagcsere a sejteken belül zajlik. Arra is rájöttek, hogy a sejtek működését valamilyen örökletes információcsomag szabályozza, amely a sejtről az utódsejtekre adódik át. A **sejt** tehát az élő szervezetek egyfajta **szerkezeti és működési alapegysége**. A sejt természetesen egy, a környezetétől jól definiált módon elhatárolt entitás. Ez a nem izolált, de jól definiált és szabályozott elhatároltság, mint később látni fogjuk, termodinamikai szükségszerűség. A sejt csak ilyen módon tarthatja fent az élettelen környezetétől lényegesen alacsonyabb entrópiáját, azaz komplexitását.

1.2.2. Az élőlények alacsony entrópiájú állapotot tartanak fent

Minden élőlényre, még a legegyszerűbbre is igaz, hogy lényegesen összetettebb, „bonyolultabb”, mint élettelen környezete. Ez a **nagyfokú komplexitás** alapvető kritériuma annak, hogy az élőlény hatékony módon, a többi élőlénnyel folyamatos versenyben fennmaradjon, és szaporodjon.

Mint arról már volt szó, az élőlények legkisebb működési egysége a sejt. Mind a **sejt**ek, mind a sejtekből szerveződő élő szervezetek **termodinamikai értelemben nyílt rendszer**ek, amelyek folyamatosan anyagokat és energiát vesznek fel a környezetükből, illetve anyagokat és energiát adnak le a környezetüknek. Ez a **folyamatos anyag és energiaáramlás** termodinamikai törvények által megszabott, megkerülhetetlen feltétele annak, hogy az élőlény fenntartsa, rendezett, tehát **alacsony entrópia szint**ű felépítését. Mint látni fogjuk, az élőlények csak úgy tudják fenntartani vagy tovább csökkenteni alacsony entrópia szintjüket, hogy eközben a környezetük entrópiáját, rendezetlenségét folyamatosan növelik.

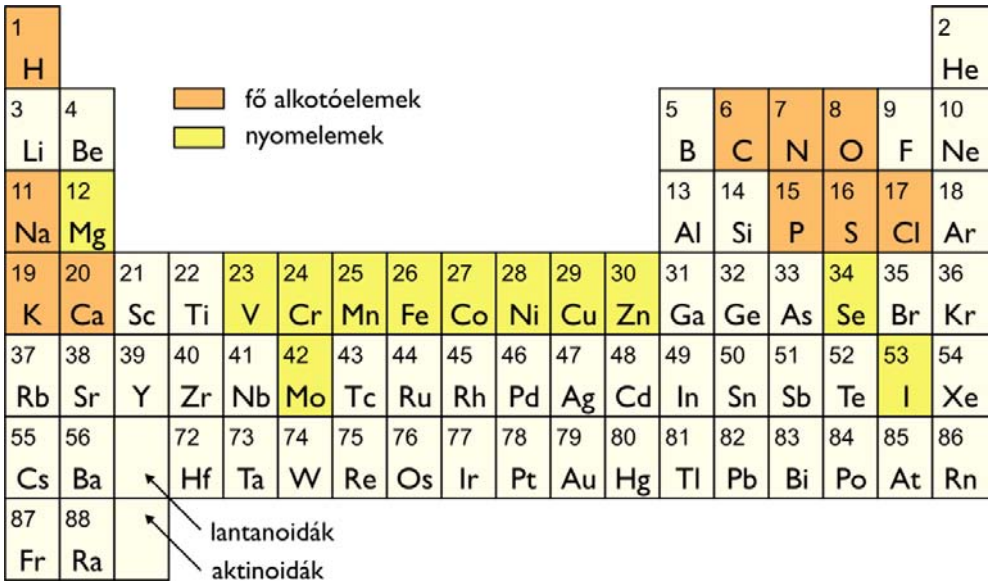
Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, termodinamikai értelemben mennyire nem helytálló az a kijelentés, miszerint az élőlények „egyensúlyban vannak a környezetükkel”. A kijelentés természetesen arra utal, hogy a természetben az élőlények hosszú távon stabilan együtt tudnak létezni környezetükkel. Az élőlényekben, amíg élnek, éppenséggel olyan folyamatok zajlanak, amelyek megakadályozzák, hogy termodinamikai egyensúly álljon be az élőlény és a környezet között. A termodinamikai egyensúly valójában akkor kezd kialakulni, amikor az élőlény elpusztult.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.2.3. Az élőlények elemi kémiai összetétele hasonló

A kémiai analitika fejlődése nyomán az élő szervezetek egyéb, szintén lényeges közös vonására is fény derült. Arra, hogy a legkülönbözőbb élőlények kémiai összetétele (az elemek és vegyület szintjén is) rendkívüli hasonlóságot mutat. A biokémia és molekuláris biológia kialakulása nyomán az is világossá vált, hogy az élőlények alapvető anyagcsere folyamatai, a kémiai energia tárolásának módja, az örökletes információ tárolásának, kódolásának és előhívásának a módja is azonos.

Mint említettük, az élőlények kémiai összetétele rendkívül hasonló, a **1.1. ábra** bemutatott fő elemekből épülnek fel.



1.1. ábra: Az élőlényekben legnagyobb mennyiségben előforduló elemek. A fő alkotóelemeket narancssárga, a nyomelemeket sárga háttér jelzi.

Az összes stabil elem közül négy, alacsony rendszámú elem dominálja az élőlények összetételét, és 6 további elem szerepel jelentős mennyiségben. A **négy leggyakoribb elem a hidrogén, a szén, a nitrogén és az oxigén.** Ezek dominanciájának részben az az oka, hogy az élőlényekre jellemző szerves molekulák döntően ezekből az elemekből épülnek fel. A hidrogén és az oxigén ezen felül azért is domináns közös alkotóelem, mert az élőlények tömegének nagyjából 70%-át víz teszi ki. A **további hat, fő alkotóelem a nátrium, a foszfor, a kén, a klór, a kálium és a kalcium**. A foszfor nagy mennyiségét az magyarázza, hogy a sejtek citoplazmája nagy koncentrációban tartalmaz foszfát ionokat, illetve ez az elem a nukleinsavaknak és az ATP-nek is fő alkotóeleme. A kén legnagyobb mértékben a fehérjék bizonyos aminosavaiban (cisztein és metionin) fordul elő. A nátrium, a kálium, a klór és a kalcium ionos formában van nagy mennyiségben jelen. (Érdemes megjegyezni, hogy a gerincesek esetében a kalcium és a foszfor igen nagy mennyiségben van jelen a csontállományban, kalcium-foszfát formájában).

A nagy mennyiségben jelen lévő elemeken felül minden élőlény tartalmaz jóval kisebb mennyiségben jelenlévő, de létfontosságú elemeket. Ezek a **mikroelemek**nek (vagy **nyomelemek**nek) nevezett anyagok leginkább fémek (például **magnézium, mangán, vas, cink**), amelyek többnyire **ionos formában** játszanak rendkívül fontos szerepet, például enzimek aktív helyének fontos szereplőiként. A Mg^{2+} ezen felül fontos szerepet tölt be oly módon is, hogy a nukleinsavak negatív töltésű foszfátcsoportjaihoz kötődve csökkenti ezek egymást taszító hatását.

Érdemes megjegyezni, hogy az egyes elemek élőlényekre jellemző arányai rendkívüli mértékben eltérnek az élettelen környezetükre jellemző arányoktól. A földkéregben például sokkal kevesebb a szén, mint az élőlényekben. Néhány, a földkéregben nagy tömegben előforduló elem, például a szilícium, a fluor vagy az alumínium viszont csak nagyon alacsony koncentrációban van jelen az élőlényekben. Ez már önmagában is mutatja, hogy az élőlények nem válogatás nélkül veszik fel a környezetük anyagait, hanem aktív módon, energia befektetés révén szelektálnak. Ez természetesen összefügg a már említett ténnyel, hogy az élőlényeknek ahhoz is energiát kell felhasználniuk, hogy a környezettől eltérő állapotukat fenntartsák.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

1.2.4. Az élőlények alapvető molekuláris összetétele

Amennyiben ilyen nagymértékben hasonlít az élőlények elemi összetétele, vajon mi teszi lehetővé az élővilág bámulatos sokféleségét? E mögött olyan anyagtípusnak kell állnia, ami nagy változatosságot mutat. A megfejtéshez az elem-összetétel helyett a vegyület-összetételt kell megvizsgálnunk (lásd **1.1. táblázat**).

1.1. táblázat: A kólibaktérium molekuláris összetétele

Molekula típusa	Tömegszázalék (gramm/ 100 gramm)	Szárazanyag tömegszázalék (%)	Molekulaféleségek száma
víz	70	–	1
fehérje	15	50	kb. 3000 !
DNS	1	3	1 (genom) !
RNS	6	20	kb. 1000
szénhidrát	3	10	50
lipid	2	7	40
szerves építőkövek	2	7	500
szervetlen ionok	1	3	12

Az **1.1. táblázat** a kólibaktérium (*Escherichia coli)* molekuláris összetételét foglalja össze. Egyetlen vegyület, a **víz** látványosan kiemelt szereppel bír, hiszen a baktérium**sejt tömegének mintegy 70%-á**t adja. Ugyanez igaz bármely más élőlény sejtjeire is. A többi, a vízzel nagyjából azonos mérettartományba eső kismolekulából csak néhány százféle van. A táblázatból azonnal kitűnik, hogy a **fehérjék** és a **nukleinsavak**, tehát a makromolekulák jelenthetik az élővilág **változatosság**ának a **fő forrásá**t, hiszen ezekből még egy baktérium esetében is több ezerféle van. Ráadásul ezek adják a baktériumsejt szárazanyagtartalmának mintegy háromnegyedét.

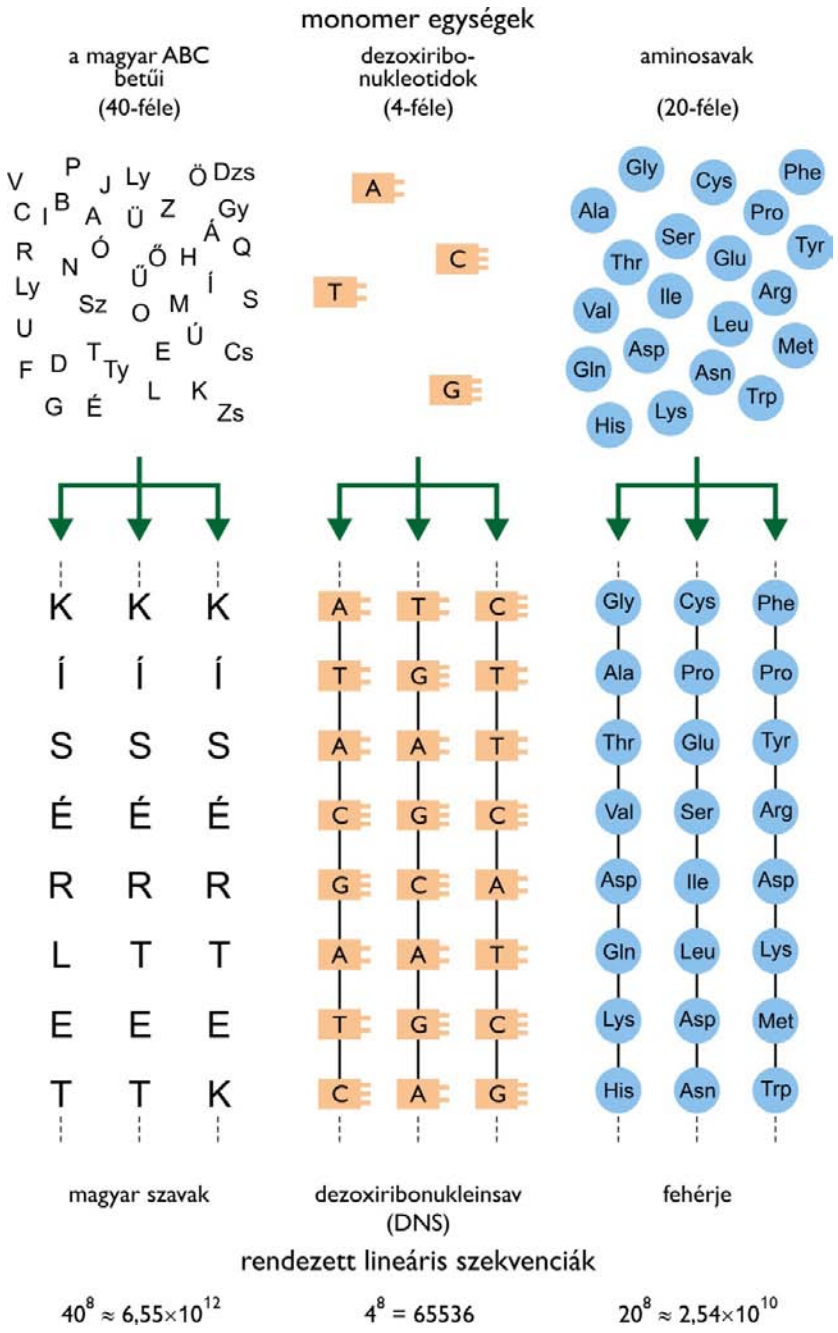
1.2.5. Az élőlényekre legjellemzőbb makromolekulák: a kombinatorikus építkezés alapelve

A makromolekulák (definíció szerint az 1000 Daltonnál nagyobb tömegű molekulák) mind **monomer építőegységekből** keletkeznek. Ide tartoznak a nukleinsavak, a fehérjék és a poliszacharidok. A nukleinsavak és a fehérjék lineáris, tehát elágazásokat nem tartalmazó polimerek. (Bár a lipidek egy része is összetett szerves molekula, nagy többségük nem makromolekula, mivel méretük nem éri el az 1 kDa-t).

A makromolekulák monomerei viszonylag egyszerű felépítésűek, és univerzálisan, minden fajra jellemzően fordulnak elő az élővilágban. **A fajra jellemző egyedi információt a nukleinsav és fehérje monomerek sorrendje hordozza**. Azt nem tudjuk, hogy a Földön összesen hányféle faj létezik, de óvatos becslések szerint is több tízmillió. Felmerülhet a kérdés, hogy vajon ekkora diverzitást nehéz-e, vagy triviális elérni a makromolekulák szintjén. Mint látni fogjuk, diverzitást generálni makromolekuláris szinten rendkívül egyszerű. A nukleinsavak esetében mindössze 4-féle, a fehérjék esetében 20-féle elem egymáshoz fűzéséből is óriási variációszámot kapunk. Ez a hatalmas variációszám hatalmas mennyiségű információt hordozhat**.**

Ahogyan azt az **1.2. ábra** is mutatja, még egy 8-tagú rövid szövegből is hatalmas variációszámok adódnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



1.2. ábra: A nukleinsavak és a fehérjék moduláris felépítése hatalmas változatosságot eredményez

DNS-ből $4^8 = 65536$ nyolctagú oligonukleotid, míg fehérjéből $20^8 = 2{,}54\times10^{10}$, tehát több mint 25 milliárd különböző oligopeptid jöhet létre. A variációk száma egyszerű kombinatorikai okok miatt tehát praktikusan kimeríthetetlen, és a fajok száma eltörpül a makromolekulákból elvileg létrehozható variációszámhoz képest. Az **1.2. ábra** azt is bemutatja, hogy a magyar nyelv 40 betűjéből $40^8 = 6{,}55\times10^{12}$ számú, tehát több mint 6500 milliárd 8-betűs karaktersor jöhet létre. Valójában a magyar nyelv néhányszor tízezer szóból építkezik (és ezeknek csak egy kis része éppen 8-betűs). Az elemek kombinálódása tehát szinte végtelen lehetőségeket ad, a kérdés inkább az, hogy ezek közül mennyi lesz „értelmes", használható.

A fehérjék 20-féle aminosavból állnak, és kémiai értelemben nincs korlátja annak, hogy ezek milyen sorrendben követhetik egymást. A fontos kérdés az, hogy ezek közül melyek lesznek azok a sorrendek, amelyek stabil térszerkezetű, funkcióképes fehérjét eredményeznek. A bevezetőben tárgyalt gondolatkör szempontjából a **legfontosabb felismerés** az, hogy **az élővilág összes faja azonos alkotóelemekből, azonos elvek alapján hoz létre adott esetben fajra jellemző makromolekulákat**. Ahogyan azt az **1.2. ábra** magyar szavakra vonatkozó

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

része jelzi, a monomerek sorrendje információt hordoz, az egyes elemek kicserélése megváltoztatja az információ jelentését.

Az evolúció során egy-egy megváltozott információ az adott környezetben hasznosnak bizonyulhat, fennmaradhat, elszaporodhat.

1.2.6. Specifikus, dinamikus molekuláris felismerések másodlagos kötésekkel

Ahogyan az már az önszerveződés folyamatában is tetten érhető, minden élőlény működésének alapvető vonása, hogy a benne szereplő molekulák kölcsönhatnak, összekapcsolódnak egymással. Ezek a **kölcsönhatások** általában **specifikusak**, tehát az egy térben lévő több ezer különböző molekula mindegyike csak a molekuláknak egy szűk csoportjával hoz létre komplexet. **A kölcsönhatások nem-kovalens jellegűek, a molekuláris felismerés alapja a térbeli és polaritásbeli komplementaritás**. A makromolekulákon jól definiálható kötőhelyek vannak bizonyos más makromolekulák, vagy kismolekulák számára. A kölcsönhatások zöme dinamikus, átmeneti jellegű. A komplex gyorsan létrejön, de csak rövid ideig marad egyben, mert a molekulákat összetartó kölcsönhatási energia olyan alacsony, hogy a hőmozgásban rejlő kinetikai energia rövid idő alatt „szétrázza” a komplexet. Más komplexek ezzel szemben stabilak, órákig, napokig is léteznek.

A fenti leírás legegyszerűbb esetben azt jelenthetné, hogy az egyes molekulák, mint teljesen merev szerkezetű legó elemek kapcsolódnak egymáshoz. A kölcsönhatások egy része valóban olyan, amiben a résztvevő molekulák szerkezete nem módosul kimutatható mértékben. Az esetek többségében azonban nem ez a helyzet. A molekulák szerkezete a komplexben rendszerint valamelyest eltér attól, mint amilyen szabad formában lenne. A két kölcsönhatási modell közötti, elsőre talán apróságnak tűnő eltérés valójában rendkívül lényeges. A **kölcsönhatást kísérő alakváltozás (konformációváltozás)** ugyanis lehetővé teszi, hogy az egyes molekuláris komponensek mintegy kommunikáljanak egymással, és ezáltal az élő rendszer komplexitását hallatlan mértékben megnöveljék. Ezek a konformációváltozások összetett szabályozásokat is lehetővé tesznek, amit többek között az allosztérikus szabályozás címszó alatt tárgyalunk majd később (lásd **17.2. fejezet**)

1.2.7. Az élőlényekben a kémiai reakciókat enzimek katalizálják

Minden élőlényre igaz, hogy bennük rendkívül változatos kémiai reakciók özöne megy végbe, a viszonylag alacsony hőmérséklet ellenére nagy sebességgel, és ami ennél is figyelemreméltóbb, precízen szabályozott módon. A nagy sebességet, és a precíz szabályozhatóságot minden élőlény esetében enzimek biztosítják. Ezek az **biokatalizátorok** az ismert esetek döntő többségében **fehérjék**, de ismertek központi jelentőségű, RNS-alapú biokatalizátorok, úgynevezett **ribozimek** is. Az RNS-ek a földi élet korai szakaszában döntő jelentőséggel bírhattak. Az ún. **RNS világ hipotézis** szerint a sejtevolúció kezdetén az RNS molekulák hordozták a genetikai információt és egyúttal ribozimként a kémiai reakciókat (saját szintézisüket) is katalizálták. Az RNS-világot a ma ismert DNS-fehérje világ később váltotta fel, mivel a DNS hatékonyabb információtároló molekula, a fehérje enzimek pedig változatosabb katalitikus hatékonysággal rendelkeznek, mint a ribozimek.

1.2.8. A sejtek molekuláris felépítése hierarchikus

Bármilyen élőlényt vizsgálunk is meg, azt tapasztaljuk, hogy a **molekulák** felépítését tekintve jellegzetes **hierarchia** figyelhető meg benne. A legegyszerűbb szintet a **környezeti prekurzorok** jelentik. Ezek olyan kismolekulák, amelyekből az autotróf szervezetek (például a növények, vagy egyes baktériumok) képesek összetettebb szerves vegyületeket képezni. Ilyen prekurzor a víz, az ecetsav, az ammónia, vagy a formaldehid. A második szintet a **prekurzorokból előállítható szerves vegyületek** (**metabolitok**) jelentik (pl. ecetsav, citromsav, karbamid stb.). Ezek egy része a következő szint (**összetett szerves molekulák, makromolekulák**) **építőköveit** képviseli. Idetartoznak többek között a cukrok (monoszacharidok), az aminosavak, a zsírsavak, a glicerin, a nukleotidok. A harmadik szintet azok a molekulák jelentik, amelyek ezeknek az építőköveknek az összeillesztéséből jönnek létre. Ilyenek például a poliszacharidok, a fehérjék, a nukleinsavak, foszfolipidek és trigliceridek. Ezek közül azokat a molekulákat, amelyek molekulatömege meghaladja az ezer Daltont, **makromolekulák**nak nevezzük. A fehérjék, a nukleinsavak és a poliszacharidok makromolekulák, míg a foszfolipidek és a trigliceridek nem. A fehérjék és

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

nukleinasavak információhordozó makromolekulák (lásd később), míg a homopolimer poliszacharidok nem. A negyedik szintet a makromolekulákból összeszerelődő (lásd **molekuláris önszerveződés, 1.2.11. fejezet**) **szupramolekuláris komplexek** jelentik. Ide tartozik például az aktin filamentum, a riboszóma, vagy a proteaszóma. A sejtben természetesen egyidejűleg megtaláljuk mind a négy szerveződési szintet.

1.2.9. Az örökletes információ tárolásának és kifejezésének közös alapelve

Az élővilágra jellemző közös tulajdonság, hogy **az örökletes információ kettősszálú DNS molekulákban** tárolódik. A kettősszálú DNS-ben a DNS két szálának nukleotid sorrendje kölcsönösen meghatározza egymást. A **replikáció** során a két szál elválik egymástól, és a kölcsönös meghatározottság alapján mindkét szál, mint templát mellé kiegészítő, komplementer szálak keletkeznek. Így két, az eredetivel megegyező, kétszálú DNS molekula keletkezik, amelyek a sejtosztódás után külön-külön az egyes utódsejtekbe kerülnek. Az új szálak szintézisét DNS-függő DNS-polimeráz enzimek katalizálják.

Az élőlények RNS és fehérje állományának bázis illetve aminosavsorrendjét a DNS tárolja. Az RNS molekulák szintén DNS templát mentén, a komplementaritás alapján keletkeznek a **transzkripció** folyamatában DNS-függő RNS-polimeráz enzimek közreműködésével.

A fehérjékre vonatkozó információ a DNS-ből RNS molekulák közvetítésével íródik át. A hírvivő RNS (mRNS) közvetíti ezt az információt, amely a genetikai kódnak nevezett szabály alapján fordítódik le a riboszómán a fehérjeszintézis, más néven **transzláció** folyamatában. Ez **a DNS→RNS→fehérje információáramlás** a már említett „**centrális dogma”**. Azóta kiderült, hogy egyes vírusokban az örökítő anyag RNS. Ennek nyomán vált ismertté, hogy az RNS-ben lévő információ alapján – megfelelő enzim, RNS-függő DNS-polimeráz, más néven reverz transzkriptáz közreműködésével DNS keletkezhet. Erről a DNS-ről azután újra előállítható a vírus RNS alapú genomja. Mint később látni fogjuk, a **fordított (reverz) transzkripció** nem csak vírusok működésében játszik szerepet, de az eukarióta sejtek egyik rendkívül fontos folyamata, a kromoszómák telomer végeinek „karbantartása” is reverz transzkripciót igényel. Vannak olyan vírusok is, amelyekben az RNS genom DNS közvetítése nélkül replikálódik. Ez egy különleges enzim, RNS-függő RNS-polimeráz működésének köszönhető. Az eredetileg felvázolt centrális dogma tehát kibővült, de abban a tekintetben továbbra is egyirányú maradt, hogy a mai napig sem ismert olyan folyamat, amelynek során fehérjében tárolt információ (aminosavsorrend) alapján nukleinsav keletkezne.

1.2.10. Önreprodukció és változatosságteremtés

Minden élőlény képes az **önreprodukció**ra, vagyis arra, hogy önmagához hasonló utódokat hozzon létre. Ugyancsak minden élőlényre igaz, hogy az önreprodukció során nagyon alacsony mértékben, de változik az új generációnak átadott örökletes információ, a DNS-ben **mutációk** keletkeznek. Ez teszi lehetővé azt, hogy az örökletes tulajdonságok a természetes **evolúció** során, adaptív módon változzanak.

1.2.11. A makromolekuláris önszerveződés alapelve

Szintén közös, az egész élővilágra jellemző alapelv a **makromolekuláris önszerveződés**. Ennek az alapelvnek az egyik eleme az, hogy a makromolekulák képesek önállóan elnyerni natív térszerkezetüket. A nukleinsavakban illetve fehérjékben esetében **a lineáris információ** (a környezet fizikokémiai paramétereivel együtt) **megszabja a makromolekula térszerkezetét**, **amely azután megszabja a molekula tulajdonságait, működését**.

A kettősszálú DNS például spontán létrejön, ha két egymással komplementer szekvenciájú, egyszálú DNS-t viszünk oldatba. A szálak összekapcsolódnak, és a kétszálú DNS elnyeri natív térszerkezetét, a kettősspirált. Ebből a szerkezetből pedig következik a DNS replikációban betöltött funkciója. Az aminosavakat a riboszómához szállító tRNS-ek is jellegzetes térszerkezettel bírnak, melyet a bennük lévő nukleotidok sorrendje, és számos utólagos (poszttranszkripciós) kémiai módosulás együttesen határoznak meg. Mint később látni fogjuk (lásd Christian Anfinsen idevonatkozó kísérlete, **5.5.2. fejezet**), a **fehérjék aminosavsorrendje meghatározza a térszerkezetüket**. A legtöbb ismert fehérjének vagy önmagában létezik stabil térszerkezete, vagy amennyiben a szerkezete önmagában nem rendezett, úgy a működése során más molekulákhoz kötődve vesz fel jellemző térszerkezetet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A makromolekuláris önszerveződés egy másik megnyilvánulási formája az **önszerveződő szupramolekuláris komplexek** léte. A sejtekben számos szupramolekuláris komplex működik. Ilyen például a minden élőlényben működő riboszóma. Számos ilyen komplex esetén *in vitro* kísérletes igazolást nyert, hogy a komplex képes az alkotóelemeikből spontán összeszerveződni. A szupramolekuláris komplexet alkotó makromolekulák szerkezete tehát elegendő információt hordoz ahhoz, hogy a komplex összeszerelődjön, ehhez nem kell komplexen kívüli molekulák közreműködése.

Mindkét önszerveződési jelenségnek az a jelentősége, hogy emiatt az egyes makromolekulák, illetve az ezekből kialakuló komplexek viszonylag autonóm egységei a szervezetnek. Szintén érdemes megjegyezni azt is, hogy az önszerveződés *in vitro* igazolt képessége önmagában nem jelenti azt, hogy a sejtben a makromolekulák térszerkezetének létrejöttét, vagy a szupramolekuláris komplexek kialakulását ne segíthetnék ezeken kívülálló komponensek (ilyenek például a polipeptidláncok feltekeredését segítő dajkafehérjék).

1.2.12. Az ATP, mint energiavaluta

Ugyancsak az élőlények alapvető közös sajátsága, hogy mindegyikükben az **adenozin-5'-trifoszfát (ATP)** szolgál „**energiavaluta**ként". Az **ATP** minden esetben **ADP-ből keletkezik foszforiláció útján**. Erre kétféle megoldás létezik. Az egyik az elektrontranszport-lánchoz kötött **oxidatív foszforiláció**. Ennek során egy membránba ágyazott elektrontranszport-lánc a működése során proton koncentráció különbséget hoz létre a membrán két oldalán. A proton koncentráció különbség (az ún. **proton-hajtóerő**) lehetővé teszi azt, hogy a kiegyenlítődés felé ható proton átáramlásban rejlő energia ATP szintézisre fordítódjon. A protonok egy membránba ágyazott enzimen, az **ATP-szintáz**on haladnak keresztül, és ennek során keletkezik az ATP ADP-ből és szervetlen foszfátból. Eukariótákban a mitokondriumban, növényekben ezen felül a színtestekben (kloroplasztiszban) is zajlik ez a folyamat.

Az ATP-keletkezés másik formája az úgynevezett **szubsztrát-szintű foszforiláció**. Ennek során a foszfát (vagy mint később látni fogjuk, helyesebben foszforil-) csoport egy foszforilált szerves molekuláról kerül az ADP-re. Az ATP legnagyobb részben a fotoszintézis (lásd növények és egyes baktériumok) és összetettebb szerves molekulák lebontása (oxidációja) során keletkezik. Ez utóbbi folyamat minden élőlényben zajlik.

A fent említett módokon keletkező ATP szolgáltat energiát ahhoz, hogy az élőlény fenntartsa összetett állapotát, létrehozza a rá jellemző komplex anyagokat, és összehangolt mozgásokat végezzen. Ezen folyamatok során az ATP folyamatosan ADP-vé, illetve AMP-vé alakul. Minden sejt egy nagyjából állandó ATP/ADP/AMP készlettel rendelkezik, az ATP tehát folyamatosan bomlik és keletkezik, körforgásban van.

1.2.13. Molekuláris motorok és molekuláris gépek

Az élőlényeknek szintén közös tulajdonsága, hogy bennük molekuláris motorok, és molekuláris gépek működnek. Mind a **molekuláris motorok**ra, mind a **molekuláris gépek**re igaz, hogy az **ATP hidrolíziséből származó energiát felhasználva mechanikai munkát végeznek**. A különbségtétel a motor és a gép elnevezés mögött azért indokolt, mert vannak olyan molekuláris eszközeink, amelyek fő funkciója maga a mozgatás, míg a gépeknek további funkciói is lehetnek. A molekuláris gépek általában szupramolekuláris komplexek, ahol minden komponensnek, mint egy gép alkatrészeinek, jól meghatározott funkciója van (köztük van a mozgás, mozgatás is). A **miozin** például egy jellegzetes eukarióta **motorfehérje**, amely aktin szálak mentén mozog, illetve aktin szálakat mozgat. A **molekuláris gépekre** példa az ún. **repliszóma** (benne a templát DNS szál mentén mozgó, ezáltal motorfehérje DNS-polimerázzal), melynek egyes fehérjekomponensei a DNS két szálának lemásolása kapcsán különböző részfeladatokat látnak el (lásd **13.7. fejezet**). Hasonló példa a **riboszóma,** amely elmozdul az mRNS-hez képest, de fő funkciója természetesen az új polipeptidlánc szintézise az mRNS-en lévő információ alapján (lásd **13.9. fejezet**).

1.3. Dimenziók a biokémiában

A biológiai evolúció folyamatában kialakult elménk elsősorban a közvetlen érzékszerveinkkel tapasztalható világ befogadására, értelmezésére fejlődött ki. Ugyanakkor az emberi gondolkodás természetesen lényegileg túl is mutat a közvetlenül érzékelhető világ értelmezésén, hiszen képesek vagyunk elvonatkoztatni, absztrakt fogalmakat, összetett működési modelleket alkotni. Mégis tetten érhető az emberi megismerés folyamatában egy komoly gát abban a tekintetben, hogy mennyire vagyunk képesek a megszokott világunk léptékénél jóval kisebb, vagy jóval nagyobb dimenziók valós, tehát problémamegoldásra alkalmas befogadására.

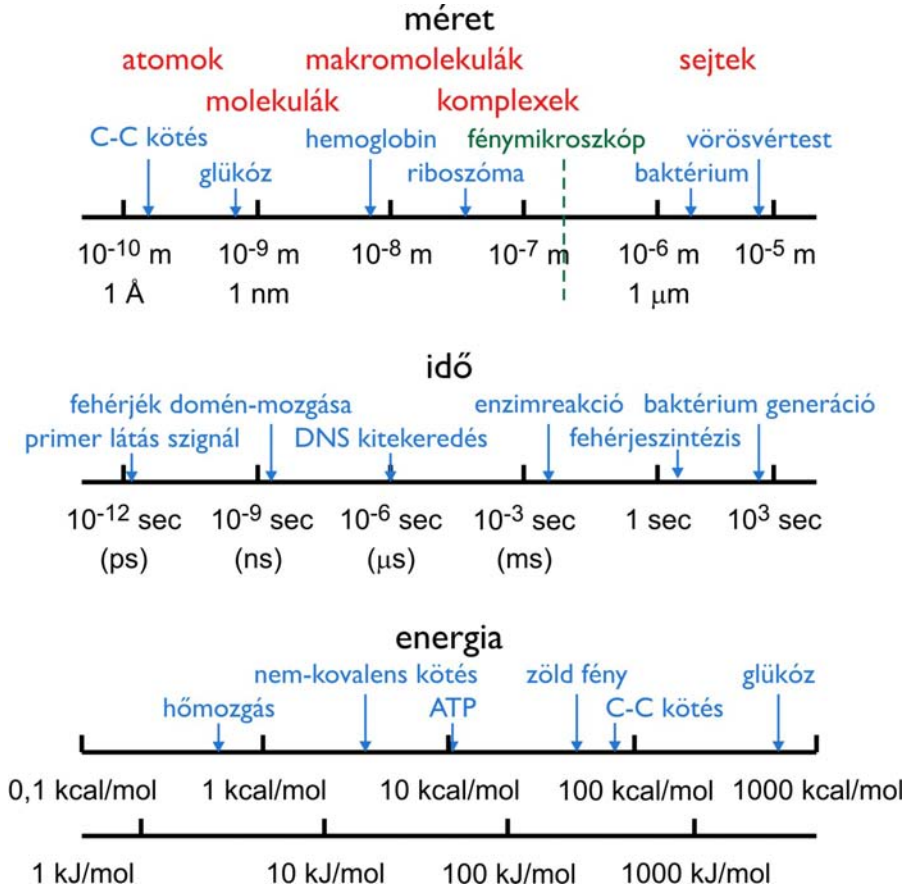
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Természetéből fakadóan a biokémia elsősorban a mikrovilággal foglalkozik. Ebben a világban a fizikai kiterjedés méretei, a vizsgált objektumok tömege, a lejátszódó tipikus folyamatok időtartama, illetve a folyamatokhoz tartozó energiák értéke jelentősen eltér a hétköznapi életben tapasztaltaktól. Érdemes emiatt megvizsgálni, hogy az egyes fizikai paraméterek tekintetében milyen mérettartományokban vizsgálódik a biokémia, és ezek között a tartományok között milyen összefüggések fedezhetők fel (lásd **1.3. ábra**).

1.3.1. A fizikai kiterjedés mérettartománya

A biokémia kérdésköre hagyományos értelemben a sejtek méretétől kiindulva a molekulákat létrehozó atomok, és az ezek között kialakuló kötések mérettartományáig terjed. A megszokott méteres, deciméteres (1/10 méter), centiméteres (1/100 méter) és milliméteres (1/1000 méter) helyett itt jóval kisebb tartományokról van szó. Az eukarióta **sejtek** tipikus mérete a néhányszor tíz mikrométeres tartományba esik, ahol a **mm** a méter egy milliomod részét jelenti.

Egy eljárás felbontási határa az általa leképezhető pontok közötti minimális távolsággal jellemezhető. Ha a két pont ezzel egyenlő, vagy ennél nagyobb távolságra van, akkor megkülönböztethetőek, ennél kisebb távolság esetén azonban egyetlen pontként érzékeljük őket. Az emberi szem felbontási határa a milliméter egytizede, vagyis 100 mm környékén van, így a tipikus méretű sejtek szabad szemmel természetesen nem láthatók. Ráadásul ahhoz, hogy ne csak detektálni tudjunk egy objektumot, de annak alakjáról, belső szerkezetéről is információt nyerjünk, az objektum méreténél nagyságrendekkel kisebb felbontási határú eljárás szükséges.



1.3. ábra: A biokémia vizsgálati körére jellemző mérettartományok

A fénymikroszkópia segítségével az emberi szemhez képest a felbontás nagymértékben növelhető. A felbontás növelésének a leképezéshez használt látható fény hullámhossza szab határt. Emiatt a fénymikroszkópia nagyjából kéttized mikrométeres, tehát 200 nm (a nanométer a méter egy milliárdod része) felbontási határt ér el. Ezzel az emberi szemnél 500-szor nagyobb felbontási képességgel már jól láthatók az eukarióta sejtek, ezek bizonyos sejtalkotói és a baktériumok is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A részletek azonban zömmel rejtve maradnak. A biokémia érdeklődési tartományába eső legtöbb objektum mérete lényegesen kisebb ennél a felbontási határnál. A legtöbb szupramolekuláris komplex, mint például a riboszóma, a néhányszor tíznanométeres tartományba esik. Ezek leképezéséhez a látható fény helyett egy annál jóval kisebb hullámhosszú sugárzást kell alkalmazni. Az első olyan technika, ami a fénymikroszkópnál lényegesen nagyobb felbontást eredményezett, az elektronmikroszkópia volt. Az itt alkalmazott elektronnyalábok hullámhossza akár 100 ezerszer is rövidebb lehet, mint a látható fényé, így a felbontási határ néhány nanométeres. Ezzel a felbontással, és különböző, itt nem részletezett eljárásokkal (például krio-elektronmikroszkópia) már a riboszómák, és egyéb szupramolekuláris komplexek alakja, ezek egyes részletei is láthatóvá váltak.

Az atomok, és a kémiai kötéshosszak mérettartománya azonban a tizednanométeres tartományba esik. A szerves molekulában lévő szénatomok közötti **kovalens kötés hossza** nagyjából **0,15 nm**. Ennek a tartománynak a kényelmesebben használható, bár nem SI mértékegysége az **Angström, ami a nanométer egytized része**. Az atomok távolsága a molekulákban tehát az Angström (Å) tartományba esik. A szupramolekuláris komplexek (~300 Å) a makromolekulák (~50 Å) és a kismolekulák (~5 Å) atomi felbontású leképezése csak olyan technikákkal lehetséges, amelyek felbontási határa az Angström tartományban van.

Mint később kicsit részletesebben látni fogjuk, két fő technika biztosít ilyen **atomi felbontás**t. Az egyik a **röntgendiffrakció**, amely akár 1 Å alatti hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást alkalmaz. A vizsgált mintában az objektumok (kismolekulák, makromolekulák, vagy akár szupramolekuláris komplexek) szabályos elrendeződéssel kristályt alkotnak. A molekulákban lévő atomok relatív térbeli elrendeződését a kristályra irányított röntgensugár szóródási képéből matematikai eljárásokkal rekonstruálják (röntgenkrisztallográfia). Az eljárás nagyon nagy felbontást eredményez, és a vizsgált objektum mérete a kismolekuláktól a hatalmas komplexekig terjedhet. A módszer fő korlátai a kristályosítás feltételéből fakadnak. Egyrészt nem minden molekulából sikerül kristályt képezni. Alternatív megoldás lehet, ha a makromolekula legalább rostokat képez; ilyen ún. rostdiffrakciós technikával vizsgálták először a DNS térszerkezetét, és ilyen kísérleti adatok felhasználásával alkotta meg Watson és Crick a DNS kettős spirál modelljét. Egy másik elkerülhetetlen kérdés, hogy a kristályban meghatározott szerkezet azonos-e a molekula oldatban mutatott szerkezetével.

A **mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia**, mint szerkezetvizsgáló eljárás röviden azon alapul, hogy az egymáshoz közeli atomok magjainak mágneses tulajdonságai függnek a környezetükben lévő egyéb atomok magjainak milyenségétől és mágneses állapotától. Ennek a függésnek nagyon szigorú távolságfüggése van, és ezen keresztül a molekula egyes atomjainak egymáshoz képesti távolsága meghatározható. Megfelelő mennyiségű és minőségű távolságadatból egyfajta „háromdimenziós térképészeti” eljárással az egyes atomok egymáshoz viszonyított pozíciója meghatározható. A módszer hatalmas előnye, hogy kristályosítás nélkül, oldatban vizsgálja a molekulákat, és a molekulában zajló mozgásokról is információt szolgáltat. A hátránya az, hogy – egyelőre – a legnagyobb vizsgálható molekulák mérete a kisebb fehérjék méretének felel meg.

Az említett eljárásokkal tehát optikai, vagy egyéb fizikai és matematikai eljárásokkal leképezhetők, „láthatóvá tehetők” az egyes molekulák. Ennek felbecsülhetetlen értéke van a megismerés folyamatában. Az emberi elme nagyrészt a látáson keresztül szerez információkat a külvilágról. Egy objektum látványa hatalmas segítséget ad ahhoz, hogy megértsük, az hogyan működhet. A molekulák szerkezetvizsgálatának eredményei nagyban hozzájárulnak ahhoz, hogy megértsük a makromolekulák kölcsönhatásainak miként jét vagy az enzimek hatásmechanizmusát. A szerkezet ismerete abban is nagy segítséget nyújt, hogy terápiás szempontból fontos támadási pontok, például egyes betegségekben bizonyos túlműködő fehérjék ellen gátlószereket fejlesszenek.

1.3.2. Időtartamok skálája

Mint láttuk, a biokémia által vizsgált legkisebb és legnagyobb objektumok fizikai kiterjedésének aránya mintegy százezer. Ez elég széles skálát jelez, de ez eltörpül a biokémia által vizsgált folyamatok tipikus időegységeinek skálájához képest. Itt a leglassabb és leggyorsabb történések tipikus időegységei közötti arány szinte felfoghatatlanul nagy, 10^{15} érték, vagyis az egymilliárd egymilliószorosa (egy billiárd).

Kezdjük a legrövidebb időtartamokkal. A molekulákban lévő **kötések rezgése**i, a kötések körüli elfordulások a **pikoszekundum**os időskálán zajlanak, vagyis másodpercenként ezermilliárdszor bekövetkezhetnek. Ebben az időtartományban zajlik például a látási szignált generáló konfigurációváltozás, amelynek során a fotont befogadó cisz-retinal transz konfigurációba kerül. Az enzimreakciók során bekövetkező elemi apró lépések, pl. kémiai kötések körüli elfordulások is ezen az időskálán zajlanak. A több-doménes fehérjék egyes **domén**jeinek (a polipeptidláncon belül önálló feltekeredésre képes térszerkezeti egységei) egymáshoz képesti **elmozdul**ása a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

nanoszekundumos skálán zajlik, tehát másodpercenként akár egymilliárdszor is megtörténhet. A **DNS** két szálának lokális **széttekeredése** a **mikroszekundum**os (egy milliomod másodperc) skálán zajlik, és a leggyorsabb enzimreakciók is nagyjából ilyen skálán mennek végbe. Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy az enzimreakciók során számos kötésnek kell egymás után elmozdulnia, az enzim oldaláról domén mozgások is szükségesek lehetnek, ezért a leggyorsabb reakció is lassabb kell, hogy legyen, mint az azt megalapozó, a pikoszekundumos és nanoszekundumos skálán zajló elemi mozgások. A legtöbb **enzimreakció** ugyanakkor a **milliszekundum**os skálán, vagy ennél lassabban zajlik. Figyelemre méltó, hogy ez a tartomány már a mindennapi életünk egyes kiélezett helyzeteiben is jelentkezik, például egyes sportágakban már ezredmásodperces időbontásban kell mérni ahhoz, hogy eldönthető legyen, ki nyert. Az emberi reakcióidő a tizedmásodperces skálán mozog, összhangban azzal, hogy az észleléstől a cselekvéssorig számos, ezredmásodperces skálán zajló molekuláris történésnek (pl. membrántranszportok, akciós potenciál végighaladása, motorfehérjék működése) kell megtörténnie.

Az aminosavak riboszóma általi összekapcsolása a tizedmásodperces skálán zajlik (eukariótákban 6-9 aminosav épül be a láncba másodpercenként), így egy nagyobb fehérje szintézise akár percekig is eltart. Ez már összemérhető időtartam pl. egy intenzíven osztódó **baktérium generációs idejé**vel (**20-30 perc**) amelynek során a két új sejt létrehozásához fehérjék özönét kell előállítani, és le kell másolni a több millió nukleotid egységből álló genomot (a replikáció sebessége prokariótákban 1-2 ezer nukleotid másodpercenként, az eukariótákban ennél lassabb, mintegy 100 bázispár/sec).

A kiterjedésre vonatkozó mérettartományoknál már megemlítettük a hierarchikus felépüléssel mutatott párhuzamot. Ezt az idő esetében is érdemes megjegyezni. Az élőlényekben zajló folyamatok az idő tekintetében egyfajta hierarchiába rendezhetők. A legalapvetőbb és leggyorsabb kötésrezgésekből illetve kötések körüli forgásokból szerveződnek össze a nagyobb léptékű összerendezett mozgások, amelyek a makromolekulák és a szupramolekuláris komplexek működésére jellemzőek.

1.3.3. A biokémia területére jellemző energiatartományok

A tér és idődimenziók esetében az alapfogalmakat könnyen befogadjuk, hiszen ezek mindennapos közvetlen tapasztalatainkból fakadnak. Legfeljebb a makroszkopikus világunktól nagymértékben eltérő skálákkal kapcsolatban akadnak nehézségeink. Az energia azonban ennél elvontabb fogalom. Ráadásul az energia nagyon sokféle formában jelentkezik (hőenergia, kémiai energia, sugárzási energia, elektromos energia stb.). Az **energia** fizika jelentése a **munkavégző képesség**gel kapcsolatos. Egy rendszer energiája azt jellemzi, hogy mekkora munkát tud végezni egy másik rendszeren. Erről részletesebben is szót ejtünk a Termodinamikai alapjai című **3. fejezet**ben.

Az energiaskálát is érdemes logikai összefüggésekben átnézni. Az energia SI **mértékegysége** a **joule**, de a **kalória**, mint mértékegység annyira beágyazódott a köznapi felhasználási területeken, hogy az idevonatkozó ábra a kalória skálát is bemutatja. (1 cal = 4,18 J). A biokémia témakörét érintő legalacsonyabb fontos energiaszint a hőmérséklettel szorosan összefüggő, a **hőmozgás**ban megtestesülő energia, az adott rendszerben lévő részecskék egy móljára jutó átlagos mozgási energia. Ez **37ºC-on**, azaz 310 Kelvin hőmérsékleten az $E = nRT$ összefüggés alapján (R: egyetemes gázállandó), egy mólra vonatkoztatva **~2,5 kJ/mol** értéknek adódik. A biokémikus számára ez az érték különösen abban a tekintetben fontos, mert ennek tükrében kell megértenünk, hogy egy-egy vonzó kölcsönhatás mennyire stabil komplexet eredményez. Amennyiben a kölcsönhatás energiája, tehát az az energia, ami a kölcsönhatás megszüntetéséhez szükséges, kisebb, mint a hőmozgásban rejlő átlagos kinetikai energia, akkor az adott kölcsönhatás rendkívül rövid életidejű lesz. Minél nagyobb a kölcsönhatási energia a hőmozgás energiájához képest, annál stabilabb lesz a komplex, hiszen annál ritkábban koncentrálódik a komplexre akkora kinetikai energia (ütközés formájában), amely meghaladná a kötési energiát.

A biokémia témakörében előforduló **nem-kovalens kölcsönhatások** tipikus energiatartománya mintegy egy nagyságrenddel magasabban van. Az oksági összefüggés természetesen fordított, azokat a kölcsönhatásokat érdemes számon tartanunk, amelyek egy adott hőmérsékleten sikeresen „veszik fel a harcot” a hőmozgásban rejlő kinetikai energiával. Ez a tartomány nagyjából **0,5-40 kJ/mol**. Az alsó határra jellemző alacsony érték azért releváns, mert amennyiben egyszerre, egyidejűleg számos molekuláris kölcsönhatás valósul meg, úgy az egyenként alacsony, pl. 0,5 kJ/mol energiájú kölcsönhatások összeadódva már tetemes stabilizálást jelenthetnek.

Az **ATP-ADP átalakulás**ra jellemző energiaszint változás (mint később azt pontosítjuk, szabadentalpia változás) értéke **a sejtben uralkodó körülmények között** nagyjából **−50 kJ/mol**, ahol a negatív előjel azt jelenti, hogy ez a szint csökken, a folyamat munkára fogható. Ha ezt összevetjük a másodlagos kötések már említett kötési energiájával, akkor ebből látható, hogy az ATP (vagy a vele analóg GTP) átalakulása során felszabaduló energia

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

felhasználható másodlagos kötések felbontására, illetve konformációváltozásokon keresztül munkavégzésre. A konformációváltozás természetesen csak másodlagos kötések felszakításával valósulhat meg. Tipikus példák erre a motorfehérjék, vagy a jelátviteli folyamatokban kulcs szerepet játszó G-fehérjék. A skálán soron következő érték a zöld tartományba eső hullámhosszúságú fény energiája, ami nagyjából 240 kJ/mol. Az evolúció során elsők között kialakult fotoszintetizáló baktériumok, a bíbor kénbaktériumok pigmentje főleg ebben a tartományban nyel el. Mint jól látható, ez a fényenergia szint bőségesen elegendő energiát szolgáltat ahhoz, hogy ADP-ből és szervetlen foszfátból ATP keletkezzen. A soron következő érték a szénatomok közötti kovalens kötés energiája, vagyis az az energia, ami a kötés felbontásához kell. Jól látható, hogy ez az érték lényegesen nagyobb, mint a nem-kovalens kölcsönhatások energiája, így pusztán a hőmozgás energiáját figyelembe véve a szerves molekulákban lévő kovalens kötések rendkívül stabilak. Végül a skálán bemutatott legnagyobb érték azt jelzi, hogy egy **glükóz molekula teljes oxidációja** széndioxiddá és vízzé nagyjából **3000 kJ/mol** energia felszabadulással (~ −3000 kJ/mol szabadentalpia változással) jár. Ez átszámolva mintegy 60 ATP-ben tárolható energiacsomagot jelent. A szervezet a glükóz teljes oxidációját számos elemi lépésben valósítja meg, melynek során 32 ATP-t képez ADP-ből és szervetlen foszfátból. Így a szervezet mintegy 50%-os hatásfokkal dolgozik, ami jobb, mint a legtöbb ember alkotta gép hatásfoka.

1.3.4. A biokémia területére eső tömegértékek

Az **1.2. táblázat**ban összefoglaltuk, hogy hogyan viszonyul egymáshoz a biokémia vizsgálati területére eső tipikus objektumok (kismolekulák, makromolekulák, szupramolekuláris komplexek, sejtek) tömege.

1.2. táblázat: A biokémia vizsgálati körére jellemző objektumok tömege

Biomolekula	Méret (nm)	Tömeg (Dalton)	(pg)
víz	0,3	18	
alanin	0,5	89	
glükóz	0,7	180	
foszfolipid	3,5	750	
ribonukleáz (kis fehérje)	2	12.600	
immunglobulin G	14	150.000	
miozin (nagy fehérje)	160	470.000	
riboszóma	18	2.520.000	
ΦX174 bakteriofág	25	4.700.000	
piruvát-dehidrogenáz (multienzim komplex)	60	7.000.000	
dohány-mozaikvírus	300	40.000.000	$6{,}7\times10^{-5}$
mitokondrium	1.500		1,5
E. coli sejt	2.000		2
kloroplasztisz	8.000		60
májsejt	20.000		8.000

A táblázat az egyes objektumok legnagyobb átmérőjét is feltünteti. Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy az egyes objektumok közötti, a méret és a tömeg oszlopokban jelentkező arányok nem azonosak. Ha két objektum alakja azonos, akkor amennyiben az átmérők aránya „x”, úgy a tömegek aránya közel x^3 értéknek várható. Ennek oka, hogy amíg az átmérő csak egy térdimenzióban, a térfogat 3-dimenzióban érvényesül. Azonos alak esetén tehát egy 2-szer nagyobb átmérőjű test 2^3-szor, azaz 8-szor nagyobb térfogatú lesz a másiknál, ami azonos sűrűség esetén nyolcszoros tömeget jelent. A tömeg **SI mértékegysége** a **kilogramm**, de az **atomok és molekulák** világában ez a mértékegység túlontúl nagy egységet jelent a kényelmes hivatkozáshoz. Ezért bevezették a **Dalton (Da)** mértékegységet. Definíció szerint **a ^{12}C szénizotóp tömegének 1/12-ed része egy Da**. Mivel a ^{12}C szénizotóp 6

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

protont, 6 neutront és 6 elektront tartalmaz (mely utóbbi tömege elhanyagolható), ezért a Da egység tulajdonképpen a proton és a neutron tömegének az átlaga. Azokat a molekulákat, amelyeknek a tömege meghaladja az 1000 Da-t, definíció szerint makromolekuláknak nevezzük. Ezek esetében a Da helyett a kilodalton (kDa) egységet szoktuk használni. A vírusok, sejtalkotók, sejtek tömegét már nem praktikus Da egységekben kezelni, a táblázat ezek esetében a gramm billiomod ($1/10^{12}$) részében, pikogrammban adja meg a tömeget.

1.3.5. Az élőlények genomjának információtartalma

Minden élőlény DNS-ben hordozza a működéséhez szükséges, generációról generációra átadott örökletes információt. Egy faj teljes genetikai információját, a DNS molekulák összességét **genom**nak nevezzük. Ennek megfelelően például a haploid emberi genom egyetlen, 23 kromoszómából álló kromoszóma-szerelvény DNS-ét és a mitokondrium DNS-ét foglalja magába.

A **DNS** egy része RNS molekulákat kódol, amelyek egy része, az mRNS-ek, fehérjék aminosavsorrendjének az információját hordozzák. A genomban tehát megkülönböztetünk **RNS-gének**et, és **fehérjegének**et (a gén biokémiai értelemben az a DNS szakasz, ami génterméket, polipeptidláncot vagy RNS molekulát kódol), valamint az ezek működését **szabályozó DNS szakaszok**at. A géneken és az ismert szabályozó elemeken kívül azonban − fajfüggő mértékben – olyan DNS szakaszok is vannak, amelyek funkciója egyelőre ismeretlen.

Az **1.3. táblázat** néhány, didaktikai okokból kiválasztott faj (többségük a molekuláris biológusok kísérleti alanya) genomjának fő adatait hasonlítja össze.

1.3. táblázat: Egyes példaként kiválasztott fajok genommérete

Faj	Genom (Mbp)	Gének száma
Homo sapiens	3200	20000
Arabidopsis thaliana	115	25500
C. elegans	97	19100
D. melanogaster	120	13600
S. cerevisiae	12	6300
Escherichia coli	4,6	3200
Haemophilus influenzae	1,8	1700

Alulról felfelé haladva elsőként a ***Haemophilus influenzae*** baktérium szerepel, amelynek 1,8 Mbp (1,8 millió nukleotid monomer tagszámú) genomja az egyik legkisebb ismert genom. Ez a genom mindössze **1700 gént** hordoz. Ehhez képest egy másik baktérium, a modellélőlény ***Escherichia coli*** majdnem kétszer annyi, **3200 gén**nel rendelkezik, a genommérete 4,6 Mbp. A kólibaktérium legtöbb törzse egyfajta szimbiózisban él melegvérű állatok bélrendszerében, de ismertek olyan törzsei is, amelyek a környezetben önállóan, gazdaszervezet nélkül léteznek. A *H. influenzae* ugyanakkor egy sejten belül élősködő parazita. Az élősködő életmód révén ez utóbbi baktérium a függetlenebb életmódhoz szükséges mintegy 3000 gén felét az evolúció során elveszthette, mivel az ezek által kódolt funkciók vagy egyáltalán nem szükségesek egy eukarióta sejt belsejében, vagy ha igen, akkor azt az eukarióta gazdaszervezet biztosítja. A kólibaktérium génjeinek száma tehát azt jelzi, hogy egy autonóm működésre képes, nem extrém körülmények között élő prokarióta szervezet nagyjából ennyi génnel képes a változó körülmények között életben maradni, szaporodni.

A soron következő példa szintén egy modellélőlény, a **sörélesztő (*Saccharomices cerevisiae*)**, amely életmódját, anyagcseréjét tekintve hasonlít a kólibaktériumra. Szintén egysejtű, de felépítését tekintve mégis lényegileg különbözik, hiszen eukarióta. Ebben a baktériumoknál bonyolultabb belső felépítésű élőlényben, amelyben az organellumoknak együtt kell működniük, kétszer annyi gént találunk (**6300 gén**), mint az *E. coli*-ban, és a genommérete (12 Mbp) is több mint duplája a kóliénak (4,6 Mbp).

A listában a következő modellállat az **ecetmuslica** (***Drosophila melanogaster***). Érdemes megfigyelni, hogy ennek a többsejtű, valódi szövetekkel rendelkező, az egysejtűeknél látványosan összetettebb felépítésű élőlénynek az

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

eukarióta egysejtű élesztőhöz képes több mint kétszer annyi génje van. A többsejtű lét lényegesen több információ kódolását követeli meg a genomban. Egyrészt az egyes sejteknek egymással kommunikálniuk kell, ami olyan fehérjéket igényel, amik az egysejtűekben alig fordulnak elő. Másrészt egy valódi szövetekkel rendelkező élőlény különböző sejtjei jelentős mértékben különböznek egymástól annak megfelelően, hogy melyik milyen funkciót töltenek be. Márpedig egy többsejtű élőlény minden sejtje ugyanazt a genomot tartalmazza, csak a genomból sejttípusonként más és más információrészlet fejeződik ki. Ez a tény, a **szövetspecifikus génkifejeződés**t és a **komplex egyedfejlődés**t lehetővé tevő **összetett szabályozási mechanizmusok** számos új fehérje kialakulását igényelték.

Azt is érdemes megfigyelni, hogy az ecetmuslica génjeinek a száma ugyan csak kb. kétszeresen haladja meg az élesztőét, de genomjának bázispárban kifejezett mérete mintegy tízszer nagyobb. Vagyis egy génre átlagosan ötször annyi DNS jut, mint az élesztő esetén. Ennek az oka természetesen nem az, hogy minden gén, és ezzel kapcsolatban minden fehérje valós információtartalma, tehát mérete megötszöröződött. A drasztikus DNS mennyiség növekedés egyrészt abból fakad, hogy a gének jó része a végleges RNS produktumba be nem kerülő, az elsődleges RNS átiratból fizikailag eltávolítódó szakaszokat, **intron**okat is kódol. A végleges RNS átiratba csak az **exon**nak nevezett szakaszok kerülnek be. A génmennyiség növekedését meghaladó mértékű DNS mennyiség növekedés másik oka az, hogy a gének közötti, látszólag funkció nélküli szakaszok mérete drasztikusan megnő (ezt a nem lineáris összefüggést az evolúcióbiológiában **C-érték paradoxon**nak nevezik).

Érdemes megfigyelni, hogy a táblázatban szereplő többi faj (a **fonalféreg, *Caenorhabditis elegans***, a **lúdfű, *Arabidopsis thaliana*** és az **ember, a *Homo sapiens*** génszáma már nem mutat nagyságrendi eltérést az ecetmuslicáéhoz képest, de a fizikai genomméretük annál inkább eltérő. A **komplexitás** tehát itt már **nem arányos a gének számával**. A növekvő komplexitást valószínűleg az evolúció során **egyre összetettebbé váló szabályozási mechanizmusok** kialakulása tette lehetővé, semmint a gének puszta számának növekedése. A komplexitás elsősorban a fehérje kölcsönhatások számával mutat összefüggést. A fehérje kölcsönhatások számának növekedése maga után vonja a szabályozási lehetőségek és végső soron a komplexitás növekedését. (Egy faj összes molekuláris kölcsönhatását együttesen manapság az „interaktom” kifejezéssel jelölik. A komplexebb élőlényekben az interaktom mérete nagyobb.)

Az emberi (és a többi gerinces) genomnak a többi, a táblázatban szereplő fajhoz viszonyított nagyságrendekkel nagyobb mérete a nem-kódoló DNS szekvenciák (beleértve az intronok méretét is) megnövekedett méretére vezethető vissza. Ezeknek a nagyobb részt ismétlődő szekvenciákat tartalmazó DNS szakaszoknak a funkcióját ma még pontosan nem ismerjük. A fehérjéket kódoló szekvenciák a teljes genom mindössze ~1%-át teszik ki. Megemlítjük végül, hogy a gerincesek genommérete nem a legnagyobb az élővilágban, mivel például egyes kétéltűek és növények genommérete akár 10^{11} bázispár is lehet (**az emberi genom $3{,}2\times10^{9}$**, egy tüdőshal genomja $1{,}3\times10^{11}$, a legnagyobb virágos növényé pedig $1{,}5\times10^{11}$**bázispár**ból áll). A humán DNS információtartalmát a **3. animáció** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2. fejezet - Kémiai alapok

(szerző: Pál Gábor)

2.1. Az élő szervezetek alapvető vegyülettípusai

2.1.1. Az atomokból kémiai kötések révén vegyületek jönnek létre

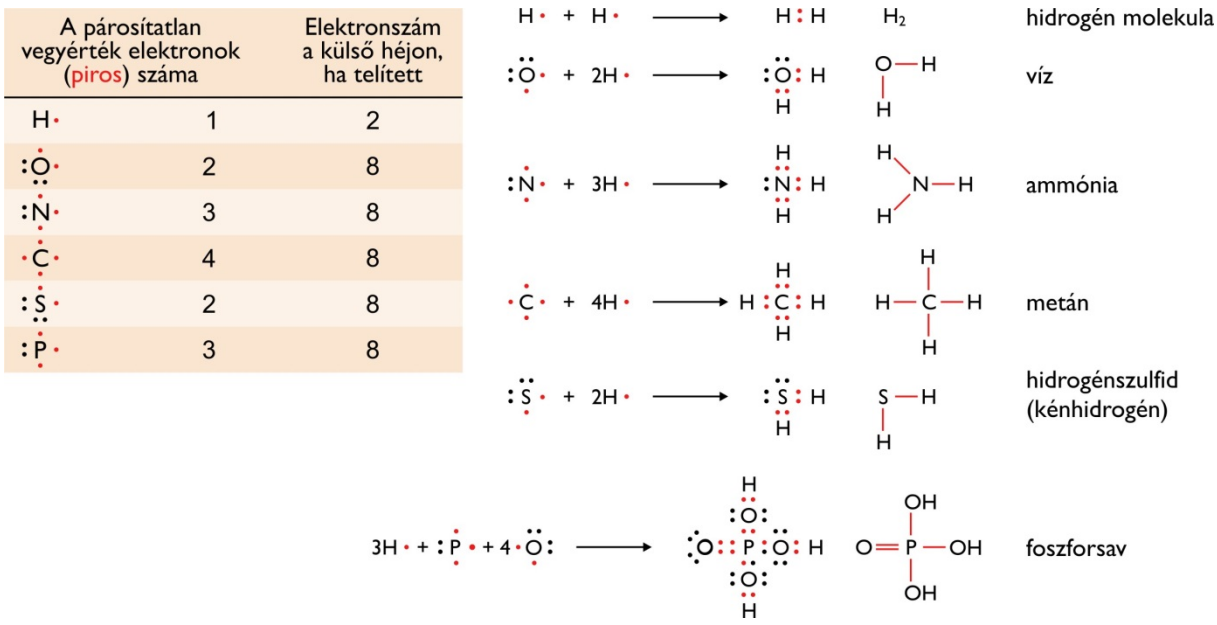
A vegyületek tárgyalásához szükséges alapfogalmakat, alapismereteket itt éppen csak érintjük, mivel feltételezzük, hogy ezeket az ismereteket az olvasó korábbi kémiai tanulmányai során már megszerezte.

Az egyes elemek kémiai tulajdonságait az **elektronszerkezet**ük határozza meg. E tekintetben kitüntetett szereppel bírnak a külső, az elemek többségénél (kivéve nemesgázok) le nem zárt elektronhéjak, melyeket **vegyértékhéj**nak is neveznek. A legegyszerűbb tárgyalás szerint az atomok a vegyértékhéjon lévő elektronokkal képesek más atomokkal **kovalens kötések**et létrehozni. Ennek során atompályák helyett **molekulapályák** alakulnak ki, melyek révén az eredeti atomi állapotokhoz képest **telítettebb elektronhéj** alakul ki. A legtöbb esetben ez nyolc elektront tartalmaz.

A kovalens kötéseket képző legfontosabb 6 elem a **hidrogén** (H), **oxigén** (O), **nitrogén** (N), **szén** (C), **kén** (S) és **foszfor** (P). Ezek közül az első négy járul hozzá legnagyobb mennyiségben az élőlényekben található vegyületek létrejöttéhez. Érdemes megjegyezni, hogy a H, O, N és C a legkisebb rendszámú olyan biogén elemek, amelyek rendre 1 (H), 2 (O), 3 (N) és 4 (C) kovalens kötést képesek létrehozni. Ezek az elemek együttesen az élő szervezetek tömegének mintegy 99%-át teszik ki!

Amikor a kémiai kötés létrejön, a hidrogén szempontjából a külső telített héjon 2, a többi elem esetében 8 elektron van. Tehát mindkét típusnál nemesgáz jellegű elektronhéj jön létre.

A két további, nagy mennyiségben szereplő kémiai elem a kén (S), mely külső héjának elektronszerkezete az oxigénéhez hasonlít, illetve a foszfor (P), mely e tekintetben a nitrogénhez hasonlít (az elemek periódusos rendszerében a kén az oxigén alatt, a foszfor a nitrogén alatt helyezkedik el). A kén tehát 2, míg a foszfor 3 elektronnal tud részt venni kémiai kötésben. Ahogyan azt az **2.1. ábra** mutatja, a 6 említett elem változatos módon kombinálódva nagyon sokféle vegyületet eredményezhet.



2.1. ábra: A legfontosabb biogén elemek elektronszerkezete, és a kovalens kötések kialakulása

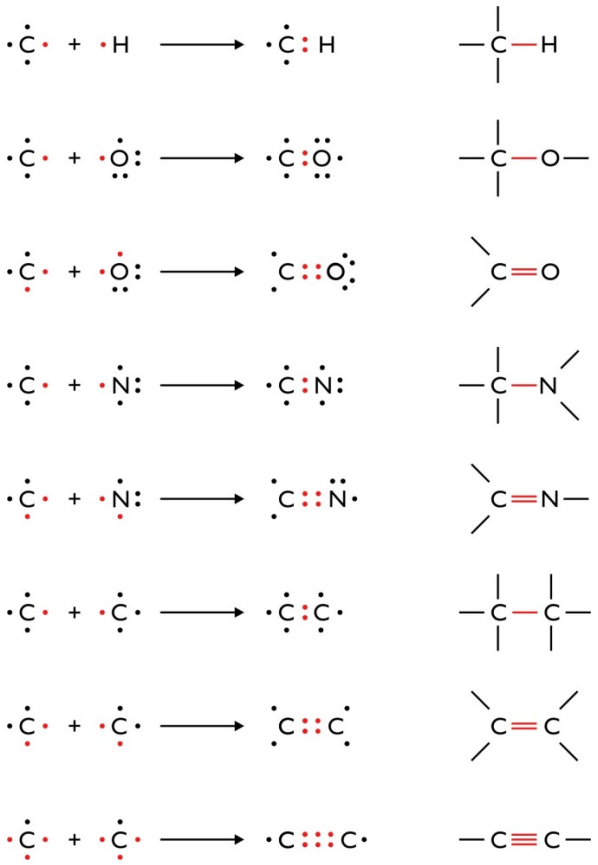
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.1.2. A szén központi szerepe

A már említett 6 elem közül bizonyos jellegzetes tulajdonságai miatt a szén központi szereppel bír. Nem túlzás azt állítani, hogy az élő szervezetek kémiai felépítése a szén köré szerveződik. A sejtek szárazanyag tartalmának több mint a fele szén. A szénatom képes mind a négy fő biogén elemmel (C, O, H, N) valamint a kénnel (S) stabil kovalens kötést létesíteni. A szén ezen kívül képes egyes, kettős és hármas kötés kialakításra is, ezért képes egyszerre 1 (pl. C≡O), 2 (pl. O=C=O), 3 (pl. H_2C=O) vagy 4 (pl. CH_4) másik atommal kovalens kötést létesíteni (lásd **2.2. ábra**).

A kapcsolódó atomtól függően a kovalens kötés polarossága (lásd később) és ezért reaktivitása nagymértékben eltérő lehet. Ennek köszönhetően a szén köré szerveződő szerves molekulák fizikai tulajdonságai és kémiai reaktivitása nagyfokú változatosságot mutat. A szén további rendkívül fontos, különleges tulajdonsága, hogy akár „végtelen számú" szénatom is összekapcsolódhat egymással, (lásd gyémánt vagy grafit). Emiatt a lehetséges szerves molekulák száma végtelen. Jelenleg nagyságrendileg tízmillió szerves vegyület ismert, ezek túlnyomó többségét szerves kémiai szintézissel állították elő.

A szénatomok összekapcsolódásának eredményeként létrejöhet lineáris (el nem ágazó) szerkezet, elágazó szerkezet, vagy éppen gyűrűs szerkezet. A szerves vegyületekről akár úgy is gondolkodhatunk, mint olyan molekulákról, amelyek rendkívül változatos vázszerkezetét szénatomok alkotják, és ezekhez a vázakhoz kapcsolódnak a szénen kívüli egyéb biogén elemek.



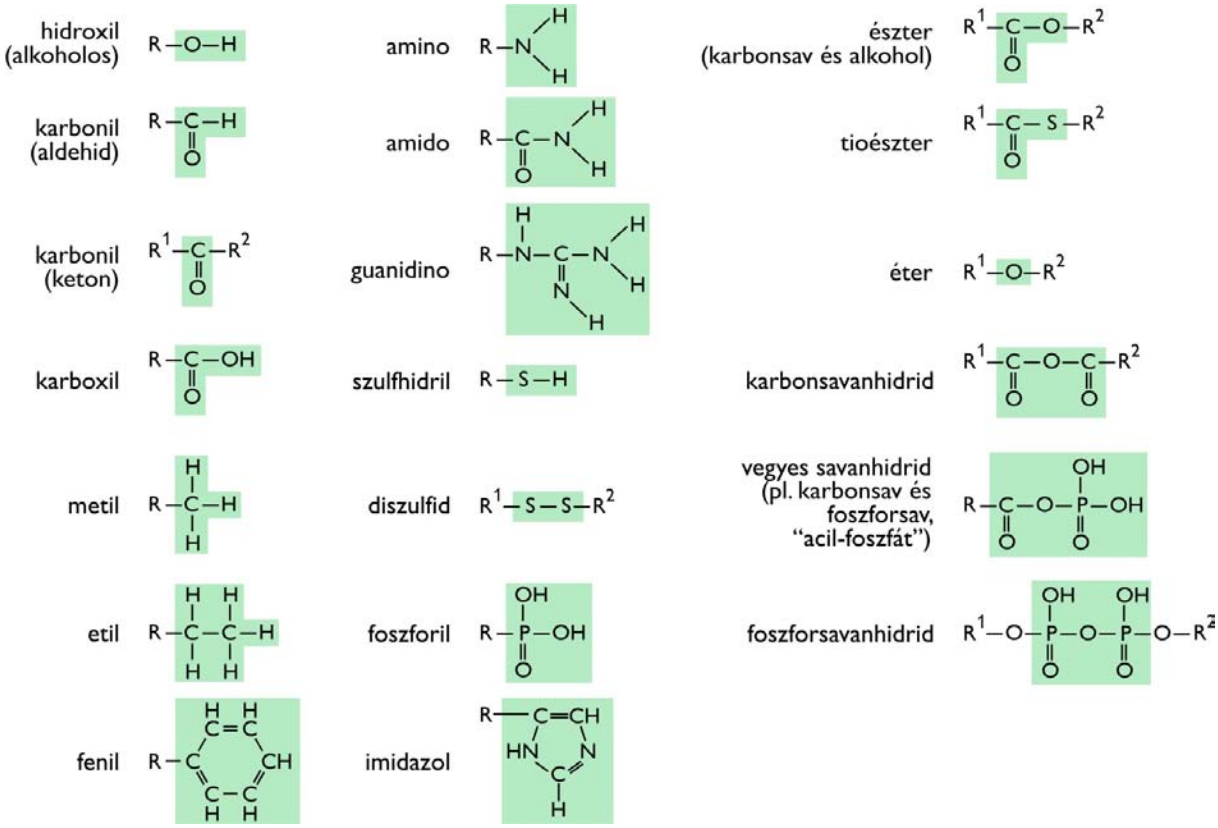
2.2. ábra: A szén mind a négy fő biogén elemmel stabil kovalens kötést képez

2.1.3. Funkciós csoportok

Bár a különböző szerves molekulák lehetséges száma végtelen, fontos észrevennünk ezekben egyfajta hierarchiát. A biogén elemek nem véletlenszerűen rendeződnek el ezekben a molekulákban, hanem néhány tucat jellegzetes elrendeződést hoznak létre, amelyeket **funkciós csoportok**nak nevezünk. Ebben a szemléletben az egyes szerves

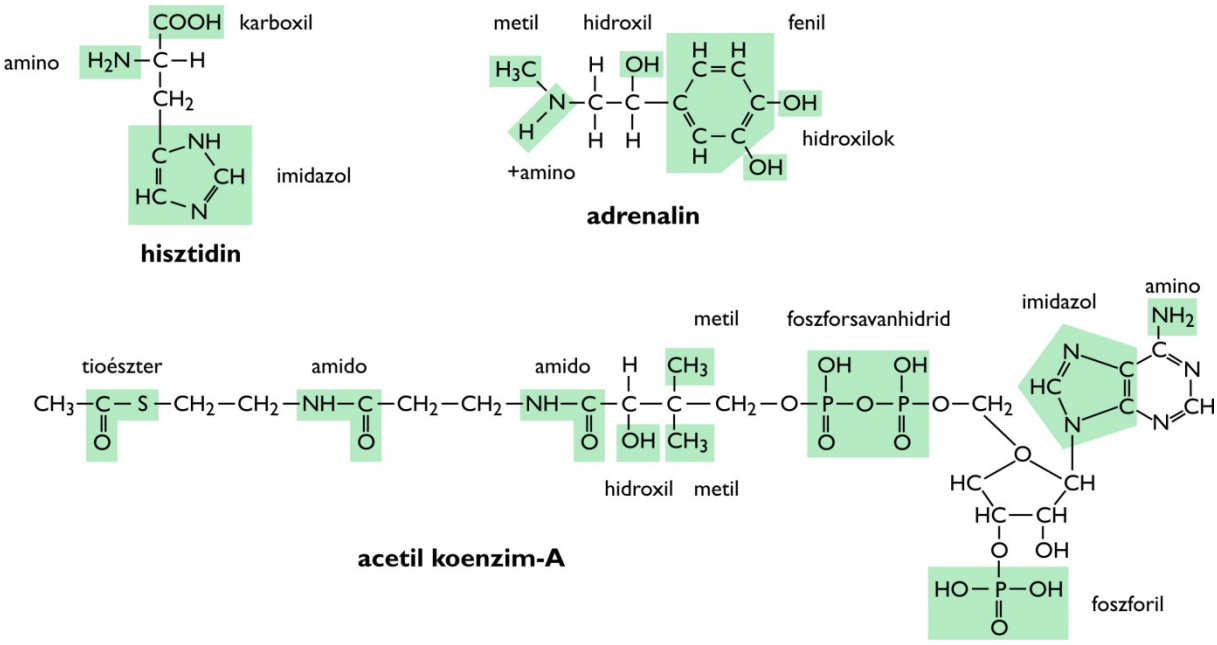
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

molekulák úgy is felfoghatóak, mintha egy csak szénből és hidrogénből álló molekula megfelelő hidrogén atomjait helyettesítenénk az adott funkciós csoportokkal (lásd **2.3. ábra**).



2.3. ábra: A szerves molekulák legfontosabb funkciós csoportjai

A későbbi tananyagrészek gyorsabb és mélyebb megértése érdekében érdemes ezeknek a funkciós csoportoknak a tulajdonságait a korábbi kémiai tanulmányok alapján felidézni. A már említett hierarchikus felépítés miatt az élőlényekben található szerves vegyületek felfoghatók egymáshoz kapcsolódó funkciós csoportok kombinációiként is (lásd **2.4. ábra**).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.4. ábra: A szerves molekulákban számos funkciós csoport kombinálódhat

Ez az értelmezés egyrészt azért hasznos, mert az egyes funkciós csoportok valamelyest autonóm fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Emiatt a belőlük levezetett molekula főbb tulajdonságai is kikövetkeztethetőek. Egy szerves vegyületen belül található metilcsoport például mindig apolárosnak tekinthető, egy karboxilcsoport pedig gyenge savnak stb. A későbbiekben azt is látni fogjuk, az élőlényekben lejátszódó kémiai reakciók egy jelentős részében ilyen funkciós csoportok kerülnek a molekulán belül (intramolekuláris átrendeződés), vagy a molekulák között (csoporttranszfer) felcserélésre. Ennek a tárgyalási módnak egy másik nagy gyakorlati előnye, hogy általa könnyebben memorizálhatók a legfontosabb vegyületek, illetve az egyes kémiai reakciók. Érdemes megjegyezni, hogy egyes kisebb funkciós csoportok nagyobb, összetettebb funkciós csoportok alkotóelemei lehetnek.

Az egyes feltűntetett csoport esetében csak néhány jellemzőjüket, illetve fő előfordulási helyüket ismertetjük. A csak szénből álló alifás (pl. metil- vagy etilcsoportok), valamint a gyűrűs fenilcsoport apolárosak, így hidrofób karakterűek. Vizes környezetből mintegy kiszorulva egymással létesítenek kölcsönhatást (lásd **2.5.3. fejezet**). Az ilyen csoportok között rendkívül rövid távolságon belül alakul ki (indukált dipól-indukált dipól jellegű, lásd **2.4.2.7. fejezet**) vonzó kölcsönhatás, vagyis tipikusan szoros térkitöltésű molekuláris képződményeket (pl. globuláris fehérjék belső, hidrofób magja) hoznak létre.

Az oxigéntartalmú csoportok legegyszerűbb típusában, a **hidroxilcsoport**ban egy oxigén és egy hidrogénatom kapcsolódik össze egyszeres kötéssel. Ennek a csoportnak a kémiai tulajdonsága attól függ, hogy milyen molekulakörnyezetben van. Az alkoholos hidroxilcsoport esetében az OH-csoport egy alifás szerkezetben lévő szénatomhoz kapcsolódik. Ez a csoport például szénhidrátok jellegzetes alkotóeleme. Az ilyen csoportok (mint látni fogjuk) **hidrogénkötés**t tudnak kialakítani, és ebben a kölcsönhatási típusban mind küldő (donor), mind fogadó (akceptor) csoportként szerepelhetnek. Az alkoholos hidroxilcsoport képes lehet protonleadásra is, tehát viselkedhet savként, de csak rendkívül erős bázisokkal szemben. A biokémia területén ilyen erős bázisokkal nem találkozunk. Ha azonban a hidroxil egy aromás gyűrű egyik szénatomjához kapcsolódik, (lásd pl. a tirozin fenolos hidroxilja) akkor gyenge savként protont adhat le.

Amennyiben a hidroxilcsoport egy karboxilcsoport része, úgy a protonleadási képessége lényegesen megnő, és ténylegesen savként kell számolni vele. A karboxilcsoport disszociált formáját **karboxilát anion**nak hívjuk.

A **karbonilcsoport**, amelyben egy szénatomhoz egy oxigén kettőskötéssel kapcsolódik, a legegyszerűbb formákban aldehidek, vagy ketonok funkciós csoportja. Ezekkel a csoportokkal leggyakrabban a cukrokban (aldózok és ketózok) találkozunk. A karbonilcsoport is képes hidrogénkötésre. A hidroxilcsoport mellett a karbonilcsoport a karboxilcsoport másik alkotóeleme, de a karbonilcsoportot felleljük az amido-, az észter-, a tioészter- és karbonsavanhidrid vagy vegyes savanhidrid csoportok tagjaként is.

Az **észterek** és különösen a **tioészter**, vizes közegben a vízzel kémiai reakcióba lépve karbonsavra, és alkoholra illetve tiolra bomolhatnak (hidrolizálnak). Az aminosavak és az azokat a riboszómákhoz szállító tRNS-ek között észterkötés van. A tioészter előfordulására tipikus példa az acetil-koenzim-A, amelyben az acetilcsoportot a koenzim-A SH csoportja tioészter képzésen keresztül hordozza. Az említett észterek bomlékonysága a termodinamika fogalomrendszerében kifejezve azt jelenti, hogy ezek a csoportok egy magas szabadentalpia szintet (aktivált állapotot) képviselnek. Ennek az állapotnak a megszűnése, tehát az észter bomlása szabadentalpia csökkenéssel jár, vagyis (mint látni fogjuk) spontán folyamat, amivel adott esetben munkát lehet végezni.

Az **aminocsoport**, amire jó példa az aminosavak névadó funkciós csoportja, semleges kémhatású vizes közegben a víztől protont vesz fel, tehát bázisként viselkedik, és így protonált formában van jelen (amely forma így már gyenge sav). Ha a csoport nem protonált, akkor hidrogénhidas kapcsolatban küldő és fogadó félként is szerepelhet. Ha azonban protonált, akkor már csak küldő fél lehet (hiszen a nitrogén nemkötő elektronpárja protonált állapotban már nem lehet hidrogénhídban fogadó fél).

Az **amidocsoport,** amely egy karbonilcsoport és egy aminocsoport kombinációjaként írható fel, nem viselkedik sem savként, sem bázisként. Hidrogénhíd kölcsönhatásban mind küldő, mind fogadó fél lehet. Ez a csoport szerepel például a peptidkötésben. Az amidok stabilabbak, tehát alacsonyabb szabadentalpia szintet képviselnek, mint a megfelelő észterek. Ennek megfelelően a polipeptidlánc riboszómális szintézisének egyik termodinamikai „hajtóereje” az, hogy a folyamat során a fent már említett észterkötések szűnnek meg, miközben peptidkötések keletkeznek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A csak nitrogénből, szénből és hidrogénből álló **guanidino-csoport** viszonylag **erős bázis**, ami semleges kémhatású közegben protont vesz fel. Ezt a csoportot többek között az arginin aminosav funkcionális csoportjaként találjuk meg a szervezetben. A heterociklusos gyűrűt tartalmazó **imidazol-csoport** legjellegzetesebb előfordulási helye a hisztidin aminosav oldallánca. Ez a csoport többek között azért nevezetes, mert a protonáltsági állapotának változása a semleges körüli pH tartományban megy végbe. A semlegesnél kissé alacsonyabb pH-n protonált, és ilyenkor sav-bázis reakciókban gyenge savként viselkedik, e feletti pH-n viszont nincs protonálva, tehát ekkor sav-bázis reakciókban bázisként protont tud felvenni. Az imidazol-csoport ezen felül fémek és fémionok koordinációs kötésében is szerepet játszik.

A **szulfhidril-csoport** (SH) lényegesen reaktívabb, mint az oxigéntartalmú alkoholos hidroxil párja. A szulhidril-csoport **oxidatív környezetben diszulfidot képez**. Tipikus példa erre a fehérjék esete. A sejten belüli, citoplazmatikus tér reduktív közeg, így az itt működő fehérjék zöme nem tartalmaz diszulfidhidat. A sejten kívülre szállított, vagy a sejt külső felületén működő fehérjék jó része azonban diszulfidhidakat tartalmaz. A szulfhidril-csoport a redoxfolyamatok mellett azért is említésre méltó, mert gyakran vesz rész fémek koordinálásában is. A már említett tioészter-csoport részeként is találkozunk vele.

A különböző **anhidridek** (karbonsav-anhidrid, foszforsav-anhidrid, vegyes sav-anhidrid) aktivált állapotot képviselő bomlékony molekularészletek. Foszforsav-anhidrid csoportokat találunk például az ATP molekulában, ilyen csoport szűnik meg ATP-ADP vagy ATP-AMP átalakulások során. Az ATP-ADP átalakulás során egy foszforilcsoport átvitele történik meg. Ha ez a csoport közvetlenül vízre kerül, úgy a reakciót hidrolízisnek hívjuk, és ekkor ADP mellett szervetlen foszfát keletkezik. Hidrolízis történik például az ATP-vel működő molekuláris motorok, például a miozin esetében, ahol a felszabaduló energia egy része mechanikai munkára fogható. Az ATP azonban számos egyéb módon is átalakulhat, például úgy, hogy a foszforilcsoport víz helyett egy másik molekulára kerül. A glükóz lebontásához vezető folyamat, a glikolízis első lépésében a foszforilcsoport például a glükóz 6'-hidroxiljára kerül, így glükóz-6-foszfát keletkezik.

2.1.4. A molekulák, funkciós csoportok ábrázolása

Az egyes molekulákat, funkciós csoportokat sokféle módon lehet ábrázolni. A leginkább valósághű ábrázolás esetében figyelembe kell venni az egyes atomok méretét, és ezek molekulán belüli távolságát, vagyis a kötéshosszakat. Ez a kérdés szorosan összefügg a van der Waals sugár fogalmával.

Azt, hogy két atom mennyire közelítheti meg egymást, az atomok van der Waals sugara fejezi ki. A van der Waals sugár jelöli ki azt a gömbfelszínt, amelyen belülre más atom nem kerülhet, hacsak nem jön létre kovalens kötés az atomok között. A közelebb kerülés akadálya az, hogy az egymáshoz közeledő atomok külső elektronpályái (hacsak nem alkotnak közös molekuláris pályát) nem fedhetnek át. Az ebből fakadó taszítás mértékének távolságfüggése olyan nagy, hogy az atomok merevfalú golyóként modellezhetők. **A legkisebb távolság, amennyire** (alapesetben) **két atom megközelítheti egymást, tehát a van der Waals sugaruk összege**. Amikor azonban kovalens kötés alakul ki, tehát közös molekuláris elektronpályák jönnek létre, a két atom távolsága, tehát a kötéstávolság kisebb lesz, mind van der Waals sugarak összege. Ez jól látható a **2.1. táblázat**ban, amely az egyes atomok van der Waals sugarait veti össze a két azonos atom között kialakuló egyszeres kovalens kötés hosszának felével.

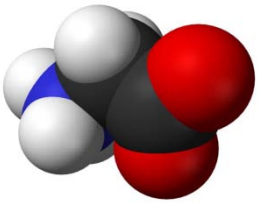
2.1. táblázat: Biogén elemek van der Waals sugara és az egyszeres kovalens kötés sugara

Elem	Az atom van der Waals sugara (nm)	Egyszeres kovalens kötés sugara (nm)
H	0,1	0,030
O	0,14	0,074
N	0,15	0,073
C	0,17	0,077
S	0,18	0,103
P	0,19	0,110
I	0,22	0,133

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A molekulákat leginkább valószerűen bemutató **térkitöltő modell**ben a molekulát alkotó **atomok** a rájuk jellemző **van der Waals sugarú gömbként** kerülnek ábrázolásra, az identitásukat pedig egyezményes színekkel szokás jelezni (pl. a szén fekete, a hidrogén fehér, az oxigén piros, a nitrogén kék, a kén sárga stb.). A **2.5. ábra** a legegyszerűbb aminosav, a glicin térkitöltő ábrázolását mutatja.

Ahol két atom között kovalens kötés van, ott a két atom megfelelő gömbje egymással átfed. Az így kialakuló felszín nagyjából megmutatja a molekula van der Waals felszínét. Ez az ábrázolási mód jól mutatja a molekulát alkotó atomok relatív méreteit illetve az egyes molekulák egymáshoz viszonyított méretét. Ugyanakkor egy ilyen ábrázolásban a kovalens kötések hossza, azok egymással bezárt szöge nem jól látható. Annak érdekében, hogy ezek a tulajdonságok is látszódjanak, bevezették a **golyó-pálcika modell**t, amelyben minden atom van der Waals sugarát azonos arányban lecsökkentették. Így a különböző atomok egymáshoz viszonyított méretaránya megőrződik, miközben a közöttük létrejövő kötések is jól jelezhetővé válnak.



2.5. ábra: A glicin térszerkezete, az atomokat van der Waals sugarú gömbként ábrázolva

Amikor az atomok méretviszonyait és a kötéshosszakat nem kívánjuk ábrázolni, egy további egyszerűsítéssel **szerkezeti képlete**ket írhatunk fel. Ebben az esetben az egyes atomokat az egybetűs kódjuk mutatja, a közöttük lévő, bemutatni kívánt kovalens kötéseket és ezek számát (egyszeres, kétszeres vagy háromszoros kötés) megfelelő számú vonallal jelezzük, valamint a kötések egymással bezárt hozzávetőleges szögét is ábrázolhatjuk. A molekula térbeli elrendeződését ebben az ábrázolási módban is jelezni lehet. Ehhez azokat a kötéseket, amelyek a lap síkjából az olvasó felé eső térrészbe mutatnak teli háromszöggel, míg a hátrafelé eső térrészbe mutatókat csíkozott háromszöggel jelezzük.

A térbeli elrendeződésnek komoly jelentősége van. Az egyes funkciós csoportok milyenségén és kapcsolódási rendjén kívül ezek térbeli elrendeződése is befolyásolja a molekula fizikokémiai tulajdonságait. Amennyiben az egyik térbeni elrendeződésből a másikba csak kovalens kötés(ek) ideiglenes felszakításán keresztül vezet az út, úgy az egyes térbeni állapotok különböző molekulákat (izomereket) jelentenek (lásd **2.2. fejezet**).

2.2. A szerves vegyületek háromdimenziós szerkezete: konformáció és konfiguráció

Azonos szerkezeti képlettel rendelkező vegyületekben az egyes atomok kapcsolódási sorrendje ugyan azonos, de az atomok egymáshoz képesti térbeli elrendeződése, vagyis sztereokémiája, eltérő lehet. A kizárólag sztereokémiájukban eltérő molekulák egymás **térszerkezeti izomer**jei. A **térszerkezeti izomerek**nek (sztereoizomereknek) **két típus**a van. Ezek a következő alfejezetekben ismertetett **geometriai** és **optikai izomerek**.

Mielőtt ismertetjük ezeket, az atomok, funkcionális csoportok eltérő térbeni elrendeződésével kapcsolatban két fontos fogalmat kell precízen megkülönböztetnünk.

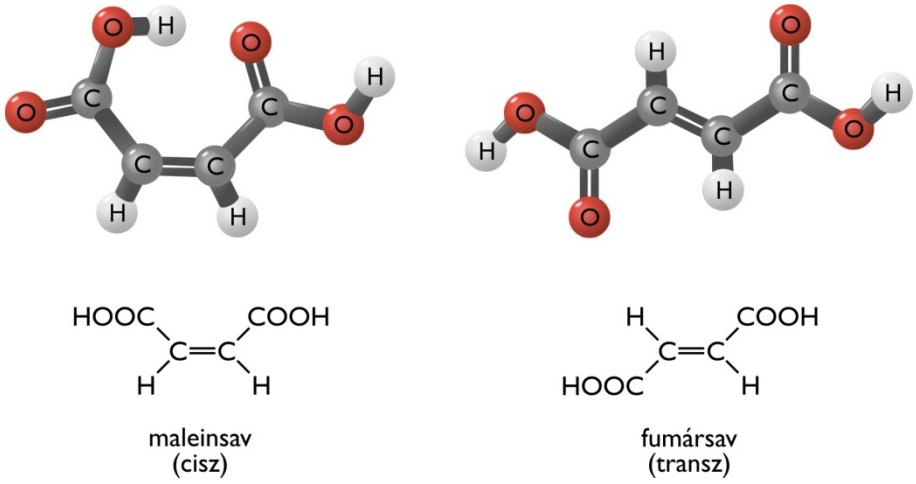
Az egyik a konfiguráció. A **konfiguráció** a molekulán belüli atomoknak olyan rögzített térbeli elrendeződése, amely **csak kovalens kötések ideiglenes felbontása árán változtatható meg**. Az egyik konfigurációs állapotból egy másikba tehát csak kémiai kötés felbontása és új kötés kialakítása árán lehet átkerülni. Ez egyben azt is jelenti, hogy az eltérő konfigurációs állapotok eltérő molekulákat (vegyületeket) jelentenek!

A **konformáció** ezzel szemben a molekulán belüli atomok olyan térbeli elrendeződése, amely kémiai kötések felbontása nélkül, pusztán **kötések körüli elfordulásokkal megváltoztatható**. Tehát egyik konformációs állapotból a másikba kötésbontás nélkül átvihető a molekula. Ez az előzőekkel szemben azt jelenti, hogy amikor konformációs állapotokat különböztetünk meg, akkor nem különböző molekulákról, hanem egy adott molekula különböző térszerkezeti állapotairól van szó.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.2.1. Konfiguráció I.: geometriai (cisz-transz) izoméria

A konfiguráció egyik típusa a geometriai, vagy más néven **cisz-transz izomériá**val kapcsolatos, amit a fumársav-maleinsav pár példáján mutatunk be (lásd **2.6. ábra**).



2.6. ábra: A geometriai (cisz-transz) izoméria bemutatása a maleinsav és a fumársav példáján keresztül

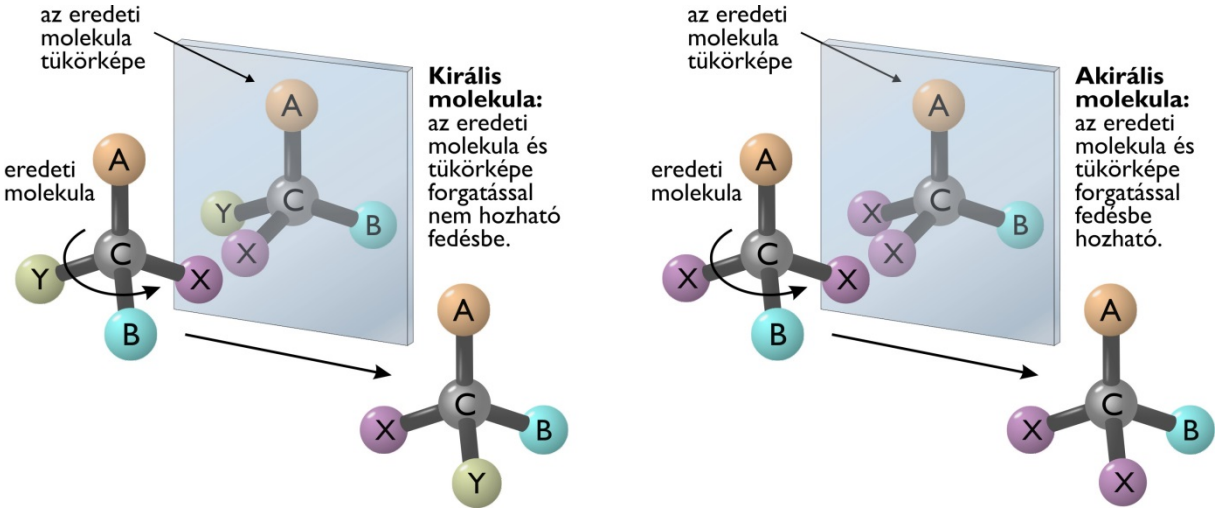
A geometriai izoméria az atomok közötti kötések körüli szabad rotáció hiányából fakad. Ennek legtipikusabb esete a kettőskötéssel függ össze. **A kettőskötés körül nincs szabad rotáció**. Ahhoz, hogy a kettőskötés tengelye körül a molekula két része egymáshoz képest elforduljon, a kettőskötés két kötése közül az egyiknek, a pi kötésnek ideiglenesen fel kell bomlania, majd újra ki kell alakulnia. Szigorúan értelmezve a cisz-transz izomériát arra az esetre vezették be, amikor a kettőskötéssel összekötött két atomhoz ugyanaz a kétféle funkciós csoport kapcsolódik (a példaként bemutatott esetben mindkettőhöz egy hidrogénatom, és egy karboxilcsoport). Ha a két azonos funkciós csoport a **kettőskötés azonos oldalán** van, akkor ezek egymáshoz képest cisz helyzetben vannak, és ez lesz a **cisz izomer**, ha **átellenes oldalon** helyezkednek el, akkor transz helyzetben vannak, ami a **transz izomer**nek felel meg. Mint látható, ebben a konfiguráció típusban az izomerek azonos összetétellel, azonos szerkezeti képlettel és azonos funkciós csoportokkal rendelkeznek, de ezeknek a funkciós csoportoknak az egymástól mért távolsága, az egymáshoz viszonyított térállása eltérő. Így természetesen az izomerek alakja is eltérő lesz, ami miatt az izomerek molekuláris kölcsönhatásai is eltérőek lesznek. Ráadásul az amúgy azonos funkciós csoportok kémiai környezete a kétféle izomerben eltérő, ami a csoportok fizikokémiai tulajdonságait az egyes izomerekben eltérővé teszi.

Hasonló, kovalens kötés felbomlása nélkül nem megvalósítható rotáció, és így cisz-transz izoméria jelentkezhet gyűrűs vegyületekben is. Mindkét esetben igaz, hogy a két eltérő konfigurációhoz tartozó molekula olyannyira eltérő tulajdonságokkal bír, hogy hagyományos vegyületnevük is eltér, esetünkben maleinsav (hivatalos, IUPAC elnevezése *(Z)*-buténdisav) és fumársav (IUPAC neve *(E)*-buténdisav).

2.2.2. Konfiguráció II.: királis centrumok és optikai izoméria

Ha egy szénatom körül négy különböző funkcionális csoport van (**királis centrum**), akkor ezek kétféle módon rendezhetők el térben. Az egyik forma a másik tükörképe, és ezek nem vihetők át egymásba térbeli forgatással (lásd **2.7. ábra**). Az ilyen **tükörképi molekulák** egymás **enantiomer**jei.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



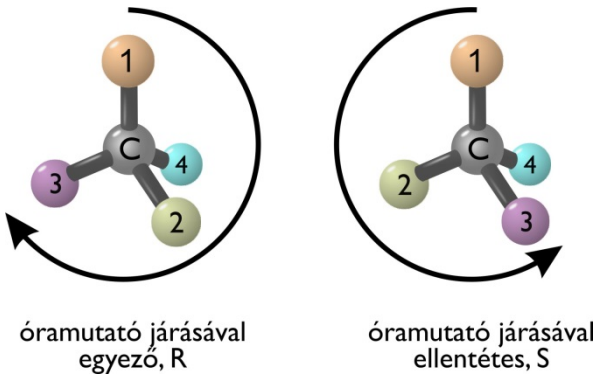
2.7. ábra: A királis centrum és az abból eredő optikai izoméria szemléltetése

Természetesen rendkívül fontos, hogy egyértelműen meg tudjuk nevezni a tükörképi molekulákat.

A központi szénatomhoz kapcsolódó funkciós csoportokat egyértelműen sorba lehet rendezni a funkciós csoportban található atomok rendszáma és összekapcsolódási sorrendje alapján (lásd **2.8. ábra**).

A legalacsonyabb „rangja” a legkisebb rendszámú hidrogénnek van, ennél magasabb rangot képvisel, ha a központi szénhez egy szénatom kapcsolódik. Ez utóbbi esetből a legalacsonyabb rangú, ha ez a kapcsolódó szén 3 hidrogénnel van kovalens kötésben, vagyis ha a központi szénhez egy metilcsoport kapcsolódik. Ennek a logikának megfelelően a leggyakoribb funkciós csoportok rangsorrendje balról jobbra haladva csökkenő sorrendben az alábbiak szerint alakul:

$$-OCH_3 > -OH > -NH_2 > -COOH > -CHO > -CH_2OH > -CH_3 > -H$$

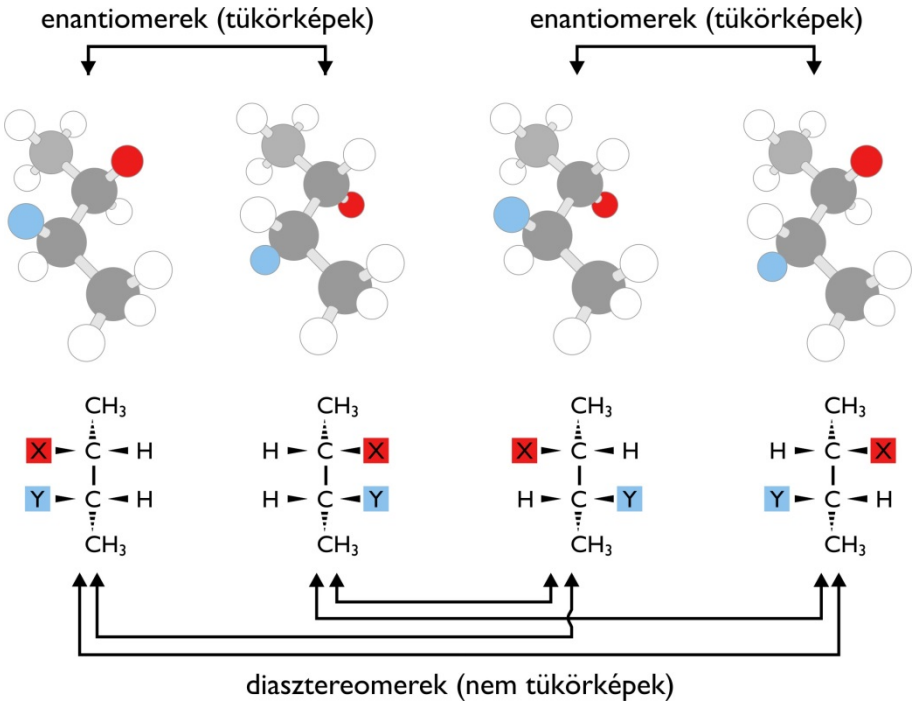


2.8. ábra: Az optikai izomerek egyértelmű elnevezése a különböző rangú funkciós csoportok relatív térbeli helyzete alapján

A rangok egyértelmű kioszthatósága teszi tehát lehetővé az enantiomerek egyértelmű megnevezését. A megfelelő azonosítás érdekében a **legalacsonyabb rangú funkciós csoportot hátra** helyezzük el a térben. Az **előre kerülő**, egy síkot definiáló három eltérő, **1., 2. és 3. rangú funkciós csoport** esetében megnézzük, hogy azok milyen irányban olvashatók össze ebben a sorrendben. Ha az összeolvasáshoz az **óramutató járásával egyező irányban** kell haladnunk, akkor az enantiomer jelölése **R** (a latin *rectus*, jobb oldali kifejezésből), ha pedig az **óramutató járásával ellentétesen** kell haladnunk, akkor **S** (latinul *sinister*: bal).

Egyetlen királis centrum esetén két sztereoizomer létezik, míg „n” királis centrum esetén 2^n-féle sztereoizomer van. Ezek rendre enantiomer párokat alkotnak (lásd **2.9. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

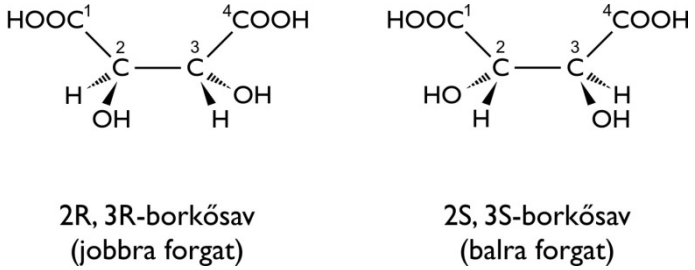


2.9. ábra: Enantiomer és diasztereomer molekulák szerkezeti összehasonlítása

Egynél több királis centrum esetén lesznek olyan sztereoizomerek, amelyek egymásnak nem tükörképei, tehát egymás viszonylatában nem enantiomerek. Azok a **sztereoizomerek, amelyek egymásnak nem enantiomerjei, a diasztereomerek**.

Az enantiomerek esetében figyelemreméltó, hogy ezek funkciós csoportjai egymástól azonos távolságra vannak, és ezek egymással bezárt irányszögei is azonosak. Emiatt a korábban említett **geometriai izomériával ellentétbenaz enantiomerek** a legtöbb **fizikokémiai paramétereik** (pl. olvadáspont, savas csoportok disszociációs állandója stb.) tekintetében **megkülönböztethetetlenek** egymástól.

Az enantiomerek különbségei kizárólag akkor nyilvánulnak meg, ha szintén tükörképi párokba rendezhető molekulákkal, vagy fizikai jelenséggel kerülnek kölcsönhatásba.



2.10. ábra: Két borkősav enantiomer összehasonlítása

A **2.10. ábrá**n szereplő két borkősav-izomer egymás enantiomere. (Ebben a speciális esetben, amikor a két királis centrumhoz ugyanaz a 4-féle funkciós csoport kapcsolódik, összesen nem 4, hanem 3 izomer létezik. A 2R, 3S-borkősav, illetve a 2S, 3R-borkősav ugyanis egymással egybeforgatható, tehát egyetlen fajta molekula, amely az előző kettőnek a diasztereomere). Az **enantiomer keverék**et tartalmazó (**racém**) oldatban a fent említett szabályszerűség miatt egy 2R, 3R-borkősav molekula másfajta másodrendű kölcsönhatásokat alakít ki egy másik 2R, 3R-borkősav molekulával, mint a saját tükörképi párjával (és ez szimmetrikusan igaz a 2S, 3S-borkősav molekulára is). A konkrét esetben mindkét molekula stabilabb kölcsönhatásokat tud létrehozni a vele tökéletesen megegyező molekulákkal, mint a tükörképi párjával. Kristályosítás során a molekulák egymással másodrendű kölcsönhatásokat hoznak létre, és egymáshoz viszonyítva szabályosan rendeződnek el a térben. Az említett

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

preferenciális kölcsönhatás miatt a két enantiomer kristályosítással elválasztható egymástól. A két enantiomer aszimmetrikus, egymáshoz képest tükörképi kristályokat alkot.

Az enantiomerek a síkban polározott fényt egymáshoz képest ellentétes irányban forgatják el. A síkban polározott fény, amelyben az elektromágneses hullám egyetlen síkban rezeg, felfogható két, ellentétes (egy óramutató járásával egyező, és egy azzal ellentétes) irányba tekeredő, azonos fázisú és amplitúdójú, cirkulárisan polározott fény (tehát fényspirál) eredőjeként. Az enantiomerek eltérő módon gerjeszthetők a két fényspirál komponenssel, emiatt a polarizáltság síkja az egyik enantiomernél az óramutató járásával egyező, a másiknál azzal ellentétes irányban elfordul. A jelenséget elsőként Louis Pasteur (1843-ban) mutatta ki.

Amint azt látni fogjuk, a kiralitásból eredő **enantiomerek** nevezéktanára van egy másik, **Emil Fischer által bevezetett (D- és L-izomerek) nevezéktan** is, **amit a biokémia** hagyománytiszteletből **megőrzött**. Ezt az aminosavak ismertetésénél tárgyaljuk, de a most következő példák egyikében, amelyik aminosavakat érint, már szerepeltetjük.

Az enantiomer párok tehát sokkal jobban hasonlítanak egymásra, mint a diasztereomerek, vagy éppenséggel a geometriai izomerek. Ezért az elnevezésük is azonos, leszámítva azt az egybetűs kódot (R vagy S, illetve D vagy L) amelyik a funkciós csoportok térbeni elrendeződésére utal. A tükörképi párok megkülönböztetése kifinomult optikai eljárásokat igényel, fizikai elválasztásuk pedig komoly technikai kihívást jelent. Ennek tükrében rendkívül figyelemreméltó, hogy **az élő rendszerek** könnyedén **megkülönböztetik egymástól az enantiomer párokat**. A szőlőcukrot (D-glükóz) például a sejtek pillanatok alatt vízre és széndioxidra bontják le, míg a tükörképi párt (L-glükóz) nem tudják átalakítani.

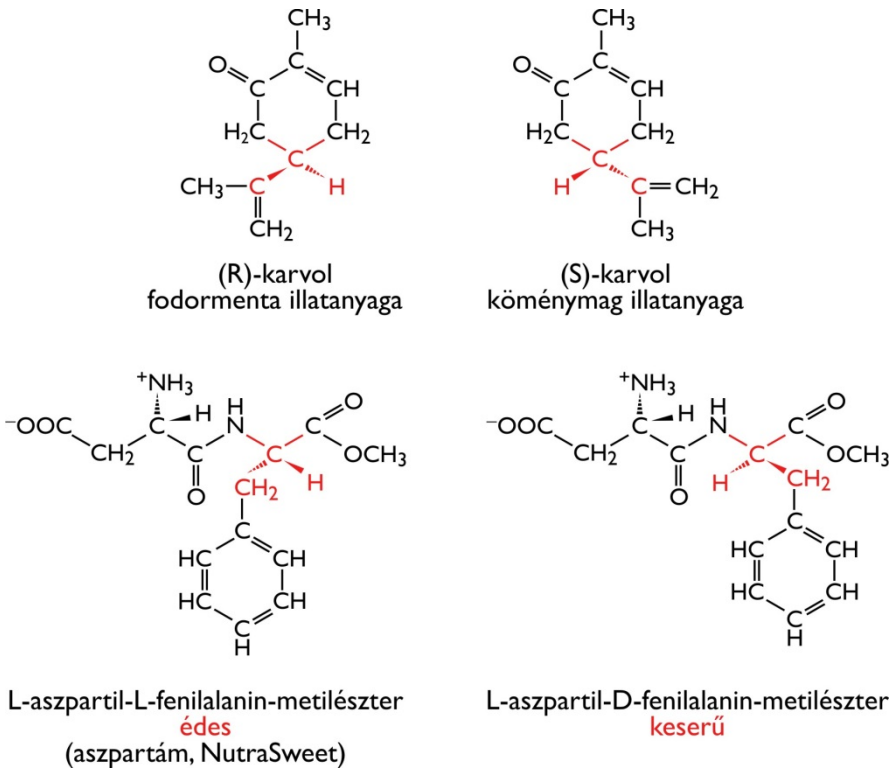
Egyes enantiomer párok a szervezetünk számára könnyedén, már szaglás illetve ízlelés útján is megkülönböztethetőek. Az (R)-karvon például a fodormenta illatanyaga, míg a tükörképi párja az (S)-karvon adja a köménymag jellegzetes illatát (lásd **2.11. ábra**). Ezeket tipikusan természetes forrásból izolálják, de amennyiben szintetikusan, racém keverékként állítanák elő, úgy a felhasználhatósághoz mindenképpen el kellene választani egymástól a két komponenst.

Egy másik tanulságos példa az egyik mesterséges édesítőszerrel kapcsolatos. Az L-aszpartil-L-fenilalanin-metilészter édes, míg az a molekula, amelyben a fenilalanint tartalmazó rész az előzőnek tükörképi párja, éppenséggel keserű.

Vajon minek köszönhető, hogy a szervezetünk képes erre a „finom” különbségtételre? Az ízérzékelés és a szaglás molekuláris szinten megfelelő receptoron alapul. Ezek a specifikus receptorok lépnek másodlagos kölcsönhatásokon keresztül kapcsolatba a felismert molekulával. A receptorok az élő szervezetben fehérjék, és a fehérjék maguk is királis molekulák. A 20 fehérjealkotó aminosavra egy (a glicin) kivételével mind igaz, hogy alfa-szénatomja királis centrum. A fehérjékben a glicint leszámítva a **19 aminosav** mind létezhetne **enantiomer párok**ban, de a valóságban ezek az aminosavak mind csak az egyik konfigurációban (a Fischer nevezéktan szerint az **L sztereoizomer**) vannak jelen.

Ha egy receptor valamilyen kötőzsebe stabil kölcsönhatást tud létrehozni egy olyan molekulával, vagy molekularészlettel, ami királis, akkor magától értetődően ugyanez a kötőzseb nem tud ugyanolyan kölcsönhatást létesíteni a tükörképi párral. Ismert példa erre a jobb kéz és a bal kéz esete. A két kezünk egymás tükörképe, melyek nem forgathatók fedésbe. Ennek megfelelően a balkézre pontosan illeszkedő kesztyű (lásd kötőzseb) nem tudja szorosan illeszkedve befogadni a jobb kezünket, illetve a jobbkezes kesztyű nem illeszkedik szorosan a balkezünkre. A fenti példákban az egyes enantiomereket más-más receptorok kötik meg, és ennek megfelelően eltérő jel kerül feldolgozásra az agyban. A glükóz esetében is fehérjékkel kapcsolatos az említett megkülönböztetés. A glükóz lebontása egy soklépéses kémiai folyamatsor, amelyben minden lépést specifikus enzimek katalizálnak. A résztvevő enzimek mind fehérjék, amelyek sztereospecifikus kötőhellyel rendelkeznek a szubsztrátjuk számára. A királis szubsztrát tükörképi párjával nem lépnek kapcsolatba.

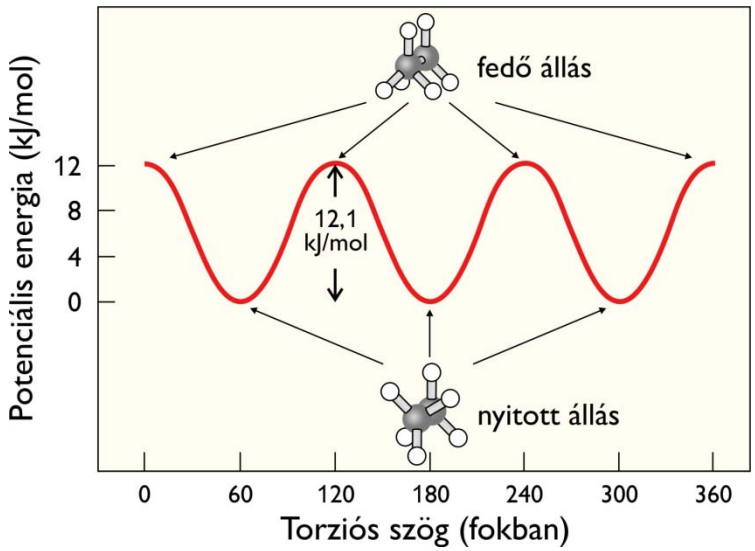
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.11. ábra: Az enantiomerek biológiai hatása eltérő

2.2.3. Konformáció

Mint említettük, a **konformáció** a molekulán belüli atomok olyan térbeli elrendeződése, amely kémiai kötések felbontása nélkül, pusztán **kötések körüli elfordulásokkal megváltoztatható**. Az egyes konformációs állapotokat **konformációs izomerek**nek, röviden **konformerek**nek is nevezik. Mivel az egyes állapotok között kötések körüli rotációval lehet „közlekedni" a rotamer elnevezés is használatos. Példa gyanánt nézzük meg az etán konformációs állapotait (lásd **2.12. ábra**).



2.12. ábra: Az egyes rotamerek potenciális energiája eltérő

Az átfedő állapotokhoz valamivel magasabb energiaszint tartozik, ezért a molekulák nagyobb hányada a keresztező rotamer állapotban van. Bár a konformer állapotok közötti átmenetekhez nem kell kovalens kötést bontani, mégis

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

kialakulhatnak viszonylag **stabil konformer állapotok**. Ennek részben termodinamikai, részben kinetikai okai vannak. Az egyes konformer állapotokhoz, mint már az etán példáján is láttuk, eltérő szabadentalpia szintek tartoznak. Minél alacsonyabb ez a szabadentalpia szint, a molekuláknak annál nagyobb hányada lesz abban az állapotban.

Tegyük fel, hogy van két megkülönböztethető konformációs állapot, amelyekhez azonos szabadentalpia szint tartozik. Ezek 1:1 arányban lesznek jelen. Tegyük fel azt is, hogy valamilyen fizikokémiai eljárással el tudjuk választani a két konformert egymástól. Amennyiben a két állapot között rendkívül gyors az átmenet, úgy az elválasztás végére újra egy 1:1 arányú keveréket kapunk, hiszen már a szeparáció során beállna az új egyensúly. Ha azonban az egyik állapotból a másikba egy magas aktivációs szabadentalpiájú köztes állapoton keresztül vezet csak az út, akkor az új egyensúly csak nagyon lassan áll be, így a két konformer (ideiglenesen) elválasztható egymástól.

2.2.3.1. A makromolekulák konformációs állapotai

A biokémia érdeklődési körén belül különleges helyet foglal el a makromolekulák konformációja. A **makromolekulák** esetében funkcionális értékelés alapján megkülönböztetünk **natív**, tehát funkcióképes, és funkcióképtelen **konformáció**kat (az utóbbi konformációs állapotokat **denaturált**nak nevezzük).

Az élőlényekben található DNS natív állapota például a kettős spirál, amelyben a két egymással komplementer DNS szálat a Watson és Crick által leírt bázispárosodási szabályok szerint hidrogénhidak (és egyéb van der Waals kölcsönhatások) tartják össze. A DNS denaturált állapotának azt a konformációt nevezzük, amikor a két szál teljes mértékben elválik egymástól.

Az RNS molekulák egy jó részének is van jól definiált térbeli szerkezete, natív konformációja. A tRNS molekulák például jellegzetes, szoros térkitöltésű, L-alakú molekulák, amelyek natív szerkezetét bázispárok és egyéb van der Waals kölcsönhatások stabilizálják. Ugyancsak határozott szerkezet jellemzi a riboszómális RNS-eket is.

A fehérjék tetemes része ún. globuláris fehérje. Ezek a fehérjék apoláros belső résszel, más néven hidrofób maggal rendelkeznek. A hidrofób mag a hidrofób hatásnak nevezett termodinamikai jelenség (lásd **2.5.3. fejezet**) miatt alakul ki, és döntően befolyásolja a fehérje stabilitását.

A natív konformáció közelebbről megvizsgálva valójában egy olyan konformáció sereget jelent, amelyet a molekula a működése során felvesz. Maga a fogalom egyfajta evolúción ment át, részben a vizsgálati módszerek függvényében. A mai napig leghatékonyabb atomi felbontású szerkezetvizsgáló módszer a röntgenkrisztallográfia. Ez az eljárás egy döntően statikus képet nyújt a kristályosított makromolekula szerkezetéről. Az esetek többségében ez a szerkezet egyfajta átlagos szerkezetet jelent, ami „körül” sokféle konformációs állapot lehetséges. Ez részben abból vált nyilvánvalóvá, hogy azonos, de különböző körülmények között kristályosított makromolekulák szerkezete kismértékben eltérhet. Rendkívül hasznosnak bizonyultak azok a vizsgálatok, amikor ugyannak a makromolekulának különböző természetes kölcsönható partnereivel alkotott komplexeit sikerült kristályosítani. Ezek a vizsgálatok is azt jelezték, hogy a makromolekulák többségének a működés során jellegzetesen megváltozhat a szerkeze (lásd még **17.1. fejezet**). A makromolekulák inherens konformációs szabadságát jól jelzik az oldatfázisú NMR vizsgálatok is, amelyek során gyakran fény derül arra, hogy **a makromolekulák** mindenféle kölcsönható partner nélkül is **különböző natív konformációk egyensúlyában létezhetnek**.

2.3. Az élő szervezetekben lejátszódó fő reakciótípusok

Részben valós kémiai mechanizmusok alapján, részben didaktikai, tehát az információ rendszerezését és hatékony átadását elősegítendő a biokémia művelői öt csoportra osztották az élő szervezetben eddig feltárt kémiai reakciókat. Ez nagyban megkönnyíti az egyes reakciók tárgyalását, és az abban szereplő enzimek funkcionális katalogizálását is. Az **öt típus**, melyeket példák segítségével mutatunk be, a következő: **oxidáció-redukció**; **C-C kötéshasadás illetve képződés**; **molekulán belüli átrendeződés (izomerizáció)**; **csoport transzfer molekulák között**; **kondenzáció vízkilépéssel**.

Megjegyzendő, hogy az enzimek osztályozása nagyrészt, de nem teljesen követi ezeket a reakciótípusokat. A kémia illetve a biokémia nemzetközi szervezetei (IUPAC: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

ill. IUBMB: *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) hat csoportra osztotta az élő szervezetben eddig feltárt enzimeket a biokémiai reakciótípusok alapján. Az enzimek az EC (*Enzyme Commission*) nevezéktan alapján történő csoportosítását (lásd **8.4. táblázat**), valamint enzimkatalízis típusait és mechanizmusait a **8. fejezet**ben tárgyaljuk részletesen, ebben a fejezetben a kémia reakciótípusok bemutatására szorítkozunk.

A különböző reakciótípusok tárgyalása előtt röviden át kell tekintenünk néhány alapvető fogalmat. Ilyen az **elektronegativitás** fogalma, amely segítségével jól jellemezhető, hogy egy kémiai kötés milyen természetű, ionos vagy kovalens, és ha kovalens, akkor apoláros vagy poláros-e.

Az elektronegativitás (X; görög betű, ejtsd:khí), a kötésben lévő atom elektronvonzó képességét jellemző paraméter. Ezt a fogalmat többen is kidolgozták. Robert S. Mulliken 1934-ben közzétett definíciója alapján $X = (E_I - E_A)/2$,

ahol E_I az ionizációs energia, vagyis a legkönnyebben leszakítható elektron eltávolításához szükséges energia, míg E_A az elektronaffinitás, vagyis a negatív töltésű ion képződésénél felszabaduló (negatív előjelű) vagy az ehhez elhasználódó (pozitív előjelű) energia. Ez a megközelítés rendkívül logikus, hiszen egy kötésben lévő atom esetében minél nagyobb energia árán szabadul meg az atom az első eltávolítható elektronjától, és minél szívesebben (minél nagyobb felszabaduló energia árán) fogad be egy extra elektront, annál nagyobb az atom elektronvonzó képessége. Mérési nehézségek miatt azonban inkább egy másik elektronegativitási skála terjedt el (lásd **2.2. táblázat**), amelyet Linus Pauling vezetett be szintén a harmincas években, tapasztalati, kötési energiákból meghatározott értékek alapján.

2.2. táblázat: Elektronegativitási értékek

Elem	Elektronegativitás	Elem	Elektronegativitás
F	4,0	Fe	1,8
O	3,5	Co	1,8
Cl	3,0	Ni	1,8
N	3,0	Mo	1,8
Br	2,8	Zn	1,6
S	2,5	Mn	1,5
C	2,5	Mg	1,2
I	2,5	Ca	1,0
Se	2,4	Li	1,0
P	2,1	Na	0,9
H	2,1	K	0,8
Cu	1,9		

A Pauling-skálán a nemesgázok elektronegativitási értéke a legalacsonyabb, zéró. Az alkáli fémeké 0,7-1,0 értékek közötti, a hidrogéné 2,1, a széné 2,5 a halogéneké pedig 2,2-4,0 ahol a 4,0 egyben a skála legmagasabb értéke. A Pauling-féle elektronegativitási skála remekül használható a kémiai kötések osztályozására.

Ha két atom elektronegativitási értékének a különbsége $\Delta X < 0{,}6$, akkor a közöttük kialakuló **kötés kovalens**, és **apoláros**, vagyis a két atom közel azonos mértékben „birtokolja" a közös elektronokat (lásd pl. H_2, O_2, Cl_2, CH_4).

Ha $0{,}6 < \Delta X < 2{,}1$, akkor a kötés egy **poláros kovalens kötés** (pl. HCl, H_2O, CCl_4), amelyben a két atom által közösen „birtokolt" elektronok nagyobb valószínűséggel tartózkodnak a nagyobb elektronegativitású atom közelében, mint a kisebb elektronegativitású közelében. Emiatt a nagyobb elektronegativitású atom részleges negatív, a kisebb elektronegativitású atom részleges pozitív töltést hordoz.

Amennyiben $\Delta X \geq 2{,}1$, úgy **a kémiai kötésionos**, tehát az elektron (vagy elektronok) teljes mértékben a nagyobb elektronegativitású atomhoz tartozik (illetve tartoznak), így az teljes negatív töltést (vagy töltéseket) nyer, tehát anion lesz. Ennek megfelelően a kisebb elektronegativitású atom teljes mértékben megválik az elektronjától, és teljes pozitív töltést hordoz. Jó példák erre a NaCl, HF, $MgCl_2$ amelyek ionos vegyületek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ezt a gondolatmenetet újra felvesszük a másodlagos kölcsönhatások tárgyalásánál is, de előbb a kémiai reakciótípusok ismertetésénél használjuk fel.

2.3.1. Oxidáció-redukció

Az oxidáció és a redukció egymástól elválaszthatatlan folyamatok, valójában egyetlen, elektronátmenettel járó folyamat két oldalát jelentik. Amikor egy atom, vagy molekula oxidálódik, vagyis elektronokat veszít, akkor a reakcióban résztvevő másik fél elektronokat nyer, vagyis redukálódik. E miatt az elválaszthatatlanság miatt ezeket a reakciókat **redoxreakciók**nak is nevezik. Nevével ellentétben egy ilyen reakcióban nem feltétlenül vesz részt oxigén, de az első ilyen reakciókat az oxigén, mint tipikus oxidálószer esetében írták le. A redoxreakciók megértésének előfeltétele az oxidációs fok, az **oxidációs szám** fogalmának ismerete. Ezeket a fogalmakat az előbb bevezetett elektronegativitás fogalmával lehet értelmezni.

Amint az elektronegativitás kapcsán az már szerepelt, ha a két atom elektronegativitási különbsége, $\Delta X \geq 2{,}1$, akkor a nagyobb elektronegativitású atom teljes mértékben átveszi az elektront a kisebb elektronegativitásútól, lásd pl. a NaCl képződés esetét. Ebből, és a fenti leírásból látható, hogy a nátrium reakciója klórral egy redoxreakció, amelyben a nátrium oxidálódik, míg a klór redukálódik. Ezt látványosan jelzi a nátriumatom által teljes mértékben elvesztett, illetve a klóratom által teljes mértékben átvett elektron.

A biokémia területén ritka az ilyen, teljes mértékű, ionokhoz vezető elektronátadás, hiszen a szerves vegyületeket alkotó elemek között nincs ekkora elektronegativitási különbség. Amikor az elektronegativitási különbség kisebb, akkor a redoxreakció eredményeként a nagyobb elektronegativitású atom részben vonja csak el az elektront a kisebb elektronegativitású atomtól, részleges töltéseket generáló, polarizált kovalens kötés lesz a végeredmény.

Definíció szerint, és az alábbi leírásból is következően az elemi állapotú anyagokban (pl. He; H_2, O_2, elemi szén) az atomok oxidációs száma 0. Az oxidációszám kiszámolásakor a kémiai kötésben lévő atomok elektronegativitási adataiból páronként megállapítjuk, hogy a vizsgált atom jobban, vagy kevésbé birtokolja-e az elektront, mint a vele kötésben lévő másik atom.

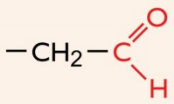
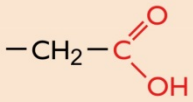
A többféle atomból álló vegyületekben az oxidációs szám kiszámítási módja független attól, hogy ionos kötés van-e a két atom között, vagy polarizált kovalens kötés. Amelyik atomhoz inkább tartozik az elektron, annak gondolatban teljesen átadjuk az elektront, így annak oxidációs száma eggyel csökken (negatív irányba változik). Ezzel összhangban, amelyik atomhoz kevésbé tartozik az elektron, attól gondolatban teljesen elvonjuk azt, így annak az atomnak az oxidációs száma eggyel nő (pozitív irányba változik). Végeredményképpen az oxidációs szám minden atom esetében egész szám lesz. A teljes molekulát tekintve az azt alkotó atomok oxidációs számának összege nulla lesz, amennyiben a molekula nem rendelkezik eredő töltéssel. Ha rendelkezik eredő töltéssel (molekula-ion), akkor az összeg megegyezik a töltéssel.

A biokémiában leggyakrabban a szerves, széntartalmú vegyületek oxidációival találkozunk. Ezzel kapcsolatban érdemes megvizsgálni a szénatom lehetséges oxidációs állapotait, amit az oxidációs számmal jellemezhetünk.

A csak szénből és hidrogénből felépülő **alkánok** esetében az **oxidációs szám -4 és 0 közötti egész szám** lehet (lásd **2.3. táblázat**).

2.3. táblázat: A szénatom oxidációs száma különböző vegyülettípusokban

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

	Vegyület típusa	A szénatom oxidációs száma
$-CH_2-CH_3$	alkánok	-4-től (CH_4) 0-ig (csak C-C kötés)
$-CH_2-CH_2OH$	alkoholok	-1
	aldehidek	+1
	karbonsavak	+3
$O=C=O$	széndioxid	+4

A metánban a szénatom négy hidrogénatommal van kovalens kötésben. Mivel a szén nagyobb elektronegativitású, mint a hidrogén, mind a 4 hidrogénatom elektronját a szénatomhoz rendeljük, így a szénatom oxidációs száma -4 lesz. Ha egy elágazó szénláncú alkánban egy olyan szénatomot vizsgálunk, amely 4 másik szénatommal van kovalens kötésben, akkor ennek a központi szénatomnak az oxidációs száma 0 lesz. Azoknál a szénatomoknál, amelyek mind hidrogénatommal, mind szénatommal is kötésben vannak, az oxidációs szám -4 és 0 közötti egész szám lesz, minden hidrogénnel kialakított kapcsolat eggyel csökkenti az oxidációs számot.

Azokban a vegyületekben, amelyekben a szén oxigénnel is kovalens kötésben van, ott az elektront az oxigénhez rendeljük. Egyszerű számítás alapján látható, hogy az alkoholokban a szén oxidációs száma -1, aldehidekben +1, karbonsavakban +3, míg legoxidáltabb állapotában, a széndioxidban +4.

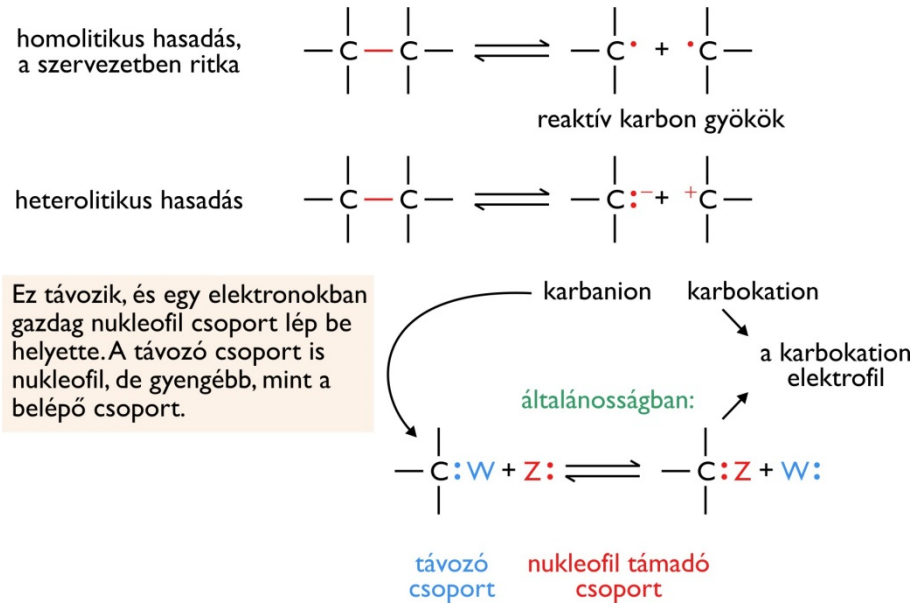
Amikor egy szerves vegyület oxidálódik, akkor abban a szén oxidációs száma növekszik, míg a reakcióban résztvevő másik vegyületben valamely atom oxidációs száma csökken. Mint említettük, az oxidációban nem feltétlenül vesz részt oxigén.

Jó példa erre a tejsav és a piroszőlősav között lezajló reverzibilis redoxreakció (piruvát + NADH + H^+ « laktát + NAD^+). Amikor (egy enzim katalizálta folyamatban) a tejsav oxidálódik, a reakcióban résztvevő szénatom 2 elektront veszít, így az oxidációs száma 2 egységgel megnő. A reakcióban nem oxigén, hanem a NAD koenzim az elektronakceptor. A reakció során a redukálódó koenzimben 2 szénatomnak 1-1 egységgel csökken az oxidációs száma. Látható, hogy a reakció során nem csak elektronok, de protonok is átadódnak a tejsav molekuláról, vagyis a molekula végső soron két hidrogént veszít. (A NAD koenzim szerepéről a **20.10. fejezet**ben lesz szó).

2.3.2. Szén-szén kötés hasadása nukleofil szubsztitúcióval

A második reakciótípus a szén-szén kötés hasadás. Ez általánosságban kétféleképpen történhet meg. Az egyik esetben mindkét szénatom megtart 1-1 elektront. Ez a homolitikus szén-szén kötés felhasadás, amely reaktív gyökök képződéséhez vezet, és az élő szervezetben ritka (lásd **2.13. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.13. ábra: A szén-szén kötés hasadás két fő típusa és a nukleofil helyettesítés

A heterolítikus kötéshasadás során az egyik szén örökli mindkét elektront, így karbanionná válik, míg a másik szén elveszti az elektron és karbokation keletkezik belőle. Ennek a folyamatnak a leírására szolgál a nukleofil helyettesítés, más néven a **nukleofil szubsztitúció** (lásd **2.13. ábra)**.

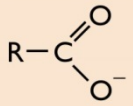
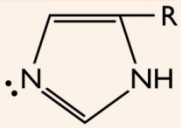
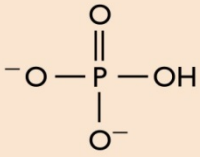
Ennek nevezéktana szerint a karbanion távozik, (tehát ez a távozó csoport) és egy elektronokban gazdag, nukleofil csoport lép be helyette. Fontos azonban megjegyezni, hogy a nukleofil szubsztitúció, mint kémiai reakció típus, túlmutat a szén-szén kötés felhasadásán. Egy rendkívül gyakori molekuláris mechanizmust jelent az élő szervezetben, amely számos egyéb, a biokémiai csoportosításban más címszó alatt (lásd csoporttranszfer) szereplő kémiai reakcióban megjelenik.

Fontos észrevennünk, hogy a távozó és a belépő csoport egymáshoz hasonít abban, hogy mindkettő elektronokban gazdag, így mindkettő lehet belépő csoport egy nukleofil szubsztitúciós reakcióban. A spontán végbemenő nukleofil szubsztitúciós folyamatokban mégis azt látjuk, hogy az egyik ilyen csoport távozik, míg a másik belép. Ez alapján nyilvánvaló, hogy a belépő csoport erősebb nukleofil, mint az, amelyik távozott, illetve fordított szemszögből nézve a belépő csoport rosszabb távozó csoport annál, mint amit lecserélt, hiszen máskülönben a reakció fordítva ment volna végbe.

A nukleofil csoportok között tehát páronkénti összehasonlítás alapján egyfajta rangsor állítható fel (lásd **2.4. táblázat**). Az érem két oldalaként egy csoport minél jobb nukleofil, annál rosszabb távozó csoport, és fordítva. A rangsor hátterében termodinamikai törvényszerűség áll. Mint később látni fogjuk, egy folyamat akkor játszódik le spontán, ha annak eredményeképpen a rendszer szabadentalpiája csökken. Amennyiben egy folyamat spontán lejátszódik, úgy annak fordítottja nem játszódik le magától. Valójában ezt fejezi ki az említett rangsor. Ha az egyik csoport képes lecserélni a másikat, akkor (azonos koncentrációk esetén) a fordított reakció nem történhet meg.

2.4. táblázat: Nukleofil csoportok csökkenő támadócsoport hatékonyság szerint rendezve

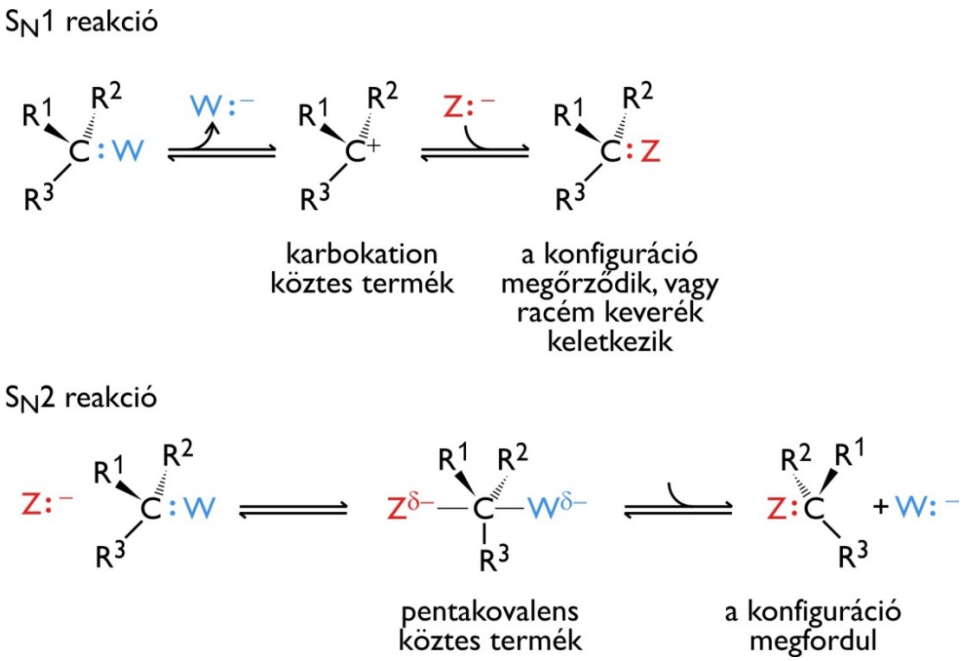
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Néhány nukleofilként működő funkcionális csoport ill. molekula	
hidroxid ion	
víz	
hidroxil (alkoholos)	
alkoxil	
szulfhidril	RSH
szulfid	
amino	
karboxilát anion	
imidazol	
anorganikus ortofoszfát ion	

A nukleofil helyettesítés a reakció pontosabb mechanizmusa alapján kétféleképpen mehet végbe. Az első, **S_N1 reakció** első lépésben kilép a távozó csoport, és csak ezt követően lép be az azt helyettesítő belépő csoport. A heterolitikus hasadás ennél a csoportnál egyértelműen tetten érhető, hiszen köztes állapotként karbokation keletkezik.

A biokémia tárgykörében sokkal gyakoribb az **S_N2 reakciótípus** (lásd **2.14. ábra**). Ennél a belépő csoport egyfajta támadócsoportként szerepel. Elektron-gazdag csoportjával nukleofil támadást végez a hasadó kötés egyik, elektronban szegény szénatomja ellen. Ennek eredményeként kialakul egy **pentakovalens átmeneti állapot**, amelyben a megtámadott szénatom öt funkciós csoporttal van kötésben. Ez az átmeneti állapot hasad fel úgy, hogy a nukleofil támadó csoport marad kötésben, míg a gyengébb nukleofil csoport távozik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.14. ábra: A nukleofil szubsztitúció két típusa

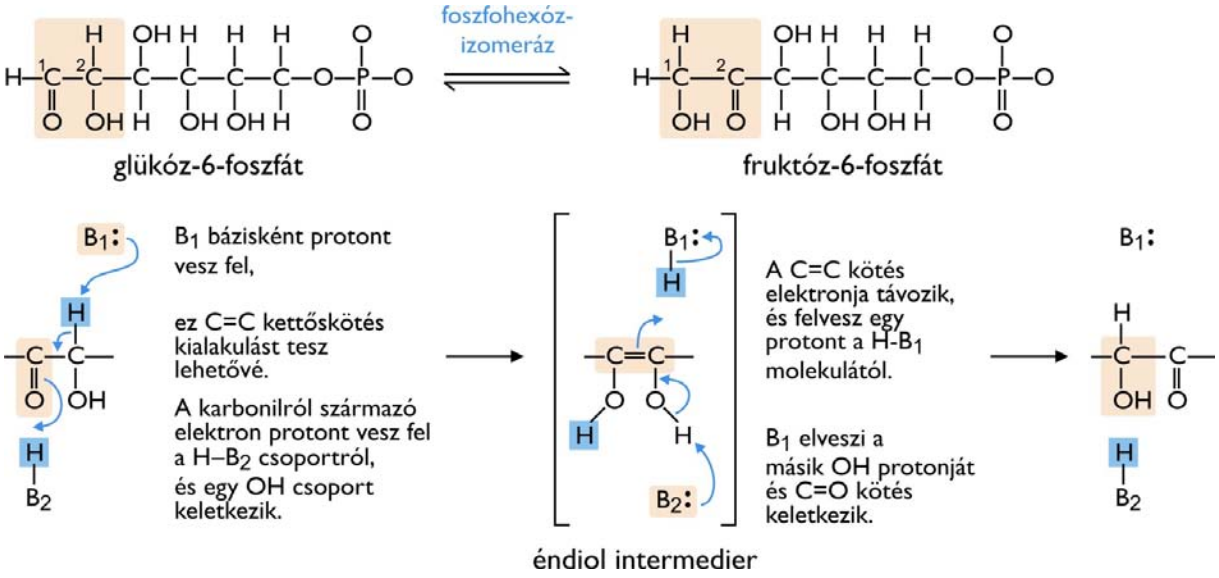
Érdemes megjegyezni, hogy amennyiben a reakcióban kiemelt szereppel bíró szénatom egy királis centrum, tehát 4 eltérő funkciós csoport veszi körül, akkor a kétféle nukleofil szubsztitúciós reakciótípus eltérő végeredményre vezet. Amennyiben a reakció S_N1 típusú, úgy a második lépésben belépő csoport vagy kizárólag ugyanarról az oldalról léphet be, mint amely oldalon a távozó csoport kilépett, és ekkor a konfiguráció megőrződik, vagy mindkét oldalról beléphet, és ekkor racém elegy keletkezik. Amennyiben azonban a reakció S_N2 típusú, úgy a belépő csoport csak ellentétes oldalról érkezhet, mint amerre a távozó csoport kilép, így a konfiguráció megfordul.

2.3.3. Molekulán belüli csoportátrendeződés

A biokémiai reakciótípusok következő típusát azok a kémiai reakciók jelentik, amelyek során az átalakulás egyetlen molekulán belül történik. Ezeknek a reakcióknak a végeredménye tipikusan az, hogy két funkciós csoport egymással mintegy helyet cserél. Bár a végeredmény valóban ezt sugallja, mint látni fogjuk, a reakció ettől eltérő úton zajlik. A reakció során valójában **protonok és elektronok rendezett újraelosztása** megy végbe a **molekulán belül**. Tipikus **példa** erre a glikolízis második lépése, amelyben **glükóz-6-foszfátból fruktóz-6-foszfát keletkezik** (lásd **2.15. ábra)**.

A reverzibilis reakció során a glükóz-6-foszfátot kiindulási anyagként tekintve egy aldózból ketóz keletkezik, így a folyamat végére a karbonilcsoport és az alkoholos (H-C-OH) részletek mintegy helyet cserélnek. A folyamat a valóságban általános sav-bázis katalízissel, egy ettől teljesen eltérő útvonalon zajlik a foszfohexóz-izomeráz enzim közreműködésével. Egy ehhez hasonló enzimatikus folyamat részleteit később az enzimműködés mechanizmusok között részletesebben is tárgyaljuk (lásd **8.5.2. fejezet**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.15. ábra: A csoportátrendeződés bemutatása a glükóz-6-foszfát fruktóz-6-foszfáttá alakulásának példáján

A folyamat első lépésében az enzim aktívcentrumában egy bázis protont von el a szénhez kapcsolódó hidrogéntől (lásd **2.5.5. fejezet**). Ettől a szénen megjelenik egy extra elektron, ami lehetővé teszi, hogy a két egymáshoz kapcsolódó szénatom között kettőskötés alakuljon ki. A kettőskötés kialakulása ugyanakkor azzal járna, hogy a karbonilcsoport oxigénje egyszeres kötéssel kapcsolódjon a szénatomhoz, és negatív töltést hordozzon. Ez egy magas energiájú állapot lenne, ami elkerülhető azáltal, hogy egy savként funkcionáló enzimcsoport protonálja ezt az oxigént. Így egy éndiol köztes állapot alakul ki, amelyben a kettőskötéssel egymáshoz kapcsolódó mindkét szénatom hidroxilcsoportot is hordoz.

Ebből az állapotból a reakció az alábbiak szerint zajlik tovább. A korábban bázisként protont felvett csoport immár savként protont ad le a kettőskötésnek, miközben a korábban savként protont leadó, immár bázisként funkcionáló másik csoport protont vesz fel attól a hidroxilcsoporttól, amelyik a reakció elején is hidroxil állapotban volt. Ennek eredményeként az éndiol úgy alakul át, hogy az a szénatom, ami korábban karbonilcsoport része volt, most egy hidrogént és egy hidroxilt hordoz, míg az, amelyik ez utóbbiakat hordozta, karbonilcsoportba kerül. Eközben a folyamatot savként illetve bázisként szimultán katalizáló két csoport eredeti állapotába kerül.

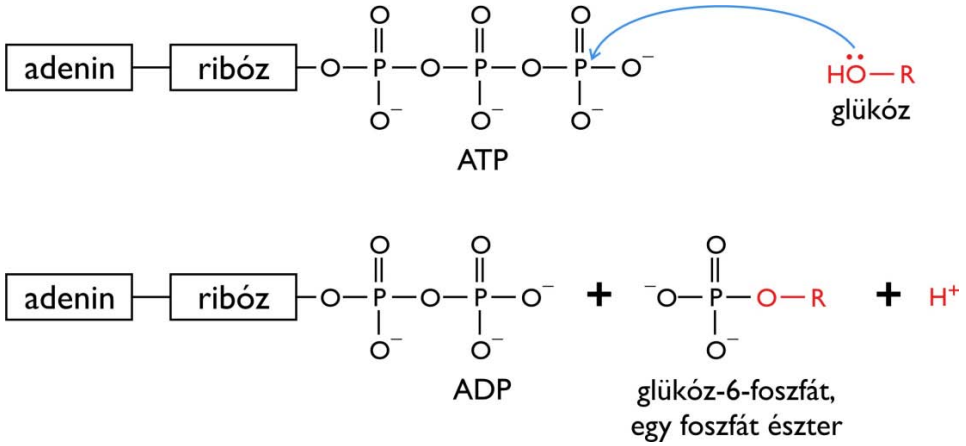
2.3.4. Csoporttranszfer reakciók

A biokémia által vizsgált folyamatok nagy hányadában két molekula reagál egymással úgy, hogy az egyikről egy funkciós csoport átkerül a másikra. A folyamat **leggyakrabban nukleofil szubsztitúcióval zajlik**. (Itt látható, hogy a nukleofil szubsztitúció, mint kémiai reakciótípus több különböző biokémiai reakciótípusnál is megjelenik).

A csoporttranszfer egyik tanulságos **példája a glikolízis első lépése**, melynek során (a **hexokináz** enzim által katalizált folyamatban) **ATP-ből foszforilcsoport kerül át glükózra**. Ahogy azt a

2.16. ábra jelzi, a glükóz 6. szénatomján lévő hidroxilcsoport végez nukleofil támadást az ATP gamma-foszfátcsoportjában lévő foszfor atomon. A nukleofil szubsztitúcióra vonatkozó tárgyalás szerint a támadó csoport itt egy hidroxil, míg a távozó csoport tulajdonképpen az ADP molekula. A foszforilcsoport átvitelével a glükózból glükóz-6-foszfát keletkezik. A glükózra került foszforilcsoport és az eredetileg is az ott lévő oxigén együttesen foszfátcsoportot képez. A glükózon eredetileg szereplő hidroxil rossz, a reakció során keletkezett foszfát azonban jó távozó csoport. Ennek a glikolízis egy későbbi lépésében fontos szerepe lesz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



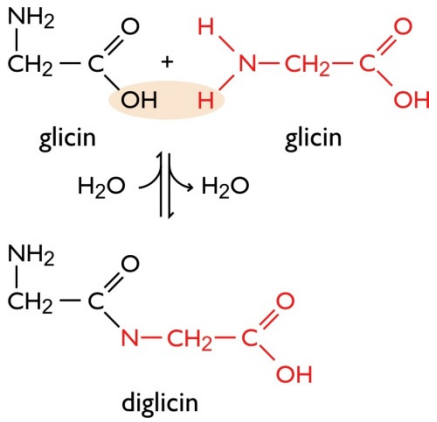
2.16. ábra: A csoporttranszfer reakció bemutatása a glükóz-6-foszfát keletkezésének példáján keresztül

Érdemes megjegyezni, hogy a glükóz-6-foszfát nem keletkezhet glükóz és szervetlen foszfát reakciójából. Egy ilyen folyamatban ugyanis a glükóz jó nukleofil támadó, tehát rossz távozó hidroxilcsoportját kéne lecserélni egy, a hidroxilnál jóval gyengébb nukleofil támadó (és emiatt sokkal jobb távozó) foszfát csoporttal. Ugyanezt általánosabb termodinamikai értelmezésben megfogalmazva glükóz-6-foszfát azért nem keletkezhet ezen az úton, mert egy ilyen folyamat növelné a rendszer szabadentalpiáját. Amikor azonban a glükóz-6-foszfát ATP részvételével keletkezik, a folyamat már spontán végbemegy, ugyanis az ATP ADP-vé történő átalakulása nagyobb szabadentalpia csökkenést okoz, mint amilyen szabadentalpia növekedéssel az jár, hogy a glükózból glükóz-6-foszfát keletkezik (további részletek erről az ún. kapcsolt reakciók leírásánál olvashatók a **3.4.6. fejezet**ben).

2.3.5. Kondenzációs reakciók vízkilépéssel

A biokémiai reakciótípusok utolsó csoportját azok a reakciók alkotják, melynek során két molekula összekapcsolódik, miközben egy vízmolekula szabadul fel. Ezt a reakciótípust röviden **kondenzációs reakció**nak nevezik.

Ez egy rendkívül fontos reakciótípus, ugyanis **az élő szervezetet felépítő makromolekulák**, poliszacharidok, nukleinsavak és fehérjék – legalábbis formálisan – **mind így keletkeznek**. A **2.17. ábra** szereplő példa azt mutatja be, hogy egy dipeptid két aminosavból történő létrejötte formálisan egy vízkilépéssel, kondenzációval valósulhat meg.



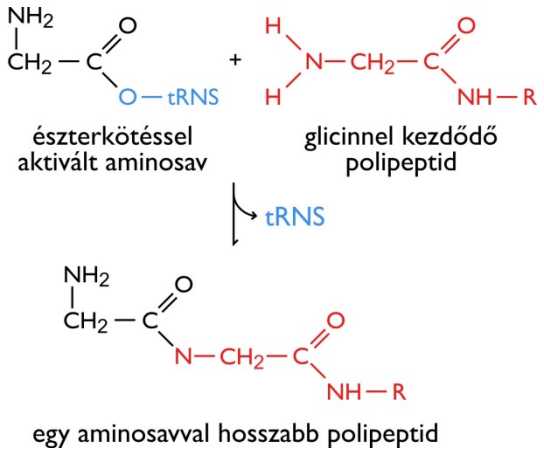
2.17. ábra: Egy dipeptid kialakulása formálisan kondenzációs reakcióval írható le

Nagyon fontos azonban megértenünk, hogy ez a reakció ebben a felírásban nem valósulhat meg. Vegyük észre, hogy a kondenzáció is egy nukleofil szubsztitúció lenne, amelyben egy amin lenne a támadócsoport, és egy annál jóval erősebb támadócsoport, a hidroxil (amely részt venne a vízmolekula kialakításában) lenne a távozó csoport (lásd a nukleofil csoportok **2.4. táblázat**át).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A korábban elmondottak szerint ez termodinamikailag kedvezőtlen lenne, növelné a rendszer szabadentalpiáját. Ez egyben azt is jelenti, hogy éppenséggel **a kondenzációs reakcióval ellentétes folyamat, a hidrolízis játszódhat le spontán**, amelyben a dipeptid vízzel reagálva két aminosavra bomlik. Ez utóbbi folyamat az erős nukleofil víz a támadócsoport, és a gyengébb nukleofil amin a távozó csoport.

A csoporttranszfer reakcióban bemutatott esethez hasonlóan itt is az a megoldás, hogy a kondenzáció valójában egy másik úton zajlik úgy, hogy a reakció során egy másik, nagy szabadentalpia csökkenéssel járó molekuláris átalakulás is végbemegy (lásd **2.18. ábra**).



2.18. ábra: A valóságban a peptidkötés kialakulása aktivált aminosav egységeket igényel

A szervezetben az aminosavak aktiválásra kerülnek ahhoz, hogy összeépülhessenek. Összeépülésükkor nem szabad aminosav állapotban vannak, hanem egy tRNS molekulához vannak kapcsolva kovalensen, észterkötéssel. (Amint azt később, a transzláció fejezetében látni fogjuk, az aminoacil-tRNS molekulák ATP segítségével jönnek létre; lásd **16.2. fejezet**). Az észterkötés elbomlása szabadentalpia csökkenést okoz. A reakciót megvizsgálva továbbra is azt látjuk, hogy egy amin végez nukleofil támadást egy karbonil szénatomon, de a kilépő csoport nem egy hidroxil, hanem egy tRNS molekula. Ez a reakció egy újabb példája annak, hogyan lehet egy energiaigényes szintetikus folyamatot végső soron ATP-ben rejlő kémiai energia segítségével végrehajtani.

2.4. A másodlagos kölcsönhatások (kötések).

2.4.1. A másodlagos kölcsönhatásokról általánosságban

Az előző fejezetekben elsősorban az atomok között, közös elektronpáron keresztül kialakuló, molekulákat létrehozó elsődleges, kovalens kölcsönhatásokkal, és ezek átalakulásaival foglalkoztunk. Általánosságban kijelenthető, hogy a **kovalens kötés**ek „erősek”. Az ezeknek a kötéseknek a felbontásához szükséges kötési energia értékek a **300-700 kJ/mol** tartományba esnek. Ezt az értéket érdemes összevetnünk a hőmozgásban megtestesülő, az adott rendszerben lévő részecskék egy móljára jutó átlagos mozgási energia. Ez 37ºC-on (= 310 K) az $E = nRT$ összefüggés alapján, egy mólra vonatkoztatva ~2,5 kJ/mol értékű. Ennek tükrében érthető, hogy pusztán a molekulák nyüzsgése, egymással való ütközése nem elegendő ezeknek a kötéseknek a felbontásához. Ez egyben azt is jelenti, hogy – hacsak a rendszerben lévő molekulák kémiai reakció révén nem alakulhatnak át alacsonyabb energiaszintű vegyületekké –, akkor a kovalens kötések, és ezen keresztül a molekulák stabilnak tekinthetőek.

A kovalens kölcsönhatáson kívül azonban van egy sereg rendkívül fontos másfajta kölcsönhatás is, amelyek gyűjtőneve: **nem-kovalens kölcsönhatások**. A nevükből fakadóan ezek a kölcsönhatások nem eredményeznek molekulákat. A nem-kovalens kölcsönhatások, vagy más elnevezéssel „másodlagos kötőerők” ionok és molekulák (beleértve a nemesgázok egyatomos molekuláit is) között jönnek létre. Ezek a kölcsönhatások sokkal gyengébbek, mint a kovalens kötések, de a jelentőségüket már az is jelzi, hogy ezeknek a kölcsönhatásoknak az eredményeként létezik folyadék és szilárd fázis.

A nem-kovalens kölcsönhatások felfedezése van der Waals (1873) nevéhez fűződik, aki azt vizsgálta, hogy a valóságban létező, reális gázok viselkedése miért nem írható le tökéletesen az ideális gázokra vonatkozó

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

gáztörvényekkel. Az ideális gázokra vonatkozó gáztörvények statisztikai fizikai leírása hatalmas intellektuális teljesítmény volt. A leírás azon alapult, hogy a gázt alkotó részecskék egymással tökéletesen rugalmasan ütköznek, egyéb, például vonzó kölcsönhatás nincs közöttük. Amennyiben ez a valódi gázok esetében is így lenne, úgy a gázokat nem lehetne hűtéssel, vagy nagy nyomás alkalmazásával folyadékfázisba vinni.

Márpedig a valóságban minden molekula, így a gázt alkotó molekulák között is vannak vonzó kölcsönhatások, csak a gázok esetében ezek kisebb energiájúak, mint az adott hőmérsékletre jellemző, a hőmozgásban megtestesülő átlagos kinetikai energia. Emiatt a hőmozgás „leküzdi” ezeket a kölcsönhatásokat. Hűtés, tehát a hőmozgásban rejlő energia csökkentése révén ezek a kölcsönhatások látványossá válnak, hiszen a molekulák egymás közelében maradnak, kialakul a folyadékfázis.

Az **élő rendszerekben** a másodlagos kölcsönhatások tipikus kötési energia tartománya **~ 0,5-40 kJ/mol**. Ez a tartomány átfed a hőmozgásban rejlő energiaértékkel. A hőmozgás energiájánál alacsonyabb értékű vonzó kölcsönhatás is elegendő már ahhoz, hogy általa az egymást vonzó molekulák az idejük egy kis hányadában összekapcsolódjanak egymással. Minél nagyobb mértékben haladja meg a köztük lévő kölcsönhatás energiája értéke a hőmozgásban rejlő energiáét, annál hosszabb ideig tart ez az összekapcsolódott állapot. A lényeg, hogy a másodlagos kölcsönhatások eredményeként a molekulák dinamikus asszociációra képesek, a kisenergiájú kölcsönhatások rövidéletű, a nagyobb energiájúak hosszabb életidejű (stabilabb) komplexeket eredményeznek. Mint látni fogjuk, **minden nem-kovalens kölcsönhatás** végső soron **elektrosztatikus jellegű**, és a Coulomb-törvény alapján értelmezhető.

2.4.2. A másodlagos kölcsönhatások típusai

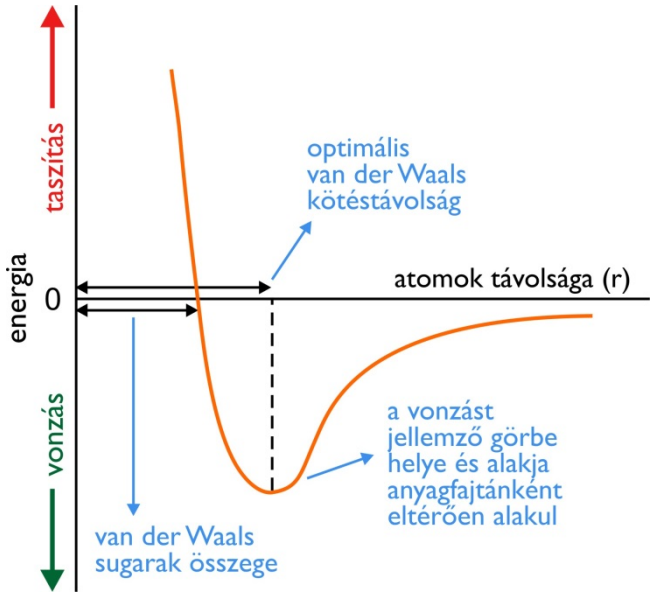
2.4.2.1. Rövidtávú taszítás

A másodlagos kölcsönhatási típusok közül érdemes külön kezelni a minden molekula illetve ion (beleértve az ellentétes töltésű ionokat is) között létrejövő **rövidtávú taszítás**t.

Amikor bármilyen két molekula vagy ion között a távolság csökken, egy bizonyos határon belül taszítás lép fel. Ennek energia-távolság függvénye rendkívül meredek, a taszítás mértéke a távolság (r) függvényében $1/r^{12}$ szerint változik. Ez azt jelenti, hogy minden egyes távolság-felezéshez az előző felezéshez szükséges energia mintegy 4000-szeresét kell befektetni (lásd **2.19. ábra**).

Ennek az az eredménye, hogy az ionok és molekulák gyakorlatilag felszínnel rendelkező merev testekként viselkednek, egymással „ütköznek”, és nem nyomhatók össze határtalanul. Amint arról már a bevezetőben is esett szó, a van der Waals sugár adja meg azt a jellemző távolságot, amin belül egy atomot, iont, vagy molekulát egy másik részecske nem közelíthet meg jobban (kivéve, ha kovalens kötés jön létre). A van der Waals sugárból következik, hogy az atomoknak, ionoknak, molekuláknak is van praktikus értelemben vett felszínük, a **van der Waals felszín**. A részecskék van der Waals sugarainak összege adja meg azt a legkisebb távolságot, amelyre két részecske egymást megközelítheti.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.19. ábra: A másodlagos kölcsönhatások energiájának távolságfüggése

Ennél a távolságnál nagyobb távolságok esetén bármely két részecske között vonzó kölcsönhatás alakul ki! Ez a (negatív előjelű energiával) számszerűsített vonzó kölcsönhatás minden esetben elektrosztatikus eredetű. A két ellentétes töltésű ion triviális esetét leszámítva ez azzal kapcsolatos, hogy a részecskék elektronfelhője soha nem tökéletesen egyenletesen van elosztva. Két egyenetlenül elosztott elektronfelhővel bíró részecske vonzani tudja egymást, hiszen mindkettőben kialakul egy pozitívabb és egy negatívabb oldal, amelyek egymás felé fordulva elektrosztatikus vonzást fejtenek ki egymásra.

Ennek a vonzó kölcsönhatásnak is van egy távolságfüggése. Ha a két részecske „végtelen” messze van egymástól, akkor a vonzás energiája nullához közelítően alacsony negatív értékű. A távolság csökkenésével egy bizonyos határig egyre erősebb lesz ez a vonzás. A vonzás mértéke azonban a távolság csökkenésével nem nő korlátlanul, egy adott távolságnál eléri a lehető legnagyobb (energiában kifejezve lehető legnagyobb negatív) értékét, ami a távolság további csökkentésével már egyre kisebb lesz. Ennek oka a fent tárgyalt rövidtávú taszítás.

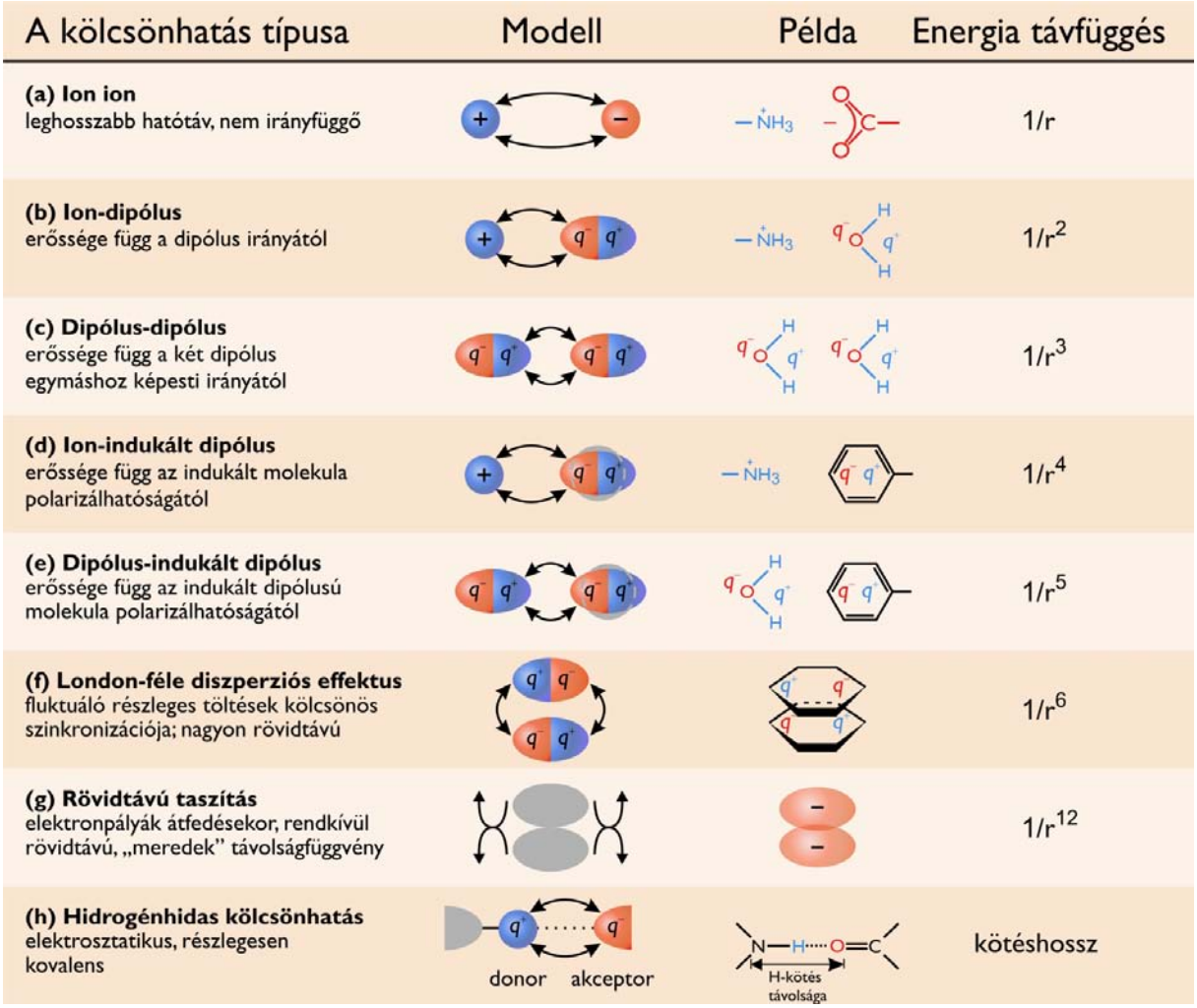
A **másodlagos kölcsönhatásnak tehát van egy távolság optimuma**, amelynél a kölcsönhatás a legerősebb. Ennél kisebb távolság esetén a vonzás csökken, majd átcsap taszításba, míg nagyobb távolság esetén a résztvevő részecskékre jellemző mértékben csökken a távolság függvényében.

Fontos megértenünk, hogy attól függően, hogy konkrétan milyen részecskék közötti kölcsönhatásról van szó, más és más lesz az optimális kölcsönhatási távolság, a kölcsönhatási energia értéke ebben a távolságban, valamint a kölcsönhatási energia függése a távolság növelésétől.

Az egyes vonzó másodlagos kölcsönhatásokat ennek megfelelően érdemes típusokba sorolni (lásd **2.20. ábra**).

A biokémiai tárgykörében azokat a másodlagos kölcsönhatásokat nevezik **van der Waals kölcsönhatások**nak, amelyekben **nem szerepel teljes értékű ion**. Az alábbiakban a kölcsönhatási típusokat az egyre csökkenő kötési energia, és egyre növekvő távolságfüggés sorrendjében soroljuk fel. Emiatt a van der Waals és az ionokat is feltételező kölcsönhatások az alábbi felsorolásban keverednek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.20. ábra: A másodlagos kölcsönhatások típusai, és az egyes típusok energiájának távolságfüggése

2.4.2.2. Ion-ion kölcsönhatás

A pontszerű töltések elektrosztatikus kölcsönhatási energiáját a **Coulomb-törvény** írja le az alábbiak szerint:

$$E = k \times \frac{q_1 \times q_2}{D \times r}$$

2.1. egyenlet

E a kölcsönhatási energia, k egy arányossági tényező, q_1, q_2: a két töltés (azonos töltéseknél E pozitív, taszítás, ellentéteseknél E negatív, vonzás), míg D: a közeg dielektromos állandója (árnyékolási képessége). A dielektromos állandó vákuumban D = 1,0, míg vízben D = kb. 80 (!).

Vegyük észre, hogy a számunkra legközönségesebbnek tűnő, az élet számára nélkülözhetetlen közegnek, a víznek milyen hatalmas elektrosztatikus árnyékoló képessége van. A víz a vákuumra jellemző kölcsönhatáshoz képest nyolcvanad részére csökkenti a vonzás mértékét!

A teljes értékű töltéseket hordozó részecskék, más néven ionok között kialakuló vonzó kölcsönhatás az **ion-ion kölcsönhatás**, amelynek a szakirodalomban kényelmi okokból gyakran használt, bár pongyola elnevezése „**sóhíd**", vagy „**sókötés**".

Ennek a kölcsönhatásnak a leghétköznapibb példája a NaCl kristály, vagyis a konyhasó. A jól ismert konyhasó egy szilárd anyag, amelyben a nátriumionok és kloridionok szabályos rendben helyezkednek el, a közöttük lévő

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

kötési energia tetemes mértékű, amit jól jellemez, hogy a konyhasó mintegy 800ºC-on olvad meg. Mégis, mint köztudott, a NaCl remekül oldódik vízben, ahol ez az amúgy rendkívül stabil kristályszerkezet könnyedén felbomlik. Ez a példa jól mutatja, hogy a víz rendkívül magas dielektromos állandója milyen nagymértékben csökkenti az elektrosztatikus kölcsönhatások energiáját.

Számos funkciós csoport hordoz teljes töltést. Semleges kémhatáson az aminosavak karboxilcsoportja egyszeres negatív, míg aminocsoportjuk egyszeres pozitív töltést hordoz. Az argininban is megtalálható guanidino-csoport széles pH tartományban hordoz egyszeres pozitív töltést. A DNS cukorfoszfát gerincében minden egyes monomerre egy negatív töltés jut a foszfátcsoport miatt. Az egymással komplementer két szál emiatt taszítja egymást. Ezt a taszítást a foszfátcsoportokhoz ionos kötéssel kapcsolódó magnéziumionok csökkentik.

Szintén tipikus példa az eukarióta DNS nukleoszómás szerkezetének kialakulása. Ennek során a DNS hiszton fehérjékből álló komplex köré tekeredik. A hiszton fehérjék nagy százalékban (~25%) tartalmaznak pozitív töltésű aminosavakat, amelyek ionos kölcsönhatásba kerülnek a DNS cukorfoszfát gerincében lévő negatív töltésekkel. Ezek az ionos kölcsönhatások meghatározó szerepet játszanak a nukleoszómás szerkezet kialakításában.

Mint az a Coulomb egyenletből látható, az **ion-ion kölcsönhatás** energia **1/r** szerint függ a távolságtól. Más szóval, ha egy adott távolságnál a kötési energia értéke *X*, akkor kétszeres távolságnál az energia értéke *X*/2. Ez viszonylag „enyhe” **távolságfüggés**t jelent, az ion-ion kölcsönhatás a másodlagos kölcsönhatások közül a legnagyobb hatótávú. Ez praktikusan azt jelenti, hogy saját méretükhöz képest a molekula-ionok már nagy távolságból képesek vonzani egymást.

A kölcsönhatás kötési energiája, mint említettük, erősen függ a közeg dielektromos állandójától. **Vizes oldatban sokkal gyengébb, mint apoláros közegekben**. A tipikus kötési energia tartomány vízben **~ 5-20 kJ/mol**. Az ion-ion kölcsönhatás olyan értelemben **nem irányfüggő**, hogy a részecske (ion) bármely irányban egyformán hat kölcsön a környezetével.

A Coulomb-törvény gyakorlati alkalmazásával kapcsolatban számos probléma merül fel. Az egyik az, hogy nagypontossággal csak pontszerű töltésekre alkalmazható. Atomok, atomcsoportok esetében a számolt energia csak ezek méreténél jóval nagyobb távolságok esetén pontos, az atomok mérettartományába eső rövid távolságok esetén már nem. A másik probléma az, hogy az egyenletben szereplő dielektromos állandó szigorúan csak absztrakt, tökéletesen homogén közegre vonatkoztatható. Amikor atomi felbontású leírást szeretnénk alkalmazni, már figyelembe kell venni, hogy a helyi környezet soha nem homogén.

2.4.2.3. Ion-dipólus kölcsönhatás

Az ion-dipólus kölcsönhatás megértéséhez először tisztáznunk kell a dipólus fogalmát. Amint azt az elektronegativitás fogalmának bevezetése során tárgyaltuk, ha két atom elektronegativitása közötti különbség, ΔX értéke nagyobb, mint 0,6 de kisebb, mint 2,1, akkor a közöttük kialakuló kovalens kötés poláros. A kötésben lévő elektronok ilyenkor az idő nagy részében közelebb vannak a nagyobb elektronegativitású atomhoz. Emiatt a nagyobb elektronegativitású atom részlegesen negatív, a kisebb elektronegativitású pedig részlegesen pozitív töltésű lesz.

Ha a molekulát alkotó atomok közötti kovalens kötések polárosak és a molekula nem-szimmetrikus szerkezetű, akkor a pozitív és negatív töltések súlypontja nem esik egybe. A molekula tehát állandó jellegű töltéskülönbséggel bír, vagyis poláros lesz. Jó példa erre a (gázhalmazállapotú) hidrogénklorid (HCl), vagy a víz (H_2O).

Az állandó töltéskülönbség, más néven dipólus kifejezhető a molekula két eltérő pontján elhelyezkedő negatív, illetve pozitív előjelű, pontszerű, az egységnyinél kisebb, tehát parciális töltéssel. Ennek alapján a töltéskülönbség már számszerűsíthető a **dipólusmomentum** (μ) fogalmán keresztül.

$$\mu = qr$$ **2.2. egyenlet**

A q a szeparált töltés mértéke, míg r a pozitív töltésből a negatív töltésbe mutató vektor, amelynek hossza a szeparált töltések távolsága. A dipólusmomentum tehát egy skalármennyiség és egy vektor szorzata, azaz maga is vektor. A fentiek szerint látható, hogy egy molekulának akkor nem lesz állandó dipólusmomentuma, más néven akkor lesz apoláros a molekula, ha: a) a benne lévő kovalens kötések nem polárosak (pl. I_2, H_2), vagy b) a benne lévő

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

kötések polárosak, de a molekula szimmetrikus a szerkezetű (pl. CCl_4). Az apoláros molekuláknak tehát nincs állandó dipólusmomentumuk, de mint nemsokára látni fogjuk, indukálható bennük dipólus.

Az ion-dipólus kölcsönhatások tehát teljes értékű ionok, és állandó dipólusmomentummal rendelkező molekulák illetve csoportok között alakulnak ki. A kölcsönhatás során a dipólusmomentummal rendelkező molekula az ion töltésével ellentétes töltésű részével orientálódik az ion felé. Az ionnal ellentétes töltésű része így közelebb kerül az ionhoz, mint az ionnal azonos töltésű része, így a Coulomb-törvény alapján belátható, hogy a vonzó kölcsönhatás felülmúlja a taszító kölcsönhatást, tehát végül elektrosztatikus vonzás jön létre. Erre jó példa a NaCl már említett oldódása vízben. A víz dipólus molekula, amely negatív oldalával a nátriumionok, pozitív oldalával a kloridionok felé fordul. A vízmolekulák mindkét iont körbevéve árnyékolják az ionok közötti vonzó kölcsönhatást.

Ennek a kölcsönhatásnak az energiája tehát a **dipólus oldaláról tekintve irányfüggő**. A kölcsönhatási energia **távolságfüggése $1/r^2$**, tehát a távolság növelésével erősebben csökken, mint az ion-ion kölcsönhatás (a távolság duplázásával negyedére csökken).

2.4.2.4. Dipól-dipól kölcsönhatások

Ezen kölcsönhatások kötési energiájának **távolságfüggése** még intenzívebb, **$1/r^3$**, vagyis a kötési energia a távolság duplázásával nyolcadára csökken. A kölcsönhatás mindkét résztvevő partner oldaláról **irányfüggő**, a dipólusok kölcsönösen orientálják egymást. Tipikus **példa a vízmolekulák**, vagy a **peptidkötések** között kialakuló kölcsönhatás. Mivel nem tartalmaz ionokat, **ez egy van der Waals kölcsönhatás**.

2.4.2.5. Ion-indukált dipól kölcsönhatás

Amint azt említettük, az apoláros molekulákban, illetve csoportokban is létrejöhet dipólus, amennyiben azt valami indukálja. Amennyiben egy ion és egy apoláros molekula (vagy csoport) kellő közelségbe kerül, az ion dipólust indukálhat. Az indukált dipól ionnal ellentétes oldala az ion felé néz, és elektrosztatikus vonzás alakul ki. Tipikus **példa** erre az, ahogyan egy fehérjemolekulában egy aromás oldalláncú aminosav, például a **fenilalanin benzol gyűrűje** kölcsönhatásba lép egy **arginin**, vagy egy **lizin** oldallánc **pozitív töltésű** csoportjával. A kölcsönhatás erőssége függ az indukált dipólust adó csoport polarizálhatóságától (minél jobban polarizálható, annál erősebb lesz a kölcsönhatás). Ennek a kölcsönhatásnak a **távolságfüggése** az előzőnél is kifejezettebb, **$1/r^4$**, vagyis a kötési energia a távolság duplázásával ~ egy tizenhatodára csökken.

2.4.2.6. Dipól-indukált dipól kölcsönhatás

Még gyengébb, és a távolsággal még nagyobb mértékben lecsengő a dipól-indukált dipól kölcsönhatás. Ennek erőssége is függ az indukált dipólust adó csoport polarizálhatóságától, távolságfüggése ~ $1/r^5$, vagyis a kötési energia a távolság duplázásával ~ egy harminckettedére csökken. Ilyen kölcsönhatás alakul ki **például vízmolekulák**, és **apoláros aromás aminosavak** között.

2.4.2.7. Indukált dipól-indukált dipól kölcsönhatás

Ez a kölcsönhatás, amit Fritz London nyomán London-féle diszperziós kölcsönhatásnak is neveznek, a másodlagos kölcsönhatások közül a **legkisebb kötési energiájú**, és ennek van a legnagyobb távolságfüggése. Amennyiben két apoláros molekula, vagy csoport kellően közel kerül egymáshoz, és elektronfelhőik szinkronizáltan fluktuálnak, ezáltal az ellentétes töltésű részeik egymással szemben helyezkedhetnek el, és így elektrosztatikus vonzás alakulhat ki. Jó **példa** erre a **fehérjékben** egymáshoz térben közel kerülő **aromás oldalláncok gyűrűinek egymásra lapolódása**, vagy a DNS kettőshélix szerkezetben a **DNS szálban** egymást követő **bázisok** részleges, lépcsőzetesen eltolt **átfedése (***base stacking***).** Ennek a kölcsönhatásnak az erőssége is függ az abban résztvevő csoportok polarizálhatóságától, **távolságfüggése ~ $1/r^6$**, vagyis a kötési energia a távolság duplázásával ~ egy hatvannegyedére csökken.

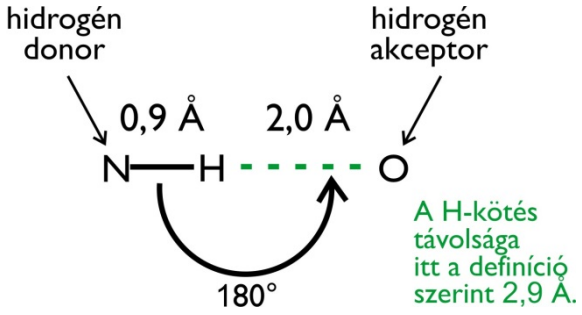
2.4.2.8. Hidrogénhidas kölcsönhatás („hidrogénkötés”)

A **hidrogénhidas kölcsönhatás**, vagy pongyolábban megfogalmazva a **hidrogénkötés** egy speciális másodlagos kölcsönhatás, amelynek kovalens-szerű jellegzetességei is vannak. Természetesen ez is elektrosztatikus eredetű,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

azon belül pedig egy dipól-dipól kölcsönhatás. Részben különleges jellege, részben (az ettől nem független) kiemelt fontossága miatt ezt a kölcsönhatást részletesebben, és az „átlagos” dipól-dipól kölcsönhatásoktól külön tárgyaljuk.

A hidrogénhidas kölcsönhatás **két csoport összesen három atomja** közreműködésével jön létre (lásd **2.21. ábra**).



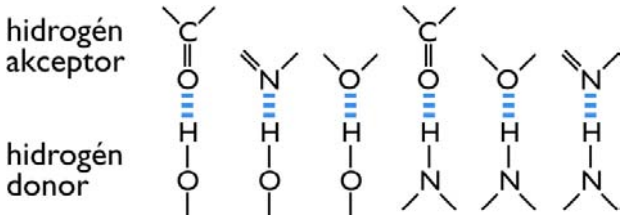
2.21. ábra: Hidrogénhíd kötésben három atom vesz részt

Van egy donor csoport, és egy akceptor csoport. A **donor** csoportban van egy **nagyelektronegativitású atom** (pl. O, vagy N), és egy ehhez kovalensen kötött H atom. A nagy elektronegativitású atom miatt a kovalens kötés poláros, a donor csoport enyhén savas jellegű (hajlamos proton leadásra). A részben elektronhiányos hidrogénatom komoly pozitív töltéssűrűséggel rendelkezik. Az **akceptor** csoport tartalmaz egy olyan, rendszerint **szintén nagy elektronegativitású atom**ot, amelynek **nemkötő elektronpár**ja van. Ez a nemkötő elektronpár alakít ki kölcsönhatást a nagy töltéssűrűségű, elektronhiányos hidrogénnel. Fontos megértenünk, hogy ez a kölcsönhatás három atom együttműködésével jön létre, vagyis a hidrogénhíd kötés nem értelmezhető pusztán a hidrogén és az akceptor közötti kötésként.

A hidrogénhíd kötés **számos szempontbólkovalens jellegű**. Egyrészt az **energiája** magasabb a tipikus másodlagos kölcsönhatások energiájánál, **~10-30 kJ/mol**. Másrészt, amikor az említett három atom hidrogénhidat alkot, akkor a hidrogén és az akceptor csoport fogadó atomja közelebb kerülhetnek egymáshoz, mint van der Waals sugaraik összege. Harmadrészt a létrejövő kötések száma nem tetszőleges, tehát egyfajta vegyérték-szerű tulajdonság is megjelenik.

Definíció szerint a **hidrogénhíd kötés távolsága** alatt **a donor-akceptor atomok távolságá**t értjük (nem pedig a hidrogén-akceptor távolságot). Ez egyrészt jobban kifejezi, hogy ez a speciális kötés 3 atom együttműködésének az eredménye, másrészt technikai okokra is visszavezethető. Röntgenkrisztallográfiában az egyes atomok helyét az elektronfelhőn szóródó röntgensugarak alapján fejtik meg. Mivel a hidrogénnek csak egy elektronja van, a legutóbbi időkig a röntgenkrisztallográfia nem volt képes azonosítani a hidrogénatomok pozícióját. Ezeket az atomokat a kémiai ismeretekre alapozva számítások alapján helyezték be a modellbe. A donor és az akceptor pozíciója azonban jól definiált volt, ezért is volt célszerű ezek távolságát dokumentálni.

A szerves molekulákban számos olyan funkciós csoport van, amelyek között hidrogénhíd kölcsönhatás jöhet létre. Ezekből mutat pár tipikus példát a **2.22. ábra.**



2.22. ábra: A hidrogénhíd kötés tipikus esetei szerves molekulákban.

A hidrogénhíd kötések már említett módon definiált, donor és akceptor atom közötti távolsága tipikusan ~0,25-0,30 nm. Minél rövidebb a kötés, és minél inkább igaz, hogy a kötésben résztvevő 3 atom egy vonalba esik annál erősebb a kötés.

Emiatt a hidrogénhíd kötés **erősen távolság- és irányfüggő** is egyben. Ennek hatalmas szerepe van, ugyanis ennek köszönhetően a hidrogénhíd kötés komoly „szervezőkészséggel” bír. Mint látni fogjuk, a fehérjékben lévő főlánc

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szabályos konformációs állapotai, tehát a fehérjék másodlagos szerkezete elsősorban a szabályos rendben kialakuló, a gerinc csoportok közötti hidrogénhíd kötések eredménye (lásd **4.4. fejezet**).

Köztudott, hogy a kettősszálú DNS-ben az egymást kiegészítő két szál egymással szemben lévő bázisai között hidrogénhíd kötések vannak. Amint azt később szintén látni fogjuk, a hidrogénhíd kölcsönhatásnak a víz tulajdonságai szempontjából is kiemelkedő jelentősége van.

2.4.3. Molekuláris felismerés gyenge másodlagos kötésekkel

2.4.3.1. A rövidtávú kölcsönhatások pontos térkitöltést feltételeznek

Amint azt láttuk, a legtöbb másodlagos kölcsönhatás csak nagyon rövidtávon hat, a kölcsönhatási energia a távolság növelésével drasztikusan csökken.

A röntgenkrisztallográfia kifejlesztésével egyre több **molekuláris komplex** pontos térszerkezete vált ismertté. Ezek alapján kiderült, hogy az evolúció során létrejött stabil komplexekben a felismerés során eltemetődő **molekulafelszínek** általában rendkívül szorosan illeszkednek egymáshoz, **közöttü**k nagyon **nagy térbeli komplementaritás** van. A rövid hatótávolságú elemi kölcsönhatások tehát mintegy „kikényszerítik” a jól illeszkedő kölcsönhatási felszíneket.

Számos esetben a komplexet alkotó molekulák térszerkezetét szabad (azaz „különálló”, nem komplexált) állapotukban is meghatározták. Az esetek egy részében a szabad formában és a komplexben mutatott térszerkezet szinte azonosnak bizonyult. Ezek a vizsgálatok megmutatták, hogy Emil Fischer kulcs-zár modellje (lásd **8. fejezet**) a molekuláris felismerések egy részére sikerrel alkalmazható. A kölcsönhatások másik csoportjára viszont éppen a molekuláris felismerés, a kötődés kiváltotta konformációváltozás jellemző, ami mintegy kommunikációs szerepet tölt be a biológiai partnerek között. Az ilyen jellegű szerkezetváltozások tipikus példája az alloszterikus szabályozás (lásd **17. fejezet**).

2.4.3.2. Sok gyenge elemi kölcsönhatás együtt erős kölcsönhatást eredményezhet

A másodlagos kölcsönhatások felvezetésénél már említettük, hogy ezek a molekulák között (vagy egy molekulán belül az egyes csoportok között) kialakuló kölcsönhatások a kölcsönhatás erősségétől függően dinamikus, vagy stabil kapcsolatok kialakulásához vezetnek. Az első kérdés, ami felmerülhet, hogy miként jöhet létre stabil kapcsolat ilyen gyenge kötőerők által.

Amennyiben **sok gyenge kölcsönhatás** egymástól függetlenül egyidejűleg kialakulhat, úgy ezek kölcsönhatási **energiája összeadódik**. Nézzük ezt meg a **Boltzmann eloszlás** alkalmazásával (lásd **2.3. egyenlet**).

A leírásban ***L*** a komplexbe kerülő molekulák egyikét, általános elnevezéssel a **ligandum**ot jelenti. (Hagyomány szerint amennyiben egy nagy és egy kis molekula kapcsolódik össze, a kisebbet szokták ligandumnak nevezni.) Az L_{sz} a szabadállapotú ligandumot, az L_k a komplexben szereplőt, míg az L_T az összes ligandumot jelöli. A **szögletes zárójel moláris koncentrációt jelent**.

Tegyük fel, hogy a ligandum egy ΔE értékű, a komplexet stabilizáló kölcsönhatás miatt kötött állapotban ΔE értékkel alacsonyabb energiaszinten van, mint szabad állapotban. Az egyenletrendszer első sora a Boltzmann eloszlás alapján megadja, hogy mekkora az $[L_{sz}]/[L_k]$ arány, ha a két állapot közötti energiakülönbség ΔE.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$\frac{[L_{sz}]}{[L_k]} = e^{\frac{-\Delta E}{RT}}$$

$$[L_{sz}] = [L_k] \times e^{\frac{-\Delta E}{RT}}$$

$$[L_T] = [L_k] + [L_{sz}]$$

$$\frac{[L_k]}{[L_T]} = \frac{[L_k]}{[L_k] + [L_{sz}]} = \frac{[L_k]}{[L_k] + [L_k] \times e^{\frac{-\Delta E}{RT}}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-\Delta E}{RT}}}$$

2.3. egyenlet

A mondandónkat jobban illusztrálandó nézzük most meg azt, hogy a stabilizáló kötések energiaértékének függvényében az összes ligandum (L_T) hanyadrésze lesz kötött formában. Egyszerű algebrai átalakítások eredményeként ezt a negyedik sor mutatja (lásd **2.3. egyenlet**).

Helyettesítsünk be ebbe az egyenletbe egységenként növekvő energiaértékeket, és számoljuk ki, hogyan alakul az $[L_k]/[L_T]$ arány. Legyen az energiakülönbség, tehát a komplexet stabilizáló gyenge kölcsönhatás értéke ΔE = 4,2 kJ/mol (1 kcal/mol), és a vizsgált eset vonatkozzon szobahőmérsékletre (T = 298 K). Ezen a hőmérsékleten a hőmozgásban rejlő átlagos kinetikai energia, RT » 2,4 kJ/mol (ahol R, az egyetemes gázállandó értéke, 8,3 J/mol/K). A vizsgált kötési energia tehát csak 75%-kal haladja meg a hőmozgásban rejlő energiát. A gázállandó, a hőmérséklet, és a kötési energia ismeretében kiszámolt $[L_k]/[L_T]$ arány 0,84-nek adódik. Ez azt jelenti, hogy a ligandumok 84%-a komplexben lesz. (Az hogy melyik van éppen komplexben, és melyik szabadon, természetesen egy dinamikus egyensúly szerint pillanatonként változik).

Amennyiben a ligandum egyszerre két azonos energiájú másodlagos kötéssel kötődik, úgy ez az arány már 0,97-re (97%), míg 3 egyforma gyenge kölcsönhatás esetén 0,994 (99,4%)-ra emelkedik.

A példában azt feltételeztük, hogy az egyes kölcsönhatások egymástól függetlenül alakulnak ki, tehát sem nem segítik, sem nem gátolják egymás kialakulását. A hatásuk így egyszerűen összeadódik (additív hatás).

A példából jól látható, hogy **gyenge kölcsönhatások összeadódva exponenciálisan növelik a komplexbe kerülő molekula arányát**. Ennek hátterében egyszerű kombinatorika áll. Ahhoz, hogy a ligandum szabaddá váljon, egyszerre mind a 3 gyenge kölcsönhatásnak meg kell szűnnie. Ha az egyes kölcsönhatások egymástól függetlenek, akkor állapotaik (létezik-e, vagy felbomlott-e a kölcsönhatás) szabadon kombinálódnak. Minél több gyenge kölcsönhatás adódik össze, annál ritkábban alakul ki az az állapot, amikor ezek mindegyike egyszerre éppen felbomlott). Ez a rendkívül egyszerű példa jól mutatja, hogy sok gyenge kölcsönhatás együtt egyenrangú lehet egy erős kölcsönhatással. Ugyanakkor, mint a lenti gondolatmenetben kifejtjük, a kölcsönhatás specifikusságának a szempontjából a sok kis elemi kölcsönhatásból történő építkezés előnyösebb.

2.4.3.3. A sok gyenge elemi kölcsönhatás szerepe a specifikus felismerésben

Az élő szervezetekben a **specifikus kölcsönhatások**nak hatalmas szerepük van. A sok ezer vagy tízezer különböző fehérje csaknem mindegyike csak néhány fajta más fehérjével vagy egyéb molekulával képes komplexet képezni. A receptorok például tipikusan csak egy-, vagy néhányfajta molekulával alkotnak komplexet, a többi molekulával nem. Ugyanez igaz az enzimekre, ellenanyagokra, vagy a fehérjék egyéb működési kategóriáira is.

A sok **gyenge elemi kölcsönhatás kombinálása** még a legegyszerűbb idevonatkozó leírás, a fent említett **Emil Fischer kulcs-zár modell**je alapján is **hatékonyabban** eredményez **specifitás**t, mint kevés, de nagyon erős kölcsönhatás. A kulcs-zár modell szerint az egymással kölcsönható molekulák geometriai és polaritás szempontjából tökéletesen illeszkednek egymáshoz. Minden egyes illeszkedési pontot 1-1 másodlagos kölcsönhatásnak tekintve nyilvánvaló, hogy minél több ilyen pont van, annál többféle, mégpedig exponenciálisan többféle kölcsönhatási felszín hozható létre.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

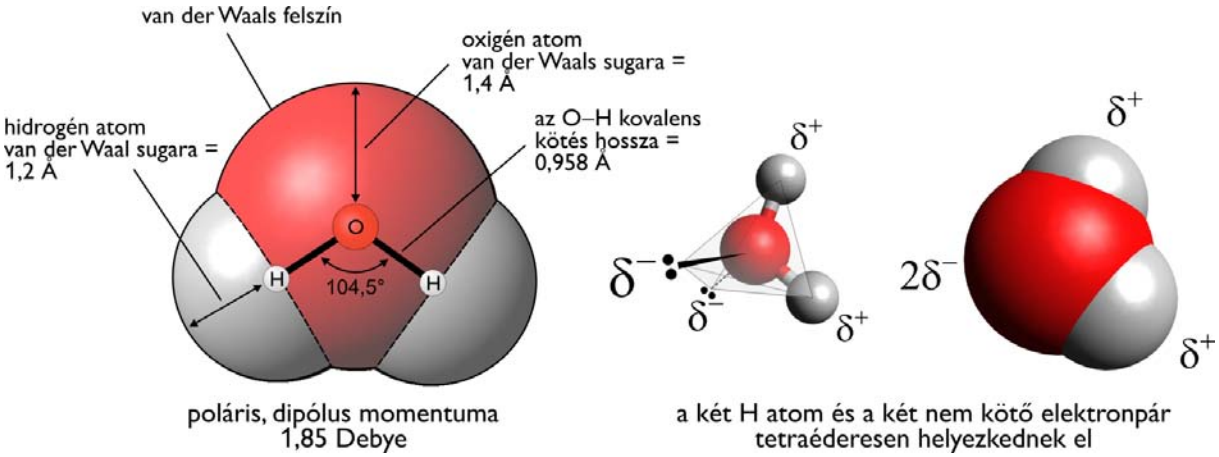
2.5. A víz alapvető tulajdonságai és biokémiai szerepei

A víz mind a közvetlen környezetünk, mind a saját szervezetünk tekintetében az a vegyület, amivel a leggyakrabban, legnagyobb mennyiségben találkozunk. Emiatt hajlamosak lehetünk arra, hogy rendkívül közönséges, egyszerű vegyületnek tekintsük. Mi sem áll távolabb a valóságtól! A **víz** egy különleges vegyület, amelynek **fizikokémiai tulajdonságai** igencsak **rendhagyóak**. Ezek a tulajdonságai szoros kapcsolatban állnak azzal, hogy a mai fogalmaink szerint nem tudjuk az életet víz közreműködése nélkül elképzelni. Másképpen fogalmazva, a földi élet folyékony víz alapú.

2.5.1. A víz fő fizikokémiai adatai

Mint köztudott, a vízmolekulában egy oxigénatomhoz két hidrogénatom kapcsolódik kovalens kötéssel. A víz molekulatömege 18 Da. Az oxigén elektronegativitása lényegesen nagyobb, mint a hidrogéné, ezért mindkét kovalens kötés poláros, az elektronok több időt töltenek az oxigénatom környezetében. Mivel az ebből fakadó részleges negatív és részleges pozitív töltések súlypontja nem esik egybe, a **vízmolekulá**nak állandó **dipólusmomentuma** van, amelynek értéke **1,85 D** (debye) (lásd **2.23. ábra**).

Vizsgáljuk meg, hogy miért is tekinthető a víz különleges vegyületnek.



2.23. ábra: A vízmolekula jellemző szerkezeti adatai

A másodlagos kölcsönhatásoknál elmondottak alapján nagy általánosságban elmondható, hogy minél nagyobb egy molekula, annál több másodlagos kölcsönhatást képezhet. Hasonlítsuk e-tekintetben össze a vízmolekulát egy olyan, kissé nagyobb molekulával, amelyben az egyik hidrogén helyett egy metilcsoport szerepel. Ez természetesen a metanol.

Pusztán a két molekula méretét tekintve azt várhatnánk, hogy a metanol jég állapotból kiindulva magasabb hőmérsékleten olvad meg, és magasabb hőmérsékleten forr fel, mint a víz. Ennek azonban épp az ellenkezője igaz. A Celsius skálán, amelynek beosztását természetesen a víz tulajdonságaihoz igazították, a víz olvadáspontja 0, forráspontja 100 fok, míg a metanol olvadáspontja mínusz 98 fok, forráspontja 65 fok. A víz folyadékállapotból történő elpárologtatásához grammonként több mint kétszer annyi hőre van szükség, mint a metanol esetében.

A **víz** tehát méretéhez képest **rendhagyóan magas olvadáspont**tal, forrásponttal és **párolgáshő**vel rendelkezik. Ezek azt jelzik, hogy a vízmolekulák mind szilárd, mind folyékony halmazállapotban sokkal erősebb kölcsönhatást létesítenek egymással, mint az a méretükből fakadna. A vízben az oxigénatomhoz ugyanannyi hidrogénatom kapcsolódik, mint ahány nemkötő elektronpárja van. Ráadásul a két hidrogénatom, és a két nemkötő elektronpár egy tetraéder négy csúcsán helyezkednek el. Ez, és a már említett elektronegativitás különbség azt jelenti, hogy **minden vízmolekula egyidejűleg négy hidrogénhíd kötésben vehet részt**. Ekkor minden atom egy kifejezetten erősnek számító másodlagos kölcsönhatásban van. A jégben valóban minden vízmolekula egyidejűleg négy hidrogénhidat létesít négy másik vízmolekulával. Ez magyarázza a víz rendhagyóan magas olvadáspontját. **Folyadék**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

halmazállapotban mintegy **15%-kal kevesebb hidrogénhíd** alakul ki, időátlagban minden vízmolekula ~3,4 hidrogénhíd kötést létesít. Ez a még mindig kimagaslóan magas kölcsönhatási arány rendhagyóan magas forrásponttal jár. Ugyanakkor a folyadékfázisú víz **rendkívül dinamikus szerkezetű**. Benne a hidrogénhidas kapcsolatok másodpercenként mintegy ötvenmilliárdszor cserélnek gazdát.

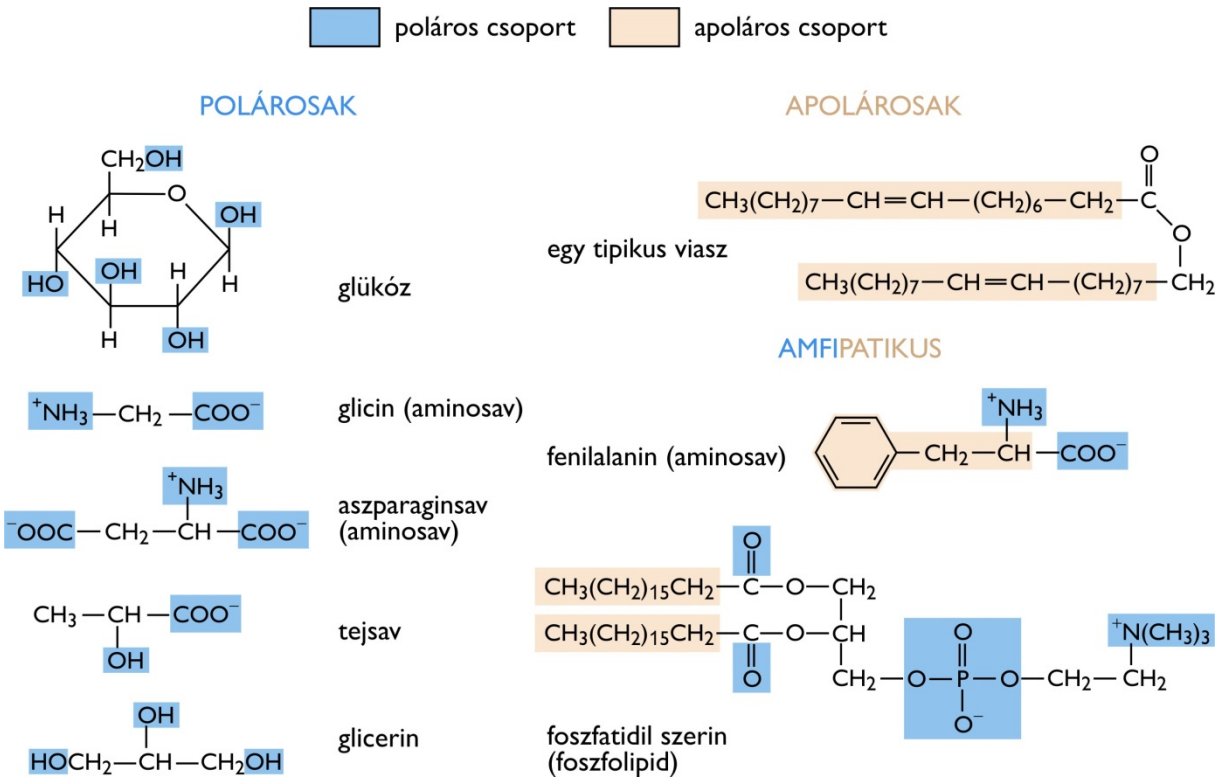
Amikor a vízmolekulák szilárd halmazállapotban tetraéderesen helyezkednek el, egységnyi mennyiségű molekulára nagyobb térfogat jut, mint folyadék halmazállapotban. **A jég sűrűsége** tehát **kisebb, mint a folyékony vízé** (a víz sűrűsége 4ºC-on a legnagyobb). A legtöbb ismert anyagnál ez éppen fordítva van. A víz ilyetén tulajdonságának a Föld élővilágára nézve önmagában is hatalmas jelentősége van. Amikor az élővizek megfagynak, a folyékony víznél kisebb sűrűségű jég nem süllyed le, hanem a felszínen marad, és hőszigetelő réteget alkot. Amennyiben a jég sűrűsége nagyobb lenne a folyékony vízénél, úgy az élővizek fenékig befagyhatnának.

Jelentős dipólus momentuma miatt a víznek kiemelkedően magas a dielektromos állandója, tehát erőteljesen árnyékolja az elektrosztatikus kölcsönhatásokat.

2.5.2. A víz, mint oldószer

A másodlagos kölcsönhatásokról korábban írtak alapján nyilvánvaló lehet, hogy állandó dipólus momentuma és nagy dielektromos állandója miatt a **víz kiváló oldószere az ionoknak, és a poláros molekuláknak**. Sók oldásakor a víz a pozitív illetve negatív töltésű ionokat a megfelelő, ellentétes részleges töltésű oldalával veszi körbe, így többrétegű hidrátburkot alakít ki, amelyben az ionokkal ion-dipól kölcsönhatások alakulnak ki.

A molekulák többsége polárosság szempontjából három csoportra osztható: poláros, apoláros, amfipatikus (lásd **2.24. ábra**).



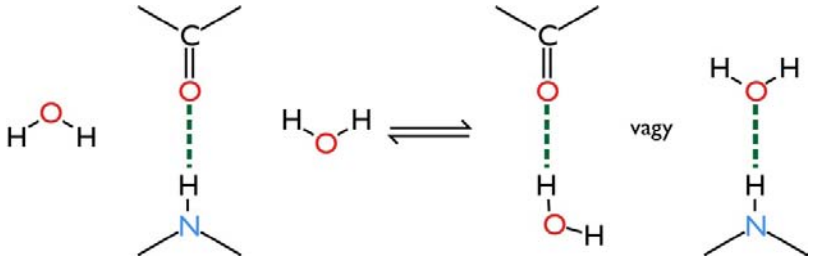
2.24. ábra: A poláros és apoláros csoportok száma és elrendeződése szerint a molekulák lehetnek polárosak, apolárosak, vagy amfipatikusak

A poláros molekulákkal (amelyekben az alkotó atomok közötti kovalens kötések polárosak, és maga a molekula nem-szimmetrikus szerkezetű) a víz dipól-dipól kölcsönhatásokat alakít ki. Ezen belül azokkal a csoportokkal, amelyek erre képesek, hidrogénhíd kötéseket létesít (lásd **2.25. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az apoláros molekulákkal (amelyekben az alkotó atomok közötti kovalens kötések vagy apolárosak, vagy ha polárosak, akkor maga a molekula szimmetrikus szerkezetű) a víz csak gyenge, dipól-indukált dipól kölcsönhatásokat tud kialakítani. Részben ennek köszönhetően de, mint a következő fejezetben (lásd **2.5.3.**) látni fogjuk, főleg entrópiával kapcsolatos okok miatt, az apoláros molekulák inkább egymással kerülnek kölcsönhatásba, semmint vízzel, mintegy kiszorulnak a vízből. Emiatt a „vízutáló" viselkedésük miatt az **apoláros molekulák**at vagy csoportokat **hidrofób**nak is szokták nevezni.

A molekulák egy harmadik típusában (**amfipatikus**) a poláros és az apoláros funkcionális részek egymástól jól elkülönítetten helyezkednek el a molekulán belül. Egy ilyen esetben a víz kedvező kölcsönhatásokat tud létesíteni a poláros csoportokkal, míg az apolárosakkal nem. Ennek eredményeképpen az apoláros csoportok egymás felé fordulnak, a polárosok a víz felé fordulnak, és micellák, vagy kettősréteg membránok alakulnak ki (lásd **11.5. fejezet**). Erre a jelenségre a hidrofób hatás (lásd lent) ad magyarázatot.



2.25. ábra: A víz poláros csoportokkal dipól-dipól kölcsönhatásokat, lehetőség szerint hidrogénhíd kötést létesít

2.5.3. A hidrofób hatás (effektus)

A hidrofób hatást, mint jelenséget mindenki ismeri. Az apoláros molekulák, mint például a szénhidrogének, nem oldódnak vízben, mintegy „utálják a vizet", emiatt nevezik ezeket hidrofób molekuláknak. Ennek okára egy népszerű, de hibás magyarázat az, hogy a vízmolekulák egymással erősebb kölcsönhatást létesítenek, mint az apoláros molekulákkal, és ezért mintegy kitaszítják maguk közül azokat. Ha közelebbről megvizsgáljuk ezt a kérdést, akkor világossá válik, hogy a magyarázat ennél összetettebb. Az igaz ugyan, hogy a vízmolekulák egymással erősebb kölcsönhatást létesítenek (lásd dipól-dipól; hidrogénhíd) mint apoláros molekulákkal (lásd dipól-indukált dipól), de az apoláros molekulák a vízzel erősebb kölcsönhatást létesítenek (dipól - indukált dipól) mint egymással (indukált dipól - indukált dipól). A kölcsönhatási energia alapú mérlegben tehát nem csak azt kell figyelembe venni, hogy a poláros oldószer-molekulák egymással stabilabb kölcsönhatást létesítenek, mint az oldandó apoláros anyaggal, hanem azt is, hogy az apolárosak egymással kevésbé stabil kölcsönhatást létesítenek, mint a vízzel. Emiatt nem egyértelmű, hogy pusztán a kötéserősségeket tekintve magyarázható-e a jelenség. Ráadásul számos poláros, a vízzel jól elegyedő oldószer, mint például az acetonitril, vagy a dimetil-szulfoxid kifejezetten jól oldja az apoláros molekulákat.

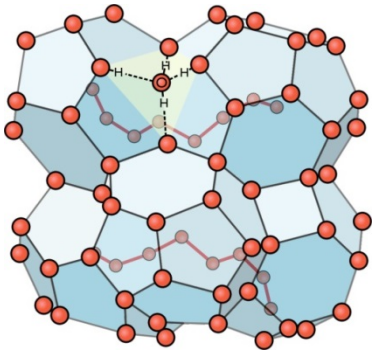
A jelenség tehát nem pusztán azért áll elő, mert a víz poláros. Ezen túlmenően valami más, egyedi tulajdonsága is van a víznek, ami a hidrofób effektust kiváltja. Maga a kifejezés (hidrofób) is jelzi a „hidro" előtag révén, hogy ez az effektus kifejezetten a vízzel kapcsolatos.

A jelenség megértéséhez nem elegendő az egyedi kölcsönhatásokat figyelembe venni. A **hidrofób effektus** jó okkal nem is került felsorolásra a másodlagos kölcsönhatások között. Ez ugyanis **nem egy közönséges kétoldalú kölcsönhatás**, hanem egy termodinamikai rendszer komplex viselkedésének a végső eredménye, amelynek **kiváltó oka elsősorban az entrópiával kapcsolatos**.

A vízmolekulák a jégben, mint már említettük, egymással maximális számú (molekulánként négy) hidrogénhidat képeznek. Folyékony vízben a hőmozgás miatt kevesebb, átlagosan ~3,4 hidrogénhíd alakul ki molekulánként. Ezek a kölcsönhatások folyadékfázisban természetesen folyamatosan felszakadnak, és újraalakulnak, a vízmolekulák emiatt folyékony halmazállapotban nem alkotnak tartósan rendezett szerkezeteket. Más a helyzet, amikor a vízben apoláros molekulák is vannak. Amikor az **apoláros molekulák felszínén a vízmolekulák** egymással hidrogénhíd kölcsönhatást létesítenek, akkor a hidrogénhidak számának maximálása során szabályosan rendeződnek el, és a jégben mutatott elrendeződéshez hasonló, úgynevezett **klatrát szerkezetet hoznak létre** (lásd **2.26. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Természetesen ez a szerkezet sem állandó, de jóval kevésbé dinamikus, és jóval rendezettebb, mint a tiszta vízben kialakuló szerkezetek. A vízmolekuláknak ez a rendeződése a termodinamika fogalomrendszerével kifejezve azt jelenti, hogy **a klatrátban lévő vízmolekulák rendezettebb állapota miatt a rendszer entrópiája a tiszta vízéhez képest csökken, ami növeli a rendszer szabadentalpiáját**. Mint később látni fogjuk, a spontán, munkavégzés nélkül, tehát maguktól végbemenő, visszafordíthatatlan folyamatokra az jellemző, hogy általunk csökken a rendszer szabadentalpiája.

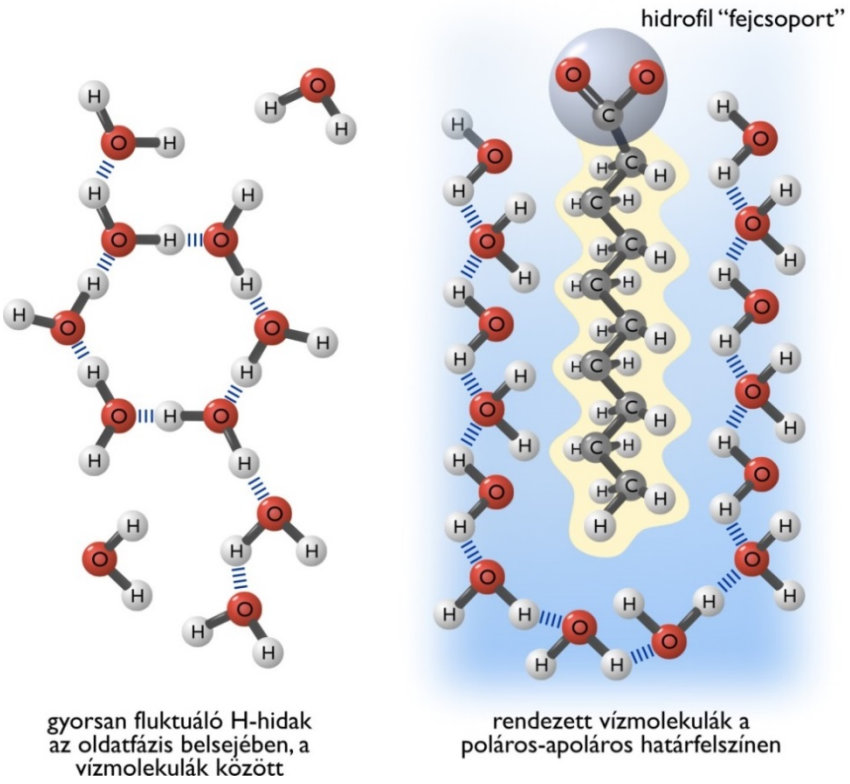


2.26. ábra: Apoláros molekulák körül a vízmolekulák klatrát szerkezetbe rendeződnek

A konkrét esetben azáltal csökken a vizet és apoláros molekulákat tartalmazó rendszer szabadentalpiája, hogy csökken az apoláros molekulák vízzel érintkező összesített felszíne. Ennek a spontán folyamatnak a során az apoláros molekulák egymást veszik körbe. A víz felé akkor mutatják a legkisebb felszínt, ha gömb alakú terekbe csoportosulnak. Jó példa erre, amikor olajat elegyítünk vízzel. Ennek végeredménye (súlytalanság esetén) egyetlen gömb alakú olajcsepp a vizes fázisban. Normál földi körülmények között a sűrűségi viszonyoknak megfelelően egymásra rétegződő, két nem elegyedő fázist kapunk.

Amikor nem apoláros, hanem amfipatikus molekulákat elegyítünk vízzel, akkor a fentivel azonos okok miatt hasonló jelenség lép fel, aminek végeredménye mégis eltérő. Ebben az esetben is egymással lépnek kapcsolatba az apoláros molekularészek, tehát itt is mintegy „kimenekülnek” a vízből, de mivel kovalensen kapcsolva vannak egy poláros részhez, ezért a végeredmény eltérő lesz (lásd **2.27. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.27. ábra: A víz az amfipatikus molekula apoláros csoportja körül rendeződni kényszerül

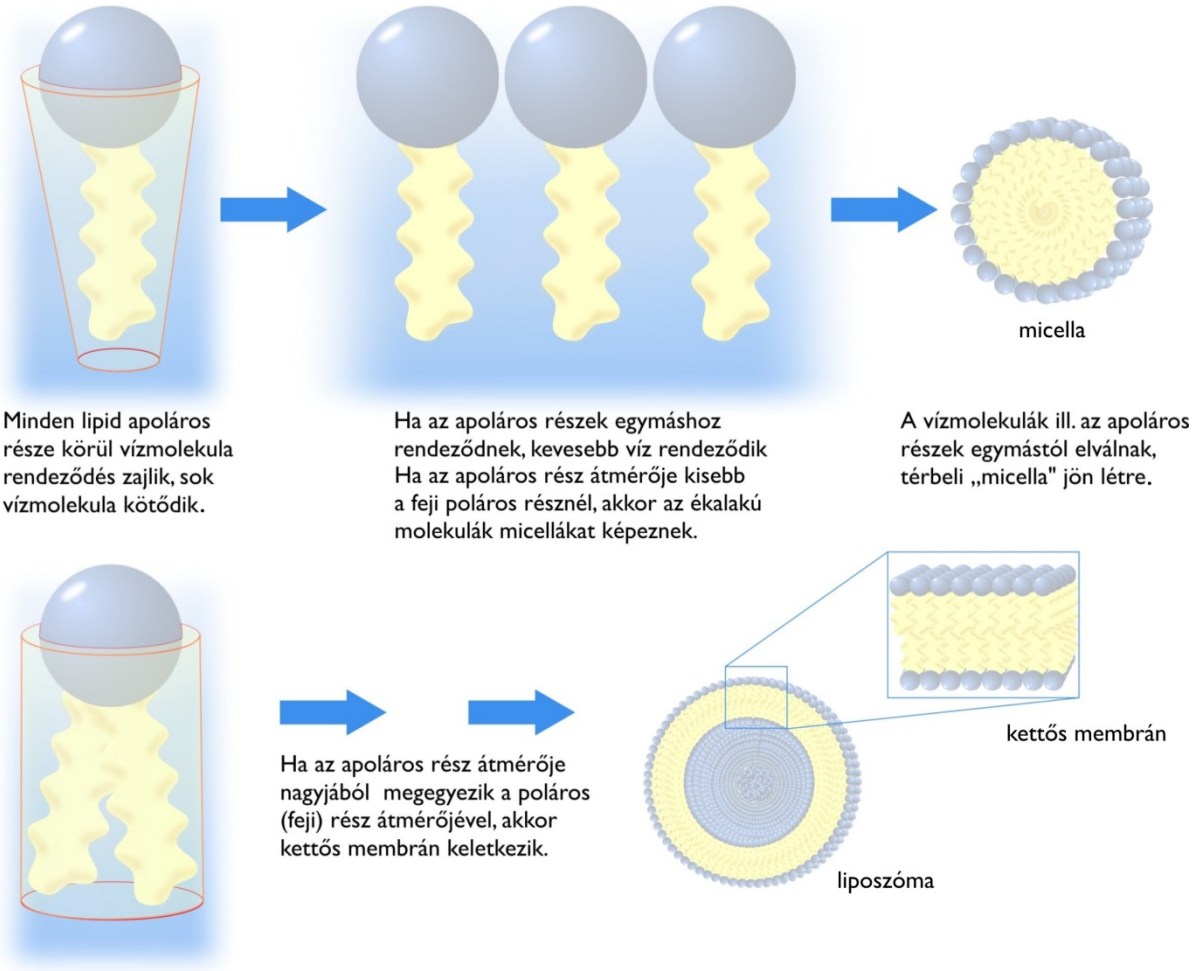
Az **amfipatikus molekula** alakjától függően jellemzően kétféle végeredmény születhet (lásd **2.28. ábra**).

Ha az apoláros rész kisebb átmérőjű, mint a poláros (feji résznek nevezett) rész, akkor a molekula ék alakú lesz. Ebben az esetben az apoláros részek úgy temetődhetnek el, ha apoláros belsejű, poláros külsejű gömböket, **micellákat képez**nek. A micellák sugara megegyezik az amfipatikus molekulák hosszával.

Ha az apoláros rész átmérője nagyjából megegyezik a poláros (feji) rész átmérőjével, akkor nem gömbök képződnek, hanem **kettős membrán**ok. Ezek olyan síkok, amelyeket két, amfipatikus molekulákból álló réteg alkot. Az apoláros molekularészek ebben a kettősrétegben egymás felé, míg a poláros részek kifelé, a víz felé fordulnak. A kettősmembránok maguk is gömböket képeznek, így nem alakulnak ki a kettősmembrán sík szélén olyan területek, ahol az apoláros részek vízzel érintkeznek.

A **hidrofób hatás**nak (a szakirodalomban: **hidrofób effektus**) óriási **jelentősége** van a biológiai rendszerekben. A **globuláris fehérjék natív szerkezetének kialakulásában** például **döntő szerep**e van a makromolekula belsejébe temetődő, zömmel apoláros oldalláncokat tartalmazó úgynevezett hidrofób magnak. A globuláris fehérjék felszínén zömmel poláros csoportok helyezkednek el, tehát natív térszerkezete a micellákra emlékeztet (bár a részletek tekintetében természetesen sokkal összetettebb).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.28. ábra: Az amfipatikus molekulák vízben szerkezetüktől függően micellákat, vagy membrán kettősréteget képeznek

A **biológiai membránok**, például a sejtmembrán, vagy az eukarióták számos organellumának a membránjai döntően **foszfolipidekből állnak**. A foszfolipidek olyan amfipatikus molekulák, amelyek apoláros részének átmérője nagyjából akkora, mint a poláros feji rész átmérője. Ez a szerkezeti oka annak, hogy a foszfolipidek **membrán kettősréteg**et képeznek.

Tehát a biológiai **membrán kettősrétegek** is a **hidrofób effektus következtében** alakulnak ki. Ezek a lipid kettősrétegek, (lásd sejtmembrán, vagy különböző organellumok, vakuólumok membránja), gömbszerűen zárt képződményeket alkotnak, így a síknak nincsenek lezáratlan, a víz felé apoláros részeket mutató szélei, a víz felé csak poláros részek fordulnak.

A hidrofób hatásnak a **DNS kettősspirál szerkezet stabilizálásában is fontos szerep** jut. A láncban egymást követő bázisok egymással átfedve egymásra lapolódnak, apoláros részük a víztől elzárva szoros térkitöltésű belső térrészt alakít ki.

2.5.4. Ionegyensúlyok vizes közegben

Azt korábban már tárgyaltuk, hogy a víznek van dipólusmomentuma, de pusztán a víz kémiai képletéből (H_2O) kiindulva az következne, hogy a vízmolekulának nincs eredő töltése. Ebből pedig az következne, hogy a tökéletesen tiszta folyékony halmazállapotú víz nem vezethetné az áramot. (Folyadékokban az elektromos áramot a fémes vezetőkkel ellentétben ionok vándorlása hozza létre).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

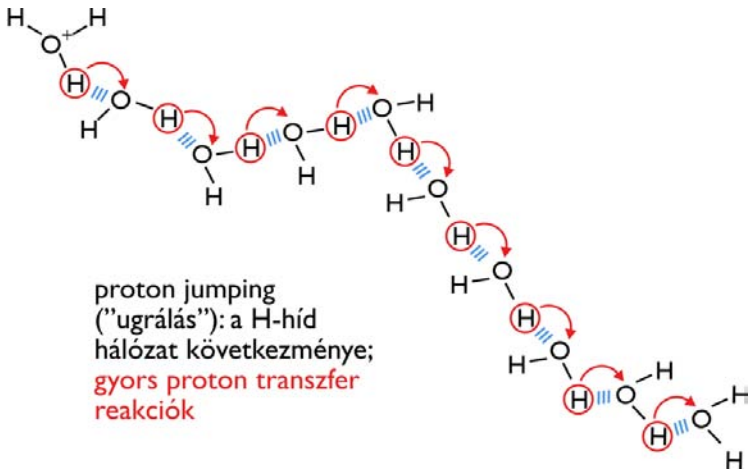
Márpedig tapasztalati tény, hogy a nagytisztaságú **víz** is **vezeti az áramot**. A tiszta víz elektromos vezetőképességének (az ellenállás reciproka) ismeretében a víz ionkoncentrációja is meghatározható. A tiszta víz tehát részben semleges, részben ionos állapotban van jelen, ezek között egyensúly van.

A víz ionokra bomlik az alábbi egyenlet szerint:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$
$$H^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+$$

2.4. egyenlet

A víz tehát protonra és hidroxidionra bomlik. A proton pillanatszerűen reagál egy vízmolekulával, és hidroxónium iont képez. Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a pozitív töltés gyorsabban vándorol vízben, mint azt hidroxónium ionok vándorlása lehetővé tenné. A jelenség hátterében az áll, hogy a hidroxónium ionok a hálózatos hidrogénhíd rendszer miatt könnyen átadják a protonjukat, és ezáltal hidroxónium ion állapotukat a szomszédos vízmolekuláknak. Ez a **proton-ugrálás (*proton jumping*)** jelensége (lásd **2.29. ábra)**. A proton-ugrálás miatt a hidroxónium ionok vándorlásán felül a hidroxónium ion állapot maga is terjed, mégpedig gyorsabban, mint maguk a hidroxónium ionok.



2.29. ábra: A proton-ugrálás jelensége vízben

A víz ionokra történő bomlása egyensúlyra vezet, a bomlás mértéke egy egyensúlyi állandóval számszerűen is kifejezhető:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

2.5. egyenlet

Mindkét oldalt megszorozva a víz koncentrációjával az alábbi egyenlethez jutunk:

$$K_{eq}[H_2O] \equiv K_v = [H^+][OH^-]$$

2.6. egyenlet

Mivel a **víz moláris koncentrációja** egy konkrét érték, (~**55,5 M**), ezért a baloldalon két állandó szorzata szerepel, ami maga is állandó. Ezért a jobb oldalon szereplő szorzat önálló elnevezést is kapott, ez a **vízion szorzat**. Ennek értéke $\mathbf{10^{-14}\ M^2}$.

Mivel a víz semleges, ezért a **protonok** és a **hidroxidionok koncentrációja** megegyezik, $\mathbf{10^{-7}\ M}$. Ha ezt a tized mikromólos koncentráció adatot összevetjük a víz koncentrációjával, akkor látható, hogy a vízmolekuláknak csak egy rendkívül kis hányada, 555 millió molekulából 1 molekula van éppen disszociált állapotban. Ez a disszociáció

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

tehát önmagában praktikusan nem befolyásolja a semleges vízmolekulák koncentrációját, tehát a vízion szorzatban jogosan tekintjük a víz koncentrációját állandónak.

Mivel ilyen kis koncentrációval nem praktikus számolásokat végezni, ezért a protonkoncentráció kifejezésére definíciószerűen bevezették a **pH fogalmá**t:

$$pH = -\log_{10}\left[H^+\right] \qquad \textbf{2.7. egyenlet}$$

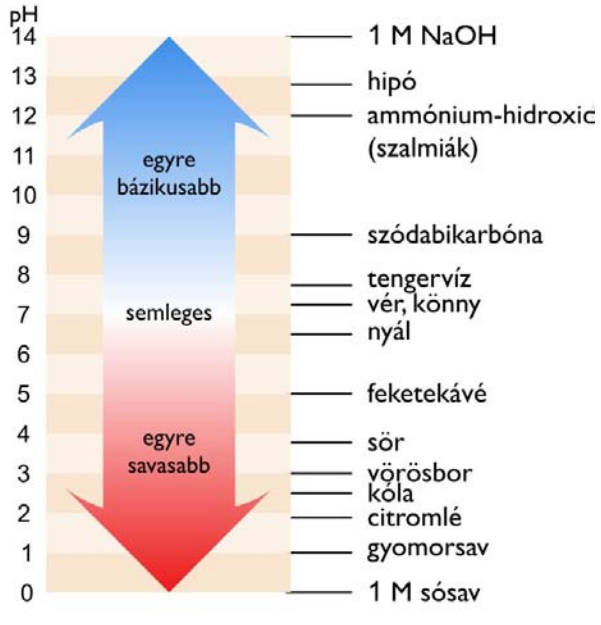
A vízion szorzat állandóságából következik, hogy amilyen arányban növekedik a protonkoncentráció a vízben (pl. savak beoldása miatt), olyan arányban csökken a hidroxidion koncentrációja, és fordítva.

A **2.30. ábra** mutatja, hogy a pH skála egészszámú értékeihez milyen protonkoncentráció és hidroxidion koncentráció tartozik. Érdemes megjegyezni, hogy a pH bevezetésével analóg módon a pOH fogalom is bevezetésre került, de ez a biokémia gyakorlatában nem használatos. A **2.30. ábra** azt is mutatja, hogy különböző testnedvekben, illetve egyéb, hétköznapi életünkből ismerős folyadékokban mekkora a pH értéke.

A pH fogalomköre rendkívül fontos a biokémiában. A életfolyamatokban résztvevő molekulák nagy hányadában vannak olyan funkcionális csoportok, amelyek képesek protont felvenni, illetve leadni. Egy ilyen proton felvétel, vagy leadás természetesen töltésváltozással jár. Ha a protont leadó csoport egyszeresen pozitív volt, akkor semleges töltésű lesz, ha semleges volt, akkor negatív töltésűvé válik, a protont felvevők esetében pedig mindennek az ellenkezője igaz.

A másodlagos kölcsönhatásoknál már láttuk, hogy milyen nagy jelentősége lehet annak, hogy egy molekula hordoz-e töltést (ionos-e) vagy sem. Egy egyszerű protonleadás vagy felvétel komoly mértékben meghatározhatja, hogy az adott csoport milyen molekulákkal képes majd kölcsönhatásba kerülni, és alapvetően befolyásolhatja az adott csoport kémiai reakciókban való részvételét is. A protoncserével kapcsolatos reakciók a sav-bázis reakciók.

$[H^+]$ (M)	pH	$[OH^-]$ (M)	pOH
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0



2.30. ábra: A megfelelő hidroxónium és hidroxidion koncentrációkhoz tartozó pH illetve pOH értékek, és egyes közismert folyadékok pH értékei

2.5.5. Sav-bázis reakciók vizes közegben

Ahhoz, hogy a sav-bázis reakciókat tárgyaljuk, mindenekelőtt definiálni kell a **sav és a bázis fogalmá**t. Svante Arrhenius, aki elsőként feltételezte, hogy a sók vízben ionokra disszociálva oldódnak, 1884-ben a következő definíciót adta: sav az, ami disszociálva protont ad le, bázis az, ami disszociálva OH^- iont ad le. Ennek a definíciónak

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

az értelmében csak azok az anyagok lennének bázikusak, amelyek hidroxidiont tartalmaznak, az ammónia például nem lenne bázis.

Johannes **Brønsted** és Thomas **Lowry** 1923-ban egymástól függetlenül új definícióval szolgáltak. Eszerint **sav az, ami protont képes átadni egy másik molekulának, míg bázis az, amelyik proton tud felvenni**. A definíciójukból következik, hogy a sav, illetve a bázis szerep csak konkrét, protonátmenetes reakciókban, tehát sav-bázis reakciókban definiálható.

A sav-bázis reakciókban tehát kell, hogy szerepeljen egy sav, és kell, hogy szerepeljen egy bázis is, ezek feltételezik egymást. Ugyanaz az anyag az egyik reakcióban szerepelhet savként, egy másikban pedig bázisként attól függően, hogy mi a reakciópartnere. (Ez a viszonylagosság és egymásrautaltság analóg azzal, amit az elektronátmenettel kapcsolatos redoxreakcióknál láttunk. Ha valami oxidálódik, akkor valami másnak redukálódnia kell. Az, hogy egy ilyen reakcióban egy anyag redukálódik, vagy oxidálódik-e, függ a reakciópartnertől).

Kezdetben a sav-bázis gondolatkör elválaszthatatlan volt az oldódás gondolatkörétől. Brønsted és Lowry azt is megállapították, hogy az, hogy egy anyag mennyire erős sav (milyen mértékben képes protont leadni), vagy bázis (milyen mértékben képes protont felvenni), függ az oldószertől. Az oldószer tehát mint protont felvevő (sav) vagy mint protont leadó (bázis) molekula részt vesz a reakcióban. A korábbi gondolatmenetnek megfelelően az egyes résztvevők szerepe és „erőssége" attól függ, hogy milyen molekulával, az utóbbi példában milyen oldószerrel lépnek reakcióba.

A kérdéskör matematikai leírásához érdemes bevezetni az „**általános sav**" fogalmát, ami a felírt reakcióban savként viselkedik majd. Ennek jele: **HA**, a H jelzi, hogy a molekula protont tud majd leadni. Ha ez az általános sav protont ad le, akkor a visszamaradó molekula, **a savmaradék az A^-** jelet kapja. Mindenekelőtt fontos kiemelni, hogy ez az általános jelzés nem jelenti azt, hogy a sav feltétlenül semleges, a savmaradék pedig feltétlenül negatív töltésű kéne, hogy legyen. A lényeg, hogy amikor a savként szereplő reakciópartner lead egy protont, a töltése egy egységgel kisebb lesz. Ha semleges volt, akkor egy negatív töltése lesz, ha korábban egy pozitív töltése volt, akkor semlegessé válik.

Vegyük észre azt is, hogy egy reverzibilis sav-bázis reakcióban a szerepek a reakció során megváltoznak. Ami savként protont adott le, az bázissá válik, ami pedig protont vett fel, az savvá. Az eredeti felírásban savként szereplő molekula deprotonált formája a sav konjugált bázisa, míg az eredeti felírásban bázisként szereplő molekula protonált formája a bázis konjugált sava lesz.

Ebben a fejezetben a víz szerepét tárgyaljuk, így a sav-bázis reakciókat is vizes közegben vizsgáljuk meg. A fenti definíciók alapján az alábbi általános sav-bázis reakció írható fel vizes közegben:

$$HA + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + A^- \qquad \textbf{2.8. egyenlet}$$

Az általános sav egy egyensúlyra vezető folyamatban protont ad le a víznek. Ebben a reakcióban a víz bázisként működik. Az általános savból kialakul annak A^- **konjugált bázis**a, míg a bázisként szereplő vízből kialakul a H_3O^+ **konjugált sav**. A fordított reakcióban ezek a konjugált molekulák reagálnak egymással. Az egyensúlyra vezető folyamathoz tartozik egy egyensúlyi állandó is, az alábbiak szerint:

$$K_{eq} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]} = \frac{\frac{[A^-]}{[HA]}}{\frac{[H_2O]}{[H_3O^+]}} \qquad \textbf{2.9. egyenlet}$$

Az egyenletben szereplő egyensúlyi állandó természetesen az eredeti felírás szerinti termékek moláris koncentrációjának szorzata osztva a kiindulási anyagok moláris koncentrációjának szorzatával. Ennek az egyenletnek az egyszerű algebrai átrendezése egy sokatmondó emeletes törtet eredményez. Ebben a két konjugált sav-bázis pár koncentrációarányai vannak egymással elosztva.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Mit is jelent ez? Ez az emeletes tört természetesen továbbra is az egyensúlyi állandót adja meg, de egyben megvilágítja az egyensúlyi állandó egyik fontos jelentését is. Az egyensúlyi állandó azt mutatja meg, hogy a reakcióban szereplő általános sav, mennyire erős a vízből keletkező savhoz, vagyis a hidroxónium ionhoz képest.

Definíciós szerint azokat hívjuk erős savaknak, amelyeknél ez az arány, tehát az egyensúlyi állandó nagyobb, mint egy. Tehát azok az erős savak, amelyek erősebbek, mint a hidroxónium ion. Elsőre meglepő lehet ez a kis számérték, de vizsgáljuk meg, hogy vajon a hidroxónium ion erős sav-e. Mivel a vízben csak minden 555 milliomodik vízmolekula van hidroxónium ion állapotban, ezért nyilvánvaló, hogy a hidroxónium ion rendkívül erős sav, ami nagyon nagy hányadban adja le a protonját víznek.

A salétromsav K_{eq} értéke például 1,2; a kénsavé 10^3, míg a sósavé 10^7. Ez egyben azt is mutatja, hogy az erős savak vízben oldva azok, amelyek gyakorlatilag teljes mértékben disszociálnak, tehát amelyeknek gyakorlatilag minden molekulája leadja a protonját. Gyakorlati értelemben az erős savaknál tehát csak formalitás az egyensúlyi állandó felírása, az erős savak vízzel való reakciója szinte tökéletesen a disszociációja irányában van eltolva.

Nézzük meg, hogy ezzel szemben milyen törvényszerűségek vonatkoznak a gyenge savak híg vizes oldataira. Mivel a hidroxónium ion koncentráció proton koncentrációként is felírható, ezért a korábbi egyensúlyi állandón apró formai módosítást hajthatunk végre az alábbiak szerint:

$$K_{eq} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA][H_2O]}$$ **2.10. egyenlet**

Szorozzuk meg mind a két oldalt a víz moláris koncentrációjával. Fontos, hogy ez a szorzás csak akkor jelent állandó értékkel való szorzást, ha gyenge savak híg oldataira vonatkozik az egyenlet. Ebben az esetben ugyanis a víz 55,5 M koncentrációjához képest elenyésző lesz az a koncentráció csökkenés, ami abból fakad, hogy a vízmolekulák egy része protont felvéve hidroxónium ionná alakul. Erős, teljesen disszociáló savaknál, illetve gyenge savak magas koncentrációinál ez az elhanyagolás már nem tehető meg.

Ha gyenge savak híg oldatairól van szó, akkor ez a szorzás tehát egy konkrét (állandó) 55,5 M koncentráció értékkel való szorzást jelent. A K_{eq} és a vízkoncentráció szorzata így maga is egy állandó lesz, amit savi disszociációs állandónak nevezünk.

$$K_{eq} \times [H_2O] = K_{sav} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$ **2.11. egyenlet**

Ez egy nagyon jól használható paraméter, amennyiben a már említett módon, csak gyenge savak híg oldataira alkalmazzuk, és helyesen értelmezzük. Amennyiben nem vesszük figyelembe, hogy hogyan jutottunk a savi disszociációs állandó fogalmával, az egyenlet formája önmagában félrevezethet bennünket. A K_{sav} ugyanis pusztán az egyenlet formája alapján látszólag egy olyan reakciót jellemez, amelyben a HA sav minden reakciópartner nélkül (vákuumban) spontán bomlik. Ez, mint már tárgyaltuk, nem így van, a reakciópartner a víz, a K_{sav} értéke kizárólag a vízzel való kölcsönhatásra vonatkozik. Más, protonfelvételre képes oldószer esetében a reakció, és így a K_{sav} értéke is eltérő lenne. Az mindenestre nyilvánvaló, hogy egy adott oldószer esetében minél magasabb a K_{sav} értéke, annál erősebb a sav.

A K_{sav} definiálásához vezető egyenlet kis algebrai átalakítással egy rendkívül hasznos, ezért kiemelten fontos egyenlethez, az úgynevezett **Henderson-Hasselbalch egyenlet**hez vezet.

Először is definiáljuk a pK_{sav} fogalmát a következőképpen: $pK_{sav} = -\log_{10}K_{sav}$. Mivel minél erősebb a sav, annál nagyobb a K_{sav} értéke, és mivel a pK_{sav} a K_{sav} negatív tízes alapú logaritmusa, ezért minél erősebb egy sav, annál alacsonyabb lesz annak pK_{sav} értéke.

Ezek után vegyük a savi disszociációs állandót definiáló egyenlet mindkét oldalának negatív előjelű, tízes alapú logaritmusát, így az alábbi egyenlethez jutunk:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$pK_{sav} = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$ **2.12. egyenlet**

Egyszerű átrendezéssel a pH-t az egyenletből kifejezve kapjuk a **Henderson-Hasselbalch egyenlet**et:

$$pH = pK_{sav} + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$ **2.13. egyenlet**

Először vizsgáljuk meg, hogy mi a **pK_{sav} érték** praktikus jelentése. Amennyiben a pH értéke éppen megegyezik a pK_{sav} értékével, úgy az egyenlet jobb oldalán szereplő összeadás második tagjának értéke nulla. A log[A]/[A$^-$] tag akkor lehet nulla, ha az [A$^-$]/[HA] hányados értéke 1. A pK_{sav} értékének gyakorlati jelentése tehát a következő: **megadja azt a pH értéket, amelyen a gyenge sav éppen 50-50%-ban van disszociált illetve nem-disszociált állapotban.**

Miért is hasznos ez az egyenlet? Amennyiben a pK_{sav} értéke már ismert, úgy bármilyen pH érték esetében egyszerűen kiszámítható, hogy a gyenge savként működő, disszociációra képes csoport milyen arányban van protonált (sav) és deprotonált (konjugált bázis) állapotban.

Az is könnyen belátható, hogy a pH az oldatban lévő savak és bázisok arányától függ. Az angol nyelvű szakirodalomban a K_{sav} állandó elnevezése K_a, ahol az *a* az „*acid*” szóra utal. A pK_{sav} megfelelője emiatt a pK_a. (Mivel a K_a rövidítés összetéveszthető az asszociációs állandó jelölésével, ezért a szövegben mindenhol a K_{sav} kifejezést alkalmaztuk. A pK_a rövidítés ugyanakkor teljesen egyértelmű, és a nemzetközi irodalomban annyira általános, hogy a jegyzet többi részében, így a most következő ábrán is ezt alkalmazzuk.)

A **2.31. ábra** foglaltuk össze néhány jellemző funkciós csoport illetve molekula pK_a értékeit.

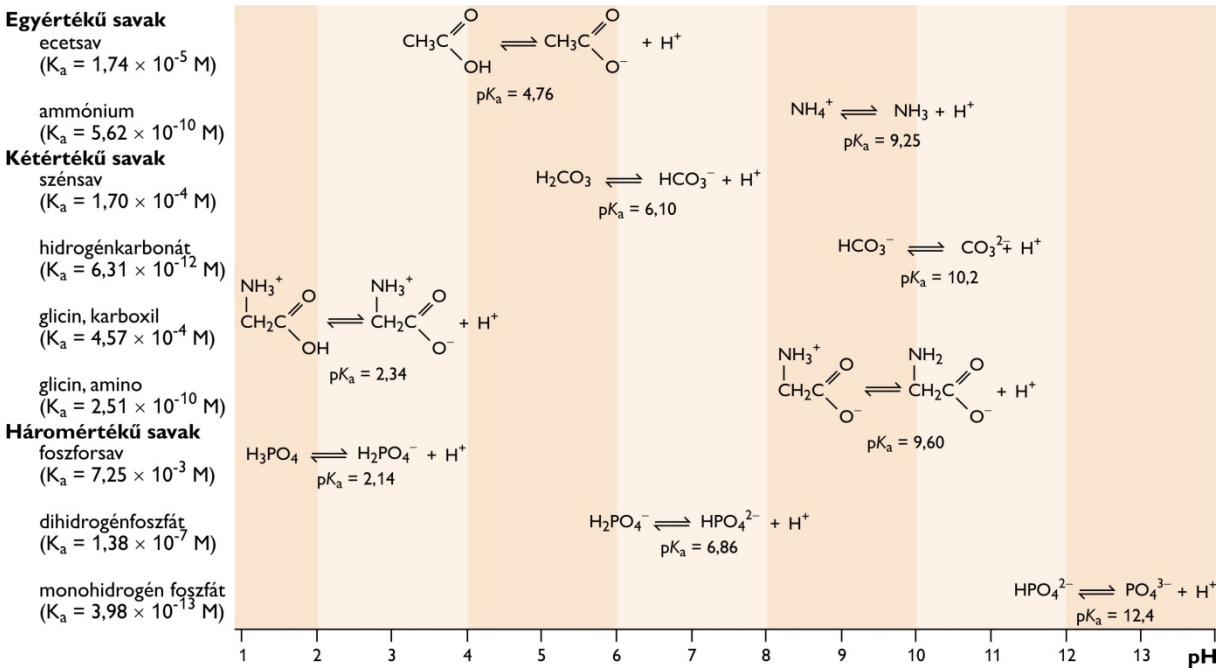
Az ábra azt is mutatja, hogy vannak csoportok, amelyek csak egy protont tudnak leadni, tehát egyértékű savak, de vannak olyanok is, amelyek kettőt (kétértékű savak) illetve hármat is (háromértékű savak). A többértékű savaknál minden egyes proton leadásához tartozik egy külön pK_a érték.

Az ecetsavban lévő karboxilcsoport pK_a értéke 4,76. Ebből következik, hogy pH = 4,76 értéken az oldatban lévő ecetsav molekulák felének van a karboxilcsoportja disszociált állapotban (karboxilát formában).

A Henderson-Hasselbalch egyenletből következően egyszerűen kiszámítható, hogy a pK_a értékénél egy egységgel magasabb pH-n az [A$^-$]/[HA] arány 10:1, két egységgel magasabb pH-n 100:1, három egységgel magasabb pH-n 1000:1. Ha a pH egy, kettő, illetve három egységgel alacsonyabb, akkor az [A$^-$]/[HA] arány rendre 1:10; 1:100 illetve 1:1000 lesz. Ezek alapján világos, hogy a pK_a értéknél 2-3 értékkel magasabb pH-n már szinte csak a disszociált (konjugált bázis) forma van jelen, míg a pK_a értéknél 2-3 értékkel alacsonyabb pH-n már szinte csak a nem disszociált (sav) forma van jelen.

2.31. ábrán látható példák jól mutatják, hogy az általános leírásban szereplő HA sav lehet semleges, (pl. ecetsav karboxil), hordozhat egy pozitív töltést (lásd ammóniumion), de lehet egyszeresen, vagy kétszeresen negatívan töltött is (lásd dihidrogén-foszfát és hidrogén-foszfát).

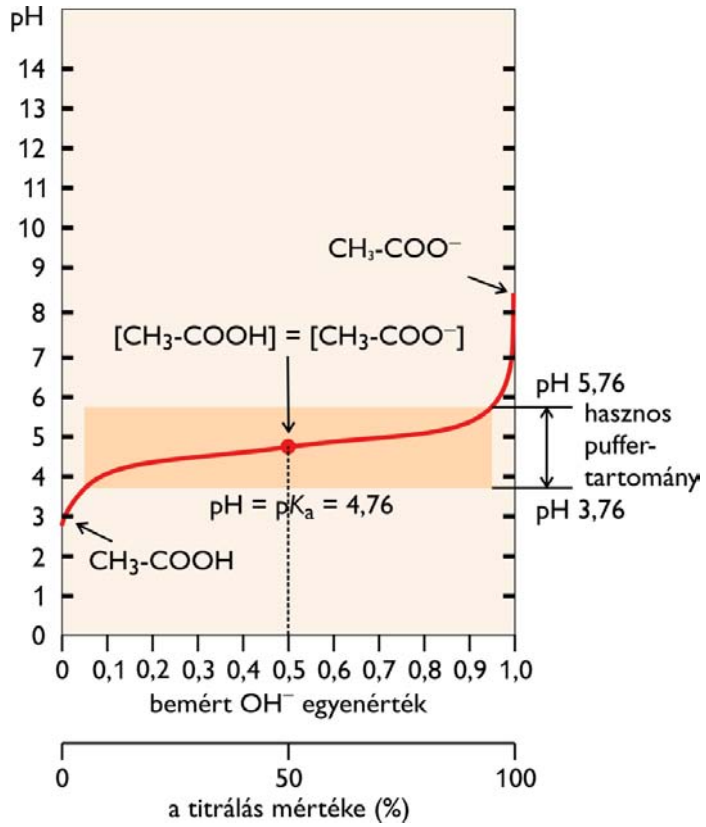
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.31. ábra: Néhány, a biokémia területén fontos vegyület illetve funkciós csoport pK_a értéke

2.5.6. Puffer-hatás

Amennyiben egy vízben gyakorlatilag teljes mértékben disszociáló, tehát erős savat keverünk a vízhez, a pH a sav koncentráció növekedésével meredeken csökken. Ha erős bázist oldanánk be, akkor a pH a bázis koncentráció növelésével meredeken növekedne. Ha azonban ezeket az anyagokat nem tiszta vízbe adagoljuk, hanem a savat egy gyenge bázis oldatába, a bázist pedig egy gyenge sav oldatába, akkor merőben máshogy alakul a koncentráció-pH függvény. Ezt a **2.32. ábra** illusztrálja.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.32. ábra: Pufferhatás: az ecetsav oldathoz adott nátriumhidroxid az ecetsav pK_a értékének környezetében tompított mértékben növeli az oldat pH értékét

Az ábrán illusztrált kísérletben 0,1 M-os ecetsavat (gyenge sav) titrálunk 0,1 M-os NaOH-val, (erős bázis), és mérjük a pH-t. A 0,1 M-os ecetsav oldat pH értéke kiszámolható a K_{sav} definíciójából kiindulva.

Az ecetsav pK_a értéke 4,76, ezért a K_{sav} értéke $10^{-4,76} = 1,76 \times 10^{-5}$ M. A savi disszociációs egyenletből kiindulva tegyük fel, hogy az ecetsav molekulákból X M koncentrációnyi disszociált, tehát (0,1−X) M maradt disszociálatlan. Mivel a víz saját disszociációjából származó 10^{-7} M proton elhanyagolható a beoldott ecetsav koncentrációjához képest, így úgy vesszük, hogy a protonok mind a disszociált ecetsavból származnának, vagyis a proton koncentrációja is X.

$$K_{sav} = 1,76 \times 10^{-5}\mathrm{M} = \frac{(X\mathrm{M})(X\mathrm{M})}{0,1\mathrm{M} - XM} \qquad \textbf{2.14. egyenlet}$$

A további számolás egy másodrendű egyenlethez vezet, amelynek valós gyöke X, vagyis a protonkoncentráció = $1,32\times10^{-3}$ M. Ennek a koncentrációnak a negatív előjelű tízes alapú logaritmusa megadja a pH értékét, ami 2,88. A görbe két végén az ecetsav illetve az acetátion vízzel való reakciójából származó pH-t olvashatjuk le, ebből az egyik értéket az ecetsav vonatkozásában ki is számítottuk.

A görbe szélektől eltérő többi része esetében viszont úgy gondolkodhatunk, hogy amennyi hidroxidion került beoldásra, éppen annyi acetátion keletkezik:

$$HA + OH^- = A^- + H_2O \qquad \textbf{2.15. egyenlet}$$

Tegyük fel, hogy „y” az ecetsav kezdeti mennyisége (nem koncentrációja!), és „x” a hozzáadott hidroxid mennyisége, akkor a disszociált forma (esetünkben acetát) és a nem disszociált forma (esetünkben ecetsav) koncentrációi az alábbiak szerint számolhatók ki:

$$\left[A^-\right] = \frac{x}{V} \qquad \textbf{2.16. egyenlet}$$

illetve:

$$\left[HA\right] = \frac{y-x}{V} \qquad \textbf{2.17. egyenlet}$$

ahol V az aktuális (közös) térfogat. Ezeket az egyenleteket kombinálva a Henderson-Hasselbalch egyenlettel megkapjuk, hogy hogyan változik a pH az x és az y függvényében:

$$pH = pK_a + \log\frac{\frac{x}{V}}{\frac{y-x}{V}} = pK_a + \log\frac{x}{y-x} \qquad \textbf{2.18. egyenlet}$$

Tehát a **2.18. egyenlet** írja le a **2.32. ábrán** látható görbét, amelynek kiindulási értéke a titrálás elején pH ~2,9, a pH az első néhány tized egyenértéknyi NaOH adagolására meredeken emelkedik, majd az emelkedés mértéke csökken.

Az ekvivalencia pont felénél (lásd x = y/2) a titrálási görbének inflexiós pontja van. Itt tehát a pH emelkedésnek lokális minimuma van, e feletti NaOH adagolásnál a pH egyre meredekebben emelkedik. Az ekvivalencia pont

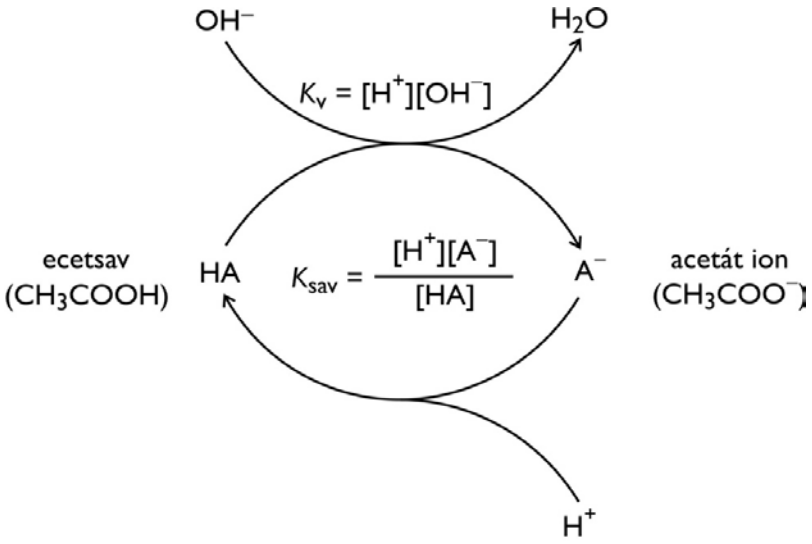
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

felénél feleannyi hidroxidot oldottunk be, mint amennyi ecetsav volt beoldva. Mivel az ecetsav acetát iont képezve elreagál a bemért hidroxidionnal, ebben a pontban az ecetsav fele van éppen acetát ion formában disszociálva, vagyis ez a pH érték mutatja az ecetsav pK_a értékét.

Érdemes megfigyelnünk, hogy a pK_a érték +/− 1 pH egység tartományban a pH csak gyengén, csaknem lineárisan emelkedik a hidroxid bevitelével. Az oldatban lévő gyenge sav mintegy tompítja a hidroxidionok hatását. Eredetileg a német nyelvterületen a puffer elnevezést a vagonok végén lévő rugós ütközőkre vezették be, amelyek tompították az ütközés hatását. Ennek analógiájára vezették be a puffer elnevezést a kémia területére a gyenge savak illetve bázisok pH-változást tompító viselkedése miatt. A puffer-hatás párhuzamos egyensúlyok eredménye, amelyeknek egyidejűleg teljesülniük kell.

Amikor ecetsav oldatba hidroxidionok kerülnek, a vízion-szorzat állandósága miatt a protonkoncentráció le kell, hogy csökkenjen olyan mértékben, hogy a hidroxidion koncentráció és a protonkoncentráció szorzata 10^{-14} M^2 legyen. Ha azonban csökken a protonkoncentráció, akkor az kihat a savi disszociációs állandóval jelzett egyensúlyra is. Ennek az egyensúlynak is változnia kell, máskülönben csökkenne a K_a (K_{sav}) állandó értéke. Az állandó azért marad elnevezéséhez híven változatlan, tehát a rávonatkozó hányados értéke azért marad állandó, mert a számlálóban szereplő, csökkenő protonkoncentrációt a nevezőben szereplő ecetsav disszociációja részben kompenzálja. Végső soron ebben a törtben a számláló és a nevező értéke azonos arányban csökken.

A **2.33. ábra** szerint leegyszerűsítve úgy is jellemezhető a folyamat, hogy a bevitt hidroxidionok közvetlenül ecetsavval reagálnak, így az ecetsav egyfajta protonraktárként működve mérséklik a protonkoncentráció csökkenését. Teljes mértékben nem kompenzálhat az ecetsav, hiszen elreagálva növeli az acetát ionok koncentrációját, amelyek egy része bázisként a víztől proton vesz fel.



2.33. ábra: A puffer hatás párhuzamos egyensúlyok eredménye.

A **2.33. ábra** azt is mutatja, hogy az ecetsav/acetát puffer erős sav beadásakor is mérsékli a pH-változást. Ekkor a mechanizmust legegyszerűbben úgy lehet értelmezni, hogy a sav közvetlenül az acetát ionnak ad át protont, megnő az ecetsav koncentrációja, ezért az extra ecetsavmennyiség egy részének disszociálnia kell. Végső soron azonban kevesebb proton kerül vízmolekulára, mint akkor, ha az acetát nem lett volna az oldatban.

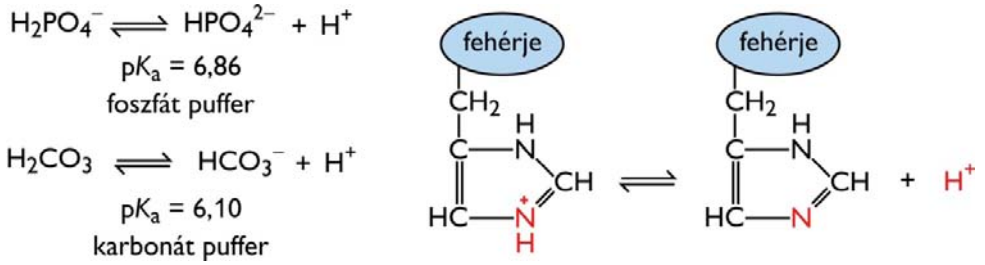
A pufferek működéséből egyértelműen látszik, hogy minden puffer az abban szereplő gyenge sav pK_a értékének közvetlen környezetében (pK_a ±1 pH egység) képes leginkább állandóan tartani a pH-t, és az is nyilvánvaló, hogy minél nagyobb a puffer koncentrációja, annál hatékonyabb a puffer-hatás, annál nagyobb az úgynevezett puffer-kapacitás.

2.5.7. Biológiai pufferek

A biológiai rendszerekben rendkívül fontos a pH szűk tartományban tartása, hiszen a pH függvényében változik számos disszociációra képes molekula, például a fehérjék bizonyos oldalláncainak disszociációs foka, töltése.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

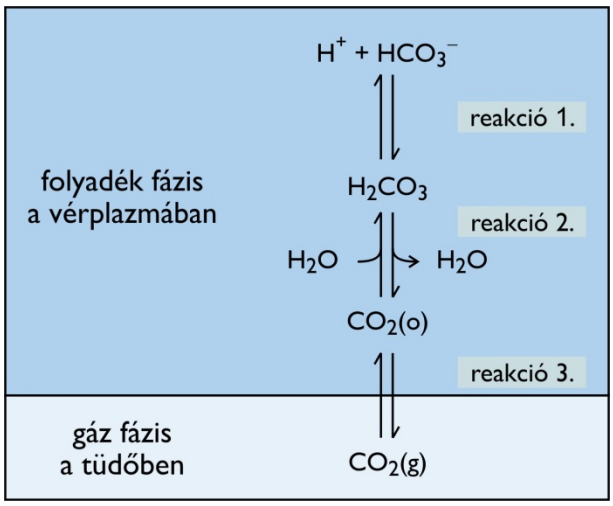
Az **ember vérében a pH ~7,4**-es értéken van, és ez az érték aktív folyamatok révén stabilizálódik. Passzív módon mindazon puffer rendszerek érdemben hozzájárulnak ennek a pH értéknek a stabilitásában, amelyek gyenge sav komponensének a pK_a értéke közel semleges pH értékű. Ebből a szempontból kitüntetett szerepe van a szérum magas foszfátkoncentrációjának, hiszen a **dihidrogén-foszfát / hidrogénfoszfát puffer**ben a dihidrogén-foszfát 6,86-os pK_a értéke ebben a tartományban van, illetve a szérum nagyon magas fehérjekoncentrációja miatt a fehérjék felszínén lévő **hisztidin oldalláncok**nak is, amelyek pK_a értéke ~6,0 (lásd **2.34. ábra**).



2.34. ábra: A vérben működő pufferek

A pH aktív stabilizálásban ugyanakkor a legnagyobb szerepet mégis a **szénsav / hidrogénkarbonát puffer** játssza. Ennek idevonatkozó **pK_a érték 6,1**. Ennek a puffer-rendszernek a központi szerepét az magyarázza, hogy az emberi szervezet mind a szénsav, mind a hidrogénkarbonát ion koncentrációját aktívan tudja szabályozni. A szénsav koncentrációját széndioxid kilégzéssel tudja csökkenteni, míg a hidrogénkarbonát koncentrációját intenzívebb vesén keresztüli kiválasztással.

A szervezet lebontó folyamatainak egyik végterméke a széndioxid. A keletkező széndioxid vízben szénsav formájában oldódik, majd hidrogénkarbonát ionra és protonra disszociál (lásd **2.35. ábra**). Mind az oldódás, mind a disszociálás folyamata reverzibilis. A szénsav pK_a értéke, valamint a szérum pH értéke ismeretében a Henderson-Hasselbalch egyenlet alapján könnyen kiszámolható, hogy pH 7,4-es értéken a szénsav/hidrogénkarbonát ion arány ~20.



2.35. ábra: A vérben működő szénsav / hidrogénkarbonát puffer elemei

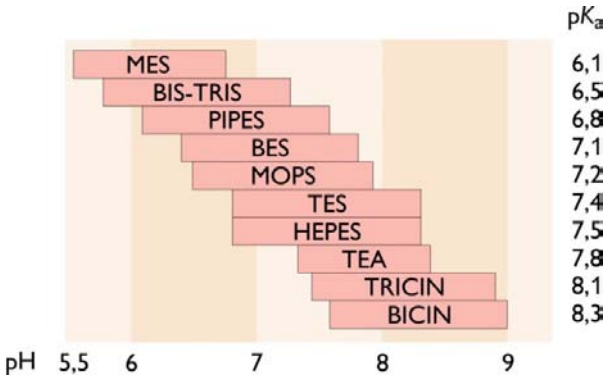
A szabályozás a következő példákkal illusztrálható. Intenzív testmozgás hatására az izmokból tejsav ürül a vérbe. Ez csökkenti a szérum pH-ját. Az agyban lévő speciális receptorok érzékelik a pH akár kismértékű csökkenését is. Válaszként az agy a szervezetet intenzívebb be- és kilégzésre utasítja. Ennek hatására a nagyobb ütemben távozik a tüdőből széndioxid, és az egyensúlyoknak megfelelően csökken a szénsav koncentrációja is a hidrogénkarbonát ion rovására. Ez az aránymódosítás emeli a pH-t. A pH a szérumban emelkedhet erőltetett, túlzott mértékű belégzésnél is. Amennyiben a pH a szérumban növekedne, úgy azt a vesén keresztüli hidrogénkarbonát ion kiválasztással lehet (többek között) normalizálni.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

2.5.8. Biokémiai kísérletekben használt pufferek

Mivel a pH értéke a funkciós csoportok disszociációs állapotán keresztül kritikus mértékben befolyásolhatja a molekuláris folyamatokat, **a biokémiai kísérletek során a pH értékét precízen be kell állítani, és stabilan kell tartani**. A megfelelő puffer kiválasztásánál az alábbi fő szempontokat kell figyelembe venni.

Abeállítani kívánt pH ismeretében olyan puffert kell választani, amely gyenge sav komponensének pK_a értéke nagyon közel van a kívánt pH értékéhez. A puffer koncentrációjának kellően magasnak kell lennie annak érdekében, hogy megfelelően nagy legyen a puffer-kapacitás. A puffernek olyan molekulának kell lennie, amely nem befolyásolja a vizsgált folyamatot: nem kötődik semmilyen oldatkomponenshez, illetve nem lép kémiai reakcióba egyik oldatkomponenssel sem, tehát nem alakul át. Ezek miatt a követelmények miatt a kutatók biológiai pufferek helyett általában olyan szintetikus molekulákat használnak, amelyek nem fordulnak elő az élő rendszerekben. A **2.36. ábra** ezekre mutat néhány példát.

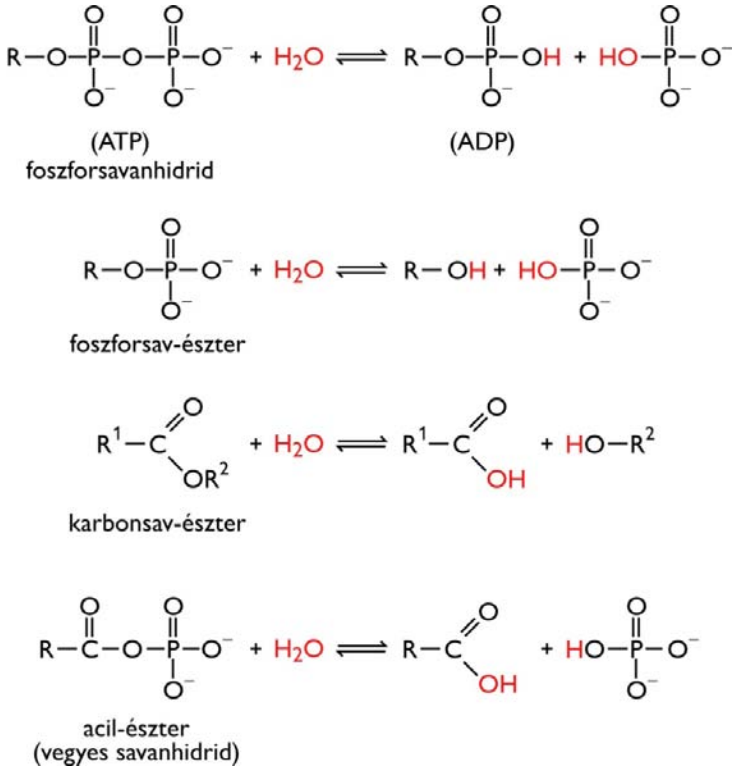


2.36. ábra: A biokémiai kísérletekben gyakran használt, nem biológiai eredetű pufferek

2.5.9. A víz, mint reakciópartner

A **víz** nem csak oldószerként, a hidrofób hatáson keresztüli „szervezőként”, savbázis reakciókban proton közvetítőként játszik fő szerepet az életfolyamatoknak, de számos kémiai folyamatban meghatározó **reakciópartner** is. Ezek közül a leggyakoribb a **hidrolízis**, melynek során egy molekula „vízbelépés” közben két másik molekulára bomlik. Ilyen reakciókra mutat példákat a **2.37. ábra.**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



2.37. ábra: A hidrolízis típusú reakciókban a víz reakciópartnerként szerepel

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

3. fejezet - A termodinamika alapjai

(szerző: Pál Gábor)

A termodinamika alapjainak ismerete elengedhetetlen ahhoz, hogy megértsük az élő rendszerek működését. A termodinamika törvényei áthatják az élő rendszerek minden szerveződési szintjét a molekuláktól a sejten és az egyeden át a globális ökoszisztémáig.

Az alábbi néhány kiragadott példa jól illusztrálja a termodinamika általános, központi jelentőségét a biokémiai területén.

Amint azt már korábban láttuk, a molekulák másodlagos kölcsönhatásokon keresztül komplexeket alkothatnak egymással. Azt, hogy egyensúlyi állapotban milyen arányban lesz jelen a komplex és az azt alkotó komponensek, termodinamikai törvények szabják meg.

A makromolekulák elvileg hatalmas számú különböző konformációs állapotban lehetnek. A makromolekulák jelentős része, lásd pl. a globuláris (gömbszerű) fehérjék, vagy a kettősszálú DNS, mégis egyetlen jellegzetes, funkcióképes, más szóval natív konformációban van jelen. Ez a konformáció is másodlagos kölcsönhatásokon keresztül jön létre, de ebben az esetben döntően molekulán belüli csoportok között alakulnak ki ezek a kölcsönhatások. A natív konformáció létrejöttében meghatározó szerepe van a már ismertetett hidrofób hatásnak, amelyről említettük, hogy kizárólag termodinamikai fogalmakkal értelmezhető. Miközben a makromolekula elnyeri rendezett, natív térszerkezetét, apoláros molekularészek válnak a víz számára hozzáférhetetlenné. Azok a vízmolekulák, amelyek korábban az apoláros részek köré rendeződtek, rendezetlenebb állapotba kerülnek. Azt, hogy egyensúly esetén milyen arányban találjuk meg a natív konformációt egyéb konformációkhoz képest, szintén a termodinamika diktálja.

A kémiai reakciók irányát, a kialakuló egyensúlyi állapot koncentrációviszonyait, az egységnyi kémiai átalakulás révén végezhető maximális munkát szintén termodinamikai törvények diktálják. Termodinamikai fogalmakon keresztül értelmezhető az is, hogy miért van szükség a külvilágtól világosan elhatárolt sejtre, illetve miként képesek a sejtek az anyagcsere folyamatok révén előállítani a rájuk jellemző vegyületeket, és fenntartani összetett állapotukat.

Azt, hogy mi szabja meg a kémiai reakciók sebességét, és hogyan képesek az enzimek gyorsítani ezeket a reakciókat szintén termodinamikai fogalmakon keresztül értelmezhetjük.

A termodinamika megértés szintű befogadása sokaknak kihívást jelent. Ennek egyik oka bizonyára az, hogy a termodinamika olyan elvont fogalmakat használ, amelyek általában nehezen köthetők mindennapi tapasztalati ismeretekhez. Ilyen például a belső energia, az entalpia, vagy a szabadentalpia fogalma. Ebben az elektronikus tankönyvben megpróbáltuk a lehető legegyszerűbben, közérthetően összefoglalni a termodinamikai alapokat. A közérthetőség mellett kifejezett célunk volt, hogy olyan ismereteket foglaljunk össze, amik valóban elengedhetetlenek a biokémia által vizsgált, fent már említett témakörökben. Első lépésben ismerkedjünk meg a termodinamika alapfogalmaival.

3.1. A termodinamika alapfogalmai

Rendszer

A termodinamika központi alapfogalma a rendszer. A rendszer a világegyetem egy olyan, tanulmányozásra kiválasztott része (pl. egy sejt, egy reakcióedény, stb.) aminek **jól definiált határ**ai vannak. Ez a jól definiált határ tehát elengedhetetlen kritérium.

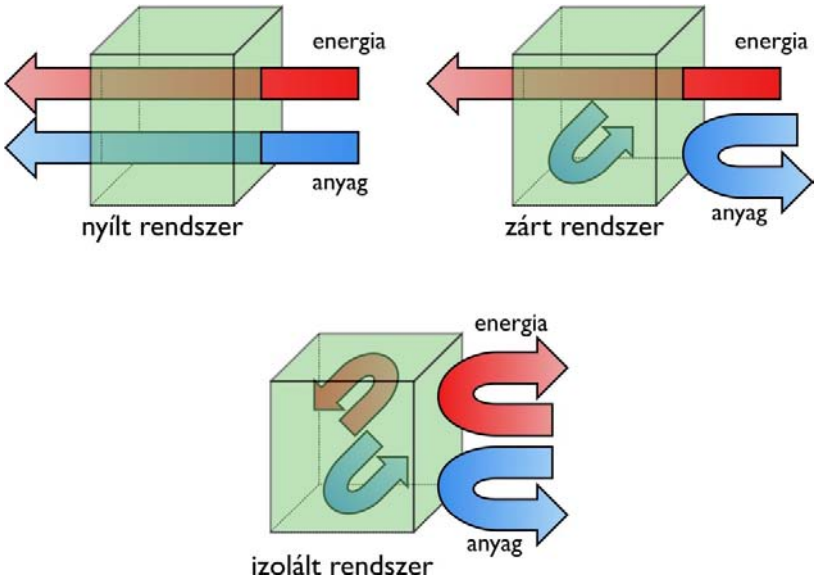
Környezet

A környezet a világegyetem rendszeren kívüli része. Ez a felosztás nem jelent valamilyen alá fölé rendeltséget. A rendszer működésének megismerését célzó méréseket gyakran nem magában a rendszerben, hanem az azzal kapcsolatban álló környezetben végezzük.

Rendszer típusok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A rendszernek három, jól elkülöníthető típusa van. Attól függően, hogy a rendszer és a környezete közötti **határfelül**etnek milyen jellemzői vannak, **a rendszer lehet nyílt, zárt, vagy izolált** (lásd **3.1. ábra**).



3.1. ábra: A termodinamikai rendszerek három típusa

A rendszer típusa nyílt, ha a rendszer és a környezete közötti határfelületen anyag és energiaátáramlás is megengedett. A rendszer típusa zárt, ha az energiaátáramlás megengedett, de anyagátáramlás nem. Az izolált típusú rendszerben a határfelületen sem energiaátáramlás, sem anyagátáramlás nem történhet. (A negyedik elméleti kombináció, amelyben csak anyagátáramlás lenne, energiaátáramlás nem, valójában nem értelmezhető, mivel az anyagátáramlás egyben energiaátáramlást is jelent.)

Energia (E)

További alapfogalom az energia. Az energia meglehetősen elvont fogalom, amit talán azért is nehéz intuitíve befogadni, mert az energia mindig csak közvetett módon figyelhető meg. Egy leegyszerűsített definíció szerint az energia munkavégző képességet jelent, azonban a munka az energia egy speciális formája, azaz a meghatározás ilyen formában nem sokat mond.

Az energiának ráadásul nagyon sok válfaja, konkrét megjelenési formája van (kinetikus energia, sugárzási energia, kémiai energia, nukleáris energia, gravitációs energia stb.). A termodinamikában megkülönböztetünk egy belsőenergiának nevezett fogalmat is, amiről nemsokára szó lesz.

A legkülönbözőbb formákban jelentkező energiának van egy alapvető jellemzője. **Az energia**, bármilyen formájú legyen is, **elengedhetetlen feltétele a fizikai munkavégzésnek**.

Munka (w)

A fizikai **munka** kifejezhető **valamilyen erővel szembeni elmozdulással**. Mértékegysége ennek megfelelően egységnyi erő (Newton) szorozva egységnyi elmozdulással (méter). A Nm mértékegység természetesen nem más, mint az energia SI mértékegysége, a Joule (J).

Konkrét eseteket tekintve fizikai munkát végezhet például egy tágúló gáz, amely egy dugattyú segítségével a gravitációs erő ellenében súlyt emel. Összetettebb módon, de például kémiai reakcióval is végezhető munka, akár úgy, hogy a kémiai reakció áramot termel, amivel ugyancsak súly emelhető stb.).

Ha egy zárt rendszeren munkát végzünk, akkor ezáltal növeljük a rendszer munkavégző képességét, vagyis energiáját. Ha viszont a rendszer végez munkát a környezetén, akkor csökken a rendszer munkavégző képessége, tehát energiája. A **munkavégzés** definíciójából fakadóan mindig **rendezett formájú energiaáramlás**t jelent.

Hő (q)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A magasabb hőmérsékletű testből az alacsonyabb hőmérsékletűbe energia áramlik át, amit hőnek nevezünk. A magasabb hőmérsékletű test energiája, tehát munkavégző képessége nagyobb, mint az ugyanolyan, de alacsonyabb hőmérsékletű testé. Amikor a rendszer hőt ad le a környezetének, az energiája csökken, amikor hőt vesz fel a környezetétől, akkor az energiája növekszik.

A hőátadás (a munkavégzéssel szemben) **rendezetlen formájú energiaáramlás**. (Érdemes megjegyezni, hogy a termodinamikai hőmérséklet fogalom, éppen a fenti jelenségen keresztül került bevezetésre. A nulladik főtételnek nevezett törvény szerint azok a rendszerek, amelyek közötti a határfelület lehetővé teszi a hőátadást, de amelyek között nem történik hőcsere, egy termodinamikai paraméterükben megegyeznek. Ez a paraméter a hőmérséklet.)

A rendszer és a környezete közötti határfelület hőáteresztő képessége szerint megkülönböztetünk **adiabatikus** és **diatermikus határfelület**et. A rendszer és környezete közötti határ adiabatikus, ha hőátadást nem tesz lehetővé, és diatermikus, ha a hőátadást lehetővé teszi.

Szintén a hővel kapcsolatban a rendszerben zajló folyamatok (pl. fázisátalakulás, vagy kémiai reakció) is kétfélék lehetnek. A rendszerben lezajló folyamat **exoterm,** ha annak során **hő szabadul fel**. Adiabatikus határfelület esetén, (tehát amikor a rendszer nem tudja leadni a hőt a környezetnek), a rendszer hőmérséklete emelkedik. Diatermikus határfelület esetén ugyanakkor a rendszer hőmérséklete (legalábbis az egyensúly beálltával) nem lesz magasabb, a rendszer a hőt a környezetnek adja le.

A rendszerben lezajló folyamat (pl. fázisátalakulás, vagy kémiai reakció) **endoterm**, ha annak során a rendszer energiájának egy része **hő-abszorbció**val (elnyelődéssel) változik. Adiabatikus esetben a rendszer hőmérséklete ilyenkor csökken, diatermikus esetben a rendszer hőmérséklete (az egyensúlyt elérve) nem változik, mert a rendszer a környezetből hőt vesz fel.

Belső energia (U)

A rendszer teljes energiája a belső energia (U), ami megegyezik azzal az energiával, ami az adott rendszer létrehozásához szükséges. **A belső energia tartalmazza a rendszer összes molekulájának mozgási energiáját** (haladó mozgás, forgás, rezgések) **és helyzeti energiáját** (amelyek különböző formái közül számunkra a kémiai kötésekben rejlő potenciális energia lesz releváns). A belső energia egy absztrakt fogalom. Pontos mennyisége általában nem meghatározható, de általában nem is fontos a számunkra. Amivel ellenben a termodinamika jellemzően foglalkozik, az a belső energia megváltozása, ami viszont mérhető. A belső energia **állapotfüggvény**, vagyis kizárólag a rendszer pillanatnyi állapotától függ, attól, hogy milyen módon került az adott állapotba, független.

Ezzel összefüggésben egy folyamatnál a belső energia változását (ΔU) megkapjuk, ha a végső belső energiából levonjuk a kezdetit: $\Delta U = U_{\text{végső}} - U_{\text{kezdeti}}$.

A belső energia **extenzív** tulajdonság, mert függ az anyag-mennyiségtől (ugyanúgy, ahogy például a tömeg és a térfogat is). Az extenzív tulajdonságok összeadódnak, szemben az anyagmennyiségtől független **intenzív** tulajdonságokkal, amilyen pl. a hőmérséklet, a nyomás, vagy a sűrűség. Ez utóbbi tulajdonságok nem összeadódnak, hanem kiegyenlítődnek.

3.2. A termodinamika első főtétele

A termodinamika első főtétele szerint egy rendszer belső energiáját kétféle módon lehet megváltoztatni: munkavégzéssel (w), vagy hőközléssel (q): $\boldsymbol{\Delta U = q + w}$. Ez a megállapítás tapasztalaton alapul. Izolált rendszerben egyik sem történhet, és ezzel kapcsolatban belátható, hogy az izolált rendszer belső energiája nem változik. Ez valójában nem más, mint **az energia megmaradásának** (szintén tapasztalaton alapuló) **elve**.

Az első főtétel mutatja a hő és a munka egyenértékűségét is. A hő és a munka ugyanannak az értéknek (az energiának) két különböző valutája. A munka és hő az energiaátadás különböző formái. Mint láttuk, az egy értelmezhető kérdés, hogy egy rendszernek mekkora a belsőenergiája. Az azonban értelmetlen kérdés, hogy egy rendszernek mekkora a „hőtartalma” vagy a „munkatartalma”. A munka és a hő mindig energia „változás közben”. Ennek megfelelően **a hő és a munka nem állapotfüggvények!** Ugyanazt a belső energia változást végtelenül sokféle q és w összege eredményezheti!

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Bár erről már korábban is esett szó, alapvető jelentőségű a termodinamikában bevezetett előjel-konvenció, amely az energiacserét a rendszer belső energia változásának tükrében értékeli. A munka pozitív előjelű ($w > 0$), ha a környezet végez munkát a rendszeren, illetve a hő pozitív előjelű, ($q > 0$), ha a környezet közöl hőt a rendszerrel. Ezekben az esetekben ugyanis az energiaátadás növeli a rendszer belsőenergiáját. Ennek megfelelően a munka negatív előjelű, ($w < 0$), ha a rendszer végez munkát a környezeten, illetve a hő negatív előjelű ($q < 0$), ha a rendszer közöl hőt a környezettel. Ezekben az esetekben ugyanis a rendszer belsőenergiája csökken.

3.3. Az entalpia fogalmának bevezetése

Az **entalpia a rendszer összes energiája**, ami a belsőenergián (a rendszer létrehozásához szükséges energia) kívül még azt az extra energiát is tartalmazza, ami ahhoz kell, hogy a V térfogatú rendszer számára helyet készítsünk egy állandó p nyomású környezetben: $\boldsymbol{H = U + pV}$.

Az entalpia láthatólag összetettebb fogalom, mint a belső energia, ezért azonnal felmerülhet az olvasóban, hogy mi az értelme annak, hogy bevezetésre került.

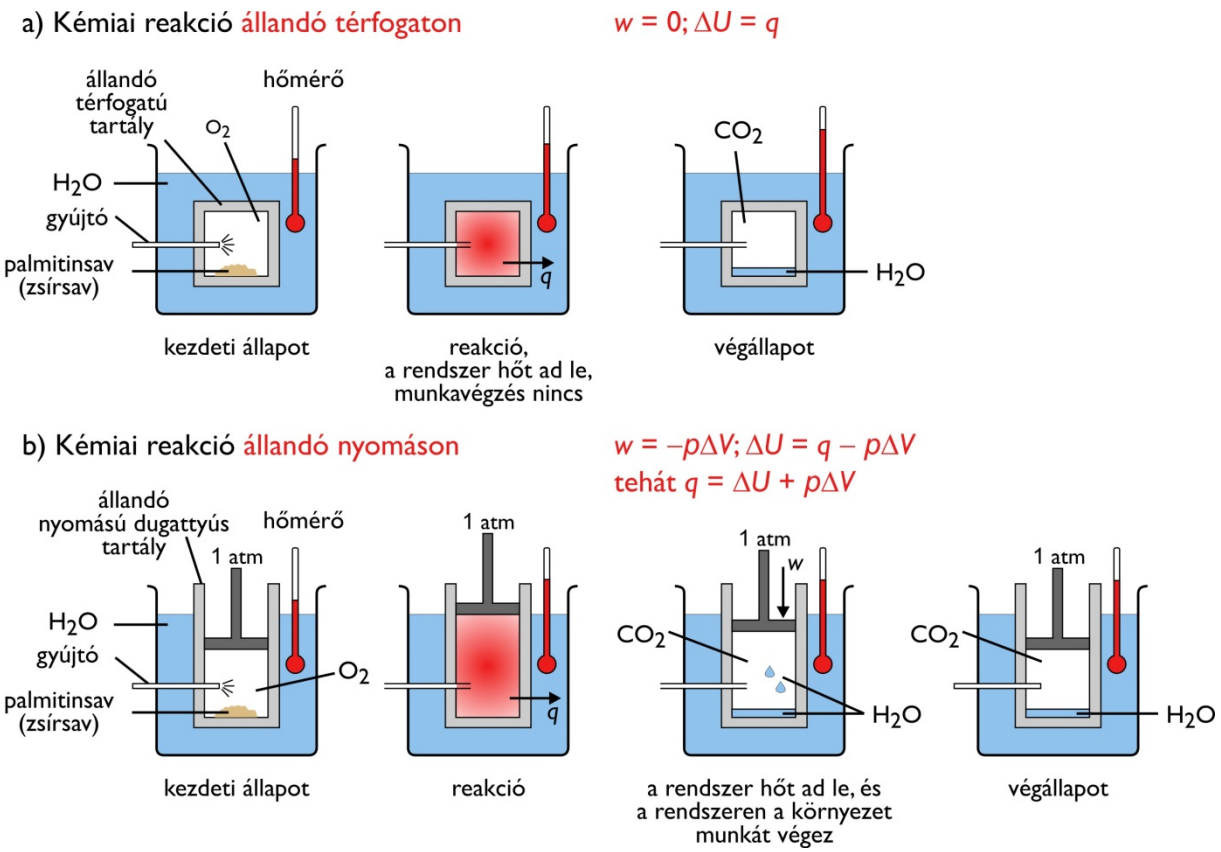
Mielőtt ezt megértenénk, nézzük meg az alábbi két mérést (lásd **3.2. ábra**). Mindkét mérésben egy-egy tartály merül vízbe. A tartályon belüli térrész a rendszer, a víz reprezentálja a környezetet. A tartályok fala egy diatermikus határfelület, tehát hőcsere történhet. Anyagátáramlás nem történhet, a kísérletben tehát zárt rendszereket vizsgálunk. A tartályba mindkét kísérlet során adott (azonos) mennyiségű zsírsav kerül, és annyi oxigén, amennyi a zsírsav teljes oxidációjához elegendő. A kémiai reakció eredményeként széndioxid és víz keletkezik. Ezek mennyisége természetesen mindkét mérésben azonos. A mérésekkel azt határozzuk meg, hogy a kémiai reakció során mennyi hő szabadul fel. A két kísérlet elrendezése némileg eltérő. Az egyik mérés során a tartály térfogata állandó, míg a másik esetben az egyik fal dugattyúszerűen mozoghat, tehát a tartály térfogata változhat. Ebben a második esetben a tartályban lévő nyomás lesz állandó, megegyezik a külső légnyomással.

A konkrét példában 1 mól palmitinsav teljes oxidációja zajlik:

$$CH_3(CH_2)_{14}COOH_{\,(szilárd)} + 23\ O_{2\,(gáz)} \rightarrow 16\ CO_{2\,(gáz)} + 16\ H_2O_{\,(folyadék)}$$

A folyamat során kémiai kötésekben tárolt energia, vagyis a belső energia potenciális energia típusú energiájának egy része szabadul fel, és adódik le a környezetnek hő formájában. Ezt a hőt a tartályt körülvevő víz hőmérsékletének megváltozásán keresztül határozzuk meg a víz tömegének, és a víz fajlagos hőkapacitásának ismeretében ($Q = cm\Delta T$, ahol c a fajlagos hőkapacitás, m a víz tömege, és ΔT a hőmérsékletváltozás). Vegyük észre, hogy bár egy, a rendszerben zajló folyamatot vizsgálunk, maga a mérés a környezetben történik. Ezt a kísérletes elrendezést kaloriméternek nevezzük (lásd **3.2. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



3.2. ábra: Azonos kémiai reakció során eltérő mennyiségű hő szabadul fel attól függően, hogy a reakció állandó térfogaton, vagy állandó nyomáson zajlik-e le

Az állandó térfogaton végbemenő kémiai reakció eredményeként a rendszer hőt ad le a környezetének, de munkavégzésre nem kerül sor, hiszen nem történik semminemű anyagelmozdulás valamiféle erő ellenében. Ebben az első esetben tehát: $w = 0$; $\Delta U = q$.

A konkrét példában a rendszer által leadott (negatív előjelű!) hő alapján: $\Delta U = q = -9941{,}4$ kJ.

Az állandó nyomáson végbemenő kémiai reakció eredményeként a rendszer szintén hőt ad le a környezetének. A konkrét példában ennek mértéke: $q = -9958{,}7$ kJ. A második esetben tehát ugyanaz a kémiai reakció 17,3 kJ-lal nagyobb mértékű hőleadást eredményezett! Márpedig a két esetben a két rendszer belső energiája ugyanolyan mértékben kellett, hogy megváltozzon, hiszen egymással összehasonlításban azonos kiindulási anyagokból azonos végtermékek keletkeztek.

A második kísérletet során, a kezdeti és a végső állapot összehasonlításából kiderül, hogy a folyamat végén beálló egyensúlyban a tartály térfogata kisebb, mint kezdetben volt (ez a **3.2. ábrán** nem látszik, mivel kicsi a térfogatkülönbség, de kísérletesen jól mérhető). A külső (állandó) légnyomás tehát benyomta a dugattyút. Ez azt jelenti, hogy a környezet munkát végzett a rendszeren, tehát növelte annak belső energiáját! Vajon mi ennek a térfogatcsökkenésnek az oka? A kiindulási állapotban a 23 mólnyi gáz volt jelen oxigénmolekulák formájában. A végállapotban ugyanakkor csak 16 mólnyi gáz van jelen széndioxid formájában. Ez a különbség eredményezi a dugattyú benyomódását.

A második mérési elrendezésnél tehát az általános $\Delta U = q + w$ esetet kell figyelembe vennünk. A környezetnek leadott hő az előzőekben említett módon mérhető, és mint láthattuk, 17,3 kJ-lal meghaladta az állandó térfogatú mérés során kapott értéket. Kérdés, hogy a rendszeren végzett munka hogyan határozható meg. A külvilág által végzett munka a munka definíciójából fakadóan az erő, és az erővel szembeni elmozdulás szorzata: $w = -F \times \Delta r$. A negatív előjel azért szükséges, mert az r a rendszer szempontjából nézve csökken, tehát Δr negatív, miközben a rendszer szempontjából a rajta végzett munka pozitív előjelű. A fenti egyenletet könnyen átalakíthatjuk, hogyha figyelembe vesszük, hogy az erő felírható a nyomás (ebben az esetben a külső légnyomás) és a felület (ebben az esetben a dugattyú felülete) szorzataként:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$w = -p \times A \times \Delta r = -p \times \Delta V$.

A korábban az elmozdulásra vonatkozó negatív előjel ebben az átalakított formában még inkább nyilvánvaló: a rendszer térfogata a folyamat során csökkent, tehát a térfogatváltozás negatív előjelű. A $p \times \Delta V$ tagot tehát −1-el meg kell szorozni ahhoz, hogy a termodinamikai előjel koncepcióval egyezően a rendszeren a környezet által végzett munka pozitív legyen. Az így definiált $-p \times \Delta V$ munka természetesen mérhető, és 17,3 kJ-nak adódik.

A belső energia változása állandó nyomáson:

$\Delta U = q + w = q + (-p\Delta V) = -9958{,}7 \text{ kJ} + 17{,}3 \text{ kJ} = -9941{,}4 \text{ kJ}$

Ez azt jelenti, akár állandó térfogaton, akár állandó nyomáson ment végbe, ugyanaz a kémiai reakció ugyanakkora belső energia változással járt. A belső energia változás hő és munka-komponense ugyanakkor a két esetben eltért. Az állandó nyomáson végbement reakció esetében éppen annyival több hőt adott le a rendszer, mint amekkora munkát végzett rajta a környezet.

Vajon mi is ezek alapján az előnye annak, hogy bevezették az entalpia belsőenergiánál összetettebb fogalmát? Kísérletesen legegyszerűbben a hőcsere mérhető, de mint láttuk, hőcsere nem mindig adja meg a belső energia változását, hiszen a munkavégzést (pl. térfogati munkát) is figyelembe kell venni. A reakciókat egyszerűbb állandó nyomáson lejátszatni, mint állandó térfogaton. Olyan állapotfüggvényt érdemes bevezetni, aminek változása **állandó nyomáson** megegyezik a jól mérhető hőcserével, **ha a térfogati munkán kívül nincs másfajta munka**. Ez **az állapotfüggvény** nem más, mint **az entalpia**.

Az entalpia definíció szerint: $H = U + pV$. Állandó nyomáson az entalpia megváltozása így írható fel: $\Delta H = \Delta U + p\Delta V$. Ezt átrendezve: $\Delta U = \Delta H - p\Delta V$. Mint láttuk, a térfogati munka így írható fel: $w = -p\Delta V$. Ebből következően tehát: $\Delta U = \Delta H + w_{térf.}$

Mivel az első főtétel szerint: $\boldsymbol{\Delta U = q + w}$, ezért **állandó nyomáson, ha nincs más munka, mint térfogati:**

$\Delta H = q$.

Mivel U, p és V állapotfüggvények, ezért H is állapotfüggvény, tehát értéke nem függ attól, hogy hogyan jutott a rendszer az adott állapotba. Ebből következően megváltozása egyszerűen kifejezhető az alábbiak szerint: $\Delta H = H_{végső} - H_{kezdeti.}$ Mivel H értékének változása pusztán a kezdeti és végállapotok különbsége, az állandó nyomáson kalorimetriásan meghatározott ΔH reakcióhő szempontjából mindegy, hogy az előző példában szereplő palmitinsav milyen reakció útvonalon oxidálódik.

Az állandó nyomású kaloriméterben meghatározott ΔH érték tehát érvényes a sejtben, állandó nyomáson lezajlódó folyamatra is, hiszen a végtermékek (széndioxid és víz) azonosak! Mindez annak ellenére igaz, hogy a mérés során a palmitinsav közvetlenül reagált oxigénnel, míg a sejtekben a palmitinsav egy rendkívül összetett, soklépéses folyamatban alakul át végső soron széndioxiddá és vízzé. A palmitinsav (és bármely más szerves anyag) sejtes oxidációra vonatkoztatható „kalóriatartalma” tehát egyszerű fizikokémiai méréssel meghatározható! Ez az érték végső soron azt mutatja meg, hogy az élőlényekre is jellemző állandó nyomáson lezajló kémiai reakciót kísérő belső energiaváltozásnak mekkora az a része, amely nem térfogati munkaként jelentkezik. Ez az adat a biokémia számára különösen fontos, mivel a térfogati munkát az élőlények nem tudják hasznosítani (az élőlények nem hőerőgépek!). Ezért az így meghatározott energiamennyiség egy felső korlátot ad arra, hogy a kémiai reakció során felszabaduló energiából legfeljebb mennyi fordítható térfogati munkától eltérő, hasznos munkára. Amint azt a termodinamika második főtétele kapcsán nemsokára látni fogjuk, az **entalpiaváltozásnak csak egy részét lehet nem-térfogati munkára fordítani. Ezt a** hányadot hívjuk majd **szabadentalpiá**nak.

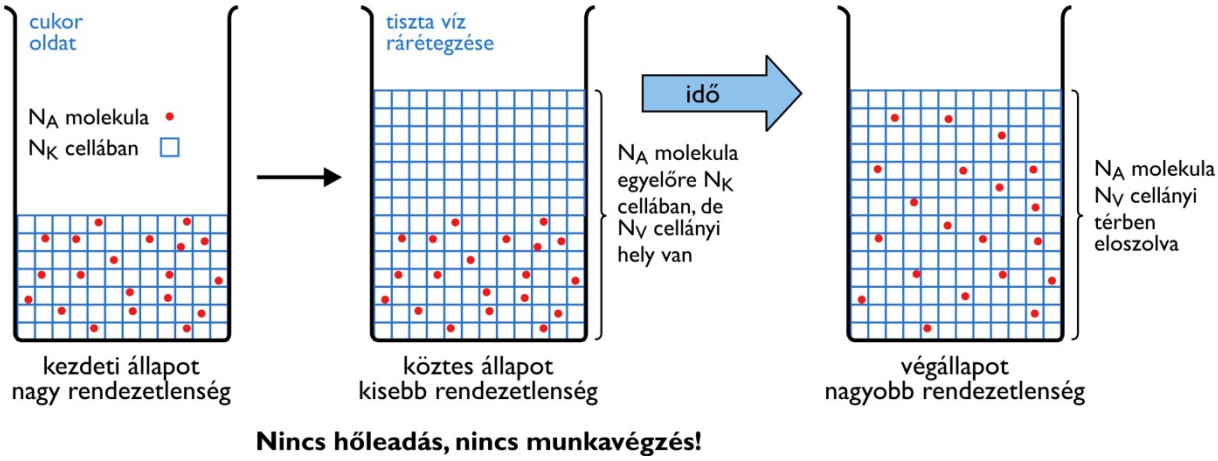
3.4. A termodinamika második főtétele

A termodinamika második főtételének sokféle megfogalmazása létezik. Mindegyik azzal a tendenciával kapcsolatos, miszerint a kinetikai és potenciális energiafajták idővel egyenletesen szétoszlanak a természetben. Ez a szétoszlás egyirányú. **A termodinamika második főtétele** tehát ezzel az energia „szétterüléssel”, **a folyamatok irányával, egyes folyamatok megfordíthatatlanságával** (irreverzibilitásával) **foglalkozik.** Mint látni fogjuk, ezen folyamat előrehaladottságának a mértékét egy nagyon érdekes mutató, az entrópia adja meg. **A második főtétel egyik** tömör megfogalmazása a következő: **izolált rendszer entrópiája maximális érték felé tart.**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az első főtétel egyfajta könyvelői energiamérleg, ami semmit nem mond az energia áramlásának lehetséges irányairól. Nem foglalkozik például azzal, hogy áramolhat-e spontán folyamatban hő az alacsonyabb hőmérsékletű rendszerből a magasabb hőmérsékletű felé. Egyszerűen azt konstatálja, hogy amennyiben áramolna, mekkora lenne a két rendszer belső energia változása. Az első főtétel egyenlete azt is sugallja, mintha a hő és a munka tökéletesen egyenértékű lenne. Márpedig tapasztalati tény, hogy a munka formájában közölt energia ugyan tökéletesen hővé alakulhat, de fordítva nem így van. A hő formájában átadott energiának mindig csak egy bizonyos százaléka fordítódhat munkavégzésre, a folyamat hatásfoka soha nem száz százalékos.

Tapasztalati tény, hogy vannak önmaguktól végbemenő, szakszóval spontán folyamatok, és vannak olyanok, amik végbemeneteléhez energia-befektetés kell. A spontán folyamatok irreverzibilisek, csak egyik irányban zajlanak le. Vajon mi szabja meg ezeknek a folyamatoknak az irányát? Alacsonyabb belső energia (U) felé „törekvés”? Ez részben igaz, de van egy másik faktor is. Ez a másik faktor legnyilvánvalóbban olyan spontán folyamatok során érhető tetten, amelyeket nem kíséri a belső energia változása, mégis egyirányúak, megfordíthatatlanok. A **3.3. ábra** egy ilyen folyamatot illusztrál.



3.3. ábra: Az entrópia statisztikus alapon történő bevezetése egy belsőenergia változással nem járó, spontán végbemenő, visszafordíthatatlan folyamat példáján

A példában egy V térfogatú, híg cukoroldatra rétegezünk V térfogatú vizet. Tapasztalati tény, hogy a cukormolekulák idővel tökéletesen egyenletesen oszlanak el a $2V$ térfogatú oldatban. Ez egy spontán végbemenő, irreverzibilis folyamat. A fordított folyamat, tehát az, hogy az összes cukormolekula spontán összegyűljön az eredeti „alsó” térrészbe, nem zajlik le. A folyamatot nem kíséri a belső energia változása, hiszen sem hőcsere, sem munkavégzés nem történik. Vajon mi „hajtja” ezt a folyamatot? Mi változik a folyamat során?

Részletesebben megvizsgálva a kérdést belátható, hogy a cukormolekulák egyenletes eloszlásának egyszerű statisztikai oka van. Az, hogy a „fele lent, fele fent” állapot sokkal többféleképpen valósulhat meg, mint az, hogy az összes cukor molekula „lent van”. Olyan nagymértékben haladja meg az egyenletes eloszlás valószínűsége a rendezett eloszlását, hogy praktikusan soha nem áll újra elő semmilyen, a tökéletesen egyenletes, rendezetlen eloszlástól eltérő állapot. Ez matematikailag szabatosan kifejezhető az alábbiak szerint:

Az egyszerűség kedvéért csak a két említett térrészt vegyük figyelembe, és tegyük fel, hogy N db cukormolekula van. Ekkor ezek mikroszkopikus szinten 2^N különböző módon rendeződhetnek el a két térrész között, hiszen minden egyes molekula vagy éppen „fent” van, vagy éppen „lent” van, és az egyes molekulák kétféle elhelyezkedési lehetőségét kell egymással N-szer összeszorozni.

Mivel a cukormolekulák egyformák, ezért jóval kevesebb, összesen $N + 1$ makroszkopikusan megkülönböztethető állapot lehetséges, amelyekben rendre 0, 1, 2, ..., $N - 1$, vagy N db molekula van éppen „lent” (míg a többi éppen „fent” van).

Az az állapot, amelyben mindegyik molekula „lent” van, csak egyféleképpen valósulhat meg. Az az eset, amikor 1 db van „fent”, N-féle módon valósulhat meg. Általánosságban az alábbi egyenlettel számolható ki, hogy hányféleképpen valósulhat meg, hogy L darab van az egyik térfélben, és N-L darab a másikban:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$W_L = \frac{N!}{L!(N-L)!}$$ **3.1. egyenlet**

A W_L mérőszám tehát azt mutatja meg, hogy egy adott makroszkopikus elrendeződés mögött hány mikroszkopikus elrendeződés lehetséges. Egy adott elrendeződés valószínűségét a $W_L/2^N$ hányados adja meg, amelyben az adott makroszkopikus elrendeződést lehetővé tévő mikroszkopikus elrendeződések számát elosztjuk az összes lehetséges mikroszkopikus elrendeződések számával.

Nagy N esetén az $L = N/2$ makroszkopikus állapothoz tartozó $W_L/2^N$ valószínűség minden egyéb lehetséges makroszkopikus elrendeződés valószínűségénél nagyobb, mégpedig olyan jelentős mértékben nagyobb, hogy praktikusan csak ez az állapot jön létre.

3.4.1. Az entrópia fogalmának statisztikus bevezetése

A W mérőszám megmutatta, hogy egy rendszer hányféleképpen valósíthat meg egy adott makroszkopikus elrendezést. Nagy „N” elemszámnál W kezelhetetlenül nagy. Boltzmann (1877) bevezette a **statisztikus entrópia** fogalmát, ami a W természetes alapú logaritmusával arányos: $\boldsymbol{S = k_b \ln W}$, **ahol S az entrópia, míg a k_b a Boltzmann állandó**. S, vagyis **az entrópia a rendezetlenség mértéke**, hiszen tökéletesen rendezett állapotnál, ami csak egyféleképpen valósítható meg (pl. tökéletes kristály), $W = 1$, és az egyenlet szerint $S = 0$.

A korábban már látott belső energiához és entalpiához hasonlóan ***S* is állapotfüggvény**, hiszen értéke nem függ attól, hogy hogyan jutott a rendszer az adott állapotba. Az ***S* is extenzív**, tehát összeadódó. A Boltzmann-féle bevezetésben az összeadódás oka az, hogy az entrópiát bevezető egyenletben logaritmus szerepel. Tegyük fel, hogy egyesítünk két rendszert. Az egyik W_1 féle mikroszkopikus állapotban lehetett, a másik W_2 féle állapotban lehetett. Az egyesített rendszer $W_1 \times W_2$ féle mikroszkopikus állapotban lehet. A logaritmus szabályai szerint a szorzat logaritmusa egyenlő a szorzótényezők logaritmusainak összegével, vagyis a két rendszer entrópiája összeadódik.

A korábbi példában az izolált rendszer egy alacsony S állapotból indult, és a reakció végállapotában az S maximális értéket vett fel.

A termodinamika már említett **2. főtétele szerint az izolált rendszer entrópiája maximális érték felé tart.** Vegyük észre, hogy ez az állítás egyenértékű a következő kijelentéssel: minden izolált rendszerben (vagyis ahol $\Delta U = 0$) a spontán lezajló folyamatokra igaz, hogy $\Delta S \geq 0$. A $\Delta S = 0$ eset a reverzibilis, tehát oda-vissza egyaránt lejátszódó folyamatokra érvényes.

Menjünk végig az alábbi, elsőre talán meglepő, de nagyon tanulságos gondolatmeneten. Az energiamegmaradás törvénye a teljes univerzumra érvényes. A világegyetem maga is izolált, (nincs környezete, amivel anyagot vagy hőt cserélne), tehát a világegyetemre igaz, hogy $\Delta U = 0$.

A világegyetem entrópiáját tehát minden reverzibilis folyamat állandóan tartja, és minden irreverzibilis folyamat növeli. Ez nem más, mint a jól ismert hőhalál elmélet, amely szerint a világegyetem tökéletes termikus kiegyenlítődés felé halad. A gondolatmenet folytatásaként bontsuk a világegyetemet két részre. Egyik a rendszer, másik annak környezete. Az entrópia extenzív volta miatt felírható az alábbi összefüggés:

$$S_{rendszer} + S_{környezet} = S_{világegyetem}$$ **3.2. egyenlet**

Ebből, és a világegyetem izolált voltából következik az alábbi összefüggés:

$$\Delta S_{rendszer} + \Delta S_{környezet} = \Delta S_{világegyetem} \geq 0$$ **3.3. egyenlet**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Vizsgáljuk meg ezt az egyenletet. Ezek szerint **egy rendszerben lezajló folyamat csökkentheti a rendszer entrópiáját, de csak akkor, ha a folyamat során a környezet entrópiája azzal egyenlő mértékben (reverzibilis folyamat esetén) vagy annál nagyobb mértékben (irreverzibilis folyamat estén) növekszik!**

Ez az összefüggés rávilágít arra, hogy az élőlények csak olyan folyamatokkal érhetik el magas rendezettségű, tehát alacsony entrópiájú állapotukat, amely folyamatok eredményeként környezetük entrópiája folyamatosan növekszik!

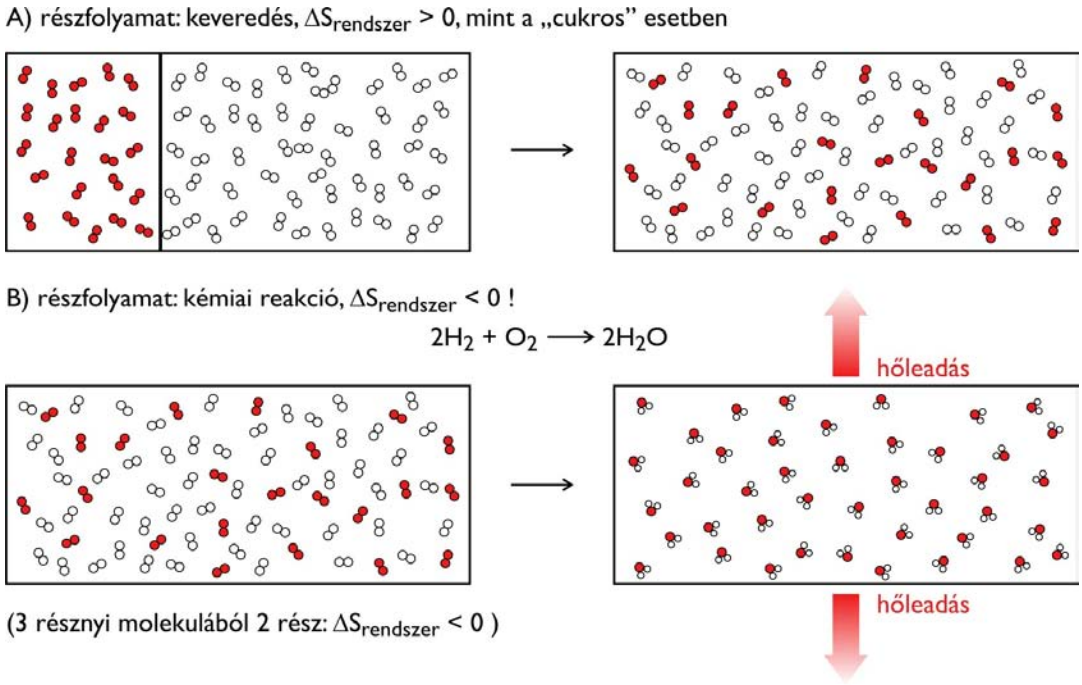
3.4.2. A szabadentalpia bevezetése

A teljes univerzum entrópiaváltozását természetesen nem tudjuk megmérni. Az pedig már az előző egyenletből is látszott, hogy a rendszer entrópiaváltozása önmagában nem elegendő ahhoz, hogy megállapítsuk egy folyamat spontán lejátszódhat-e. Jó példa erre a hidrogén égése, amely spontán végbemegy (feltéve, ha az aktivációs gáton átjuttatjuk egy gyufaszál meggyújtásával – az aktiváció energia jelentőségét később magyarázzuk meg), holott a folyamat során a rendszer entrópiája csökken (lásd **3.4. ábra**).

A hidrogén oxigénnel történő reakciójának első részlépése, amikor a kétféle gáz elkeveredik, növeli a rendszer entrópiáját. A második lépésben azonban a rendszer entrópiája csökken, mivel 3 résznyi molekulából 2 résznyi molekula keletkezik. Ezek mikroszkopikus állapotainak száma jóval kisebb, mint 3 résznyi molekuláé. Közismert tény, hogy a hidrogén oxigénnel történő reakciója, tehát elégése vízzé spontán folyamat, ami irreverzibilis, hiszen önmagától nem zajlik le a fordított irányban (a vízbontáshoz energiát kell befektetni). A hidrogén elégetése, mint spontán folyamat a második főtétel értelmében növeli a világegyetem entrópiáját. A folyamat során tetemes mennyiségű hő adódik le a környezetnek, ezzel függ össze a (rendszer+környezet) vonatkozásában jelentkező entrópia növekedés.

Ez átvezet bennünket **az entrópia** másik, valójában valamivel korábbi, Rudolf Clausius (1865) általi **klasszikus termodinamikai levezetésé**hez. E szerint a környezetnek leadott hő növeli a környezet entrópiáját, mégpedig a környezet hőmérsékletével fordítottan arányosan mértékben (lásd **3.4. egyenlet**).

$$\Delta S_{környezet} = \frac{q_{leadott}}{T}$$ **3.4. egyenlet**



3.4. ábra: A hidrogén reakciója oxigénnel a rendszer entrópiáját csökkenti, de mivel a környezetnek leadott hő a környezet entrópiáját ennél nagyobb mértékben növeli, a reakció spontán végbemegy

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Reverzibilis folyamatban, melyben a világegyetem entrópiája nem változik, a környezet entrópia változása egyenlő a környezetnek leadott hő és a környezet hőmérsékletének hányadosával. Amennyiben a folyamat irreverzibilis, úgy a környezet entrópia változása ennél a hányadosnál nagyobb, az univerzum entrópiája pedig növekszik.

Ez az összefüggés természetesen a fordított irányra, illetve a környezet mellett a rendszerre is igaz. Tehát a környezettől felvett hő csökkenti a környezet entrópiáját, és növeli a rendszer entrópiáját.

Nézzük meg egy tipikus példán, hogyan is írja le a folyamatokat az így bevezetett entrópia.

Legyen a rendszerünk egy üvegedény, amelyben félig fagyott víz van. Ennek hőmérséklete 0°C, tehát 273 K. Az edény környezete legyen egy nagyméretű, 20°C-os, tehát 293 K hőmérsékletű szoba, amely legyen egyben egy izolált rendszer. A szoba mérete legyen olyan nagy, hogy annak hőmérsékletét a folyamat során állandónak tekinthessük. A szobából, mint környezetből hő adódik át a rendszerbe. Az idő előrehaladtával a jég elolvad, de amíg ez nem következik be teljes mértékben, addig az edényben lévő víz és jég keverékének hőmérséklete 273 K marad. Vizsgáljuk a folyamatot addig a végpontig, amikor az összes jég éppen elolvadt. A példában tehát sem a szoba, sem az edény hőmérséklete nem változik. Mitől irreverzibilis ez a folyamat?

Legyen a környezetből felvett hő mennyisége q. A környezet entrópia változása negatív, hiszen hőt adott le. Értéke $\Delta S_{környezet} = -q/293$ J/K. Az edény, mint rendszer entrópiája növekedett, hiszen hőt vett fel. Ennek értéke $\Delta S_{rendszer} = q/273$ J/K. A teljes, izolált rendszerünk entrópia változása a két entrópia változás összege: $\Delta S_{összes} = q/273$ J/K $- q/293$ J/K. Vegyük észre, hogy a kapott érték pozitív, tehát az izolált rendszer entrópiája – a második főtételnek megfelelően – növekedett. Ez pusztán annak a tapasztalati ténynek köszönhető (amit a nulladik főtétel mond ki), hogy a hő mindig a magasabb hőmérsékletű testből áramlik az alacsonyabb hőmérsékletű irányába. Egy ilyen hőátadás viszont minden esetben növeli a világegyetem entrópiáját!

Amennyiben hő adódik át egy magasabb hőmérsékletű helyről egy alacsonyabb hőmérsékletű helyre, az mindig pozitív entrópiaváltozást jelent a rendszer + környezet együttesére nézve.

Folytassuk az előzőleg bevezetett egyenletet, és alakítsuk át arra az esetre, amikor a vizsgált folyamat állandó nyomáson zajlik, és a térfogati munkán kívül nincs másfajta munkavégzés (lásd az entalpia bevezetésénél). Ekkor felírható, hogy:

$$\frac{q_{leadott}}{T} = -\frac{\Delta H_{rendszer}}{T}$$ **3.5. egyenlet**

Az előző két egyenlet kombinációjaként az alábbi egyenletet kapjuk:

$$\Delta S_{környezet} = -\frac{\Delta H_{rendszer}}{T}$$ **3.6. egyenlet**

Ezt az egyenletet kombinálva az entrópia változások összegére vonatkozó **3.3. egyenlet**tel az alábbi egyenlethez jutunk:

$$\Delta S_{világegyetem} = \Delta S_{rendszer} - \frac{\Delta H_{rendszer}}{T} \geq 0$$ **3.7. egyenlet**

Szorozzuk meg mind a két oldalt a rendszer minden esetben pozitív értékű hőmérsékletével:

$$T\Delta S_{világegyetem} = T\Delta S_{rendszer} - \Delta H_{rendszer} \geq 0$$ **3.8. egyenlet**

Szorozzuk meg mindkét oldalt mínusz eggyel (a reláció ilyenkor természetesen megfordul).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$-T\Delta S_{világegyetem} = -T\Delta S_{rendszer} + \Delta H_{rendszer} \leq 0$$ **3.9. egyenlet**

Amint az a **3.9. egyenlet**ből látható, a $-T\Delta S_{világegyetem}$ tag értéke minden spontán irreverzibilis folyamatra negatív kell, hogy legyen, hiszen ezekre $\Delta S_{világegyetem}$ pozitív előjelű (lásd második főtétel), T pedig mindig pozitív. Ez a $-\boldsymbol{T\Delta S_{világegyetem}}$ tag tehát egy **folyamat-irányjelző!** Kiemelt fontossága miatt ez az irányjelző nevet is kapott, **szabadentalpia-változásnak hívjuk, és ΔG-vel jelöljük**.

A ΔG értéke függ a hőmérséklettől, ezért az egyenlet csak **állandó hőmérsékletre értelmezett**, és mint korábban említettük, a nyomás is állandó, hiszen ezért vezethettük itt be az entalpiát (H). Végső soron az alábbi egyenlethez jutottunk:

$$\Delta G = \Delta H_{rendszer} - T\Delta S_{rendszer} \leq 0$$ **3.10. egyenlet**

Az egyenlet **a Gibbs-féle szabadentalpia (G)** megváltozását írja le. A szabadentalpia is **állapotfüggvény**, csakúgy, mint a belső energia, az entalpia, vagy az entrópia. A jelölés Josiah Willard Gibbs tiszteletére került bevezetésre, aki elsőként vezette be 1873 körül az állandó hőmérsékletre és nyomásra vonatkozó, a szabadentalpiával azonos „*available energy*” fogalmat. Megjegyzendő, hogy az angol nyelvű szakirodalom kizárólag a *Gibbsfree energy* vagy röviden csak *free energy* kifejezést használja.

Az egyenlet szerint **minden állandó nyomáson és hőmérsékleten lezajló spontán, irreverzibilis folyamatra igaz, hogy annak eredményeként a szabadentalpia változás kisebb, mint nulla. ΔG akkor egyenlő nullával, ha a folyamat reverzibilis, vagy ha termodinamikai egyensúly áll fenn.**

Vegyük észre, hogy a ΔG értéke csak a rendszerre vonatkozó entalpia és entrópia tagokból származik, ezért nem kell a teljes univerzumra figyelnünk!

A különböző életfolyamatok esetében, az állandó nyomás és hőmérséklet kritériuma az esetek túlnyomó részében fennáll, ezért ez az egyenlet kiválóan alkalmazható a biokémia által tanulmányozott folyamatokra is! Mivel a szabadentalpia is állapotjelző, ezért egy-egy folyamat (pl. kémiai reakció) esetén csak a kezdeti és a végső állapot számít, az nem, hogy milyen utat járt be a folyamat a két állapot között.

Az egyenletből azonnal adódik, hogy olyan folyamat, amelynek során a rendszer entrópiája csökkenne (a $\Delta S_{rendszer}$ tag negatív, tehát a $-T\Delta S_{rendszer}$ tag pozitív), miközben a rendszer hőt venne fel, (a $\Delta H_{rendszer}$ tag is pozitív) nem játszódhat le, hiszen az pozitív ΔG értékkel járna.

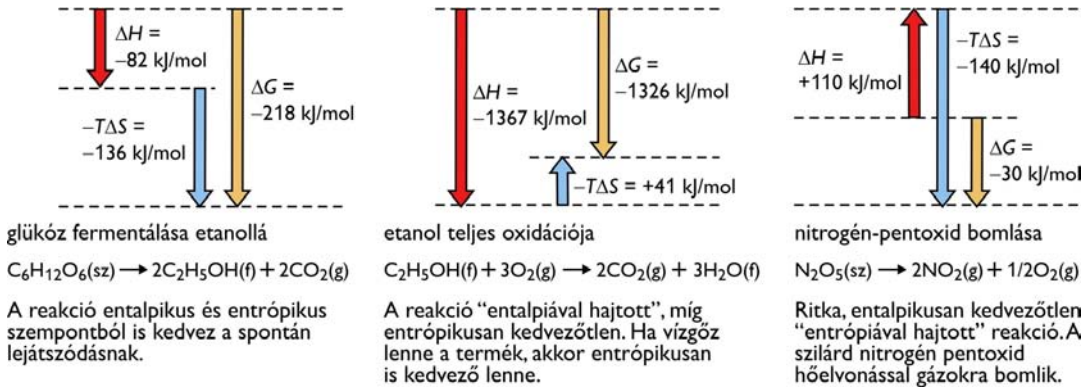
A spontán lejátszódó irreverzibilis folyamatok három csoportba oszthatók a rendszerre vonatkozó ΔH és $-T\Delta S$ szerint (lásd **3.1. táblázat**):

3.1. táblázat: A reakciók négyféle típusa az entalpikus és entrópikus tagok előjele alapján

ΔH	ΔS	ΔG = ΔH – TΔS
–	+	Olyan exoterm reakció, ami spontán lejátszódik minden hőmérsékleten
–	–	Olyan exoterm reakció, ami spontán lejátszódik, ha T < ΔH / ΔS
+	+	Olyan endoterm reakció, ami spontán lejátszódik, ha T > ΔH / ΔS
+	–	Olyan exoterm reakció, ami spontán nem megy végbe (endergonikus)

Nézzünk meg három jellemző példát a spontán lejátszódó reakciókra (lásd **3.5. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



3.5. ábra: Egy-egy jellemző példa a háromféle, spontán lejátszódó folyamat típusra

Az első folyamat a glükóz mikrobiális fermentálása etanollá. Ebben a jól ismert folyamatban 1 mólnyi szőlőcukorból 2 mól etanol és 2 mól széndioxid keletkezik. A molekulák száma tehát növekszik, ráadásul a széndioxid gáz halmazállapotú, ezért a rendszer entrópiája növekszik. A folyamat ismert módon exoterm, vagyis a rendszer hőt ad le, ami szintén kedvez a folyamatnak, hiszen azt mutatja, hogy a környezet entrópiája is növekszik.

A második példánk az etanol teljes oxidációja. A folyamat során 1 mól etanol 3 mól oxigénnel reagálva 2 mól széndioxidot és 3 mól vizet eredményez. Ennél a reakciónál kérdés, hogy milyen hőmérsékleten zajlik. Ha az alkoholt közvetlenül égetnénk el oxigénnel, akkor a termékek mind gáz halmazállapotúak lennének, és a folyamat entrópikusan is kedvező lenne. Ha az élő szervezetben lezajló oxidációról van szó, ami alacsony hőmérsékleten zajlik, akkor a keletkező víz folyadék halmazállapotú. Ebben az esetben a folyamat entrópikusan kedvezőtlen, és attól lesz spontán, hogy a negatív entalpikus tag dominál (a folyamatot az entalpiaváltozás „hajtja"). A rendszer entrópia csökkenését ilyenkor bőven felülmúlja a környezet entrópia növekedése.

A harmadik esetünk, a szilárd halmazállapotú nitrogén-pentoxid spontán bomlása nitrogéndioxidra és oxigénre. A folyamat endoterm, vagyis ennek során a rendszer hőt vesz fel a környezetéből. A környezet entrópiája tehát csökken, de a rendszer entrópiája ennél nagyobb mértékben növekszik, mivel szilárd halmazállapotú anyagból annál nagyobb mól-számú gáz keletkezik.

3.4.3. A szabadentalpia változás és a maximális nem-térfogati munka

Az alábbi levezetés alapján belátható, hogy a szabadentalpia változás nem csak a folyamat irányát mutatja meg, hanem azt is számszerűsíti, hogy a folyamattal legfeljebb mennyi nem-térfogati jellegű munka végezhető. Korábban az entalpia bevezetésénél már láttuk, hogy definíció szerint:

$$H = U + pV$$ **3.11. egyenlet**

Mivel a belső energia megváltozása a hőcsere és az összes (térfogati és nem-térfogati) munka összege, ezért állandó nyomáson felírható, hogy:

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V = q + w_{össz} + p\Delta V$$ **3.12. egyenlet**

Reverzibilis folyamatban $\Delta S_{rendszer} = -\Delta S_{környezet}$, és $q = T\Delta S$. Ennek, a fenti egyenletnek, valamint a ΔG általános egyenletének kombinálásával az alábbi, reverzibilis folyamatokra vonatkozó egyenlethez jutunk:

$$\Delta G = T\Delta S + w_{összrev} + p\Delta V - T\Delta S = w_{összrev} + p\Delta V$$ **3.13. egyenlet**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A $w_{összrev}$ részben térfogati, részben minden egyéb munkát (pl. töltés szétválasztás, anyagszállítás koncentrációgradiens ellenében stb.) jelent reverzibilis folyamatban:

$$w_{összrev} = w_{térfrev} + w_{egyébrev}$$ **3.14. egyenlet**

Az entalpia bevezetésénél már láttuk, hogy a térfogati munka:

$$w_{térf} = -p\Delta V$$ **3.15. egyenlet**

Ebből viszont következik, hogy:

$$\Delta G = w_{térfrev} + w_{egyébrev} + p\Delta V = -p\Delta V + w_{egyébrev} + p\Delta V = w_{egyébrev}$$ **3.16. egyenlet**

A leírás reverzibilis folyamatra vonatkozott. Egy állandó nyomáson és hőmérsékleten lejátszódó **irreverzibilis f**olyamat esetében a folyamattal végezhető nem-térfogati munka mindig kisebb, mint a ΔG értéke. **Egy folyamat ΔG értéke tehát megadja a maximálisan kinyerhető nem-térfogati** (pl. töltés-szeparáció stb.) **munkát**. A folyamat **exergonikus**, vagyis „munkára fogható", **ha $\Delta G < 0$**, és **endergonikus** vagyis extra munka nélkül önmagában nem zajlik le, **ha $\Delta G > 0$.**

3.4.4. A kémiai reakciókat kísérő szabadentalpia változás

Minden fizikai-kémiai folyamat, így **a kémiai reakciók esetében is a folyamatot kísérő ΔG szabadentalpia változás mutatja meg, hogy a reakció spontán végbemegy-e**, milyen „távol van" az egyensúlytól, és az egyensúly felé haladva mekkora maximális munkavégzés nyerhető a folyamatból.

A kémiai reakció komponensek keverékében megy végbe. Egyes komponensek mennyisége csökken, másoké ennek megfelelően növekszik. Minden komponenshez rendelhető egy adat, amely megmutatja, hogy az adott komponens mekkora szabadentalpia-részt visel fajlagosan (molárisan) a komponensek keverékében. Az elegy szabadentalpiája tehát a komponensek szabadentalpiáinak az összege. Ez **a szabadentalpia állapotjelző és extenzív** tulajdonságából következik.

A komponensenkénti fajlagos szabadentalpia hozzájárulás, amit kémiai potenciálnak (Gibbs, 1860), illetve parciális **moláris szabadentalpiá**nak is neveznek, szabatosabban megfogalmazva azt mutatja meg, hogy hogyan függ a rendszer szabadentalpiája az adott komponens mennyiségének változásától, úgy, hogy közben a T, p és n', vagyis a hőmérséklet, a nyomás és a komponensek összetétele állandó marad:

$$\overline{G}_A = \left(\frac{\partial G}{\partial n_A}\right)_{p,T,n'}$$ **3.17. egyenlet**

Elsőre talán nem könnyű értelmezni a fenti kijelentést, ezért hasznosnak bizonyulhat egy szemléletesebb példa, a fajlagos térfogat esete. Egymással elegyedő folyadékok esetében jól ismert tény, hogy ezek térfogata nem feltétlenül adódik össze. Kérdés, hogy egy adott többkomponensű elegyben mekkora rész-térfogatot foglalnak el mólonként az egyes komponensek. Ezt egy gondolatkísérletben úgy is meglehetne határozni, hogy veszünk egy közel végtelenül nagy, de ismert térfogatú elegyet, adunk hozzá 1 mólt az adott komponensből, és megmérjük a térfogat növekedést. A közel végtelenül nagy térfogat azért fontos, hogy az egy mól anyag hozzáadása praktikusan ne változtassa meg az elegy összetételét. A térfogat növekedés praktikusan meg fogja adni, hogy egy mól adott komponens mekkora térfogatot foglal el az elegyben adott összetétel esetén. Az adott komponens móljainak számát ismerve az is kiszámolható lesz, hogy az adott komponens összesen mekkora térfogatot foglal el az elegyben. Ugyanez a gondolatmenet vonatkoztatható a kevésbé szemléletes kémiai potenciál, illetve parciális moláris szabadentalpia esetére.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$G = n_A \times \overline{G}_A + n_B \times \overline{G}_B + n_C \times \overline{G}_C + \ldots$$ **3.18. egyenlet**

Adott összetételű elegy szabadentalpiája tehát **megadható a komponensek szabadentalpia hozzájárulásainak összegeként**, ahol ezek a hozzájárulások a komponensenkénti parciális moláris szabadentalpia értékek és a komponensenkénti moláris mennyiségek szorzata.

Nézzük meg, hogy hogyan vezethető le mindebből a kémiai reakciókat kísérő szabadentalpia változás. Legyen az általános, oda-vissza lejátszódó kémiai reakció sémája a következő:

$$n_A \times A + n_B \times B \leftrightarrow n_C \times C + n_D \times D.$$ **3.19. egyenlet**

Vajon adott *A*, *B*, *C*, *D* koncentrációkon milyen irányban zajlik majd a nettó reakció? Többek között ezt fogjuk a továbbiakban megvizsgálni. Kémiai reakciónál az egyes komponensek egymásba alakulnak. A reakciót kísérő szabadentalpia változás általánosságban így írható fel:

$$\Delta G = G_{termékek} - G_{kiindulási-anyagok}$$ **3.20. egyenlet**

A fenti reakcióra vonatkoztatva, és „balról jobbra” haladó reakció esetén, amikor rendre n_A *A* és n_B *B* fogy, miközben n_C *C* és n_D *D* keletkezik, ez az alábbi egyenlet szerint írható fel:

$$\Delta G = n_C \times \overline{G}_C + n_D \times \overline{G}_D - n_A \times \overline{G}_A - n_B \times \overline{G}_B$$ **3.21. egyenlet**

Az elegy szabadentalpiája tehát a keletkező komponensek hozzájárulásaival nő, míg az eltűnő komponensek eredeti hozzájárulásával csökken.

Ha a fenti, „balról jobbra” felírt egyenlethez tartozó reakció ΔG értéke negatív, akkor a reakció valóban abban az irányban megy spontán végbe, ahogy azt felírtuk. Ha a ΔG értéke pozitív, akkor a reakció éppen a fordított irányban zajlik le spontán, ha pedig a ΔG értéke éppen nulla, akkor termodinamikai egyensúly van, minden komponensből időegységenként ugyanannyi alakul át, mint amennyi keletkezik.

Amint az a **3.21. egyenlet**ből látható, az, hogy mi történik, az egyes parciális moláris szabadentalpiáktól, vagyis az egyes kémiai potenciáloktól függ. A kémiai potenciál értékek ugyanakkor két tényezőtől függnek. Az adott komponens anyagi minőségétől (lásd lejjebb, mint standard moláris szabadentalpia) és az adott komponens koncentrációjától. Egyensúlyban minden komponens azonos kémiai potenciálon van, az alacsonyabb standard moláris szabadentalpiájú anyagok magasabb koncentrációban lesznek, mint a magasabb standard moláris szabadentalpiájú anyagok.

Az itt bevezetett modellben, a felső irányban n_A mólnyi *A* és n_B mólnyi *B* fogy, miközben n_C mólnyi *C* és $n_D$mólnyi *D* keletkezik úgy, hogy eközben mindegyik komponens koncentrációja állandó marad. Ez kétféleképpen is elképzelhető. Az egyik lehetőség, hogy olyan nagymennyiségű keveréket vizsgálunk, amelyben a fent említett mennyiségű anyagátalakulás csak elhanyagolható mértékben változtatja meg a koncentrációkat. A másik lehetőség, ami kiválóan vonatkoztatható élő rendszerekre is, hogy egy olyan nyílt rendszert vizsgálunk, amelyben az elfogyó komponensek folyamatosan pótlódnak, míg a keletkező komponensek folyamatosan eltávolítódnak. Ebben az esetben a rendszer stacionárius (*steady-state*) állapotban van. A sejtben, vagy a sejt közötti állományban számos anyag koncentrációja úgy marad állandó, hogy közben az adott anyag adott ütemben folyamatosan fogy, de ugyanolyan ütemben pótlódik is. Jó példa a szinte állandó vércukorszint. A vérből folyamatosan glükóz jut a sejtekbe. A csökkenő vércukorszint hatására egy hormonális szabályozás keretében a máj glükózt ürít a vérbe, tehát pótolja a vérből eltávolított glükózt.

Nézzük meg, hogy hogyan függ a kémiai potenciál a koncentrációtól. Az elegy egyes komponenseinek kémiai potenciálját közös standard állapotra (pl. p = 1atm, T = 298 K) jellemző standard kémiai potenciáljaikhoz viszonyítjuk. **A standard kémiai potenciál az adott vegyület elemeiből való képződéséhez tartozó standard**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

moláris képződési szabadentalpia. Ehhez az anyagminőségtől függő standard értékhez adjuk hozzá minden egyes komponensnél a koncentrációtól függő tagot.

$$\overline{G}_A = \overline{G}_A^0 + RT \ln \frac{a_A}{a_A^0} \qquad \textbf{3.22. egyenlet}$$

Az egyenlet a korábban mutatott parciális differenciálegyenlet integrálásának eredménye. Az $RT\ln a_A$ tagban „a_A" az adott komponens „aktivitása", ami híg oldatoknál kb. megegyezik a komponens koncentrációjával. Maga az $RT\ln(a_A/a^0{}_A)$ tag azt mutatja meg, hogy mekkora ΔG változással jár az adott komponensnek standard állapotú 1 M-os koncentrációjából az adott koncentrációba való jutása.

Híg oldatokra vonatkozóan és aktivitások helyett koncentrációkat figyelembe véve az alábbi egyenletet kapjuk:

$$\overline{G}_A \cong \overline{G}_A^o + RT\ln\frac{[A]}{[A]^o} = \overline{G}_A^o + RT\ln\frac{[A]}{1} = \overline{G}_A^o + RT\ln[A] \qquad \textbf{3.23. egyenlet}$$

Jól látható, miért érdemes a standard koncentrációt 1 M-osként bevezetni, az egyenlet így leegyszerűsödik. A korábban felírt kémiai reakció szabadentalpia változása a fentiek figyelembe vételével így alakul:

$$\Delta G = n_C\overline{G}_C^0 + n_C RT\ln[C] + n_D\overline{G}_D^0 + n_D RT\ln[D] - n_A\overline{G}_A^0 - n_A RT\ln[A] - n_B\overline{G}_B^0 - n_B RT\ln[B] \qquad \textbf{4. egyenlet}$$

Rendezzük át az egyenletet úgy, hogy a standard értékek és a koncentrációfüggő tagok két külön csoportba kerüljenek:

$$\Delta G = n_C\overline{G}_C^0 + n_D\overline{G}_D^0 - n_A\overline{G}_A^0 - n_B\overline{G}_B^0 + RT\ln[C]^{n_C} + RT\ln[D]^{n_D} - RT\ln[A]^{n_A} - RT\ln[B]^{n_B} \qquad \textbf{5. egyenlet}$$

Vegyük észre, hogy az első négy tag a standard körülmények között zajló reakció szabadentalpia változását, ΔG^0 jelenti, míg a második négy tagból az RT szorzótényező kiemelhető. Ezek alapján az alábbi egyenlethez jutunk:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT(\ln[C]^{n_C} + \ln[D]^{n_D} - \ln[A]^{n_A} - \ln[B]^{n_B}) \qquad \textbf{3.26. egyenlet}$$

A zárójelben lévő tagokra alkalmazzuk a logaritmusok összeadására illetve kivonására vonatkozó szabályokat. Így az alábbi, rendkívül fontos alapegyenlethez jutunk:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT\ln\frac{[C]^{n_C}[D]^{n_D}}{[A]^{n_A}[B]^{n_B}} \qquad \textbf{3.27. egyenlet}$$

Az egyenletben $[A]$ és $[B]$ **a kiindulási anyagok**, $[C]$ és $[D]$ **a termékek aktuális, tehát nem egyensúlyi koncentrációja.** Mindegyik koncentráció a kémiai reakcióra jellemző sztöchiometriai együtthatóra van emelve. Az említett aktuális koncentrációk tehát a vizsgálat pillanatában megvalósuló koncentrációk. Az egyenletben szereplő, az aktuális koncentrációkat tartalmazó hányadost reakcióhányadosnak is szokták nevezni, jele Q (mint *quotient*).

Az egyenletet részben arra fogjuk majd használni, hogy megállapítsuk, egységnyi, konkrétan 1 mólnyi anyagmennyiség átalakulását mekkora szabadentalpia változás kíséri. Ez az egyenlet csak akkor alkalmazható, ha az anyagátalakulás ellenére a komponensek már említett aktuális koncentrációja a reakció során nem változik, állandó marad! Hogyan lehetséges ez? Például úgy, hogy olyan nagy mennyiségben van jelen az összes komponens, hogy egy mólnyi anyagátalakulás (fogyás és keletkezés) csak elhanyagolható mértékben változtatja meg a koncentrációkat. A másik, korrektebb eset a stacionárius rendszer, amelyben a keletkezett anyagokat folyamatosan eltávolítjuk, az elfogyó anyagokat pedig folyamatosan pótoljuk, így a koncentrációk egyáltalán nem változnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az egyenletben **ΔG^0 a reakcióra jellemző állandó, mint már említettük ez a standard körülmények között zajló reakció szabadentalpia változása**.

Nézzük meg, hogyan olvasható ez ki a végső egyenletből, mikor egyezhet meg a ΔG^0 értéke a ΔG értékével. A $\Delta G^0 = \Delta G$ eset akkor következhet be, ha az egyenlet jobboldalának második tagja nulla. Ahhoz, hogy ez a tag nulla legyen, az kell, hogy a logaritmusjelet követő hányados értéke 1 legyen, hiszen 1 bármilyen alapú logaritmusa 0. A hányados természetesen akkor 1, ha a számláló értéke megegyezik a nevező értékével. Erre egy triviális megoldás az, ha a hányadosban szereplő [A], [B], [C] és [D] koncentrációk mindegyike éppen 1 M, hiszen ekkor akármilyenek a sztöchiometriai együtthatók, a hányados értéke csak 1 lehet. Nos, emlékezzünk vissza, hogy a standard körülményeket úgy választottuk meg, hogy az egymással reakcióba lépő anyagok (reaktánsok) koncentrációja 1 M legyen.

A ΔG^0 értéknek van azonban egy másik jelentése is, értéke szorosan összefügg a kémiai reakció egyensúlyi állandójával. Ennek levezetéséhez vizsgáljuk meg, hogy mi vonatkozik arra a kémiai reakcióra, amelyik egy termodinamikai egyensúlyban zajlik. (Ez természetesen egy fából vaskarika megfogalmazás, hiszen termodinamikai egyensúly esetén mindkét irányban azonos ütemben zajlik a reakció, vagyis nincs nettó anyagátalakulás.) Termodinamikai egyensúly esetében két fontos kijelentést tehetünk. Az egyik, hogy a reakciót kísérő szabadentalpia változás értéke nulla. A másik, hogy egyensúlyban a reakcióhányadosban szereplő koncentrációk egyensúlyi koncentrációk, tehát ilyenkor (és csak ilyenkor!) a reakcióhányados megegyezik az egyensúlyi állandóval.

Egyensúlyban tehát:

$$0 = \Delta G^0 + RT \ln K_{eq}$$ **3.28. egyenlet**

Az egyenletet átrendezve:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$ **3.29. egyenlet**

Ennek az összefüggésnek rendkívül nagy jelentősége van, a következők miatt. Amennyiben egy kémiai reakcióra vonatkozóan az egyensúlyi koncentrációk mérésén keresztül meghatároztuk az egyensúlyi állandót, vagy mások közléséből már ismerjük azt, úgy ezáltal egyben ismerjük a standard szabadentalpia változás, tehát a ΔG^0 értékét is. Ennek ismeretében pedig bármilyen aktuális reaktáns koncentrációk esetére ki tudjuk számolni az adott koncentrációviszonyokra jellemző ΔG szabadentalpia változást! A szabadentalpiára korábban levezetett összefüggések következtében a ΔG ismeretében két elemi fontosságú információ jut a birtokunkba: merre indul el a kémiai reakció, és moláris anyagátalakulásra vonatkoztatva legfeljebb mekkora nem-térfogati munkát lehet végeztetni a reakcióval. Amennyiben a ΔG negatív, úgy a reakció abban az irányban zajlik, ahogy azt felírtuk, tehát az apriori „kiindulási anyagoknak” nevezett molekulák fogynak, és az apriori „termékeknek” nevezett anyagok keletkeznek. Ha a ΔG pozitív, akkor az adott koncentrációviszonyok közepette a reakció éppenséggel fordított irányban zajlik le spontán, tehát a „kiindulási anyagok” keletkeznek, és a „termékek” fogynak.

3.4.5. Standard körülmények a biokémiában

Mint láttuk, a kémiai reakciók irányát, és az általuk végezhető munkát a ΔG értéke mutatja meg. A ΔG^0 értéke önmagában nem ad elegendő ismeretet, ismerni kell a koncentrációkat is.

A ΔG^0 értéke a reakcióra (adott hőmérsékleten) jellemző állandó. Bár az aktuális koncentrációk ismerete híján pontos adatot nem szolgáltat, de ha a reaktánsok koncentrációi egymáshoz hasonlóak, a ΔG^0 értéke tájékoztató lehet arra nézve, hogy „merre szokott menni” a reakció, és mekkora munka végeztethető vele.

Az életfolyamatokban azonban van néhány olyan gyakori reaktáns, amelynek koncentrációja jelentősen eltér a többi reaktáns koncentrációjától. Ilyen például a víz, amelynek moláris koncentrációja (~55,5 M), nagyságrendekkel meghaladja a többi reaktáns koncentrációját, vagy a hidroxónium ion, amelyé éppenséggel rendkívül alacsony (semleges közegben 10^{-7} M).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Azoknak a reakcióknak az esetében, ahol egyes reaktánsok koncentrációi lényegesen eltérnek a többiétől, a hagyományos ΔG^0 nem ad jó tájékoztatást a reakció várható kimeneteléről. Amennyiben az említett reaktánsok kirívóan magas, vagy éppen alacsony koncentrációja állandó, mint például a víz, vagy egy adott pH mellett a hidroxónium-ion esetében, hasznos bevezetni egy olyan továbbfejlesztett standard ΔG-t, amely az adott reaktáns tekintetében nem a hagyományos 1 M-os, hanem a valós koncentrációra vonatkozik. A biokémiában ezt hívjuk **transzformált standard szabadentalpia változás**nak.

Tehát annak érdekében, hogy a standardunk jobban tükrözze a valóságot, a biokémiában a már említett két esetben, valamint a magnéziumion esetén a sejtre jellemző aktuális koncentrációkat nevezzük ki standard koncentrációknak. (Minden, ATP-t vagy más nukleozid-foszfát részvételével zajló reakcióban a Mg^{2+} koncentrációt is figyelembe kell vennünk, mert a sejtben a nukleotidok mindig Mg^{2+}-komplex formájában vannak jelen.) Az említett komponensek esetében az új standard koncentrációk figyelembevételével számoljuk ki az új standard körülményekre jellemző ΔG^0 értéket, amit ezért transzformált standard szabadentalpia változásnak, hívunk, és $\boldsymbol{\Delta G^{0\prime}}$-ként jelölünk (a szakirodalom egy részében a jelölés $\boldsymbol{\Delta G'^0}$). A biokémiában használt standard állapotban tehát: $\mathbf{[H_2O] = 55{,}5\ M;\ [H^+] = 10^{-7}\ M;\ [Mg^{2+}] = 1\ mM.}$

Ekkor nem teszünk mást, mint hogy az adott „X" komponensre vonatkozó $RT\ln[X]$ tagot (amely termékek esetében pozitív, kiindulási anyagok esetében negatív előjelű, lásd **3.25. egyenlet**) kivonjuk a koncentrációfüggő tagok közül, és hozzáadjuk az eredeti ΔG^0 értékhez. Ezek után a koncentrációkat tartalmazó második tagban tehát már nem szabad szerepeltetni az érintett komponensre vonatkozó koncentrációadatot, hiszen az már szerepel a transzformált standard értékben.

A tényleges reakció ΔG értéke természetesen nem függ a választott viszonyítási körülményektől, de az így bevezetett transzformált standard $\Delta G^{0\prime}$ állandónak az értéke a valóságos körülményeket jobban megközelíti. (A pontos adatot azonban csak a többi reaktáns koncentrációinak figyelembevételével lehet meghatározni az alapegyenlet szerint). Az egyensúlyi állandó értéke és a transzformált standard szabadentalpia változás értékei egymásból számolhatóak (lásd **3.2. táblázat**).

3.2. táblázat: Az egyensúlyi állandó és a standard szabadentalpia változás kapcsolata

	$\Delta G^{\circ\prime}$	
K'_{eq}	(kJ/mol)	(kcal/mol)
10^3	–17,1	–4,1
10^2	–11,4	–2,7
10^1	-5,7	–1,4
1	0	0
10^{-1}	5,7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

A $\Delta G^{\circ\prime}$ szemléletesen nem más, mint a transzformált standard körülmények között a termékek szabadentalpia tartalmának és a kiindulási anyagok szabadentalpia tartalmának különbsége.

Ha ilyen körülmények között a termékek szabadentalpia tartalma kisebb, akkor a reakció spontán lezajlik. Ha nagyobb, akkor a reakció az ellenkező irányban zajlik le spontán, de mindez csak akkor érvényes, ha éppen a standard körülményeken vagyunk. Minden más esetben az aktuális koncentrációkkal kiszámolt ΔG mondja meg, hogy mi történik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

3.4.6. Kapcsolt kémiai reakciók

A szabadentalpia állapotjelző (állapotfüggvény), vagyis nem függ az adott állapotba vezető útvonaltól, és extenzív, tehát összeadódó. Ezért **a szabadentalpia változás** is összeadódó, más szóval **additív**. Egymást követő két kémiai reakció külön-külön meghatározott $\Delta G^{\circ\prime}$ értékeiből a teljes reakcióra jellemző $\Delta G^{\circ\prime}$ érték egyszerű összeadással számolható (lásd **3.6. ábra**).

A fentiekből következik, hogy egy spontán le nem zajló, **pozitív $\Delta G^{\circ\prime}$ értékű, tehát termodinamikailag kedvezőtlen, endergonikus reakció le tud zajlani, ha kapcsolva van egy termodinamikailag kedvező, negatív $\Delta G^{\circ\prime}$ értékű, exergonikus reakcióhoz, feltéve hogy az eredő $\Delta G^{\circ\prime}$ érték negatív**. A kapcsoltság azt jelenti, hogy a két kémiai reakciónak kell, hogy legyen közös komponense.

(1)	A	⟶ B	$\Delta G_1^{\circ\prime}$
(2)	B	⟶ C	$\Delta G_2^{\circ\prime}$
összeg:	A	⟶ C	$\Delta G_1^{\circ\prime} + \Delta G_2^{\circ\prime}$

3.6. ábra: Egymást követő, közös intermedierrel rendelkező reakciók szabadentalpia változása összeadódik

Elsőként nézzük meg az alábbi reakciót, bár előre jelezzük, hogy ez nem egy valódi kapcsolt reakció. A glükóz lebontásához vezető glikolízis első lépéseként a glükóz molekula 6. szénatomjához kapcsolódó hidroxil helyére egy foszfátcsoport kerül, glükóz-6-foszfát jön létre (a reakciót a hexokináz enzim katalizálja). Formálisan legegyszerűbben ez az alábbiak szerint mehetne végbe: glükóz + P_i → glükóz-6-P + H_2O, ahol a P_i az inorganikus foszfát. Csakhogy ez a reakció endergonikus, a $\Delta G^{0\prime}$ értéke 13,8 kJ/mol, tehát spontán nem megy végbe. A reakció nem is így zajlik, a glükóz nem inorganikus foszfáttal, hanem ATP-vel reagál, és az ATP ADP-vé alakul az alábbiak szerint: ATP + glükóz → ADP + glükóz-6-P.

Vajon hogyan tudnánk ismert adatokból eldönteni, hogy a fenti folyamat exergonikus-e?

Az ATP hidrolízise (ATP + H_2O → ADP + P_i) exergonikus, a $\Delta G^{\circ\prime}$ értéke -30,5kJ/mol. A glükóz-6-foszfát keletkezése, bár a valóságban nem úgy zajlik, felírható két egymást követő reakcióként is:

1. glükóz + P_i → glükóz-6-P + H_2O $\quad \Delta G^{0\prime} = 13{,}8$ kJ/mol

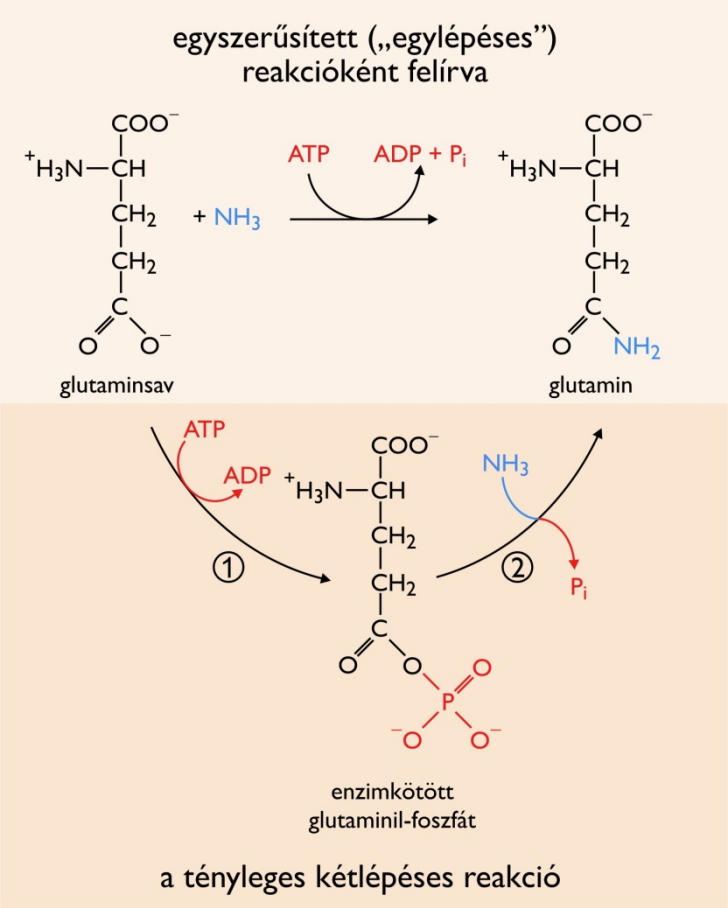
2. ATP + H_2O → ADP + P_i $\quad \Delta G^{0\prime} = -30{,}5$ kJ/mol

Az eredő reakció: ATP + glükóz → ADP + glükóz-6-P (ami mint láttuk a valóságban is így megy végbe). Az eredő $\Delta G^{\circ\prime}$ = 13,8 kJ/mol + -30,5 kJ/mol = -16,7 kJ/mol, tehát az eredő reakció exergonikus, és ez egy képzeletbeli kapcsolt reakcióból levezethető. A fenti képzeletbeli reakciósor a valóságban enzim nélkül nem lenne energetikailag kapcsolt. A kapcsolást az enzim (hexokináz) hozza létre, azáltal, hogy az enzim aktív helyén az ATP hidrolízise helyett egy ún. foszforilcsoport reakció zajlik le (lásd **2.3.4. fejezet**). Ha az ATP az oldatban lévő hatalmas koncentrációban lévő vízzel spontán hidrolizálna, az nem segítené elő a glükóz foszforilációját.

A szabadentalpia változás kiszámolása szempontjából ugyanakkor nem számít, hogy milyen útvonalra végezzük el a számítást, hiszen a szabadentalpia állapotjelző tulajdonsága miatt csak a kezdeti és a végállapot számít.

Nézzünk egy másik példát, amiben valóban **kapcsolt reakció**ról van szó. A **glutamin keletkezése glutaminsavból például** ilyen (lásd **3.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



3.7. ábra: Példa egy kapcsolt reakcióra, amelyben az ATP-ADP átalakuláshoz kapcsolva megy végbe egy önmagában végbe nem menő kémiai reakció

Formálisan ehhez a reakcióhoz a glutaminsavnak ammóniával kéne reagálnia vízkilépés közben. Ez a reakció azonban endergonikus lenne. A valóságban a glutaminsav első lépésben ATP-vel reagál. Az ATP-ről egy foszforilcsoport kerül a glutaminsav karboxil csoportjára (enzim jelenlétében). Így egyik termékként ADP és egy köztes termékként egy vegyes savanhidrid keletkezik. Ez utóbbi magas szabadentalpia szinten van, reakciója ammóniával exergonikus. A második lépésben a vegyes savanhidrid bomlik, glutamin és inorganikus foszfát keletkezik. Ez tehát egy valódi kapcsolt reakció. Az első lépésben az ATP-vel történő kémiai reakció egy magas szabadentalpia szintű, más szóval aktivált köztesterméket eredményez, amely a második lépésben átalakul.

Mindkét említett reakcióban specifikus enzim katalizálja a folyamatot, de ennek a reakciót kísérő szabadentalpia változás szempontjából nincs jelentősége.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

4. fejezet - Aminosavak, peptidkötés, a fehérjék elsődleges és másodlagos szerkezete

(szerző: Pál Gábor)

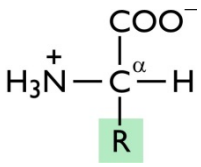
Minden, a tudomány által eddig feltárt életfolyamatban központi szerepet játszanak a fehérjék. Fehérjék alkotják a sejtek belső szerkezetét, katalizálják az élő szervezetben zajló kémiai reakciók ezreit, másolják át a DNS-ben tárolt örökletes információt újonnan szintetizált nukleinsavakba. Szintén fehérjék hangolják össze jelátviteli utakba szerveződve a sejten belüli folyamatokat. A sejtek közötti kommunikációban is alapvető szerepük van, hiszen a jelfogó receptorok mind fehérjék, ahogy a hormonok egy része is az. Motorfehérjék alakítják át az ATP-ben rejlő kémiai energiát összehangolt mozgássá, míg az immunrendszer egyes fehérjéi védelmi vonalat képeznek paraziták ellen. Fehérjékből áll az orrszarvú tülke, fehérje szállítja az oxigént a vörösvértestekben. Fehérjék teszik lehetővé anyagok sejtbe, illetve sejtből irányuló transzportját, fehérjék végzik a célzott fehérjelebontást, fehérje katalizálja azt a folyamatot, amely révén a szentjánosbogár fényt bocsájt ki, és így tovább, hosszan sorolhatnánk még a fehérjék szerteágazó szerepét. A fehérjék olyannyira központi szereppel bírnak, hogy nélkülük aligha tudnánk elképzelni az élet mai összetettségi szintjét.

A fehérje szó görög eredetű formája, **protein** (*proteios*: legelső) is erre utal. Az elképesztően sokféle funkció ismeretében meglepő tény, hogy a hatalmas változatosság mögött kémiai értelemben viszonylagos egyszerűség áll. Minden fehérje alapvetően 20-féle aminosav el nem ágazó, tehát lineáris polimere.

4.1. A 20 (+2) fehérjealkotó aminosav

A 20 (+2)-féle fehérjealkotó aminosav teljes készletének azonosítása meglepően hosszú időt vett igénybe. Az elsőként azonosított aszparagint a spárga (*Asparagus*) növényből izolálták (innen ered az elnevezése is) 1807-ben, míg utolsóként a treonint azonosították 1938-ban. Érdemes megjegyezni, hogy az összes fehérjealkotó aminosav elnevezése fantázianév. A glutaminsav a búza „glutén" fehérjéjéről (melyben a latin eredetű *gluten* szó ragasztót jelent) kapta a nevét, míg a glicin elnevezése a görög „*glykos*", édes szóból, a tiroziné pedig a görög „*tyros*" sajt szóból ered.

A fehérjealkotó **aminosavak** mind **α-amino-karbonsavak**. Ez azt jelenti, hogy olyan, aminocsoportot és karboxilcsoportot egyaránt tartalmazó vegyületek, amelyek aminocsoportja és karboxilcsoportja ugyanahhoz a szénatomhoz, nevezetesen az α-val jelölt szénatomhoz kapcsolódik (lásd **4.1. ábra**).



4.1. ábra: Az amino-karbonsavak általános képlete

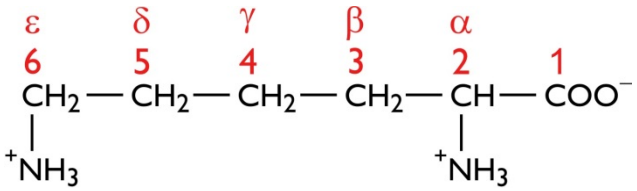
Ehhez az **α-szénatom**hoz tartozik az **oldallánc** csoport is. A 20-féle fehérjealkotó aminosav az oldalláncok tekintetében különbözik egymástól. Röviden jegyezzük csak meg, hogy létezik egy 21. és 22. fehérjealkotó aminosav is. Az élővilág minden kategóriájában, bár nem túl sok fehérjében fordul elő a **szeleoncisztein**, amely a cisztein származéka (az oldallánc kénatomot egy szelénatom helyettesíti). Egyes metanogén archeákban levő fehérjékben **pirrollizin** található, amely a lizin származéka (az oldallánc aminocsoporthoz egy pirrol-csoport kapcsolódik). Ez a két aminosav speciális módon épül be a fehérjékbe a transzláció során. A fehérjékből sok más aminosav is azonosítható, de ezek mindegyike poszttranszlációs úton, a fehérje oldalláncok utólagos kémiai módosulásával keletkezik.

Az aminosavak egyes szénatomjainak jelölésére illetve számozására (sajnos) egyszerre kétféle nevezéktan is használatos. A szénatomok hagyományos, görög betűkkel történő jelölése a legmagasabb rendű funkciós csoporttól

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

indul. Az ahhoz kapcsolódó első szénatom kapja az a, az azután következő a b, stb. elnevezést. Az adott szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó funkciós csoport „örökli" a szénatom görög jelölését. Ennek megfelelően minden fehérjealkotó aminosavban van például a-karboxil és a-aminocsoport, míg például a lizin aminosavban ezeken kívül van egy e-aminocsoport is.

A szerves kémiában elfogadott számozás a fentitől eltérő logikát követ, mivel a karboxilcsoportban szereplő szénatom kapja az 1. sorszámot, és a sorban egymáshoz kapcsolódó szénatomok rendre növekvő sorszámot kapnak. A két eltérő jelölési sémát a lizin aminosav példáján keresztül a **4.2. ábra** illusztrálja.



4.2. ábra: Az amino-karbonsavak szénatomjainak jelölése két eltérő egyezményes rendszer szerint

Egyetlen kivétellel minden fehérjealkotó aminosavban négy eltérő csoporthoz kapcsolódik az a-**szénatom**hoz, ez a szénatom tehát **királis centrum**ot alkot. Az egyetlen **kivétel a glicin**, hiszen ennek oldallánc csoportja egy hidrogénatom, így itt az a C-atomhoz két hidrogénatom kapcsolódik. A glicin esetében tehát az a C-atomhoz nem négyféle, hanem csak háromféle funkciós csoport kapcsolódik.

A többi 19 aminosav az optikai izoméria miatt **kétféle** konfigurációban létezhet, amelyek egymás tükörképei, más néven **enantiomer** párjai. **A fehérjékben** ugyanakkor a kétféle enantiomerből **kizárólag az egyik** van jelen, a most ismertetendő Fischer-féle nevezéktan szerinti L-enantiomer.

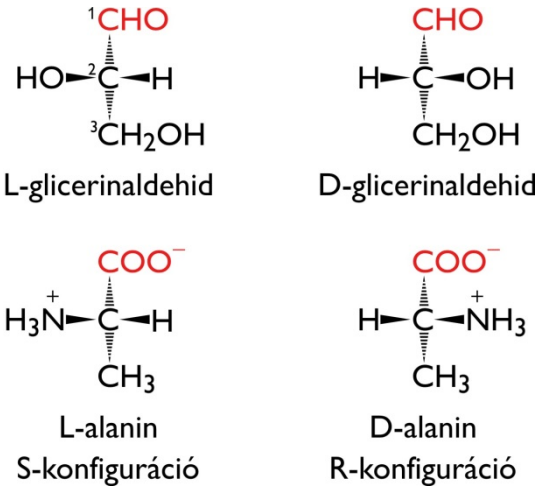
(Az optikai izomériánál ismertetett hivatalos R/S nevezéktan szerint egy kivétellel minden királis szénatomot tartalmazó aminosav „S" konfigurációjú. Az egyetlen kivétel a cisztein, mivel a hivatalos nevezéktanban használt eljárás szerint a királis szénatomhoz kapcsolódó -CH_2SH csoport magasabb rendű, mint a –COOH karboxilcsoport. Emiatt a cisztein R beosztást kap. A hivatalos nevezéktanhoz tartozó eljárás tehát érzékenyebb egy-egy atom cseréjére, mint a Fischer-féle rendszer.)

Biokémiában a történelmi hagyományok tisztelete miatt megőrződött **Emil Fischer nevezéktan**a is. Ezt Emil Fischer eredetileg a cukrokra vezette be 1891-ben. Nevezéktanát a legegyszerűbb királis cukorból, a glicerin-aldehidből vezette le. Az eredetileg tehát cukrokra bevezetett Fischer-féle projekcióban a cukormolekula szénláncát függőlegesen ábrázoljuk. A királis szénatom egy adott, kijelölt síkban van. A királis szénatomhoz kapcsolódó magasabb besorolású csoport feljebb, az alacsonyabb besorolású lejjebb helyezkedik el. Mindkét kapcsolódó szénatom a sík mögött helyezkedik el. Cukrok esetében a vízszintesen elrendezett másik két csoport vagy hidroxilcsoport, vagy hidrogénatom lehet. Ha ezek közül a magasabb rendű (tehát a hidroxil) baloldalra esik, akkor az enantiomer L (baloldali: *laevus*) konfigurációjú, ha jobboldalra esik, akkor D (jobboldali: *dexter*) konfigurációjú. A Fischer-féle nevezéktan aminosavak esetében úgy alkalmazható, hogy a glicerin-aldehidben szereplő aldehid csoportot gondolatban karboxilra, a hidroxilcsoportot pedig aminocsoportra cseréljük (lásd **4.3. ábra**).

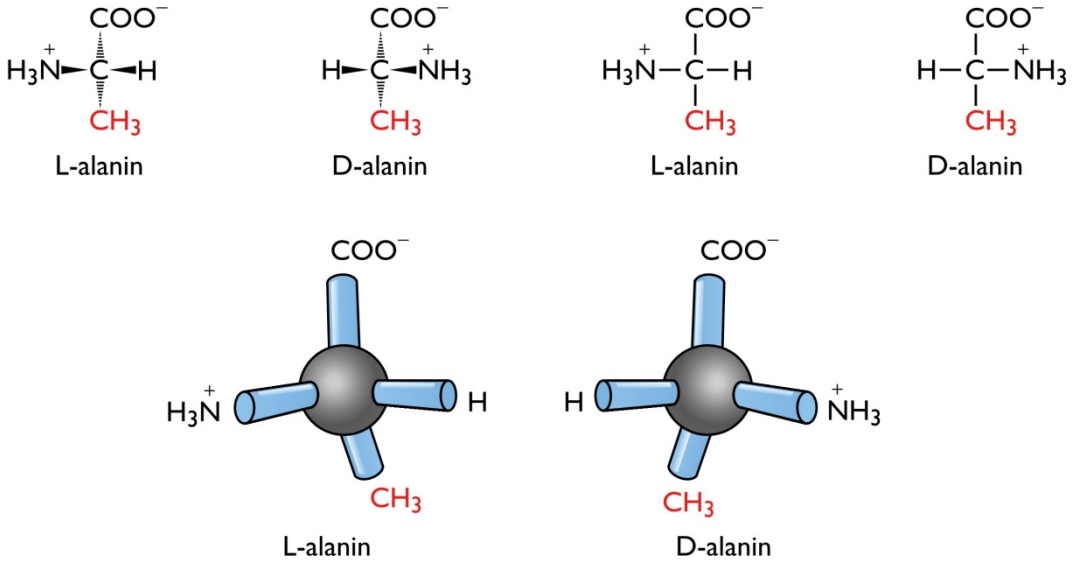
A **4.4. ábra** illusztrálja, hogy a valódi térbeni elrendeződést milyen egyezményes egyszerűsítések alapján lehet végül síkban jelezni.

Érdemes megjegyezni, hogy amikor Emil Fischer bevezette a fenti D/L nevezéktant, már kimutatható volt, hogy a tükörképi enantiomer párok ellentétes irányban forgatják el a síkban polározott fényt. Azt azonban Fischer még nem tudta megállapítani, hogy az a forma, amelyik a fényt jobbra forgatja el, vajon az általa D konfigurációjúnak nevezett, vagy az L konfigurációjúnak nevezett forma-e. Ma már tudjuk, hogy a D glicerin-aldehid a síkban poláros fényt történetesen jobbra, míg az L konfigurációjú balra forgatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.3. ábra: Az enantiomerek nevezéktanának Emil Fischer által bevezetett eljárása a glicerinaldehid alapján



4.4. ábra: Az enantiomerek eltérő térbeliségének különböző ábrázolási módjai

Azt, hogy a 20-féle fehérjealkotó aminosavból az a 19, amelyik királis centrumot tartalmaz, mind azonos konfigurációs típusban van jelen a fehérjékben, rendkívül hosszadalmas kísérletsorozatban igazolták. Ez az oldalláncok kémiai egymásba alakításán és optikai aktivitásuk mérésén keresztül történt.

Azt azonban, hogy a két lehetséges eset közül melyik abszolút konfigurációs típusba tartoznak, elsőként röntgendiffrakcióval sikerült megállapítani. Ekkor derült ki, hogy **az összes királis fehérjealkotó aminosav L konfigurációban van**.

A **4.1. táblázat** foglalja össze a 20 aminosav nevét, hárombetűs és egybetűs rövidített elnevezését, moláris tömegét, disszociációra képes csoportjainak pK_a értékét, az aminosav izoelektromos pontját, hidropátiás indexét, fehérjékben meghatározott előfordulási gyakoriságát. A hidropátiás index azt számszerűsíti, hogy az adott aminosav oldallánca mennyire vízkedvelő, vagy víztaszító tulajdonságú. Minél nagyobb pozitív szám tartozik az indexhez, annál inkább hidrofób, minél nagyobb negatív értékű szám tartozik az indexhez, annál inkább vízkedvelő az oldallánc.

4.1. táblázat: Az aminosavak legfontosabb fizikokémiai tulajdonságai

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Aminosav	Rövidített elnevezés		M_t	pK_1 (–COOH)	pK_2 ($-NH_3^+$)	pK_R (oldallánc)	pI	Hidropátiás index	Előfordulási gyakoriság fehérjékben (%)
apoláros alifás csoport									
glicin	Gly	G	75	2,34	9,60		5,97	–0,4	7,2
alanin	Ala	A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
prolin	Pro	P	115	1,99	10,96		6,48	1,6	5,2
valin	Val	V	117	2,32	9,62		5,67	4,2	6,6
leucin	Leu	L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
izoleucin	Ile	I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
metionin	Met	M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
aromás csoport									
fenilalanin	Phe	F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
tirozin	Tyr	Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	–1,3	3,2
triptofán	Trp	W	204	2,38	9,39		5,89	–0,9	1,4
poláros, töltést nem hordozó csoport									
szerin	Ser	S	105	2,21	9,15		5,68	–0,8	6,8
treonin	Thr	T	119	2,11	9,62		5,87	-0,7	5,9
cisztein	Cys	C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
aszparagin	Asn	N	132	2,02	8,80		5,41	-3,5	4,3
glutamin	Gln	Q	146	2,17	9,13		5,65	-3,5	4,2
pozitív töltést hordozó csoport									
lizin	Lys	K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	-3,9	5,9
hisztidin	His	H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	-3,2	2,3
arginin	Arg	R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	-4,5	5,1
negatív töltést hordozó csoport									
aszparaginsav	Asp	D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	-3,5	5,3
glutaminsav	Glu	E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	-3,5	6,3

A **4.1. táblázat** az egyes aminosavakat alapvető fizikokémiai tulajdonságuk szerint csoportosítja. Érdemes kiemelni, hogy még a legegyszerűbb osztályozás szerint is **legalább 5 típus**t érdemes elkülöníteni (pl. **apoláros alifás, aromás, poláros, töltést nem hordozó; poláros, negatív töltést hordozó; poláros, pozitív töltést hordozó**). Az aminosavak tehát fizikokémiai tulajdonságuk tekintetében nagyfokú eltéréseket mutatnak, a teljes 20-tagú készlet komoly változatosságot képvisel.

A disszociációra képes csoportok tekintetében elsősorban az oldalláncokat érdemes kiemelnünk, hiszen a minden aminosavban jelen lévő α-amino és α-karboxilcsoportok a fehérjében (az 1-1 amino-, illetve karboxiterminális kivételével) már nincsenek jelen. Hét aminosav oldallánca esetében kell számolnunk disszociációval. Ezek közül 5 esetében nyilvánvaló, hogy az élőlényekben jellemző pH tartományban nagyrészt disszociált formában vannak jelen.

Az **aszparaginsav** és a **glutaminsav** neutrális közegben 1-1 protont teljes mértékben leadnak, így ezek egységnyi **negatív töltés**t hordoznak. A táblázatban jelzett értékek (3,64 illetve 4,25) a semleges töltésű forma, mint sav pK_a értékei.

A **lizin** és az **arginin** neutrális kémhatású közegben extra protont vesznek fel, praktikusan teljes mértékben protonáltak, tehát egységnyi **pozitív töltés**t hordoznak. A táblázatban jelzett érték (~10,5 és ~12,5) a pozitív töltésű forma, mint sav pK_a értékei. A hisztidin pK_a értéke is a pozitív töltésű formára vonatkozik. A **6,0** érték jelzi, hogy semleges kémhatású közegben a hisztidin oldalláncok zöme pozitív töltésű, de a hisztidin oldalláncok mintegy tizede semleges (lásd Henderson-Hasselbalch egyenlet, **2.5.4. fejezet**).

A szabad (nem diszulfidhídban lévő) cisztein és a tirozin is képesek leadni a protonjukat. Bár mindkét aminosav neutrálisan semleges típus tagjaként került felsorolásra, fontos tudnunk, hogy a pH függvényében akár tetemes arányban is töltéssel rendelkező formában lehetnek jelen. A pK_a értékek alapján látható, hogy a **cisztein** esetében (**pK_a ~8,2**) már semleges kémhatáson, a **tirozin** esetében (**pK_a ~10,5**) csak lúgos közegben számottevő a deprotonált, negatív töltésű forma aránya.

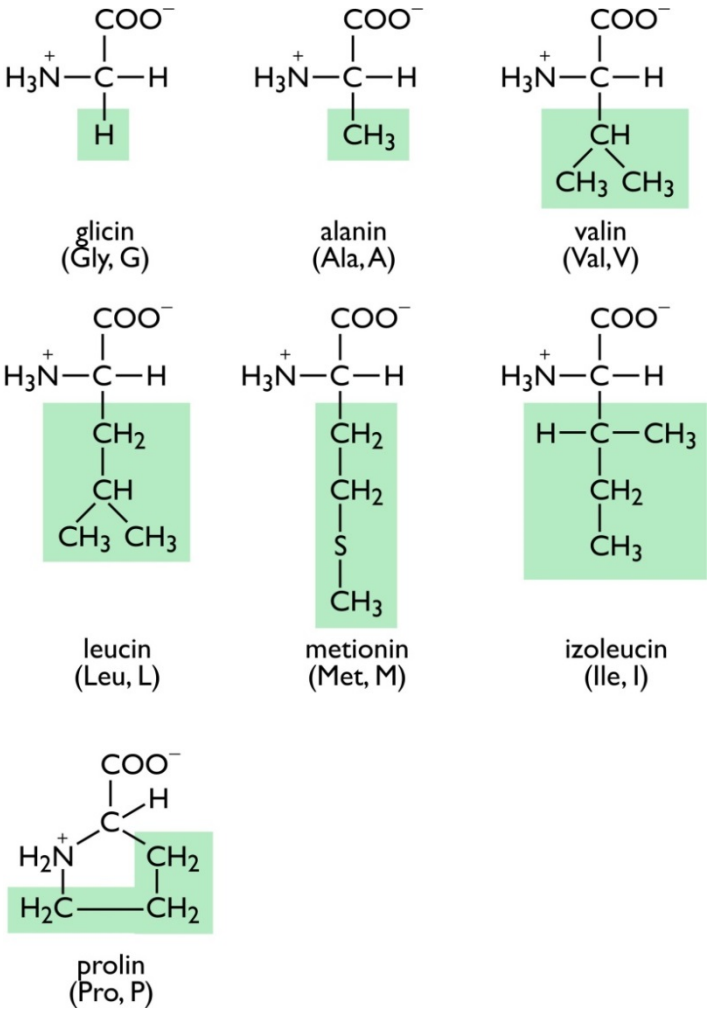
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Érdemes megjegyeznünk, hogy a **4.1. táblázat**ban szereplő aminosav gyakorisági adatok globuláris fehérjékre vonatkoznak, s ettől valamelyest különböznek a fibrilláris fehérjék, és jelentősen eltérnek az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék (IUP: *intrinsically unstructured protein*) gyakorisági értékei.

A következőkben részletesebben kitérünk az egyes aminosav típusokra, ezek legalapvetőbb tulajdonságaira, és fehérjealkotóként betöltött tipikus biológiai szerepeikre.

4.1.1. Apoláros, alifás oldalláncú aminosavak

Szűkebb értelemben véve ebbe a csoportba a csak szén- és hidrogénatomot tartalmazó, nem aromás, tehát alifás oldalláncú aminosavak, a **glicin** (**Gly**), az **alanin** (**Ala**) a **leucin** (**Leu**) az **izoleucin** (**Ile**) a **valin** (**Val**) és a **prolin** (**Pro**) tartozhatnának, de mint látni fogjuk a **metionin (Met)** is ide sorolódik (lásd **4.5. ábra**).



4.5. ábra: Az alifás oldalláncú aminosavak

A **glicin kivételével** ezek az aminosavak mind **hidrofób** tulajdonságú **oldallánc**cal bírnak. A glicin a lehető legkisebb méretű, egyetlen hidrogénatomot tartalmazó oldallánca nem kényszeríti a hidrátburkot képző vízmolekulákat olyan rendezett klatrát struktúrára, ami miatt hidrofób hatás lépne fel.

Ezek az oldalláncok globuláris fehérjék esetében nagyobb arányban találhatók meg fehérje víz által hozzá nem férhető belső részében, a hidrofób magban, mint a víz számára hozzáférhető felszínen. A metionin esetében megjegyzendő, hogy annak oldallánca kénatomot is tartalmaz, ezért valójában nem alifás. Legtöbb fizikokémiai tulajdonsága miatt mégis célszerű az alifások közé sorolni. Ugyanakkor a metionin oldallánca a kénatomnak köszönhetően fémekkel és fémionokkal képes koordinációs komplexeket létesíteni.

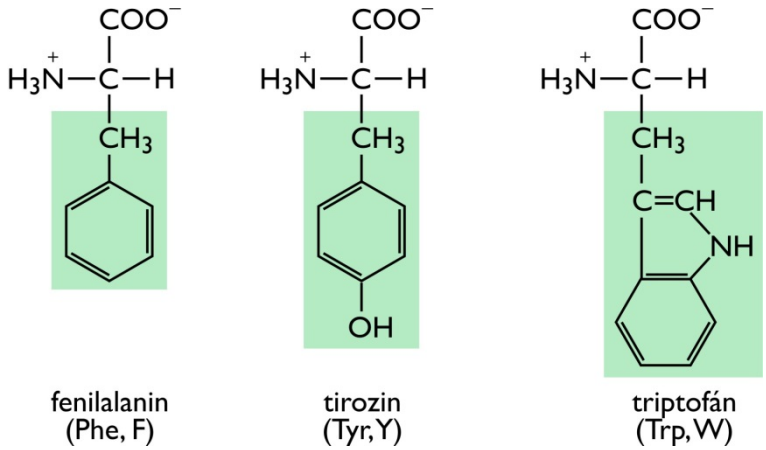
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Érdemes kiemelni, hogy minimális méretű oldallánca miatt a glicin a többi aminosav csoporthoz képest a legnagyobb, tehát maximális mértékű rotációs szabadságot biztosítja a polipeptidlánc számára. Ennek bizonyos térszerkezetek (például nagy hajlékonyságú „csukló” régiók) esetében fontos szerep jut.

A **prolin** az egyetlen olyan fehérjealkotó aminosav, amelynek oldallánca egy szénatomon keresztül kovalens kötésben van az aminocsoporttal. A prolin tehát **iminosav**. Amikor prolin szerepel a polipeptidláncban, a főláncban megjelenő gyűrűs részlet az adott szakasz rotációs szabadsága minimális mértékű lesz. A prolin tehát az átlagosnál merevebb, korlátozott mozgékonyságú lokális szerkezeteket eredményez. Ugyanakkor az X-Pro kötés esetében lehetséges a cisz-transz izomerizáció (lásd **4.3.5. fejezet**)

4.1.2. Aromás oldalláncú aminosavak

Tipikusan három aminosavat szokás ebbe a csoportba sorolni: a **fenilalanin**t (**Phe**), a **tirozin**t (**Tyr**) és a **triptofán**t (**Trp**) (lásd **4.6. ábra**).



4.6. ábra: Az aromás oldalláncú aminosavak

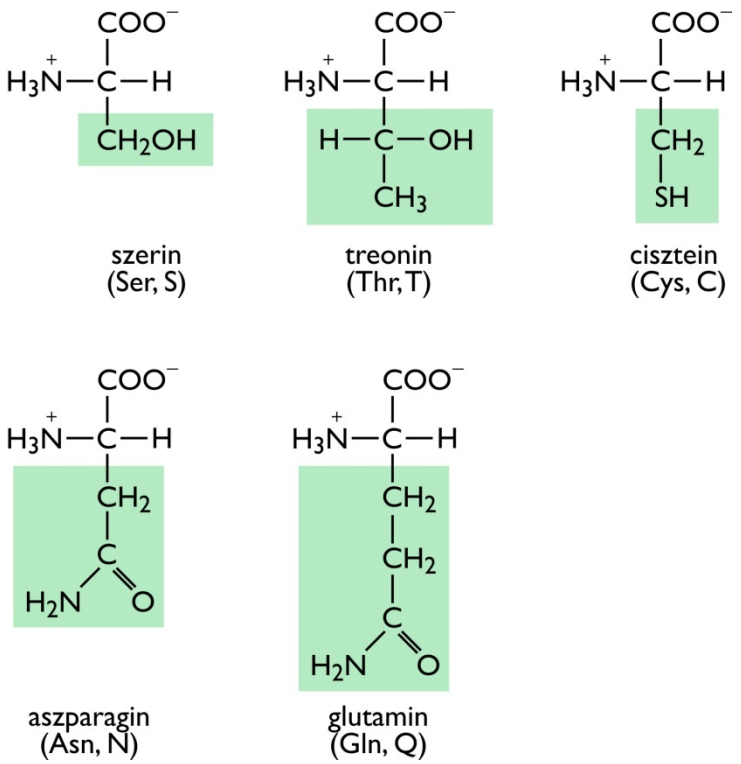
Valójában a hisztidin (His) is aromás oldalláncú, de egyéb domináns tulajdonsága (pozitív töltést hordozhat) miatt egy másik csoportba szokták sorolni. Az említett három aminosav mindegyikére igaz, hogy **ultraibolya tartományban karakteres fényelnyelési maximum**uk van. A hisztidinnek nincs ilyen tulajdonsága, ez további érv amellett, hogy ne ebbe a csoportba sorolják.

Széles körben elterjedt téves nézet, hogy az itt felsorolt aromás aminosavak kifejezetten hidrofób tulajdonságúak. A hidropátiás index is mutatja, hogy valójában csak a fenilalanin tekinthető egyértelműen apolárosnak, víztaszítónak. Amíg tehát a fenilalanin egyértelműen hidrofób, addig a másik kettő vegyes tulajdonságokkal bír. A tirozin a fenolos, a triptofán pedig az indol gyűrűje révén, a könnyen polarizálható delokalizált elektronok miatt, indukált dipóluson keresztüli kölcsönhatásokban is részt tud venni. Ezen felül -OH ill. –NH csoportjukon keresztül képesek H-hidas kölcsönhatást is létesíteni. Ezek az oldalláncok gyakran lépnek interakcióba pozitív töltésű csoportokkal is a delokalizált elektronfelhő és a kationok között létrejövő úgynevezett kation-π kölcsönhatáson keresztül. A delokalizált elektronfelhők egymással is kölcsönhatásba léphetnek, ez az ún. p-p kölcsönhatás.

4.1.3. Poláros, töltést nem hordozó oldalláncú aminosavak

Ebbe a csoportba tartozik a **szerin** (**Ser**), a **treonin** (**Thr**), az **aszparagin** (**Asn**) és a **glutamin** (**Gln**), amelyek mindegyike egyértelműen poláros oldalláncú. Ugyanakkor jobb híján a **ciszteint** (**Cys**) is ide szokták sorolni (lásd **4.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.7. ábra: A töltést nem hordozó, poláros oldalláncú aminosavak

Semleges formájában a cisztein ugyan inkább hidrofób tulajdonságú, de a másik kéntartalmú aminosavval, a metioninnal ellentétben disszociált formában is jelen lehet, amikor is negatív töltést hordoz, így poláros. A metioninhoz hasonlóan a cisztein is képes fémekkel koordinációs komplexet képezni. Egyfajta „átlagtulajdonságot" tekintve a ciszteint ezért jobb híján a poláros aminosavak közé sorolják.

Ezek az aminosavak oldalláncukon keresztül a vízzel kedvező H-hidas kölcsönhatást létesítenek (a gyenge hidrogénhíd donor cisztein kivételével). A szerin és a treonin hidroxilcsoportot, a cisztein szulfhidrilcsoportot, az aszparagin és a glutamin karbonsav-amid csoportot tartalmaz.

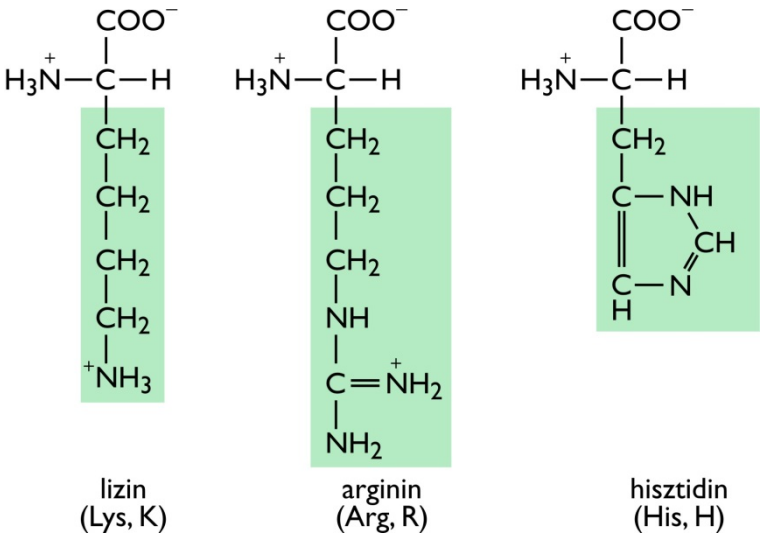
A peptidkötések drasztikus körülmények között végrehajtott savas hidrolízise során (lásd később) az amidkötések is elbomlanak, így az Asn és Gln aminosavak helyett ilyenkor aszparaginsav (Asp) illetve glutaminsav (Glu) keletkezik. Ez a fajta dezamidálódás spontán módon is végbemegy, elsősorban az Asn-Gly szekvencia részleteknél. A spontán folyamatnak az enyhén lúgos közeg kedvez.

A fehérjék aminosavsorrendjének meghatározása hamarabb vált lehetővé, mint a fehérjéket kódoló gének DNS-szekvenálása. Számos fehérje esetében a fehérje szekvenálása bizonyos pontokban aszparaginsavat, vagy glutaminsavat jelzett, majd később a kódoló DNS-szekvenálása kimutatta, hogy az adott pozíciók tekintetében valójában Asn illetve Gln aminosavat kódol a gén. Mire a fehérje izolálásra került, az adott pozíciókban az Asn vagy Gln aminosav spontán dezamidálódott.

4.1.4. Pozitív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak

Ebbe a csoportba a **lizin** (**Lys**) az **arginin** (**Arg**) és a **hisztidin** (**His**) tartozik (lásd **4.8. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



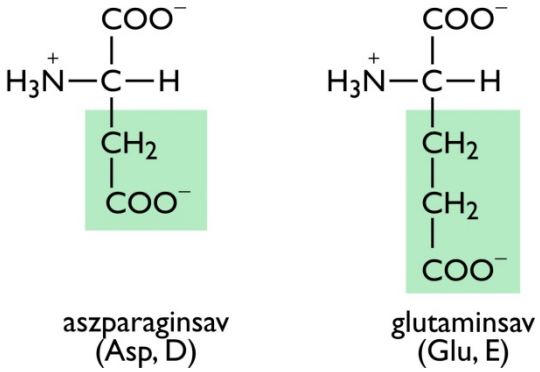
4.8. ábra: A pozitív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak

Ezek mindegyike hidrofil oldalláncú. A lizint és arginint „bázikus” aminosavként emlegetik, de mivel semleges pH-tartományban mindkettő egységnyi pozitív töltésű, savként viselkednek. A **His imidazol gyűrűje lehet semleges, vagy pozitív** is. A protonált Lys és Arg hidrogénhíd kölcsönhatásban csak donorként szerepelhet.

A hisztidin a legsokoldalúbb aminosav. Semleges kémhatású közegben a semleges töltésű és a protonált formája is jelen lehet. A semleges töltésű formája gyenge bázis, hiszen protont vesz fel, míg a protonált forma gyenge sav, hiszen protont ad le. Ennek megfelelően általános bázis és általános sav-katalizisben is részt vehet, valamint jó nukleofil is. Ráadásul a hisztidin a nemkötő elektronpárjával fémionokat is köthet. A fentiek miatt a hisztidin meghatározó szerepet játszik számos enzim katalitikus mechanizmusában (pl. szerin- és cisztein-proteázok, glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz, lásd **8.5.3. fejezet**).

4.1.5. Negatív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak

Bár a cisztein és a tirozin oldallánca is képesek proton leadással negatív töltésűvé válni, ebbe a csoportba csak az **aszparaginsav**at (**Asp**) és a **glutaminsav**at (**Glu**) sorolják (lásd **4.9. ábra**).

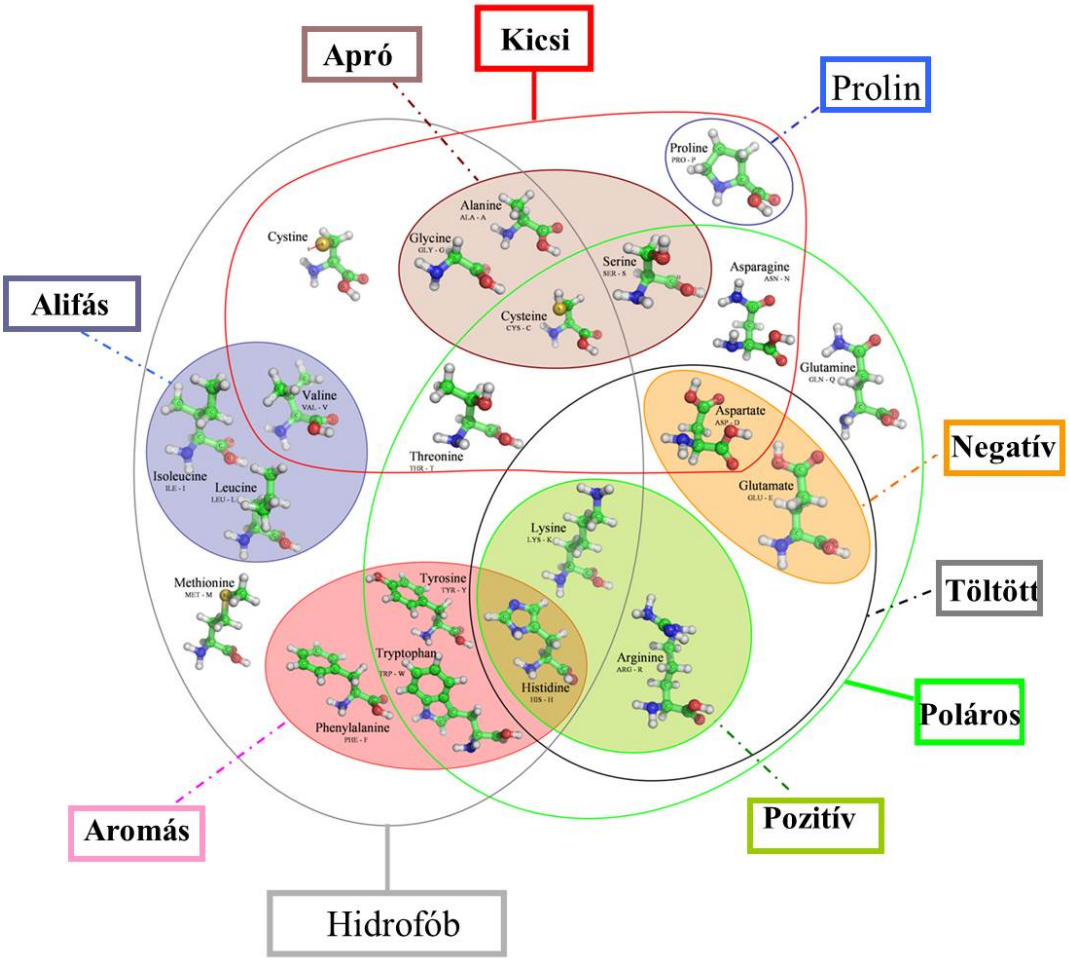


4.9. ábra: A negatív töltéssel rendelkező oldalláncú aminosavak

Bár a protonleadás képessége miatt ezeket az aminosavakat savas aminosavaknak is szokás nevezni, fontos megérteni, hogy ez adott esetben félreérthető megfogalmazás is lehet. Ennek a két aminosavnak az oldallánca semleges kémhatású közegben döntően disszociált, negatív töltésű, karboxilát ion formában van jelen. Amikor az oldallánc az említett formába került, akkor savként viselkedett (protont adott le), de ebben a formában ezek a csoportok már bázisként funkcionálnak, hiszen protont vehetnek fel.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Amint azt több esetben érintettük, egyes aminosavak besorolása nem problémamentes, mivel az egyes, az osztályozáshoz felhasznált tulajdonságok nem zárják ki egymást. Egyes aminosavak tehát egyszerre több csoportba is tartozhatnak. Emellett ráadásul az is igaz, hogy az említett tulajdonságokon felül egyéb fontos tulajdonságok szerint is érdemes csoportosítani az aminosavat. Ilyen például a méret. Az aminosavak különböző elvek mentén történő csoportosítását jól szemlélteti a **4.10. ábra** bemutatott Venn-diagram.



4.10. ábra: Az aminosavak egyik lehetséges, egyszerre sokféle fizikai-kémiai szempont szerinti csoportosítása

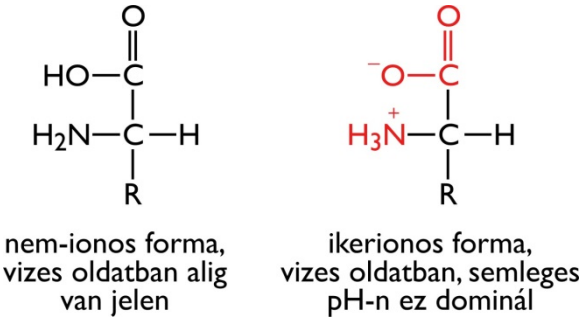
Egy további különleges tulajdonsága miatt a ciszteinnel érdemes külön is foglalkozni. A **ciszteinek** szabad szulfhidrilcsoportjai oxidáció során **diszulfid-hid**akat képeznek. A reverzibilis reakcióban az –SH csoport valójában a disszociált, $–S^-$ formában vesz részt, ezért a reakció lúgos közegben gyors, míg savas közegben szinte egyáltalán nem zajlik le. Savas közegben „konzerválni” lehet az egyensúlyra jellemző állapotot, tehát a szabad és diszulfidhídban lévő csoportok helyzetét. Fehérjék savas hidrolízisekor a diszulfidhídban lévő Cys-Cys csoportokat **cisztin**ként lehet izolálni, míg a diszulfidhidat nem alkotókat cisztein aminosavként. Az –SH csoport polarizálhatósága miatt a cisztein reaktív oldallánccal rendelkezik, amely számos enzimreakcióban központi jelentőségű funkcionális csoportként szerepel.

4.2. Az aminosavak disszociációs állapotai

Ha pusztán az egyes atomok összekapcsolódásait nézzük, akkor az aminosavak felírhatók úgy is, hogy aminocsoportjuk illetve karboxilcsoportjuk nem hordoz töltéseket. Vizes közegben azonban nem ez jellemző az aminosavakra. Az említett két csoport semleges kémhatású közegben töltéssel rendelkezik, ionos állapotban van. A **karboxilcsoport** gyenge savként proton ad le, és **karboxilát anion** formában van jelen. Az **aminocsoport** ezzel szemben a vízből protont vesz fel, a **protonált amin pozitív töltés**ű ionként van jelen.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az aminosavak a két említett csoportjuk miatt tehát két ellentétes töltést mindenképpen hordoznak, így **vizes közegben ikerion**os (***zwitterion***) állapotban vannak jelen (lásd **4.11. ábra**). Egyes aminosavak esetében természetesen ezen felül az oldallánc is hordozhat töltést.



4.11. ábra: Az aminosavak vizes oldatban ikerionos állapotban vannak jelen.

4.2.1. Disszociábilis csoportot nem tartalmazó oldalláncú aminosavak izoelektromos pontja

Egy molekula **izoelektromos pontja (IEP)** az a pH érték, amelyen a molekulának nincs eredő (nettó) töltése. Azok az aminosavak, amelyek oldallánca nem tartalmaz disszociációra képes csoportot, diprotikusak, tehát két disszociációra képes protont tudnak hordozni. Egyiket az amino, másikat a karboxil csoportjukon. Ezeknek az aminosavaknak a titrálási görbéje emiatt olyan, mint két független monoprotikus sav közös oldatáé.

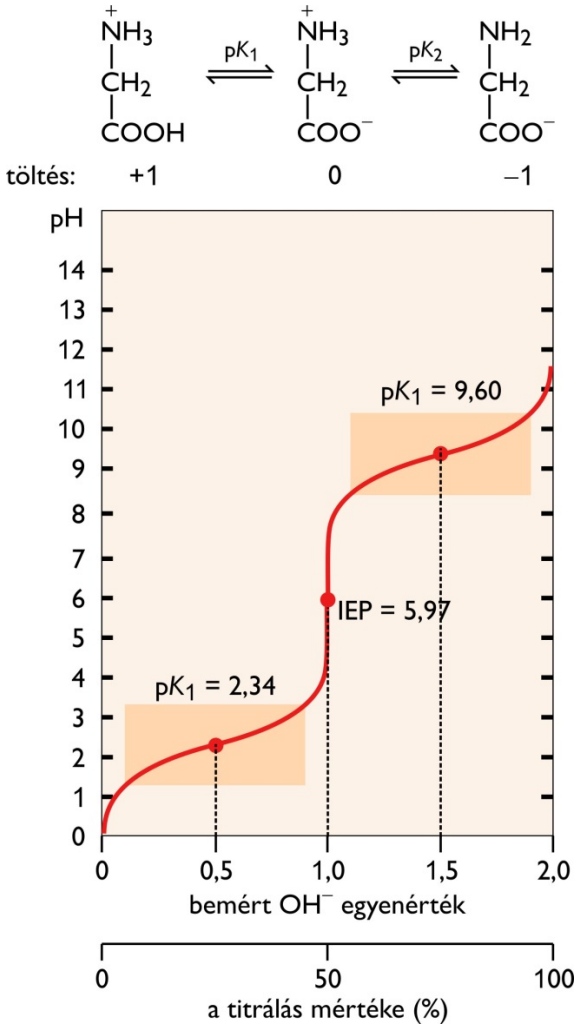
Példaként nézzük meg a glicin titrálási görbéjét (lásd **4.12. ábra**):

A titrálási görbe meghatározásakor egy maximálisan protonált +1 töltésű állapotból indulunk, és ehhez adagolunk nátriumhidroxidot. A titrálás végére – 1 töltésű formához jutunk.

A +0,5 töltéshez tartozó pH megadja a karboxilcsoport pK_a értékét, míg a -0,5 töltéshez tartozó pH megadja a protonált aminocsoport pK_a értékét.

A diprotikus aminosavak izoelektromos pontja az amino és karboxil csoportok pK_a értékeiből könnyen számolható, ugyanis az IEP ezen értékek egyszerű számtani közepe.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.12. ábra: A glicin titrálási görbéje

4.2.2. Disszociábilis csoportot tartalmazó oldalláncú aminosavak izoelektromos pontja

Azoknál az aminosavaknál, amelyek oldallánca hordozhat disszociációra képes protont, a titrálási görbe összetettebb, mivel három proton disszociációjára is sor kerül. Ezeknél az aminosavaknál az izoelektromos pont azoknak a pK_a értékeknek az összege, amelyek a titrálási görbén a semleges töltésű állapotot „szegélyezik” (lásd **4.13. ábra**).

Erre két példát is bemutatunk. Az egyik egy sav, a glutaminsav esete.

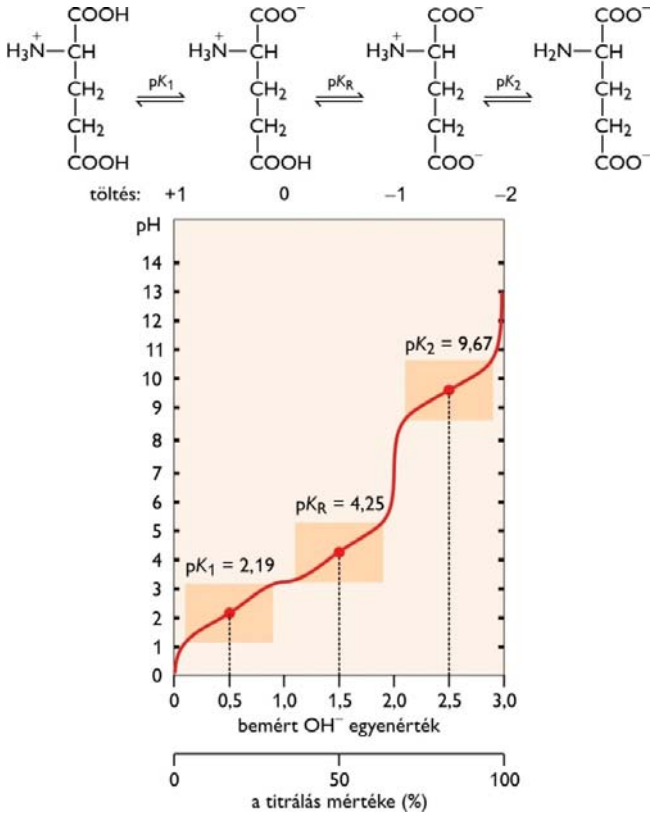
Látható, hogy itt az izoelektromos pont az α karboxil csoport és az oldallánc karboxil csoport pK_a értékeinek az átlaga: $IEP_{Glu} = ½ (pK_1 + pK_R) = 3,22$.

A másik példa egy bázis, a hisztidin esetében mutatja be az IEP kiszámítás módját (lásd **4.14. ábra**).

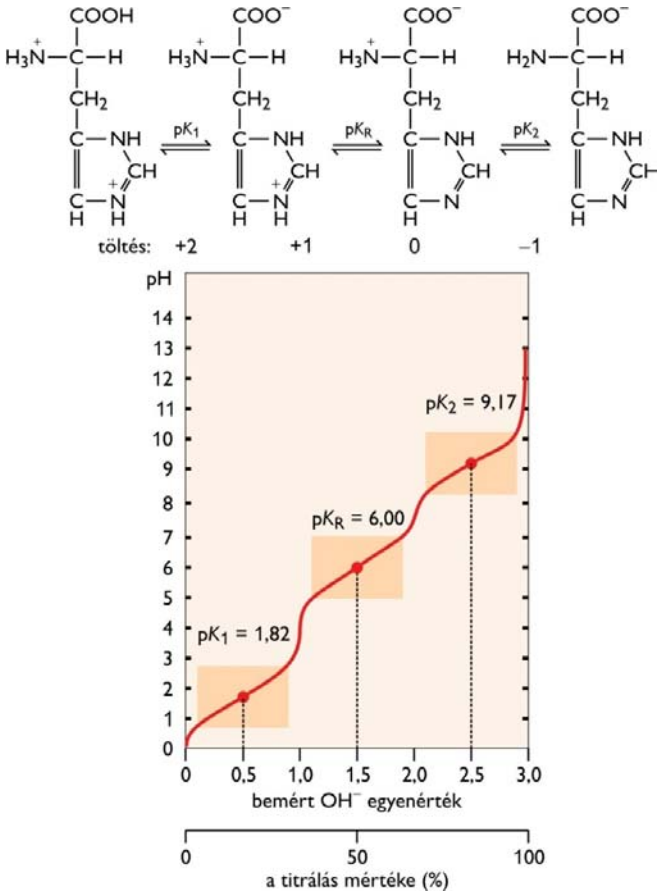
Míg a glutaminsav esetében a titrálás során +1 töltésű állapotból -2 töltésű állapotig jutottunk el, a hisztidin esetében a teljesen protonált állapot +2 töltésű, és a titrálás végén -1 töltésű formához jutunk.

Ebben az esetben az oldallánc pK_a értékének és az α aminocsoport pK_a értékének az átlaga adja meg az IEP értékét: $IEP_{His} = ½ (pK_R + pK_2) = 7,59$

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.13. ábra: A glutaminsav titrálási görbéje



4.14. ábra: A hisztidin titrálási görbéje

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

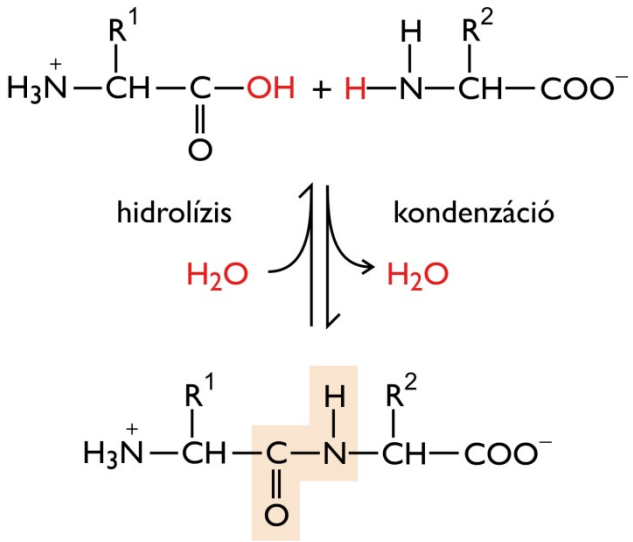
A fenti két ábrából az is látszik, hogy az α-karboxil és -aminocsoportok pKa értékei nem függetlenek az aminosav oldalláncától.

4.3. Peptidkötés, polipeptidek, fehérjék

4.3.1. A polipeptidlánc alaptulajdonságai

Amint arról már szó esett, a **fehérjék** egymással összekapcsolt **aminosavak lineáris polimerjei**. A fehérjékben az aminosav csoportokat **peptidkötések** kötik össze. Az elnevezés Emil Fischer nevéhez fűződik. Emil Fischer mutatta ki azt, hogy megfelelő kémiai módszerrel aminosavakból lineáris polimerek, polipeptidek jöhetnek létre, amelyek fehérjeszerű tulajdonságokat mutatnak. Egy rendkívül ötletes kísérletében azt is bebizonyította, hogy ezek a mesterségesen létrehozott polipeptidek fehérjebontó enzimekkel kezelve ugyanúgy aminosavakra bonthatók, mint maguk a természetes fehérjék. Az enzimek nagyfokú szelektivitására alapozva ebből az eredményből arra következtetett, hogy a fehérjékben is ugyanolyan kémiai kötések vannak az aminosav csoportok között, mint az általa létrehozott polipeptidekben.

Ha pusztán a végtermékeket tekintjük, akkor a polipeptidek aminosavakból való létrejötte illetve aminosavakra történő bomlása az alábbi kémiai egyenletekkel írható le (lásd **4.15. ábra**).



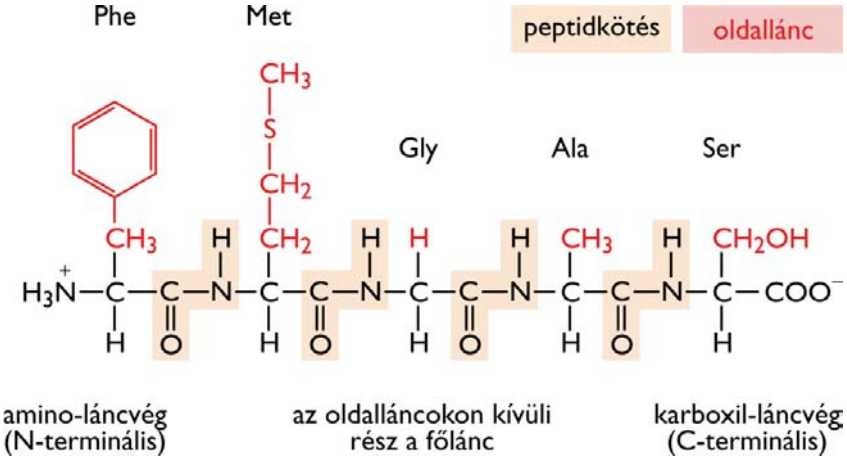
4.15. ábra: A peptidkötés bomlása hidrolízissel, illetve kialakulása kondenzációval

A **polipeptid felbomlása hidrolízis**sel megy végbe, vagyis peptidkötésenként egy vízmolekula „lép be” a hasadó molekulába. Ez a folyamat exergonikus, tehát negatív szabadentalpia változással jár, és ennek köszönhetően spontán végbemegy. A folyamat ugyanakkor rendkívül lassú (katalizátor nélkül a felezési idő több év!). Ennek az az oka, hogy a reakció egy magas szabadentalpiájú köztes állapoton keresztül zajlik, vagyis a reakciónak magas az aktivációs szabadentalpiája. A kémiai átalakulások sebességének termodinamikai leírásával a **9. fejezet** foglalkozik.

A spontán végbemenő hidrolízis folyamatához képest fordított folyamat, a vízkilépéssel történő kondenzáció, a **polipeptidlánc szintézise** természetesen nem mehet végbe spontán. Ez a folyamat pozitív szabadentalpia változással járna, vagyis **endergonikus**. Amint azt később részletesen látni fogjuk a transzláció fejezetben, az élő szervezetben a fehérjék egy ATP-igényes folyamatban, **kapcsolt reakciókon keresztül** keletkeznek. A kapcsolt reakciókban az aminosavak aktivált, nagy szabadentalpia szintű vegyületek részeiként jelennek meg. A folyamatot kísérő ATP-AMP átalakulás miatt a kapcsolt reakciók együttesen már exergonikusak.

A fehérjék kémiai értelemben aminosavakból felépülő lineáris (el nem ágazó) polimerek (lásd **4.16. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



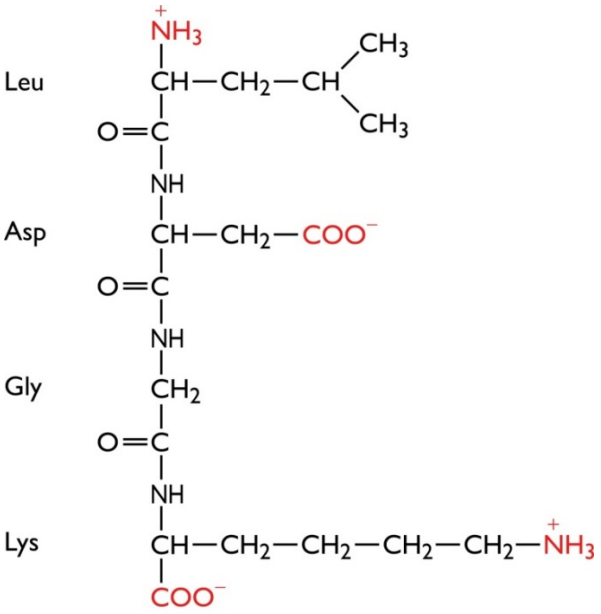
4.16. ábra: A polipeptidnek irányultsága van, a főlánc monoton szerkezetű, a változatosságot az oldalláncok sorrendje jelenti

Mivel az aminosavak nem szimmetrikus molekulák, ezért a belőlük létrejövő **polipeptidláncnak irányultsága van**. A láncnak van egy aminocsoportot tartalmazó vége (amino-láncvég, **N-terminális**) és egy karboxil csoportot tartalmazó vége (karboxil-láncvég, **C-terminális**).

A polipeptidláncban szereplő egységeket **aminosav maradékok**nak hívjuk, hiszen nem a teljes aminosavak, hanem a vízkilépés utáni „maradékok” (*residue*) épülnek össze a láncban. Az aminosav maradékokat peptidkötések kötik össze. A peptidkötés szerkezetével a következő alfejezet foglalkozik.

A polipeptidláncban az eredeti aminosavak oldalláncai változatlan formában jelen vannak, ezek lesznek a polipeptid **oldallánc**ai. Az oldalláncokon kívüli részt **főlánc**nak (vagy **peptidgerinc**nek) hívjuk.

A polipeptid váza, vagyis a főlánca tehát (a prolin csoportokat leszámítva) egy azonos, ismétlődő egységekből felépülő, homogén struktúra. Az aminosav egységenkénti változatosságot a láncban egymást követő oldalláncok sorrendje jelenti. Az egyes peptidek savas, ill. bázikus jellegét, oldhatóságát, kémiai reakciókban való viselkedését döntően a bennük lévő oldalláncok kémiai jellege határozza meg. A **4.17. ábra** egy tetrapeptid, azaz négy aminosavból álló peptid szerkezetét mutatjuk be.



4.17. ábra: A peptidek kémiai karakterét az oldalláncok dominálják

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

4.3.2. Fehérjeszerkezeti szintek: primer (elsődleges) szerkezet

A polipeptidek bevezetésekor magától értetődően megjelenik az aminosavsorrend fogalma. Emiatt célszerű már most megemlíteni a biokémia által definiált fehérjeszerkezeti szinteket. **Négy szerkezeti szint**et különítünk el.

Az **elsődleges** (primer) szerkezet nem más, mint **a fehérje aminosavsorrendje**, más néven **szekvenciája**.

Mint már láttuk, a polipeptidláncnak van egy főlánc része. A peptidgerincen lévő peptidkötések N-H és C=O csoportjai hidrogénhíd kötés kialakítására képes funkciós csoportok. Ismert néhány olyan **szabályos főlánc-konformáció**, amelyben az említett csoportok egymással **hidrogénhidak**at alakítanak ki. Ezek a szabályos konformációk képviselik a fehérjék **másodlagos** (szekunder) **szerkezeti szint**jét.

A harmadik fehérjeszerkezeti szint, tehát a **harmadlagos** (tercier) **szerkezet** nem más, mint a polipeptidlánc térbeli**, háromdimenziós szerkezete** (konformáció). A háromdimenziós szerkezetet akkor tekinthetjük ismertnek, ha egy háromdimenziós koordinátarendszerben elhelyezve meg tudjuk adni egy polipeptidlánc összes atomjának mindhárom térkoordinátáját.

A **negyedleges** (kvaterner) **szerkezet** a **több alegységből álló fehérjék** miatt került bevezetésre. A negyedleges szerkezet ismerete feltételezi az összes alegység harmadlagos szerkezetének ismeretét. Ennél a szerkezeti szintnél azt jellemezzük, hogy az egyes alegységek a többi alegységhez képest miként helyezkednek el a térben.

4.3.3. A fehérjék mérettartománya

A legtöbb fehérje kb. 50 – 2000 aminosav-maradékból áll. Egy aminosav maradék átlagosan 110 Da, a fehérjék zöme tehát 5.500-200.000 Da (5,5-200 kDa) közötti molekulatömegű. Egy átlagos méretű fehérje 300-400 aminosavból áll (~40 kDa). A **4.2. táblázat**ban szereplő táblázat néhány tipikus példát mutat be arra, hogy a fehérjék méret és összetétel szempontjából milyen változatosságot mutatnak. A táblázat egyre növekvő méret szerinti felsorolásban mutatja be a tipikus példákat.

4.2. táblázat: Néhány fehérje molekulatömege és alegység-összetétele

A fehérje neve	Molekulasúly	Aminosav csoportok száma	Polipeptid-láncok száma
citokróm-c (humán)	13.000	104	1
ribonukleáz-A (szarvasmarha hasnyálmirigy)	13.700	124	1
lizozim (tojásfehérje)	13.930	129	1
mioglobin (lószív)	16.890	153	1
kimotripszin (szarvasmarha)	21.600	241	3
kimotripszinogén (szarvasmarha)	22.200	245	1
hemoglobin (humán)	64.500	574	4
szérumalbumin (humán)	68.500	609	1
hexokináz (élesztő)	102.000	972	2
RNS-polimeráz (*E. coli*)	460.000	4.158	5
apolipoprotein (humán)	513.000	4.536	1
glutamin-szintetáz (*E. coli*)	619.000	5.628	12
titin (humán óriásfehérje)	2.993.000	26.926	1

Ennek a táblázatnak a tanulságai részleteiben csak a későbbi fejezetek ismereteinek fényében lesznek majd világosak. Néhány tanulságot azonban az érdekesség kedvéért előre megemlítünk.

A **citokróm-c**, a **ribonukleáz-A** vagy a **lizozim** mind **kisméretű** enzimek. Ezek egy olyan mérettartományban vannak, amelynél lényegesen kisebb méretben valószínűleg nem jöhet létre hatékony enzim. Kisebb méretű fehérjék

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

tehát ismertek, de enzimfehérjék nem. Az **enzimek** mind gömbszerű, **globuláris fehérjék**, amelyeknek rendelkezniük kell egy vagy több szubsztrátkötő hellyel, és valamilyen, a kémiai katalízisben főszereppel bíró központi résszel, aktív centrummal. A mai ismeretek szerint az enzimkatalízis szempontjából elengedhetetlen, hogy a katalizáló enzim stabil térszerkezettel rendelkezzen. A jelek szerint a megfelelő stabilitású, és egyben a szükséges funkcionális részeket is tartalmazó struktúra létrehozásához valamivel több, mint 100 aminosav egység szükséges.

A kimotripszinogén és a kimotripszin összehasonlítása is tanulságos. A kimotripszin egy fehérjebontó enzim, amit a hasnyálmirigy termel. A mirigyben inaktív formában **(zimogén)** termelődik, amelynek a neve kimotripszinogén. Ez egyetlen polipeptidláncból áll. A **kimotripszinogén**ben a szubsztrát megkötéséért felelős részlet nincs megfelelő térszerkezetben. A bélbe ürülő kimotripszinogént a szintén a hasnyálmirigy által termelt tripszin nevű fehérjebontó enzim aktiválja úgy, hogy a kimotripszinogénben egyes meghatározott peptidkötéseket elhidrolizál. Ennek eredményeképpen egy négy aminosav csoporttal kisebb, immár három, diszulfidhidakkal összekötött polipeptidláncból álló, **aktív** szubsztrátkötő apparátussal rendelkező forma, a **kimotripszin** alakul ki.

A **hemoglobin** is több polipeptidláncból áll, de ennek hátterében egészen más jelenség áll. A hemoglobin egy valódi **több alegység**es fehérje. Kétféle polipeptidláncból (alegységből) épül fel, mindkét típusból kettőt találunk a működő fehérjében. A hemoglobinnál mintegy másfélszer nagyobb szérumalbumin egyetlen polipeptidláncból áll, amely egyetlen gömbszerű (globuláris), önálló feltekeredésre képes részből, más szóval doménből áll. A táblázat alján a szérumalbuminnál jóval nagyobb méretű fehérjéket találunk. Ezek hatalmas mérete azonban nem azt jelenti, hogy ezek szerkezete szintén egyetlen, de egyre nagyobb, gömbszerű doménen alapulna. A domének mérete viszonylag szűk tartományon belül van, a hidrofób hatás miatt kialakuló apoláros mag mérete ugyanis nem lehet akármekkora.

A **nagy méretek** mögött rendszerint két fő ok áll. A fehérje állhat például nagyjából átlagos méretű alegységekből, de ezek száma akár igen nagy is lehet, lásd a **hexokináz**, **RNS-polimeráz**, **glutamin-szintetáz** „sorozatot”. Egy másik lehetséges ok az, hogy ugyan a fehérje egyetlen polipeptidláncból (egyetlen alegységből) áll, de nagyon nagyszámú, önálló feltekeredésre képes, globuláris szerkezeti egység, tehát domén építi fel. Erre példa a **hatalmas méret**ű, egyetlen láncból álló titin fehérje, ami a harántcsíkolt izom passzív rugalmasságát biztosítja. A **titin** fehérjében 244 domén van, amelyeket szerkezetnélküli szakaszok kötnek össze. A harántcsíkolt izom működési egységén, a szarkoméren belül egy-egy titin fehérje átíveli a szarkomer egység hosszának felét. A fehérje egyik vége a Z-vonalhoz (szarkomer széléhez), míg a másik vége az M-vonalhoz (szarkomer közepéhez) kötődik. Az izom nyúlásakor a szarkomer hossza növekszik. Ennek során a titin molekula úgy tud nyúlni, hogy a benne lévő domének sorra letekeredjenek. Az izom összehúzódásakor a szarkomerek rövidülnek, ekkor az említett domének újra feltekeredjenek.

4.3.4. Egyszerű és összetett fehérjék

A fehérjék zöme pusztán a már megismert 20-féle aminosavból épül fel. Ezeket **egyszerű fehérjék**nek is nevezik. Vannak azonban **összetett fehérjék** is, amelyek a polipeptidlánc(ok) mellett egyéb, nem fehérje természetű csoportokat is tartalmaznak (lásd **4.3. táblázat**).

Amennyiben az utóbbiak kovalens módon kötődnek a fehérjéhez, fehérje-konjugátumról beszélünk. Az összetett fehérjék közé tartoznak a **glikoproteinek** és **lipoproteinek** is, amelyekben cukor illetve lipid természetű csoportokat kapcsolódnak kovalensen az oldalláncokhoz. A nem fehérje természetű komponenst

kofaktornak hívjuk. A kofaktorok rendkívül sokfélék lehetnek (szerves molekulák, ionok, esetenként fématomok) és szerepük is nagyon sokféle lehet. Az enzimek katalitikus folyamataiban résztvevő vagy azt segítő kofaktorok neve **koenzim**, illetve erős (kovalens) kötődés esetén **prosztetikus csoport**. Az utóbbiak zöme vitamin természetű (például a B_1-vitamin származéka, a tiamin-pirofoszfát, amely többek között a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex egyik koenzime).

4.3. táblázat: Az összetett fehérjék típusai

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Típus	Egyéb csoport	Példa
lipoproteinek	lipid	β_1-lipoprotein
glikoproteinek	szénhidrát	immunglobulin G
foszfoproteinek	foszfátcsoport	kazein (tejben)
hemoproteinek	Hem (vas-porfirin)	hemoglobin
flavoproteinek	flavin nukleotidok	borostyánkősav dehidrogenáz
metalloproteinek	vas	ferritin
	cink	alkohol-dehidrogenáz
	kálcium	kalmodulin
	molibdén	dinitrogenáz
	réz	plasztocianin

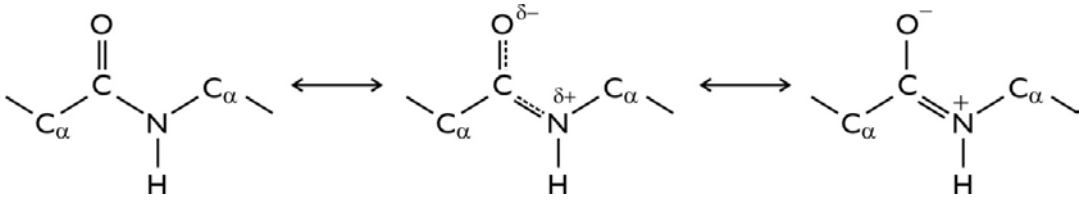
4.3.5. A peptidkötés szerkezete és tulajdonságai

Térjünk vissza a peptidkötésre, ugyanis amint azt látni fogjuk, ennek szerkezeti tulajdonságai döntő mértékben befolyásolják a fehérjék másodlagos, és ezen keresztül harmadlagos szerkezetét.

Kristályosított peptidek röntgenszórási adatait elemezve Linus Pauling és Robert Corey az 1930-as években arra jutott, hogy a **peptidkötés**ben szereplő szénatom és nitrogénatom távolsága 1,32 Angström. Ez a távolság kisebb, mint egy tipikus egyszeres C-N kötés távolsága (1,49 Angström), de nagyobb, mint egy tipikus C=N kettőskötés távolsága (1,27 Angström). Ez arra utalt, hogy valami módon a C-N kötés „**részlegesen kettőskötés** természetű".

Pauling és Corey azt is megállapították, hogy a peptidkötés **planáris szerkezet**ű: a benne szereplő OCNH atomok, valamint a N- és C-atomhoz kapcsolódó 1-1 C_α-atom, tehát mindösszesen 6 atom egy síkban van.

Világossá vált, hogy a peptidkötés elektronszerkezete nem írható fel valósághűen úgy, hogy a kötésben lévő atomok között kizárólag egyszeres és kettőskötéseket feltételezünk. A valós elektronszerkezet egyfajta köztes állapotot jelent két határszerkezet között, ahogyan azt a **4.18. ábra** mutatja. Az egyik határszerkezetben (**4.18. ábra** baloldalán) a szénatom és az oxigénatom között kettőskötés van, míg a szénatom és a nitrogénatom között egyszeres kötés van, és egyik atom sem hordoz nettó töltést.



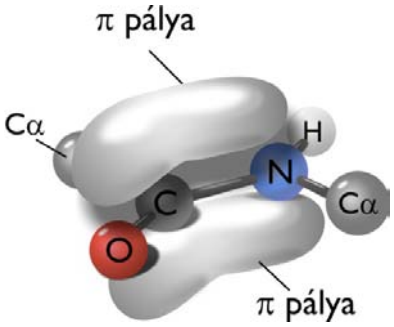
4.18. ábra: A peptidkötés delokalizált elektronszerkezete és a két határszerkezet

A másik határszerkezetben (**4.18. ábra** jobboldalán) a szénatom és az oxigénatom között egyszeres, az szénatom és a nitrogénatom között kettőskötés van, az oxigénatom ekkor egyszeresen negatívan, míg a nitrogénatom egyszeresen pozitívan töltött.

A valós szerkezet (**4.18. ábra** közepén) a két hipotetikus határszerkezet kombinációja, melyben a szénatom és az oxigénatom, valamint a szénatom és a nitrogénatom között részleges kettőskötés van, az oxigénatom részleges negatív töltés, a nitrogénatom pedig részleges pozitív töltés hordoz.

A két határszerkezet a valóságban tehát nem létezik, a valós szerkezet nem oszcillál a két határszerkezet között. A valós szerkezet egyetlen stabil szerkezetet jelent, amelyben ötvöződnek a két hipotetikus határszerkezet egyes tulajdonságai. A delokalizált elektronszerkezet két π-pálya formájában jön létre (lásd **4.19. ábra**).

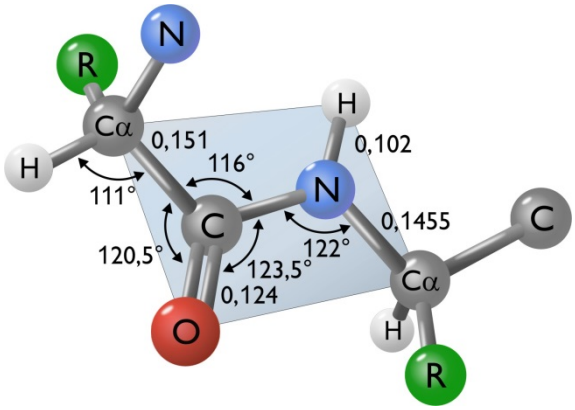
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.19. ábra: A peptidkötés delokalizált elektronszerkezete

Mivel ezek miatt a szénatom és a nitrogénatom között nem egyszeres kovalens kötés van, ezért a szén és a nitrogénatomot összekötő vonal, mint tengely körül nem tud szabadon elfordulni egymáshoz képest a molekula két része. Pauling és Corey következtetésének mindenben megfelelő módon a peptidkötésben résztvevő, illetve azt szegélyező összesen 6 atom egy síkban van.

A **4.20. ábra** peptidkötés **transz konfiguráció**ban van, a C=O és az N-H csoportok a C-N kötés által meghatározott egyenes két átellenes oldalán vannak, ahogyan azt a **4.20. ábra** részletesebben is szemlélteti, bemutatva az egy síkba kerülő hat atom tekintetében a kötéshosszakat és a kötésszögeket is.



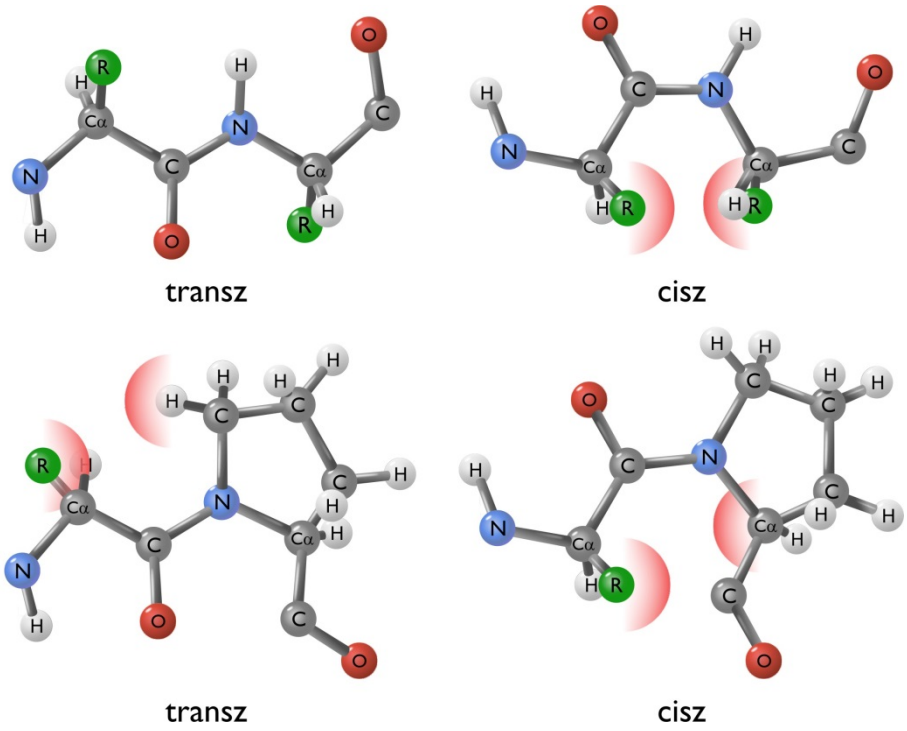
4.20. ábra: A delokalizált szerkezetű peptidkötésre jellemző kötésszöge és kötéshosszak

Az említett 6 atom úgy is egy síkban lehet, ha a peptidkötés cisz konfigurációjú. Ezt a **4.21. ábra** illusztrálja.

A cisz konfigurációban a peptidkötés két oldalán lévő C_α atomokhoz kapcsolódó oldalláncok azonban olyan közelségbe kerülnek, hogy a közöttük fellépő rövidtávú taszítás miatt ez a konfigurációs állapot energetikailag rendkívül kedvezőtlen, a transz konfigurációhoz képest magasabb szabadentalpia szintet jelent. Emiatt az ismert fehérjeszerkezetekben – hacsak nem X-Pro peptidkötésről van szó-, a cisz konfiguráció csak pár ezrelékben fordul elő. Emlékezzünk vissza: a termodinamikai alapismeretekben leírtak szerint az egymással egyensúlyban lévő állapotok előfordulási arányait a köztük lévő szabadentalpia különbség határozza meg.

Az X-Pro peptidkötések esetében azonban, ahogyan azt a **4.21. ábra** alsó része illusztrálja, mind a transz, mind a cisz konfiguráció esetében túl közel kerülnek egymáshoz bizonyos molekularészletek. Emiatt a két állapot közötti szabadentalpia szint különbsége kisebb. A **transz/cisz megoszlás** az **X-Pro kötések** esetében ~ 95% / 5% megoszlást eredményez.

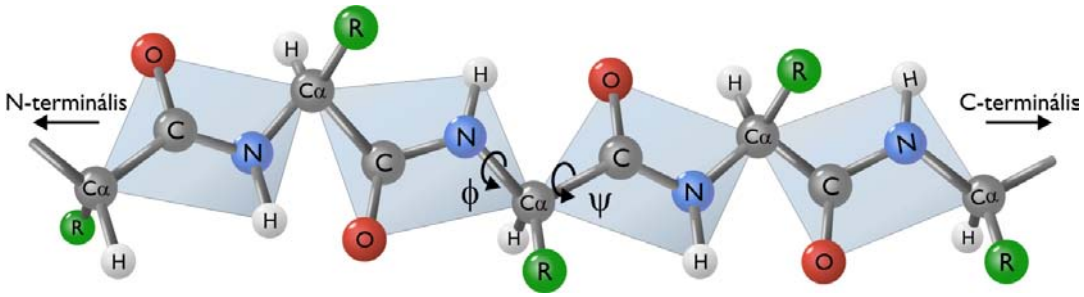
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.21. ábra: A peptidkötés cisz és transz konfigurációjú állapota általános esetben, illetve a prolin esetében

4.3.6. A fehérje főlánc (peptidgerinc) konformációjának geometriai jellemzése

A fehérje **peptidgerinc**én rendre **N-C_α-C-N** kötések követik egymást. A főlánc konformációja egyértelműen megadható az említett kötések mentén létrejövő szög-elfordulásokkal azaz torziós szögekkel. Ahogyan azt az imént elemeztük, a C-N kötés körüli elfordulással a peptidkötés planaritása miatt valójában nem kell foglalkoznunk. A főlánc konformációjának megadásához tehát elegendő az **N-C_α kötések körüli**, **Φ**, illetve a **C_α-C kötések körüliΨ torziós szögek** ismerete, ahogyan azt a **4.22. ábra** is mutatja.



4.22. ábra: A főlánc konformációja egyértelműen megadható az N-C_α kötések körüli Φ, illetve a C_α-C kötések körüli Ψ torziós szögekkel

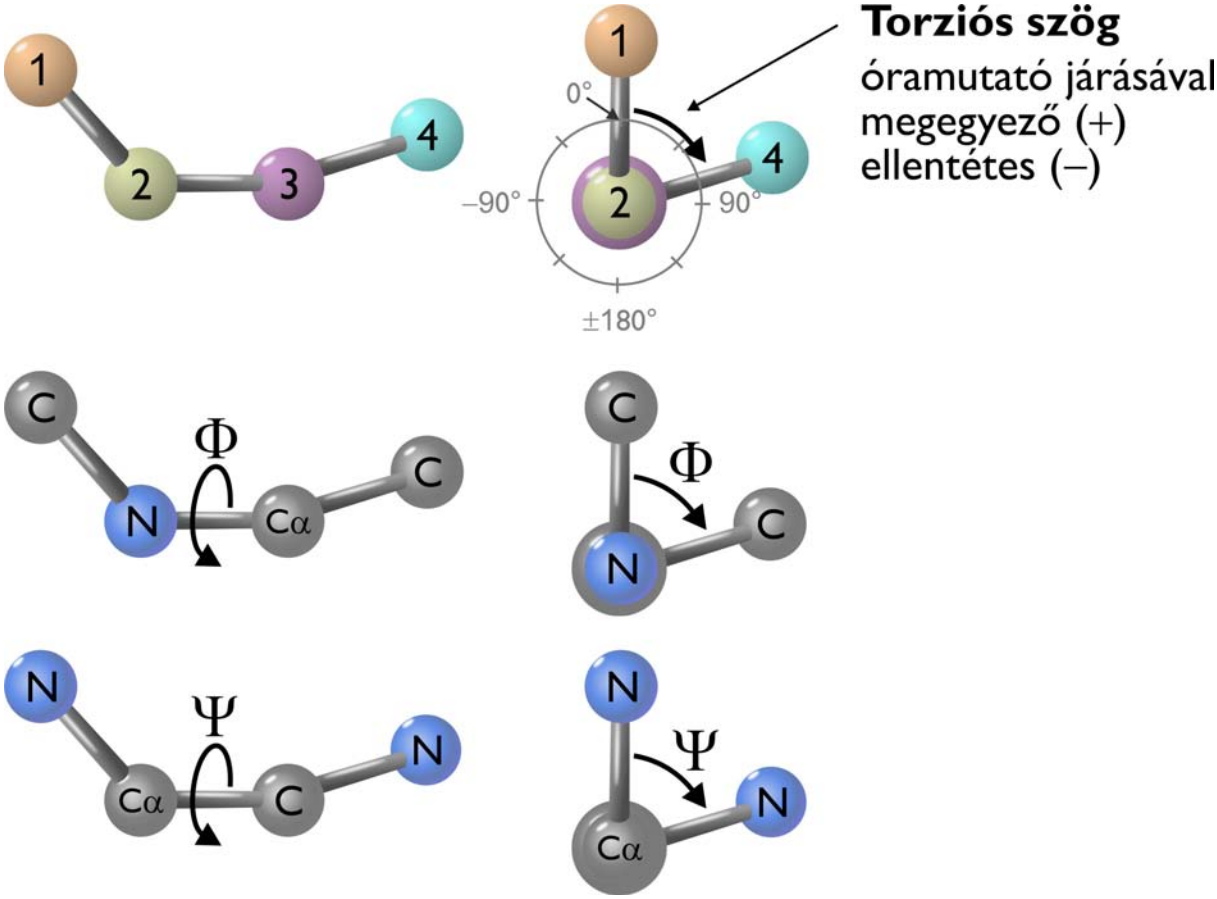
Annak érdekében, hogy egyértelmű legyen a Φ, Ψ szögek jelentése, a **4.23. ábra** segítségével részletesen is bemutatjuk a torziós szögek definícióját.

A torziós szöget négy, egymást a molekulán belül sorban követő, atom vonatkozásában definiáljuk. A 2. és 3. atom közötti kötés körüli elfordulás mértékét adjuk meg. A torziós szög az mutatja meg, hogy a 2., 3. és 4. atom által definiált sík hány fokkal van elfordulva az 1., 2. és 3. atom által definiált síkhoz képest. Ha ez az elfordulás az óramutató járásával megegyező, akkor a szöget pozitív előjelűnek, ha az óramutató járásával ellentétes, akkor negatív előjelűnek tekintjük, így az összesen 360 fokot egy 0 és plusz 180 fok, valamint egy 0 és mínusz 180 fok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

tartományra bontjuk. A 0 fok esetén az 1. és a 4. atom átfedő pozícióban van. A + 180 és a – 180 fok azonos állapotot jelent, amikor az 1. és a 4. atom éppen ellentétes irányban állnak.

Visszatérve a fehérje főlánc esetére: az N-terminálistól a C-terminális felé haladva a Φ szöget rendre a C-N-C_α-C vonatkozásában, míg a Ψ szöget az N-C_α-C-N vonatkozásában definiáljuk. Látható, hogy az N-terminálison lévő első aminosav csoport esetében Φ szöget nem lehet értelmezni, míg a C-terminális csoport esetében Ψ szöget nem lehet értelmezni, hiszen az utolsó C-atomot nem követi N-atom.



4.23. ábra: A torziós szögek bevezetésének elve, és az elv alkalmazása a polipeptidláncra

Egy „N” tagszámú peptid főláncának konformációja tehát 2N-2, azaz 2(N-1) torziós szöggel jellemezhető. Fontos kiemelni, hogy ez a leírás az oldalláncok konformációjával nem foglalkozik!

A fentiek figyelembevételével tehát a **peptidgerinc** lokális **konformáció**ja minden láncközi aminosav csoport esetében megadható egyetlen **Φ / Ψ szögpár**ral.

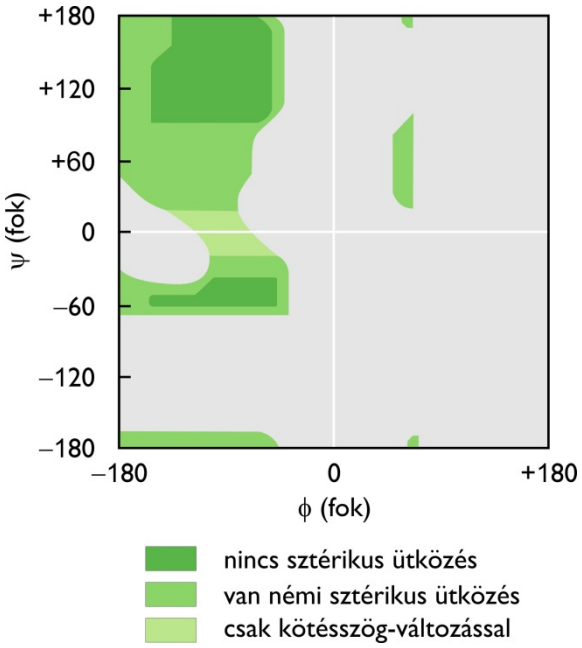
Ennek rendkívül szemléletes grafikus bemutatására szolgál az 1963-ban bevezetett **Ramachandran-diagram**, amit a **4.24. ábra** illusztrál.

A Ramachandran diagram vízszintes tengelyén a Φ, függőleges tengelyén pedig a Ψ szöget ábrázoljuk, mindkét esetben a már ismertetett -180 és 180 fokok közötti tartományban. Ezáltal egy négyzetet kapunk, amelyben minden egyes ponthoz egyetlen Φ / Ψ szögpár tartozik.

A **4.24. ábra** azt mutatja be, hogy amennyiben a polipeptidláncban alaninok követik egymást, mely szögpárok valósulhatnak meg. A sötétzöld tartományt olyan szögpárok alkotják, amelyek esetén nincs funkciós csoportok közötti ütközés. Ezek a termodinamikailag legkedvezőbb főlánc konformációkat reprezentálják. Az egyre halványabb zöld színek a termodinamikailag egyre kevésbé kedvező, de még megvalósuló konformációs állapotokat mutatják. A szürke területre olyan szögpárok esnek, amelyek esetében egyes funkciós csoportok átfedése olyan nagymértékű lenne, hogy a rövidtávú taszítás miatt az adott állapot nem jöhet létre. Vegyük észre, hogy az elméletben rendelkezésre álló szögpároknak a valóságban csak egy kis hányada valósulhat meg.

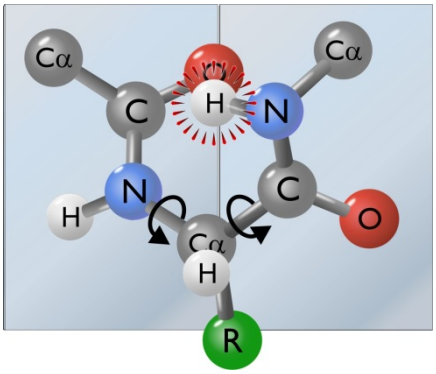
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ha a polipeptidben alanin helyett a legkisebb oldalláncú glicin szerepel, úgy a megengedett tartomány nagyobb, ha az alaninnál nagyobb oldalláncú aminosavak szerepelnek, akkor pedig kisebb.



4.24. ábra: Torziós Φ / Ψ szögpárok ábrázolása a Ramachandran diagramon

A **4.25. ábrán** példaként vizsgáljuk meg, hogy a diagram közepét reprezentáló 0/0 szögpár a valóságban miért nem valósulhat meg. Az ábra világosan mutatja, hogy a Φ = 0 / Ψ szögpár azért nem valósulhat meg, mert az adott aminosav csoport előtti aminosav egység karbonil oxigénje ütközne az adott aminosav csoportot követő aminosav egység N-H csoportjával.



4.25. ábra: A 0/0 Φ / Ψ szögpárhoz tartozó konformáció sztérikus ütközés miatt nem valósulhat meg

4.4. Fehérjeszerkezeti szintek: másodlagos szerkezet

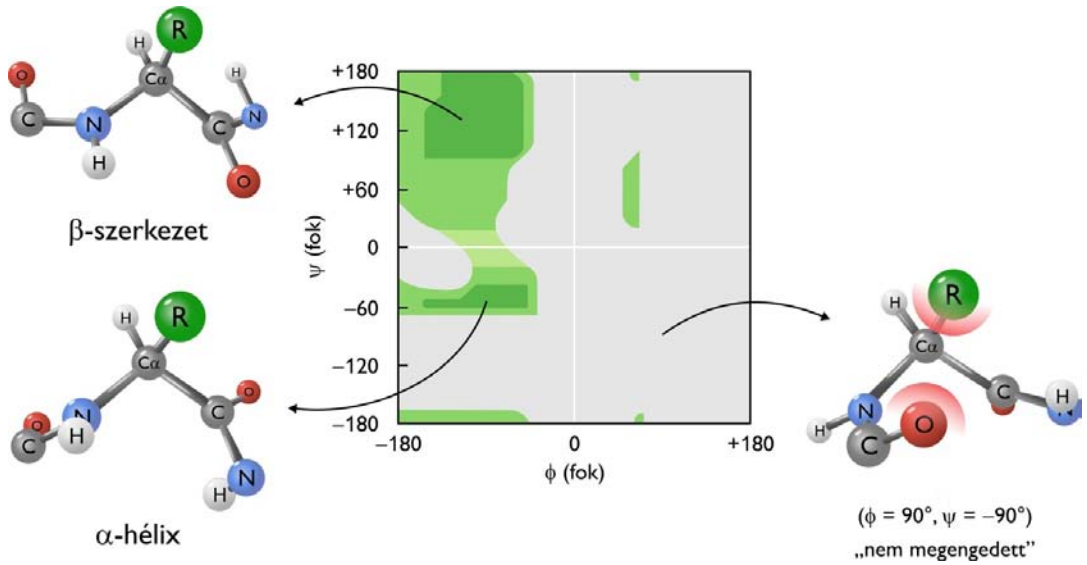
A Ramachandram diagram egy-egy megengedett Φ / Ψ szögpárával jellemzett konformációjának aminosav-egységenkénti ismétlésével szabályos, repetitív, szerkezetek jöhetnek létre. Ezek a potenciális szabályos szerkezetek azonban csak akkor jönnek valójában létre, ha azokat valami stabilizálja.

A létező repetitív szerkezetekben a megfelelő Φ/Ψ szögpárok ismétlődése a peptidgerincen belüli funkciós csoportokat olyan orientációba hozza, hogy azok között szerkezetstabilizáló hidrogénhídak jönnek létre. Az így kialakuló **szabályosas ismétlődő főlánc Φ/Ψ szögpárok** jelentik a fehérjék **másodlagos szerkezet**ét.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

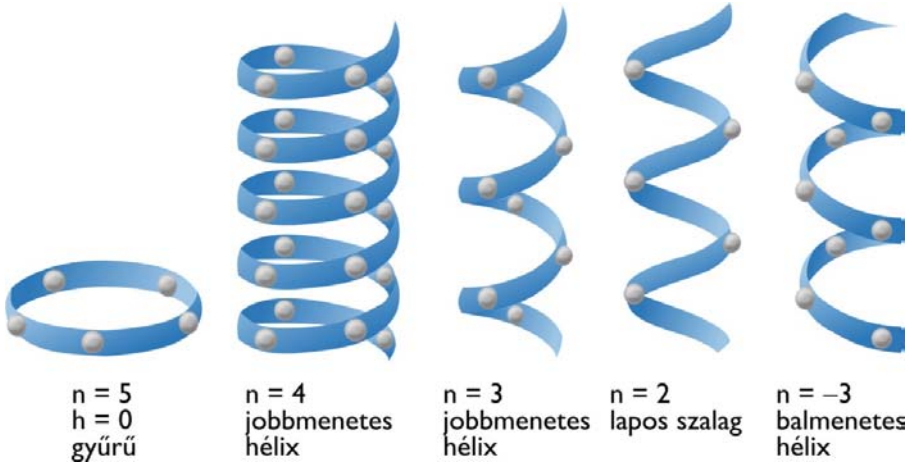
A legelterjedtebb másodlagos szerkezet típusok az **α-hélix**, a **β-redő,** a különböző **hajtűkanyarok,** valamint a **kollagén hélix** (lásd **4.5.3. fejezet**; ez utóbbit konformációja nagyon hasonlít a jegyzetben nem tárgyalt **poliprolin-II hélix**hez).

A **4.26. ábra** mutatja, hogy melyik az a két szögpár, amelynek ismétlődésével a két leggyakoribb stabil másodlagos szerkezeti elem, az α-hélix, a β-redő jön létre.



4.26. ábra: A két energetikailag legkedvezőbb Φ / Ψ pár ismétlődésével jön létre az α-hélix és a β-redő

Mielőtt részletesebben megismerkednénk ezekkel a szerkezeti típusokkal, vizsgáljuk meg, miként írhatók le általánosságban, és hogyan jellemezhetők a szabályos szerkezetek. Ezt a **4.27. ábra** mutatja be.



4.27. ábra: Az elméleti szabályos szerkezetek néhány alapadattal megadhatók

A Φ / Ψ szögpárok ismétlésével a peptidgerinc **térben spirális formá**ba rendeződik. A monomer egységekből álló lánc alkotta spirált alapvetően **három adat**tal lehet jellemezni: milyen irányba tekeredik a spirál, egy teljes fordulatra hány monomer egység jut (jelölése **n**), és egy monomer egységre mekkora menetemelkedés jut (jelölése **h**, mértékegysége nm vagy Å). A két utóbbi szorzatából származtatott **nh = p** megmutatja, hogy egy teljes körfordulat megtétele mekkora emelkedéssel jár. Az „n" nem kell, hogy egész szám legyen. Közmegegyezésre **jobbmenetes spirál** esetében az „**n" pozitív**, balmenetesnél „n" negatív.

Ahogyan azt a **4.27. ábra** is illusztrálja, amennyiben nincs menetemelkedés (p = 0), akkor a lánc gyűrűbe zárul. Amennyiben p > 0, úgy egy spirált, a biokémia nyelvén hélixet kapunk.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Nézzük meg mikor jobbmenetes, és mikor balmenetes a hélix. Pozícionáljuk a hélixet úgy, hogy a tengelye éppen felénk nézzen. Ezek után **a hélix felénk eső végéről elindulva** nézzük meg, hogy miközben a hélixen haladva távolodunk, milyen irányban kerüljük meg a hélix tengelyét. Ha **óramutató járásával egyezőe**n, akkor a hélix **jobbmenetes**, ha **óramutató járásával ellentétesen**, akkor **balmenetes**.

Ezek után nézzük meg, melyek a leggyakoribb olyan valós szabályos másodlagos szerkezetek, amelyeket főláncon belüli stabilizáló kölcsönhatások stabilizálnak.

4.4.1. A másodlagos szerkezetek kísérletes igazolása

Amint azt a peptidkötés szerkezetének ismertetésekor már említettünk, az 1930-as években már sikerrel alkalmazták a röntgendiffrakciót kisméretű, kristályosítható szerves molekulák térszerkezetének vizsgálatára. A röntgendiffrakcióról részletesebben a globuláris fehérjék térszerkezetét tárgyaló **5.1. fejezet**ben írunk. A molekulák kristályszerkezetben mutatott szabályos elrendeződése elengedhetetlen feltétele volt a szabályos röntgenszóródási mintázat létrejöttének.

A fehérjék kristályosítása valójában már az 1800-as évek közepén elkezdődött. Az első fehérjekristályt Friedrich Hünefeld, a hemoglobin felfedezője írta le. Mivel a kémia területén a kristályosítás a homogén formában történő izolálás egyik fontos eljárása volt, a fehérjéket is elsősorban ilyen okok miatt kezdték el kristályosítani. Az első **enzimkristály**t **James Sumner** állította elő 1926-ban, amikor még nem volt nyilvánvaló, hogy az enzimek fehérjék. A kristályosítással ezt sikerült bizonyítani.

Fehérjekristályok tehát már rendelkezésre álltak, de az ilyen kristályok röntgenszórási képe túl komplexnek bizonyult az értelmezésükhöz. A kristályosított fehérjék mind globuláris fehérjék voltak, amelyek térszerkezete meglehetősen komplex. Ugyanakkor ebben az időszakban már elkezdődött a biológiai eredetű **rostok röntgendiffrakciós vizsgálata** is. Az ilyen rostokat a globuláris fehérjéknél egyszerűbb felépítésű molekulák alkották, és bár ezek elrendeződése a rostban nem olyan szabályos, mint egy valódi kristályban, de elegendően szabályosnak bizonyult ahhoz, hogy jellegzetes röntgenszórási mintázatokat eredményezzen.

Tipikus példák voltak ebben az időszakban a textilipar által ösztönzött kutatások, amelyek során például a pamutból (lásd a poliszacharid, cellulóz), a selyemből (lásd a fibroin fehérje) vagy a gyapjúból (lásd a keratin fehérje) származó rostok szerkezetét igyekeztek feltárni.

A selyem vizsgálatának első eredményeit japán kutatók, Nishikawa és Ono szolgáltatták 1913-ban, akik megállapították, hogy a selyemszál rendezett szerkezetet mutat. Az első szisztematikus fehérjeszerkezeti vizsgálat **William Astbury** nevéhez fűződik, aki az 1930-as években, a gyapjúban és az emberi hajban is megtalálható **keratin** fehérje szerkezetét, illetve a fő kötőszöveti fehérje, a **kollagén** szerkezetét vizsgálta.

Ezek után ismerkedjünk meg három tipikus másodlagos szerkezeti típussal.

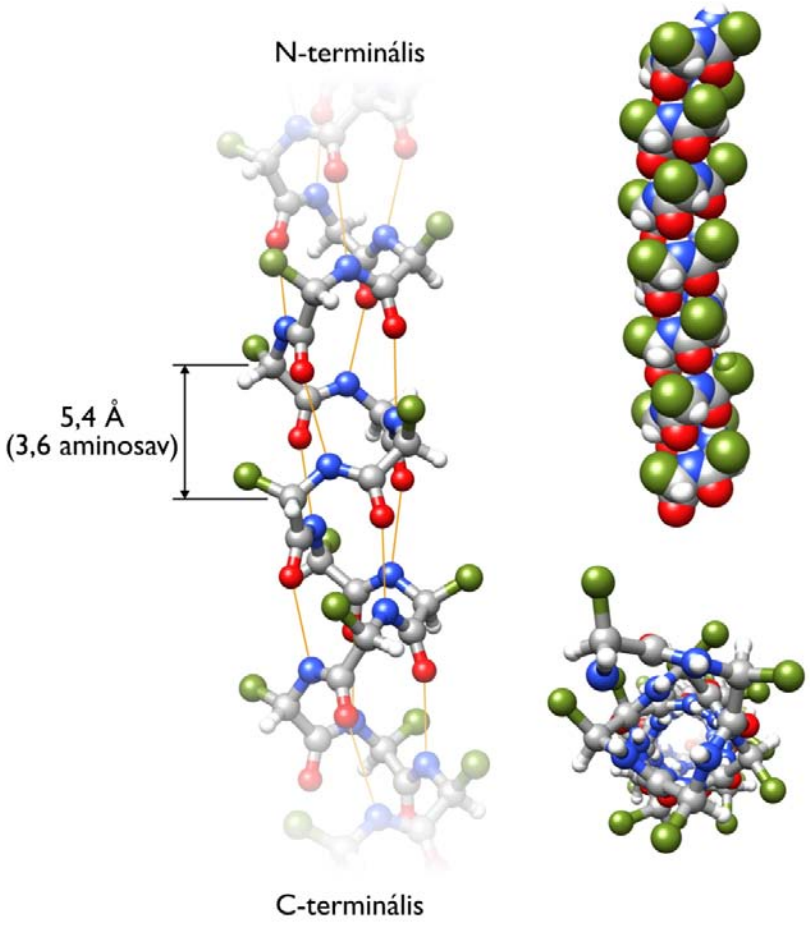
4.4.2. A jobbmenetes α-hélix szerkezet

A **jobbmenetes α-hélix** az elsőként felismert másodlagos szerkezeti elem, amelyet Linus Pauling és Robert Corey írt le 1951-ben. Ez egyben a leggyakoribb másodlagos szerkezeti elem. Jellemző adatai a következők: **n=3,6; h=1,5 Å** tehát **p = hn = 5,4 Å**. Egy fordulatra tehát átlagosan 3,6 aminosav csoport jut, csoportonként a hélix emelkedése csoportonként 1,5 Å, míg teljes fordulatonként 5,4 Å. Az ehhez a szerkezethez tartozó ideális torziós szögpár: Φ=-57º, Ψ=-47º.

Az α-hélix szerkezetben **H-hidak** jönnek létre a hélixben szereplő aminosav csoportok karbonil-oxigénje (mint akceptor) és a szekvenciában 4 csoporttal távolabb eső aminosav maradék N-H csoportja (mint donor) között, tehát egy $\mathbf{n_{(C=O)}}$ / $\mathbf{n+4_{(N-H)}}$ mintázat szerint. Ezt a **4.28. ábra** illusztrálja.

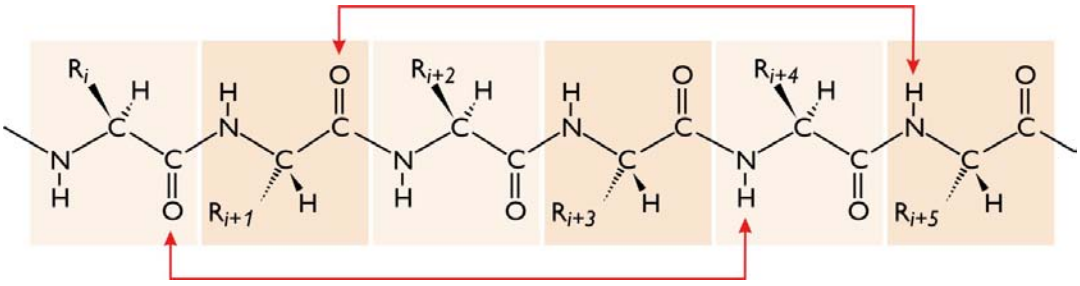
Jól látható, hogy a szerkezet egyetlen rövid, folytonos láncszakaszon belül alakul ki. A kölcsönhatásban első megközelítésben az oldalláncok nem vesznek rész, hiszen ezek a hélix tengelyére nagyjából merőlegesen kifelé mutatnak. Ez jól látszik a **4.28. ábra** golyó-pálcika modelljén is, amelynél a hélix tengelye felénk mutat. Az ilyen ábrázolás azonban annyiban félrevezető, hogy a valóságban a hélix belsejében nincs üreg, a térkitöltés tökéletes. Ezt a térkitöltéses modell jól illusztrálja.º

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.28. ábra: Az α-hélix szerkezete többféle ábrázolásban, és a szerkezetet stabilizáló hidrogénhidak

A H-hidat képző atomok közötti a szekvenciában egymást követő atomok száma: 13, ezért az α-hélix egy **másik** egyezményes **elnevezése: (3,6$_{13}$-hélix)**. Ezt mutatja a **4.29. ábra**).



4.29. ábra: Az α-hélixben H-hidak jönnek létre az aminosav csoportok karbonil-oxigénje és a szekvenciában 4 csoporttal távolabb eső aminosav maradék N-H csoportja között

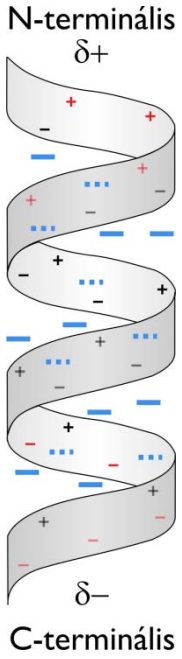
Az ismert fehérje térszerkezetek alapján az α-hélixek **átlagos hossz**a ~**12 aminosav**nyi (18 Å).

A peptidkötés **saját dipólus momentum**a miatt az azonos irányban álló peptidkötések a hélixnek eredő dipólus momentumot kölcsönöznek (lásd **4.30. ábra**).

Az amino-terminális végnél savas, a karboxil-terminális végen bázikus aminosavak stabilizálhatják a dipólust. A H-hidak elrendeződésének logikája miatt az α-hélixben lévő első 4 aminosav egység peptidil N-H csoportja, illetve az utolsó 4 aminosav egység C=O csoportja számára nincs gerinc eredetű hidrogénhíd partner. Ezt kompenzálandó, az eddig megismert fehérjeszerkezetekben gyakran találhatók a α-hélixek két végét szegélyező olyan szekvenciák,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

amelyek oldalláncai képesek hidrogénhíd kötéseket létesíteni az említett peptidilcsoportokkal. Erre a szerkezeti megoldásra a **hélix sapka** (*capping*) elnevezés terjedt el.



4.30. ábra: peptidkötések saját dipólus momentum a hélixnek eredő dipólus momentumot kölcsönöz

4.4.3. A β-lemez szerkezet

A **β-lemez** szerkezetet **β-láncok** hozzák létre a láncok közötti hidrogénhíd kötések révén. A β-láncban a főlánc teljesen nyújtott szerkezetű.

A szerkezetre jellemző alapadatok a következők: **n = 2; h = 3,4 Å**. Ebben az esetben tehát két aminosav csoport jut egy teljes kör megtételére, ami miatt a „spirál" valójában egy teljesen nyújtott, **lapos szalag**.

Vegyük észre, hogy itt az egy egységre jutó menetemelkedés több mint kétszeresen meghaladja az α-hélixre jellemző értéket. A β-láncok egymáshoz képest kétféle elrendeződésben alkothatnak lemezeket, ahogyan azt a **4.31. ábra** mutatja. A láncok elrendeződése lehet **antiparallel** és **parallel**.

Az antiparallel esetre a jellemző torziós szögpár: Φ= –139º, Ψ= +135º, míg a parallel esetre:

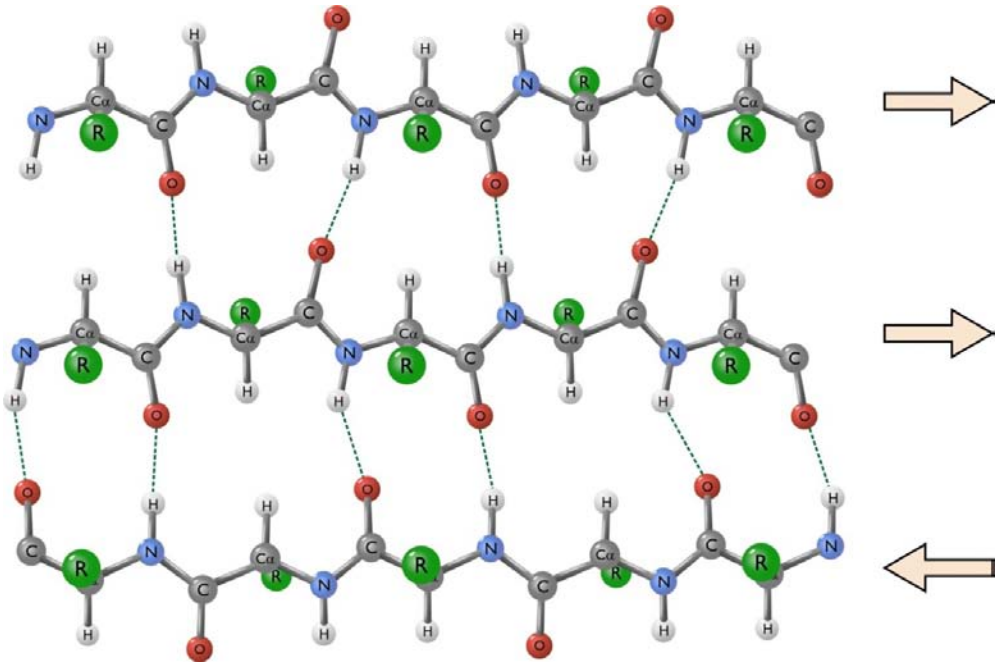
Φ= –119º, Ψ= +113º.

Mint látható, a β-lemezt nem feltétlenül olyan lánc részletek alkotják, amelyek a szekvenciában egymáshoz közel esnek. Az egyes láncok egymástól távol is lehetnek a primer szerkezetben. A **4.31. ábra** azt is mutatja, hogy egyetlen lemezen belül lehetnek parallel és antiparallel elrendeződésű β-láncok is. Az oldalláncok a láncon haladva felváltva a lemez síkja fölé és alá nyúlnak. A hidrogénhidak a **parallel láncok között kevésbé egyenesek** (a donor-hidrogén-akceptor atomok kevésbé esnek egy vonalba, kissé jobbra csavarodnak), de a láncon egyenletesen elosztva helyezkednek el.

Az antiparallel láncoknál a H-hidak egyenesebbek, de kevésbé egyenletesen oszlanak el a szerkezetben.

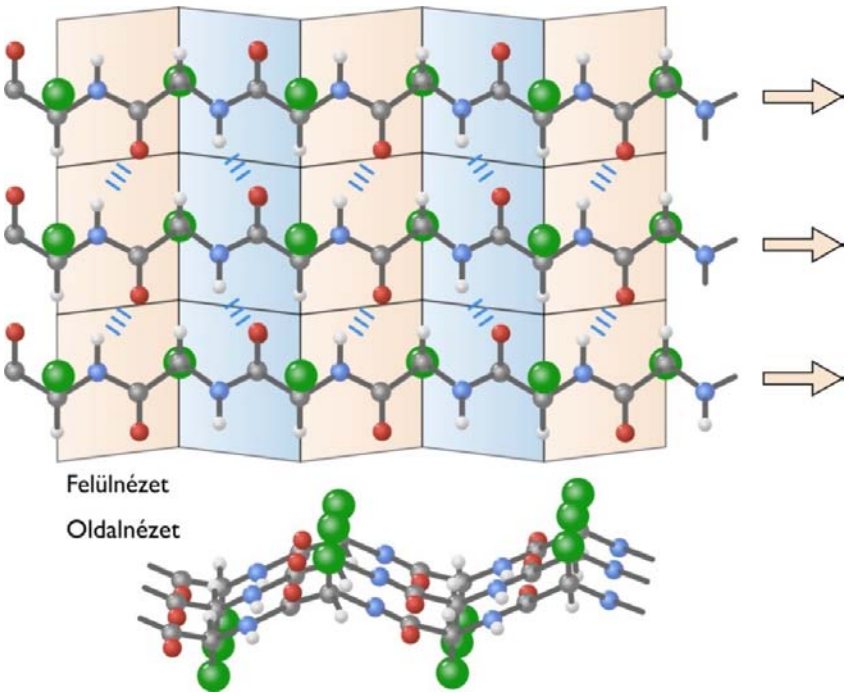
A kialakuló **β-lemez** lehet tisztán **parallel, antiparallel, vagy vegyes**. Az ismert fehérjeszerkezetek alapján a β-lemezek rendszerint **2-12 lánc**ból állnak, míg a **β-lánc**okat átlagosan **5-12 aminosav maradék** alkotja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



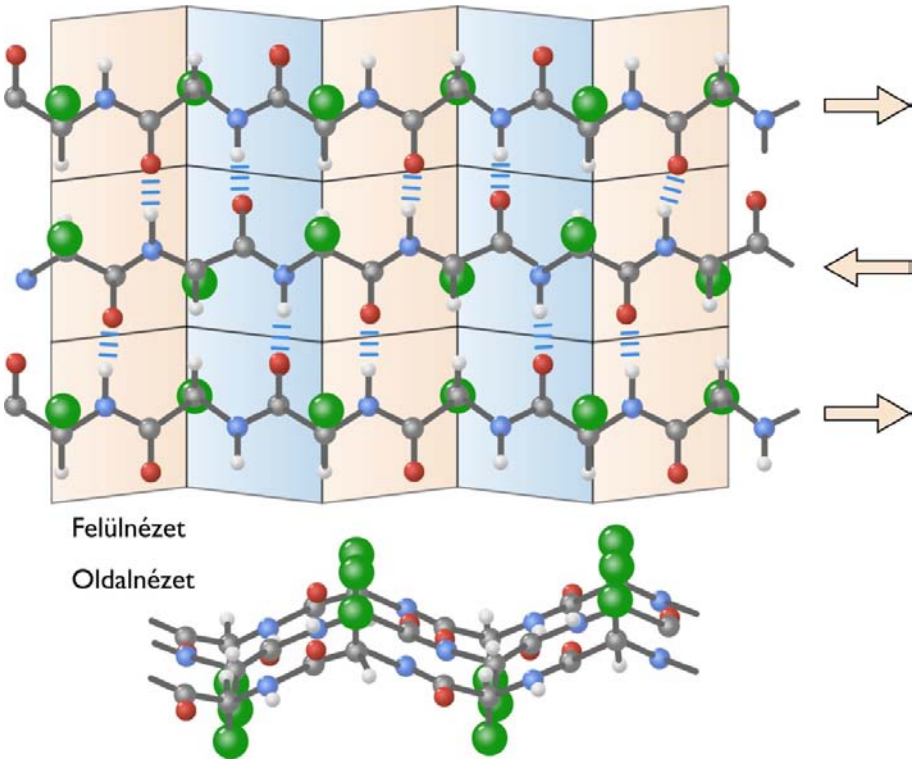
4.31. ábra: A β-lemezben az egymás melletti láncok lehetnek parallel és antiparallel lefutásúak

Ahogyan azt a **4.32. ábra** és **4.33. ábra** mutatják, a **β-lemezek síkja**, legyen szó akár parallel, akár antiparallel (vagy vegyes) lemezről, paravánszerűen **hajtogatott** (redőzött). Az egymás mellé rendeződő szálakban az egymás mellé kerülő aminosav egységek oldalláncai azonos irányba mutatnak, és így a síknak mindig azonos oldalára kerülnek. A szekvenciában egymást követő oldalláncok, a szekvenciában haladva rendre hol a sík egyik oldalán, hol a sík másik oldalán helyezkednek el.



4.32. ábra: A parallel a β-lemezek térszerkezete

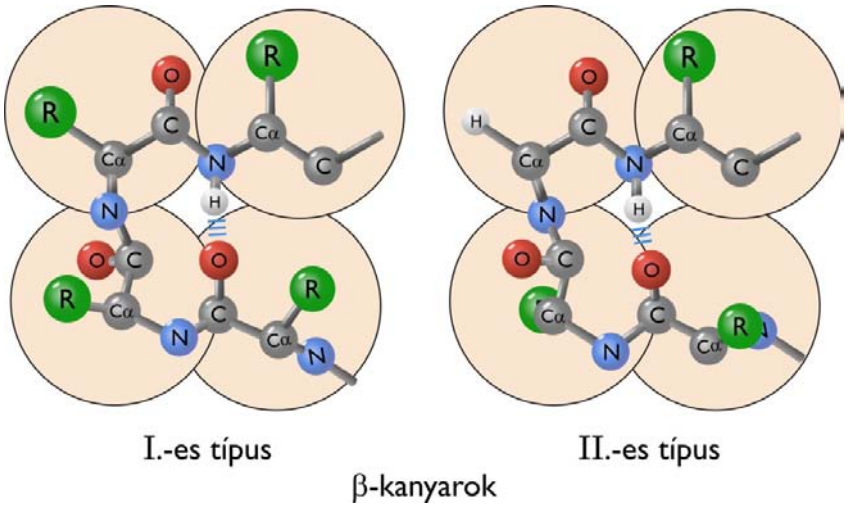
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.33. ábra: Az antiparallel a β-lemezek térszerkezete

4.4.4. β-kanyarok

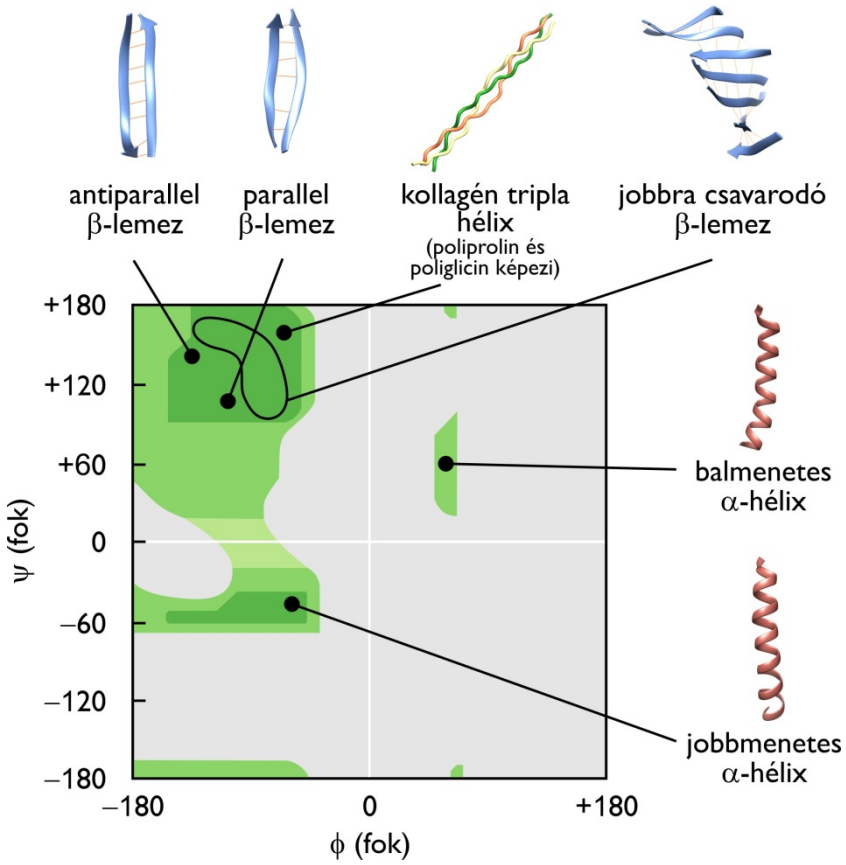
A hélixek és β-láncok egyirányba haladó szerkezetek. A globuláris fehérjékben ezekből a szerkezetekből vissza kell kanyarodni ahhoz, hogy egy gömbszerű háromdimenziós szerkezet jöjjön létre. A visszakanyarodás történhet nagyon rövid szakasz igénybevételével, hajtűszerűen. Ennek a megoldásnak a szabályos szerkezeti elemei a **β-kanyarok**, amelyekre a **4.34. ábrán** látunk két példát. Az ábrán az egyes aminosav csoportokat gömbök jelölik. A **II.** β-kanyar **típus harmadik aminosav-csoport**ja mindig **glicin**.



4.34. ábra: Két gyakori β-kanyar felépítése

A **4.35. ábra** összefoglalóan illusztrálja, hogy a másodlagos szerkezeti elemek jellemző torziós szögpárjaik miatt hol helyezkednek el a Ramachandran diagramon.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.35. ábra: Az egyes gyakori másodlagos szerkezeti elemek pozíciója a Ramachandran diagramon

Az ábrán szerepel néhány olyan változat vagy típus, amelyek még nem kerültek megemlítésre. A β-lemezekkel kapcsolatban eddig azt az esetet tárgyaltuk, amikor a lemez egy síkban van. A globuláris fehérjékben lévő β-lemezek azonban tipikusan nem sík, hanem hajlított, tekeredő lapot képeznek. A **4.35. ábra** illusztrálja a **jobbra csavarodó β-lemez** szerkezetet, és jelzi azt a diagram területet is, ami az ehhez a szerkezethez tartozó torziós szögpároknak felel meg.

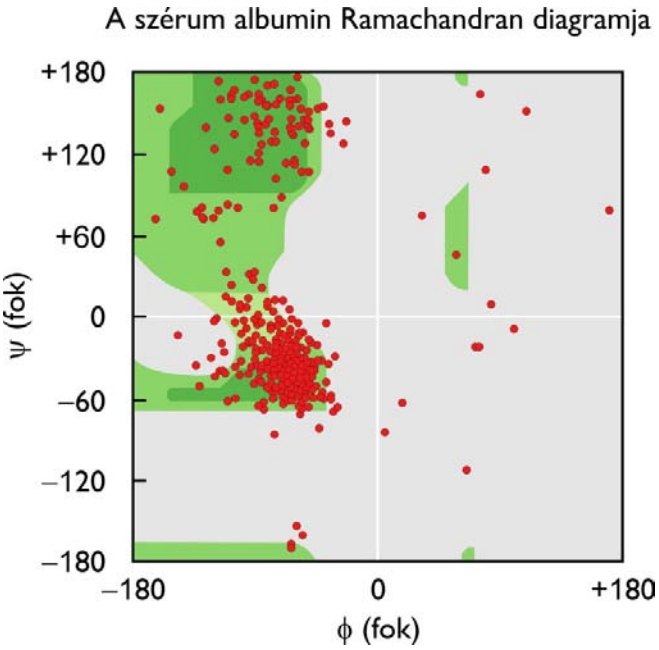
Eddig csak jobbmenetes α-hélixekről ejtettünk szót. A főlánc azonban ellenkező irányban is tekeredhet úgy, hogy a peptidgerinc csoportok szabályos hidrogénhíd kötéseket hoznak létre. Ez egy **balmenetes α-hélix**et eredményezne. A balmenetes α-hélixben az oldalláncok részlegesen ütköznének a főlánc más csoportjaival, ezért a fehérjékben nem igazán jönnek létre ilyen hélixek. A Ramachandran ábrázolás mégis jelöli ezt a típust. Ennek az oka az, hogy bár kiterjedt balmenetes hélixek nem jöhetnek létre, egy-egy néhány aminosav csoportot tartalmazó rövid szakasz mégis felvehet balmenetes hélix szerkezetet.

A **4.35. ábra** jelez egy **kollagén tripla-hélix** szerkezetet is, amellyel a fibrilláris fehérjékkel foglalkozó fejezetben találkozunk (lásd **4.5.3**)

Nézzük meg egy globuláris fehérje, a szérumalbumin **Ramachandran diagram**ját (lásd **4.36. ábra**).

Az ábra a polipeptidgerinc összes torziós szögeit megjeleníti egyetlen Ramachandran diagramon. Ami elsőre szembeötlő, hogy az aminosav-csoportok elsöprő többségének konformációs állapota a diagram zölddel jelzett, tehát az alaninokra vonatkozó elméleti számítások alapján funkciós csoport ütközésekkel nem járó, „**megengedett" területé**re esik. Az is látszik, hogy a csoportok legnagyobb hányada α-hélix konformációban van, míg maradék zöme β-lemezeket alkot. Csak elvétve találunk olyan csoportot, amely konformációja tiltott zónára esik. Az ilyen csoportok létezésére két fő magyarázat van. Az egyik, hogy ezek **glicin**ek, amelyek számára **nagyobb** megengedett **konformációs felület** áll rendelkezésre a Ramachandran diagramon, mint alanin részére. Ezért az adott konformáció nem jár szerkezeti feszültséggel.

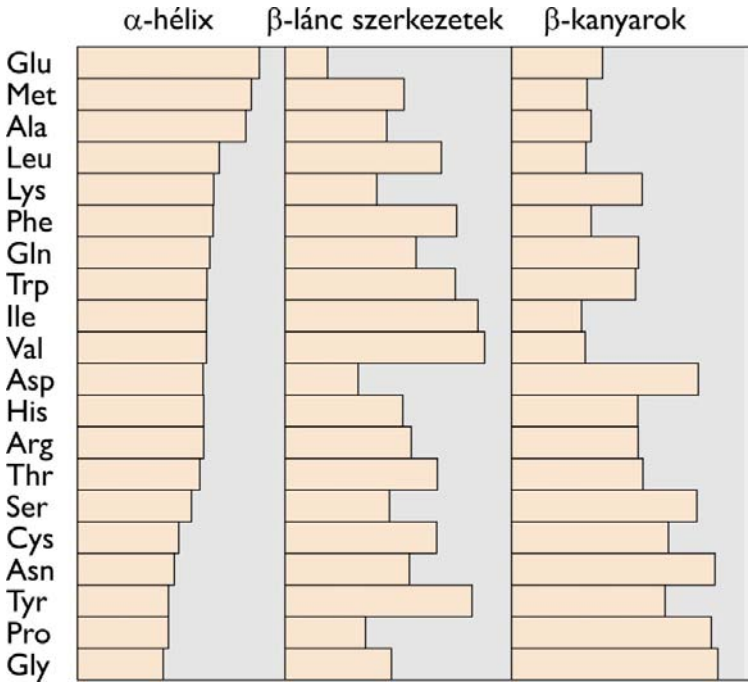
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.36. ábra: A szérumalbuminban szereplő aminosav-csoportok Φ / Ψ szögpárjai a Ramachandran diagramon

A másik lehetőség, hogy az adott csoport nem glicin, a lokális konformáció szerkezeti feszültséggel jár, de mégis létrejöhet, mert azt egyéb, közeli kölcsönhatások kompenzálják, stabilizálva a szerkezetet.

A másodlagos szerkezetek létrejöttében az oldalláncoknak alárendelt szerep jut, hiszen ezeket a szerkezeteket főlánc csoportok közötti hidrogénhidak stabilizálják. Ennek ellenére az ismert fehérjeszerkezetekből származó statisztikák alapján világos, hogy az egyes aminosav csoportok eltérő gyakorisággal fordulnak elő a három fő másodlagos szerkezeti formában. Ezt illusztrálja a **4.37. ábra.**



4.37. ábra: Az egyes aminosavak eltérő arányban szerepelnek különböző másodlagos szerkezeti elemekben

Az **4.37. ábra** a 20 fehérjealkotó aminosavat az alapján csoportosítja, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő α-hélix szerkezetben. Az aminosavak felülről lefelé csökkenő gyakoriság szerint kerültek felsorolásra. α-hélix szerkezetben leginkább azok az aminosavak fordulnak elő, amelyek oldallánca elég nagyméretű ahhoz, hogy védje

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

a hélixben lévő hidrogénhidakat a víz támadása ellen. Emellett az is fontos, hogy az oldallánc ne legyen képes hidrogénhíd partnerként versengeni a gerinc csoportokkal. A hélixben a következő okok miatt lehet alacsony az aminosav gyakorisága: hidrogénhidat kínál a főlánc csoportok számára (pl. Ser, Thr, Asn, Tyr); túl kicsi az oldallánca ahhoz, hogy védje a hidrogénhidakat (Gly) nincs főlánc N-H csoportja, amin keresztül a hélix stabilizáló főlánc hidrogénhíd kialakul (Pro).

A β-lemezekre az jellemző, hogy ezeknél maximális hely nyílik az oldallánc elhelyezésére. Ezért a legnagyobb térkitöltésű oldalláncok gyakran szerepelnek β-lemezek szerkezetben. A rövid oldalláncú, hidrogénhidat képző aminosavak (Asp, Ser, Asn), valamint a prolin és a glicin itt is alulreprezentáltak.

A β-kanyarokban felülreprezentált a glicin és a prolin, valamint egyéb, a már említett szerkezetek számára „szerkezettörő” tulajdonságú Asp, Ser és Asn.

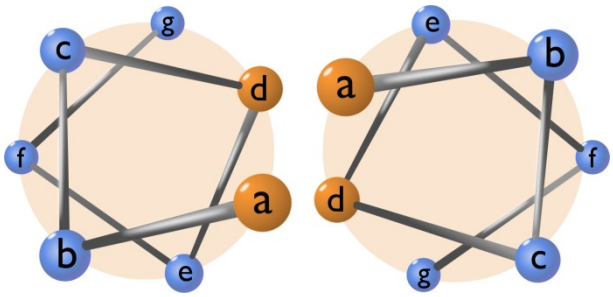
4.5. A fibrilláris fehérjék térszerkezete

A másodlagos fehérjeszerkezeti szint ismertetése után rátérhetünk a fibrilláris fehérjék témakörére. A fibrilláris fehérjék térszerkezetét egy-egy másodlagos szerkezeti típus dominálja, ezért érdemes velük ezen a ponton megismerkedni. A **fibrilláris fehérjék szerkezeti funkció**val rendelkeznek, és mindig több-alegységesek, tehát **negyedleges szerkezet**tel bírnak. A globuláris fehérjékkel ellentétben ezért a fibrilláris fehérjék esetében nem külön el világosan egy harmadlagos szerkezeti szint. Három jellegzetes példával ismerkedünk meg, ezek az **α-keratin**, a selyem **fibroin**, és a **kollagén**. Ezeknél a fehérjéknél látványosan tetten érhető, hogyan határozza meg a fehérje aminosavsorrendje a fehérje térszerkezetét, illetve a térszerkezet a fehérje egyéb tulajdonságait, és ezen keresztül a funkciót.

4.5.1. A keratin

A **keratin** nagy tömegben van jelen a bőr elszarusodó felhámjában, és annak képződményeiben (haj, szőr, szaru). Korábban α-keratinnak nevezték, mivel az α-hélix dominál benne. A keratin két jobbmenetes α-hélix **balmenetes szuperhélix**e. A szuperhélix (angolul ***coiled-coil***, azaz „csavart csavarodás”) egy körbefordulás során 5,1 Å-öt emelkedik.

A keratin lánc aminoterminális és karboxiterminális vége egy-egy kisméretű globuláris „fejet” képez. Ezeket leszámítva a fehérje aminosavsorrendjére az jellemző, hogy a következő mintázat ismétlődik benne nagyon nagy számban: $(abcdefg)_n$, ahol az a és d aminosavak hidrofób természetűek. Ez a **heptád ismétlődés** α-hélix képződését segíti elő, de ezen felül egy másik fontos tulajdonságot is diktál. A szekvenciában egymást szabályos mintázat szerint követő hidrofób oldalláncok az α-hélix oldalán szabályos rendben jelennek meg (lásd **4.38. ábra**).



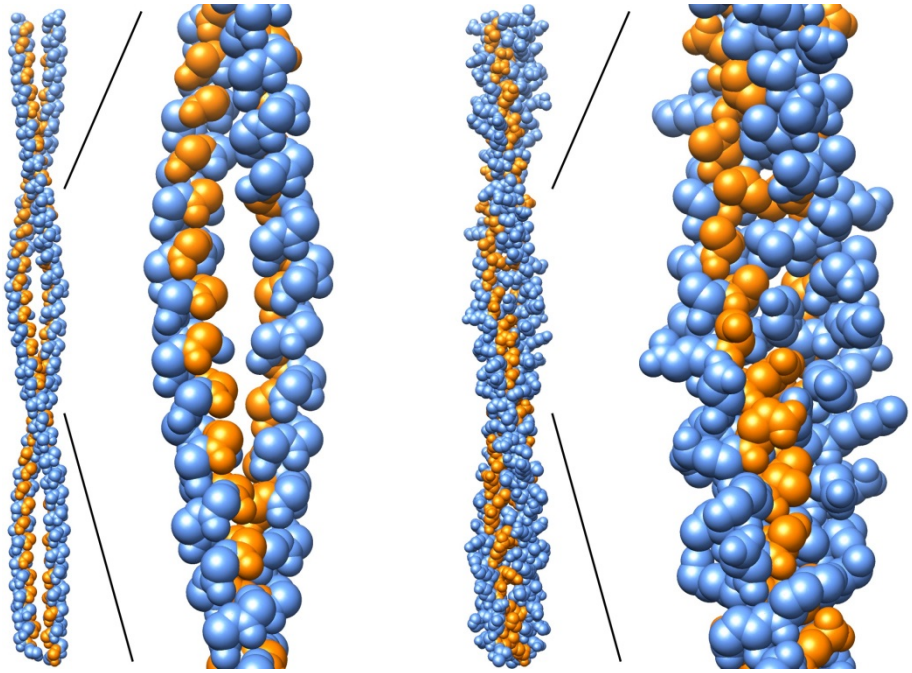
4.38. ábra: A keratint alkotó két α-hélix közötti térrészbe apoláros aminosavak helyezkednek el

A **4.38. ábra** felülnézetben mutat két α-hélix-et. Mindkét hélixben egy oldalra kerülnek a hidrofób oldalláncok. Ezek a hélixek a hidrofób oldalukkal egymás felé fordulva a hidrofób effektusnak köszönhetően összetapadnak.

Térben ábrázolva még jobban látszik a szerkezet kialakulásának módja (lásd **4.39. ábra**). Az α-hélixben egymást periodikus rendben követő apoláros aminosavak egyfajta hidrofób hullámvonalat képeznek. A keratin szerkezetben két jobbmenetes α-hélix tekeredik egymás köré balmenetes szuperhélixet alkotva úgy, hogy hidrofób hullámvonalaik fedésbe kerülnek, és így egyetlen közös **hidrofób „varrat”** alakul ki a két lánc között. Felmerülhet a kérdés, hogy miért hetes periodicitás figyelhető meg a *coiled-coil* szerkezetben? A válasz abból adódik, hogy az α-hélix egy

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

menetmagasságára 3,6 aminosav jut, a szuperhélixben viszont az elemi hélixeknek a kettős láncra vonatkoztatott menetemelkedése, a csavarodás miatt 3,5-re csökken, azaz két fordulat után pontosan átfednek a **4.38. ábra** látható *a* és *d* pozíciók.



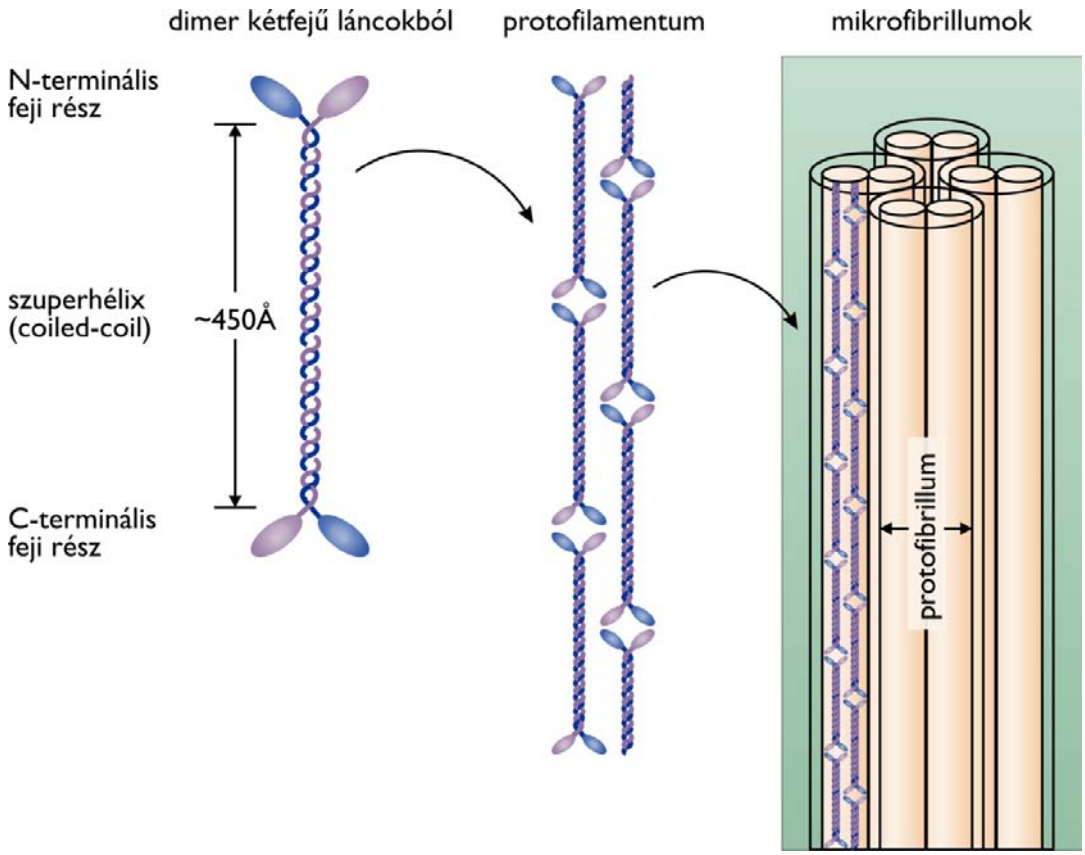
4.39. ábra: A keratin szuperhélix (*coiled-coil*) térszerkezete a hidrofób varrattal. A baloldali ábrán csak a főlánc szerepel, a jobboldali ábrán az oldalláncok is. Így látható, hogy melyik az a térrész, amelyben a hidrofób oldalláncok egymással kölcsönhatást létesítenek.

A kétláncú **keratin** molekulák a **4.40. ábrán** illusztrált módon **protofilamentumok**ba rendeződnek. A keratin szekvenciájában nagy számban fordul elő cisztein. Az egymás mellé rendeződő dimerek között **diszulfidhidak** alakulnak ki. A lágy keratinban, mint ami például a felhámban lévő sejtekben található, kisebb arányban van cisztein, mint a kemény keratinban, amely pl. a hajban, vagy a körömben fordul elő.

Két protofilamentum egymás mellé rendeződve protofibrillumot alkot, míg négy protofibrillum együttese **mikrofibrillum**ot hoz létre.

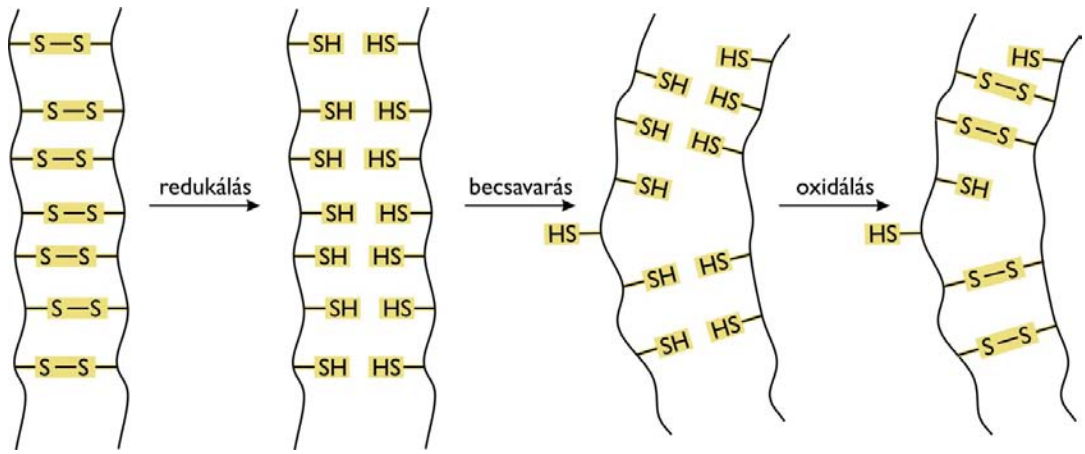
Vizsgáljuk meg, milyen jellegzetes tulajdonságai vannak a keratinnak, és hogyan következnek ezek a szekvenciájából, illetve szerkezetéből. Alighanem a keratin a legellenállóbb fehérje. Vízben praktikusan nem oldható, ami jól magyarázható egyrészt a zömmel hidrofób összetételével, másrészt a diszulfidhidakkal stabilizált komplex szerkezetével.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.40. ábra: A keratin szerkezet egy többszörösen összetett struktúra, a mikrofibrillum alapeleme

A **keratin**tartalmú **struktúrák**, mint például a haj, kevéssé nyújtható. Ez is a diszulfidhidaknak tudható be. **Redukálószerek hatására** azonban a hajszál mintegy kétszeres hosszúságúra **nyújtható**. Ilyenkor a szuperhelikális illetve az α-hélix szerkezet megszűnik, és ideiglenesen β-lemezes szerkezet alakul ki. Ezt a hatást használják ki a dauerolás során (lásd **4.41. ábra**).



4.41. ábra: A keratin natív szerkezetére jellemző diszulfidhidak ideiglenesen átrendezhetők

A nedves hajba redukálószereket juttatva a diszulfidhidakat felbontják. A haj feltekeredésével az egyes keratin egységek egymás mellett elcsúsznak. Oxidálószer hatására a keratin egységek megváltozott helyzete rögzíthető. Az egyenes haj így göndörré tehető, illetve a göndör haj kiegyenesíthető. A fodrászok nagy szerencséjére a hatás ideiglenes. A megváltoztatott szerkezetben a keratin nem az aminosavsorrendje által diktált állapotban van. A szerkezeti feszültségek hatására a feszített diszulfidhidak idővel felbomlanak, a haj visszanyeri eredeti állapotát, a natív diszulfidhidak újra kialakulnak.

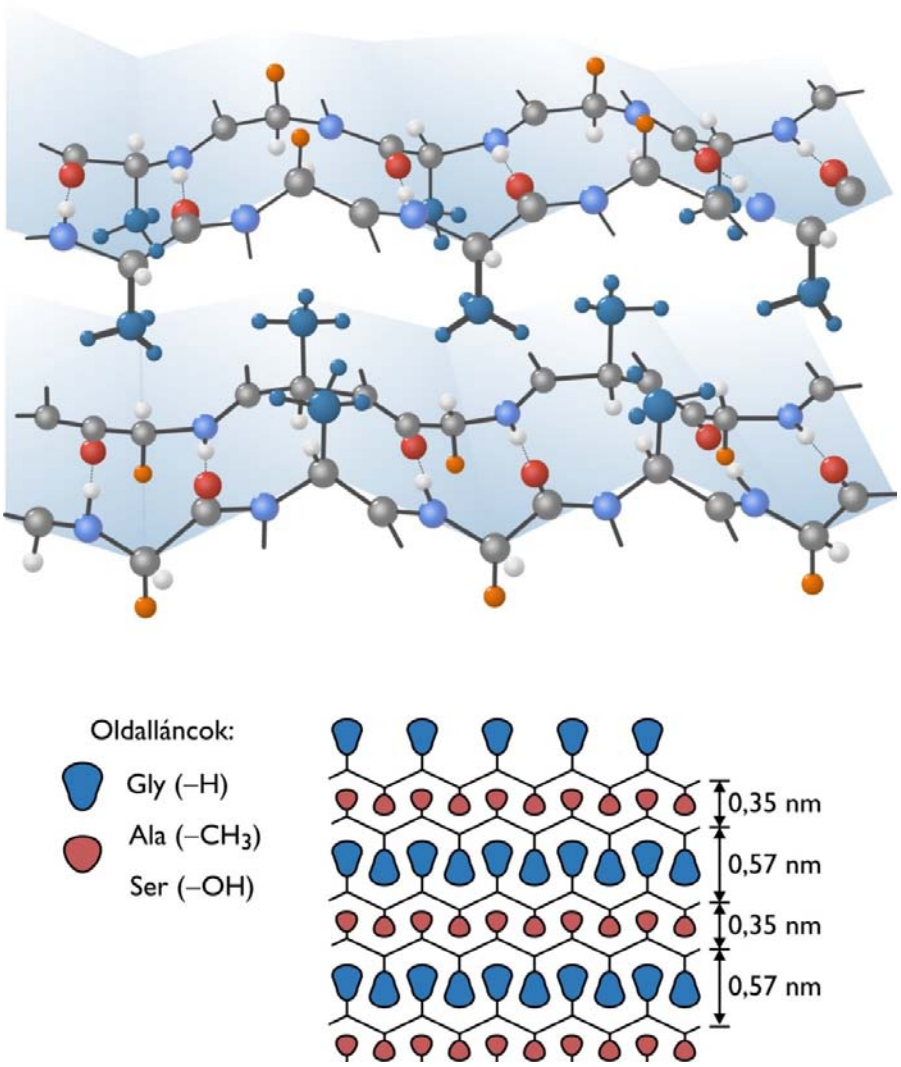
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Szintén főleg a diszulfidhidak nagy száma magyarázza azt a tényt, hogy a keratin a legtöbb élőlény számára emészthetetlen. A fehérjebontó enzimek hiába hasítják el a peptidkötéseket, a keletkezett peptideket így is diszulfidhidak tartják egyben. Ugyanakkor a ruhamolyok gond nélkül fogyasztják a főleg keratinból álló gyapjút, mivel az emésztőrendszerük merkaptánokat termel, amelyek redukálják a diszulfidhidakat.

4.5.2. A selyem fibroin

A selyem fő alkotóeleme a **fibroin** fehérje. A selyem fibroin fehérjében a következő szekvencia motívum ismétlődik: **(Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)$_n$**. A szekvenciára tehát az jellemző, hogy minden második pozícióban a legkisebb oldalláncú aminosav, a glicin szerepel. A glicinek közötti pozíciókban a méretsorrendben soron következő, szintén kisméretű alanin, vagy szerin lehet.

A fibroin fehérje teljesen nyújtott β-láncok formájában van jelen. A β-láncok a selyemszál irányában futnak, és **antiparallel β-lemezek**et alkotnak a láncok között kialakuló hidrogénhíd kötések révén (lásd **4.42. ábra**).



4.42. ábra: A selyem fibroin térszerkezeti modellje

A láncok azonos regiszterbe rendeződnek a lemezek létrehozásakor, tehát a glicinek mellett glicinek, a szerin/alanin csoportok mellett szerin/alanin csoportok helyezkednek el. Ennek eredményeképpen a lemezek egyik oldalán kizárólag glicin oldalláncok nyúlnak ki, a másik oldalán pedig kizárólag szerin vagy alanin oldalláncok nyúlnak ki.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ennek köszönhetően az egyes lemezek maximális térkitöltéssel lapolódhatnak egymásra. Az egyik lemez „glicines” oldala egy másik lemez szintén glicines oldala felé fordul. A szerin/alanin oldalláncokat hordozó oldalak szintén azonos összetételű oldalakkal képesek maximális térkitöltéssel „összetapadni”.

A szerkezetet a láncok irányában tehát kovalens kötések (peptidkötések), a láncokra merőlegesen a lemezeken belül hidrogénhíd kötések, míg a lemezek között gyenge másodlagos kötések tartják egyben.

Selymet egyes ízeltlábúak (pl. lepkék lárvái és pókok) termelnek. A fibroin szerkezeti fehérje mellett ezek az ízeltlábúak egy ragasztófehérjét is termelnek, ebbe ágyazódnak bele a fibroin szálak. A selyem a tömegéhez viszonyítva hatalmas **szakítószilárdság**gal bír, ráadásul úgy, hogy **hajlékony** is egyben. Ezek a tulajdonságok jól magyarázhatók a fibroin fehérje szerkezetével. Mivel a selyemszál irányába álló peptidláncok teljesen nyújtottak, ezért a selyemszál gyakorlatilag **nyújthatatlan**. A szál irányában kovalens kötések tartják össze a szerkezetet, míg arra merőlegesen gyenge kötőerők. Ezért a selyemszál erős, de nagyon hajlékony. A selyemből készült szövetek redukálószerek, illetve mosás hatására nem mennek át a gyapjúszövetekre jellemző változásokon, hiszen a selyemben nincsenek ciszteinek.

4.5.3. A kollagén térszerkezete

A **kollagén** jellegzetes extracelluláris **kötőszöveti fehérje**, az inak, porcok, bőr, érfal és a csontok fő alkotója. A kollagén emiatt a gerincesek legnagyobb tömegben jelenlévő fehérjéje is egyben.

A sejtekben keletkező teljes hosszúságú fehérje, a **prokollagén**, rendelkezik egy N-terminális és egy C-terminális doménnel. Az ezeken kívüli fehérjelánc jellegzetes **szekvencia mintázat**a a következő: **(Gly X Y)$_n$**, ahol az **X** és **Y** pozíciókban leggyakrabban **prolin** található. A prolinok egy része a fehérjeszintézist követően egy enzim hatására kovalensen módosul, **hidroxil-prolin**ná alakul. Ugyanezekben a pozíciókban lizin is lehet, amely egy másik enzim hatására szintén hidroxilcsoportra tesz szert. A (Gly-X-Y)$_n$ szekvenciájú prokollagén szakasz egy **balmenetes hélixet** hoz létre, ami azonban nem α-hélix. Míg az α-hélix esetében egy aminosav egységre 1,5 Å menetemelkedés jut, a kollagén-hélix esetében ez 2,9 Å, vagyis ebben a hélixben a polipeptidlánc sokkal nyújtottabb formában van. (Ehhez a nyújtott konformációhoz hasonlít egy itt nem tárgyalt másodlagos szerkezeti elem, a II-es típusú, szintén balmenetes poliprolin-hélix.)

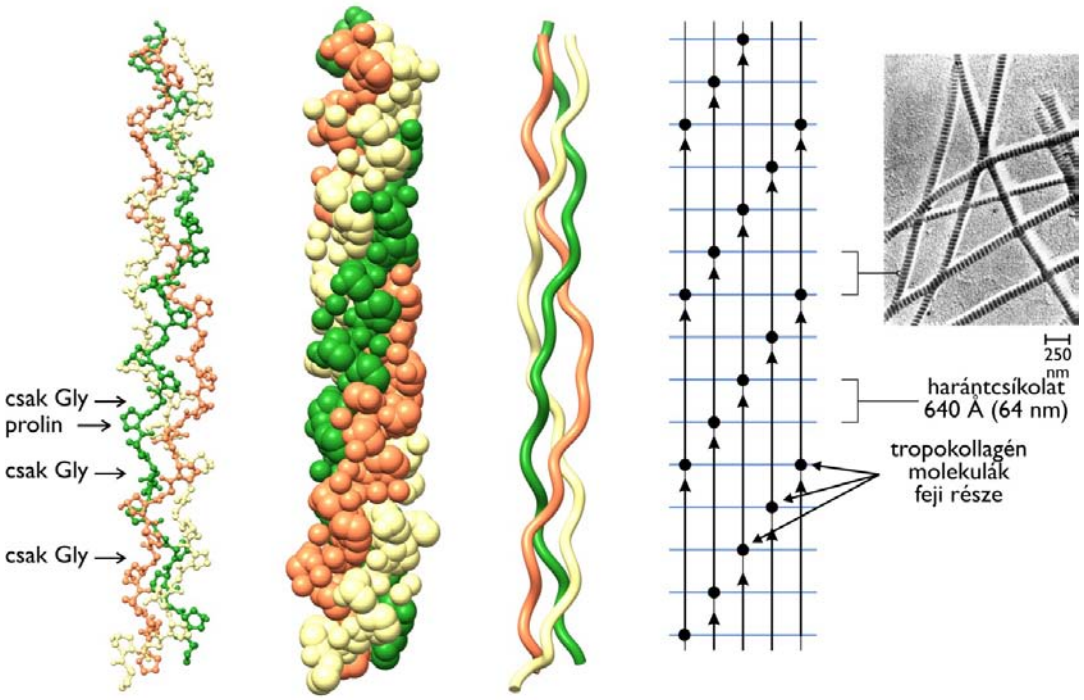
Ahogyan azt a **4.43. ábra** mutatja, három balmenetes kollagén hélix egyetlen **jobbmenetes tripla hélix**et alkot.

A **4.44. ábrán** szereplő keresztmetszeti ábrázolás jól illusztrálja, hogy a szekvencia miként szabja meg az alapszerkezetet.

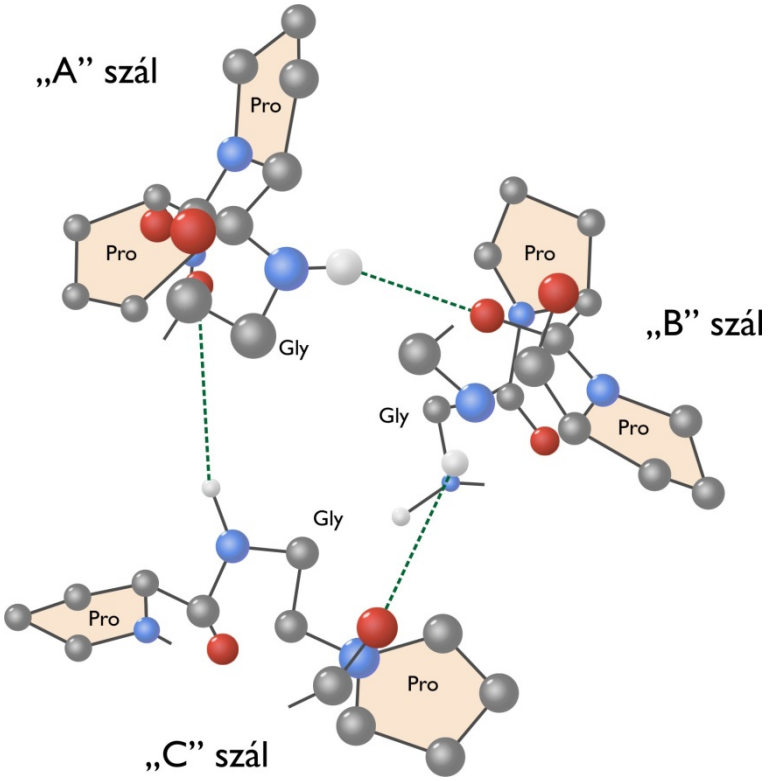
A szerkezetben minden harmadik pozíció a tripla-hélix közepe felé fordul. A három lánc között itt rendkívül kicsi a távolság, a láncok között kizárólag a glicin oldallánc (H-atom) számára van hely. A másik két pozíció aminosav csoportjai (legnagyobb arányban prolinok) a tripla hélix külsején helyezkednek el.

Minden glicin egység peptidil NH csoportja donorként vesz részt egy láncok közötti hidrogénhíd kialakításában egy peptidil C=O csoporttal. A prolinok és lizinek utólagos hidroxilálása azért fontos, mert az így bekerülő hidroxilcsoportokon keresztül további, a szerkezetet stabilizáló hidrogénhidak jönnek létre. Ezek nélkül a tripla-hélix szerkezet nem stabil. A kollagénben lévő aminosavak egy része glikozilálódik is, tehát szénhidrát csoportok kerülnek rájuk.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



4.43. ábra: A kollagén térszerkezeti modellje, és a tropokollagén egységek összeszerveződése



4.44. ábra: A kollagén szuperhélix keresztmetszeti képe a glicin egységenként kialakuló hidrogénhidakkal

A **hidroxilcsoportokat kialakító enzimek koenzimként aszkorbinsav**at használnak. Aszkorbinsav tartós hiányában emberben egy súlyos betegség, skorbut alakul ki, amelyet a kötőszövet szerkezetének gyengülése okoz. Ez a már említett módon azért alakul ki, mert a kollagén molekulák szerkezete az utólagosan kialakítandó hidroxilcsoportok hiányában nem stabil.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A globuláris feji domének miatt vízoldható **prokollagén**t a sejtek az extracelluláris térbe juttatják. Ennek során a feji domének specifikus proteázok által lehasítódnak. A kijutó, immár **tropokollagén**nek nevezett háromláncú forma vízben nem oldódik. A tropokollagén egységek szabályos, lépcsőzetes eltolással összetettebb szerkezetű **rostok**at hoznak létre. A lépcsőzetes eltolás matt a kollagén rostok keresztmetszetében a pozíció függvényében periodikusan hol több, hol kevesebb tropokollagén egység szerepel, ami harántcsíkolt mintázatot kölcsönöz a rostnak.

A tropokollagén egységek között főleg a **lizinek**en és **hidroxil-lizinek**en keresztül enzimatikus folyamatban **kovalens kötések** alakulnak ki. Az aminosavsorrend és az abból következő szerkezet a kollagén esetében is szépen magyarázza a molekula tulajdonságait. A **tropokollagé**n szerkezete a sok prolin miatt viszonylag **merev**. A nyújtott szerkezetű tropokollagén és a tripla-hélixek közötti keresztkötések miatt a kollagén rostok szinte **nem nyújtható**k, és nagy szakítószilárdságúak. A lizineken keresztül kialakuló kötések száma az életkor előrehaladtával nő, ami csökkenti a kollagén rostok hajlékonyságát.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

5. fejezet - A fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezete

(szerző: Pál Gábor)

A fehérjék túlnyomó többsége globuláris, azaz nagyjából gömbszerű alakkal rendelkezik. Az evolúció során ez a szerkezeti forma rendkívül sokféle funkció számára bizonyult megfelelőnek. Az összes enzimfehérje, a vér szállítófehérjéi, a receptorok, az ellenanyagok, a membránokban lévő csatornák stb. mind-mind globuláris szerkezetűek. Mielőtt megismerkednénk a globuláris fehérjék szerkezetének tulajdonságaival, röviden tekintsük át a szerkezetek vizuálisan befogadható jellemzésének jelentőségét, és ezt követően a térszerkezet-felderítés két legjelentősebb technikáját, a röntgendiffrakciónak és a mágneses magrezonanciának (NMR) az elvi alapjait.

5.1. A fehérjék térszerkezet-vizsgálata

5.1.1. A biológiai objektumok vizualizálásának jelentősége

Amikor a körülöttünk lévő világ megismeréséhez információkat gyűjtünk, számos érzékszervünkre támaszkodunk. A legtöbb ismeretet kétségtelenül mégis a látásunk biztosítja. A vizuális információ rendkívül sok, az emberi elme számára könnyen feldolgozható adatot hordoz. Számos ismert mondás, mint pl. hogy „hiszem, ha látom”, vagy „egyetlen kép többet ér ezer szónál” is erre utal.

Amikor egy összetett objektumot meglátunk, a vizuális információ segítségével azonnal adatokat kapunk arról, hogy az objektum egyes egységei miként kapcsolódnak egymáshoz, az adott objektum hogyan „viselkedhet”, hogyan működhet. Amikor egy objektumot szemlélünk, akkor - anélkül, hogy ezt tudnánk - pontokra bontva képezzük le azt, feldolgozva az egyes részek térbeli viszonyát, egymáshoz kapcsolódásuk miként jét. Mindez azért lehetséges, mert a fény az objektum pontjain szóródik, és az egy pontból szétszóródó fénysugarakat a szemünk optikai rendszere újra egy pontba gyűjti össze. Ennek a leképezésnek a felbontási képessége azzal az adattal jellemezhető, amely megmutatja, hogy legfeljebb milyen közel lehet egymáshoz két tárgypont ahhoz, hogy valóban két külön pontként tudjuk leképezni. A maximálisan elérhető **felbontás** nagyjából egyenlő a szórt, és újra összegyűjtött **fény hullámhosszának a felé**vel. Az emberi szem fényérzékelő molekulái a 400-800 nanométeres (egy nanométer a méter egy milliárdod része; 1 nm = 10^{-9} m) hullámhossztartományba eső fénysugarakat képesek érzékelni. Ezért a látható fényen alapuló felbontás – hiába nagyítjuk a képet különböző mikroszkópokkal –, nem haladja meg a 200-400 nanométert, vagyis a néhány tized mikrométert.

Fénymikroszkóppal tehát már láthatók a mikrométeres mérettartományba eső baktériumok, vagy az eukarióta sejtek sejtmagja és bizonyos körülmények között a sejtmagban lévő kromoszómák is, de a sejtek ennél részletesebb belső felépítése már nem észlelhető. Azt az elektromágneses sugárzást, amelynek hullámhossza az atomok és a kémiai kötések mérettartományába esik Wilhelm Conrad Röntgen fedezte fel 1895-ben, amiért 1901-ben megkapta az első fizikai Nobel-díjat. Felfedezése nyomán igen hamar elindultak a röntgensugáron alapuló szerkezetvizsgálatok.

5.1.2. Szerkezet-meghatározás röntgendiffrakcióval

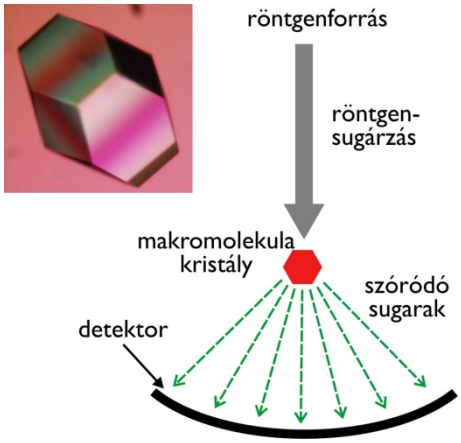
A néhány Angström hullámhosszúságú, tehát az atomok és kémiai kötések mérettartományába eső **röntgensugárzás** intenzíven elhajlik és szóródik az atomok elektronfelhőjén. Ezeket a nagyenergiájú szóródó sugarakat nem lehet optikai eszközökkel újra egy pontba fókuszálni. Az **elhajlási (diffrakciós) mintázat** ugyan tartalmazza a szóródást kiváltó objektumra vonatkozó leképezendő információt, de az a klasszikus, gyűjtőlencséken alapuló képalkotói eljárásokkal nem rekonstruálható.

Kezdetben röntgensugár forrásként vákuumcsöveket használtak, amelyekben nagyfeszültség segítségével egy katódból az anódba „csapódó” elektronok energiájának egy része az elektronsugárra merőleges irányú röntgensugarat eredményez. Ma is ilyen elven működnek a kisebb kutatóintézetek „házi” röntgenforrásai. A röntgendiffrakciós

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szerkezetkutatásokat ugyanakkor az utóbbi évtizedekben nagyban fellendítette a részecskegyorsítók elterjedése, amelyek kiváló röntgensugárforrások (szinkrotron sugárzás).

Ha az atomok, illetve az atomokból álló molekulák szabályos rendben egymáshoz rendeződve kristályt alkotnak, az egymástól periódusosan, szabályos távolságokra lévő pontokról szóródó sugarak a tér meghatározott pontjain egymást erősítve interferálnak. Az interferencia-mintázat röntgenfilmen, vagy egyéb megfelelő detektoron észlelhető (lásd **5.1. ábra**).



5.1. ábra: A röntgenkrisztallográfiás eljárásokban a kristályba rendeződött molekulák elektronjain szóródó röntgensugarak diffrakciós mintázata alapján fejtik meg a molekula térszerkezetét

Ezt a jelenséget elsőként Max von Laue fedezte fel, és elsőként ő dolgozta ki, hogy a diffrakciós kép miként függ össze a kristály geometriai adataival. Eredményeiért 1914-ben Nobel díjat kapott. Vele nagyjából egy időben William Lawrence Bragg is kristályos anyagok és röntgensugárázás kölcsönhatását kezdte vizsgálni. Az ehhez szükséges kísérleti berendezést édesapja, William Henry Bragg építette meg. A szerkezetvizsgálatban elért eredményeikért 1915-ben megosztott fizikai Nobel-díjat kaptak. A röntgensugarakat tehát már igen korán elkezdték kristályos anyagok belső szerkezetének feltárására használni.

Ahogyan az előző fejezetben láttuk, a fehérjék vonatkozásában az első használható adatokat mégsem kristályos, hanem rostokba szerveződő kvázi-kristályos anyagokról készítették. James Watson és Francis Crick 1953-ban az angliai Cambridge-ben dolgozta ki a DNS-szerkezet kettős spirál modelljét. Munkájuk során nagyban támaszkodtak azokra a röntgendiffrakciós eredményekre, amelyeket a londoni King's College-ben dolgozó Maurice Wilkins és Rosalind Franklin értek el DNS-rostok vizsgálatával. Az eredményekért Watson, Crick és Wilkins 1962-ben orvosi Nobel-díjat kaptak.

Ugyanebben az évben kapott kémiai Nobel-díjat a szintén Cambridge-ben tevékenykedő John Kendrew és Max Perutz, akik az ötvenes évek végén **röntgenkrisztallográfia**i vizsgálatokkal megfejtették az oxigént tároló mioglobin, illetve az oxigént szállító hemoglobin térszerkezetét (a mioglobin kristály röntgendiffrakciós képét az **5.2. ábra** mutatja). Ezekben a vizsgálatokban nem rostokat, hanem valódi fehérjekristályokat használtak.



5.2. ábra: A mioglobin fehérje kristályának röntgendiffrakciós képe

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A röntgenkrisztallográfia a mai napig a leghatékonyabb fehérjeszerkezet meghatározó módszer. A makromolekuláris térszerkezetek adattárában (PDB: *Protein Data Bank*) a könyv írásának idején több mint 76000 olyan fehérjeszerkezet található, amelyet röntgendiffrakcióval határoztak meg. A módszer nagy előnye, hogy szinte méretkorlát nélkül képes akármekkora fehérje, vagy egyéb makromolekuláris komplexek térszerkezetét feltárni. Jó példa erre a riboszóma, mint szupramolekuláris komplex atomi felbontású térszerkezetének meghatározása, ami 2009-ben kémiai Nobel-díjat eredményezett Venkatraman Ramakrishnan, Thomas Steitz és Ada Yonath számára.

Ugyanakkor, ahogy minden technikának, a röntgenkrisztallográfiának is vannak korlátai. Az egyik probléma az, hogy a makromolekulát kristályosítani kell, ami az esetek nagy részében nem egyszerű feladat. A másik felmerülő probléma, hogy vajon a kristályban tapasztalt szerkezet mennyiben felel meg az oldatban lévő, natív molekula szerkezetének.

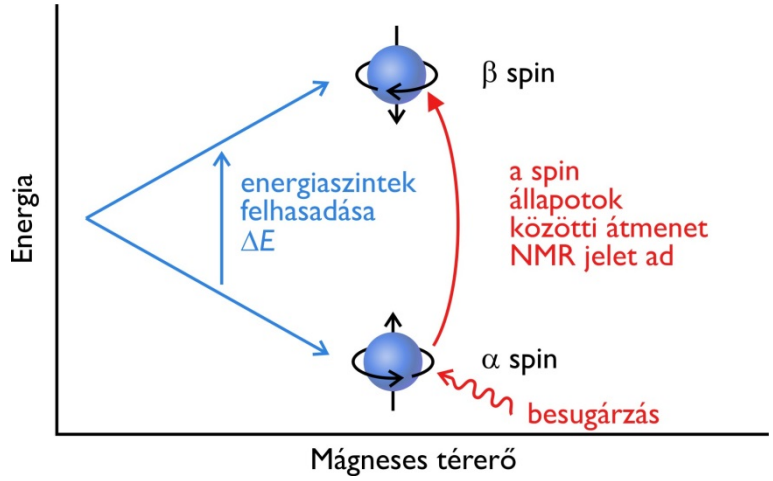
A **makromolekuláris kristályok** nagy (~40-60%) százalékban tartalmaznak vizet, ami amellett szól, hogy az oldatszerkezet és a kristályszerkezet megegyezhet. Ugyanakkor a kristály úgy jön létre, hogy a rácspontokon lévő molekulák között másodlagos kölcsönhatások alakulnak ki. Ezek a kölcsönhatások módosíthatják a molekulák konformációját. Ha egy nem tökéletesen natív konformáció kedvez a kristály létrejöttének, akkor ez a konformáció jelenik meg a kristályban.

Bár a röntgenkrisztallográfia egy rendkívül megbízható, és nagyon sikeres vizsgálati mód, nagyon hasznos, hogy létezik egy attól teljesen független fizikai elveken alapuló, oldatszerkezetek meghatározására alkalmas eljárás, a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia.

5.1.3. Szerkezetmeghatározás mágnesen magrezonanciával

A térszerkezet meghatározás során kiderítjük, hogy egy molekulában az atomok egymáshoz képest hogyan rendeződnek el a térben. Ezt az információt úgy is meg lehetne fejteni, ha nem az atomok egy adott koordinátarendszerben vett pozícióját határoznánk meg, hanem az egyes atomok egymástól való távolságát. A kiértékelés a térképészeti háromszögelési eljárás egyfajta háromdimenziós analógiája szerint történik. Annyi távolságadatot kell meghatározni, hogy csak egyetlen olyan modell létezzen, amely ellentmondásmentesen megfelel az összes meghatározott távolságnak.

A fenti eljáráshoz egy olyan fizikai jelenség szükséges, amellyel meg lehet határozni oldatban lévő makromolekulák egyes atomjainak egymástól való távolságát. Ez a fizikai jelenség a mágneses magrezonancia (NMR: *nuclear magnetic resonance*), az eljárás az **NMR spektroszkópia** (lásd **5.3. ábra**).



5.3. ábra: A mágneses magrezonancia (NMR) jelensége. Külső mágneses térbe helyezett, eredő spinnel rendelkező atommagok kétféle spin állapotának energiája eltérő. Az eltérés mértéke egyenesen arányos a mágneses térerővel. Az NMR spektroszkópiában alkalmazott mágneses térerők esetén a két állapothoz tartozó energiakülönbség mértéke az elektromágneses sugárzás rádióhullám-tartományába esik. Megfelelő frekvenciájú rádióhullámmal a spin a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

magasabb energiaszintű állapotra gerjeszthető. Adott mágneses térerő esetén a gerjesztéshez szükséges rádióhullám frekvenciája jellemző az adott atommagra, és annak kémiai környezetére.

A mágneses magrezonancia egy fizikai jelenség: külső mágneses térbe helyezett (megfelelő) atommagok képesek elektromágneses sugárzást elnyelni, majd újra kibocsájtani. Az elnyelt elektromágneses sugárzás frekvenciája függ a külső mágneses tér erősségétől, és az atommag mágneses tulajdonságától. Ez utóbbi attól függ, hogy az atommag mely elem mely izotópjához tartozik.

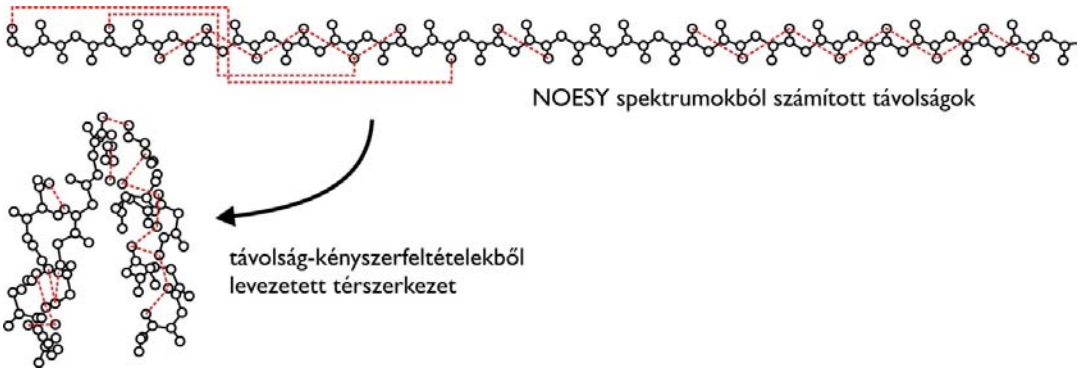
A neutronok és a protonok ½ értékű saját forgásmomentummal, más néven spinnel rendelkeznek. Azoknak az izotópoknak az atommagjai, amelyek páros számú protonból és páros számú neutronból állnak, a Pauli féle kizárási elv miatt nem rendelkeznek eredő spinnel, mert nem lehet egyetlen protonjuknak illetve neutronjuknak sem tökéletesen azonos a kvantumállapota. A páros számú protonok illetve a páros számú neutronok spinjei ezért páronként ellentétes értékűek, kioltják egymást. Ezzel szemben minden olyan izotóp **atommag**ja rendelkezik **nem nulla értékű spinnel**, és ezzel arányos mértékű saját mágneses momentummal, amelyben a protonok és / vagy a neutronok száma páratlan. Ilyen izotópok pl. a ^{1}**H,** ^{13}**C,** ^{15}**N,** ^{31}**P**.

A kétféle spin energiájának különbsége arányos a külső mágneses térerővel. Adott erősségű külső mágneses tér alkalmazása mellett megfelelő frekvenciájú (általában a rádióhullám frekvenciatartományába eső) elektromágneses sugárzás elnyelése útján a spin az alacsonyabb energiájúból a magasabb állapotba gerjeszthető. Az alapállapotba való visszatéréskor az elektromágneses sugárzás kibocsájtódik.

A spin energia-átmenetéhez szükséges rádióhullám frekvenciája függ az adott atommag kémiai környezetétől, az azt körülvevő elektronok árnyékoló hatása miatt. A modellvegyülethez képesti frekvenciaeltolódást, más néven **kémiai eltolódás**t a frekvencia milliomodrész mértékében (ppm: *parts per million*) fejezik ki. A kémiai eltolódás miatt egy összetettebb molekulában az egyes atommagok eltérő környezetük miatt egyedileg azonosíthatók.

Az egyik spin szelektív gerjesztése az úgynevezett **nukleáris Overhauser-effektus** (NOE) következtében megváltoztathatja a térben közel lévő más spinek gerjeszthetőségét. Ezen alapul a térbeni kapcsolatok feltérképezése.

Összefoglalva, az NMR mérésekkel egy bizonyos méret (40 kDa) alatti makromolekulák **oldatban mutatott térszerkezet**e meghatározható a makromolekulában lévő atommagok azonosítása és egymáshoz képesti távolságuk mérése révén (lásd **5.4. ábra**).



5.4. ábra: A fehérje térszerkezete megfelelő mennyiségű, atommagok közötti távolságadat, mint kényszerfeltétel-rendszer alapján NMR spektroszkópiai adatokból meghatározható.

Megfelelő NMR vizsgálatok a szerkezet meghatározáson felül a szerkezetre vonatkozó **dinamikai adatok**kal is szolgálhatnak. Megmutathatják, hogy a molekula egyes csoportjai milyen ütemben változtatják a pozíciójukat.

A PDB adatbankban jelenleg mintegy 8800 olyan fehérjeszerkezet van, amelyet NMR-rel oldottak meg. A jelenlegi statisztikák szerint tehát az ismert szerkezetek mintegy 90%-át röntgendiffrakcióval, 10 %-át NMR spektroszkópiával határozták meg. A két technika jól kiegészíti egymást. A röntgendiffrakciónál nincs méretkorlát, és általában kevés fehérje kell hozzá, de a kristályosítás nem minden fehérje esetén sikeres. A kristályosítás sikertelenségének egyik oka lehet az, hogy a fehérje túl kicsi (nem alakul ki elég kölcsönhatás a molekulák között), és/vagy túl mozgékony a szerkezete. Éppen az ilyen fehérjék ideálisak NMR vizsgálatokra, amelyekből kiderülhet a fehérje oldatban mutatott szerkezetén kívül a szerkezet dinamikai viselkedése is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ezek után rátérünk a globuláris fehérjék harmadlagos szerkezetének bemutatására.

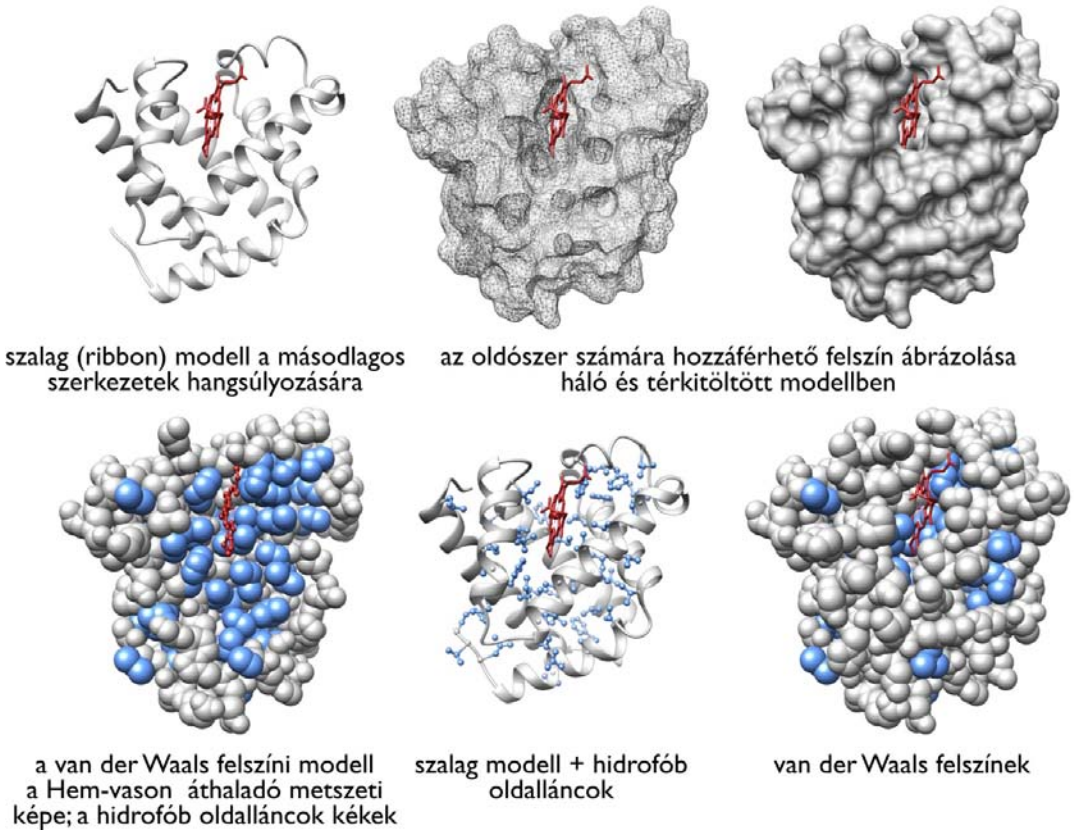
5.2. A fehérjék harmadlagos szerkezete

5.2.1. A globuláris fehérjék szerkezetének alapvető közös vonásai

Az **első háromdimenziós fehérjeszerkezet**et John Kendrew és csoportja röntgenkrisztallográfiával oldotta meg 1959 végére, mintegy tízévnyi megfeszített munka eredményeként. A fehérje a bálna **mioglobin**ja volt, melynek térszerkezetét molekuláris grafikai ábrázolásokkal az **5.5. ábra** mutatja be.

A vízi gerincesek vázizmában hatalmas koncentrációban van jelen ez az oxigéntároló fehérje, amit ezért viszonylag könnyű volt homogén formában előállítani. A homogén állapot nagyon fontos kritérium a kristályosítás során.

Az első megismert fehérjeszerkezet a következő tanulságokkal járt. Minden királis aminosav-csoportja L-konfigurációjúnak bizonyult. Ez volt az első olyan vizsgálat, amely közvetlenül bizonyította, hogy a fehérjékben ez a konfiguráció van jelen (**homokiralitás elve**). Az aminosavak csoportok mintegy **70%**-ára vonatkozóan a főláncot a Pauling által javasolt **α-hélix szerkezet**ben találták. A poláros oldalláncokat szinte kivétel nélkül a molekula felszínén találták. Az apoláros oldalláncok zömét, bár nem mindegyikét, a fehérje belsejében eltemetve találták (lásd **5.5. ábra)**.



5.5. ábra: A mioglobin térszerkezetének többféle molekuláris grafikai ábrázolása. Az eltérő vizualizációs módok a térszerkezet eltérő tulajdonságait emelik ki. (PDB:1MYO).

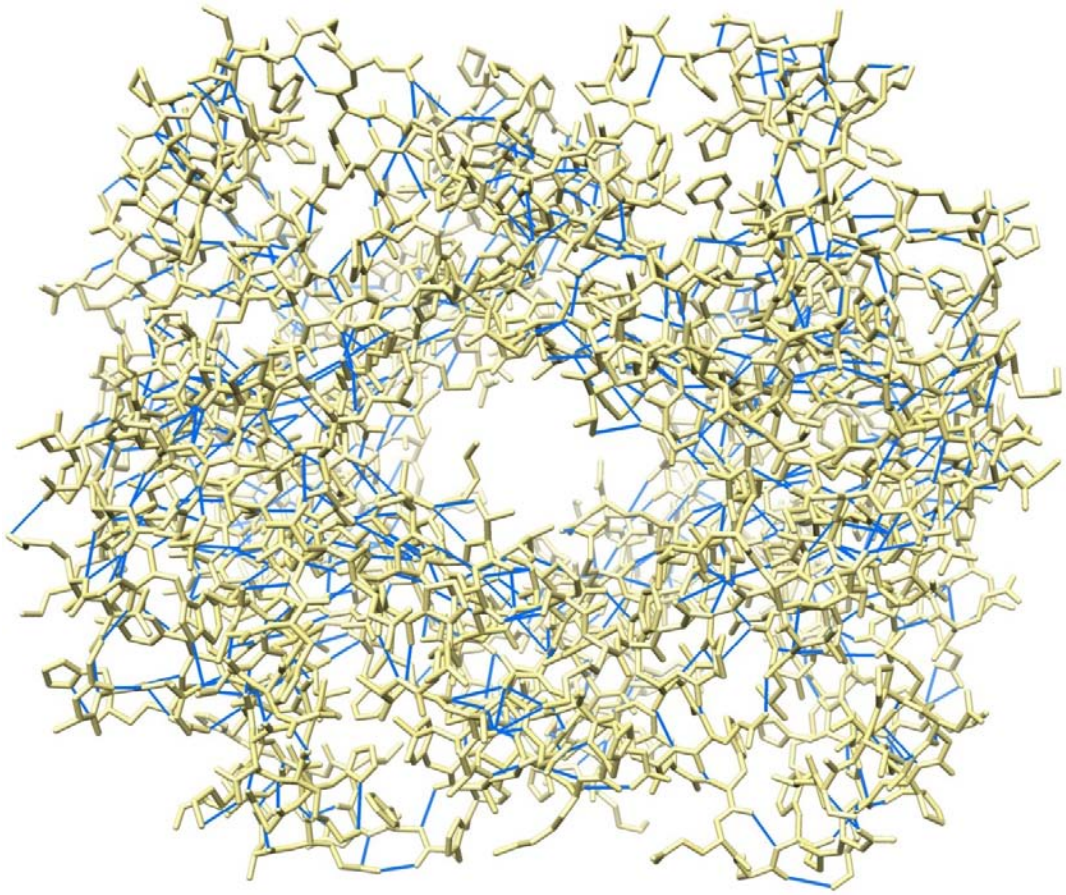
Kiderült, hogy a molekula belsejében nincsenek „üregek”, a nagyrészt apoláros belső részben gyakorlatilag tökéletes a térkitöltés (**térkitöltési kényszer**). Nem csak üregeket nem találtak, de a belső részben vízmolekulák sem voltak jelen.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Egy globuláris fehérje esetében magától értetődően lehetetlen, hogy a gömbszerű objektum belsejébe csak oldalláncok kerüljenek. A főláncnak is át kell haladnia a belső részen. Mivel a főlánc poláros, ezért elkerülhetetlen, hogy a szerkezet belsejének egy része poláros legyen.

A szerkezet vizsgálatakor kiderült, hogy az összes, az oldószer számára nem hozzáférhető, hidrogénhidas kölcsönhatásokra képes csoport ténylegesen H-hidakat képez. Más szóval a molekula belsejében a **H-hidak száma maximál**is. Ezt az **5.6. ábra** mutatja be a hemoglobin példáján keresztül.

Az első fehérjeszerkezet arra is felhívta a figyelmet, hogy a fehérjék térszerkezete sokkal komplexebb, mint bármely már, addig megismert molekuláé. A szerkezet **vizuális befogadás**a, „megértése” hosszú időt igényelt. Akkoriban még nem álltak rendelkezésre számítógépek, amelyek különböző számításokból eredő grafikai trükkökkel ki tudtak volna emelni bizonyos fontos szerkezeti aspektusokat. A térkoordináták alapján fizikailag a valóságban felépítettek egy golyó-pálcika modellt. Ma már számos ingyenesen elérhető számítógépes program áll rendelkezésre ahhoz, hogy a PDB adatbázisból szabadon elérhető atomi térkoordináták alapján a makromolekula szerkezetet megjelenítsük (**molekuláris grafika,** lásd **5.5. ábra**).



5.6. ábra: Hidrogénhidak a hemoglobin belsejében. A molekula belsejébe temetett, hidrogénhíd képzésre képes poláros csoportok mindegyike ténylegesen hidrogénhidas szerkezetben van (lásd kék vonalak), a hidrogénhidak száma tehát maximális (PDB:163N).

A vizualitáson keresztüli jobb megértés érdekében számos szerkezeti tulajdonságot ki lehet hangsúlyozni, be lehet mutatni. Kiszámítható, és megjeleníthető, hogy mely csoportok között alakulnak ki hidrogénhidak. Kirajzolhatók a másodlagos szerkezeti elemek, megmutatva a fehérjeszerkezet egyfajta belső szerveződését. Megjeleníthető a szerkezet térkitöltő modellel is, ami kihangsúlyozza az egyes molekuláris csoportok egymással való kölcsönhatását. Különböző számítások alapján kirajzolható a fehérje oldószer, vagy akár konkrétabban a vízmolekula számára hozzáférhető része, tehát egyfajta felszíne. Be lehet mutatni színkódolással a felszín töltésviszonyait, vagy hidropátiás indexét és így tovább.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A fentiek miatt ebben az elektronikus könyvben törekedtünk arra, hogy minél több molekuláris grafikai ábrázolással segítsük az olvasót a „háromdimenziós műveltség” elsajátításában, ami nélkül a makromolekulák háromdimenziós világa nehezen érthető meg.

(Az e-könyvben szereplő összes fehérjeszerkezeti ábra az interneten elérhető adattárban (PDB: Protein Data Bank) szereplő atomi koordináták alapján készült, amelynek az azonosító kódját az ábrafeliratokban feltüntetjük (a mioglobin esetében ez például 1MYO, a hemoglobinnál 1GZX).)

5.2.2. A globuláris fehérjék hierarchikus szerkezeti felépítése

A PDB adatbázisban szereplő 85 ezer szerkezet összehasonlító vizsgálata alapján az ismert fehérjeszerkezeteket mintegy 1300 **szerkezeti család**ba (angolul ***fold***) lehet sorolni. Az egyes családok tehát szerkezeti alapon elkülöníthetőek, az adott családba tartozó fehérjék térszerkezete lényegileg megegyezik.

5.2.3. Fehérjeszerkezeti motívumok

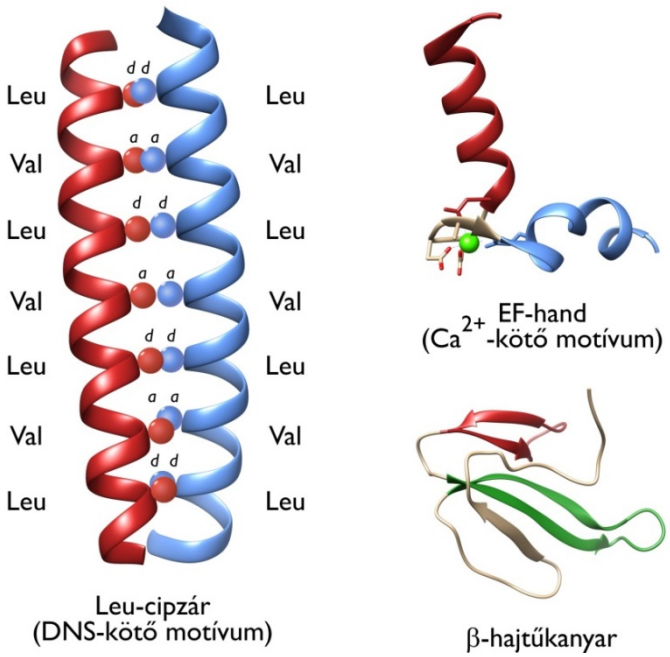
A nagyszámú fehérjeszerkezet elemzésével kiderült, hogy a fehérjék háromdimenziós szerkezetén belül léteznek olyan **térszerkezeti egységek**, amelyek másodlagos szerkezeti elemek adott elrendeződésű kombinációi. Ezek rendre megjelennek a legkülönbözőbb fehérjecsaládok szerkezetében. Ezeket a kis egységeket, amelyek a fehérje térszerkezet egyfajta kirakós játék elemei, „szuperszekunder” elemeknek, más néven **motívumok**nak nevezték el. A motívumok tehát egy másodlagos szerkezeti szint feletti, de harmadlagos szerkezeti szint alatti szintet képviselnek (nevezik **szupermásodlagos szerkezeti szint**nek is).

A legegyszerűbb motívumok 2-3 másodlagos szerkezeti egység olyan kombinációi, ahol az egymás közelébe kerülő szakaszok a szekvenciában is szomszédosak. Az egyszerűbb motívumok kombinálódásával összetettebb motívumok jöhetnek létre, amelyeknél már olyan szakaszok között jön létre kölcsönhatás, amelyek a szekvenciában távol esnek egymástól. A fehérjék szerkezete tehát hierarchikus, a másodlagos szerkezeti elemekből kisebb, egyszerűbb motívumok, ezekből pedig nagyobb, összetettebb motívumok jöhetnek létre. Nézzünk néhány példát gyakori motívumokra (lásd **5.7. ábra**).

Az **EF-kéz (*EF-hand*)** egy jellegzetes **Ca^{2+}-kötő motívum**, amelyre jó példa a kalmodulin fehérje. Elsőként a kalmodulinnal rokon parvalbumin fehérjében írták le, ahol „E” és „F” jelzésű α-hélixek, valamit az ezeket összekötő szakasz alkotta ezt a szerkezetei egységet, innen származik az elnevezés. Ez tehát egy hélix-hurok-hélix szuperszekunder szerkezetű motívum.

A **leucin-cipzár** szerkezete gyakorlatilag azonos a fibrilláris fehérjék egyik tagjaként bemutatott keratin szerkezetével, tehát egy **kétláncú szuperhélix (*coiled-coil*)**. Ez a motívum megjelenhet egyetlen polipeptidlánc részeként is, de ahogyan azt a keratin esetében már láttuk, két azonos vagy különböző polipeptidlánc is alkothat egymással leucin-cipzárt. Jó példa a transzkripciós faktorok (szabályzó fehérjék) esete, ahol a fehérjék dimerizációjáért a leucin-cipzár motívum felelős (lásd **18.1.1.4. fejezet**).

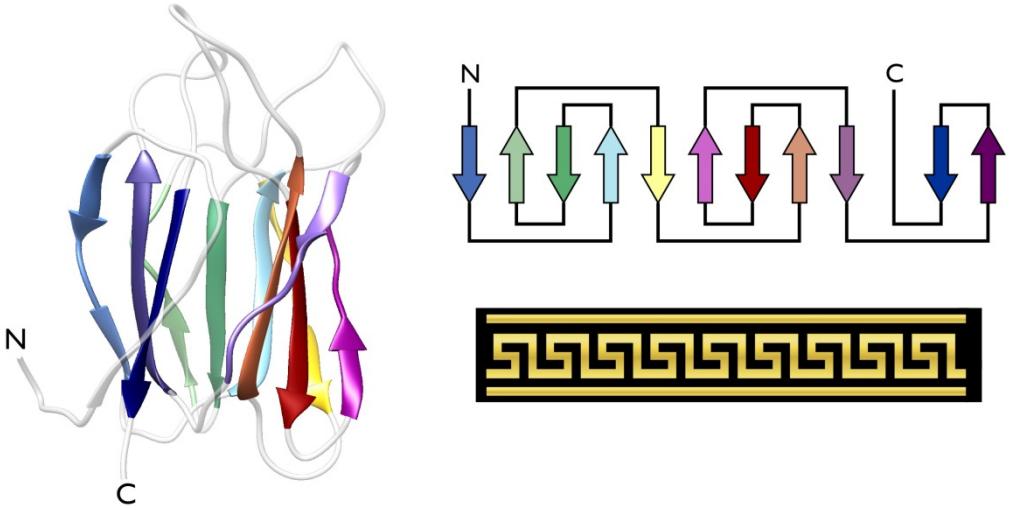
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.7. ábra: Néhány egyszerű szupermásodlagos szerkezeti elem, más néven motívum

Ezekben az esetekben a motívum tehát nem egyetlen fehérje szerkezetének a része, hanem egy **negyedleges szerkezet** létrejöttét elősegítő egység.

A **hajtűkanyar**t mint másodlagos szerkezeti elemet már bemutattuk. Azért szerepel a szuperszekunder szerkezeti elemek között is, mert nagyon gyakran más motívumok részeként jelenik meg. Az **5.8. ábrán** egy összetettebb motívumot mutatunk be, amit **görög váza motívum**ként is említenek.



5.8. ábra: Egy összetett szerkezeti motívum, a görög váza motívum

A már említett, mintegy 1300 különböző globuláris fehérjeszerkezet ilyen azonos topológiai elemek eltérő kombinációjaként értelmezhető. Az ismeretek szerint legfeljebb néhány száz eltérő motívum építi fel az összes globuláris fehérjét. A motívumok egy része egyféle funkcióval rendelkezik (pl. az EF-kéz az eukarióta sejtek univerzális Ca^{2+}-szabályozó eleme). Más motívumokhoz nem feltétlenül tartozik egyedi funkció, tehát eltérő fehérjékben az azonos szerkezeti motívum akár más-más funkcióval is rendelkezhet.

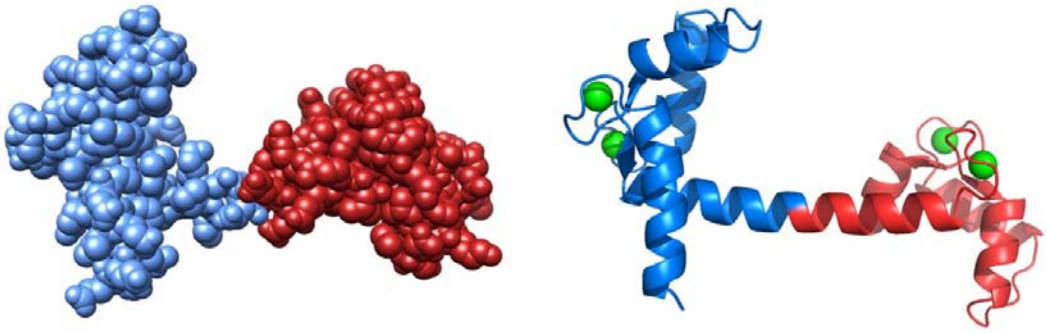
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

5.2.4. Domének

Számos globuláris szerkezetű fehérjében felismerhetőek **kompakt**, önmagukban is **globuláris** jellegű **szerkezeti egységek**. Ezeket **domének**nek nevezzük. A domének jelentik a másodlagos és harmadlagos szerkezeti szint közötti legmagasabb „átmeneti" szintet. (A domének tehát egyetlen polipeptidláncon belül elkülönülő egységek, nem keverendők össze az eltérő polipeptidláncok alkotta alegységekkel). Egyértelmű definíció létezik arra, hogy mit tekinthetünk doménnek. A **domén** a fehérjemolekulán belül jól elkülönülő, másodlagos és harmadlagos szerkezeti szint közötti szerkezeti egység, amely autonóm, vagyis a fehérje többi részétől **független feltekeredés**re képes.

A doménnek nem feltétlenül van, de esetenként lehet jól elkülöníthető funkciója (pl. egy membrán-kötött receptor valamelyik extracelluláris doménjének lehet ligandum-kötő funkciója). Az **5.9. ábra** baloldali képén a térkitöltő ábrázolás egyértelműen jelzi, hogy a kalmodulin fehérje szerkezete két jól elkülönülő doménből áll. A jobboldali képen a fehérje szalagmodellje látható, melyben az is látszik, hogy mindkét domén két Ca^{2+}-kötő hellyel rendelkezik (amelyek EF-kéz szerkezetűek).

A domének tipikus mérete **~40-100 aminosav**. Létezésükre először az hívta fel a figyelmet, hogy globuláris fehérjék fehérjebontó enzimmel történő kezelésekor első lépésben néha jól definiált részekre esett szét a fehérje (limitált proteolízis), és az így keletkező részek sokkal lassabban emésztődtek tovább. Kiderült, hogy ilyenkor a polipeptidlánc doménekre emésztődött szét. A **domének közötti** gyakran **flexibilis** összekötő **szakasz** a proteázok számára könnyebben hasítható, mint a doménen belüli polipeptidlánc.



5.9. ábra: A kalmodulin térszerkezetének térkitöltő, és szalagmodellje (PDB: 1CLL)

5.3. Fehérje térszerkezeti típusok

Mint említettük, a PDB adatbázisban jelenleg összesen mintegy 85 ezer fehérje térszerkezet van. A legegyszerűbb szerkezeti osztályozás alapján ezeket hét alapvető típusba soroljuk. Ezek az alábbiak:

a) **Alfa-helikális** (*all-alpha*) **fehérjék**, amelyekben α-hélix szerepel, β-lemez nem, vagy csak kevés (lásd **5.10. ábra**).

b) **Béta-szerkezetű** (*all-beta*) **fehérjék**, amelyekben β-lemez szerepel, α-hélix nem, vagy csak elvétve (lásd **5.11. ábra**)

c) **Alfa+béta fehérjék**, amelyekben főleg antiparallel β-lemezek vannak, amelyek a szerkezetben a hélix-tartalmú résztől elkülönülve fordulnak elő. Az antiparallel láncok miatt jöhet létre ez az elkülönülés, a főlánc egy szakasza oda-vissza hajtogatódva létrehozza a térben elkülönülő antiparallel béta-lemezes részt, a szekvencia egy másik szakasza pedig kialakítja a helikális részt (lásd **5.12. ábra**).

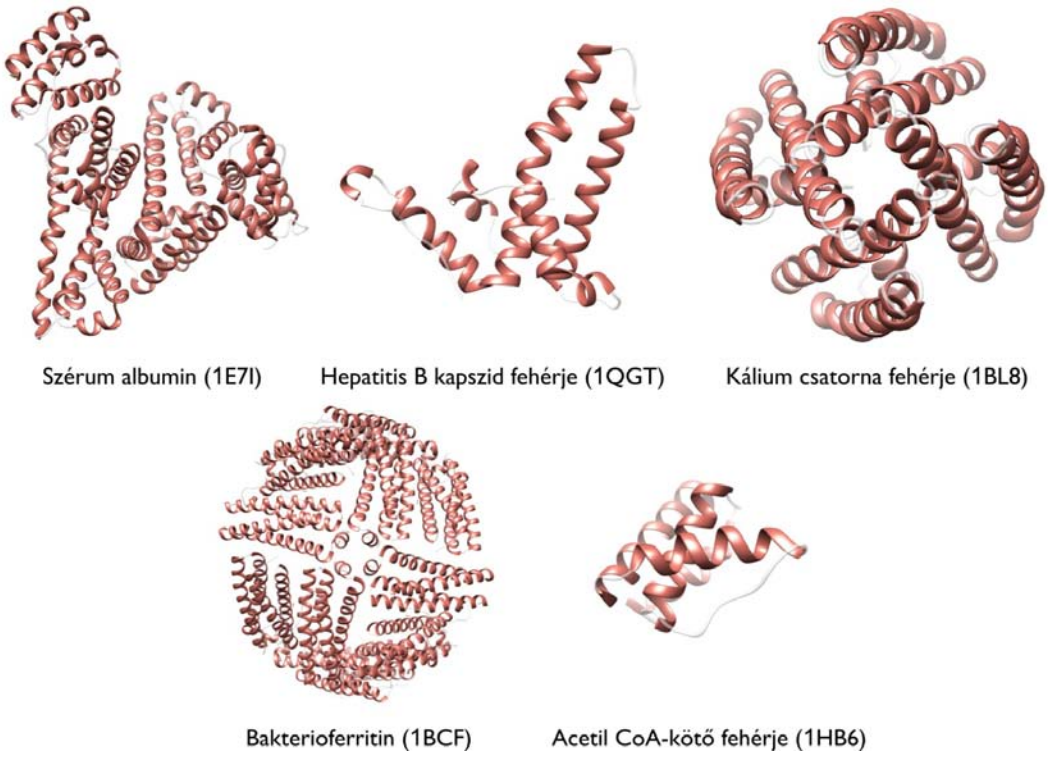
d) **Alfa/béta fehérjék**, amelyekben főleg parallel β-lemezek vannak. A parallel lemezek tipikusan β-lánc – α-hélix – β-lánc szerveződésben alakulnak ki, α-hélix szerkezetben fordul vissza a főlánc úgy, hogy a β-láncok párhuzamosan tudjanak elrendeződni (lásd **5.13. ábra)**.

e) **Sok-doménes fehérjék**, amelyekben egyetlen polipeptidláncon belül számos, egymást követő, önálló feltekeredésre képes szerkezeti egység van. Példa a β-galaktozidáz enzim szerkezete (lásd **5.14. ábra**).

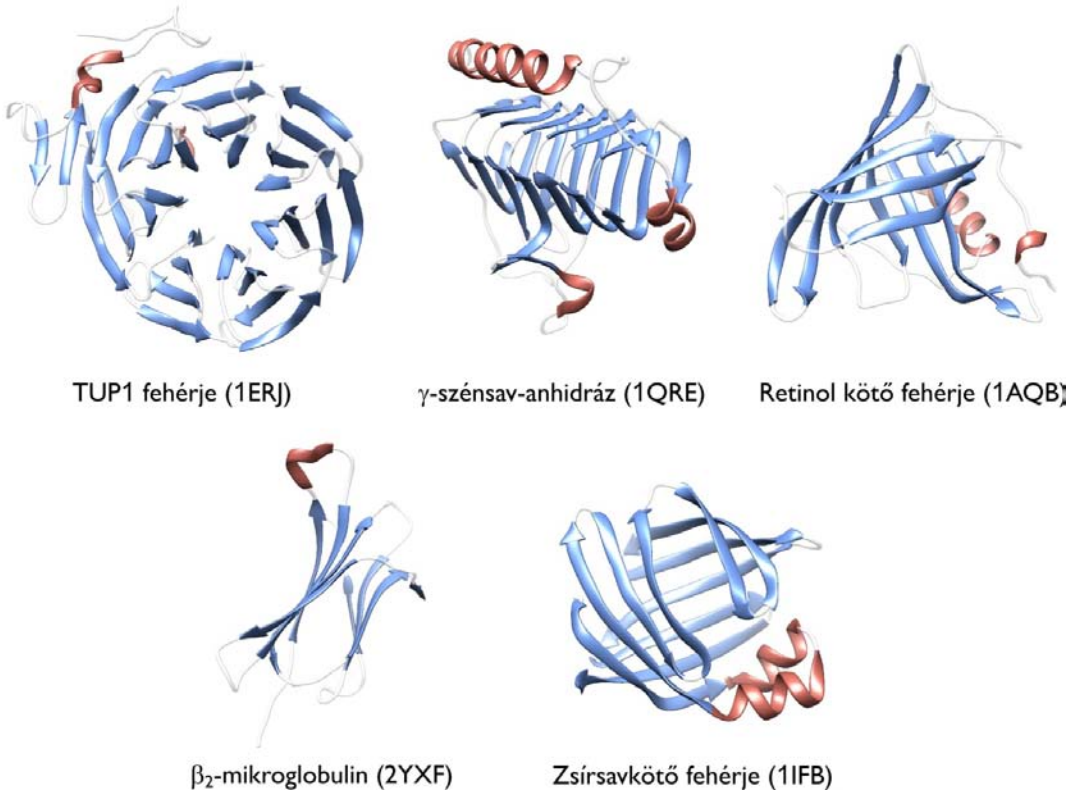
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

f) **Membrán és sejtfelszíni fehérjék,** amelyek vagy a membránba ágyazódnak, vagy a membrán felületére rögzülnek (lásd **5.15. ábra - 5.19. ábra**).

g) **Kisfehérjék**, amelyeknek **nincs** klasszikus **hidrofób mag**juk, térszerkezetüket **diszulfidhidak** vagy **fémionok** stabilizálják (lásd **5.20. ábra**).

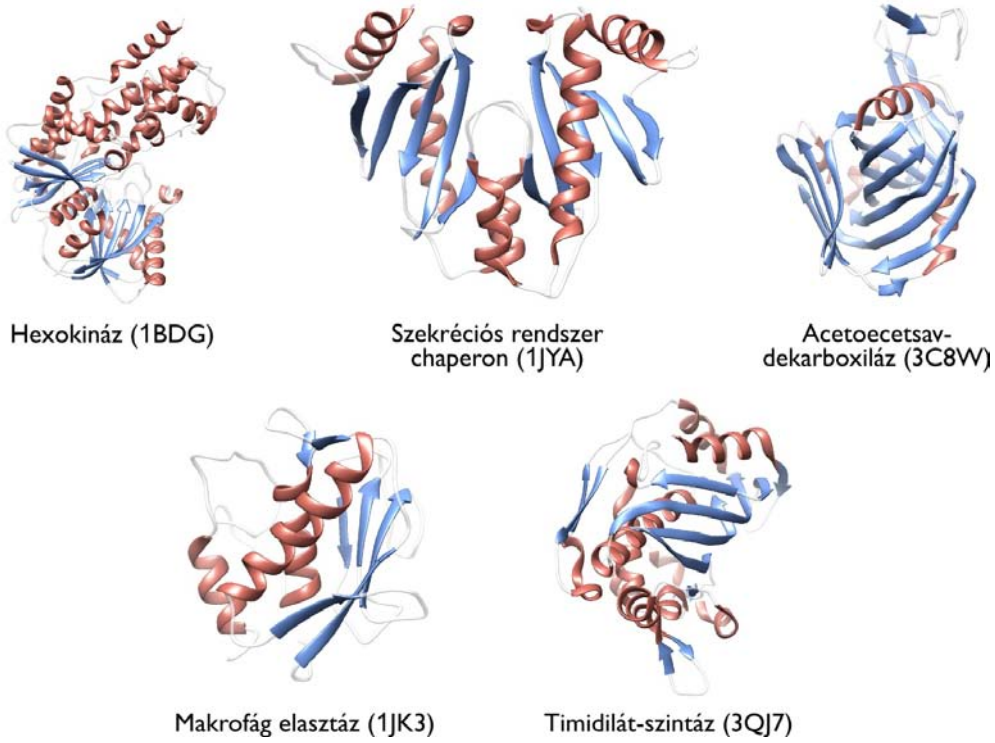


5.10. ábra: Néhány példa az alfa-helikális fehérjeszerkezeti típusra. (Zárójelben tüntettük fel a PDB kódokat.)



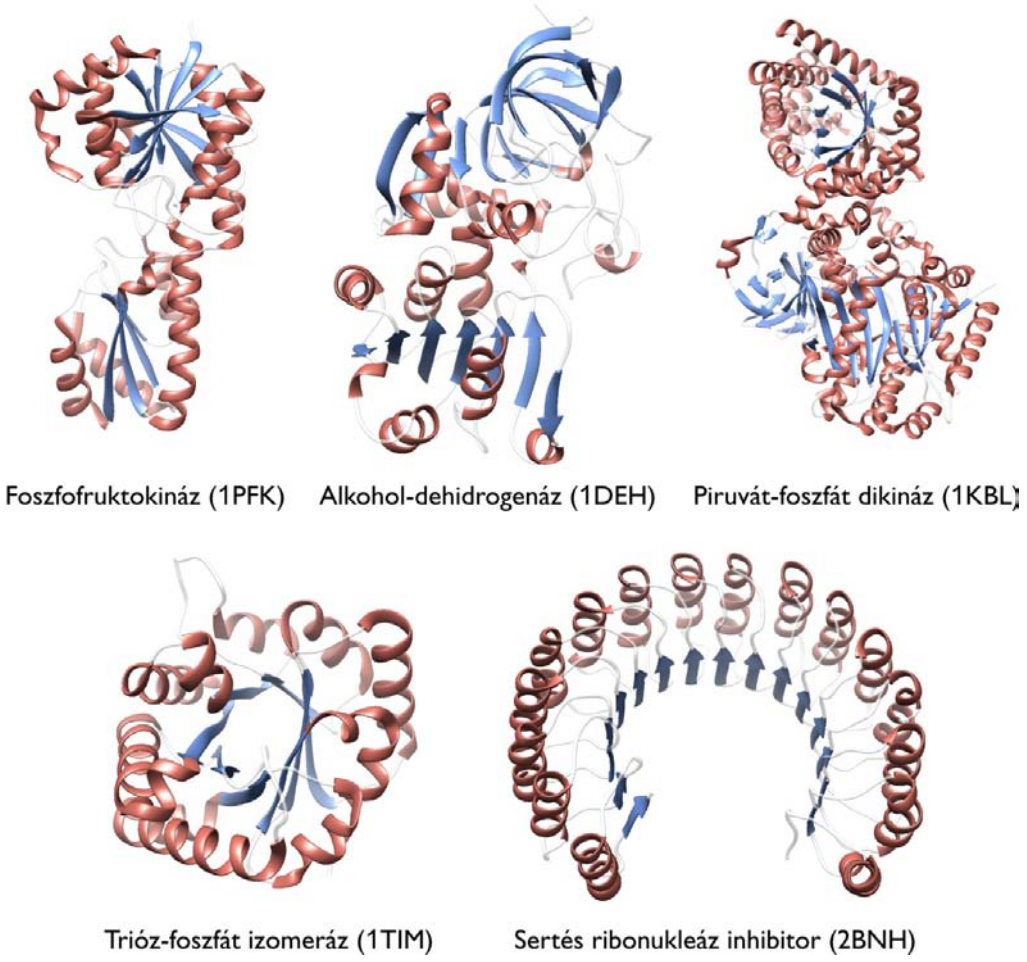
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

5.11. ábra: Néhány példa a béta-szerkezetű fehérjék csoportjából

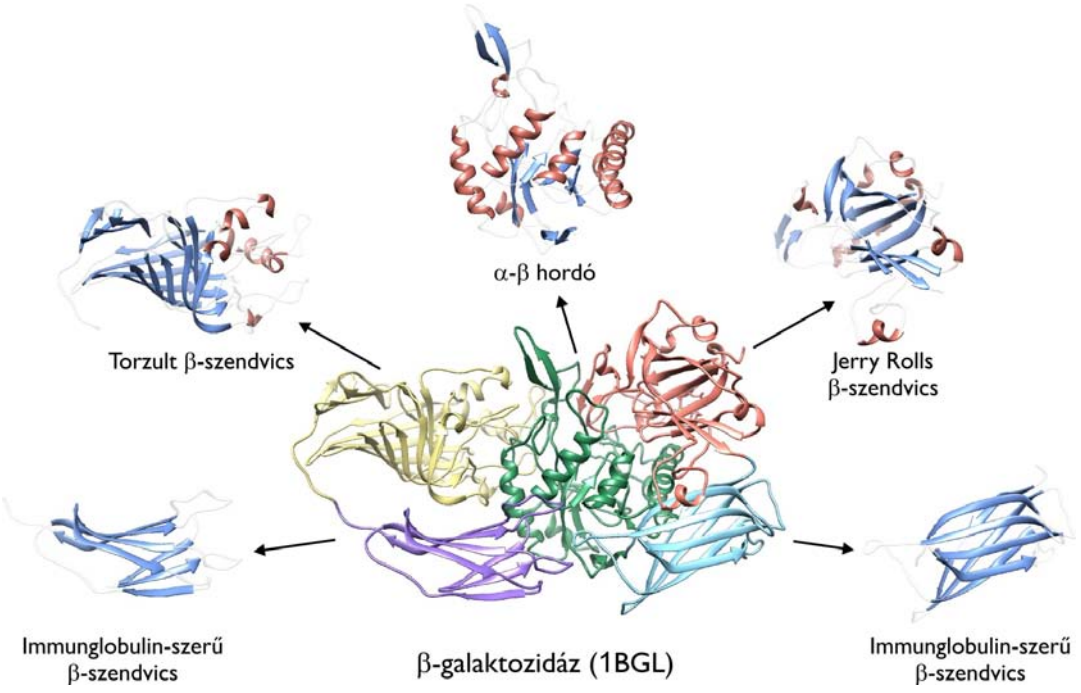


5.12. ábra: Néhány példa az alfa+béta szerkezetű fehérjék csoportjából

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



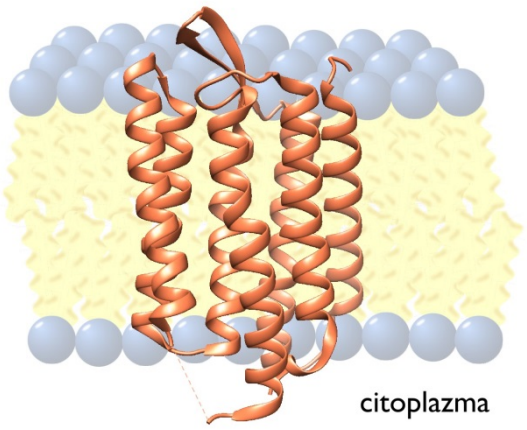
5.13. ábra: Néhány példa az alfa/béta fehérjék csoportjából



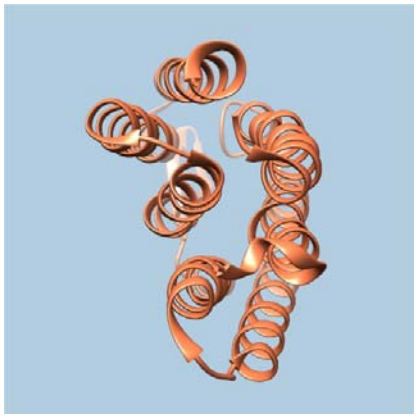
5.14. ábra: Egy jellegzetes sok-doménes fehérje, a β-galaktozidáz

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az **5.15. ábra** egy hét transzmembrán hélixet tartalmazó ún. 7TM-típusú fehérjét mutat oldalnézetben. Ezek a fehérjék egy hatalmas fehérje családot reprezentálnak, többségük valamilyen G-fehérje kapcsolt jelátviteli útvonalon receptorként (GPCR) működik (lásd **11.5.2. fejezet**). Néhány kivételtől eltekintve ezek a fehérjék nem képeznek membránon átvezető csatornát. Ahogyan a felülnézeti kép (lásd **5.16. ábra**) jelzi, a hélixek szorosan egymás mellé rendeződnek. Az ilyen fehérjékben a **membránon átívelő α-hélixek** a membrán apoláros része felé néző felszíne apoláros, míg a membrán poláros feji egységei melletti része poláros (**amfipatikus hélix**).

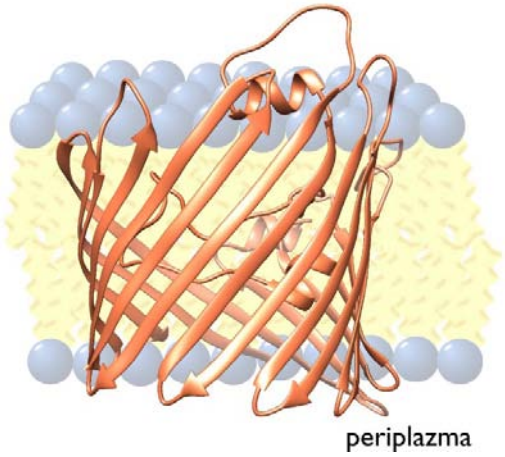


5.15. ábra: Egy hét transzmembrán hélixet tartalmazó fehérje, a bakteriorodopszin szerkezete (PDB:1C3W)



5.16. ábra: A bakteriorodopszin szerkezete felülnézetben

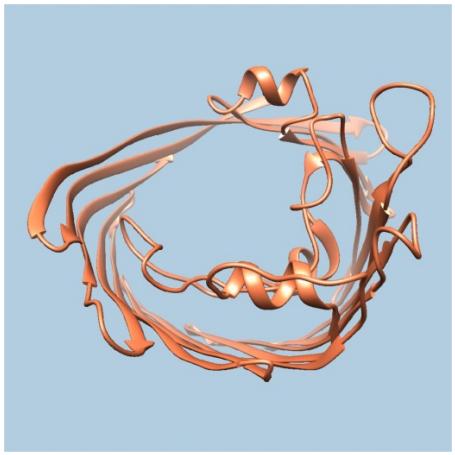
A membránfehérjék egy része **csatornát** képez a membránon keresztül.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

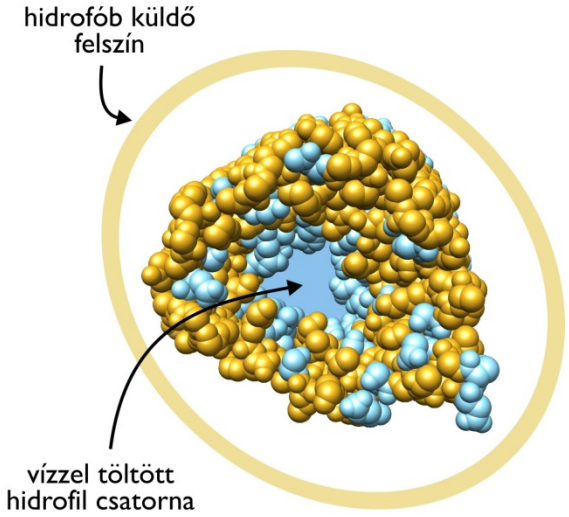
5.17. ábra: A kólibaktérium porin fehérjéje oldalnézetben (szalagmodell; PDB: 2ZFG)

A **5.17. ábra** szereplő fehérje a kólibaktérium **porin**nak nevezett fehérjéje. A Gram-negatív baktériumoknak két membránja van. A citoplazmát határoló plazmamembrán, és a külvilággal kapcsolatot tartó külső membrán közötti teret periplazmatikus térnek nevezik. A plazmamembránon keresztül szigorúan kontrollált módon zajlik az egyes anyagok leadása, illetve felvétele. A porin fehérje a külső membránba ágyazódik, és kismolekulák számára szabadon átjárható.



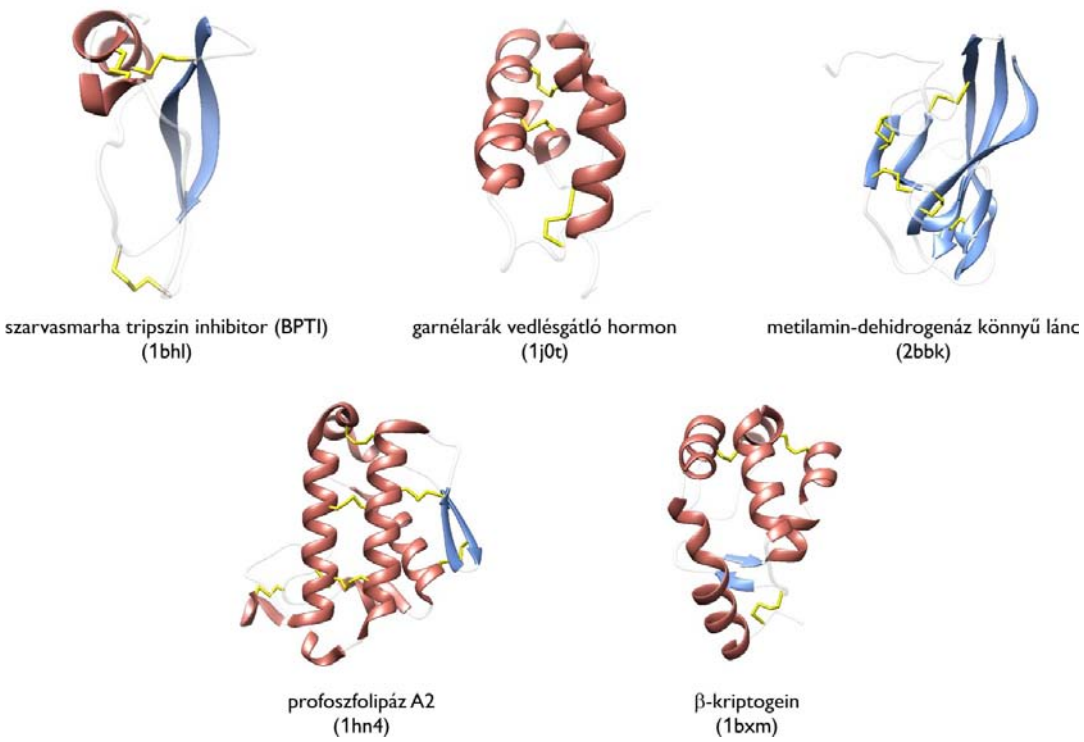
5.18. ábra: A kólibaktérium porin fehérjéje felülnézetben (szalag modell)

Felülnézeti ábrázolásban (lásd **5.18. ábra**) jól látható, hogy a porin fehérje egy csatornát képez. Az **5.19. ábra** azt is illusztrálja, hogy a **csatorna belseje hidrofil**, így a kisméretű poláros anyagok számára könnyen átjárható. A membrán felé néző felszín természetesen apoláros.



5.19. ábra: A kólibaktérium porin fehérjéje felülnézetben (térkitöltő modell)

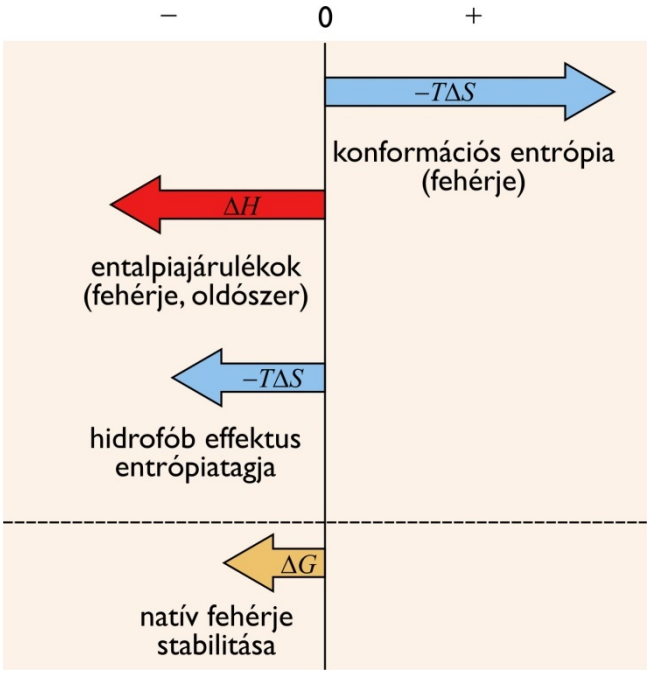
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.20. ábra: Néhány kisfehérje, amelyek szerkezetét hidrofób mag hiányában diszulfidhidak stabilizálják

5.4. A fehérje térszerkezet stabilitása

A natív (tehát funkcióképes) **fehérjeszerkezet stabilitása** egy **termodinamikai fogalom**: a vizes oldatban lévő natív, és a vizes oldatban lévő letekeredett (*unfolded*; denaturált) fehérjeszerkezetek szabadentalpia értékeinek különbsége (lásd **5.21. ábra**).



5.21. ábra: A globuláris fehérjék natív szerkezetének stabilitását meghatározó entrópia és entalpia tagok.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az itt kifejtett stabilitás olyan termodinamikai rendszerre vonatkozik, amelyben a rendszer egy különálló globuláris fehérje. A natív szerkezet néhány kivételtől eltekintve a legalacsonyabb szabadentalpia szintű szerkezet.

Ugyanakkor fontos megértenünk, hogy a különálló fehérje molekulákból natív, vagy nem-natív fehérje-aggregátumok is képződhetnek. Az így létrejövő, az előzőtől eltérő rendszernek a szabadentalpiaszintje alacsonyabb lehet, mint a natív fehérjéé. Mint hamarosan látni fogjuk, a nem-natív aggregátumok kialakulása ellen speciális dajkafehérjék működnek az élő szervezetekben.

Nézzük meg, mi jellemző a szabadentalpia szint szempontjából a **letekeredett szerkezetr**e. A letekeredett, tehát egyfajta statisztikus gombolyag szerkezetben lévő fehérje **nagyfokú konformációs entrópiá**val rendelkezik. Ez azt jelenti, hogy számos azonos szabadentalpia szintű térszerkezeti állapotban lehet. A magas konformációs entrópia kedvez a letekeredett állapot kialakulásának. Ugyanakkor a teljesen letekeredett szerkezetben a fehérje hidrofób oldalláncai szabadon hozzáférhetőek a víz számára. A hidrofób oldalláncok körül a víz alacsony entrópiájú klatrát szerkezetet hoz létre. Ez az alacsony entrópiaszintű klatrát szerkezet a letekeredett állapot ellen hat. A letekeredett fehérje poláros részei a vízmolekulákkal kedvező H-hidas kölcsönhatásban vannak, ugyanakkor fontos figyelembe vennünk, hogy a vízmolekulák közötti kölcsönhatások még inkább kedvezőek.

Nézzük meg ezek után, hogy milyen tényezők szabják meg a natív szerkezet szabadentalpia szintjét. A natív szerkezet alacsony konformációs entrópiát jelent, hiszen ha nem is egyetlen, de egy szűk konformáció-sereg jellemzi a natív állapotot. Ez az alacsony entrópia a natív állapot létrejötte ellen hat. A natív állapotú fehérje felszíni poláros részei vízzel H-hidas kapcsolatban vannak, míg az eltemetett poláros részek egymással vannak H-hidas kapcsolatban. Az apoláros részek zöme eltemetett, ezek rövidtávú másodlagos kötőerőkkel kapcsolódnak össze.

A **natív szerkezet fő stabilitási tényező**je, a feltekeredés fő oka a **hidrofób hatás**. A letekeredett szerkezet feltekeredése, a ***folding*** (a feltekeredés, felgombolyodás kifejezések mellett ezt az angol szót is használhatjuk a magyar nyelvű szakirodalomban) folyamata során az apoláros csoportokat körülvevő szabályos víz-szerkezet megszűnik, a vízmolekulák entropikusan kedvezőbb helyzetbe kerülnek. A natív szerkezet kialakulását tehát elsősorban **a vízmolekulák entrópia növekedése hajtja**!

Különböző biofizikai mérésekkel a **natív szerkezet stabilitása**, tehát a natív és a letekeredett állapotok szabadentalpia különbsége mérhető. Ennek értéke átlagosan nagyjából **-40 kJ/mol** értéknek adódik (átlagos méretű fehérjékre), vagyis csak néhány hidrogénhíd kötésnyi! Ez látszólag ellentétben áll azzal a ténnyel, hogy a natív szerkezetben akár több száz hidrogén híd is lehet.

A látszólagos ellentmondást az az imént ismertetett tény oldja fel, hogy a stabilitás nem a natív szerkezet önálló tulajdonsága, hanem a natív és a letekeredett állapotok szabadentalpia szintjeinek különbsége. A letekeredett szerkezet esetében is nagyszámú hidrogén híd alakul ki, csak éppen az oldószerrel. A natív szerkezet hidrogénhidainak száma tehát önmagában nem mérvadó. A natív állapot megannyi stabilizáló és destabilizáló tényező eredőjeként jön létre.

A fent említett stabilitásérték egy átlag. Vannak fehérjék, amelyek az átlagnál jóval stabilabbak, és természetesen vannak, amelyek jóval kevésbé stabilak. Ismertek olyan mikrobák, amelyek hőforrásokban élnek. Az ilyen élőlények fehérjéi természetesen jóval stabilabbak az átlagnál.

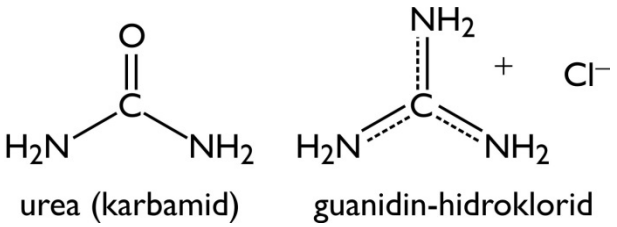
5.5. A fehérje térszerkezet kialakulása

Mielőtt rátérnénk, hogy hogyan tekeredik fel a polipeptidlánc, tehát mi a **folding** mechanizmusa, vizsgáljuk meg, hogy a natív térszerkezet hogyan tekeredik le, mit tudunk meg a polipeptidlánc „*unfolding*”-jából.

5.5.1. A fehérjék letekeredése, az „*unfolding*”.

A fehérje **natív szerkezete megszűntethető** a **hőmérséklet emelésé**vel, vagy különböző anyagok, ún. **denaturálószerek**, urea vagy guanidin-hidroklorid (GndHCl) adagolásával (lásd **5.22. ábra**). A fehérje szerkezetváltozása általánosságban spektroszkópiával követhető például a fehérje triptofánjainak fluoreszcencia tulajdonságain keresztül (lásd **5.23. ábra**). A natív szerkezetben a triptofánok zöme a fehérje belsejében el van temetve, apoláros környezetben van. A letekeredett fehérjében a triptofánok vízzel kerülnek kölcsönhatásba. A két eltérő állapotú triptofán fluoreszcencia tulajdonságai (elnyelési és emissziós maximumok) eltérők. Enzimek esetében a natív szerkezet detektálása az enzim aktivitásán keresztül is megvalósítható.

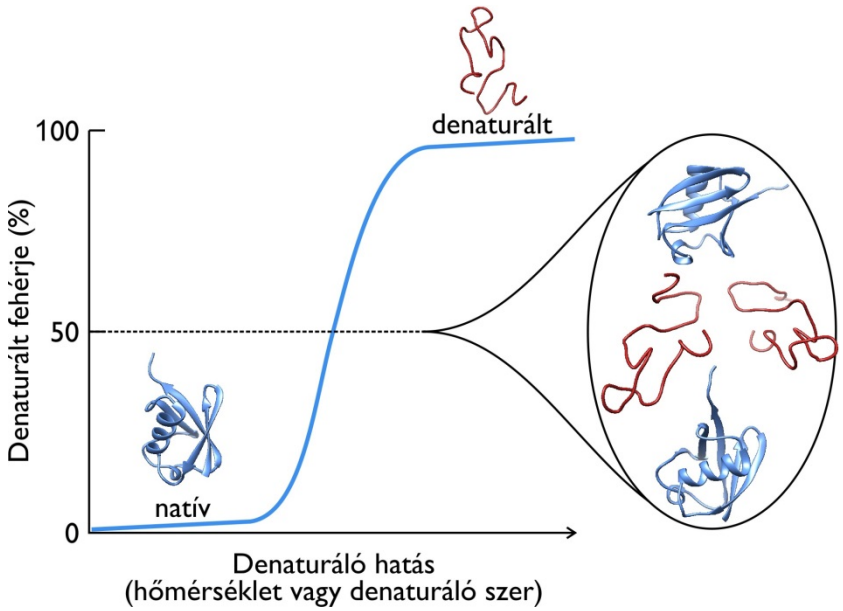
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.22. ábra: A két leggyakrabban használt fehérjedenaturáló szer az urea és a guanidin-hidroklorid

Amikor a hőmérséklet emelésével a rendszer hőmozgásában rejlő átlagos kinetikai energiát növeljük, a rendezett natív szerkezete egy bizonyos szűk hőmérséklet tartományban összeomlik, mintegy „megolvad" (lásd **5.23. ábra**). A hődenaturáció fő oka valószínűleg az, hogy a hőmérséklet emelésével megszűnik a letekeredett állapotra jellemző nagyszámú klatrát-szerkezet. Ezáltal a letekeredett állapotból a natív állapotba való „kimenekülés" fő termodinamikai oka szűnik meg. Vegyük észre, hogy a fő változás nem a natív, hanem a letekeredett szerkezetet érinti. Ebből is látszik, hogy a stabilitáshoz nem elegendő a natív szerkezetre fókuszálni, egyszerre kell figyelembe venni a natív, és a letekeredett szerkezet állapotát.

A letekeredés **denaturálószer** adagolásával is kiváltható (lásd **5.23. ábra)**. A leggyakrabban használt denaturálószerek az urea és a guanidin-hidroklorid (lásd **5.22. ábra**). Ezek a **kaotróp**, vagyis káoszt elősegítő anyagok a jelenlegi ismeretek szerint szintén a klatrát-szerkezet megszüntetésén keresztül fejtik ki főleg a hatásukat. Ezáltal elsősorban a letekeredett szerkezetet stabilizálják. Vegyük észre, hogy a letekeredés itt is egy szűk tartományban, ebben az esetben a kaotróp anyag szűk koncentrációtartományában megy végbe.



5.23. ábra: Egy globuláris fehérje denaturációs görbéje. A denaturálószer koncentrációjának növelésével, illetve a hőmérséklet emelésével egyre nő a letekeredett fehérjék aránya. Ez az arány egy szűk koncentráció- illetve hőmérséklettartományban meredeken emelkedik. A legegyszerűbb modell szerint a fehérje térszerkezete vagy teljes mértékben natív, vagy teljes mértékben letekeredett, a kettő között nincs átmenet. Az 50%-os letekeredési szint esetében tehát a fehérjemolekulák 50%-a tökéletes natív, másik 50%-a tökéletesen letekeredett szerkezetű.

A szerkezet szűk tartományon belüli összeomlása azt jelzi, hogy a natív szerkezet egy bizonyos destabilizáló hatást még tolerál, majd egy határ felett összeomlik. Ez arra utal, hogy a **natív szerkezetet** egymással együttműködő, **kooperatív kölcsönhatások stabilizálják**. Amint ezek egy része felbomlik, úgy az azonnal meggyengíti a fennmaradó kölcsönhatásokat, és a teljes rendszer összeomlik.

Ennek megfelelően a legegyszerűbb „minden vagy semmi" modell szerint a fehérje térszerkezete vagy teljes mértékben natív, vagy teljes mértékben letekeredett, a kettő között nincs átmenet. Az **5.23. ábra** diagramját tehát

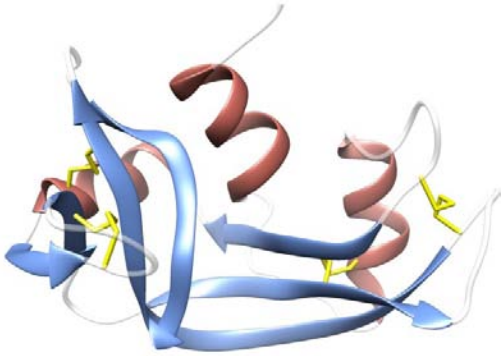
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

úgy kell értelmezni, hogy például az 50%-os letekeredési szint esetében a fehérjemolekulák fele tökéletes natív szerkezetben van, a másik fele tökéletesen letekeredett állapotú.

5.5.2. Az Anfinsen-kísérlet

Christian **Anfinsen** az 1960-as évek elején bizonyította, hogy egy kisméretű, globuláris enzim fehérje, az **RN-áz** (ribonukleáz, RNS-bontó enzim; a térszerkezetét, kiemelve a 4 diszulfidhidat, lásd **5.24. ábra**) tökéletesen **reverzibilisen renaturálható** (lásd **5.25. ábra**).

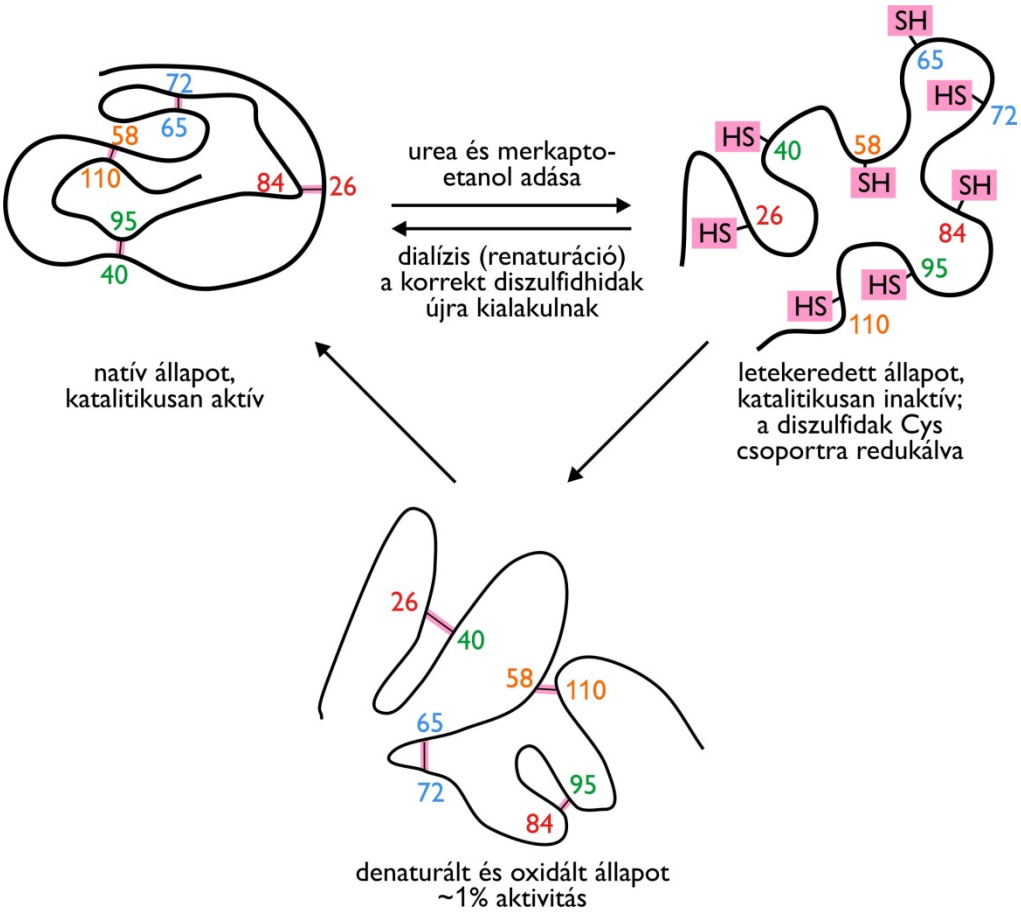
A kísérlet lényege röviden a következő: az RN-áz enzimaktivitása jelzi a natív szerkezet meglétét, ezért ezen keresztül mérhető, hogy a jelenlévő RN-áz molekulák hanyadrésze van natív állapotban. Az RN-áz fehérje diszulfidhidakat is tartalmaz, azért teljes **denaturálás**hoz nem elegendő **denaturálószer**t, ureát adni, a diszulfidhidakat valamilyen **redukálószer**rel, például merkaptoetanollal fel kell nyitni. Urea és merkaptoetanol hozzáadására az RN-áz fehérje „letekeredett”, az aktivitása teljesen megszűnt.



5.24. ábra: Az RN-áz enzim térszerkezete. (világoskék: β-lemez, barna: α-hélix, sárga: diszulfidhíd; PDB: 2AAS)

A kísérlet lényegi része ezután következett. Amint az ureát és a merkaptoetanolt **dialízis**sel eltávolította, a fehérje minden különleges segédanyag nélkül visszanyerte az aktivitását, feltekeredett (lásd **5.25. ábra**). Az is kiderült, hogy amennyiben a merkaptoetanolt gyorsan, és teljes mértékben eltávolította, a feltekeredés alacsony hatékonyságú volt. Ha azonban nagyon alacsony koncentrációban hagyott az oldatban merkaptoetanolt (a teljes redukáláshoz szükségesnél sokkal alacsonyabb koncentrációban), akkor a feltekeredés hatékonysága rendkívüli mértékben megnőtt.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.25. ábra: Az Anfinsen-kísérletben szereplő fehérjeszerkezeti állapotok, és az ezekhez vezető körülmények. A hibás diszulfidhidas állapot akkor halmozódik fel, ha a redukálószert gyorsan eltávolítják.

A natív RN-áz molekulában 4 diszulfidhíd, a teljesen letekeredettben tehát 8 szabad cisztein van. A redukálószer gyors és teljes eltávolítása azzal járt, hogy felszaporodtak azok a szerkezetek, amelyek hibás diszulfidhidakat tartalmaztak. Ezekből a lokális (tehát nem abszolút) szabadentalpia minimumokat reprezentáló hibás szerkezetekből csak a diszulfidhidak felbomlásával lehet kikerülni, ami lassú folyamat. Kis koncentrációban lévő merkaptoetanol elegendő volt ahhoz, hogy felbontsa a hibás, feszített szerkezetű diszulfidokat, új esélyt adva a molekuláknak a helyes feltekeredésre. A natív állapotra jellemző, stabilabb diszulfidhidakat a nagyon alacsony koncentrációban alkalmazott merkaptoetanol nem bontotta fel. Később számos más fehérje esetében is sikerült kimutatni, hogy **a térszerkezetet az elsődleges szerkezet kódolja**.

Az Anfinsen-kísérlet elvi jelentősége: a kísérlet bebizonyította, hogy a fehérje **folding**ja a denaturációt kiváltó okok megszűntével **spontán végbemegy**. Ez csak azzal magyarázható, hogy a natív térszerkezet valamilyen módon „bele van kódolva” a fehérje aminosavsorrendjébe. **Az aminosavsorrend, tehát az elsődleges szerkezet egyértelműen meghatározza a térszerkezetet, tehát a harmadlagos szerkezetet**! Anfinsen ezért a felismerésért 1972-ben kémiai Nobel-díjat kapott.

Az önálló feltekeredés képessége egyfajta autonómiát jelent a fehérjékre nézve. A biológiai rendszerekben számos esetben tapasztalunk alapvető egymásrautaltságot a komponensek között. Például DNS kódolja a fehérjéket, de a dekódolást, illetve a DNS másolását fehérjék végzik. A feltekeredés képessége ugyanakkor éppenséggel lehet a fehérje autonóm tulajdonsága.

Fontos kihangsúlyozni, hogy a tudomány mai állása szerint pusztán az aminosavsorrendből, egyéb független információk (például hasonló szekvenciájú fehérjék térszerkezetének ismerete) nélkül a kutatók egyelőre nem tudják kiszámolni, „meghatározni” a fehérje térszerkezetét. Az információ tehát „ott van”, de annak kifejtési módját egyelőre nem sikerült kellő részletességgel feltárni.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az Anfinsen kísérlet azt mutatja meg, hogy nincsen elvi akadálya annak, hogy egy fehérje a szekvenciájában kódolja a térszerkezetét, és autonóm módon képes legyen feltekeredni. Ez azonban nem jelenti azt, hogy az élő szervezetben ne lenne a legtöbb fehérje számára hasznos a feltekeredés folyamatának segítése, katalizálása. Ismert tény, hogy a sejtekben számos olyan fehérje működik, amely javítja a feltekeredés hatékonyságát. Ezek a **dajkafehérjék** (***chaperon***-ok).

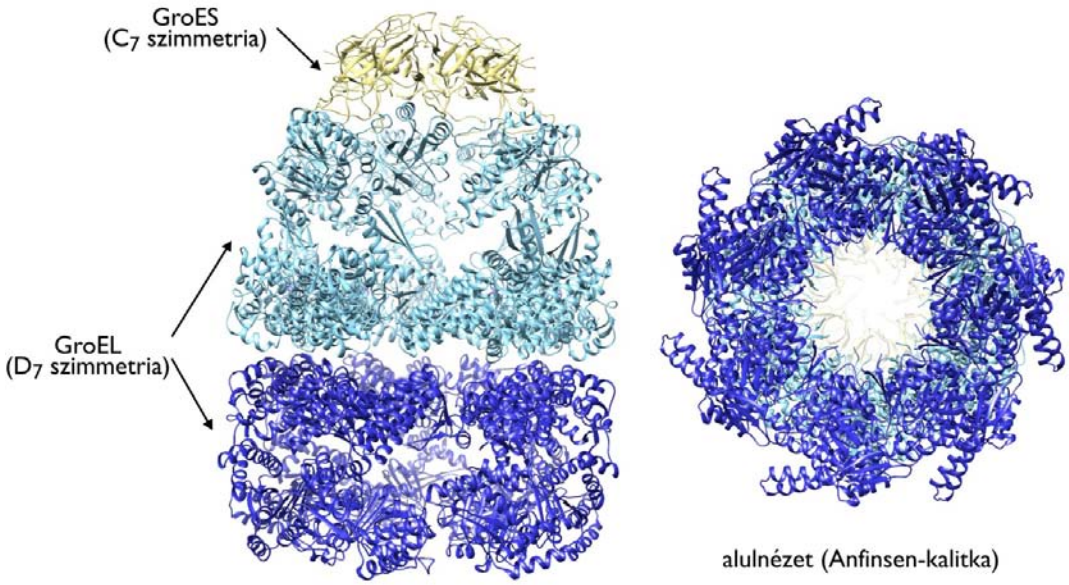
A sejtben hatalmas koncentrációban vannak jelen a fehérjék. Amikor a polipeptidlánc szintetizálódik, a még el nem készült lánc az oldat felé forduló apoláros részei miatt aggregálódhat. A dajkafehérjék **egyik típusa** (***chaperonin***-ok) hatalmas fehérje komplexet alkot, amely egyfajta kalitkába zárja a letekeredett fehérjét (Anfinsen tiszteletére ezt Anfinsen-kalitkának nevezték el), és ATP bontásból származó energiával segíti a feltekeredést. A segítés főleg az aggregálódás megakadályozásán keresztül történik.

A kólibaktérium **GroEL/GroES** chaperonin komplexének szerkezetét az **5.26. ábra** illusztrálja. A GroEL és a GroES fehérjék több alegységből állnak, tehát negyedleges szerkezettel bírnak (lásd **5.6. fejezet**).

A GroEL összesen 14 darab, 57 kDa méretű alegységből alakul ki. Szerkezete két gyűrűből épül fel, mindkét gyűrűt 7 alegység alkotja. A 14-alegységes fehérje így D_7-es szimmetriával rendelkezik. (A szimmetriák általános leírását lásd **5.6**). A két gyűrű egy hengert alkot. A GroES 7 darab, 10 kDa méretű alegységből áll, és sapkaszerűen lezárja a henger egyik oldalát. Így jön létre az Anfinsen-kalitka.

Más dajkafehérjék konformációs csapdákból segítik kijutni a feltekeredő fehérjét. Az eukarióták endoplazmás retikulumában működő **protein-diszulfid-izomeráz** például az Anfinsen-kísérletben kis koncentrációban alkalmazott merkaptoetanollal analóg módon segíti a feltekeredést: elősegíti a hibás diszulfidhidak bomlását. (A első protein-diszulfid-izomeráz enzimet magyar kutató, Venetianer Pál írta le.) Szintén konformációs csapdából segíti kijutni a feltekeredő fehérjét a **peptidil-prolin cisz/transz izomeráz** enzim is, amely a nem natív konfigurációjú prolinok átalakulását katalizálja.

Elméleti szempontból a dajkafehérjék léte tehát önmagában nem mond ellent az Anfinsen-kísérletből levont következtetés univerzális érvényének. Ugyanakkor a mai ismeretek szerint a fehérjék egy kis hányada kizárólag dajkafehérjék segítségével képes feltekeredni. A térszerkezeti információ ezek esetében is a primer szerkezetben kódolt, de önállóan nem tud érvényre jutni, csak dajkafehérjék segítségével. Másképpen fogalmazva, bár a feltekeredésnek termodinamikai gátja nincs, kinetikailag (tehát időben) a natív szerkezet elérése (a termodinamikai egyensúly beállta) csak nagyon lassan történne meg segítőfehérjék nélkül.



5.26. ábra: AGroES/GroEL komplex (chaperonin) térszerkezete (PDB:1AON)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

5.5.3. A fehérjék feltekeredése: a Levinthal-paradoxon

Az ismeretek egyszerű kombinálása olykor nagyon fontos következtetésekhez vezethet. Nézzük meg, mire jutunk, ha kombináljuk a fehérjék térszerkezetével, a molekuláris mozgások sebességével, és a fehérje feltekeredés sebességével kapcsolatos ismereteket.

Cyrus Levinthal 1968-ban az alábbi gondolatkísérletet tette közzé: vegyünk egy 100 aminosavas fehérjét. A fehérje natív főlánc szerkezetét 99 Φ, és 99 Ψ szöggel lehet megadni, ez tehát 198 torziós szög. Vizsgáljuk meg, hogy teljesen letekeredett állapotából mennyi idő alatt érheti el a főlánc a natív szerkezetet, ha véletlenszerűen próbálgatja végig az összes lehetséges konformációt. Tegyük fel, hogy minden torziós szög esetén valójában csak 3 értéket képes felvenni a szerkezet. Ez azt jelenti, hogy a főlánc 3^{198} eltérő konformációban lehet. Ez nagyjából 3×10^{94} egyedi konformáció. Ha az egyes konformációk közötti átmenetek idejét egy pikoszekundumnak vesszük (a valóságban is legfeljebb ilyen gyorsan mehetnek végbe a konformációváltozások), akkor 3×10^{82} másodpercbe telne az összes konformáció véletlenszerű végigjárása. Egy év kb. 3×10^{7} másodperc, tehát 10^{75} évbe telne ez a próbálgatás. Nos, ez több mint 10^{65}-szer meghaladja az univerzum korát. A valóságban a fehérjék akár a másodperc ezred, sőt milliomod része alatt is feltekeredhetnek. A gondolatmenetben tehát valahol komoly ellentmondás van. Emiatt ezt a gondolatmenetet **Levinthal paradoxon**nak nevezték el.

Vajon hogyan lehet az ellentmondást feloldani? A gondolatmenetben minden abban szereplő adat kísérletesen igazolt, vagy legalábbis az ismeretek által kellően alátámasztott. A gondolatmenetben egyetlen olyan kijelentés van, ami ugyan logikusnak tűnik, de amelyet semmilyen kísérletes adat nem támaszt alá. Ez az, hogy a feltekeredés során a főlánc véletlenszerűen próbálgatja végig az egyes konformációs állapotokat.

A paradoxon feloldása tehát abban áll, hogy elvetjük azt a lehető legegyszerűbb, ezért logikusnak tűnő, de ezek szerint helytelen feltevést, miszerint a feltekeredés egy teljesen random folyamat lenne.

Nos, ha nem teljesen random, akkor mi lehet a megoldás? Levinthal azt javasolta, hogy a feltekeredést a fehérjében lokális kölcsönhatások indítják el. A fehérje valamelyik szekvencia-részlete lokális kölcsönhatások révén (lásd pl. alfa hélix) rendkívül gyorsan elnyeri a natív konformációját. Ez a lokális rend leszűkíti a környező részek konformációs lehetőségeinek a számát, meghatározza, hogy azok milyen konformációt vehetnek fel. Ezt a folyamatot ahhoz hasonlította, ahogyan a kristálygóc irányítja a kristályosodás folyamatát. Legegyszerűbben megfogalmazva ez azt jelenti, hogy **létezik egy, vagy több feltekeredési útvonal**, a fehérje szerkezete ezen, vagy ezeken halad végig, ahelyett, hogy az összes lehetséges utat bejárná.

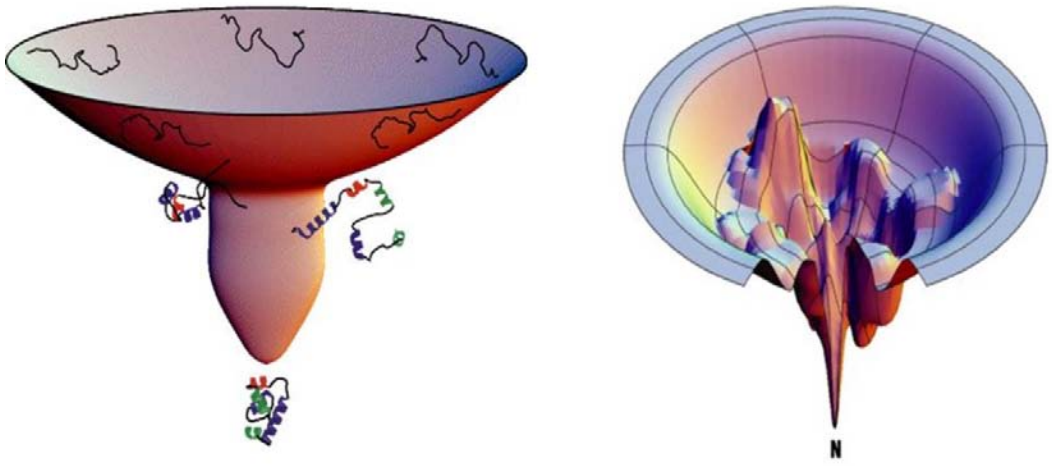
5.5.4. A fehérjék feltekeredése: a folding tölcsér

A **feltekeredés** folyamatának jelenleg elfogadott **általános modelljé**t nagyon szépen lehet illusztrálni a „**folding tölcsér**”-rel (lásd **5.27. ábra**).

A Levinthal paradoxonban említett hatalmas számú konformációs állapot mindegyikét reprezentálni lehet 1-1 ponttal egy n-dimenziós matematikai térben, ahol „n” számú adat tökéletesen definiál egy adott konformációt. Főlánc esetén ez az összes torziós szög adata lenne. Egy ilyen térben minél hasonlóbb két konformáció, annál kisebb a hozzájuk rendelt pontok egymástól való távolsága. A valóságban ugyan nem tudnánk megtenni, de az illusztrálhatóság kedvéért ábrázoljuk az egyes konformációkhoz tartozó pontokat egy háromdimenziós térben elhelyezkedő felületen.

A Levinthal paradoxonban nem szerepelt az a gondolat, hogy minden egyes konformációhoz tartozik egy szabadentalpia érték. Ebben az ábrázolásban legyen ez is egy független adat. Kérdés, hogy milyen alakzat szemlélteti legjobban az eddig összegyűlt ismereteket.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.27. ábra: A folding tölcsér. A folding tölcsért a feltekeredés termodinamikai hátterének illusztrálására vezették be, ennek részleteit lásd a főszövegben.

Az egyik ismeret, hogy a **natív szerkezet** a **legalacsonyabb szabadentalpia szint**ű szerkezet. A háromdimenziós térben a függőleges tengely (a – mint látni fogjuk – tölcsérszerű képződmény magassága) feleljen meg a szabadentalpia szintnek. Az alakzatunknak tehát kell, hogy legyen egy legalsó pontja, ami a natív állapotnak felel meg.

Teljesen rendezetlen, teljesen letekeredett konformációs állapot csillagászati számú lehet, és ezekhez tartozik a legmagasabb szabadentalpia érték. Tehát az alakzatnak kell, hogy legyen egy maximális magassága, amelyhez maximális számú pont tartozik. A két véglet között részben rendezetett szerkezetű, köztes szabadentalpia szinten lévő állapotok tartoznak majd. Az egyre alacsonyabb szabadentalpia szintekhez egyre kevesebb konformációs állapot, tehát egyre kevesebb pont tartozik.

Ezek a kritériumok együttesen egy tölcsérszerű felületet eredményeznek (lásd **5.27. ábra**). A **függőleges tengely**, mint említettük, a **szabadentalpia szint**et jelzi. Minden szabadentalpia szintnél elmetszhetjük a tölcsért egy vízszintes síkkal. Az így kapott zárt alakzat kerülete (a **tölcsér kerülete**) reprezentálja a **konformációs entrópiá**t. A tölcsér tetején a kerület maximális, jelezve, hogy a teljesen letekeredett állapotokból van a legtöbbféle, ezek rendelkeznek együttesen a legnagyobb konformációs entrópiával.

Ebben az ábrázolásmódban a feltekeredés folyamata úgy illusztrálható, hogy egy-egy teljesen letekeredett állapothoz tartozó pont mintegy „legurul” a tölcsér aljára. A pont lefelé haladása természetesen konformációs állapotok során történő áthaladást jelent. A feltekeredést a csökkenő szabadentalpia szint hajtja. Emlékezzünk vissza, spontán folyamatnál a rendszer szabadentalpiája csökken, ez hajtja a folyamatot. A tölcsér pereméről rendkívül sokféle útvonalon haladhat lefelé a pont, de ahogy egyre lejjebb jut, az általa reprezentált feltekeredő polipeptidlánc egyre kevesebb fajta konformáció közül választhat. Ezt jelzi az alakzat egyre szűkülő, tölcsér alakja.

Az **5.27. ábra** jobb oldalán szereplő összetettebb kép azt is mutatja, hogy a tölcsér felszínén „hegyek”, és „gödrök” lehetnek. A hegyek olyan szabadentalpia gátakat illusztrálnak, amiken akadályozott az átjutás. Ezek lassítják a feltekeredést. A **gödrök lokális szabadentalpia minimumok**at illusztrálnak, amikben hosszabb-rövidebb időt eltölthet a polipeptidlánc. Az itt lévő pontok ideiglenesen felszaporodó, részben rendezett állapotú szerkezeteket, szakszóval **folding intermedier**-eket reprezentálnak.

Ez az elegáns leírás nagyban segíti, hogy el tudjuk képzelni, mit jelenhetnek a feltekeredési útvonalak, vagy a folding intermedierek, de nem részletezi a feltekeredés molekuláris mechanizmusát. Ezzel kapcsolatban csak röviden megemlítjük, hogy a **folding mechanizmusá**ra alapvetően két fő, egymásnak ellentmondó elmélet született. Az egyik a **vázszerkezet-modell** (*framework model*), a másik a **hidrofób összeomlás modell** (*hydrophobic collapse model*).

A vázszerkezet modell szerint a feltekeredés viszonylag korai szakaszában létrejönnek a natív állapotra jellemző másodlagos szerkezeti elemek, majd ezek egymással másodlagos kölcsönhatásokba lépve alakítják ki a natív

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szerkezetet a hidrofób maggal. A hidrofób összeomlás modell szerint a sorrend fordított, a feltekeredés egyik korai szakaszában kialakul egy hidrofób mag (az ebben az állapotban lévő szerkezetet ***moltenglobule***-nak, „megolvadt gombócnak” nevezik), majd ezek után alakulnak ki a másodlagos szerkezeti elemek.

5.6. A fehérjék negyedleges szerkezete

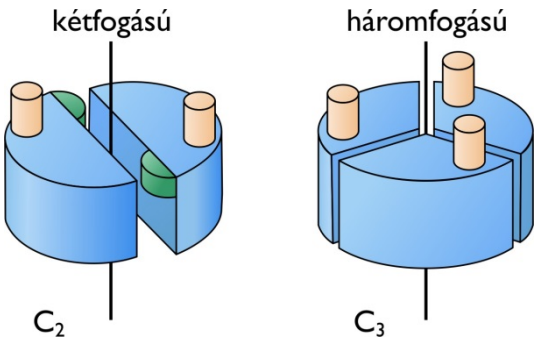
Az ismert szerkezettel bíró globuláris fehérjéknek csak mintegy fele áll egyetlen polipeptidláncból, a fehérjék másik fele több-alegységes. A **több-alegységes fehérjék** szerkezetének jellemzésére vezették be a **negyedleges szerkezet** fogalmát. Azonos alegységek esetén homo-oligomer, különböző alegységeknél hetero-oligomer fehérjékről beszélünk. Az alegységek száma szerint a fehérje lehet dimer, trimer, tetramer, stb. Az oligomer legkisebb olyan egységét, amelyből a többi egység forgatásokkal levezethető, **protomer**nek hívják. Ez homodimereknél egyetlen lánc, hetero-oligomereknél több különböző peptidlánc.

Az egyes protomerek egymáshoz képesti térbeli elhelyezkedése különböző szimmetriákkal adható meg.

A szimmetria természetesen soha nem tükörképi, hiszen a fehérjék királis szerkezetűek. Egy fehérje tükörképi párja csupa D-aminosavból állna. A szimmetriák tehát **mindig forgásszimmetriák**.

A legegyszerűbb eset a ciklikus szimmetria esete. Ebben az esetben a protomerek egyetlen tengely körüli elforgatással átvihetők egymásba (lásd **5.28. ábra**).

A kétfogású szimmetria esetében a szimmetriatengely körül 360 fok / 2, azaz 180 fokos elfordítás viszi fedésbe a protomereket, háromfogású szimmetria esetén 120 fok, n-fogású esetén 360/n fokos. Ezekben az esetekben magát a tengelyt is rendre kétfogásúnak, háromfogásúnak, n-fogásúnak nevezzük. A ciklikus szimmetriát C betűvel jelezzük. Azt, hogy hány fogású a tengely, alsó indexben jelezzük (pl. C_2, vagy C_3).

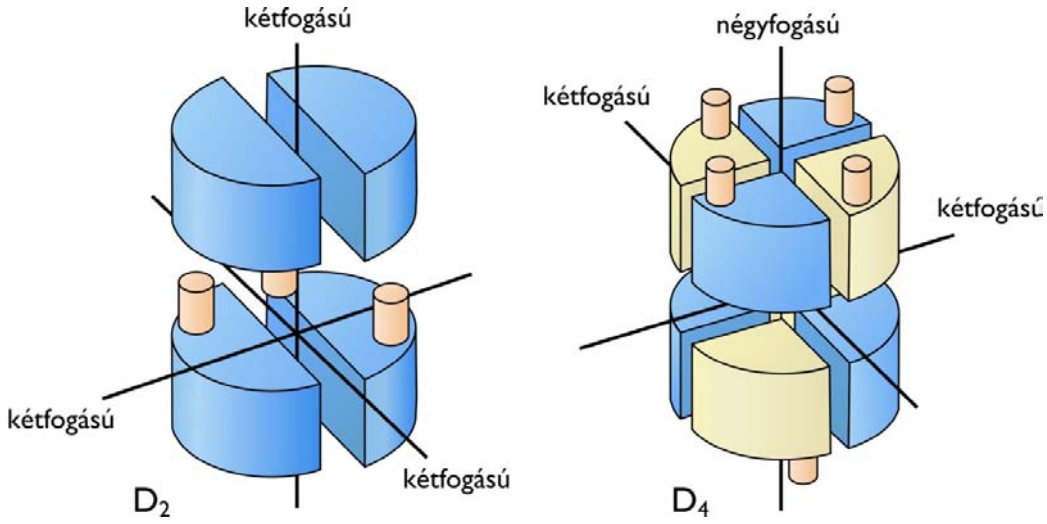


5.28. ábra: Két, ciklikus szimmetriájú negyedleges szerkezet. Ciklikus szimmetria esetén az egyes protomerek egyetlen tengely körüli elforgatással fedésbe hozhatók egymással

Ennél összetettebb a diéderes szimmetria. Ennél minden protomer átforgatható bármelyik másikba legfeljebb két különböző tengely körüli forgatással. A két tengely közül az egyik mindig kétfogású (lásd **5.29. ábra**).

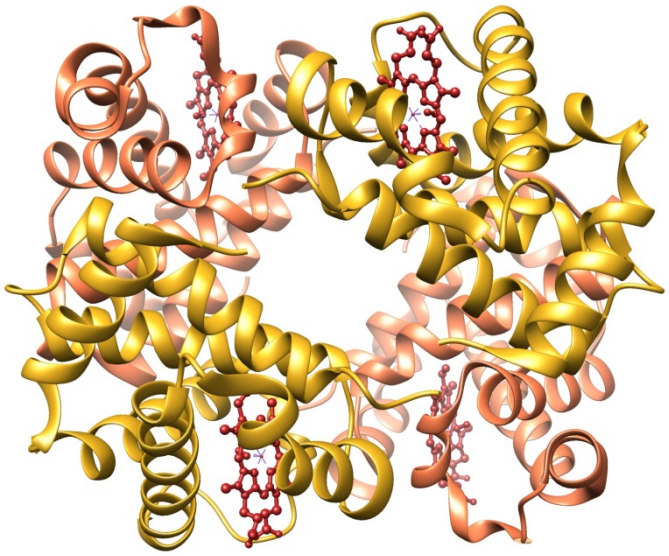
Az **5.29. ábra** két példát mutat be diéderes szimmetriára. Az egyik esetben mindegyik tengely kétfogású, (a szimmetria jele D_2) a másik esetben két tengely kétfogású, a harmadik négyfogású (jele D_4).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



5.29. ábra: Két, diéderes szimmetriájú negyedleges szerkezet. Diéderes szimmetria esetén egynél több szimmetriatengely van. Minden protomer átforgatható bármelyik másikba legfeljebb két különböző tengely körüli forgatással. A két tengely közül az egyik mindig kétfogású

A hemoglobin pl. egy heterotetramer, ami $\alpha_2\beta_2$ láncokból áll. Egyetlen αβ pár alkot egy protomert, amiből a ciklikus szimmetria miatt egyetlen kétfogású tengely körüli elforgatással megkapjuk a másik protomert, tehát a hemoglobin C_2 szimmetriával bír (lásd **5.30. ábra**).



5.30. ábra: A hemoglobin C_2 szimmetriájú negyedleges szerkezete (PDB: 1A3N)

5.6.1. A negyedleges szerkezet lehetséges előnyei

Az, hogy a több-alegységes szerkezet az evolúció során kialakult, és a fehérjék kb. fele esetében jelen van, arra utal, hogy a **negyedleges szerkezet** valamilyen előnyökkel járhat.

Az egyik ismert jelenség, amely leginkább a több-alegységes fehérjékre jellemző, az **allosztérikus szabályozás**. Ez a szabályzás mindig kölcsönhatást szabályoz, legyen az fehérje-ligandum, vagy enzim-szubsztrát kölcsönhatás. Amikor az egyik alegység ligandumot (vagy szubsztrátot) köt, akkor ezzel megváltoztatja a többi alegység ligandum-kötő (vagy szubsztrátkötő) tulajdonságát. Az allosztérikus szabályozásról később részletesen is szó esik (lásd **17.2. fejezet**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A több-alegységes szerkezeti forma egy másik előnye, hogy általa az evolúció a korábbinál nagyobb hatékonysággal lett képes létrehozni új fehérjéket. Egy-egy már meglévő fehérje apró megváltozása helyett (mellett) lényegileg eltérő módon keletkezhettek új fehérjék azáltal, hogy egy-egy fehérje eredeti önállóságát elvesztve alegységként számos más fehérje részévé vált.

Jó példa erre egy eukarióta intracelluláris fehérje, a kalmodulin, amely Ca^{2+}-ionokat köt (lásd **5.9. ábra**). Ez a fehérje tulajdonképpen egy kalciumion szenzor a sejtben. A kalciumion jelátvivő anyag. Amikor a sejten belüli Ca^{2+} koncentráció megemelkedik, a kalmodulin Ca^{2+}-ot köt, és jelentős konformációváltozáson megy át. Megjelenik rajta egy hidrofób felület, amelyen keresztül Ca^{2+}-kötött állapotában képes számos fehérjéhez kötődni, és megváltoztatni azok funkcióját (lásd **17.1. fejezet**). Ugyanakkor a kalmodulin stabil, állandó alegysége is számos fehérjének. Ezekben a fehérjékben szintén Ca^{2+}-érzékelőként működik, de mint alegység. A Ca^{2+} -kötés hatására konformációt változtat, és megváltoztatja annak a több-alegységes fehérjének a konformációját is, amelynek maga is része.

Jó példa erre a glikogén anyagcsere szabályozásában fontos foszforiláz-kináz enzim, amely a kalmodulin alegységén keresztül érzékeli a sejtben lévő Ca^{2+}-szintet. Magas Ca^{2+} -szint esetén aktiválódik és foszforilálja a glikogén-foszforiláz enzimet, amely ezáltal aktiválódik, és elkezdi mobilizálni a sejt glikogénraktárát.

Az alegységek többféle fehérjében történő felhasználása jó példája az élő szervezet **moduláris építkezés**ének. Érdemes észrevenni, hogy ennek analógiájára a modern ipar is hasonló módon hoz létre új termékeket, amikor jól bevált modulokat kombinál ahelyett, hogy „egymodulos” termékeket alakítgatna.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6. fejezet - Fehérjék izolálása és fehérjevizsgáló módszerek

(szerző: Pál Gábor)

Miután megismerkedtünk a fehérjék legalapvetőbb tulajdonságaival, nézzük át, hogyan lehet fehérjéket homogén formában izolálni, illetve hogyan lehet a fehérjék egyes fontos tulajdonságait meghatározni. Ezek az ismeretek megkönnyítik majd annak megértését, hogy a későbbi fejezetekben bemutatott ismeretanyagot vajon milyen módon tárhatták fel a kutatók.

6.1. A spektroszkópia alapjai

Mielőtt a fehérjék izolálásának témakörét tárgyalnánk, ismerkedjünk meg a legalapvetőbb vizsgálati módszer, a spektroszkópia alapjaival.

Az elektromágneses sugárzás rendkívül sokféle formában használható fel anyagvizsgálatokra. Ezek a vizsgálatok a spektroszkópia területére esnek. Mint már láttuk, a rendkívül kis hullámhosszú röntgensugár, és a rendkívül nagy hullámhosszú rádiófrekvenciás sugárzás egyaránt felhasználható molekulák térszerkezetének meghatározásához (lásd röntgendiffrakció és mágneses magrezonancia az **5.1. fejezet**ben).

A fent említett sugárzásoktól eltérően a ~190-320 nm illetve a ~320-800 nm hullámhossz tartományba eső elektromágneses sugárzás, vagyis az **ultraibolya (UV)** és a **látható (VIS)** tartományba eső fény abban az energiatartományban van, amellyel az atomok és molekulák külső héján lévő elektronok jól gerjeszthetőek.

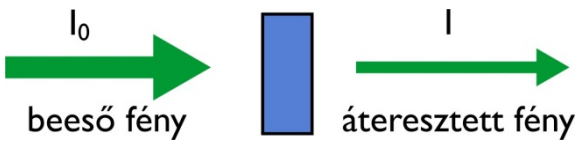
Az elektrongerjesztés miatti fényelnyelés mérésén alapuló **spektrofotometria** a legalapvetőbb spektroszkópiai módszer.

Azok az anyagok, amelyek a látható tartományban nyelnek el fényt, színesek. A központi fontosságuk miatt a biokémia által legtöbbet vizsgált fehérjék zöme, és a nukleinsavak nem ilyenek. Ugyanakkor ezek az anyagok karakteres fényelnyelést mutatnak az UV tartományban.

A fényelnyelés egy rendkívül alapvető eljárás mind minőségi, mind mennyiségi meghatározások esetében. A fényelnyelés hullámhossz-függése, vagyis az elnyelési spektrum jellemző arra az elektronszerkezetre, amelyet a fény gerjeszt. Az elnyelési spektrum tehát függ az anyagminőségtől, ezért minőségi anyag-meghatározásra használható. Az elnyelés mértéke ugyanakkor függ a fényt elnyelő anyag mennyiségétől, ami pedig mennyiségi meghatározásokat tesz lehetővé.

A fényelnyelés mértékét két, egymással összefüggő módon szokás kifejezni. Az egyik a transzmisszió, *T* (áteresztés), a másik az extinkció, *E* (kioltás, megszűnés), vagy ennek másik megnevezése az abszorbancia, *A* (elnyelés).

Vegyünk egy monokromatikus, azaz egyetlen, konkrét hullámhosszal jellemezhető I_0 intenzitású fénynyalábot, ami haladjon át a vizsgált mintán (lásd **6.1. ábra**).



6.1. ábra: A spektrofotometria a fényelnyelés mérésén alapul

Belátható, hogy az (eredetivel azonos hullámhosszú) áthaladó fény I intenzitása vagy megegyezik a beeső fény intenzitásával (ha a mintában lévő elektronok nem gerjesztődnek, tehát a minta nem nyel el), vagy kisebb annál (ha a minta a fény egy részét elnyeli).

A **transzmittancia**, *T* (áteresztőképesség) azt mutatja meg, hogy a minta a beeső fény hanyadrészét engedi át. A transzmittancia definíció szerint az alábbi egyenlettel írható le:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$T = \frac{I}{I_0}$$ **6.1. egyenlet**

A *T* értéke az 1 (nincs fényelnyelés) és a 0 (minden fény elnyelődik) tartományban van. Használatos a *T*% mértékegység is, amely százalékban fejezi ki az áteresztőképességet:

$$T(\%) = 100 \times \frac{I}{I_0}(\%)$$ **6.2. egyenlet**

A fényelnyelés jelensége egy másik, mint látni fogjuk hasznosabb matematikai formában is kifejezhető az **extinkció** (más néven **abszorbancia**), *E* fogalmával. Definíció szerint:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$ **6.3. egyenlet**

Az extinkció egy **dimenzió nélküli mérőszám**. Ha nincs fényelnyelés, akkor az *E* értéke nulla. Ha a fény egytizede megy át a mintán, akkor az *E* értéke 1, ha 99% nyelődik el, akkor az *E* = 2.

Az extinkció és a transzmittancia kapcsolatát az alábbi egyenlet írja le:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log_{10} \frac{1}{T} = -\log_{10} T$$ **6.4. egyenlet**

Ugyanez az extinkció és a százalékos transzmittancia kapcsolatát az alábbi egyenlet írja le:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log_{10} \frac{1}{T} = \log_{10} \frac{1}{\frac{T(\%)}{100}} = \log_{10} \frac{100}{T(\%)} = 2 - \log_{10} T(\%)$$ **6.5. egyenlet**

A **6.1. táblázat** számokban mutatja be a fényelnyelés és a százalékos fényáteresztő képesség viszonyát.

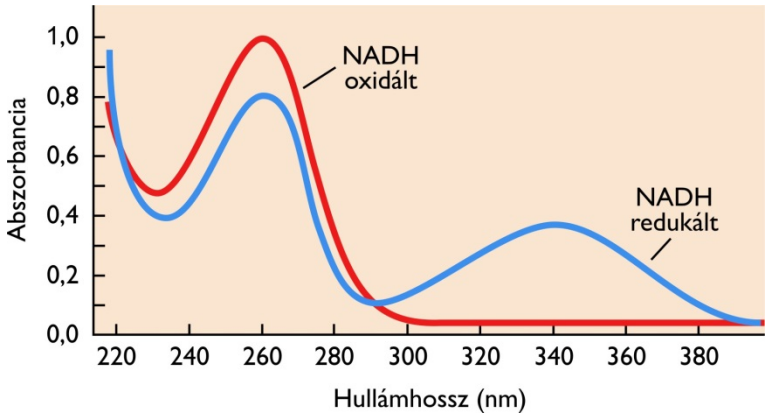
6.1. táblázat: Egyes abszorbancia értékek, és a hozzájuk tartozó százalékos transzmittancia

A	T %
0,01	98%
0,1	79%
0,5	32%
1	10%
2	2,5%
3	1%

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.1.1. Minőségi meghatározás: spektrumok

Amennyiben az extinkció értékét megmérjük és ábrázoljuk a hullámhossz függvényében, **spektrum**ot kapunk. Egy homogén anyag spektruma jellemző az elnyelést okozó anyag elektronszerkezetére, tehát magára az anyagra. Az adott anyag minden olyan változása, amely érinti az elektronszerkezetet, spektrális változással jár, így kimutatható. Jó példa erre a NAD koenzim oxidált és redukált állapotainak eltérő spektruma (lásd **6.2. ábra**; lásd még **20.16. ábra**).



6.2. ábra: A NAD koenzim redukált és oxidált formája jellegzetesen eltérő spektrumot ad.

Az oxidált és a redukált forma egyaránt rendelkezik egy adenin gyűrűvel, emiatt mindkét formának van 260 nm közelében egy elnyelési csúcsa. A redukált forma azonban egy 340 nm körüli extra csúccsal is rendelkezik, ami a redukció következményeként megjelenő, a nikotinsavamid részletet érintő kinoidális szerkezetnek köszönhető.

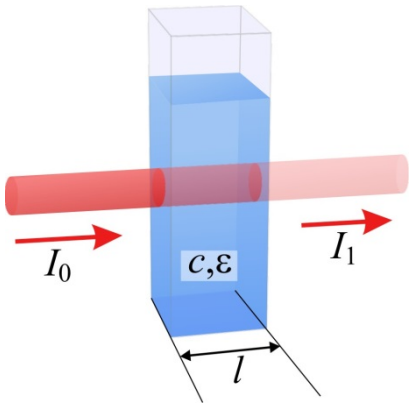
Az aminosavak közül a triptofán, a tirozin és a fenilalanin például UV tartományban jellegzetes spektrummal rendelkeznek, 280 nm környékén maximális elnyelést mutatnak. A fehérjék túlnyomó többségében jelen vannak ezek az aminosav csoportok, így a fehérjék túlnyomó többségének 280 nm körül elnyelési maximuma van. A fehérjék 220 nm körül is komoly elnyelési csúccsal rendelkeznek. Ez a peptidkötésnek tulajdonítható.

A nukleinsavak a **pirimidin** és **purin bázisok** miatt **260 nm** környékén rendelkeznek abszorpciós maximummal, ezt az adenin részlet elnyelése révén már a NAD/NADH spektrumával kapcsolatban (lásd **6.2. ábra**) már említettük.

6.1.2. Mennyiségi meghatározás: a Lambert-Beer törvény

A **Lambert-Beer törvény** kapcsolatot teremt az extinkció, és a fényelnyelést okozó anyag koncentrációja között.

A mérés során az anyag *c* koncentrációjú oldatát egy mintatartó edénybe, küvettába helyezzük. A küvetta anyagát úgy kell megválasztani, hogy az ne nyeljen el a mérésben használt hullámhosszon. A küvetta fény irányával megegyező kiterjedése megadja a fényutat (*l*). A küvettát egy spektrofotométer készülékbe helyezzük. A készülék méri a beeső fény I_0, és az áteső fény I intenzitását, és kiszámítja az extinkció értékét (lásd **6.3. ábra**)



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.3. ábra: Oldott anyagok abszorbanciája arányos az anyag koncentrációjával, és a fényút hosszával

A Lambert-Beer törvény szerint egy fényelnyelő anyag oldatkoncentrációja, és az oldat extinkciós értéke között lineáris összefüggés áll fenn az alábbi egyenlet szerint:

$$E = \varepsilon \times c \times l$$ **6.6. egyenlet**

ahol *E* az extinkció, *c* az oldott anyag koncentrációja, *l* a fény küvettában megtett útja cm mértékegységben, míg ε az extinkciós együttható (koefficiens). Az ε pontos megnevezése és mértékegysége a koncentráció mértékegységéhez igazodik. A koncentrációt leggyakrabban molaritásban (M) adjuk meg. Ilyenkor az ε-t moláris extinkciós együtthatónak nevezzük, mértékegysége M^{-1} x cm^{-1}.

Az ε számértéke megegyezik a vizsgált anyag 1 mólos oldatának extinkciójával, ha a fényút 1 cm. (Ez természetesen egy elméleti érték, a valóságban egy fényelnyelő anyag 1 mólos oldatának elnyelési értéke olyan magas lenne, hogy az nem lenne mérhető).

Az egyenletből *c* értéke kifejezhető:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \times l}$$ **6.7. egyenlet**

A moláris extinkciós együttható és a fényút ismeretében tehát egy anyag koncentrációja megmérhető az extinkció meghatározásán keresztül.

A **Lambert-Beer egyenlet** érvényességének szigorú **feltételei** vannak: az összefüggés kizárólag monokromatikus fényre vonatkozik; az oldószer a méréshez használt hullámhosszon nem nyelhet el; a vizsgált anyag fizikokémiai állapota nem függhet a koncentrációjától (egyes anyagok például magasabb koncentrációban aggregálódnak).

A fotometria tehát egy rendkívül széleskörűen használható eljárás oldott anyagok azonosítására, és koncentrációjuk mérésére.

6.2. A sejtek feltárása és a fehérjék izolálása

A fehérjék természetes forrásból történő izolálásánál az első kérdés az, hogy az adott fehérje milyen szövetben fordul elő legnagyobb mennyiségben. Ez dönti el, hogy milyen szövetből induljunk ki. Fontos, hogy intracelluláris, extracelluláris (pl. vérben lévő) vagy membránfehérjéről van-e szó. Ha intracelluláris a fehérje, akkor fontos tudnunk, hogy melyik sejtalkotóban van jelen legnagyobb mennyiségben, hiszen akkor érdemes először azt a sejtalkotót izolálni. Azt a folyamatot, melynek során az eukarióta sejt egyes alkotóegységeit (pl. plazmamembrán, sejtmag, mitokondriumok) izoláljuk, sejtfrakcionálásnak nevezzük. Ennek során a sejteket feltárjuk, és az egyes fő sejtalkotókat egymástól különböző frakciókba különítjük.

6.2.1. A sejtek feltárása

A sejtek feltárásának részletes eljárása attól függ attól, hogy mi a kiindulási minta. Többsejtűek esetén a cél az, hogy a szövetet alkotó sejtek közötti kapcsolatot megszűntessük, az egyes sejtek sejtmembránja esetleg sejtfala (lásd növények, gombák) felszakadjon, a sejtek feltáródjanak.

Az eljárás során rendszerint olyan puffer oldatokat használunk, amelyek hasonlítanak a feltárandó minta natív körülményéhez. A mintát általában hűtjük, hogy lassítsuk a káros kémiai reakciókat, például a proteázok általi fehérjebontást, vagy a spontán oxidációt. A proteázok gátlására proteáz-inhibitor keveréket, az oxidáció kivédésére redukáló szereket is alkalmazhatunk. A mintában nehézfém ionok is lehetnek, amelyek komplexet képezhetnek egyes aminosav oldalláncokkal. Ennek kivédésére például etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) alkalmazunk, amely a nehézfém-ionokkal komplexet képez, és így megköti azokat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A két leggyakrabban alkalmazott sejtfeltáró módszer a **késes homogenizálás**, és az **ultrahangos feltárás**. A késes homogenizátor egy, a célra optimalizált „botmixer” jellegű készülék. Ezzel a készülékkel erős szerkezetű szöveteket is szét lehet roncsolni. Az ultrahangos sejtfeltárást inkább a már többé-kevésbé szétválasztott sejtek szuszpenziója esetén használatos. Az ultrahangot egy „**szonikátor**”-nak nevezett készülék állítja elő, amely a rezgéseket egy fém alkatrész segítségével vezeti a sejt-szuszpenzióba. Az ultrahangot rövid pulzusokban adagoljuk. A sejteket a hirtelen jelentkező nagy nyomáskülönbségekből adódó nyíróerők tárják fel.

Nyíróerőkön alapulnak mindazok az eljárások is, amelyeknél a sejt-szuszpenziót egy szűk keresztmetszetű térrészen keresztül préselik át nagy nyomást alkalmazva. Ennél a módszernél az alacsony-nyomású térrészbe jutó sejtek a hirtelen nyomásesés miatt szinte felrobbannak. Szintén a nyíróerőket alkalmazzák azok a sejtfeltárók, amelyeknél a sejt szuszpenziót egy olyan hengerbe teszik, amelyben egy, a henger átmérőjénél éppen csak kisebb átmérőjű dugattyút mozgatnak. A henger és a dugattyú fala közötti, a sejteknél csak alig nagyobb térrészben a nyíróerők miatt a sejtek feltáródnak.

Különösen ellenálló, például sejtfallal rendelkező növényi sejtek esetében kvarcszemcsék segítségével, ill. folyékony nitrogénban való lefagyasztás utáni dörzsmozsaras feltárást is alkalmaznak. Ezzel szemben a rendkívül sérülékeny vérsejtek esetében a feltáráshoz elegendő az is, ha a sejteket hipozmotikus oldatba helyezzük. Sejtfal hiányában ezek az egyedi sejtek a hirtelen beáramló víz miatt kipukkadnak.

6.2.2. Sejtfrakcionálás

A sejtfrakcionálás fő célja az, hogy a feltárt sejtek egyes alkotóit egymástól elkülönítsük, izoláljuk. A frakcionálást megelőző sejtfeltárás módszerének intenzitását ennek megfelelően optimalizálni kell. A sejtfeltárás kellően intenzív kell, hogy legyen, hogy a sejtek jelentős része feltáródjon, de ugyanakkor fontos, hogy a sejtalkotók zöme ép állapotban maradjon. A sejtek feltárása során a plazmamembrán szétesik, és kis membrán határolt részecskéket, vezikulákat képez. Ezek, és a többi sejten belüli organellum, illetve a citoszól oldott fehérjéi és egyéb anyagai alkotják azt a **homogenátum**ot, amelyből az egyes frakciókat izoláljuk. Az egyes frakciók elválasztásának fő módszere a centrifugálás, ezért a következőkben ennek alapelvét és fő eljárásait ismertetjük.

6.2.3. Centrifugálás

Ha egy objektumot fonálon tartva pörgetünk, a fonalat húznunk kell ahhoz, hogy a test körpályán maradjon. Ezáltal akadályozzuk meg, hogy a test egy érintő egyenes mentén, egyenes vonalú egyenletes mozgást végezzen. Az az erő, amivel a tengely felé húzzuk fonalat, a centripetális erő. Az ezzel éppen ellentétes irányú, a test tehetetlenségéből fakadó fiktív erő, amellyel a test a fonálon keresztül húzza a kezünket, a centrifugális erő (F_c).

Az egyszerűség kedvéért az oldatok **centrifugálása** során lezajló folyamatokat az F_c erővel szokták leírni.

Az ismert Newton-féle alapegyenlet szerint:

$$F = m \times a$$ **6.8. egyenlet**

Centrifugálás során a gyorsulás a szögsebesség négyzetének és a sugárnak a szorzata:

$$a = \omega^2 \times r$$ **6.9. egyenlet**

A fiktív centrifugális gyorsító erő, F_c vákuumban tehát:

$$F_c = m \times \omega^2 \times r$$ **6.10. egyenlet**

A sugár és a szögsebesség-négyzet szorzata nem más, mint a centrifugálás során jelentkező gyorsító potenciál. Ezt hagyományosan (és talán kissé megtévesztő módon) a földi gravitációs térerőből fakadó nehézségi gyorsulás (g)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

arányában adják meg. Tehát a centrifugában ébredő gyorsulási potenciál mértékét úgy adják meg, hogy az hányszorosa a g értéknek.

Ennek a jelölésmódnak az indoka az, hogy a részecskék a földi gravitáció miatt is ülepednek. A centrifugálás során is ülepítjük a részecskéket, de ekkor a gravitációból eredő gyorsító potenciálnak sokszorosát, akár több százezerszeresét is el tudjuk érni. Ez a fajta leírás tehát azt mutatja meg, hogy a centrifugálással hányszor hatékonyabban ülepítünk a Föld gravitációs potenciáljához képest.

Amikor oldatokat centrifugálunk, akkor az oldatban lévő részecskék vákuum helyett egy adott sűrűségű közegben vannak. Természetesen erre a közegre is hat a centrifugális erő. Amennyiben a részecske sűrűsége éppen megegyezik a közeg sűrűségével, úgy a részecske a közeghez képes nem mozog, vagyis a sugárirányú elmozdulása nulla lesz. Ha a részecske sűrűsége nagyobb, mint a közegé, akkor sugár irányban elindul kifelé (miközben az általa kiszorított közeg a sugár felé halad), ha pedig a sűrűsége kisebb a közegénél, akkor elindul sugárirányban a tengely felé (miközben az általa kiszorított közeg kifelé halad).

Ennek a jelenségnek a leírását szolgálja a lebegési faktor bevezetése:

$$1 - \frac{\rho}{\rho_r}$$ **6.11. egyenlet**

ahol a tört számlálójában a közeg, a nevezőjében pedig a részecske sűrűsége szerepel.

A lebegési faktorral, mint szorzótényezővel kombinált egyenlet a következő:

$$F_c = m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right) \omega^2 \times r$$ **6.12. egyenlet**

Ebből az egyenletből jól látható, hogy a centrifugálás során az adott részecskére ható erő függ a részecske tömegétől, a közeghez viszonyított sűrűségétől, a szögsebességtől, és a tengelytől való távolságtól.

Ezek közül magára a részecskére jellemző tényezők, amelyek eltérő részecskék elválasztására adnak lehetőséget, a részecske tömege, és a sűrűsége. Mint látni fogjuk, két alapvető, centrifugáláson alapuló elválasztás létezik. Az egyik esetében a tömeg és a sűrűség egyfajta kombinációja alapján zajlik az elválasztás, míg a másik esetében kizárólag a sűrűség alapján.

Amint a részecskéket a centrifugálás során elkezdjük gyorsítani, és azok elkezdenek sugár irányban mozogni, a mozgó részecskére a vándorlásával ellentétes irányú, a sebességével (az itt jellemző alacsony sebességek esetében) egyenesen arányos mértékű közegellenállási erő (F_k) lép fel. Az arányossági tényező nem más, mint a közegellenállási együttható, *f*, amelynek értéke **Stokes törvény**e szerint függ a közeg viszkozitásától, és a részecske méretétől, illetve alakjától az alábbiak szerint:

$$f = 6 \times r \times \pi \times \mu$$ **6.13. egyenlet**

Ahol μ a közegre jellemző viszkozitás, gömb alakú részecskék esetében *r* pedig a részecske sugara. Nem gömb alakú részecskék esetében *r* a Stokes sugár, amely egy olyan gömb alakú részecske sugara, amely azonos diffúziós viselkedésű, mint a vizsgált, nem gömb alakú részecske. Érdemes észrevenni, hogy a részecskét mozgásában akadályozó közegellenállási tényező egyenesen arányos a részecske sugarával.

A centrifugálás folyamata során a részecske sebessége csak addig nőhet, amíg a mozgással ellentétes irányú, az ülepedési sebességgel arányos, a részecskét lassító F_k erő értéke éppen eléri a részecskét gyorsító F_c erő értékét. Egy igen rövid idő elteltével a két ellentétes irányba ható erő értéke tehát megegyezik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$F_c = F_k = f \times v$$ **6.14. egyenlet**

A részecske emiatt adott, rá jellemző, állandó sebességgel vándorol. (Egyébként egy másfajta gyorsító erő, de azonos jellegű közegellenállási erő hatására kialakuló analóg jelenséget láthatunk az elektroforézis esetében is.) Az előző egyenletbe behelyettesítve az F_c erőt leíró összefüggést, az alábbi egyenletet kapjuk:

$$f \times v = m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right) \times \omega^2 \times r$$ **6.15. egyenlet**

Ha a fenti egyenletet úgy rendezzük át, hogy a részecske sebességét elosztjuk a centrifuga által létrehozott gyorsító potenciállal, akkor egy, a részecske ülepíthetőségére vonatkozó hasznos adatot kapunk. Ez az 1/s (reciprok másodperc) mértékegységű adat jellemzi, hogy egységnyi gyorsító potenciálra a részecske mekkora ülepedési sebességgel reagál. A részecske ülepíthetőségét a szedimentációs együtthatóval lehet jellemezni, amely Theodor Svedberg nyomán a **Svedberg együttható** elnevezést kapta:

$$S = \frac{v}{\omega^2 \times r} = \frac{m \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right)}{f} = \frac{M \times \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r}\right)}{Nf}$$ **6.16. egyenlet**

Az egyenlet számlálójában szerepelnek mindazon tényezők, amelyek pozitív módon befolyásolják az ülepíthetőséget. Minél nagyobb a részecske tömege, és minél nagyobb a közeghez viszonyított sűrűsége, annál nagyobb sebességgel ülepedik egységnyi gyorsító potenciálra vonatkoztatva. Egy adott sűrűségű részecske tömege természetesen egyenesen arányos a részecske térfogatával, más szóval egyenesen arányos a részecske sugarának a harmadik hatványával.

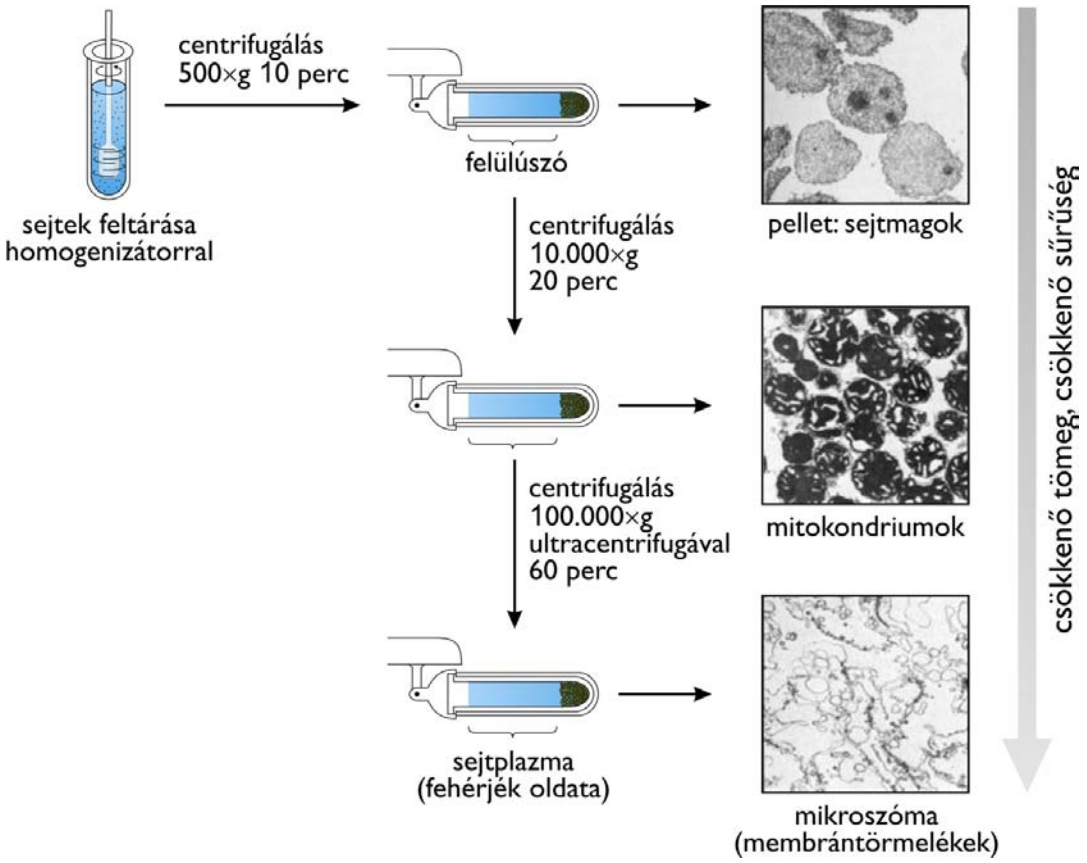
A nevezőben szerepel az a tényező, amely negatív értelemben befolyásolja az ülepíthetőséget. Minél nagyobb a közegre és részecskére közösen jellemző közegellenállási együttható, annál kisebb sebességgel reagál a részecske egységnyi gyorsító potenciálra. Mint láttuk, a közegellenállási együttható egyenesen arányos a részecske sugarával. Mivel a gyorsító erő a részecske sugarának harmadik hatványával, míg a lassító erő a részecske sugarának csak az első hatványával arányos, így végső soron a részecske sebessége a sugár négyzetével lesz egyenesen arányos. Azonos sűrűségű részecskék esetében tehát minél nagyobb egy részecske tömege, annál gyorsabban ülepedik, mégpedig egy négyzetes összefüggés alapján. Ezt használjuk ki a differenciál centrifugálás eljárás során.

6.2.3.1. Differenciál centrifugálás: sejtfrakcionálás részecske méret alapján

Az egyes sejtalkotók sűrűsége csak kis mértékben, míg méretük nagymértékben eltér. Így, bár a fent bemutatott esetben méret és sűrűség szerint egyaránt történik elválasztás, a méret szerinti elválás dominál.

A **differenciál centrifugálás**nak elnevezett eljárás során az egyes sejtalkotókat Svedberg értékeik szerint választjuk el egymástól. Szeparálási lépésenként egyre nagyobb gyorsító potenciált alkalmazunk. Egy-egy szeparálási lépésben tehát azt használjuk ki, hogy azonos gyorsító potenciálra az egyes sejtalkotók Svedberg értékeiknek megfelelően, egymástól eltérő sebességgel ülepednek. Adott gyorsító potenciál esetén adott időtartam alatt egyes sejtalkotóknak szinte teljesen, míg mások csak töredéke ülepedik ki (lásd **6.4. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.4. ábra: A differenciál centrifugálás eljárása

Differenciál centrifugálás során egymást követő centrifugálási lépéseket alkalmazunk. Az egymást követő centrifugálások rendre egyre nagyobb fordulatszámon zajlanak. Az első centrifugálásnál csak a legnagyobb tömegű, illetve legnagyobb sűrűségű sejtalkotók ülepednek ki az adott centrifugálási idő alatt. Az első lépésből származó felülúszót a második lépésben tovább centrifugáljuk, immár magasabb fordulatszámon. Ezt a sémát követve az egymást követő centrifugálásokban rendre az egyre kisebb tömegű, illetve kisebb sűrűségű sejtalkotókat ülepítjük ki.

Egy tipikus protokoll a következőképpen néz ki. A feltárt sejt homogenátumot először viszonylag alacsonynak számító, 500 g gyorsító potenciállal centrifugáljuk 10 percig. Ilyen körülmények esetén és ilyen rövid idő alatt a centrifugacsőben csak a legnagyobb Svedberg értékű részecskék, a feltáratlan sejtek, és a sejtmagok ülepednek le. Az összes többi sejtalkotó jóval lassabban ülepedik, ezért legnagyobb hányaduk még a szuszpenzióban marad.

A felülúszót áttöltjük egy másik centrifuga csőbe, és újra centrifugálunk 20 percig, de most már nagyobb sebességű centrifugában 10.000 g gyorsító potenciállal. Ilyen körülmények között, és ennyi idő alatt már kiülepednek a sejtmagnál kisebb Svedberg értékű mitokondriumok, lizoszómák és peroxiszómák, de számos komponens továbbra is a szuszpenzióban marad.

A felülúszót egy újabb csőbe áttöltve ultracentrifugában folytatjuk az ülepítést, ahol 100,000 g gyorsító potenciál alkalmazásával 1 óra alatt kiülepedik az úgynevezett mikroszóma frakció. Ez döntően a sejtfeltárás során az endoplazmatikus retikulumból lefűződő 50-150 nanométer átmérőjű vezikulákat, és egyéb ebbe a mérettartományba eső sejtalkotókat tartalmazza. A szuszpenzióban jellemzően makromolekulák, és egyes szupramolekuláris komplexek maradnak.

Még ennél is nagyobb, több százezer g gyorsító potenciál esetén kiülepíthetők a riboszómák, illetve a nagyméretű fehérjék is.

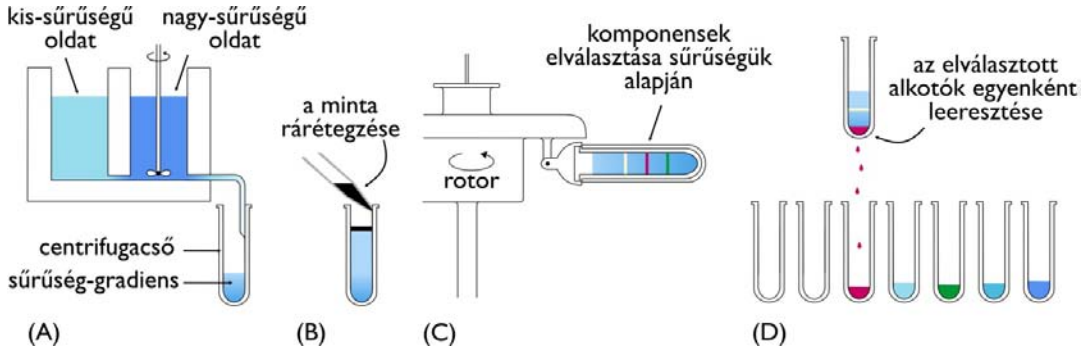
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.2.3.2. Sűrűséggradiens centrifugálás: sejtfrakcionálás részecske sűrűség alapján

A fent említett eljárás során - első megközelítésben - homogén sűrűségű közegben zajlik a centrifugálás. Fontos hangsúlyozni, hogy itt a sűrűség kifejezés a tömeg per térfogat értelemben vett sűrűséget jelenti, és nem valamely nem szaknyelvi viszkozitás jellemzőt. Mielőtt a sűrűséggradiens centrifugálás elvét ismertetnénk, érdemes megemlíteni, hogy a fent tárgyalt differenciál centrifugálásnál is alkalmazhatnak változó sűrűségű közeget, de ezekben az esetekben a sűrűséggradiens alacsony mértékű, és csak arra szolgál, hogy az egymástól éppen elváló sejtalkotók rétegei kevésbé tudjanak folyadékáramlás által összekeveredni.

A **sűrűséggradiens centrifugálás** során a centrifugacsőben egy olyan közeget hoznak létre, amelynek a sűrűsége a centrifugacső alja felé haladva meredeken növekszik. Ezt valamilyen nagy sűrűségű anyag, például cézium klorid (CsCl) használatával érik el. A csőbe úgy töltenek CsCl tartalmú oldatot, hogy a betöltést magas CsCl koncentrációjú oldattal kezdik, de a betöltött oldat CsCl koncentrációja a betöltött térfogat függvényében egyenletesen csökken. Az így kialakított közeg tetejére rétegezik az elválasztandó részecskéket tartalmazó oldatot (lásd **6.5. ábra**).

A mintát az alacsonysűrűségű felszínre rétegezzük. A centrifugálás során a részecskék ülepedni kezdenek. A cső alja felé haladva egyre nagyobb sűrűségű közegbe kerülnek. Minden részecske csak addig ülepedhet, amíg éppen eléri azt a közeg réteget, amelynek a sűrűsége éppen megegyezik a saját sűrűségével. Ekkor a részecske nem ülepedik tovább, hiszen a lebegési faktor értéke ekkor nulla, a részecskére nem hat eredő erő. Amint elmozdulna a nála nagyobb sűrűségű közeg fel, úgy a rotor tengelye (a centrifugacső teteje) felé ható erő visszafordítaná. Amint nála alacsonyabb sűrűségű közegbe kerülne, újra ülepedni kezdene. Ez a módszer tehát mérettől függetlenül, kizárólag sűrűség alapján választja el egymástól a részecskéket.



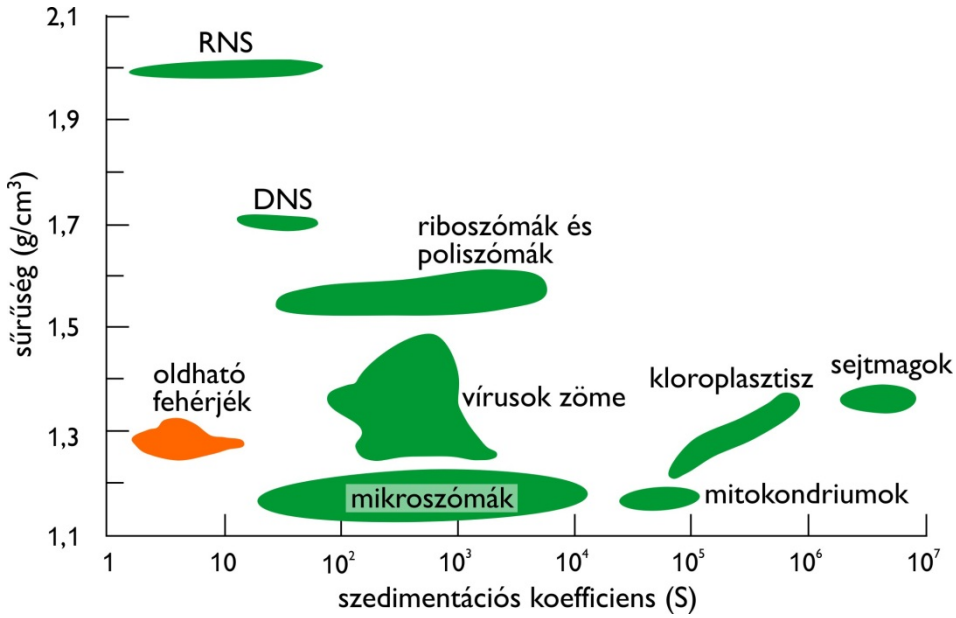
6.5. ábra: A sűrűséggradiens centrifugálás eljárása

Egyensúlyi módszerről van szó, amelynél az elválasztás során kialakul egy állandósult állapot. (Ebben a tekintetben ez a módszer érdekes analógiája az elektroforézis fejezetben ismertetett izoelektromos fókuszálásnak (IEF), amely ugyan teljesen más fizikai paraméter, a fehérjék izoelektromos pontja szerint, de szintén egyensúlyra vezető módon választja el térben az egyes komponenseket. Az IEF módszerben is gradienst alkalmaznak a közegben, csak ott éppenséggel a közeg pH értéke változik egy gradiens mentén.)

Érdemes megjegyezni, hogy a két fent említett centrifugálási eljárást, mivel azok némileg eltérő tulajdonságok szerint szeparálják az egyes részecskéket, a hatékonyabb izolálás érdekében kombinálni is lehet. Differenciál centrifugálást követően az egyes frakciókat tovább lehet komponenseikre választani sűrűséggradiens centrifugálással (lásd **6.6. ábra**).

Differenciál-centrifugálásnál elsősorban méret, sűrűséggradiens centrifugálásnál pedig kizárólag sűrűség alapján válnak el egymástól az egyes komponensek. A differenciál centrifugálás során együtt ülepedő, de sűrűségükben egymástól eltérő komponensek ezért egy második, immár sűrűséggradiens centrifugálás során egymástól elválaszthatók. A két eljárás egymás után végrehajtva ezért nagyobb elválasztó képességet biztosít, mint az egyes eljárások önmagukban.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.6. ábra: Az egyes sejtalkotók sűrűsége és szedimentációs együtthatója

6.2.4. Fehérjék durva frakcionálása

Miután az egyes sejtalkotókat frakciónként elválasztottuk, elkezdődhet a vizsgálni kívánt fehérje tisztításának folyamata. Ennek végére a vizsgálni kívánt **fehérjét homogén formában kell izolálnunk**. A homogén formában történő előállításhoz rendszerint számos, egymást követő tisztítási lépésre van szükség. Egy korábban még nem izolált fehérje esetében próba-szerencse alapú kísérletezgetés alapján születik meg az adott fehérjére optimalizált izolálási „recept”.

Az egymásra épülő tisztítási lépéseknél rendszerint a kisebb hatékonyságú, de alacsony költségű, és nagy mintatérfogatok illetve fehérjemennyiségek kezelésére alkalmas eljárásokkal kezdünk. Ezeket durva frakcionálási módszereknek is szokták nevezni. Az ilyen, elsősorban oldhatóságon, centrifugáláson, szűrésen alapuló eljárásokkal már előtisztított mintát szokták különböző kromatográfiás módszerekkel tovább tisztítani.

Az egyes fehérjéket eltérő fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján választjuk el egymástól. A fehérje saját tulajdonságai tekintetében leginkább a következő kérdések a fontosak. Milyen hőmérséklet és pH tartományban őrzi meg natív állapotát? Hol van az izoelektromos pontja? Mekkora a molekulatömege? Egy, vagy több alegységes? Ha több alegységes, akkor milyen az alegység szerkezete, mekkora a natív molekulatömege, és mekkora az egyes alegységek molekulatömege?

A hatékony izolálási eljárás kidolgozásához, a **tisztítási lépések folyamatos követésé**hez az is alapvető fontosságú, hogy az izolálni kívánt fehérjét más „szennyező” fehérjék jelenlétében is ki tudjuk mutatni, lehetőleg úgy, hogy egyben a mennyiségét is mérni tudjuk. Amennyiben enzimről van szó, úgy erre az enzimaktivitás mérése a legkézenfekvőbb, feltéve hogy van olyan kémiai reakció, amit az adott kiindulási mintában kizárólag az izolálni kívánt enzim katalizál.

Bizonyos feltételek teljesülése esetén (lásd később) a mért enzimaktivitás arányos lesz az esszébe bemért enzim mennyiségével. Ezáltal minden egyes tisztítási lépést követően meg tudjuk határozni, hogy a kiindulási mennyiségnek mekkora hányadát sikerült megőriznünk. A megőrzött mennyiséget elosztva a kiindulási mennyiséggel megkapjuk a **kitermelés értéké**t.

Ha a megőrzött enzim (általánosságban célfehérje) mennyisége mellett megmérjük a minta összes fehérjetartalmát is, akkor az enzim mennyiség / összes fehérje mennyiség arányt is meg tudjuk állapítani. Ha ezt összevetjük a tisztítási lépést megelőző (vagy a kiindulási mintára jellemző) enzim mennyiség / összes fehérje mennyiség aránnyal, akkor azt is megállapíthatjuk, hogy milyen mértékben dúsult a mintánk az izolálandó fehérje tekintetében. Amennyiben a további tisztítási eljárások már nem növelik a **dúsulás mértéké**t, az arra utalhat, hogy a mintánk már homogén, csak az izolálni kívánt enzimet tartalmazza.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Amennyiben az izolálni kívánt fehérje olyan enzim, amelyre nincs szelektív aktivitásmérő módszerünk, illetve a fehérje nem enzim, úgy a szelektív kimutatás alapja lehet egy, az adott fehérjére specifikus anyag (pl. receptor esetében a ligandum) kötődése is. Célszerű valamilyen spektroszkópiai módszerrel detektálható, például fluoreszcens csoporttal jelölt ligandumot használni.

Amennyiben specifikus ligandum sem áll rendelkezésre, úgy egyfajta általános megoldásként a ligandum helyett az izolálni kívánt fehérje ellen előállított, arra specifikus ellenanyag is használható (Western-blot eljárás). Végül, ha ilyennel sem rendelkezünk, de ismerjük az izolálandó fehérje molekulatömegét, akkor egy kevésbé specifikus, de általános módszerrel, SDS-PAGE eljárással követhetjük a tisztítás folyamatát.

A durva frakcionálási módszerek elsősorban oldhatósági és méret szerinti különbségeken alapulnak.

6.2.4.1. Oldhatóságon alapuló eljárások

A fehérjék oldhatósága alatt azt értjük, hogy az adott fehérjéből milyen mennyiséget képes az adott oldószer egységnyi térfogata oldatban tartani. Ezt leggyakrabban mg/ml mértékegységben szokták kifejezni. Az oldhatóság nagyban függ az oldószer összetételétől. Mielőtt ennek a részleteit tárgyalnánk, az oldhatóság kérdésénél fontos tisztázni, hogy natív, vagy denaturált fehérjék oldásáról van-e szó. A megértést zavaró durva leegyszerűsítés ugyanis az a hibás feltételezés, ami szerint a natív állapotú fehérje mindenképpen oldatban van, míg a denaturált fehérje mindenképpen kicsapódik az oldatból. Az alábbi ismertetésben elsőként a natív állapotú fehérjék oldhatóságáról lesz szó, később foglalkozunk a denaturálás témakörével is.

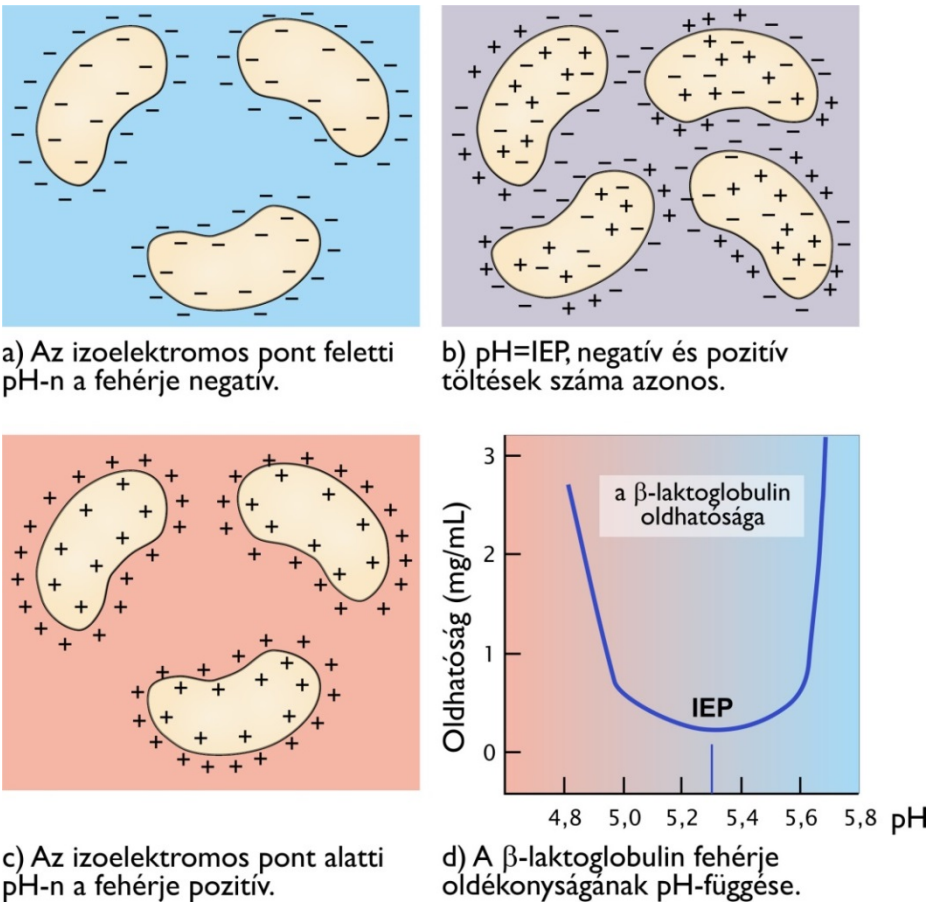
Az oldhatóság pH-függése

Leginkább az oldat pH-értéke és ionkoncentrációja befolyásolja a natív fehérje oldhatóságát. Az oldhatóság pH-függésével kapcsolatban ismert tény, hogy **a fehérjék oldhatósága izoelektromos pontjuknak (IEP) megfelelő pH értéken minimális**. Ez annak tulajdonítható, hogy ezen a pH értéken, a fehérjén éppen annyi negatív töltés van jelen, mint amennyi pozitív töltés. Emiatt az egyes fehérjemolekulák a lehető legkisebb mértékben taszítják egymást, miközben az azonos számú, ellentétes töltésű molekularészletek között létrejöhető molekulák közötti elektrosztatikus kölcsönhatások száma maximális (lásd **6.7. ábra**).

Az izoelektromos pont alatt a fehérjének nettó pozitív, a felett nettó negatív töltése van, az adott fehérje egyes molekulái tehát az izoelektromos ponttól eltérő pH értéken inkább taszítják egymást.

A minimális oldhatósági érték természetesen nem azt jelenti, hogy egy adott fehérje összes molekulája feltétlenül kicsapódik az IEP értékkel megegyező pH értéken. Az oldhatóság értékénél alacsonyabb fehérjekoncentráción a fehérjemolekulák mind oldatban lesznek, míg e feletti koncentráción egy egyensúly alakul ki, ahol az oldhatóságon felüli hányad reverzibilisen kicsapódik az oldatból. Ez a kicsapódás nem jelent denaturációt, a nem oldható hányad is natív konformációban van. Mindenesetre amennyiben natív állapotú fehérjéket szeretnénk kicsapni az oldatból, úgy érdemes a pH értéket a kicsapni kívánt fehérje IEP értékére állítani.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

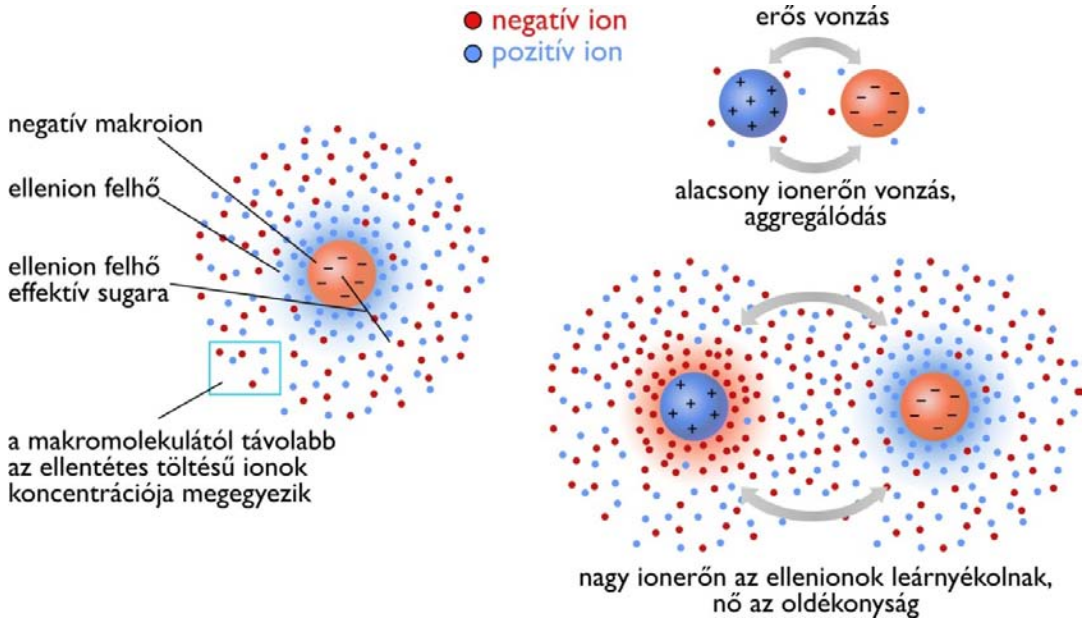


6.7. ábra: A fehérjék oldhatósága pH-függő, és az izoelektromos ponton a legkisebb mértékű

Az oldhatóság függése az ionkoncentrációtól

A fehérjék oldhatósága desztillált vízben alacsonyabb, mint olyan oldószerben, amely kis koncentrációban ionokat is tartalmaz. Amennyiben egy olyan ionmentes oldathoz, amelyben oldhatóság feletti mennyiségben vannak natív fehérjék, kis koncentrációban ionokat (sót) adagolunk, azt fogjuk tapasztalni, hogy a kicsapódott natív fehérjék is oldatba kerülnek. Ezt a jelenséget „**besózás**nak” (angolul *salting-in*) nevezik (lásd **6.8. ábra**). A kismennyiségben bevitt ionok tehát növelik a fehérjék oldhatóságát.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.8. ábra: Egy határig a növekvő ionerő növeli a fehérjék oldhatóságát, ez a „besózás” jelensége

Amint azt az oldhatóság pH-függésénél is láthattuk, a fehérjék oldhatóságát csökkenti, ha a fehérjemolekulák a felszínükön lévő töltéssel rendelkező csoportokon keresztül vonzó ionos kölcsönhatásokat létesíthetnek egymással. Az oldatba kerülő kisméretű ionok ellenionként működve képesek leárnyékolni a fehérjék felszínén lévő töltéseket, és ezáltal csökkenteni a fehérjék között kialakuló ionos kölcsönhatásokat. Ez magyarázza a „besózás” jelenségét.

Amennyiben az ionok koncentrációját egy bizonyos – az adott fehérjére jellemző – érték fölé emeljük, a fehérje oldhatósága a növekvő ionkoncentráció függvényében csökkenni fog. A csökkenő oldhatóság miatt megfelelően magas fehérjekoncentráció esetén a natív fehérjemolekulák egy része csapadékba kerül.

Ezt a jelenséget „**kisózás**nak” (angolul *salting-out*) nevezik. A jelenség oka elsősorban az, hogy az oldatba vitt ionok körül hidrátburok alakul ki. Tiszta vízben a vízmolekulák koncentrációja ~55,5 M. Amennyiben az oldott ionok koncentrációja már a mólos koncentrációtartományban van, az eredetileg szabad vízmolekuláknak tetemes része kerül az ionok körül létrejövő hidrátburokba. A vízmolekuláknak ez a hányada már nem vesz részt a fehérjemolekulák oldatban tartásában. Más szóval a fehérjemolekulákat eredetileg körülvevő hidrátburok elvékonyodik, így a fehérjék közötti apoláros kölcsönhatások felerősödnek.

Kisózásra elsősorban egyértékű kationok sóit használják. Az egyik legelterjedtebb kisózásra használt só az ammóniumszulfát. Mivel a különböző fehérjék oldhatósága eltérő mértékben függ az ionkoncentrációtól, a kisózás módszerével egy fehérjekeverék frakciókra bontható.

Jó példa erre az **ammóniumszulfátos frakcionálás**. Amennyiben egy izolálandó fehérje oldhatósága „átlagos mértében” függ az ammóniumszulfát koncentrációjától a következő módon lehet részlegesen izolálni. A fehérjekeverék oldatához az ionkoncentrációt lassan növelve ammóniumszulfátot adagolunk egy olyan koncentráció értékig, amelyen az izolálandó fehérjénk még éppen oldatban van, míg számos egyéb „szennyező” fehérje már kicsapódik. (Az ammóniumszulfát koncentráció növelését célszerű nem szilárd anyag, hanem telitett ammóniumszulfát oldat hozzáadásával kivitelezni.)

A kicsapódott fehérjéket centrifugálással ülepítjük. Az összecsapódó fehérjékből képződő aggregátumok „részecskemérete” hatalmas, így a kicsapódott fehérjék rendkívül gyorsan ülepednek. A felülúszót megőrizzük, és tovább adagoljuk az ammóniumszulfátot, egy olyan koncentrációértékig, amelyen az izolálandó fehérjénk már - természetesen számos egyéb fehérjeféleséggel együttesen - kicsapódik. A csapadékot centrifugálással ülepítjük, a felülúszót leöntjük. Ezáltal megszabadulunk a felülúszóban maradó „szennyező” fehérjéktől. A további izolálási lépéseket a csapadék visszaoldását követően végezzük el.

Irreverzibilis kicsapási módszerek

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Mint már említettük, a denaturálódás és az oldhatóság kapcsolata összetettebb annál, mint ahogyan az a köztudatban elterjedt. Natív állapotú globuláris fehérjék esetében az apoláros oldalláncok zöme a fehérje hidrofób magjában található, bár a fehérje zömmel poláros csoportokat tartalmazó felszínén is előfordulhatnak kisebb-nagyobb apoláros részletek. Amikor egy globuláris fehérje valamilyen hatásra letekeredik, az apoláros oldalláncok felszínre kerülnek. Az apoláros csoportok körül a víz alacsony entrópiájú klatrát szerkezetet hoz létre (lásd **2.5.3. fejezet**). A rendszer alacsonyabb szabadentalpia szintet érhet el, ha a klatrát szerkezet megszűnik, hiszen ezáltal a rendszer entrópiája növekedhet. Amennyiben a felszínre került apoláros csoportok egymással lépnek gyenge másodlagos kölcsönhatásba, a klatrát szerkezetek száma lecsökken, a rendszer entrópiája megnő.

Tehát a termodinamikai bevezetőben más ismertetett hidrofób hatásnak nevezett termodinamikai jelenség áll annak hátterében, hogy a letekeredett fehérjék az esetek túlnyomó részében kicsapódnak az oldatból.

Megjegyzendő ugyanakkor, hogy számos közkedvelt fehérjedenaturáló szer éppenséggel ragyogó oldószere is a denaturált fehérjéknek. Ilyen az urea, vagy a nátrium-dodecilszulfát (SDS). Ezek használatakor tehát a denaturálódást nem kíséri kicsapódás.

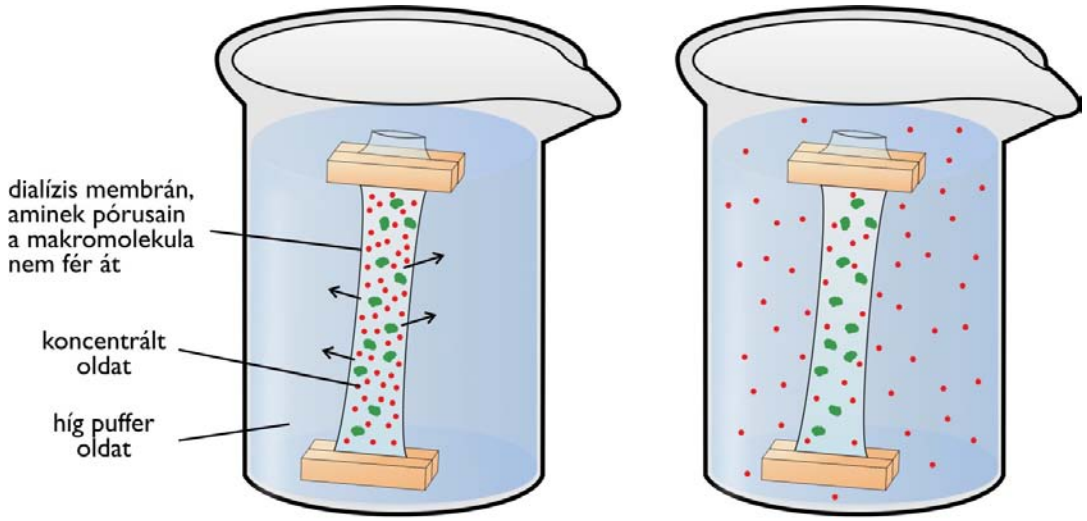
A globuláris fehérjék **denaturálása** kiváltható például **magas hőmérséklet** (hődenaturálás), vagy **extrém pH** alkalmazásával. Amennyiben az izolálandó fehérjénk valamilyen kicsapódást okozó, denaturáló hatásnak az átlagosnál jobban ellenáll, például hőstabil, vagy savtűrő, úgy ez a tulajdonsága kiaknázható az izolálás során. Megfelelően magas hőmérséklet, vagy extrém pH érték alkalmazásával a „szennyező" fehérjék jó része denaturálódott állapotban kicsapódik, centrifugálással eltávolítható, míg az izolálandó fehérjénk (rendszerint más fehérjékkel együtt) oldatban marad.

6.2.4.2. Részecskeméreten alapuló durva frakcionálási módszerek

Egyes durva frakcionálási eljárások részecskeméret alapján képesek egymástól elválasztani az egyes molekulákat. Az alább ismertetett két eljárás féligáteresztő membránokon alapul. Ezek a membránok olyan „sziták" amelyekben a lyukak mérete a molekuláris mérettartományba esik. A lyukak, illetve pórusok méreténél kisebb molekulákat a membrán átengedi, míg az annál nagyobbakat visszatartja.

A **dialízis** eljárása során egy féligáteresztő membránból készült, csőbe töltik a mintát (lásd **6.9. ábra**). A cső két végét lezárják, és az így kialakuló „zacskót" egy puffer oldatba merítik. A féligáteresztő membránon keresztül megindul mindazoknak a molekuláknak a kétirányú átdiffundálása, amelyek átférnek a membrán pórusain. Ezeknek az anyagoknak a koncentrációja a membrán két oldalán kiegyenlítődik, tehát a membránnal határolt belső térben csökken. A puffer oldat keverésével az egyensúly beállásához szükséges idő lerövidíthető.

A külső puffer oldatot néhányszor új oldatra cserélve könnyen elérhető, hogy a póruson átjutni képes oldott molekulákat vagy ionokat tökéletesen eltávolítsuk a dialízis csőből. Ezt az eljárást elsősorban arra használjuk, hogy megváltoztassuk egy fehérjeoldat ion, vagy kismolekula összetételét. Például a korábban említett ammóniumszulfátos kicsapás után a csapadékból visszaoldott fehérjék mellől dialízissel is eltávolíthatjuk a maradék ammónium és szulfát ionokat.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.9. ábra: A dialízis eljárása

Az **ultraszűrés** során is féligáteresztő membránt használunk. A dialízissel ellentétben ennél az eljárásnál valamilyen erőhatással kényszerítjük át az oldatot ezen a membránon. A víz, és a pórusoknál kisebb oldott komponensek átjutnak, míg a pórusoknál nagyobb komponensek visszatartódnak. Megfelelő méretű pórus alkalmazásával a fehérjék két frakcióra oszthatók, az egyikbe a pórusoknál kisebbek, a másikba a pórusoknál nagyobbak kerülnek. Az említett erőhatást biztosíthatja centrifugálás (Centricon csövek), vagy valamilyen nagynyomású inert gáz (Amicon berendezések). A dialízishez képest a fő különbség abban áll, hogy a pórusoknál nagyobb, visszatartott komponensekre nézve az oldat egyben töményebbé is válik. Az ultraszűrés tehát egyben koncentrálja is a visszatartott fehérjéket.

6.2.4.3. Liofilizálás

Fehérjeoldatokat az ultraszűrésen kívül úgy is töményíthetünk, hogy az oldatból a vizet, és egyéb illékony komponenseket elpárologtatjuk. Bár elvileg a bepárlást egyszerűen az oldat melegítésével is gyorsíthatnánk, a fehérjék natív állapotban tartása szempontjából ennél kíméletesebb eljárást szoktak alkalmazni. Ilyen eljárás a **fagyasztva szárítás**, vagy más néven **liofilizálás**.

Ennek során az oldatot lefagyasztjuk, és nagyon alacsony nyomású, légritka térbe helyezzük, amelyben egy folyamatosan hűtött spirált is elhelyeznek. Az illékony anyagok a mintából szublimálnak, és ráfagynak a hűtött spirálra. A szublimálás hőt von el, és folyamatosan hűti a kifagyasztott mintát. Amennyiben kellően nagy felületen fagyasztottuk ki az oldatot, úgy elegendően intenzív ez a hűtés ahhoz, hogy a minta fagyott állapotban maradjon mindaddig, amíg az összes illékony komponens eltávozik.

A folyamat végére a fehérje szilárd halmazállapotban marad hátra az egyéb nem illékony komponensekkel együtt. Liofilizálás során figyelembe kell venni, hogy milyen nem-illékony komponensek vannak a kiindulási oldatban. Nem illékony savak vagy lúgok szélsőséges kémhatást okozhatnak a visszaoldott mintában. A liofilizálás nem csak fehérje oldatok töményítésére szolgál, de egyben kiváló módja lehet annak is, hogy egy már homogén állapotúra tisztított fehérjét szárított állapotban hosszú időkre stabilan tárolhassunk.

6.3. Kromatográfiás eljárások

A kromatográfiás eljárások során a minta két fázis között oszlik meg. Van egy úgynevezett állófázis (esetenként korlátozott mozgású fázis), és egy mozgófázis. Az állófázis leggyakrabban szilárd, a mozgófázis pedig folyadék. Ilyenkor **folyadékkromatográfiá**s eljárásról beszélünk.

A tipikus folyadékkromatográfiás elválasztásnál az állófázis anyaga mikroszkopikus „gyöngyökből” áll. Ezeket a szemcséket egy csőbe töltik, tehát egy kromatográfiás oszlopot készítenek. A szemcséknek nagy a fajlagos felszínük. Egyes eljárásoknál a szemcsék belsejében adott méretű csatornák is vannak.

Az eljárás során, a kromatográfiás oszlopon átfolyatjuk a fehérjekeverék oldatot, majd meghatározott, egyes eljárásokban változó összetételű pufferrel mossuk le a fehérjéket az oszlopról. A fehérjék, eltérő tulajdonságaik szerint eltérő időt töltenek az állófázisban és a mozgófázisban. Minél hosszabb időt tölt el egy fehérje az állófázisban, annál lassabban halad át az oszlopon, annál később eluálódik az oszlopról.

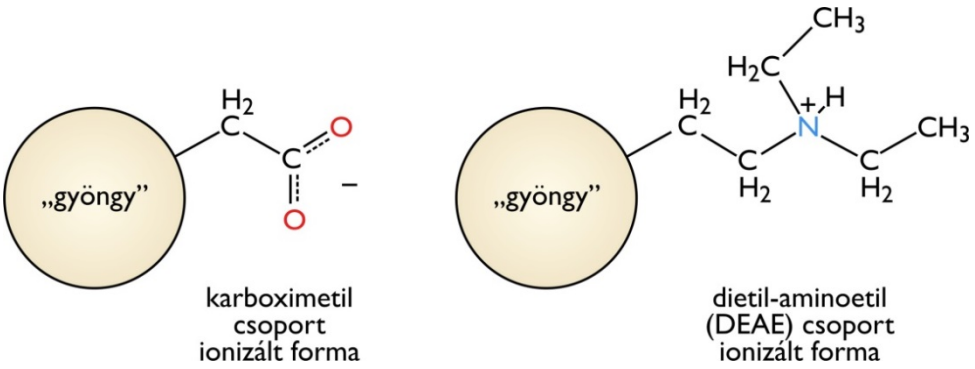
6.3.1. Ioncserés kromatográfia

Az **ioncserés kromatográfia** esetében az oszlopot olyan szemcsékkel töltjük fel, amelyek felszíne töltésekkel rendelkező funkciós csoportokat hordoz. Ezek a funkciós csoportok kovalensen vannak a szemcsékre rögzítve.

Ha a funkciós csoportok negatív töltésűek, akkor a fehérjék pozitív töltésű csoportjaival képes vonzó kölcsönhatást létesíteni. Az ilyen kromatográfiát **kationcserés kromatográfiá**nak hívjuk. Ha a funkciós csoportok pozitív töltésűek, akkor a fehérjék negatív töltésű csoportjaival képes vonzó kölcsönhatást létesíteni. Az ilyen kromatográfiát **anioncserés kromatográfiá**nak hívjuk.

A **6.10. ábra** a leggyakrabban alkalmazott anioncserés illetve kationcserés funkciós csoportokat mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

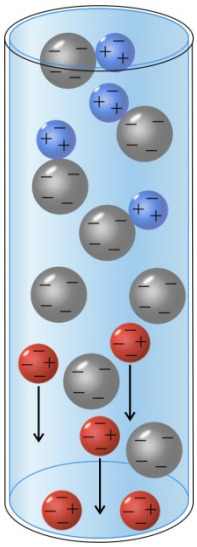


6.10. ábra: A kationcserés és az anioncserés kromatográfia során alkalmazott tipikus funkciós csoportok

Nézzük meg az eljárás lényegét a kationcserés kromatográfia példáján keresztül (lásd **6.11. ábra**).

A fehérjekeveréket a kationcserélő oszlopra töltve azok a fehérjék alkotnak többé-kevésbé stabil komplexet az oszlop negatívan töltött funkciós csoportjaival, amely fehérjék az adott pH-n rendelkeznek pozitív töltésű oldalláncokkal. Minél több ilyen oldallánc van a fehérjén, annál stabilabb lesz ez a kölcsönhatás.

Azok a fehérjék, amelyek egyáltalán nem képesek vonzó kölcsönhatást létesíteni az oszloptöltettel, egyszerűen átáramolnak az oszlopon, és az úgynevezett átfolyó frakcióban jelennek meg, gyakorlatilag akkora térfogatú frakcióban, amekkora térfogatú az eredeti fehérjeoldat volt.



6.11. ábra: Az kationcserés kromatográfia sémája. Az oszloptöltetet kialakító gyöngyök (szürke gömbök) felszínén kovalensen kötött negatívtöltésű funkciós csoportok vannak. Az egyes fehérjék (piros és kék gömbök) eltérő felszíni töltéseik miatt eltérő mértékben képesek vonzó kölcsönhatást kialakítani a gyöngyökkel, így elválaszthatók egymástól.

A kötődő fehérjék e helyett az oszlop egy „szeletében" egy „korongban" kitapadnak az oszlopon (színes fehérjék esetén ez jól látható). Ez a „korong" vándorol az oszlop vége felé, ahogy a puffert áramoltatjuk. A fehérjék ilyenkor folyamatosan disszociálnak a felszínről, és némi vándorlás után újra kötődnek a felszínre. Minél erősebben kötődik egy fehérje a felszíni funkciós csoportokhoz, annál lassabban vándorol a neki megfelelő „korong". Az egyes fehérjék „korongjai" tehát elválnak egymástól. A legegyszerűbb, úgynevezett **izokratikuseljárás** esetén állandó összetételű pufferrel mossuk az oszlopot. Ilyenkor az erősen kötődő fehérjék „korongja" csak nagyon nagy térfogatnyi puffer átáramoltatása után érkezik le az oszlopról.

Az elterjedtebb eljárástípusban valamilyen pufferösszetevőnek a koncentrációját fokozatosan növeljük. Egy olyan pufferösszetevőjét, amely elősegíti a fehérjék és a töltet közötti kölcsönhatás megszűnését. Ioncsere esetén a leggyakoribb megoldás egy oldott só koncentrációjának a folyamatos növelése („**só-gradiens**"). Az oldott ionok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

versengenek az elektrosztatikus kölcsönhatással. Minél stabilabban kötődik egy fehérje az oszloptöltethez, annál magasabb ionkoncentrációnál történik meg a fehérje **elúció**ja. Egy ilyen eljárásnál azt látnánk, hogy az egyes „korongok" csak bizonyos ionkoncentráció esetén vándorolnak mérhető sebességgel az oszlopon. A gradiensnek ez az ionkoncentrációja mintegy „végigsöpri" az adott fehérjét az oszlopon. Ez az eljárás mind anioncsere, mind kationcsere esetén alkalmazható.

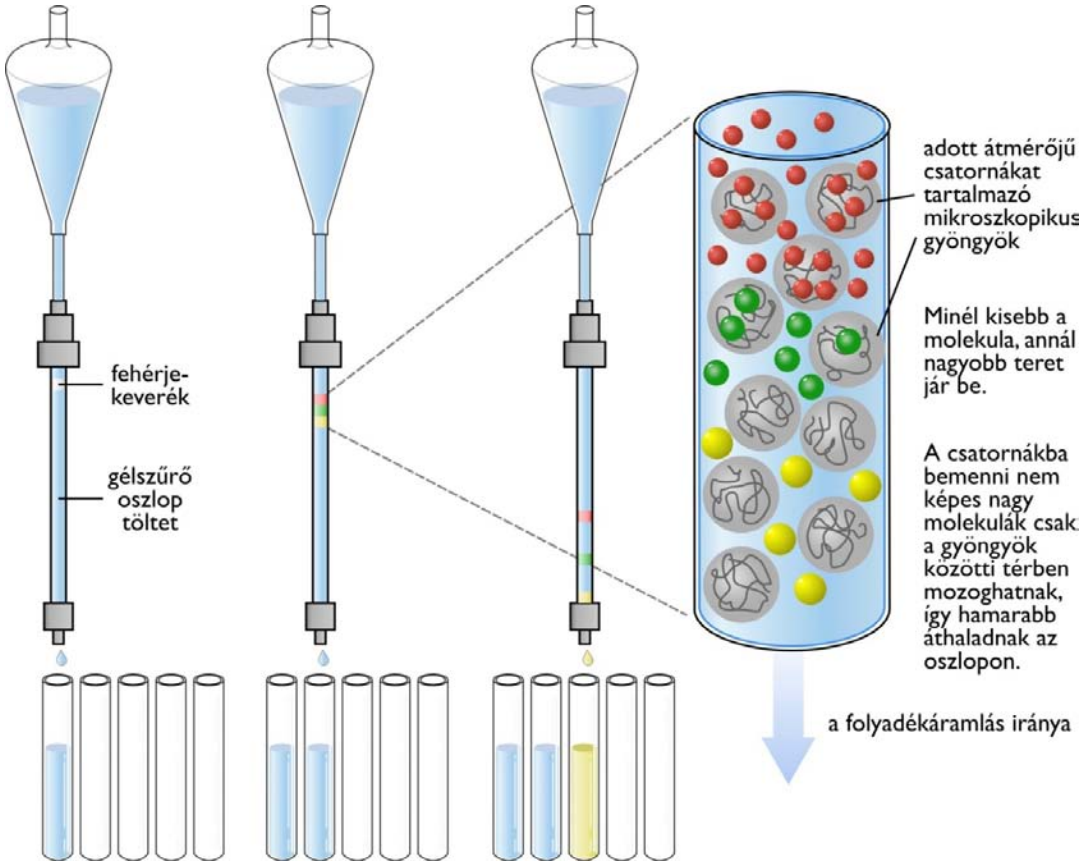
A másik lehetőség a **pH-gradiens**. Ennek során úgy változtatjuk fokozatosan az eluáló puffer pH-értékét, hogy a töltethez kötődő fehérjék fokozatosan elveszítsék a kötődést biztosító töltésüket. Anion-csere esetén a pH-t folyamatosan csökkentve a fehérjék negatív töltésű oldalláncai pK_a értéküknek megfelelően fokozatosan protont vesznek fel, így elvesztik töltésüket. Kation-csere esetén a pH-értéket folyamatosan növelve a kötést biztosító pozitív töltésű fehérje oldalláncok deprotonálódnak, és semlegessé válnak.

6.3.2. Fehérjék elválasztása méret szerint: gélszűrő kromatográfia

Gélszűrés esetén a szemcsék porózus szerkezetűek, belsejüket meghatározott átmérőjű pórusok szövik át. A szemcsék anyaga olyan, hogy ahhoz éppenséggel ne kötődjenek a fehérjék másodlagos kölcsönhatásokkal. A szemcsék belseje egy korlátozottan mozgó fázis, a szemcsék közötti tér a mozgófázis (lásd **6.12. ábra**).

A mintát az oszloptérfogathoz képest kicsi (1-3%) térfogatban juttatják az oszlopra. Azok a molekulák, amelyek minden póruson bejutnak, a puffer átáramoltatásakor egyaránt átjárják a szemcsék közötti, és a szemcséken belüli térrészeket is, tehát bejárják a teljes oszloptérfogatot. Ezek a molekulák tehát akkor érkeznek le az oszlopról, ha egy teljes oszloptérfogatnyi puffert átáramoltattunk.

Azok a molekulák, amelyek egyik pórusba sem tudnak bevándorolni, kizáródnak a szemcsékből, és csak a szemcsék közötti térrészt járják be. A puffer átáramoltatása során ezek a szemcsék közötti térfogatnak megfelelő puffer-mennyiség átáramlásakor, tehát hamarabb leérkeznek az oszlopról. Azok a molekulák, amelyek a két említett szélső mérettartomány között vannak, köztes puffer térfogatoknál érkeznek le.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.12. ábra: A gélszűrő kromatográfia méret szerint választja el a molekulákat

6.3.3. Reverz-fázisú kromatográfia: fehérjék elválasztása hidrofób jelleg alapján

A kromatográfia kezdetén az oszloptöltetek, tehát a szemcsék hidrofil anyagból voltak. Ilyenek volt például a különböző szilikátok. Ezeken választottak el molekulákat eltérő adszorpciós képességük alapján. Gyakran kis szerves molekulákat választottak el, amelyeket apoláros oldószerekben oldva vittek az oszlopra.

Később kémiai módosításokkal, tipikusan hosszú alkil láncokkal befedték az eredetileg poláros felszínt. Ezek a nagy alkil csoportok a hidrofób hatás révén képesek vízből hidrofób felületű molekulákat megkötni. Az eredeti fázisok elrendezése tehát megfordult, innen a „fordított fázis” elnevezés.

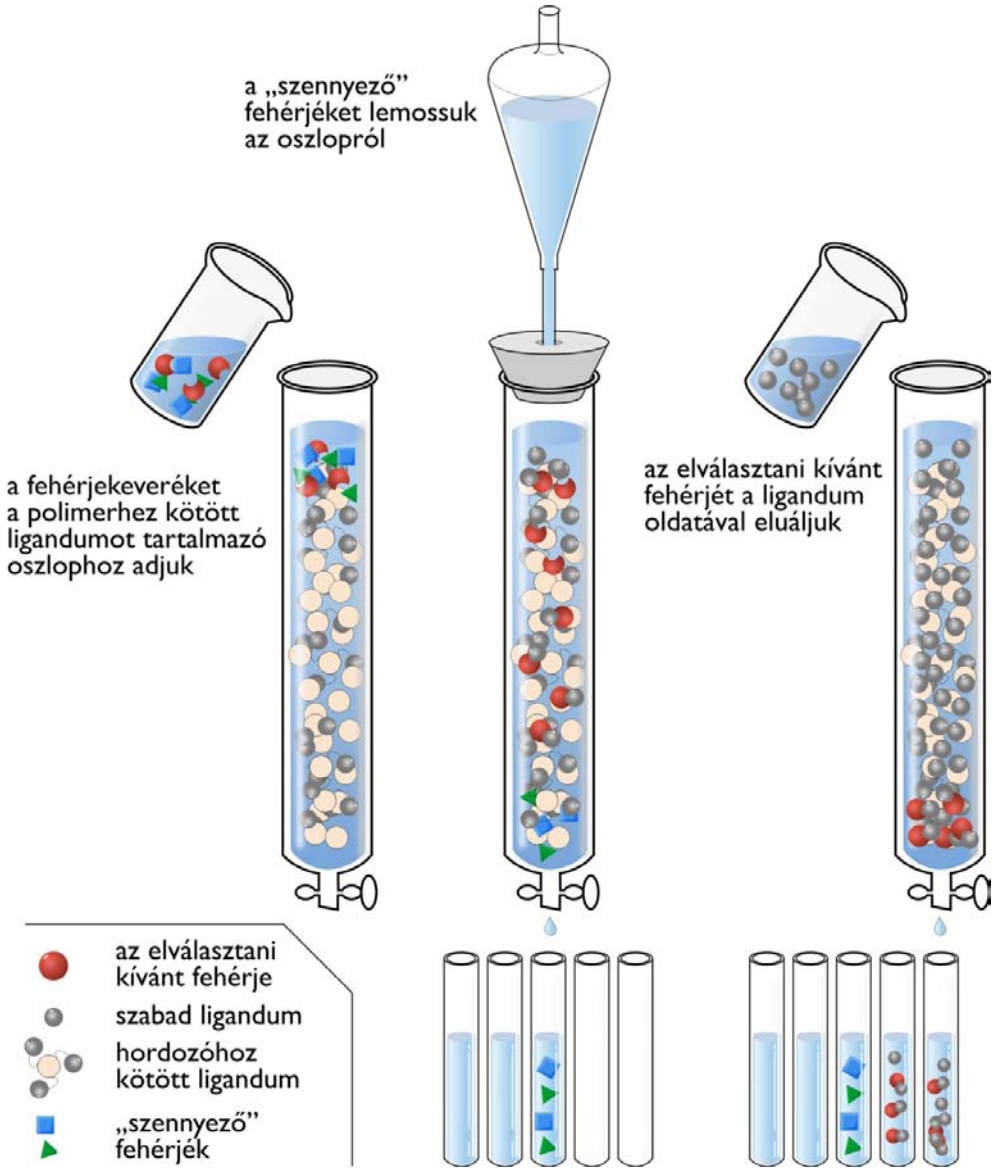
A fehérjék ugyan alapvetően poláros felszínűek, de a legtöbb fehérje felületén vannak kisebb-nagyobb apoláros „foltok” is. Ha ezeket a vízben oldható fehérjéket fordított fázisú oszlopra visszük, a fehérjék a hidrofób hatás miatt hidrofób felszínükkel a szemcsék hidrofób felületére tapadnak. Amennyiben az oldatban gradiens-szerűen növeljük valamilyen apoláros részt is tartalmazó oldószer (például acetonitril) koncentrációját, úgy az versengeni fog a hidrofób felszínekért, és a fehérjék rendre eluálódnak.

Számos fehérje esetében jól működik a fenti eljárás, de sok fehérje túl stabilan kötődik a nagy alkil-csoportokhoz, esetleg denaturálódva kötődik, vagy az eluáláshoz használt szerves oldószer hatására denaturálódik. Ezért dolgozták ki a hidrofób interakciós kromatográfiát. Ennél azt használják ki, hogy magas ionerőn erősebb a hidrofób hatás. Így a fehérjék kisebb méretű hidrofób csoportokhoz is stabilan kötődnek. Az elúcióhoz nem kell szerves oldószert alkalmazni, elegendő csökkenteni a puffer ionkoncentrációját.

6.3.4. Affinitás-kromatográfia

Számos olyan fehérje ismert, amely biológiai szerepe kapcsán nagy szelektivitással kötődik egyetlen másik fehérjéhez, vagy éppen kismolekulához. A receptorok például szelektíven kötődnek a megfelelő hormonhoz, az enzimek a szubsztrátjukhoz, stb. Az **affinitás-kromatográfia** során az ilyen nagy szelektivitású **molekuláris felismerés**t aknázzuk ki. A komplexet képző molekulák közül az egyiket az oszlop szemcséihez rögzítjük, és így egyetlen elválasztási lépésben sikeresen izolálható a szelektív kötőpartner akár hatalmas feleslegben lévő egyéb fehérjék keverékéből (lásd **6.13. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



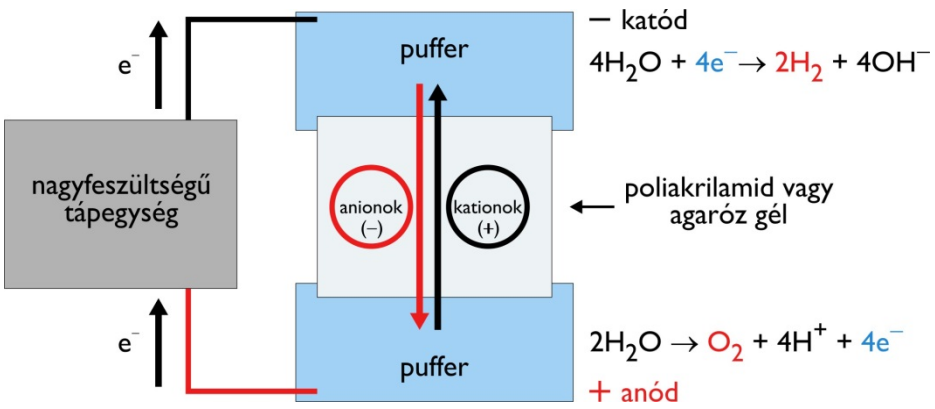
6.13. ábra: Az affinitás-kromatográfia szelektív molekuláris felismerés alapján választ el egyetlen molekula típust nagyszámú „szennyező" molekulától

6.4. Elektroforetikus eljárások

6.4.1. Az elektroforézisről általánosságban

Elektroforézis során egy-egy elektród külön-külön egy-egy puffer tartályba merül, és a két puffer tartály között töltött részecskék számára átjárást biztosítunk (lásd **6.14. ábra**). Ha a két elektród között egy elektromos tápegységgel elektromos potenciálkülönbséget, tehát feszültséget hozunk létre, akkor ennek hatására elektronok áramlanak a tápegységen keresztül az anód felől a katód felé. A katódra kerülő elektronokat a pufferben lévő vízmolekulák veszik fel, hidrogén gáz és hidroxidionok keletkeznek. Az anódon eközben vízmolekulák adnak le ugyanannyi elektront, mint amennyi a katódról levált, oxigén gáz keletkezik, és protonok (illetve ezek víz molekulákra kerülésével hidroxónium ionok) keletkeznek. A két puffer tartály között töltött részecskék számára átjárást biztosító összeköttetésen a pozitív töltésű ionok (kationok) a negatív töltésű katód felé, a negatív töltésű ionok (anionok) pedig a pozitív töltésű anód felé vándorolnak. Az egyes ionok eltérő töltésük és méretük miatt eltérő sebességgel vándorolnak, tehát így elválaszthatók egymástól. A vándorlás sebességét befolyásoló legalapvetőbb fizikai összefüggések ismerete rendkívül fontos annak megértéséhez, hogy az egyes konkrét elektroforézis eljárások esetében az egyes molekulák miért lesznek eltérő sebességűek, milyen elven választhatók el egymástól.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.14. ábra: Az elektroforézis alapelve

Az elektroforézis során a töltéssel rendelkező testre F_e elektromos erő hat, amelynek értéke egyenlő a „q” töltés és az „E” elektromos térerő szorzatával:

$$F_e = q \times E$$ **6.17. egyenlet**

Az E elektromos térerő mértékegysége (newton/coulomb), illetve (volt/cm). Az elektroforézisek egyik fő paramétere az alkalmazott elektromos térerő, amit volt/cm értékben adnak meg.

A vándorló részecskére kis sebesség esetén a sebességgel (v) egyenesen arányos mértékű, a vándorlás irányával ellentétes irányú F_k közegellenállási erő hat:

$$F_k = f \times v$$ **6.18. egyenlet**

A közegellenállási erő nagysága a közegre és a testre vonatkozó információkat egyaránt tartalmazó közegellenállási együtthatóval (f) fejezhető ki. Minél nagyobb a részecske, és minél „akadályozóbb” a közeg, annál nagyobb az f értéke.

Az elektroforézis elindításakor a részecske (pillanatszerűen rövid idő alatt) arra a sebességre gyorsul, amelynél a közegellenállási erő értéke éppen eléri az ellentétes irányú elektromos erő értékét:

$$q \times E = f \times v$$ **6.19. egyenlet**

A részecskére ható eredő erő ekkor nulla, tehát a részecske innen egyenletes sebességgel halad ($F_e = F_k$, tehát $F_{eredő} = 0$).

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$ **6.20. egyenlet**

A részecske elektroforetikus mozgékonysága (μ) megmutatja, hogy az adott részecske (adott közegben) egységnyi térerő esetén mekkora sebességgel vándorol. Ez egyenesen arányos a töltésével, és fordítottan arányos az adott közegre és a részecskére együttesen jellemző közegellenállási együtthatóval.

Az eltérő mozgékonyságú töltött részecskék elektroforézis során egymástól elválaszthatók, hiszen azonos közegben azonos elektromos térerő alkalmazásával eltérő sebességgel vándorolnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatoknál a töltéssel rendelkező makromolekulák közül leginkább a fehérjék és a nukleinsavak elválasztásához alkalmazzák az elektroforézis elvét. Minden esetben valamilyen térhálós gélben zajlik az elektroforézis, ezért ezeket az eljárásokat összefoglalóan gélelektroforézis eljárásoknak nevezzük.

Az elektroforézis fent említett elve önmagában nem követeli meg, hogy annak során valamilyen gélt is alkalmazzunk. A kezdetek kezdetén nem is alkalmaztak géleket. A töltéssel rendelkező részecskéket homogén folyadékfázisban vándoroltatták. Ezzel az eljárással alapvetően három probléma adódott.

Az egyik, hogy a közönséges folyadékok az eltérő méretű ionok mozgását ugyan eltérő mértékben akadályozzák, de ez az eltérés igen kismértékű, tehát az elválasztás nem hatékony. A másik probléma azzal kapcsolatos, hogy egyszerű folyadékfázis esetén a folyadékfázisban akár kis hőmérsékletkülönbségek hatására is áramlások indulnak el, amelyek rontják az elválasztást. A harmadik probléma, hogy folyadék-fázisban minden irányban jelentős a diffúzió mértéke, ami szintén rontja az elválasztás hatékonyságát.

Mindhárom problémára megoldást kínál a **térhálós gélek alkalmazása**. Az ionokat nem homogén puffer közegben vándoroltatjuk, hanem egy olyan puffer közegben, amelyet valamilyen térhálós gél „sző át”. Ez a gél megakadályozza a folyadékáramlás kialakulását, és az egyszerű folyadékfázishoz képest lényegesen nagyobb mértékben akadályozza a részecskék mozgását, ezáltal csökkenti a diffúzió mértékét. Mindezek mellett az elválasztás hatékonysága szempontjából a gél legfontosabb szerepe az, hogy a vándorló részecskék méretétől függően radikálisan eltérő mértékű akadályt jelent. Az adott térhálós gélre jellemző átlagos pórusméretnél nagyobb részecskék a gélben gyakorlatilag nem vándorolnak, azokat tehát visszatartja. A pórusméretnél jóval kisebb részecskék számára a gél „érzékelhetetlen” vagyis ezekre csak a pufferoldatra jellemző közegellenállás érvényesül. A két szélsőérték közötti részecskeméret tartományban azonban a gél erősen méretfüggő módon lassítja a részecskék vándorlását. Ebből következik, hogy egy-egy konkrét gél csak egy–egy konkrét részecskeméret tartományban használható, tehát minden konkrét feladathoz tartozik egy optimális pórusmérettel rendelkező gél.

Az elektroforézis során alkalmazott géllel szemben a következő általános követelmények merülnek fel. Legyen vízzel nedvesedő, kémiailag stabil (ne lépjen kémiai reakcióba az elektroforézis során), ne hordozzon töltéseket (ne viselkedjen ioncserélőként), legyen fizikailag ellenálló, legyen átlátszó, ne festődjön az elválasztott anyagok kimutatására használt festékkel, s legyen szabályozható a pórusmérete.

Nem ismerünk olyan anyagot, amely a molekuláris biológia által vizsgált igen nagy részecskeméret tartományt önmagában átfedné, tehát olyat, amelyből szélsőségesen eltérő pórusméretű géleket lehetne készíteni. A molekuláris biológiai vizsgálatokban alapvetően kétféle anyag vált be, amelyek megfelelnek a fenti kritériumoknak. Az egyik a poliakrilamid, a másik az agaróz. A poliakrilamid gélben az akrilamid gyökös polimerizációjával keletkező poliakrilamid szálakat kovalens kötések kötik össze. Az agaróz gélben ezzel szemben a poliszacharid láncok között másodlagos kötőerők alakulnak ki. A poliakrilamid gélek pórusmérete viszonylag kicsi, ezért ezt a gélt elsősorban fehérjék és kisebb nukleinsavak elválasztásánál alkalmazzák. Az agaróz gélek pórusmérete sokkal nagyobb, ezért elsősorban nagyméretű nukleinsavak elválasztására használják. A továbbiakban az egyes poliakrilamid alapú eljárásokat tekintjük át.

6.4.2. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

6.4.2.1. A PAGE módszerről általánosságban

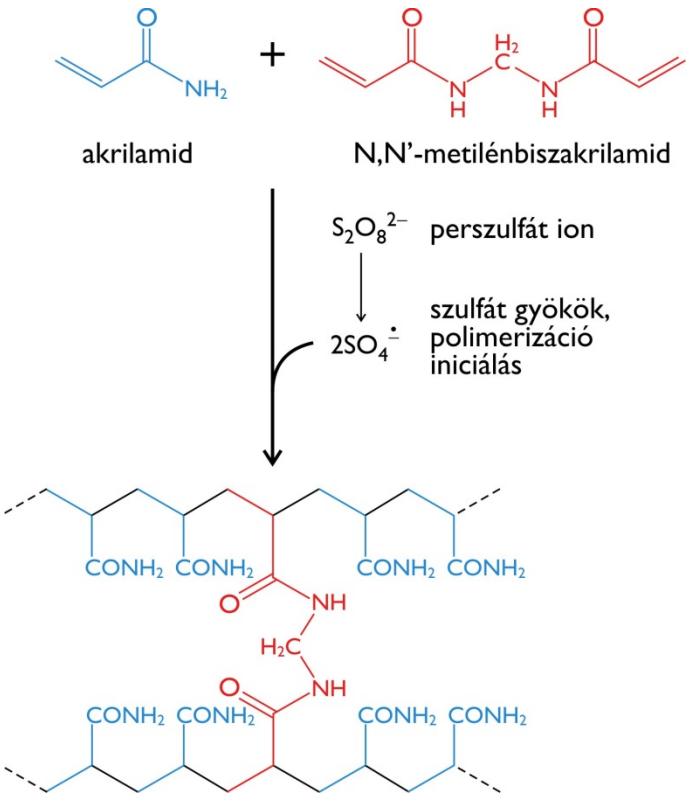
Amint azt már említettük, a **poliakrilamid gél**t kisebb nukleinsavak elválasztásánál is alkalmazzák. A Sanger-féle DNS-szekvenálás esetében például ezzel a módszerrel választják el egymástól az eltérő hosszúságú, lineáris, egyszálú DNS molekulákat. Az eljárás felbontása a néhányszor 10-bázis hossztól a nagyjából 1000 bázis hosszúságig terjedő mérettartományban olyan nagy, hogy képes az egymástól csak 1-1 bázis hosszal eltérő molekulákat is elválasztani. DNS esetében tehát egyértelműen a lánc hossza szerint zajlik az elválasztás. Ennek az az oka, hogy a DNS (és RNS) estében az egységnyi molekulatömegre (polimer-hosszra) eső negatív töltések száma, vagyis a relatív töltés azonos. Ez annak köszönhető, hogy minden monomer egység tartalmaz egy foszfátcsoportot, ami a negatív töltést hordozza. Megfelelő denaturálószer (pl. urea) alkalmazása mellett a lineáris molekulák alakja is azonos lesz. Így kizárólag a denaturált molekula mérete szerint válnak majd el egymástól. (Ugyanezt látjuk majd az SDS-PAGE esetében fehérjék vonatkozásában, lásd később). A PAGE módszernek azonban számos olyan változata van (SDS-PAGE, izoelektromos fókuszálás, 2D PAGE), amelyek elsősorban fehérjék különböző tulajdonságok szerinti elválasztására alkalmas.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A különböző fehérjék egy adott pH értéken más-más töltéssel rendelkeznek. Ráadásul az egyes fehérjék mérete és alakja is eltérő. Ha vizes oldatban elektromos erőtér alkalmazásával a fehérjéket vándorlásra késztetjük, az egyes fehérjék eltérő töltésük, méretük és alakjuk miatt különböző sebességgel mozognak, és ez alapján egymástól elválaszthatók. Mivel az elválasztás egyszerre többféle elven zajlik, ezért ugyan nagyhatékonyságú, de pusztán egy-egy elválasztás alapján nem tudjuk meghatározni, hogy egy adott fehérje miért vándorol gyorsabban egy másiknál: elsősorban azért, mert nagyobb a töltése, vagy azért, mert kisebb a mérete. A fent már említett, később ismertetendő PAGE változatokat éppen azért fejlesztették ki, hogy a fehérjék kizárólag méret, vagy éppenséggel kizárólag izoelektromos pont alapján váljanak el (lásd később).

A poliakrilamid gél létrehozása: az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok és iniciátorok jelenlétében gyökös polimerizációra képes, és a reakció során nagy molekulatömegű, lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Mivel az akrilamid rákkeltő és mutagén, alkalmazásánál megfelelő óvatosság szükséges. A polimer forma azonban már nem mérgező. Ez utóbbi vizes oldata nagy viszkozitású. Ha megfelelő keresztkötő ágenst, N,N'-metilénbiszakrilamidot is alkalmazunk, a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre (lásd **6.15. ábra**). Az elektroforézis során az ionokat (nukleinsavakat vagy fehérjéket) ebben a gélben vándoroltatjuk.

Mint arról már szó esett, az eljárás különlegesen **nagy felbontóképességg**el rendelkezik, a gélben a molekulák sebességére töltésük, méretük, illetve alakjuk is befolyással bír. A gél méret szerinti „molekulaszűrő" hatását a gél átlagos pórusmérete szabja meg. A pórusméret az akrilamid monomer koncentrációjának és a térhálósító metilénbiszakrilamid százalékos arányának alkalmas megválasztásával tág határok között változtatható. A gél mechanikus tulajdonságai kb. 4-20% akrilamid koncentráció-tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilénbiszakrilamid mennyisége az alkalmazott akrilamid monomernek rendszerint 1-3%-a. A poliakrilamid rendelkezik mindazon már említett tulajdonságokkal (hidrofil, nem hordoz töltéseket, kémiailag stabil), amik az elektroforézis során előnyösek. Ezeken felül további fontos tulajdonsága, hogy az elválasztandó fehérjékkel nem lép semmilyen fehérje-specifikus kölcsönhatásba, és nem zavarja a fehérjék detektálására szolgáló festési reakciókat sem. Ha az elektroforézist natív (nem-denaturáló) közegben, alacsony hőmérsékleten végezzük, számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását, ami alapján ezek a gélben specifikusan kimutathatók.



6.15. ábra: A térhálós poliakrilamid gél kialakulása

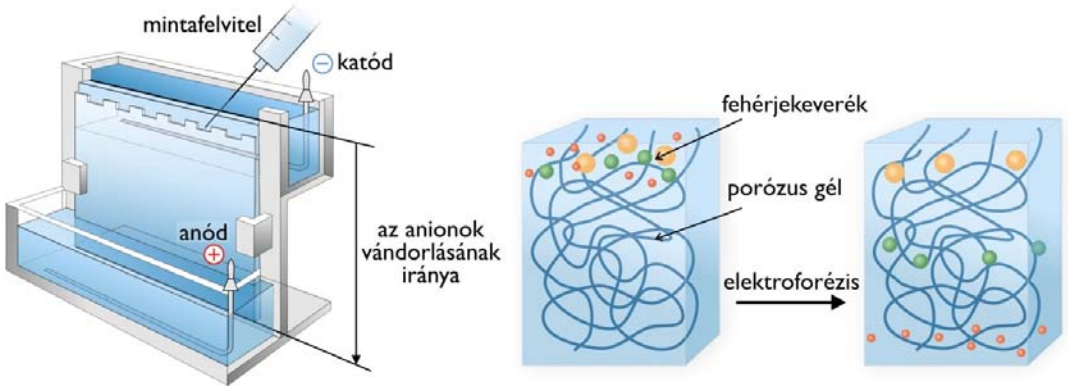
Gélkészítés során az igényszerinti koncentrációjú akrilamid / metilénbiszakrilamid oldathoz megfelelő pH értékű pufferoldatot keverünk, majd a gyökös polimerizációt egy alkalmas katalizátor és iniciátor hozzáadásával indítjuk

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

el. A katalizátor általában peroxidszulfát, mely vizes közegben spontán bomlik, ami által szabad gyökök keletkeznek. Ezek a szabad gyökök azonban önmagukban nem képesek az akrilamid molekula kettős kötését felhasítva elindítani a gyökös polimerizációt, viszont gerjesztik az iniciátor molekulákat. Ez utóbbiakból ekkor olyan szabad gyökök alakulnak ki, amelyek már kiváltják a polimerizációt. A leggyakrabban használt iniciátor a tetrametil-etilén-diamin (TEMED). A katalizátor és az iniciátor koncentrációját úgy választjuk meg, hogy a polimerizáció, így a gélesedés 10-30 perc alatt teljes mértékben végbemenjen.

Az elektroforézis "geometriája" szerint kétféle eljárás használatos. Az elsőként kidolgozott módszer esetében a pufferrel, katalizátorral, iniciátorral összekevert akrilamid / metilénbiszakrilamid oldatot egy az egyik végén lezárt üvegcsőbe öntik. Az így létrejövő géloszlopban csak egyetlen mintát lehet futtatni. A jelenleg elterjedt eljárásokban a fent említett oldatot két, egymással párhuzamos üveglap közé töltjük (lásd **6.16. ábra**). Így egy gél lemez alakul ki, amelyben egyidejűleg, egymás mellett, azonos körülmények között számos mintát futtathatunk, melyek ily módon egymással könnyen összehasonlíthatók. Ez nagyban megkönnyíti az elektroforézis eredményének kiértékelését.

Az elektroforézis sikerét döntő mértékben befolyásolja a gél akrilamid koncentrációja és a pH helyes megválasztása. Fehérjék esetén rendszerint az izoelektromos pontnál magasabb pH-n dolgozunk. Ekkor a fehérjék negatív töltésűek, így az anód felé vándorolnak. A puffer szerepe nemcsak abban áll, hogy az elektroforézis ideje alatt a pH-t állandó értéken tartja, hanem a puffer ionjai végzik az áram vezetés legnagyobb részét is. Normális esetben a fehérjeionok az áram vezetésében csak elhanyagolható mértékben vesznek részt, vagyis a fehérjék átviteli száma kicsi. Ha azonban a puffer koncentrációja túl alacsony, megnő a fehérjék szerepe az áram vezetésében, ami általában elkenődött fehérjesávokat eredményez. Az optimálisnál magasabb puffer koncentráció esetén viszont túl kicsi lesz a fehérjék mobilitása, ami szintén rontja az elválasztás minőségét, mivel a megnövekedett időigény miatt a diffúzióra is több idő jut.



6.16. ábra: A vertikális elrendezésű poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE). A natív PAGE eljárás során a fehérjék mérete és töltése egyaránt befolyásolja a vándorlás sebességét, míg az SDS PAGE eljárás a fehérjéket kizárólag méret szerint választja el egymástól.

Az alkalmazott puffer rendszerek szempontjából a gélelektroforetikus technikákat két nagy csoportba oszthatjuk. Folytonos (**kontinuus)puffer** rendszerről beszélünk, amikor ugyanazt a puffert alkalmazzuk a gélben, mint az elektródokat tartalmazó puffer-tankokban. Ennek a módszernek az előnye az egyszerűségében rejlik, viszont a felbontóképessége valamivel rosszabb, mint a bonyolultabb ún. **diszkontinuus puffer** rendszereké.

A diszkontinuus elektroforetikus technikák két különböző koncentrációjú gélt, és három különböző puffer rendszert alkalmaznak. A futtató (más néven szeparáló) gél fölé egy ún. koncentráló (más néven: tömöritő) gélt polimerizálunk. Ennek akrilamid koncentrációja a futtató gélénél jóval alacsonyabb, olyannyira, hogy itt a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül. A három különböző puffer rendszerben két különböző aniont alkalmaznak. Mindkét gélben a puffer anion komponense egy erős sav maradéka, melynek disszociáció foka gyakorlatilag nem függ a közeg pH-jától, vagyis töltése széles pH tartományban állandó. Ez a komponens általában a kloridion. Tank pufferként viszont olyan puffer rendszert alkalmaznak, melynek anion komponense egy gyenge sav savmaradéka, pl. glicinát-anion. A tankpufferben a pH 8,3.

A kistérfogatú fehérjemintát a koncentráló gél felszínére rétegezzük. Feszültség hatására a fehérjeionok és a tank puffer anionjai belépnek a koncentráló gélbe. A koncentráló gélben a pH 6,8, ami alig magasabb, mint a glicin

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

izoelektromos pontja (6,5). Ilyen pH-n a glicin molekula csak parciálisan negatív (az idő nagy részében nettó semleges ikerionos állapotban van), elektroforetikus mobilitása alacsony, így lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák koncentrációja. Ez helyileg megnöveli az elektromos ellenállást. Minthogy az elektromos körben az áramerősség állandó kell, hogy legyen, (nincs makroszkopikus töltésszétválás), Ohm törvényének megfelelően az ellenállással arányosan megnő a térerő is, ezért a fehérjék vándorlása felgyorsul, amíg el nem érik az ionokban gazdag, kis elektromos ellenállású kloridion frontot. Minthogy a kloridion frontban az ellenállás, és így a térerő kicsi, a fehérjék sebessége csökken, és a front mögött mintegy összetorlódva igen vékony sávban vándorolnak a futtató gél felszínéig.

A futtató, vagy más néven szeparáló gélben a helyzet megváltozik. A szeparáló gél pH értéke 8,8-9,0 között van. Ezen a pH-n a glicinben lévő aminocsoportok egy része elveszti az extra protonját, így elveszti a pozitív töltését. A glicinát-ion parciális negatív töltése emiatt megnő, ezért mobilitása is megnövekedik. Így a glicinát töltéshiányából eredő koncentráló hatás megszűnik, a fehérjék a továbbiakban különböző töltésük miatt eltérő sebességgel vándorolnak. Ráadásul a futtató gél akrilamid koncentrációját már úgy választjuk meg, hogy a molekulaszűrő hatás is érvényesüljön, és a gél az elválasztani kívánt fehérjék mérettartományában a lehető legnagyobb mértékben szeparáljon méret szerint is.

Az elektroforetikus eljárások többségénél a futtatás során jelzőfestéket alkalmazunk, amit a mintába keverünk. Ez a kis molekulatömegű, negatív töltésű festék rendszerint gyorsabban vándorol a gélben, mint az elválasztandó makromolekula-ionok (pl. fehérjék). A festék mintegy láthatóvá teszi a futási frontot, így egyértelművé válik, mikor tekinthető az elválasztás befejezettnek. A leginkább használatos jelzőfesték a brómfenolkék.

A továbbiakban ismertetjük az egyes PAGE eljárásokat, a legegyszerűbbtől az egyre összetettebb felé haladva.

6.4.2.2. Natív-PAGE

A **natív-PAGE fehérjék elválasztására** szolgáló eljárás. Ennek során igyekszünk olyan körülmények közepette vándoroltatni a fehérjéket, hogy azok megtartsák natív térszerkezetüket. Az elektroforézist tehát nem-denaturáló közegben, és rendszerint alacsony hőmérsékleten végezzük. Ilyen körülmények között számos enzim megőrzi natív szerkezetét és így enzimaktivitását. Ezáltal ezek az enzimek a gélben specifikusan kimutathatók még akkor is, ha nagyon nagy mennyiségben vannak jelen más fehérjék is. Egy ilyen „festési” eljárás során a gélt egy olyan szubsztrát oldatába áztatjuk, amelyet a kimutatni kívánt enzim szelektíven alakít át, és amelynek terméke színes és oldhatatlan. Így ahol a gélben az adott enzim megtalálható, ott annak helyét színes csapadék jelzi.

Ezen felül a natív-PAGE kiválóan alkalmas arra is, hogy egy olyan, alaposan megtisztított fehérjepreparátum esetén, amely csak egyetlen fehérjét tartalmaz, megnézzük, hogy az valóban homogén-e. Egyetlen éles csíkot csak akkor kaphatunk, ha a fehérjénk homogén. Amennyiben a tisztítás során a fehérjemolekulák egy része kémiailag módosult, (pl. dezaminálódott, vagy diszulfidhíd átrendeződésen ment át), esetleg aggregálódott, úgy egynél több csíkot kapunk. A natív-PAGE arra is kiválóan alkalmas, hogy detektáljuk vele két vagy több fehérjekomponens egymással alkotott komplexének kialakulását. A kovalens kötésekkel, vagy éppen másodrendű kölcsönhatásokkal létrejövő alegységszerkezet, vagy két önálló fehérje (pl. enzim-inhibitor, receptor-ligandum) között kialakuló komplex ugyanis a natív elektroforézis során stabilan együtt marad, együtt vándorol.

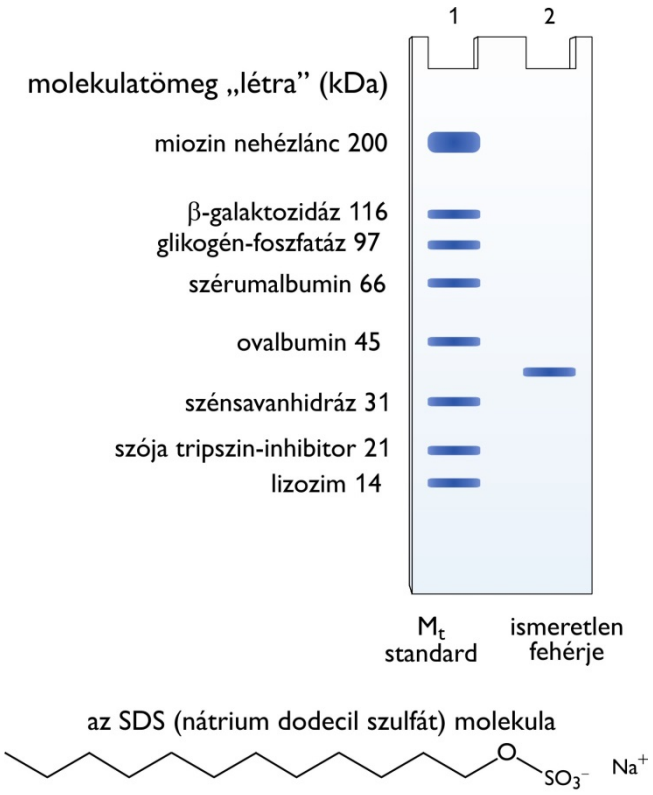
A natív elektroforézisek során különösen ügyelni kell arra, hogyan viszonyul egymáshoz a gélben alkalmazott puffer pH értéke és az elválasztani kívánt fehérje, vagy fehérje-komplex izoelektromos pontja, hiszen ez szabja meg a fehérje vándorlási irányát.

6.4.2.3. SDS-PAGE

Az **SDS-PAGE** is **fehérjék elválasztásá**ra használt módszer, csakhogy itt a fehérjéket **denaturált állapotukban** vándoroltatjuk. Az általános bevezetőben leírtak szerint a hagyományos (natív) akrilamid-gélelektroforézis során a szeparáció a fehérjék töltésétől, alakjától és méretétől egyaránt függ, ezért első megközelítésben nem alkalmas pl. fehérje molekulatömeg meghatározásra. Arra sem ad választ, hogy egy már tisztított mintában lévő fehérje több alegységes-e, hiszen natív körülmények között az alegységek együtt maradnak. Ezen kérdések megválaszolására a poliakrilamid gél elektroforetikus technikák leginkább elterjedt válfaja, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis bizonyult alkalmasnak (lásd **6.17. ábra)**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az **SDS** (*sodium-dodecyl-sulphate*) egy **anionos detergens**. Ha a fehérjemintát SDS-sel és diszulfidhidakat bontani képes redukáló szerrel kezeljük magas hőmérsékleten, radikális konformációváltozások következnek be. A fehérjék közötti kölcsönhatások megszűnnek, az alegység szerkezet felbomlik, a fehérjék denaturálódnak. Az SDS mintegy "kitekeri" a fehérjéket, apoláros részével azok belső, hidrofób magját fellazítja, és mivel anionos detergens, a fehérjéket negatív töltésekkel látja el.



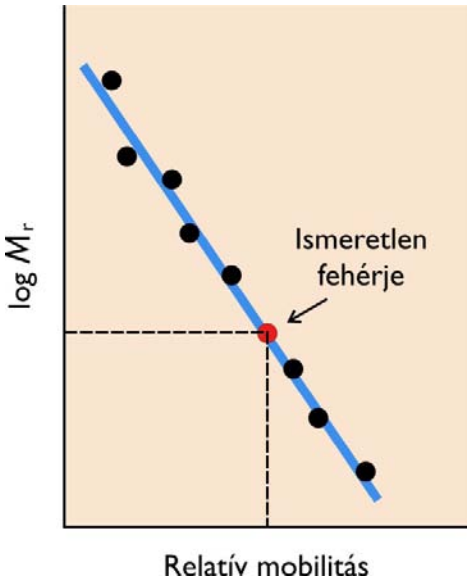
6.17. ábra: Az SDS-PAGE eljárás méret szerint választja el a fehérjéket

A kötődött SDS mennyisége nagyjából független a polipeptidlánc szekvenciájától, ellenben egyenesen arányos a lánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulatömegével. Ez más szóval azt jelenti, hogy az SDS kezelés után az összes fehérje relatív töltése nagyjából azonos lesz. Ráadásul a kezelés hatására az egyes fehérjék alakja is hasonlóvá válik. A negatív töltésű SDS molekulák taszítják egymást, ezért az SDS-kezelt fehérjék valószínűleg közel rúd alakúak lesznek. Mindez azt eredményezi, hogy az egyes fehérjék ugyanolyan módon lesznek kizárólag méretük szerint elválaszthatók, ahogy korábban azt a lineáris egyszálú (denaturált) DNS molekulák PAGE elválasztása során már láttuk. A bevezetőben említett három tulajdonság (relatív töltés, alak, méret) szerinti szeparálás helyett ugyanis itt is csak méret szerinti szeparáció történik. Mivel a molekulaméret arányos a molekulatömeggel, az SDS poliakrilamid gélelektroforézis végső soron molekulatömeg szerint szeparál.

Ez a legelterjedtebb, legolcsóbb módszer a **fehérjék alegység molekulatömegének** viszonylag pontos **meghatározására**. A tapasztalat szerint a fehérje relatív mobilitása (a fehérje futási távolsága osztva a jelzőfesték futási távolságával) a fehérje molekulatömeg logaritmusának függvényében monoton csökken. Ha a mintánkat ismert molekulatömegű fehérjékkel azonos gélben futtatjuk, a standard fehérjék futása alapján készített kalibráló egyenesről a mintában lévő fehérjék alegység molekulatömege leolvasható (lásd **6.18. ábra**)

A **6.2. táblázat** azt mutatja, hogy különböző akrilamid koncentrációjú gélek esetén milyen mérettartományban teljesül a relatív mobilitás és a molekulatömeg logaritmusa között előbb említett összefüggés.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.18. ábra: Ismeretlen fehérje molekulatömegének meghatározása SDS-PAGE eljárással készített kalibrációs egyenes alapján

6.2. táblázat: Az egyes akrilamid gélkoncentrációk eltérő fehérjeméret-tartományokhoz ideálisak

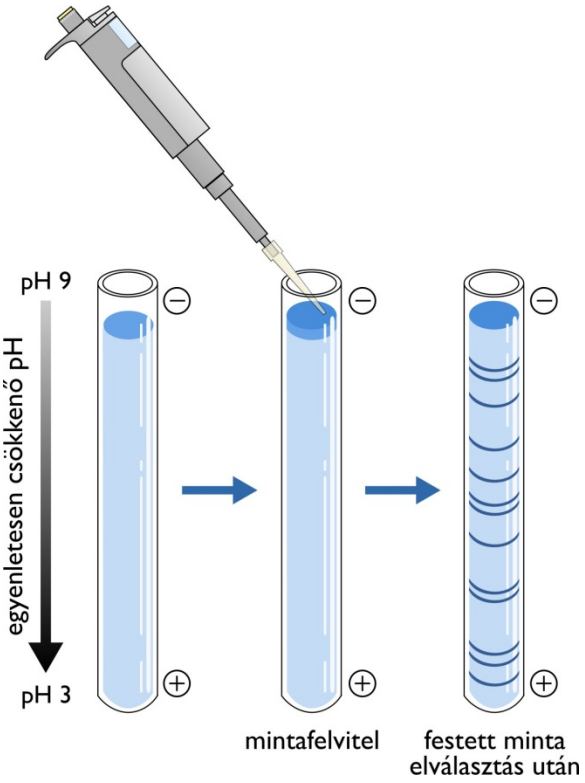
Akrilamid koncentráció (%)	Az elválasztás lineáris tartománya (kDa)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5,0	57-212

Az SDS poliakrilamid gél elektroforézis a leginkább elfogadott módszer annak eldöntésére, hogy egy fehérje, ill. enzimpreparátum homogén-e. Különösen jól alkalmazható bonyolultabb fehérje-asszociátumok, multienzim komplexek vizsgálatára. A denaturáló SDS-PAGE során ezek a komplexek alkotóikra esnek szét, és az egyes polipeptidláncok külön-külön vándorolnak a gélben. A fehérjék gélben történő megfestésével mennyiségi meghatározásra is lehetőség nyílik, így nem csak azt lehet megállapítani, hogy egy alaposan megtisztított, sokkomponensű komplex hányféle alegységből áll, de meg lehet határozni az egyes alegységek számának egymáshoz viszonyított arányát is.

6.4.2.4. Izoelektromos fókuszálás

Izoelektromos fókuszálás során olyan körülményeket teremtünk, hogy a **fehérjék** kizárólag az **izoelektromos pontjukalapján válj**a**nak el** egymástól (lásd **6.19. ábra**). Az eljárás azon alapul, hogy a fehérjéken lévő, proton leadásra illetve felvételre képes csoportok disszociációs állapota függ a környezetük pH értékétől (lásd Henderson-Hasselbalch egyenlet). A fehérjék nettó töltése tehát függ a közeg pH értékétől. Amennyiben egy fehérjén a savas oldalláncok (Asp, Glu) száma meghaladja a bázikus (Arg, Lys, His) oldalláncok számát, úgy a fehérje semleges közegben negatív töltésű lesz, izoelektromos pontja (IEP), vagyis az a pH érték, amelyen a fehérje eredő töltése nulla, a savas tartományba esik. Az ilyen fehérjéket **savas fehérjék**nek is nevezzük. Amikor a fehérje bázikus oldalláncainak a száma múlja felül a savas oldalláncok számát, akkor semleges közegben a fehérje pozitív töltésű lesz, izoelektromos pontja a bázikus pH tartományba esik. Ezeket a fehérjéket **bázikus fehérjék**nek is szokták nevezni.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.19. ábra: A fehérjék izoelektromos fókuszálása

Mivel az eltérő fehérjék IEP értéke igen széles tartományt fed le (lásd **6.3. táblázat**), ezért az izoelektromos pont alapján történő elválasztás hatékony módszer.

Ha a közeg pH értéke alacsonyabb, mint a fehérje IEP értéke, akkor a fehérje pozitív töltésű lesz, és a katód felé vándorol. Ha a közeg pH értéke magasabb, mint a fehérje IEP értéke, akkor a fehérje töltése természetesen negatív lesz, és a fehérje az anód felé vándorol. Ha a pH értéke éppen megegyezik a fehérje IEP értékével, akkor a fehérje nettó töltése nulla, ezért elektroforézis során nem vándorol.

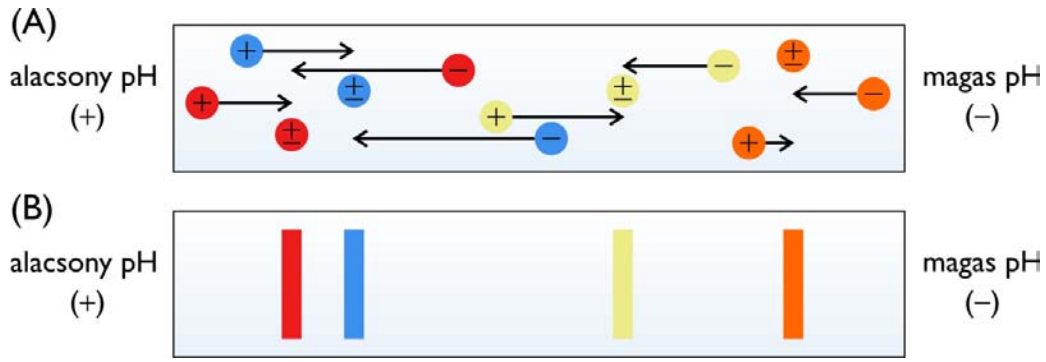
Amennyiben olyan közegbe helyezzük a fehérjét, amelyben a pH a katód és az anód között fokozatosan (gradiens mentén) változik, úgy a fehérje elindul a vele ellentétes töltésű pólus felé. A pozitív töltésű anódnál alacsony pH értékű közeget, a negatív töltésű katódnál magas pH értékű közeget hoznak létre.

6.3. táblázat: A fehérjék izoelektromos pontja nagyon széles tartományt fed le

Fehérje	IEP
pepszin	~1,0
ovalbumin	4,6
szérumalbumin	4,9
ureáz	5,0
β-laktoglobulin	5,2
hemoglobin	6,8
mioglobin	7,0
kimotripszinogén	9,5
citokróm c	10,7
lizozim	11,0

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Miközben a fehérje a változó pH értékű közegben vándorol, a töltése is változni fog. Ha negatív töltésűként az anód felé vándorol, úgy az egyre savasabb közegben egyre több protont vesz fel egészen addig, míg a rajta lévő negatív és pozitív töltések száma megegyezik, vagyis eléri az izoelektromos pontját. Ekkor a fehérjére nem hat eredő elektromos erő, ezért nem vándorol tovább. Ha a spontán diffúzió miatt mégis közelebb kerül az anódhoz, akkor újabb protonok felvétele miatt pozitív töltésűvé válik, és visszafelé vándorol a katód felé. Ugyanilyen gondolat mentén, ha az adott fehérje pozitív töltésűként a katód felé vándorolt, akkor az egyre magasabb pH értékű tartományon át haladva fokozatosan protonokat ad le, míg eléri izoelektromos pontját, és megáll. Ha diffúzióval közelebb kerül a katódhoz, akkor protonokat ad le, és az elektromos erő újra az anód felé vándoroltatja. Tehát a fehérjék mindegyike a saját IEP értékének megfelelő pH értékű gél-tartományba fókuszálódik, a fehérjék IEP értékük alapján válnak el egymástól (lásd **6.20. ábra**). A fenti folyamatok logikájából következik, hogy érdektelen, hogy a fehérjét a gél mely pontján visszük a rendszerbe, ettől függetlenül „megtalálja” az IEP értékének megfelelő pontot.



6.20. ábra: Az izoelektromos fókuszálás fizikokémiai alapelve

Az eljárás meghatározó eleme, hogy egy - lehetőleg lineáris - gradiens szerint változó pH értéket hozzunk létre a gélben. Erre két módszer ismeretes. Az egyik az amfolit hordozók alkalmazása. Az amfolit kifejezés az amfoter elektrolit kifejezés rövidítése. Az amfolitok olyan kis szerves molekulák, amelyeken egyszerre vannak jelen gyenge savas és gyenge bázikus csoportok. Ezeknek az anyagoknak az eredő töltése is a pH függvénye.

Az izoelektromos fókuszálás során olyan amfolitokból készítenek keveréket, amelyek IEP értéke egymástól csak kismértékben tér el, és együttesen átfednek egy bizonyos IEP tartományt. Ezt a keveréket a gélbe juttatják, és létrehozzák a gélben az elektromos teret. Ekkor a fehérjékre már említett folyamat zajlik le. Minden amfolit elindul a töltésének megfelelően valamelyik pólus felé, majd az izoelektromos pontjánál megáll. Mihelyst ez a folyamat lezajlott, az amfolitok pufferként működve stabilan tartják a közvetlen környezetük pH értékét. Így alakul ki a pH gradiens, amiben a fehérjék elválaszthatók.

A másik, a fentinél még finomabban szabályozott pH gradienst úgy hozzák létre, hogy speciális amfolitokat alkalmaznak. Olyanokat, amelyeket kovalens kötésekkel bele lehet polimerizálni az akrilamid gélbe. A gélöntés során hozzák létre a leendő gél oldatában a megfelelő amfolitok gradiensét, amely a gél polimerizáció során kovalensen rögzül. Így ezekben a gélekben egyfajta immobilizált pH gradiens alakul ki. Az, hogy milyen értékek között érdemes a pH gradienst létrehozni, függ az elválasztandó fehérjék IEP értékeitől.

Bármelyik eljárással hozzuk is létre a pH gradienst, amikor már minden fehérje elérte az IEP értékének megfelelő helyzetet a gélben, az elektroforézist folytatva nem történik további vándorlás. A rendszer egyfajta állandósult állapotba kerül.

Az izoelektromos fókuszálás során jelentkező egyik potenciális technikai problémát az jelenti, hogy a fehérjék oldhatósága izoelektromos pontjukon a legalacsonyabb, így egyes fehérjék az IEP értékük közelében kicsapódhatnak a gélben. Ezt megakadályozandó leggyakrabban ureát is adnak a rendszerbe, amely segít oldatban tartani a fehérjéket. Ez egyes fehérjék esetében ahhoz vezet, hogy a fehérje oldatban marad, de denaturált állapotban lesz. Urea alkalmazásakor a kiértékelésnél figyelembe kell venni, hogy a natív illetve a denaturált állapotú fehérje izoelektromos pontja eltérő lehet (mivel az egyes disszociábilis csoportok pK_a értéke függ a csoport lokális környezetétől). Az urea emellett a nem diszulfidhidakkal stabilizált alegységszerkezetet is felbonthatja. Membránfehérjék elválasztásánál pedig a fehérje oldatba vitelét nem-ionos detergensekkel segítik elő.

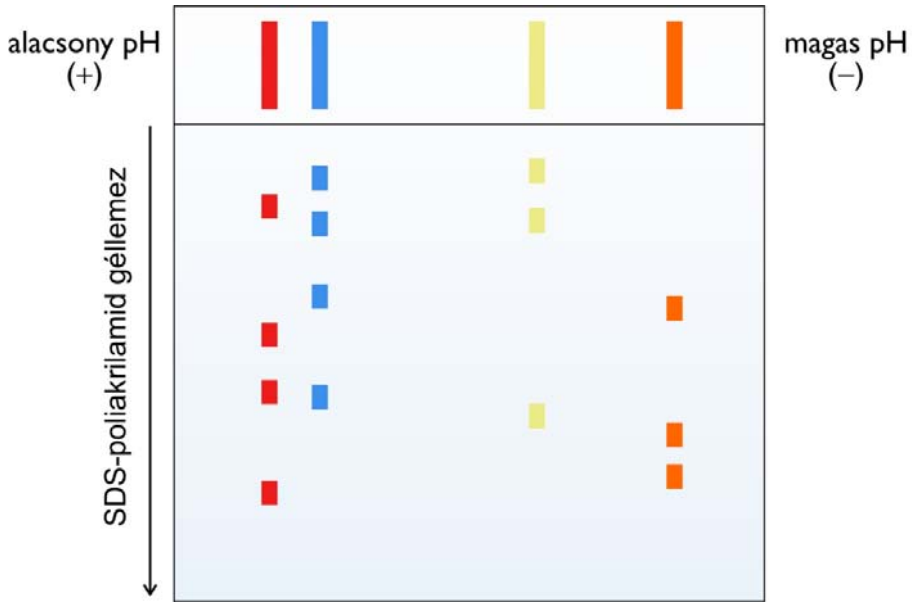
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Izoelektromos fókuszálásnál kizárólag IEP alapján igyekszünk elválasztani a fehérjéket, ezért a gél kizárólag a keveredéses folyadékáramlás megakadályozását szolgálja, tehát nem szabad molekulaszűrőként viselkednie. Ennek érdekében kifejezetten alacsony akrilamid koncentrációjú, nagy pórusméretű géleket alkalmaznak. Emiatt ritkábban ugyan, de ennél a technikánál agaróz gélt is alkalmaznak. Az eljárást leggyakrabban vízszintesen elhelyezett gélekben folytatják intenzív hűtés mellett.

6.2.4.5. Kétdimenziós- (2D) elektroforézis

A legkülönbözőbb elválasztás technikák célja az, hogy egy sokkomponensű rendszer minden egyes összetevőjét elválassza az összes többi összetevőtől. Az elválasztás természetesen az összetevőknek valamilyen fizikai-kémiai tulajdonságban tetten érhető eltérésein alapul. Sokkomponensű elegyek esetében gyakori probléma, hogy pusztán egyetlen tulajdonság szempontjából nem tér el az összes komponens egymástól. Ilyenkor az adott tulajdonság szerinti elválasztás eredményeképpen lesznek olyan összetevők, amelyek homogénen elválnak a többitől, de lesznek olyanok is, amelyek továbbra is más összetevőkkel együtt, keverékben maradnak. Természetesen ezeket a keverékeket is el lehet választani komponensekre, amennyiben egy, az előzőekben alkalmazottól eltérő, attól lehetőleg tökéletesen független egyéb tulajdonság szerinti elválasztást alkalmazunk. Jó példa erre a fehérjék nagyhatékonyságú elválasztására bevezetett **kétdimenziós poliakrilamid gélelektrof**orézis (**2D PAGE**), amelyben két, az előbbiekben már tárgyalt technikát kombinálnak (lásd **6.21. ábra**).

Az SDS poliakrilamid gél elektroforézis a leginkább elfogadott módszer annak eldöntésére, hogy egy fehérje, ill. enzimpreparátum homogén-e. Különösen jól alkalmazható bonyolultabb fehérje-asszociátumok, multienzim komplexek vizsgálatára. A denaturáló SDS-PAGE során ezek a komplexek alkotóikra esnek szét, és az egyes polipeptidláncok külön-külön vándorolnak a gélben. A fehérjék gélben történő megfestésével mennyiségi meghatározásra is lehetőség nyílik, így nem csak azt lehet megállapítani, hogy egy alaposan megtisztított, sokkomponensű komplex hányféle alegységből áll, de meg lehet határozni az egyes alegységek számának egymáshoz viszonyított arányát is.



6.21. ábra: Kétdimenziós (2D) elektroforézis: izoelektromos fókuszálás és SDS PAGE kombinálása

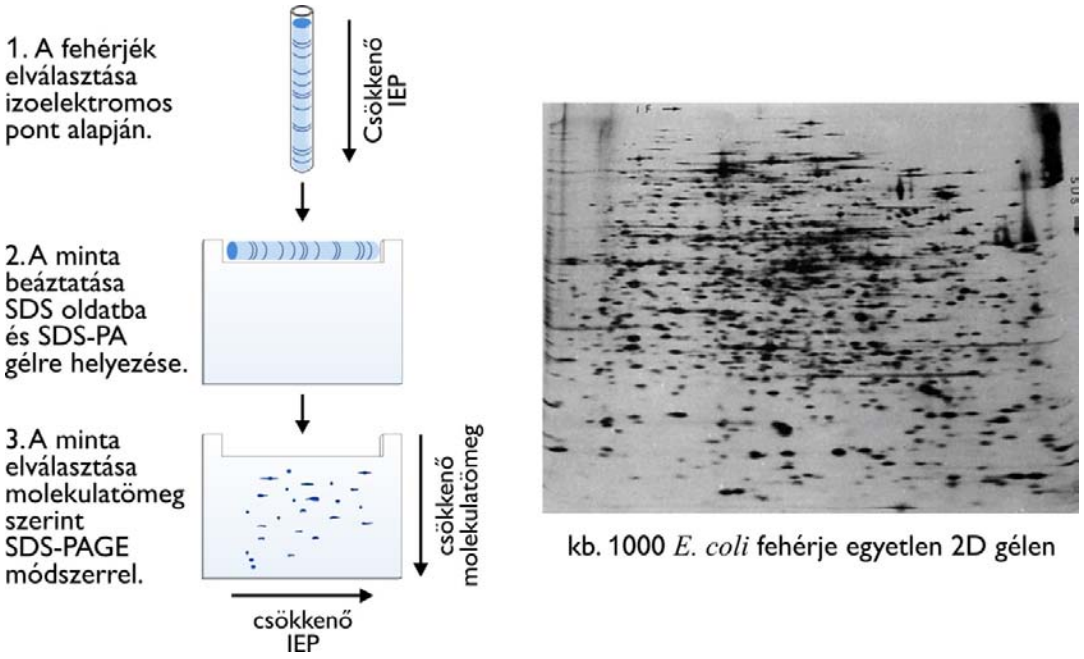
Amint az első dimenzióban megtörtént az elválasztás, ezt a gél-csíkot SDS oldattal itatják át, és egy SDS-poliakrilamid gél egyik szélére illesztik. Az elektródok megfelelő elrendezésével az IEP alapján elválasztott fehérjéket az eredeti elválasztási irányra merőlegesen vándoroltatják a poliakrilamid gélbe, és végrehajtanak egy már ismertetett **SDS-PAGE** elválasztást. Ennél a lépésnél tehát konkrét, és átvitt értelemben is egy másik dimenzió szerint zajlik az elválasztás. Egyrészt az előző elválasztási irányra merőleges, második térdimenzióban válnak el a komponensek, másrészt az előzőekben alkalmazott tulajdonságtól (IEP) teljesen független második tulajdonság, a molekulaméret szerint történik ez az elválasztás.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Tehát amennyiben az izoelektromos fókuszálás során egy-egy térrészben még több, azonos IEP értékű fehérje volt jelen, úgy ezek most méret szerinti elválhatnak egymástól. Érdemes megjegyezni, hogy erre a második elválasztásra mindaz érvényes, amit az SDS-PAGE esetében már leírtunk. Azok a másodlagos kölcsönhatások, amik az izoelektromos fókuszálásnál esetleg még egyben tartottak fehérje alegységeket megszűnnek, és az egyes alegységek elválnak egymástól. A diszulfidhidak felbontásához természetesen itt is redukáló szert kell alkalmazni. Ebben a második dimenzióban tehát elkülönült polipeptidláncok vándorolnak. Tehát amennyiben az izoelektromos fókuszálásnál egy adott térrészben egy adott több-alegységes fehérje volt jelen, úgy a második dimenzió szerinti elválasztásban most már annak alegységei vándorolnak. Ha eltérő méretű alegységekből áll a fehérje, úgy ezek az alegységek a második dimenzióban elválnak egymástól

.

A **6.22. ábra** jobb oldalán egy valós 2D elektroforézis eredményét látjuk, amelyben a kólibaktérium fehérjéit választották el egymástól.



6.22. ábra: A 2D ELFO eljárás egyes lépései

6.5. Aminosav összetétel analízis

Bár az egyes fehérjéket egyedileg az aminosavsorrendjükkel, tehát a szekvenciájukkal lehet definiálni, a fehérjék között az aminosav összetételben is jelentős eltérések lehetnek. Tehát valamelyest az aminosav összetétel is jellemző a fehérjékre (lásd **6.4. táblázat**)

Azt az eljárást, amellyel a fehérje aminosav összetételét meghatározzák, aminosav összetétel analízisnek, rövidítve **aminosav-analízisnek** nevezik. Az eljárás célja, hogy megállapítsa, az adott fehérjében az egyes aminosav fajtákból pontosan hány darab van. Az eljárás tehát nem foglalkozik az aminosav csoportok sorrendjével (ezt a szekvenálás eljárásával határozzák meg).

Az aminosav összetétel analízis feltétele, hogy a vizsgálandó fehérje homogén formában álljon rendelkezésre. A homogenitás egyik legjobb ellenőrzési módja a kétdimenziós gélelektroforézis.

Az eljárás során a fehérjét aminosavakra kell bontani. Ezt a fehérje savas hidrolízisével érik el. A peptidkötések nem-enzimatikus hidrolízise rendkívül lassú folyamat, mert a reakciónak nagyon magas aktivációs szabadentalpia gátja van. A hidrolízist rendkívül „kíméletlen” körülmények közepette végzik, a mintát 6 M sósav oldattal egy teljes napon át egy kuktaszerű készülékben 110-120°C fokon főzik. A folyamat célja ugyan a peptidkötések

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

hidrolízise, de eközben az aszparagin és glutamin oldallánc-amid csoportjai is hidrolizálnak, és aszparaginsav illetve glutaminsav keletkezik. A folyamat során a ciszteinek és a triptofánok egy része is átalakul.

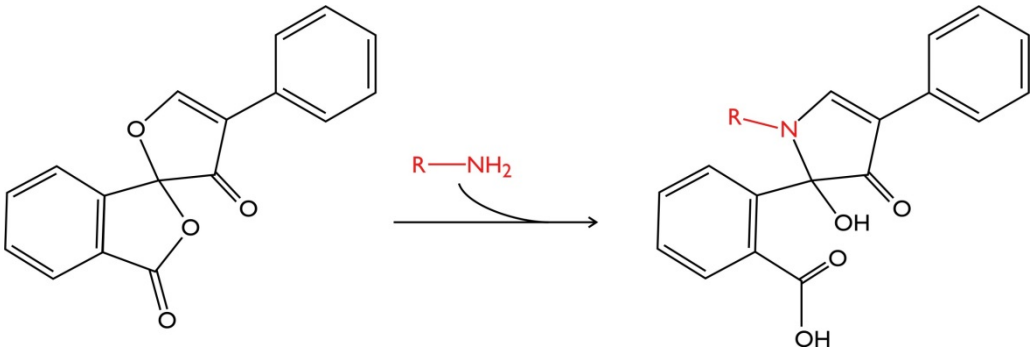
A hidrolízis végeredménye tehát aminosavak keveréke lesz. A cél ezek elválasztása, és az elválasztott aminosavak mennyiségi meghatározása. Az első analízist Stein és Moore az 1950-es évek elején dolgozták ki – az aminosav hidrolizátumot ioncsere oszlopon szeparálták és ninhidriddel detektálták az egyes aminosavakat. A módszer érzékenysége alacsony volt, helyette ma már fluoreszcens detektálást alkalmaznak.

6.4. táblázat: A különböző fehérjék aminosav összetétele eltérő

Aminosav	Aminosavcsoportok száma egy fehérjemolukulára vonatkoztatva	
	szarvasmarha citokróm c	szarvasmarha kimotripszinogén
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	6	8
Cys	3	10
Gln	2	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
összesen	104	245

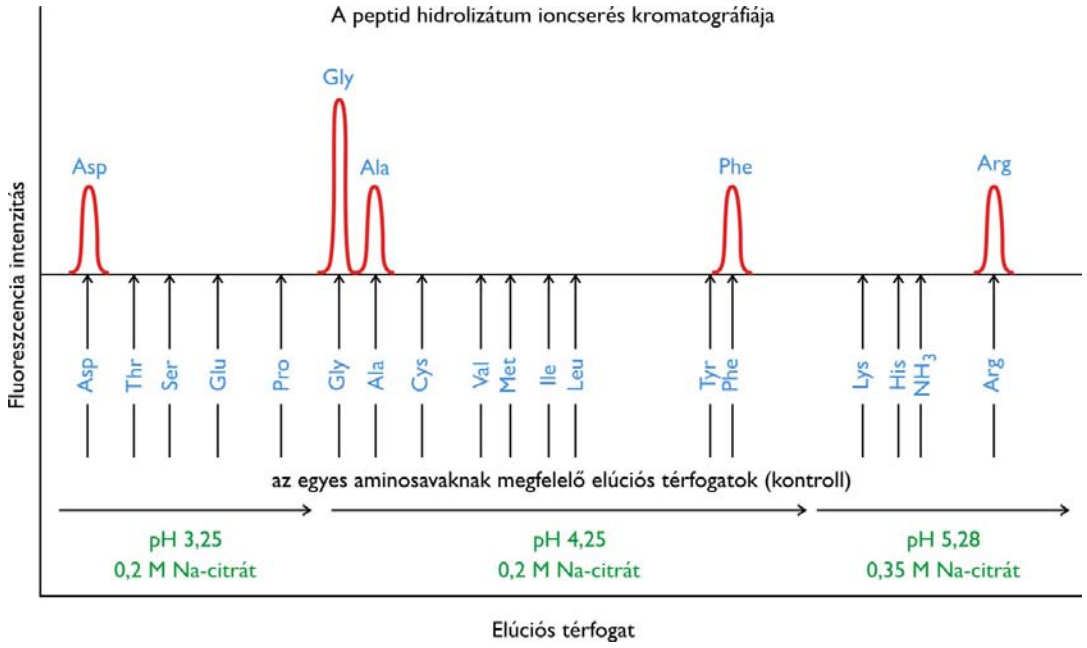
A kvantitatív mérés céljából a mai módszerekben az aminosav keveréket olyan fluoreszcens vegyülettel reagáltatják, ami minden aminosavval reagál, és stabil vegyületet képez. Ilyen például a fluorescamine, amely a minden aminosavakon lévő amin csoporttal reagál (lásd **6.23. ábra**). (A lizin egyszerre két fluorescamine molekulával jelölődik).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.23. ábra: Aminocsoportok fluoreszcens jelölése fluorescamine molekulával

A jelölés után a 20-féle, immár fluoreszkáló komponenst kromatográfiás eljárással elválasztják egymástól, például kation-cserés kromatográfiával (lásd **6.24. ábra**)



6.24. ábra: Fluoreszcensen jelzett aminosavak elválasztása és relatív mennyiségeik meghatározása

Az elválasztás előtt az oszlopot kalibrálni lehet azonos módon jelölt aminosavakkal, minden egyes aminosavra meghatározva, hogy az az adott körülmények között mekkora elúciós térfogatnál jön le az oszlopról. Az elúciós térfogat tehát beazonosítja az egyes aminosavakat. A kromatogáfia során az eluálódó mintát átvezetik egy átfolyó rendszerű küvettán, és egy fluoriméter segítségével meghatározzák a minta fluoreszcencia intenzitását. Ez az adat arányos az anyag mennyiségével (koncentrációjával). Így az elválasztás egyszerre minőségi, és mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz.

Ezek után meghatározzák az elválasztott komponensek egymáshoz viszonyított, tehát relatív mennyiségeit. Belső standard aminosavak alapján abszolút mennyiségi meghatározásra is mód van. A legkisebb jelet adó, tehát legkisebb mennyiségűm aminosavról első menetben feltételezik, hogy abból egyetlen darab volt a fehérjében. Ha ez igaz, akkor az összes többi aminosav jele ennek a jelnek az egészszámú többszöröse. Ha ez nem teljesül, akkor feltételezik, hogy az adott aminosavból a fehérje kettőt tartalmazott. Ez esetben a jelintenzitást elosztják kettővel, majd megnézik, hogy az így kapott értékhez viszonyítva a többi aminosav jele egészszámú többszörös-e. Ezzel az iteratív módszerrel végül meghatározzák, hogy a legkisebb arányban szereplő aminosavból hány darab van a fehérjében. Ezek után a többi aminosav kópiaszáma már a jelintenzitások arányából meghatározható.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.6. A fehérjék szekvenálás

6.6.1. Sanger módszerének lényege, és jelentősége

Ma már közismert, hogy a fehérjék (a DNS által) egyértelműen definiált aminosavsorrenddel rendelkeznek. Mielőtt **Frederick Sanger** az ötvenes évek elején meghatározta az **első fehérjeszekvenciát**, az **inzulin** aminosavsorrendjét, ez még korántsem volt elfogadott tény. Az egyik akkori iskola azt állította, hogy a fehérjék szekvenciájában rövidebb szekvenciarészletek ismétlődnek szabályosan. Más elméletek szerint egy-egy adott fehérje egy olyan molekulapopulációt jelent, amelynek szekvenciája egy átlag körül „mozog”, és az egyes molekulák egymástól akár nagy eltéréseket is mutathatnak. Mindezek az elméletek azért jöttek létre, mert még nem volt ismert, hogy a biológiai információ hogyan tárolódik, és hogyan fejeződik ki. Ezért semmit sem tudtak a fehérjeszintézis mikéntjéről sem. A vegyészek többsége számára nem tűnt reálisnak, hogy létezhet olyan kémiai reakció, amely eredményeként egy akkora polimer, mint a fehérje, 100%-os hatékonysággal szintetizálódna úgy, hogy annak a végeredménye egy homogén fehérjepopuláció legyen.

Sanger átütő jelentőségű eredménye alapján kiderült, hogy a fenti elméletekkel szemben a fehérjének jól definiált aminosavsorrendje van, abban nem ismétlődik semmilyen repetitív szekvencia. Az is nagy felismerés volt, hogy a szekvenciában az aminosavak bármilyen kombinációja megengedett. Eredményéért Sanger 1958-ban kémiai Nobel-díjat kapott.

Sanger teljesítménye az akkori peptidkémia csúcsát jelentette. Elsőként dolgozott ki egy eljárást, amellyel a fehérjék, illetve peptidek N-terminálisán lévő aminosav identitása meghatározható volt. Ehhez kifejlesztett egy új vegyületet, az 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene-t (FDNB). A molekula enyhén lúgos pH-n szelektíven reagál a fehérje aminocsoportjaival, és stabil kovalens terméket képez, aminek intenzív sárga színe van. A termék ellenáll a fehérje, vagy peptid teljes savas hidrolízisének. Az egyetlen α-aminocsoporton módosított aminosav a hidrolízis termékben az eredeti N-terminális aminosav. Ezzel a módszerrel megállapította, hogy az inzulin két polipeptidláncból áll. Az A lánc 21, a B lánc 30 aminosav csoportot tartalmaz.

Akkoriban az aminosav összetétel analízis már ismert volt, és néhány olyan szeparációs technika is elérhető volt, amivel peptideket lehetett egymástól elválasztani.

Sanger mindezek alapján a következő logika mentén fejtette meg a heterodimer inzulin két láncának szekvenciáját:

1) Homogén formában izolálta mindkét láncot.

2) Meghatározta mindkét szekvenálandó fehérjelánc aminosav összetételét (lásd aminosav összetétel analízis).

3) Meghatározta mindkét fehérjelánc N-terminális aminosavát.

4) Részleges (parciális) savas hidrolízissel, illetve proteázos emésztéssel olyan sokféle egyedi kispeptidre hidrolizálta a fehérjeláncot, ahányra csak lehetett. Ezeknek a peptideknek a szekvenciája emiatt természetesen egymással átfedő volt.

5) A tipikusan 2-4 aminosavból álló peptideket különféle kromatográfiás és elektroforetikus módszerekkel elválasztotta egymástól.

6) Mindegyik peptidnek meghatározta az N-terminális aminosavát, és az aminosav összetételét.

7) A nagyszámú peptid N-terminális adataiból, és aminosav összetételéből rekonstruálni lehetett azt az egyetlen lehetséges szekvenciát, amely a mérési adatokkal összhangban volt. Sanger módszere rendkívül munkaigényes volt, és egyáltalán nem nyilvánvaló, hogy általános módszerként is használható lett volna az inzulinnál lényegesen nagyobb fehérjék esetében. Sanger nem is a módszerért, hanem magáért az eredményért, és az abból fakadó nagy horderejű ismeretekért kapott Nobel-díjat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

6.6.2. Aminosav csoportok egyenkénti eltávolítása az N-terminálisról: az Edman-módszer

Amikor Sanger meghatározta az első fehérjeszekvenciát, már ismert volt Pehr Edman módszere. Edman egy merőben újfajta degradációs eljárást dolgozott ki, amivel egyenként volt képes eltávolítani aminosav csoportokat a fehérje N-terminálisáról. Ezt a módszert Sanger ugyan ismerte, de mégsem használta, mert az akkor elérhető technológiák miatt körülményesnek tartotta. Valójában Sanger kísérletes megközelítésének fő logikája és Edman speciális módszere együttesen eredményezték azt az általános, nagy hatékonyságú eljárást, amely azután világszerte elterjedt. Érdemes megjegyezni, hogy manapság már egyszerűbb a fehérjék szekvenciáját a kódoló DNS-szekvenálásán (amelynek kidolgozásáért Sanger egy további Nobel-díjat kapott) keresztül meghatározni, de ismeretlen izolált fehérje minták aminosavsorrendjét a mai napig a Sanger / Edman eljárással fejtik meg. Az alábbiakban ismertetjük ezt a kombinált eljárást.

A fő lépések (egyszerűsítve):

1) A **homogén** formában izolált **fehérjeszekvencia-specifikus felvagdosása** legalább **két** különböző **proteázzal**, és a **peptidek izolálása**. Ezek lesznek az átfedő peptidek

2) Az egyes kapott **peptidek teljes szekvenálása Edman módszerével** (lásd **6.25. ábra** és **6.26. ábra**).

3) A teljes **szekvencia rekonstruálása**

4) **Diszulfidhidak azonosítása** (ha vannak)

Vizsgáljuk meg közelebbről **Edman módszer**ének forradalmian új megközelítését, majd konkrét kivitelezési módját.

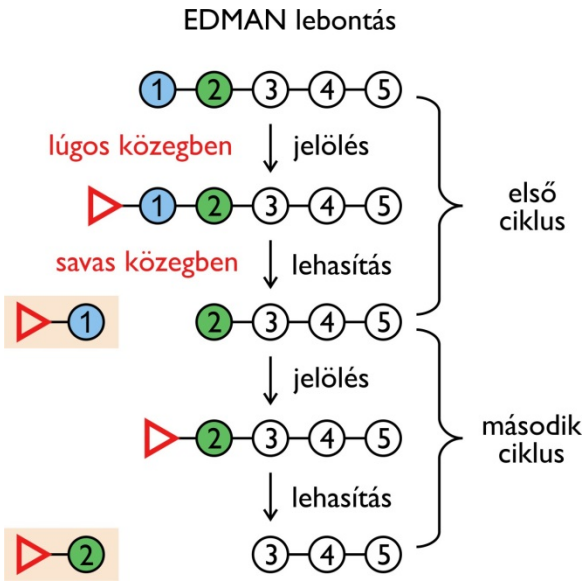
Edman megközelítése a lényegnél ragadta meg a szekvenálás problémáját. Könnyű belátni, hogy a fehérje szekvenálás elvi értelemben legegyszerűbb módja az, ha a polipeptidlánc valamelyik terminálisáról **egyenként, egymást követő lépésekben távolítjuk el az aminosavakat**. Egy-egy lépést követően meghatározzuk, hogy milyen aminosavat szedtünk le. Edman tehát olyan kémiai eljárást dolgozott ki, ami ezt tette lehetővé.

A probléma ugyanakkor ennél többrétű. Képzeljük el, hogy a kémiai eljárásunk, mondjuk az N-terminális felől, egyenként távolít el aminosavakat. Egyéb speciális megoldás híján, amint az eljárás eltávolítja az első aminosavat, a második kerül a terminálisra, amit az eljárás természetesen szintén eltávolít. Ezután jön a harmadik aminosav, és így tovább. Önmagában egy ilyen reakció tehát kontrollálatlanul halad előre. Emiatt pillanatok alatt lehetetlenné válik meghatározni, hogy az egyes aminosavak milyen sorrendben voltak.

Edman eljárásának azonban van egy elementárisan fontos jellegzetessége.

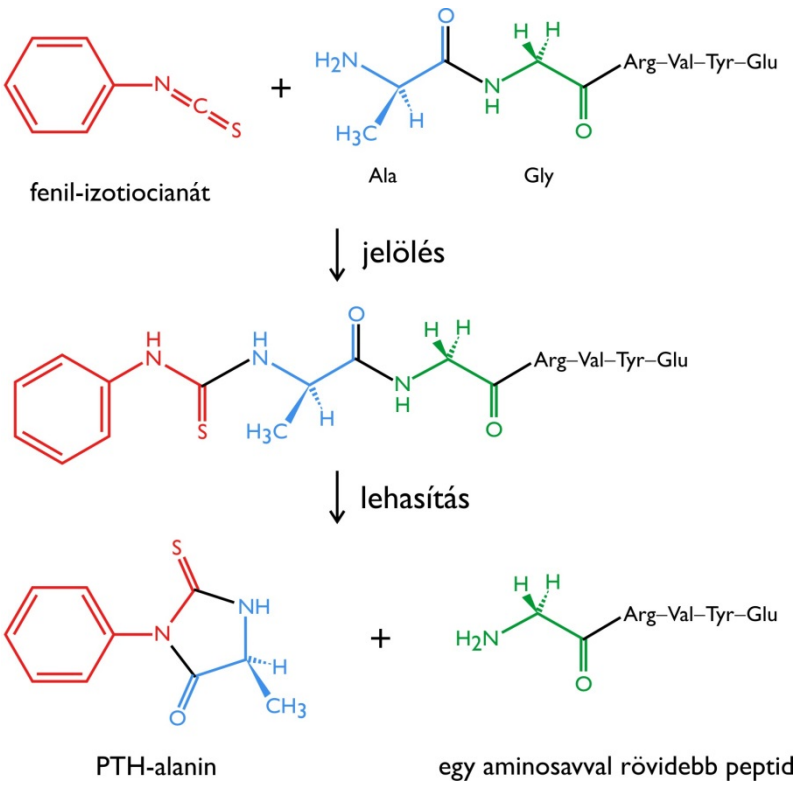
A kémiai reakciót két egymást követő lépésre bontotta, amelyek egymástól erősen eltérő körülmények között mennek csak végbe. Olyan körülmények között, ahol az első lépés végbemegy, a második lépés nem megy végbe, míg olyan körülmények között, ahol a második megy végbe, az első lépés nem zajlik le.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.25. ábra: Az Edman eljárás elvi vázlata

Nézzük meg ezt konkrétabban (lásd **6.26. ábra)**.



6.26. ábra: Az Edman eljárás molekuláris mechanizmusa

Az **N-terminális aminosav eltávolításának első lépése** olyan **magas pH**-t igényel, ahol az a-aminocsoport nem hordoz pozitív töltést. Ezen a pH-n reagáltatjuk a fehérjét fenil-izotiocianáttal, amely kovalens kötést hoz létre az aminocsoporttal. Ezután a **pH-t savasra állítjuk**, amikor is **lezajlik a második lépés**. Az N-terminális aminosavat követő peptidkötés a kovalens módosítás miatt szelektíven destabilizálódik, és savas pH-n gyorsan elhasad. A módosított aminosav leválik, megjelenik az új N-terminális.

A **fenil-izotiocianát**tal jelölt aminosav fluoreszkál. Az aminosav csoporton keresztül kromatográfiával megállapítható, hogy melyik aminosavról van szó, a fluoreszcens csoporton keresztül pedig igény szerint a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

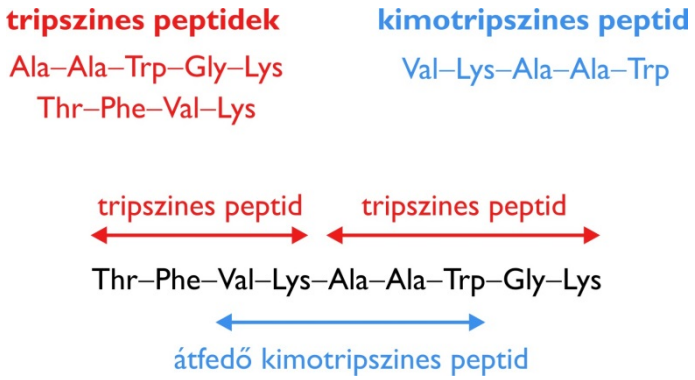
mennyisége is meghatározható. Mivel a közeg savas, ezért hiába van jelen feleslegben fenil-izotiocianát, az nem reagál az új N-terminálissal. A reagenseket, a jelölt aminosavat és az eggyel rövidebb fehérjét egymástól elválasztjuk, és újra végrehajtjuk a fent leírt lépéseket.

Ez a megközelítés oldatban is működik, de minden ciklust követően nagyhatékonyságú elválasztási lépéseket igényel.

Edman módszerének hatékonyságát tovább növelte az az újítás, melynek során a reakciót **oldatfázis helyett szilárdfázison** hajtották végre. A fehérjét egy megfelelő szilárd hordozóra kötötték. A magas pH-n végrehajtott fenil-izotiocianátos jelölést követően a szilárd fázisról egyszerűen lemosható a fenil-izotiocianát felesleg. Az oldatkörnyezet is könnyen lecserélhető savasra, és a felszabaduló módosított aminosav könnyen lemosható. A szilárd fázison történő végrehajtás könnyen automatizálhatóvá tette az eljárást. Az Edman módszerrel **mintegy 50 aminosavnyi szakaszok szekvenciáját lehet nagy biztonsággal meghatározni**.

A fehérjék túlnyomó része több száz aminosavból áll. A teljes szekvencia rekonstruálásához ezért a fehérjét szekvencia-specifikus módon kell hasítani, a keletkező peptideket el kell választani egymástól, és külön-külön meg kell szekvenálni. Ha pl. tripszinnel emésztjük meg a fehérjét, akkor minden lizint és arginint követő peptidkötés hidrolizál, és egymással szekvenciálisan át nem fedő peptideket kapunk, amelyek C-terminálisán csak lizin, vagy arginin lehet (az eredeti C-terminálist tartalmazó peptid kivételével). Ha csak tripszinnel hasított peptideket szekvenálnánk, akkor nem tudnánk az eredeti sorrendbe rendezni őket.

A megoldás az, hogy egy másik, a tripszintől eltérő szelektivitású proteázzal is hasítjuk a fehérjét. Például kimotripszinnel, ami triptofán, tirozin és fenilalanin után hasít. Az így kapott peptideket is megszekvenáljuk. A tripszines és kimotripszines peptidek átfedő információt tartalmaznak, így az összehasonlításukból egyértelműen rekonstruálható az eredeti szekvencia, amelyből származtak (lásd **6.27. ábra)**



6.27. ábra: Két eltérő specifitású proteázzal hasítva a fehérjét, átfedő peptidek keletkeznek, amelyek külön-külön meghatározott szekvenciájából a teljes szekvencia rekonstruálható

6.6.3. A diszulfidhidak pozíciójának meghatározása

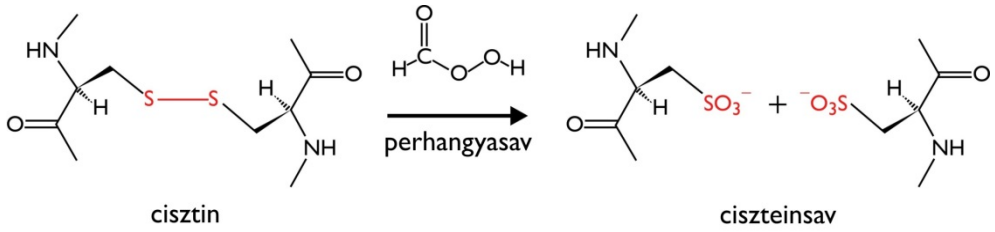
Ha a fehérjében diszulfidhidak vannak, akkor azokat is azonosítani kell. Minden diszulfidhídban szereplő cisztein esetében meg kell állapítani, hogy melyik másik ciszteinnel alkot diszulfidot. Ezt a következő lépésekből álló eljárással lehet kideríteni:

1.) A fehérje kis peptidekre hasítása savas közegben, ahol a diszulfidhidak épen maradnak. A megfelelően végrehajtott hasítás eredményeként kizárólag monomer és dimer peptidek keletkeznek, és minden dimer peptid csak egyetlen diszulfidhidat tartalmaz.

2.) A peptidek elválasztása papír elektroforézissel. Az egyes peptidek eltérő töltésűek, és összetételüknek megfelelően eltérő módon alakítanak ki gyenge kölcsönhatásokat a papírral, mint hordozó közeggel. Emiatt eltérő sebességgel vándorolnak.

3.) Az elválasztott peptidek perhangyasav gőzzel való kezelése a papíron. A kezelés során a diszulfidhidak felbomlanak, és a dimer peptidek helyett két monomer peptidek kapunk, amelyek 1-1 extra negatív töltést hordoznak a rajtuk megjelenő ciszteinsav csoport miatt (lásd **6.28. ábra**).

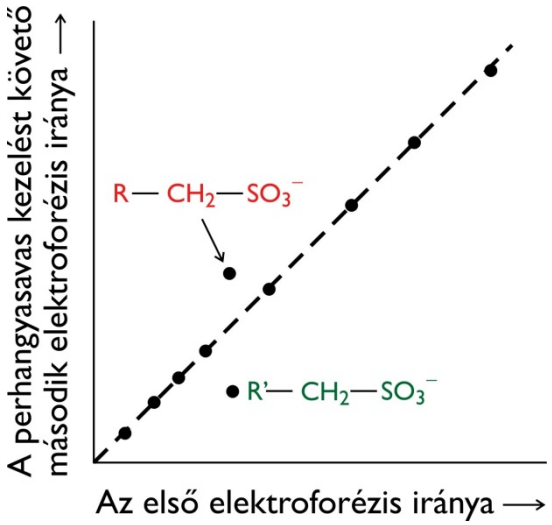
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



6.28. ábra: A diszulfidhidak felnyitása és a ciszteinek módosítása perhangyasavas kezeléssel

4.) Újabb elektroforézis az előzővel merőleges irányban. Ennek során a monomer peptidek ugyanolyan sebességgel vándorolnak, mint az első elektroforézis során, így a második elektroforézis végére a papír átlóján helyezkednek el. Az eredetileg dimer, de a kezelés során monomerré váló peptidek azonban a második elektroforézis során már megváltozott sebességgel vándorolnak, így az átlón kívül helyezkednek el (lásd **6.29. ábra**).

5.) Átlón kívüli minták szekvenálása. Ezzel pontosan meghatározható, hogy mely peptidek alkottak egymással dimereket, és ezen keresztül meghatározható, hogy mely ciszteinek alkottak egymással diszulfid hidat.



6.29. ábra: A diagonál módszer azonosítja a diszulfidhíddal összekapcsolt peptideket

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

7. fejezet - A fehérjeműködés paradigmája: mioglobin és hemoglobin

(szerző: Pál Gábor)

A fehérjék szinte felsorolhatatlanul sokféle funkciót töltenek be az élő szervezetben. Ugyanakkor vannak olyan, a működésükkel kapcsolatos általános jellegzetességek, amelyek majdnem minden fehérje esetében tetten érhetők. Ezek általános ismertetése helyett azonban didaktikai okokból célszerűbb ezeket egyetlen, jól megválasztott fehérje példáján bemutatni. Ilyen klasszikus példa a hemoglobin esete, amely mintegy „állatorvosi lóként" szépen példázza a közös jellegzetességek többségét. A hemoglobin működésének jellemzése mindemellett tudománytörténetileg is kiemelkedő szereppel bírt. A mioglobin után ez volt a második olyan fehérje, amelynek atomi szintű térszerkezetét megoldották, és ezzel összefüggésben ez volt az első olyan fehérje, amelynek működési mechanizmusát sikerült atomi szinten értelmezni.

7.1. A fehérjék működésének általános jellemzői

Gyakorlatilag minden **fehérjé**re igaz, hogy működése során kötődik más molekulákhoz, amiket általánosságban **ligandum**nak nevezünk (két fehérje kölcsönhatása esetén nézőpont kérdése, hogy melyiket tekintjük ligandumnak – egy antitest esetében például az általa felismert antigén a ligandum).

A ligandumkötés az esetek túlnyomó többségében specifikus, aminek az oka az, hogy a ligandummal szerkezetileg komplementer **ligandum-kötőhely**en keresztül jön létre a kölcsönhatás. Az esetek többségében **a ligandumkötés reverzibilis**.

Ugyancsak kevés kivételtől eltekintve a működéshez az is szükséges, hogy a fehérje térszerkezete valamilyen mértékben megváltozzon (**ligandumkötés kiváltotta konformációváltozás**). A fehérjén belüli mozgások részben kis amplitúdójú, gyors mozgások, amelyekben főleg az oldalláncok rotációja dominál. Ezeknek a mozgásoknak az időtartama a pikoszekundumos tartományba esik. Ezen felül többdoménes fehérjék esetén a domének egy rendezettebb mozgás keretében egymáshoz képest elmozdulhatnak. Ennek a mozgástípusnak az időtartama a nanoszekundumos tartományban van.

Az eddig megismert kölcsönhatások jelentős részében a ligandum nem egyformán kötődik az egymástól kissé eltérő konformációjú állapotokhoz, mintegy válogat ezek közül. Ennek leírására vezették be a **konformáció-szelekció** (*conformation-selection*) **modell**jét. Más esetekben kimutatható, hogy a fehérje szabad formában egy adott konformációs állapotban van, és maga a ligandum kötődés az, ami konformációváltozást indukál. A komplexben mutatott fehérje-konformációhoz jobban illeszkedik a ligandum, mint a szabad fehérje konformációjához. Ennek leírására vezették be az **indukált illeszkedés** (*induced fit*) **modell**jét.

Ha a fehérje egyidejűleg **több ligandum**mal is komplexet alkothat, akkor az egyik ligandum kötése szabályozhatja a másik kötését. Ez a fehérjeműködésének egy rendkívül rugalmas, kifinomult szabályzását, az úgynevezett **allosztérikus szabályzás**t teszi lehetővé (lásd **17.2. fejezet**).

A hemoglobin működése az összes fent említett jelenségre konkrét példával szolgál. Mielőtt ezeket sorra vesszük, ismerkedjünk meg az oxigénkötés alapvető problémájával.

7.2. Az oxigénkötés alapvető problémaköre

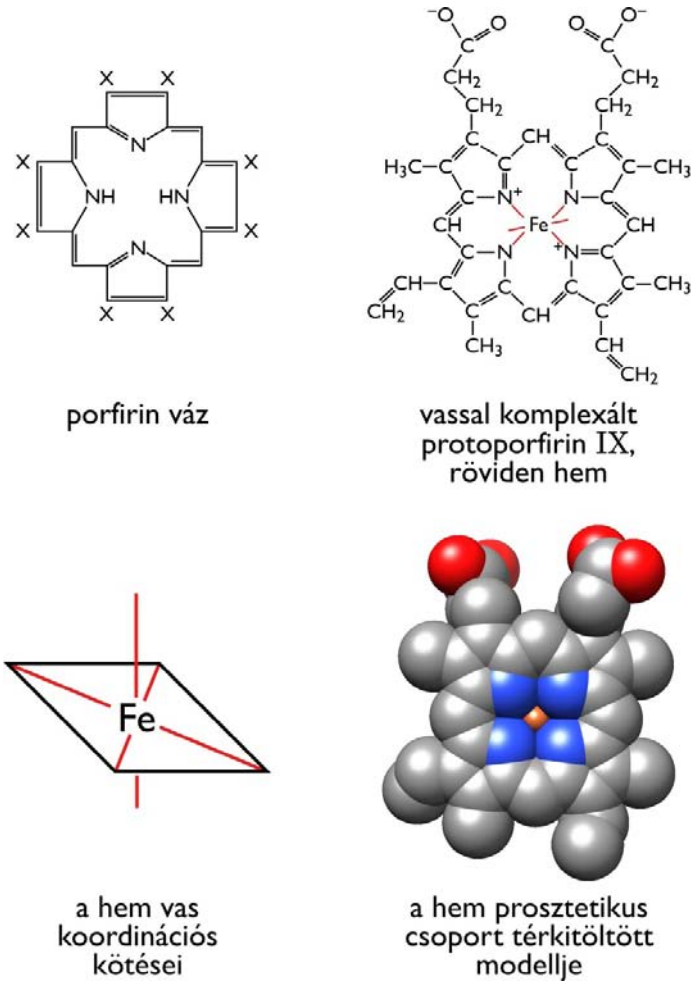
Az aerob élőlények sejtjeinek a biológiai oxidációhoz oxigénre van szükségük. Az oxigén azonban rosszul oldódik vízben. Az oxigén sejteken keresztüli diffúziója nem elég hatékony megoldás. Az **oxigént** tehát valamilyen módon **szállítani kell**, egy vízben jól oldódó molekulába kell csomagolni.

Mivel a szervezetben szinte minden funkciót fehérjék látnak el, ezért kézenfekvő, hogy az oxigén szállítását is fehérje végzi. Ez valóban így is van, de ennek lehetősége sokkal kevésbé magától értetődő, mint ahogy azt elsőre gondolnánk. A 20 fehérjealkotó aminosav közül ugyanis egyik sem képes oxigént kötni. A fehérjék egy része

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

ugyanakkor képes közvetlenül aminosavakon keresztül komplexet képezni fémionokkal, amik pedig ragyogóan képesek megkötni az oxigént. A probléma azonban az, hogy ez a kötés rendszerint nem áll meg egy egyszerű másodlagos kölcsönhatásnál, a fémek kémia reakcióba lépnek az oxigénnel, miközben reaktív, mutagén gyököket képeznek.

A fémet tehát valahogy úgy kellene fehérje molekulába ágyazni, hogy az megkösse az oxigént, de ne lépjen vele kémiai reakcióba. Erre szolgál a fehérjemolekulához kötődő, nem-fehérje természetű szerves molekula, a **hem**. A hem alapja a porfirin váz, amely 4, egymással metin csoportokkal összekötött pirrol gyűrűből áll. A konkrét hemtől függően a pirrol gyűrűkön gyűrűnként kettő, tehát a hemen összesen nyolc pozícióban különféle funkciós csoportok lehetnek jelen (lásd **7.1. ábra**).



7.1. ábra: A profirin váz szerkezete, a hem felépítése, a vas koordinációs kötései

A **hem** delokalizált elektronszerkezettel bír. Képes Fe^{2+} ionnal, tehát kettes oxidációs számú ferro-vassal, és Fe^{3+} ionnal, azaz hármas oxidációs számú ferri-vassal is **komplex**et képezni. Mindkét állapotú vas **hat ligandum atom** fogadására képes. Ezek közül négy ligandum atomot a porfirin váz négy nitrogénje biztosít. A másik két koordinációs pozíció miatt még két ligandum kötődhet. Az egyik, mint látni fogjuk, a fehérje által biztosított hisztidin oldallánc nitrogénje, a másik az oxigénmolekula lesz. A ferro-vasat tartalmazó hem képes oxigént kötni, míg az oxidáltabb ferri-vas hem komplexe inkább vízzel alkot komplexet, ami barna színű. (A Fe^{2+} kötése során a pirrol aminocsoportok protont adnak le, aminek jelentőségéről később lesz szó). Az oxigénkötő fehérjében a **hem**, **valamint a fehérje együttesen** olyan elektrongazdag rendszert képeznek, amely eredményesen **védi** az oxigént kötő **ferro-vasat az oxidációtól**. Ez a védelem szűnik meg akkor, amikor a vér megalvad, és a benne lévő hemoglobin denaturálódik. Ennek hatására a hemben lévő ferro-vas ferri-vassá oxidálódik, és vízzel alkot komplexet. Ez magyarázza az olvadt vér barna színét.

A hemoglobin működését tanulságos a mioglobin működésével összevetve elemezni. A két molekula az evolúció során egy közös fehérjéből alakult ki. Felépítésükben és működésükben vannak lényeges azonosságok és

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

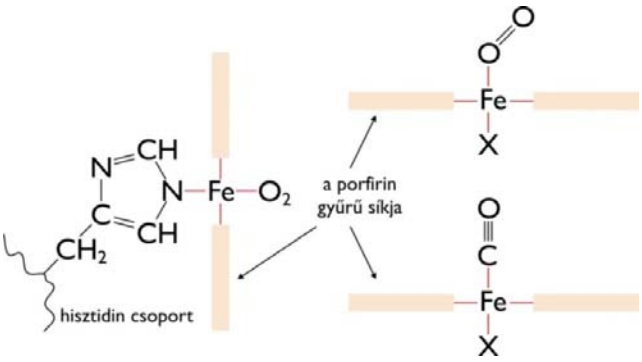
különbségek. A működési azonosságok illetve eltérések jól magyarázhatók a szerkezeti azonosságokkal és eltérésekkel, ahogyan az a szerkezet és a funkció egymásra épülése miatt várható is.

7.3. A mioglobin és a hemoglobin összehasonlítása

A **mioglobin (Mb)** a gerincesekben előfordul fehérje, amit különösen az izomsejtek tartalmaznak nagy mennyiségben (innen a „mio" előtag). Biológiai funkciója az **oxigén** ideiglenes **tárolása**. A tengeri emlősök, például a cetek és a fókák izmában különösen nagy mennyiségben fordul elő, ez adja például a bálnák izomszövetének mélybordó színét. A tengeri emlősök nagyon hosszú időt képesek a víz alatt tölteni, azért mert ez idő alatt a mioglobinban raktározott oxigént használják fel. A mioglobin **egy**etlen **polipeptidlánc**ból áll, amely **egy**etlen **hem** csoportot tartalmaz. A mioglobin a **globin fehérjék családjá**ba tartozó globuláris fehérje. Mivel hemet köt, a **hemoproteinek** közé tartozik.

A mioglobinnal ellentétben a **hemoglobin(Hb)oxigénszállító** funkcióval rendelkezik. Ez a fehérje is jelen van minden gerincesben, mégpedig a vörösvérsejtekben / vörösvértestekben. A koncentrációja igen magas, a sejt tömegének 34 százalékát a hemoglobin teszi ki. A hemoglobinban **négy polipeptidlánc** van, a fehérjét **két α két β** lánc alkotja, tehát a hemoglobin egy **heterotetramer** (az α és β alegység szekvenciája ~50%-ban azonos). **Lánconként egy hem**et tartalmaz, tehát egy hemoblobin molekulában összesen négy hem van.

A két fehérje **közös tulajdonság**ai az alábbiakban foglalhatók össze. A Fe^{2+} két, hem által szabadon hagyott **koordináció**s pozíciója közül az egyiket mindkét fehérjében az 93-as hisztidin oldallánc $N_{\varepsilon}2$ nitrogénatomja foglalja el. Ez a hisztidin oldallánc mindkét fehérjében a fehérjeszerkezet azonos pozíciójában van. Ezt a hisztidint mindkét fehérjében **proximális** (közeli) **hisztidin**nek nevezik. A fennmaradó egyetlen koordinációs pozícióhoz kapcsolódik az **oxigén** (lásd **7.2. ábra**).



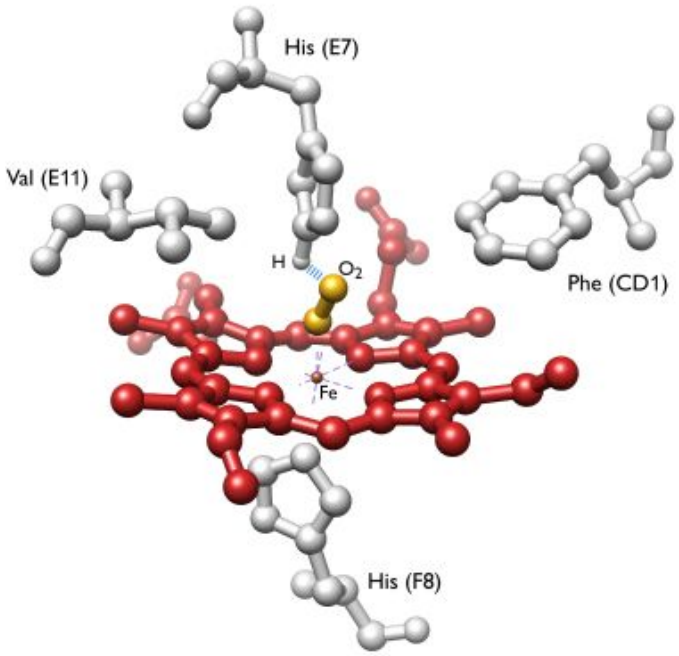
7.2. ábra: A hem és a proximális hisztidin által koordinált vas oxigén- illetve szénmonoxid-kötése

Ismert tény, hogy a hemoglobin és a mioglobin az oxigén mellett a **szénmonoxidot** is meg**köt**i, mégpedig jóval erősebben, mint az oxigént. Izolált hem 20-ezerszer erősebben köti a szénmonoxidot, mint az oxigént. Ezt úgy kell érteni, hogy ahhoz, hogy az oldatban lévő hem fele oxigén-kötött állapotban legyen, 20 ezerszer akkora oxigén koncentrációra van szükség, mint amekkora szénmonoxid koncentráció kell ahhoz, hogy a hem csoportok fele szénmonoxidot kössön. A mioglobin illetve hemoglobin fehérjéhez kötött hem esetében azonban ez az arány százszor kedvezőbb, vagyis a fehérjébe ágyazott hem már „csak" 200-szor erősebben köti a szénmonoxidot, mint az oxigént. Mivel normális esetben szénmonoxid csak nyomokban kerül a vérbe, ez a 200-szoros arány azt jelenti, hogy praktikusan csak az oxigén kötődik. Ha azonban a környezetből szénmonoxidot lélegzünk be, az a hem tartalmú fehérjékhez kötődve életveszélyes állapotot eredményez.

Annak, hogy a fehérje az izolált hem esetében tapasztalt affinitás arányokat két nagyságrenddel megváltoztatja, szerkezeti okai vannak. Elektronszerkezeti okok miatt a szénmonoxid molekula a hem síkjára merőleges orientációban köt a vashoz, míg az oxigén molekula ferdén köt be. A mioglobin és a hemoglobin fehérjében egyaránt van egy **disztális** (távoli) **hisztidin** (His64, lásd **7.3. ábra**). Ez útjában áll a szénmonoxidnak, így a kötésekor el kell mozdulnia, aminek energetikai ára van. Ez az energetikai ár csökkenti a szénmonoxid kötési

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

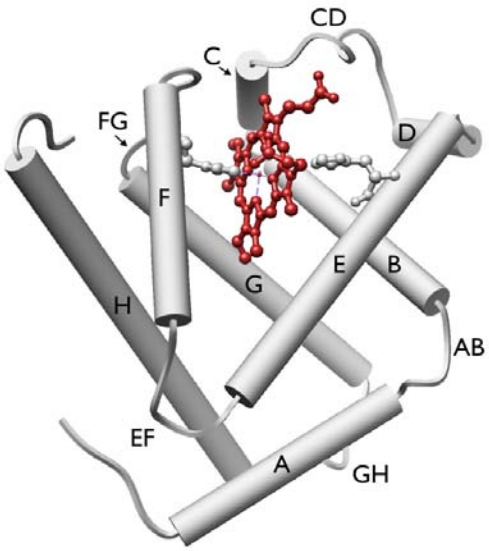
energiáját. Ráadásul ugyanez a hisztidin optimális pozícióban van ahhoz, hogy H-híd kötést létesítsen az oxigén molekula vasionnal kötést nem létesítő atomjával (lásd **7.3. ábra**).



7.3. ábra: A disztális hisztidin elősegíti az oxigén kötődését, míg gyengíti a szénmonoxid kötődését

A mio- és hemoglobin további közös jellegzetessége, hogy a hem oxigénkötő felszíne mindkét molekulában mélyen el van rejtve a fehérje belső, hidrofób környezetébe. Az oxigén csak a f**ehérjemolekula** mozgása, „**légzése”** révén képes bejutni.

A mioglobin, és a hemoglobin alegységei az **alfa-hélikális** fehérjék szerkezeti osztályába tartoznak (ezt a térszerkezet típust **globin *fold***-nak hívják). Az egyes α-hélixeket, és a hélixeket összekötő szakaszokat azonos módon jelölik a két fehérjében, A-tól H-ig. Az egyes aminosavak a hélixek alapján is számozhatók, ami egyfajta térszerkezeti információt is ad. Például a His F8 a proximális hisztidin, míg a His E7 a disztális hisztidin. Az egyik az F hélix 8. pozíciójában, a másik az E hélix 7. pozíciójában van (lásd **7.4. ábra**).



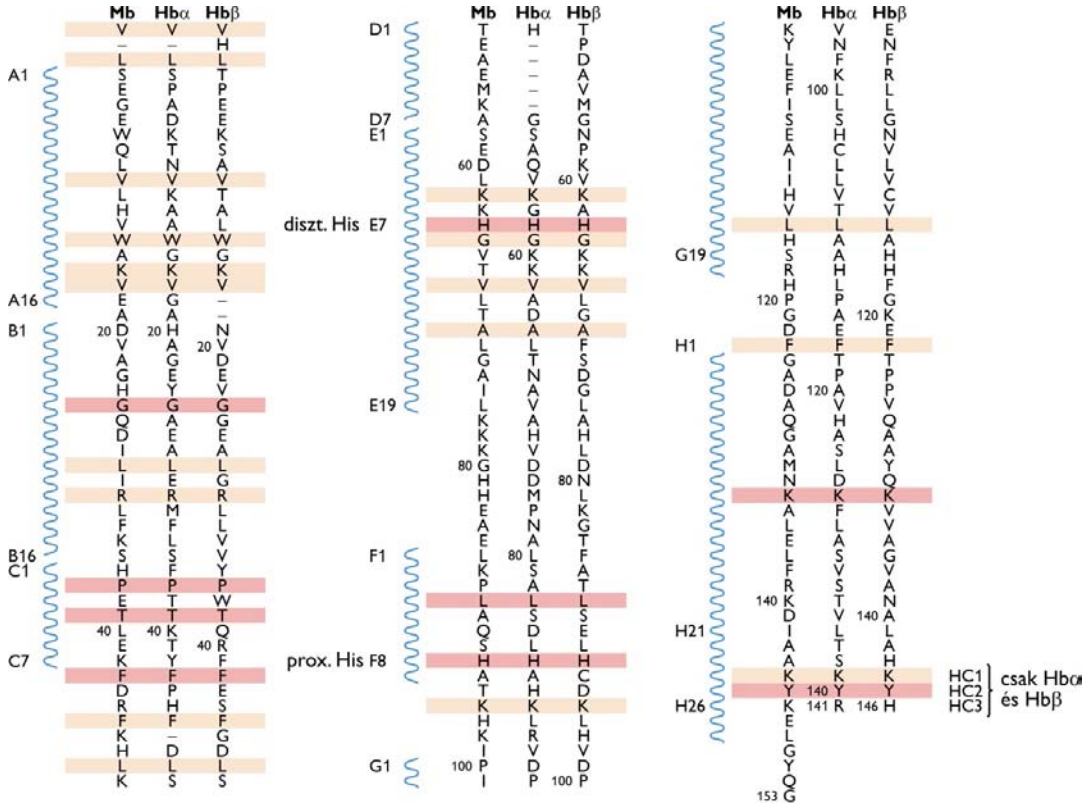
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

7.4. ábra: A globin szerkezetben a hélixeket és az azokat összekötő szakaszokat betűkkel jelölik (PDB: 1MBD)

A **mioglobin, a hemoglobin α- és a β-lánc** szekvenciájának összehasonlítása fontos **fehérjeevolúció**s tanulságokkal szolgál.

A mioglobin szekvenciája 18%-ban azonos a hemoglobin láncok szekvenciájával. Két egymástól teljesen független szekvencia esetén nagyjából 5% hasonlóság várható (mivel 20 aminosav féleség van, 1/20-ad az aránya a véletlen egybeesésnek). Ugyanez a hemoglobin két lánca között 43%. A szekvenciák összehasonlításából (lásd **7.5. ábra**) kitűnik, hogy vannak olyan pozíciók, amelyeken mind a három fehérje láncban ugyanaz az aminosav szerepel. Ezeket drapp háttér emeli ki. Ami még figyelemreméltóbb, hogy vannak olyan pozíciók is, ahol az adott pozícióban az összes ismert, a globin családba tartozó fehérjében ugyanaz az aminosav fordul elő! Ezeket piros háttér emeli ki. Vegyük észre, hogy a már megismert **proximális és disztális hisztidin** minden globinban jelen van, ami egyértelművé teszi, hogy funkcionálisan lényeges aminosavról van szó. A többi **konzervált (és invariáns) pozíció**nak szerkezeti szerepe van. (Invariánsnak nevezünk egy aminosav pozíciót, ha több, egymással összehasonlított polipeptidláncban azonosak, míg konzervált a pozíció, ha nem feltétlenül azonos, de kémiailag rokon aminosavakat találunk az adott pozíciókban. Az egymás alá/mellé rendezést szekvenciaillesztésnek, angolul *alignment*-nek hívjuk – ez a bioinformatikai eljárás a fehérjeevolúció vizsgálatának egyik alapmódszere.)

A szekvencia hasonlóság oka természetesen az, hogy ezeknek a fehérjeláncoknak **közös ős**ük volt. A távoli múltban volt egy ősi globin fehérjét kódoló gén, amely minden ma ismert globin fehérje génjének a közös őse. Már ez a gén is kódolta azokat az aminosav pozíciókat, amelyek az összes ma létező globin fehérjében közösek. Ez az **ős-gén** az evolúció során **duplikálódott**, tehát abban a sejtben, amelyben csak egy ilyen gén volt, immár kettő lett. Az egyik megtarthatta az eredeti funkcióját, a másik új funkciót nyerhetett. A két gén tehát külön evolúciós utat járhatott be, és természetesen a későbbiekben mindkettő szintén duplikálódhatott.



7.5. ábra: A két hemoglobin alegység és a mioglobin szekvenciájának összehasonlítása

A ma ismert globin gének tehát egymásból származtak, és külön evolúciós utat jártak be. Az ilyen, egymással rokonságot mutató fehérjéket (és a génjeiket is) **homológ**nak nevezzük. Az egy fajon belüli homológ fehérjék (és gének), mint a hemoglobin két lánca és a mioglobin, **paralógok**. Két fajból származó, azonos funkciójú (és természetesen közös őstől származó) fehérjék/gének pedig **ortológok**.

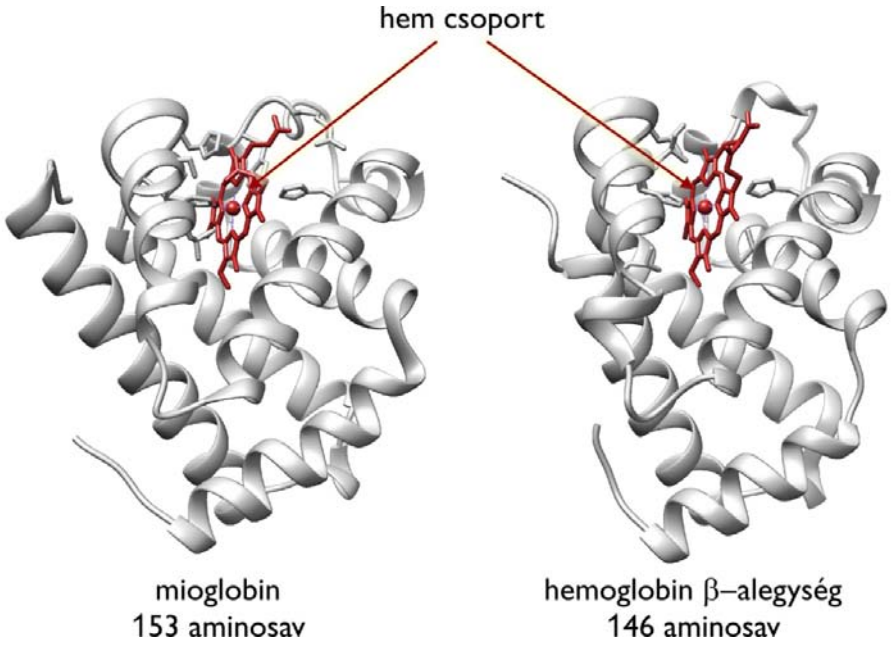
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A sokféle globin fehérje eltérő funkciókra adaptálódott az evolúció során, szekvenciájuk a sorozatos mutációk és az adaptív szelekció következtében eltávolodott egymástól (**divergens fehérjeevolúció**). Előbb a mostani mioglobin gén őse vált el a mostani hemoglobin gének közös ősétől, majd később a hemoglobin gének közös őséből keletkeztek a ma ismert hemoglobin láncok génjei.

Ez tükröződik abban, hogy a hemoglobin láncok szekvenciája egymáshoz jobban hasonlítanak, mint a mioglobinhoz. A **génduplikáció**, majd az utódgének független evolúciója **a fehérjeevolúció egyik alapmechanizmusa**.

A viszonylag alacsony szintű szekvencia azonosság ellenére a hemoglobin két alegységének és a mioglobinnak a térszerkezete rendkívül hasonló (lásd **7.6. ábra**).

Általános megfigyelés, hogy **a térszerkezet konzervatívabb, mint a szekvencia**. A funkciót elsősorban a térszerkezet szabja meg, ezért a szelekció elsősorban a térszerkezet megőrzése irányában hat. Azok a kulcspozíciók, amelyek kiemelt szereppel bírnak a térszerkezet kialakításában, illetve azok, amelyekben csak és kizárólag egyfajta aminosav képes az adott térszerkezeti, vagy egyéb funkciót ellátni, megőrződnek (lásd **7.5. ábra**). Más pozíciókban bekövetkezhetnek olyan aminosav cserék, amelyek nem eredményeznek lényeges térszerkezet változást. Mindez nem ellentétes Anfinsen következtetésével. A szekvencia szabja meg a térszerkezetet, de két nagyon eltérő szekvencia is kódolhat szinte megegyező konformációt.



7.6. ábra: A mioglobin és a hemoglobin alegység(ek) térszerkezete rendkívül hasonló

7.4. A reverzibilis ligandum-kötés általános matematikai leírása

A mioglobin és a hemoglobin kismolekulát, tehát ligandumot kötő fehérjék. Ahhoz, hogy a ligandum-kötő tulajdonságaikat mennyiségileg is jellemezni tudjuk, be kell vezetnünk az ehhez szükséges egyenleteket.

Az alábbi egyenletekben egy általános fehérje (P, protein) köt ligandumot (L) az alábbi egyszerű séma szerint:

$$P+L \rightleftharpoons PL$$ **7.1. egyenlet**

A **7.1. egyenlet** az alábbi, az egyensúlyt kifejező egyenlethez vezet:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$ **7.2. egyenlet**

A **7.2. egyenlet**ben **K_a az asszociációs állandó**, PL a fehérje-ligandum komplex, P, a fehérje, L a ligandum, a szögletes zárójel pedig molaritásban kifejezett koncentrációt jelöl. Emlékezzünk rá, hogy a **disszociációs állandó, a K_d** az asszociációs állandó reciproka. (K_d = 1/ K_a; a két állandó közül a K_d-t használják gyakrabban, részben azért, mert koncentráció dimenziója miatt szemléletesebb kifejezője a kötéserősségnek).

A **7.2. egyenlet** egyszerű átrendezésével a **7.3. egyenlet**hez jutunk.

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]}$$ **7.3. egyenlet**

Az egyenlet szövegesen kifejezve azt mutatja meg, hogy a komplexált fehérje és a szabad fehérje aránya egyenesen arányos a szabad ligandum koncentrációjával.

Nagyon fontos megállapítás, hogy amennyiben az összes ligandum koncentrációja nagyságrendekkel meghaladja a fehérje koncentrációját, úgy a szabad ligandum koncentrációja nagyságrendekkel meg fogja haladni a komplexben lévő ligandum koncentrációját: [L]>>[PL]. A komplexben lévő ligandum koncentrációja ugyanis legfeljebb akkora lehet, mint a fehérje koncentrációja.

Ez viszont azt jelenti, a teljes ligandum koncentrációból elhanyagolható mértékű lesz a komplex részesedése, így a teljes ligandum és a szabad ligandum koncentrációja jó közelítéssel azonosnak tekinthető: [L] ≈ $[L]_{totál}$. Számos biológiai példa, így az oxigénkötő fehérjék esetére is teljesül ez a feltétel.

A **7.3. egyenlet**et átrendezve a **7.4. egyenlet**et kapjuk, amit a következő lépésben felhasználunk.

$$K_a[L][P] = [PL]$$ **7.4. egyenlet**

A **7.3. egyenlet** és a **7.4. egyenlet** kombinálásával a **7.5. egyenlet**rendszerhez jutunk, amelyben bevezetjük a telítés fogalmát.

$$\theta = \frac{[PL]}{[PL]+[P]} = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P]+[P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L]+1} = \frac{[L]}{[L]+\frac{1}{K_a}} = \frac{[L]}{[L]+K_d}$$ **7.5. egyenlet**

A **telítés (teta, θ**) fogalma rendkívül egyszerű, ugyanakkor központi jelentőségű. A telítés azt mutatja meg, hogy **az összes fehérje hanyadrésze van komplexben,** tehát ligandumkötött állapotban. Vegyük észre, hogy a **7.5. egyenlet** nevezőjében a teljes fehérjekoncentráció szerepel, hiszen a szabad fehérje és a komplexben lévő fehérje koncentrációja együttesen a teljes fehérje koncentrációt adja meg. A telítés értéke 0 és 1 között lehet.

Ha nincs PL komplex, (mert nincs jelen ligandum), akkor a telítés értéke nulla.

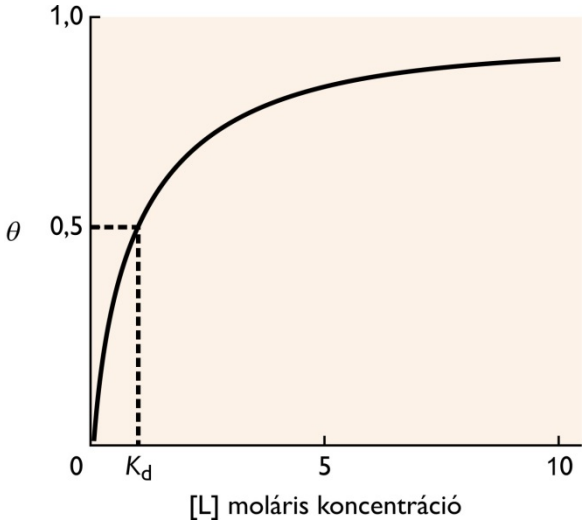
Ha pedig az összes fehérje PL komplexben van, mert „végtelenül” nagy a ligandum koncentrációja, akkor a nevezőben lévő szabad fehérje koncentráció lesz nulla, a hányados értéke pedig egy lesz.

Vegyük észre, hogy az egyenletrendszer egyszerűsítésekor a fehérje koncentrációja „kiesik”. Elsőre ez talán meglepő lehet, hiszen miért ne függene a telítés mértéke a fehérje koncentrációjától. A megoldás az, hogy az utolsóként kapott egyenletben a szabad ligandum koncentrációja, és a K_d, tehát a disszociációs állandó szerepel. A disszociációs állandóban pedig rejtve ugyan, de szerepel a szabad fehérje és a komplexben lévő fehérje aránya.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

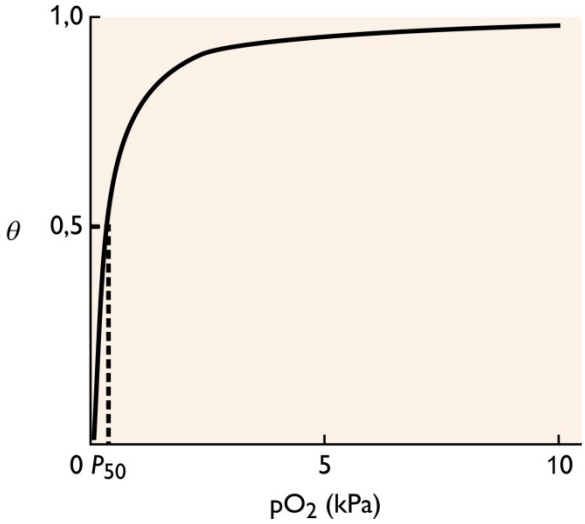
Mindenesetre a disszociációs állandó kísérletes meghatározását követően bármely szabad ligandum koncentrációnál meg tudjuk mondani, hogy mekkora a telítés értéke. **Ha** a fent már említett **[L] ≈ $[L]_{totál}$** összefüggés fennáll, akkor pedig **számolhatunk** a szabad helyett **a teljes ligandum koncentrációval**, amit kísérletesen mi szabunk meg.

A **7.5. egyenlet**ből látható, hogy amikor a szabad ligandum koncentrációja éppen megegyezik a disszociációs állandó számértékével, akkor a telítés értéke 0,5. Ez azt jelenti, hogy az összes fehérjének éppen a fele van ligandum-kötött állapotban (komplexben), a másik fele szabad formában van (lásd **7.7. ábra**).



7.7. ábra: A telítési görbe: a telítés értékének függése a szabad ligandum koncentrációjától

Folyadékban oldott gáz esetében dinamikus egyensúly áll fenn az oldat és a felette elhelyezkedő atmoszférában lévő gáz között. A folyadékban oldott gáz koncentrációja és az atmoszférában lévő gáz parciális nyomása között egyenes arányosság van. Ezért amikor a ligandum egy oldott gáz, akkor kényelmi okokból az oldat koncentrációját az azzal arányos parciális nyomással helyettesítik (lásd **7.8. ábra**, ami történetesen a mioglobin oxigéntelítési görbéjét írja le).



7.8. ábra: A mioglobin telítési görbéje – gázoknál koncentráció helyett parciális nyomást alkalmazunk

A fent leírtak értelmében, ahogy azt a **7.8. ábra** illusztrálja, az oldatkoncentráció helyett a parciális nyomást alkalmazzuk, és ennek megfelelően a **K_d**-t fogalma **helyett** bevezetésre kerül a **p_{50}** fogalma, ami a **fél-telítettséghez tartozó parciális nyomás**.

A **7.5. egyenlet**nek egy egyszerű **telítési görbe** felel meg, amely a matematika nyelvén megfogalmazva egy derékszögű hiperbola függvény. Ennek általános felírása: $Y=P_1X/(P_2+X)$, ahol X a független változó a ligandum

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

koncentráció (amit jelen esetben a parciális nyomás helyettesít), Y a függő változó, jelen esetben a telítés értéke, a P_1 és P_2 pedig a függvény paraméterei. Jelen esetben P_1 a maximális telítési érték, vagyis konkrétan 1, a P_2 pedig a disszociációs állandó (amit a p_{50} helyettesít). A telítési görbe azt mutatja, hogy „végtelenül nagy” ligandum koncentráción az összes fehérje ligandumot köt.

A **mioglobin oxigénkötését** ilyen egyszerű, **derékszögű hiperbola** típusú **telítési görbe** írja le. (Érdemes már előre jeleznünk, hogy hasonló telítési görbe írja le azt, hogy hogyan függ az enzimkatalizált reakció sebessége a szubsztrát koncentrációjától, lásd **8. fejezet**)

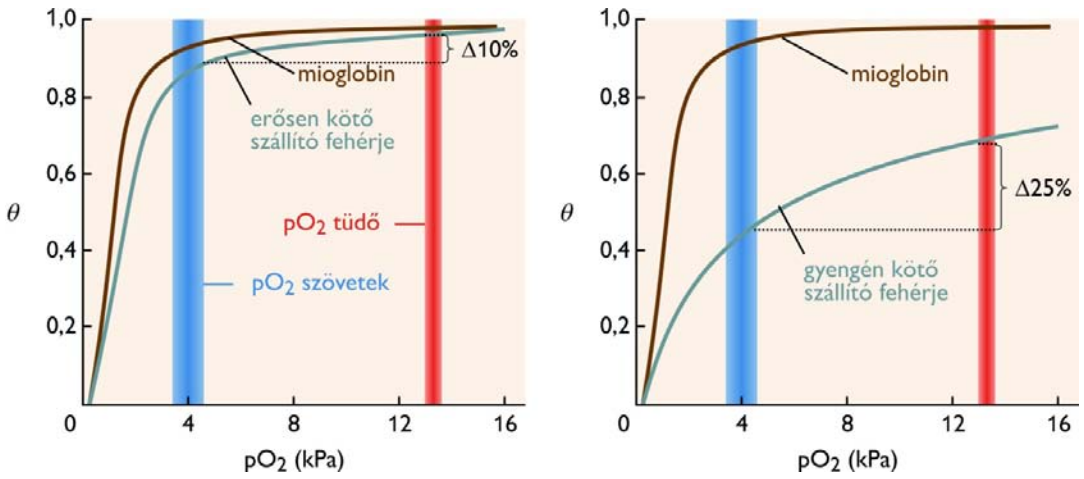
7.5. Az egyszerű szállítófehérje problémája

A tároló fehérje, mint a mioglobin esete egyszerű. Amikor közvetlen környezetében a ligandum koncentráció magas, akkor ligandumot vesz fel, ezáltal egyfajta raktárt képez. Amikor csökken a környezetében a ligandum koncentráció, akkor leadja a ligandumot, a raktárkészlet csökken. A telítés fogalmát használva: maximális telítés esetén 100 fehérjéből mind a 100 ligandumot köt. A raktározott ligandumot magától értetődően akkor kell mobilizálni, amikor a ligandum koncentráció csökken. Ahogyan a ligandum koncentrációja a fehérje környezetében csökken (lásd **7.7. ábra**), a fehérjék egyre nagyobb hányada veszíti el a ligandumát, amit „lead” a környezetének. Ha például a ligandum koncentrációja eléri a K_d (p_{50}) értékét, akkor egy olyan új egyensúly áll be, amelyben 100 fehérjéből 50 elvesztette a ligandumát.

Nézzük meg, mi a „követelmény” egy szállítófehérje esetében. A szállítófehérje úgy működik, hogy eljut (pl. a vörösvértestekben lévő hemoglobin a vérárammal) arra a helyre, ahol fel kell vennie a ligandumot (hívjuk ezt „A” helynek), majd eljut arra a helyre, ahol le kell azt adnia („B” hely). Az A helyen magas a ligandum koncentrációja, a B helyen alacsony. A kérdés az, hogy milyen tulajdonsággal kell rendelkeznie a szállítófehérjének ahhoz, hogy adott ligandum koncentrációk esetén a lehető legtöbb ligandumot szállítsa az A helyről a B-re. A kérdést úgy is megfogalmazhatjuk, hogy milyen az ideális szállítófehérje.

Első benyomásunk az, hogy minél erősebben köti a ligandumot a fehérjénk, annál jobb, hiszen adott ligandum koncentráció esetén annál nagyobb lesz a telítési érték az A helyen. Igen ám, de ha ilyen erősen, ilyen alacsony K_d értékkel köt a szállítófehérjénk, akkor a B helyen is erősen köt. Mivel a B helyen alacsonyabb a ligandum koncentráció, ezért természetesen történik ligandum leadás, de kis hatékonysággal.

Érdekes módon a valóság az, hogy egy kisebb affinitású szállítófehérje jobban teljesít. A B helyen egy ilyen fehérjének nagyobb százaléka adhat le ligandumot. Igen ám, de ha a fehérje kis affinitású, akkor az A helyen nem kerül kihasználásra a rendszer kapacitásának jó része (lásd **7.9. ábra**)



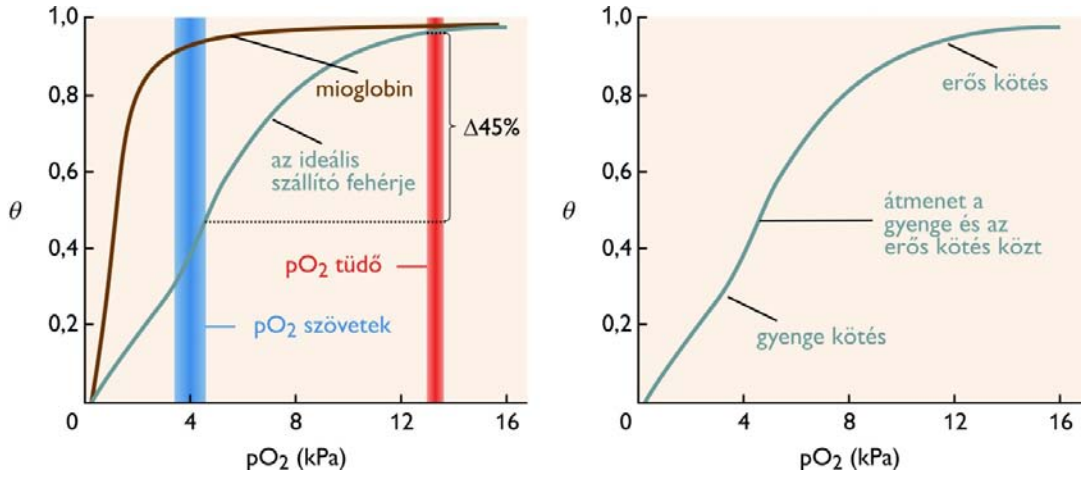
7.9. ábra: Sem egy erős ligandum-kötő, sem egy gyenge ligandum-kötő fehérje nem ideális szállítófehérje

A **7.9. ábra** jelzi, hogy az A helyen, konkrétan a tüdőben, illetve a B helyen, a szöveteknél mekkora az oxigén parciális nyomása. Az ezeknek megfelelő tartományokat piros (tüdő) illetve kék (szövetek) sávozás jelzi. A mioglobin, mint nagyon erős oxigénkötő fehérje viszonyításként szerepel az ábrán.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ha a szállítófehérjénk a mioglobint megközelítő affinitással kötné az oxigént, akkor a maximálisan felvehető oxigén mennyiségnek csak mintegy 10%-a adódna le a szöveteknél. Ha a szállítófehérje jóval kisebb affinitású, akkor a maximálisan felvehető mennyiségnek jóval nagyobb, az ábrán szereplő esetben 25%-át képes szállítani, jóllehet a tüdőben 100 ilyen fehérjéből csak mintegy 65 kötött oxigént.

Valójában tehát egyik esetben sem ideális a szállítófehérje. Az ideális szállítófehérje az A helyen nagy affinitású lenne, a B helyen pedig kis affinitásúvá válna (lásd **7.10. ábra**).



7.10. ábra: Az ideális szállítófehérje magas ligandum koncentrációjú helyen nagy affinitású, alacsony ligandum koncentrációjú helyen kis affinitású

Ahogyan a **7.10. ábra** mutatja, az ideális szállítófehérje telítési görbéjét nem egy egyszerű derékszögű hiperbola írja le, hanem egy összetettebb, úgynevezett szigmoid görbe.

A jelenség **hátterében** az úgynevezett **kooperativitás áll.**

7.6. A kooperativitás jelensége, és matematikai leírása

Az ideális szállító fehérje annál erősebben köt, minél nagyobb mértékben telített (és fordítva, annál könnyebben ereszti el a ligandumot, minél többet eleresztett már). Egyetlen kötőhellyel rendelkező molekula nem viselkedhet így, hiszen ott a kötőhely vagy foglalt, vagy nem. Csak egynél több kötőhely esetén lehetséges ilyen effektus, amennyiben az egyes kötőhelyek „kommunikálnak”, tehát az egyes kötőhelyek ligandumkötése nem független egymástól.

Ha egy ligandum belépését segíti, hogy a fehérje egy másik ligandum-kötőhelyén már van kötődött ligandum, akkor a kötőhelyek között definíció szerint **pozitív kooperativitás** van.

Független kötőhelyek esetén a több kötőhelyes fehérje ligandumkötését ugyanolyan egyszerű derékszögű hiperbola írja le, mint az egy kötőhelyes fehérjéét. A kooperativitás esetén azonban más lesz a helyzet.

Nézzük meg ezt a matematika nyelvén kifejtve.

Először is gondoljuk végig, hogy a pozitív kooperativitás fenti definíciója alapján mi lenne a jellemző egy teoretikus, tökéletesen kooperatív, „n” kötőhellyel rendelkező fehérjére. A tökéletes kooperativitás azt jelentené, hogy az n kötőhely mindegyike csak akkor tudna ligandumot kötni, ha a többi kötőhely is éppen ligandumot köt. Tehát vagy csak együtt, egyidejűleg kötnek, vagy sehogy. Ekkor tehát csak két fehérje-állapot létezik, amelyikben mind az n hely ligandum-kötött, illetve amelyben egyik sem köt ligandumot. A két állapot között egyensúly áll fent.

Ennek egyszerű sémáját a **7.6. egyenlet** mutatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$P+nL \rightleftharpoons PL_n$$ **7.6. egyenlet**

Vegyük észre, hogy a 7.6 egyenlet a **7.1. egyenlet**nek egy olyan változata, amelyben a fehérjén n kötőhely van, és ezek csak egyszerre köthetnek. Ebből a formalizmusból ugyanazzal a logikával, amivel a **7.2. egyenlet**től a **7.5. egyenlet**ig jutottunk, az alábbi egyenletrendszer következik.

A **7.7. egyenlet**ben definiáljuk az erre az esetre vonatkozó asszociációs állandót.

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}$$ **7.7. egyenlet**

Az egyenletben tehát K_a az asszociációs állandó, míg $[PL_n]$ a telített protein-ligandum komplex moláris koncentrációja.

A **7.7. egyenlet** átrendezése a **7.8. egyenlet**hez vezet:

$$K_a[L]^n[P] = [PL_n]$$ **7.8. egyenlet**

A telítés erre az esetre alkalmazott egyenletét, és annak a 7.8. egyenlet segítségével történő átalakítását a **7.9. egyenlet** mutatja.

$$\theta = \frac{[PL_n]}{[PL_n]+[P]} = \frac{K_a[L]^n[P]}{K_a[L]^n[P]+[P]} = \frac{K_a[L]^n}{K_a[L]^n+1} = \frac{[L]^n}{[L]^n+\frac{1}{K_a}} = \frac{[L]^n}{[L]^n+K_d}$$ **7.9. egyenlet**

A **7.9. egyenlet** a **7.5. egyenlet** egy módosult változata, amelyben számolunk azzal, hogy n kötőhely van, amelyek egymással kooperálnak. Ezt az egyenletet Archibald Hill-vezette be 1910-ben, annak nyomán, hogy a hemoglobin oxigénnel történő telítésének görbéjét analizálta. A végső egyenlet ennek emlékére az ún. **Hill-egyenlet**, melyben „**n**” a **Hill-együttható**.

Emlékezzünk, az egyenletet egy tökéletesen kooperatív rendszerre vezettük le, ahol „n”, tehát a Hill-együttható megegyezik a fehérje kötőhelyeinek a számával.

A kérdés, hogy amikor az egyenletet konkrét mérési eredményekre vonatkoztatva értékeljük ki, akkor a Hill-együttható vonatkozásában milyen eredményekre juthatunk. Számos több-kötőhelyes fehérje telítésének konkrét mérésével kísérletesen is meghatározták a Hill-együttható értékét. Az esetek egy részében kiderült, hogy a Hill-együttható értéke 1-nek adódott. Ez azt jelenti, hogy bár a fehérjének egynél több kötőhelye van, azok egymással nem kommunikálnak, a rendszer nem kooperatív. **Kooperativitás hiányában** tehát **n = 1**.

Azt az egyenlet bevezetésénél már láttuk, hogy tökéletes, és ezért nem realisztikus „végtelen nagymértékű kooperativitás” esetén a Hill-együttható megegyezne a kötőhelyek számával.

A **valóságban**, azokban a rendszerekben, ahol pozitív kooperativitás van, a **Hill-együttható** értéke **1 és a kötőhelyek számának számértéke között** van. Végtelen kooperativitás tehát nincs.

Ez valójában nem meglepő, hiszen itt egyfajta információáramlásról van szó az egyes kötőhelyek között. Az információ tartalma kétféle lehet. Egy addig ligandumot nem kötött hely „üzenhet”, hogy most éppen ligandumot kötött, és ezzel a többi kötőhely konformációját megváltoztatva azokat erősebb kötőhellyé teheti. Olyan mechanizmus azonban nem létezhet, amely elérné, hogy amennyiben az egyik hely éppen ligandumot kötött meg, úgy a többi is ugyanabban a pillanatban ugyanezt megtegye. Márpedig ez lenne a tökéletesen kooperatív eset.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A másik, fordított üzenet az lehet, hogy a kötőhely ligandum-kötött állapotból éppen üres állapotba kerül, vagyis elereszti a ligandumot. Ez az esemény azzal kellene, hogy járjon, hogy a többi kötőhely kisebb affinitású kötőhellyé váljon. Ez az üzenet sem lehet azonban olyan, hogy azonnal minden kötőhely eleressze a ligandumot, csak mert az egyik ezt megtette. Márpedig ez lenne tökéletes kooperativitás esetében.

Nézzük meg, hogy Hill-eredetileg hogyan határozta meg az együttható értékét. Akkoriban még nem létezett számítógép, így olyan módon transzformálta át az egyenletet egyszerű algebrai átalakításokkal, hogy az lineáris alakot öltsön, és „n” legyen az egyenes meredeksége. Így egyszerű egyenes illesztéssel meg tudta határozni „n” értékét (lásd 7.10. és 7.11. egyenleteket). (A Hill által meghatározott n érték 3,6 volt.)

Az egyenlet linearizálásának első lépéseként bevezetésre, majd kifejtésre került a θ/(1-θ). (Emlékeztetünk rá, hogy a **7.5. egyenlet** szerint, egy kötőhely esetén $\theta = [L]/([L]+K_d)$.)

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{\dfrac{[L]^n}{[L]^n + K_d}}{1 - \dfrac{[L]^n}{[L]^n + K_d}} = \frac{\dfrac{[L]^n}{[L]^n + K_d}}{\dfrac{[L]^n + K_d}{[L]^n + K_d} - \dfrac{[L]^n}{[L]^n + K_d}} = \frac{[L]^n}{K_d}$$

7.10. egyenlet

Mivel a θ kísérletesen mérhető, a θ/(1-θ) érték egyszerű számítással megkapható. Az ötletes algebrai trükknek köszönhetően, egy egyszerű mérési adat áll szemben egy olyan törttel, amelyben a Hill-együttható egyelőre kitevőben van. A **7.10. egyenlet**ben vesszük a **7.11. egyenlet** mindkét oldalának logaritmusát.

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = \log\left(\frac{[L]^n}{K_d}\right) = n\log[L] - \log K_d = n\log p_{O_2} - \log p_{50}$$

7.11. egyenlet

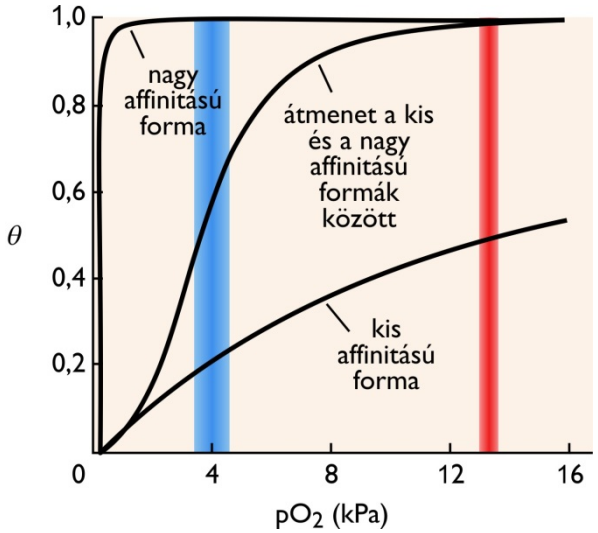
Az oxigénkötő fehérjére vonatkoztatott **7.11. egyenlet**ben a ligandum koncentrációt az oxigén parciális nyomása helyettesíti, a disszociációs állandó helyett pedig a fél-telítéshez szükséges oxigén parciális nyomás áll.

7.7. A hemoglobin kooperatív oxigénkötésének Hill-diagramja

A hemoglobin oxigénkötése egyszerű fotometriás eljárással mérhető, ugyanis az oxigénkötött hem élénkvörös színe jellegzetesen eltér az oxigén-hiányos hem kékes színétől. Nem véletlenül terjedt el az anatómiai atlaszokra jellemző ábrázolás, amely szerint az oxigénben dús vért szállító artériákat pirossal, míg az oxigénben szegényebb vért szállító vénákat kékkel ábrázolják.

A kísérletben a vér, vagy a hemoglobin oldat egy olyan edényben van, amelyben az oxigén parciális nyomását pontosan szabályozzák. Az oxigénkötött és oxigént nem kötő kötőhelyek aránya fotometriásan mérhető (lásd **7.11. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.11. ábra: A hemoglobin valós telítési görbéje (középső görbe) szigmoid alakú, működése során a fehérje kis affinitású és nagy affinitású állapotok között ingázik (szélső görbék)

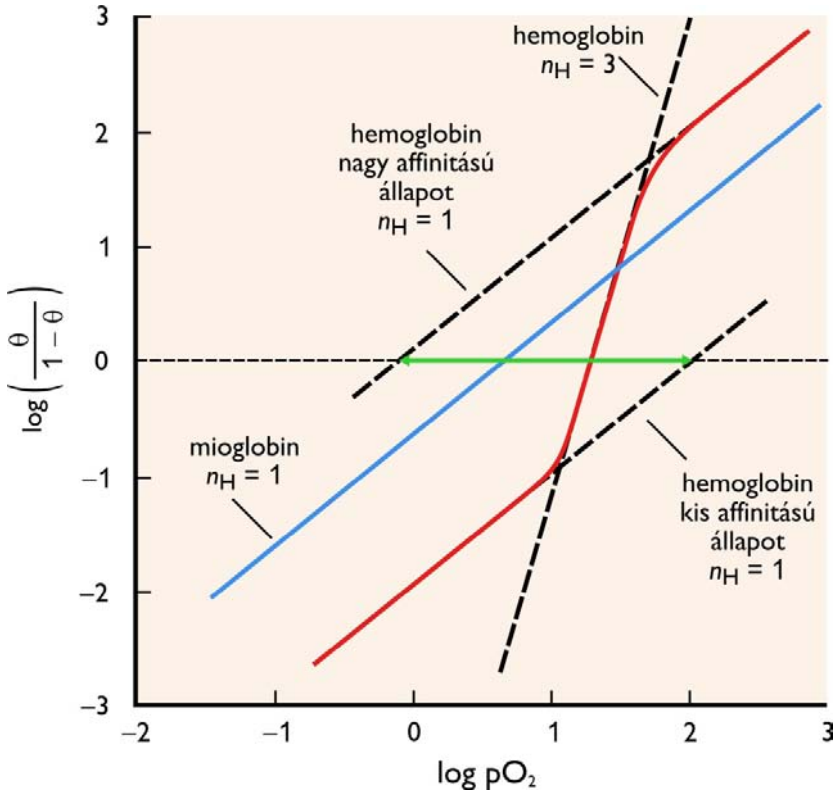
A **7.11. ábra** középső görbéje közvetlen mérés eredménye. A piros sáv a tüdőben uralkodó parciális nyomásnak, a kék sáv a szövetekre jellemző parciális nyomásnak felel meg. A normál légköri nyomás nagyjából 100 kilopascal. Mivel az oxigén a légkörben 21%-ot tesz ki, az oxigén parciális nyomása 21 kilopascal. Az ábrán jelzett, a tüdőre vonatkozó érték ennél kb. 30%-kal alacsonyabb, mintegy 13-14 kilopascal. Az alacsonyabb szint oka, hogy a tüdőben a léghólyagocskák területén az oxigén parciális nyomását ilyen mértékben csökkenti, hogy az ott jelenlévő gázkeverék vízgőzzel telített, illetve a széndioxid szint is jóval magasabb, mint normál légkörben.

A **7.11. ábra** azt illusztrálja, hogy a mérésből származó **szigmoidális görbe** annak az eredménye, hogy az oxigénkoncentrációtól függően a **hemoglobin átvált egy erősen kötő formából** (baloldali görbe) egy **gyengén kötő formára** (jobboldali görbe).

Nézzük meg a fenti mérési eredményt a **7.11. egyenlet** szerinti ábrázolásban a **7.12. ábrán**, amely egy egyszerűsített, idealizált Hill-diagramokat mutat be, ahol kontrollként a mioglobin adatai is szerepelnek, amelyeket a kék vonal szemléltet. Piros vonal mutatja a hemoglobin mérési adatait. A mioglobin egy-kötőhelyes, ezért nem kooperatív esetében a vonal meredeksége, tehát a Hill-együttható értéke 1. A vízszintes (szaggatott) tengely metszete megadja a disszociációs állandónak megfelelő pO_2 adat logaritmusát.

Kövessük most a hemoglobin vonalát az alacsony oxigénkoncentráció irányából. Az oxigénmentes hemoglobin vonala kooperációmentes esetet mutat, a Hill-együttható 1, az extrapolált tengelymetszet egy alacsony affinitású oxigénkötő fehérjét mutat. Ahogyan emeljük a kísérletben az oxigén parciális nyomását, érdekes jelenséget figyelhetünk meg. A hemoglobin átvált egy olyan állapotra, amelyben megjelenik a kooperatív működés, a Hill-együttható körülbelül 3, a tengelymetszet egy, az előzőnél jóval nagyobb affinitás fehérjének felel meg. Tovább növelve az oxigén parciális nyomását, a görbe ismét dőlésszöget változtat, a közel telített hemoglobin ismét nem mutat kooperativitást. Az ekkor kapott, 1-es Hill-együtthatóval rendelkező egyenes extrapolációjával kapott tengelymetszet még a mioglobinnál is nagyobb affinitású fehérjére utal.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.12. ábra: A mioglobin és hemoglobin idealizált Hill-diagramja

Összefoglalva: az oxigén parciális nyomását növelve a hemoglobin is telítődik, de a telítettségi foktól függően a fehérje működése a kooperativitás tekintetében kétszer is megváltozik. Egy nem kooperatív állapotból kooperatívba vált, majd ismét nem kooperatívan működő formát vesz fel.

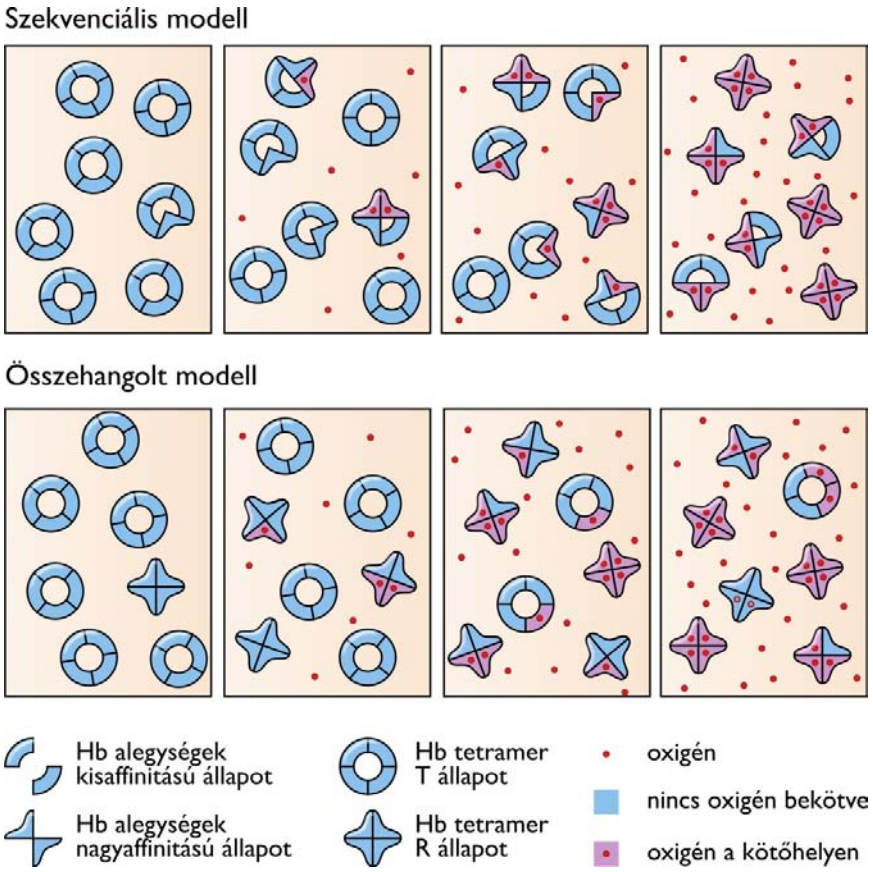
7.8. A hemoglobin Hill-diagramjának értelmezése

A hemoglobin negyedleges szerkezetének ismeretében fogalmazzuk meg konkrétabban, hogy a Hill-diagram milyen ismeretekkel szolgál. Nagyon alacsony, nem fiziológiás, csak kísérletesen előállított alacsony oxigén koncentráción a tetramerek átlagosan kevesebb, mint 1 oxigént kötnek. Ahogyan azt a Hill-egyenlet értelmezésénél már ismertettük, az első ligandum, tehát az első oxigénmolekula belépése nem jár észlelhető kooperativitással. A Hill-koefficiens 1 körüli. Az első oxigén egy kis affinitású kötőhelyre lép be, de ennek kötése már módosítja a többi kötőhelyet, elősegíti a soron következő oxigénmolekulák kötését. Magasabb oxigén koncentráción átlagosan egynél több a kötött oxigénmolekula, emiatt azt tapasztaljuk, hogy a Hill-koefficiens 3 körüli értékű. Telítéshez közeli oxigén koncentráción, ahol már átlagosan 3-4 kötött oxigénmolekula van, az utolsó molekula belépése már nem kooperatív, a Hill-koefficiens megint 1 körül. Az utolsó molekula nagy affinitású kötőhelyre lép be. Ezt az esetet érdemes a fordított irányból, csökkenő oxigénkoncentráció esetére megfogalmazni. Ebben az irányban az első oxigénmolekula egy nagy affinitású kötőhelyről lép ki, és ez a folyamat nem mutat kooperativitást. Ugyanakkor az oxigénmolekula kilépése gyengíti a többi kötőhely oxigénkötő képességét, vagyis megjelenik a rendszerben a kooperativitás.

Az X-tengely metszetei szerint a nagy affinitású állapotban lévő hemoglobin kb. 100-szor erősebben köt oxigént, mint a kis affinitású forma.

A fenti működés mechanizmusára **két eltérő modell**t vezettek be (lásd **7.13. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.13. ábra: A pozitív kooperativitás szekvenciális és összehangolt modellje

Mind a kettő összhangban áll a kísérletes adatokkal, tehát pusztán a telítési görbe meghatározása nem ad támpontot arra, hogy a két modell közül melyik felel meg a valóságnak. A jelenlegi ismeretek szerint a hemoglobin működésében mind a két modell mechanizmusa megjelenik.

7.8.1. A kooperativitás szekvenciális modellje

A **szekvenciális modell** azt feltételezi, hogy az egyes alegységek külön-külön **kétféle konformációs állapot**ban lehetnek. Az egyik a **feszített** (*tense* vagy *taut*), **T állapot**, amelyben a kötőhely kis affinitású, a másik egy **relaxált**, **R konformációs állapot**, amelyben a kötőhely nagy affinitású (lásd **7.13. ábra** felső panel).

Ebben a modellben tehát egy több-alegységes fehérje egyes alegységei egymástól eltérő konformációs állapotban lehetnek. Alapesetben, ligandum hiányában a kis affinitású T konformációs állapot az uralkodó, de a T és R állapotokhoz tartozó szabadentalpia-szint különbségnek megfelelő arányban jelen van a nagy affinitású konformációs állapot is. Amikor ligandum is van a rendszerben, az természetesen preferáltan a nagy affinitású konformációban lévő alegységhez köt. A modellben a kooperativitás ott jelenik meg, hogy a ligandum kötése **T→R konformációváltozás**t indukál a térben közel eső szomszédos alegységekben. Ennek hatására azok is nagy affinitású kötőhellyel rendelkeznek, vagyis a rendszerben nő a nagy affinitású kötőhelyek aránya (**pozitív kooperativitás**). Az egyes alegységek tehát megosztják egymással azt az információt, hogy éppen kötnek-e ligandumot, vagy nem. Meg kell jegyezni, hogy bár ritkábban fordul elő, de az első ligandum kötése által kiváltott konformációváltoztás a szomszédos alegységben levő ligandumok affinitását csökkentheti is (**negatív kooperativitás**).

7.8.2. A kooperativitás összehangolt modellje.

Az **összehangolt** vagy együttműködő (*concerted*) **modell** szerint a több-alegységes fehérje egyes alegységei csak azonos állapotban lehetnek. Itt is van egy nagy affinitású R konformáció, és egy kis affinitású T konformáció, de ezt a negyedleges szerkezetre kell vonatkoztatni. Az **összes alegység vagy R, vagy T konformációban van**, vegyes

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

állapotú alegységeket nem tartalmaz a több-alegységes fehérje. A kooperativitás ebben a modellben éppenséggel ebben az együttes konformáció-váltásban jelentkezik (lásd **7.13. ábra**, alsó panel).

Ligandum nélkül a kis affinitású állapot a stabilabb, de a T és R állapotokhoz tartozó szabadentalpia szint különbségének megfelelő arányban jelen van a nagy affinitású konformációs állapot is. A ligandum kötése stabilizálja a nagy affinitású állapotot. Ezáltal a ligandum koncentráció emelése ebben a modellben is azzal jár, hogy nő a rendszerben a nagy affinitású formák aránya. Ebben a modellben **csak pozitív** lehet a **kooperativitás**.

7.9. A hemoglobin szerkezetének és működésének részletes bemutatása

Az alább összefoglalt szerkezeti ismeretek röntgendiffrakciós vizsgálatokból származnak. A **hemoglobin** első, kisfelbontású **térszerkezet**ét Max Perutz határozta meg **1960**-ban, két évvel azt követően, hogy John Kendrew 1958-ban meghatározta a rokon fehérje, a mioglobin térszerkezetét. Mindkét kutató a Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumában dolgozott. Eredményeikért 1962-ben kémiai Nobel díjat kaptak. Az első, viszonylag kis felbontású szerkezet után Perutz és csoportja azon kezdett el dolgozni, hogy nagy felbontású szerkezetet nyerjen a hemoglobin két szélsőséges állapotáról, arról, amelyben minden alegység oxigént köt, és arról, amelyben egyik alegység sem köt oxigént. Az 1970-es évekre mindkét nagyfelbontású szerkezetet megoldották, és működési modellt tudtak bevezetni a hemoglobin kooperatív működésére.

A **hemoglobin négy alegység**ből áll, mindegyik alegységen van egy hem, tehát mindegyik alegység képes oxigént kötni. A hemoglobinnak kétféle alegysége van, amelyek külön-külön gének által kódolódnak a genomban. A tetramert **két α-lánc** (α1és α2) és **két β-lánc** (β1 és β2) alkotja.

Számos (30) aminosav-csoport vesz részt az α1β1 (és szimmetrikusan az α2β2) alegységek közötti kölcsönhatásban, míg lényegesen kevesebb (19) az α1β2 (illetve szimmetrikusan az α2β1) alegységek közötti kölcsönhatásban. Még az utóbbinál is lényegesen kevesebb kölcsönhatás van a két α-alegység között, illetve a két β-alegység között. Enyhe (alacsony koncentrációban alkalmazott) urea kezeléssel αβ dimerek izolálhatók. A tetramer hemoglobin tehát αβ dimerek dimerének tekinthető.

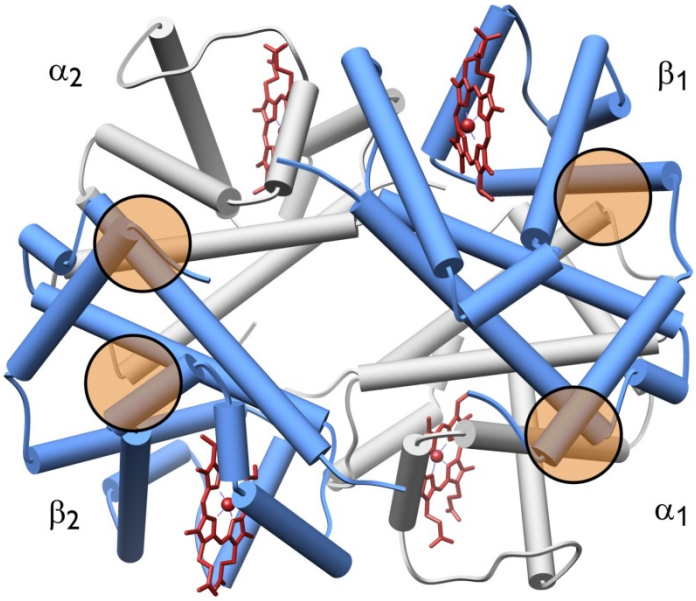
Az összehasonlító szerkezeti vizsgálatok kimutatták, hogy az oxigén-nélküli állapot szerkezete eltér az oxigénnel telített szerkezettől. Az eltérés főleg az alegységek egymáshoz képesti elmozdulását jelenti. Az oxigénkötés tehát megváltoztatja a hemoglobin térszerkezetét. Mint kiderült, más molekulák megkötése is szerkezetváltozást okoz és megváltozik az oxigénkötés affinitása is.

A hemoglobin működése tehát sokkal összetettebb, mint a mioglobiné, mivel a négy alegysége kommunikál.

Először vegyük szemügyre az **oxigénmentes, T konformációjú hemoglobin** szerkezetét (lásd **7.14. ábra**).

A **7.14. ábrán** bejelölt területek az α1β1 ill. az azzal szimmetria relációk miatt azonos α2β2 erős kölcsönhatások helyét jelzik. Ezek a kölcsönhatások nem változnak a konformációs átmenet során. A **konformációs átmenet során** tehát elsősorban **α1β1** és **α2β2 dimerek mozdulnak el egymáshoz képest**. Eközben a **7.14. ábrán** nem jelzett, de az alábbiakban ismertetett, α1β2 (illetve szimmetrikusan α2β1) kölcsönhatások változnak meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

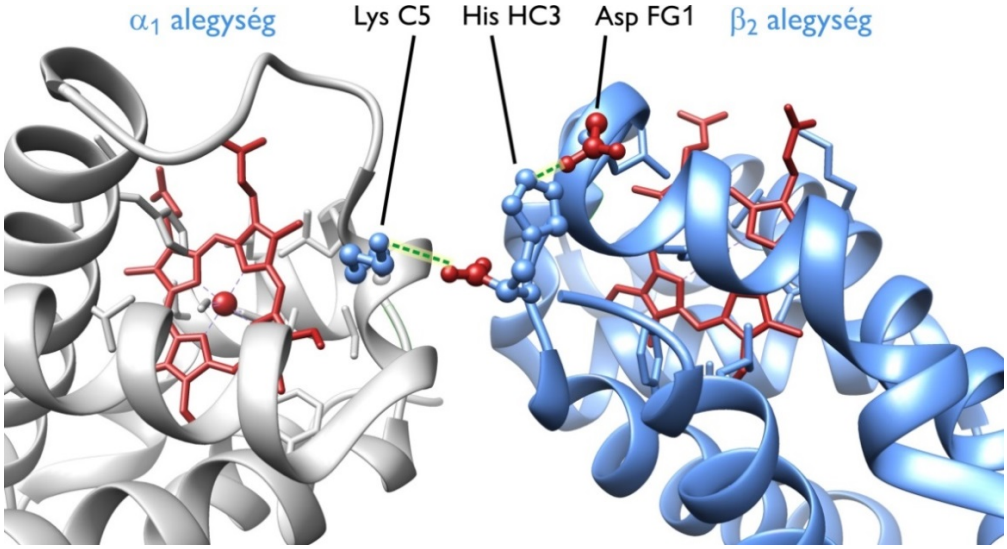


7.14. ábra: Az oxigénmentes hemoglobin T (tense) konformációja (PDB: 1HGA)

A T állapotban van egy rendkívül fontos α1β2 (illetve szimmetrikusan α2β1) kölcsönhatás, amely az R állapotban nincs jelen. Ez a kölcsönhatás a T állapot szerkezetét stabilizálja (lásd **7.15. ábra**).

A konformációs állapottól függő, a T-állapotra specifikus stabilizáló α1β2 (illetve szimmetrikusan α2β1) kölcsönhatás lényege a következő.

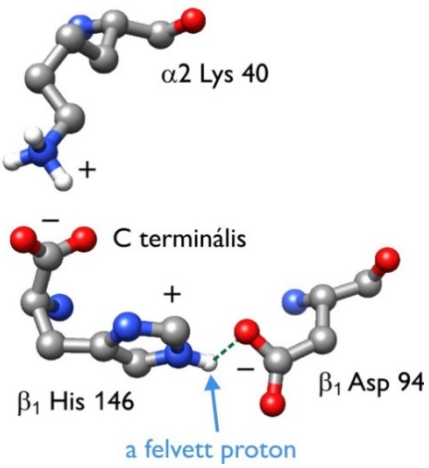
A **β2** alegység His-HC3 oldallánca, tehát a H-hélix utolsó, **C-terminális hisztidin** oldallánca **ionpár**t alkot az ugyanazon alegység **Asp-FG1**, tehát az F és G hélixeket összekötő hurok első, aszpartát oldalláncával, míg a C-terminális **főlánc karboxil** csoportja **ionpár**t alkot az **α1** alegység **C5 lizin** csoportjával.



7.15. ábra: Egy, a T konformációt stabilizáló, alegységek közötti elektrosztatikus kölcsönhatás

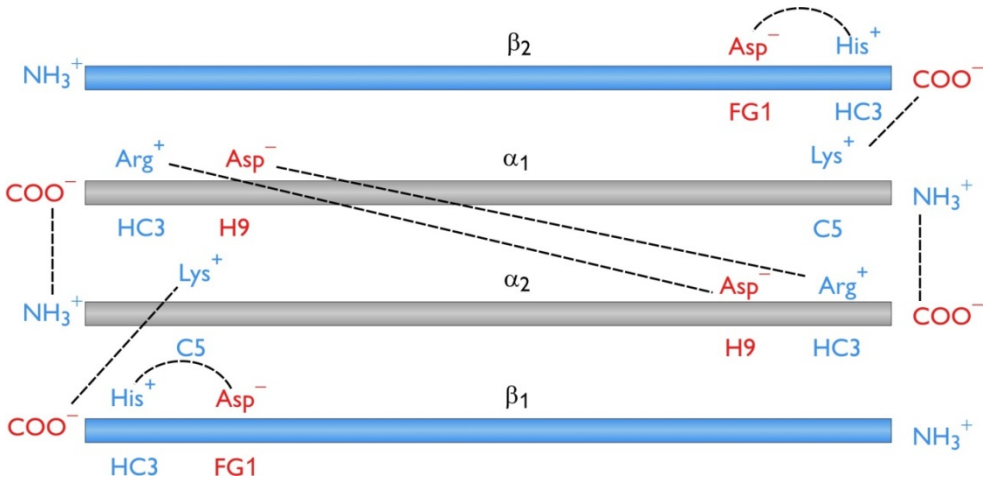
Ez a kölcsönhatási hálózat, amelyet kinagyítva a **7.16. ábra** mutat, csak akkor jöhet létre, **ha a His-HC3** oldallánca **protonált**, tehát pozitív töltést hordoz. Ebben az esetben az Asp-FG1 és a His-HC3 oldalláncok között létrejövő alegységen belüli ionpár úgy irányítja a C-terminus karboxilcsoportot, hogy az láncok közötti ionpárt hozzon létre. Ennek nagy jelentősége lesz a Bohr-effektus értelmezésében (lásd később).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.16. ábra: A T-konformációt stabilizáló elektrosztatikus kölcsönhatás részletes szerkezete

A **7.17. ábra** sematikusan illusztrálja a T formát stabilizáló ionos kölcsönhatásokat. Minden olyan külső hatás, ami gyengíti ezeket a kölcsönhatásokat, csökkenti a T forma stabilitását.

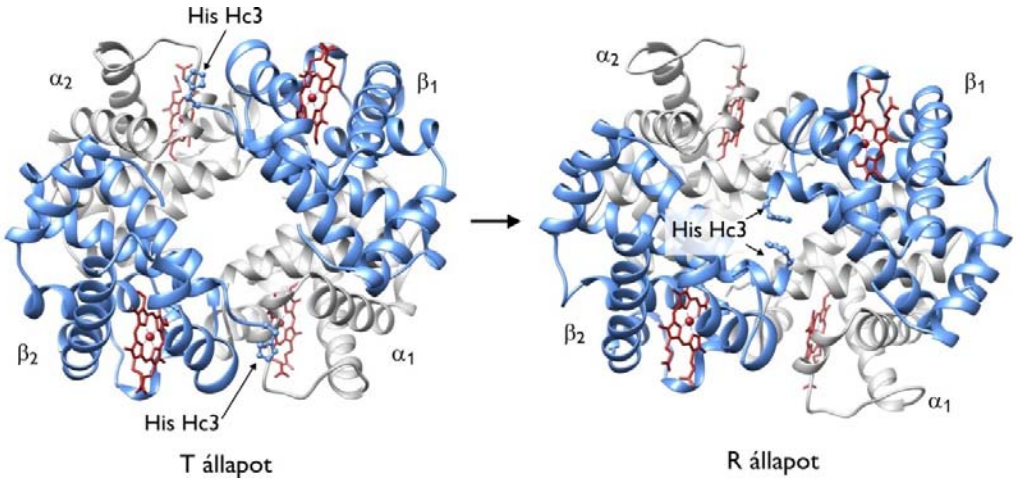


7.17. ábra: A T-konformációt stabilizáló elektrosztatikus kölcsönhatások sematikus ábrázolása

A **7.18. ábra** egymás mellett mutatja be a hemoglobin T és R konformációját.

A T állapot és az R állapot az α1β1 és α2β2 dimerek egymáshoz képesti eltekeredésével és egymáshoz közelítésével vihető egymásba. A két állapotot részben különböző, egymást kizáró kötések stabilizálják. A **T→R átmenet** során **a T állapotot stabilizáló** His-HC3 csoporton keresztüli **kötések felszakadnak**, a tetramer középső bemélyedése szűkül, a His-HC3 csoportok a központi mélyedésbe kerülnek.

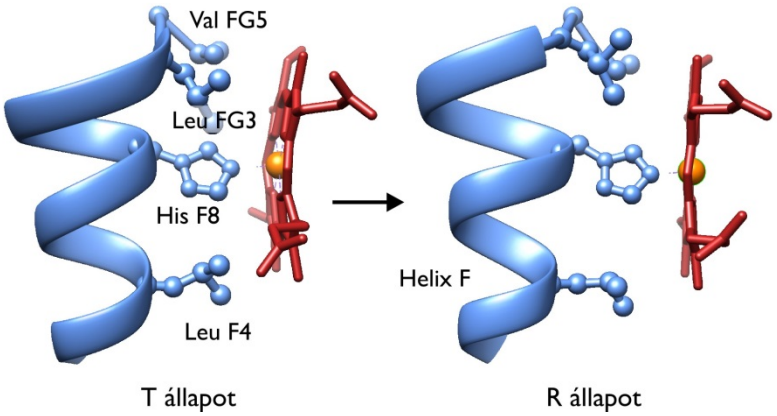
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.18. ábra: a hemoglobin T és R konformációs állapotainak összehasonlítása (PDB: 1HGA, 1BBB)

A két eltérő konformációs állapotban lévő tetramerek léte az összehangolt modellt támasztja alá, amely eleve csak ezt a két szerkezeti állapotot ismeri el, nem „engedi meg” azt, hogy a tetrameren belül az egyes alegységek eltérő konformációs típusba tartozzanak. Ugyanakkor a két szerkezet összehasonlítása (**7.19. ábra** és **7.20. ábra**) alapján a szekvenciális modellt sem lehet kizárni.

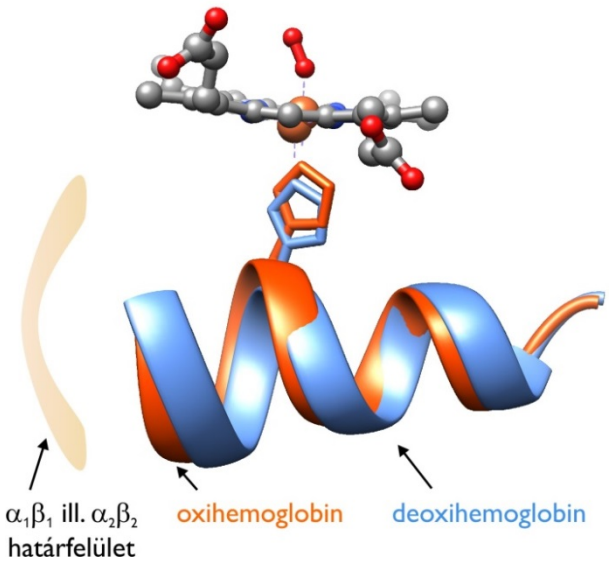
Az oxigént nem tartalmazó, a hemoglobint T állapotban mutató (**dezoxi-hemoglobin**) röntgenszerkezetben a hem nem sík, hanem enyhén domború formájú, és a benne lévő vasion kissé ki is lóg a hem síkjából, a **proximális hisztidin felé** nyomul. Az R állapotban (**oxi-hemoglobin**), amelyben a vasionhoz oxigénmolekula is kötődik, a hem gyűrűje lapos (planáris), és a vasion a hem síkjában van. Amikor az oxigén bekötődik, a jelek szerint mintegy maga felé húzza a vasiont. Ahogy a vasion az oxigén felé mozdul, utána mozdul a proximális hisztidin is, ami ezáltal bemozdítja az F-hélixet is, amelyen ő maga elhelyezkedik.



7.19. ábra: A vasion oxigénkötése megváltoztatja a hem alakját, és elmozdítja az F-hélixet

A **7.20. ábra** egymásra vetítve mutatja be a T és az R konformernek ezt a szerkezeti részletét, jobban láthatóvá téve a résztvevő atomok és szerkezeti elemek elmozdulásának mértékét.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.20. ábra: Az oxigénkötés függvényében elmozduló F-hélix alapján a hemoglobin működésére a szekvenciális kooperativitási modell is vonatkozhat

Az F-hélix az α1β1 illetve az α2β2 dimerek határfelületeinél helyezkedik el, így az oxigénkötés ténye érzékelhető a szomszédos alegységek számára, ami a szekvenciális modell fő feltételezése.

7.10. A hemoglobin anyagcserefüggő szabályozása, a Bohr-effektus

Az előző részben már megismertük, hogy a hemoglobin milyen konformációs állapotokban létezhet, és arra is láttunk modelleket, hogy miként kerülhet egyik állapotból a másikba. Arról azonban nem esett még szó, hogy ezeket a konformációs átmeneteket az oxigénkötésen kívül még mi válthatja ki. Az alábbi eredmények fényt derítettek arra, hogyan szabályozódik a hemoglobin az élő szervezetben.

Christian Bohr, a Nobel-díjas atomfizikus Niels Bohr édesapja 1904-ben alapvető felfedezést tett a hemoglobin működésével kapcsolatban. Kimutatta, hogy a **hemoglobin oxigén-affinitása pH-függő**, alacsony pH-n kisebb affinitással köti az oxigént (lásd **7.21. ábra**). Ez a jelenség a szakirodalomban a **Bohr-effektus** elnevezést kapta.

Az alapkísérletben két hemoglobin oldat oxigéntelítési görbéjét mérték meg. A közeg pH értékét mesterséges pufferrel állították be. Az egyik mérésben az oldat pH értéke 7,4 a másikban 7,2 volt. Ahogyan az a **7.21. ábrán** látható, alacsonyabb pH-n a telítési görbe a nagyobb pO_2 értékek felé tolódott el. Alacsonyabb pH-n tehát magasabb parciális nyomás esetén éri el a hemoglobin a fél-telítés állapotát, vagyis magasabb pO_2 értéken lesz az oldatban lévő kötőhelyek fele oxigénkötött állapotban. Más szóval alacsonyabb pH-n a hemoglobin oxigénkötő affinitása kisebb.

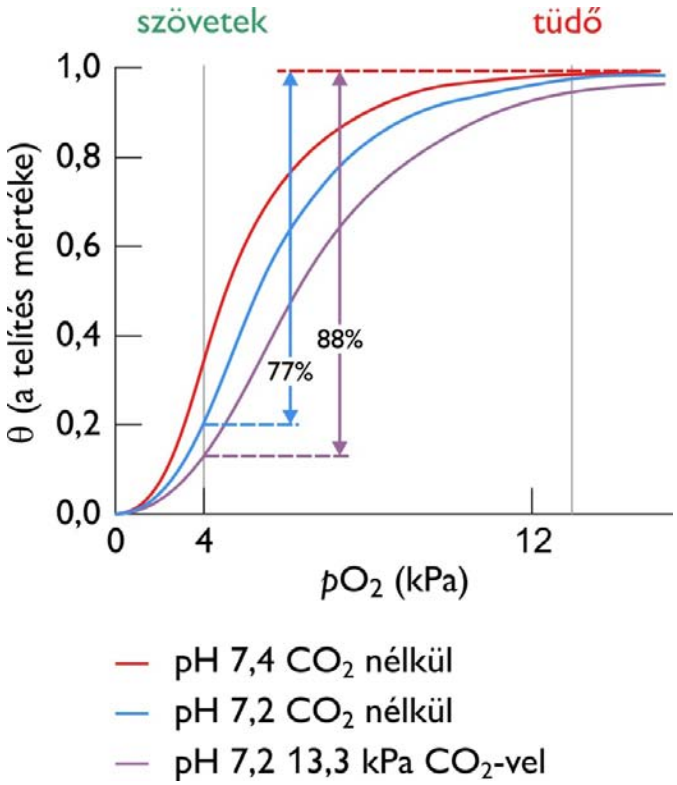
Formálisan a Bohr-effektus az alábbi egyszerű modellel magyarázható:

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

7.12. egyenlet

$$HbO_2 + H^+ \rightleftharpoons HbH^+ + O_2$$

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.21. ábra: A Bohr-effektus, azaz a hemoglobin oxigénkötő affinitásának pH-függése

A **7.12. egyenlet**ben szereplő egyszerű modell szerint a hemoglobin oxigénkötő affinitásának pH-függése azzal magyarázható, hogy a hemoglobin képes protont felvenni, és a protonfelvétel valamint az oxigénkötés kizárják egymást. Ez az egyszerű leírás természetesen nem foglalkozik azzal, hogy a proton pontosan hova köt, és miért zárja ki az oxigén kötését.

Akkoriban már jól ismert tény volt, hogy a biológiai oxidáció során széndioxid keletkezik, és az is, hogy az oldott széndioxid csökkenti a pH-t az alábbi reakciók miatt:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

7.13. egyenlet

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

A széndioxid szénsav formájában oldódik, a szénsav pedig gyenge savként részlegesen hidrogénkarbonát ionra és protonra disszociál.

A Bohr-effektus tehát előre jelezte, hogy itt egy fontos **élettani szabályozás**ról lehet szó. Minél intenzívebben zajlik egy szövetben a **biológiai oxidáció**, annál alacsonyabb a szövetben uralkodó pH. Amikor a szöveten átvezető kapillárisokban a vörösvértestek áthaladnak, a bennük lévő hemoglobin környezetében is **csökken a pH**, a **hemoglobin** oxigénkötő affinitása csökken, ezért **oxigént ad le**.

Összefoglalva: **minél intenzívebb sejtlégzést folytat egy szövet, annál több oxigént ad le számára a hemoglobin**.

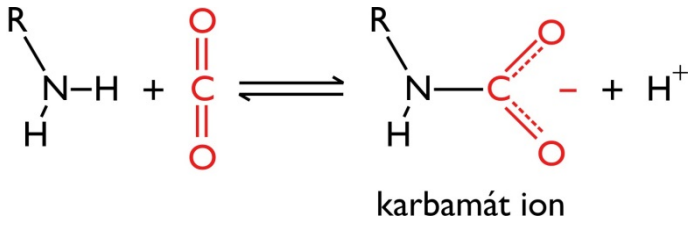
Nézzük meg, mi a hemoglobin pH-függő oxigénkötő affinitásának **fehérjeszerkezeti alapja**. A **7.16. ábrá**án már bemutattuk, hogy az alacsony oxigénkötő affinitású **T** hemoglobin **konformáció** egyik fő **stabilizáló** kölcsönhatása csak akkor alakul ki, ha a **His-HC3** oldallánca **pozitív töltés**t hordoz. Ez az oldallánc a kulcsa a pH-függő szabályozásnak. Csökkenő pH-n a hemoglobinok egyre nagyobb százalékában lesz ez a **hisztidin protonálv**a, így **egyre nagyobb százalék**uk kerül **T-konformáció**ba. Minden disszociációra képes csoport a saját pKa értéke környezetében változtatja legnagyobb mértékben a pH függvényében a protonáltsági állapotát (lásd Henderson-

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Hasselbalch egyenlet a **2.5.5. fejezet**ben és a **2.13. egyenlet**). A hisztidin imidazol csoportjának pK_a értéke éppen a fiziológiás szempontból legfontosabb pH 7,4 körül van.

A **7.21. ábraán** bemutatott kísérlet második részében az is kiderült, hogy nem pusztán a pH értéke számít, hanem az is, hogy a pH egy mesterséges puffer vegyület miatt volt 7,2 vagy az oldott széndioxid miatt. Ha mesterséges puffer helyett széndioxid beoldódása miatt volt a pH 7,2, akkor a pH azonos értéke ellenére a hemoglobin még alacsonyabb affinitással kötötte az oxigént. Az *in vitro* kísérletek tehát azt mutatták, hogy a Bohr-effektus csak részben magyarázható az oldat hidroxónium koncentrációjával, a pH-hatáson kívül a széndioxidnak van egy specifikus saját hatása is.

Mint később kiderült, a **hemoglobin** nem csak oxigént és szénmonoxidot tud **köt**ni, hanem **széndioxidot** is (lásd **7.22. ábra**). Nagyon fontos, hogy megértsük, hogy **a széndioxid nem a hem-hez, hanem a hemoglobin β-láncok N-terminálisához köt**ődik kovalens kötéssel (karbamát alakul ki), így azokat negatív töltéssel látja el.



karbamát ion

7.22. ábra: A széndioxid karbamát ion formájában kötődik a hemoglobin β-láncok N-terminálisához.

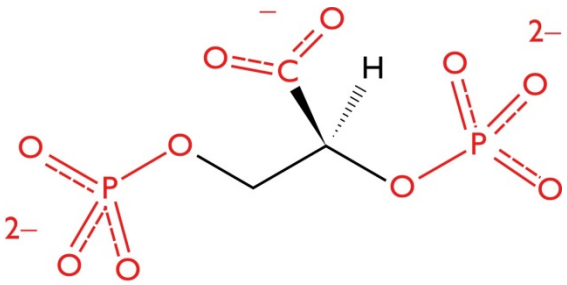
Az így kötődött **széndioxid** is a csökkenő pH irányába hat, másrészt a **negatív töltésű β-lánc N-terminálisok** is részt vesznek a **T-forma stabilizálás**ában. A kilélegzett széndioxid egy része tehát a hemoglobin útján, más része hidrogén-karbonátionként a vérplazmában oldva szállítódik.

Formálisan a széndioxid és az oxigén kötése is kizárják egymást. A széndioxid a pH függésen felül tehát tovább erősíti az oxigén-" kipasszírozó" Bohr-effektust. Fordítva szemlélve: a tüdőben lévő magasabb pH segíti az oxigénfelvételt, ekkor viszont a belépő oxigén segíti kipasszírozni a széndioxidot.

7.11. A hemoglobin oxigénkötésének anyagcserétől független szabályozása

A hemoglobinnal kapcsolatos vizsgálatok során csak viszonylag későn derült fény arra, hogy a **hemoglobin** csak akkor mutatja a fent ismertetett **kooperatív működést**, ha egy foszforilált cukorszármazék, a **2,3-biszfoszfo-glicerinsav, BPG** is **jelen van** a környezetében (lásd **7.23. ábra**).

A kezdetben izolált hemoglobin preparátumok „szennyezve voltak" ezzel az rendkívül fontos **szabályzó molekulá**val. Amikor valóban homogén hemoglobin preparátumot sikerült előállítani, amely csak a fehérje komponenseket tartalmazta, kiderült, hogy az így izolált preparátumban a hemoglobin rendkívül erősen, és nem kooperatív módon köt oxigént.



2,3-biszfoszfo-glicerinsav
(2,3 BPG)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

7.23. ábra: A hemoglobin szabályozásában fontos szerepet játszó 2,3-biszfoszfo-glicerinsav szerkezete

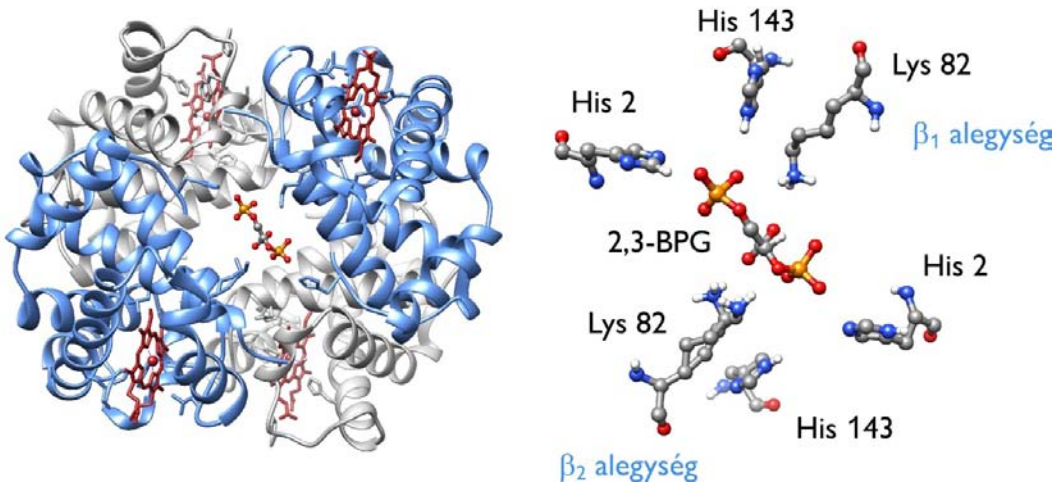
Ma már tudjuk, hogy a BPG a hemoglobin egy anyagcserétől független szabályozási módjának a kulcsa. Kiderült, hogy a széndioxid és a protonkötés esetével analóg módon formálisan a BPG-kötés és az oxigénkötés is kizárják egymást:

$$HbO_2 + BPG \rightleftharpoons Hb\text{-}BPG + O_2$$ **7.14. egyenlet**

A **2,3-BPG** a hemoglobin **T** konformációs **állapot**ának **nyitott csatornájába kötődik** és ionos kölcsönhatásokon keresztül **stabilizálja a T állapotot** (lásd **7.24. ábra**). A BPG tehát a hemoglobin negatív **allosztérikus szabályozó molekulá**ja, effektora. (Az allosztérikus fehérjék általános tulajdonságait később, a **17.2. fejezet**ben tárgyaljuk.)

BPG hiányában a T állapot elenyésző arányban alakul ki, így az R konformáció dominál. Ez az oka a BPG-mentes hemoglobin nagy oxigénkötő affinitásának, és nem-kooperatív működésének. De hogyan használható ez a molekula szabályozásra?

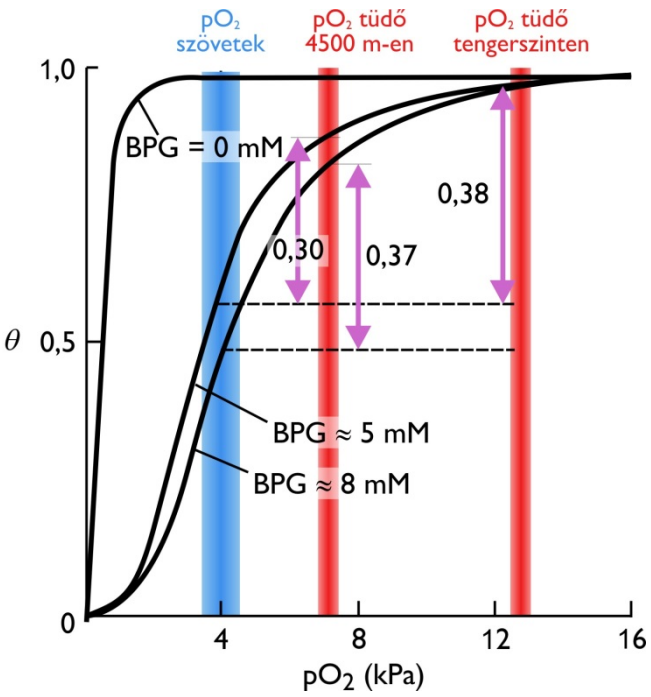
Ezzel kapcsolatban kulcs ismeret, hogy a BPG koncentrációja a tüdőben kialakuló parciális oxigén nyomás alapján szabályozódik. A tengerszintre jellemző parciális oxigénnyomáson a vörösvértestekben a BPG koncentrációja mintegy 5 mM, és a hemoglobin a maximális lehetséges oxigéntároló kapacitásának nagyjából 38%-ányi oxigént képes a szöveteknek leadni.



7.24. ábra: A BPG a hemoglobin négy alegysége közötti üregbe köt a T állapotban. A jobb oldali kinagyított részletben a komplex kialakításában szerepet játszó aminosav oldalláncok is látszanak (PDB: 1B86)

Hirtelen 4500 m-re utazva az oxigén parciális nyomása a tüdőben lényegesen alacsonyabb lesz, így a hemoglobin kevesebb oxigént képes felvenni, de csak ugyanannyit tud leadni, mint tengerszinten. A leadható oxigén a maximális tárolókapacitás 30%-ára esik a korábbi 38%-ról (lásd **7.25. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



7.25. ábra: A hemoglobin működésének szabályozása BPG-vel a légköri oxigénnyomás függvényében

Egy itt nem ismertetett szabályozásnak köszönhetően a BPG-szint a vörösvértestekben pár óra leforgásával kb. 8 mM-ra emelkedik. Ez az emelkedett BPG-szint csak kismértékben csökkenti a tüdőben felvehető oxigén mennyiséget, miközben annál jóval nagyobb mértékben növeli a szöveteknek leadható mennyiséget. Ennek köszönhetően a tengerszinti körülményekre jellemző értékhez hasonló mennyiségű oxigén szállítódik.

(Ez a szabályozás nem keverendő össze a szervezetnek azzal a válaszával, melynek során az oxigénhiányos környezet hatására egy jóval hosszabb idő elteltével megnő a vörösvértestek száma. Ez utóbbi azzal kapcsolatos, hogy a normálisnál alacsonyabb oxigén koncentráció hatására a vese megnöveli az eritropoetin (EPO) hormon termelésének ütemét. Ez fokozza a vörösvértestté váló sejtek differenciációját, és közvetve lassítja a már meglévő vörösvértestek pusztulását. Ennek a szabályozásnak azonban nincs köze a hemoglobin működési mechanizmusához.)

7.12. A magzati hemoglobin működése

A méhlepényes emlősökben az oxigén a placentán keresztül jut a magzat vérébe anélkül, hogy az anyai és a magzati vér keveredne. Azt, hogy megfelelő arányban adódhasson át az anyai hemoglobinból az oxigén a magzati hemoglobinnak, az teszi lehetővé, hogy a magzati hemoglobin nagyobb affinitással köti az oxigént, mint az anyai hemoglobin (lásd **7.26. ábra**).

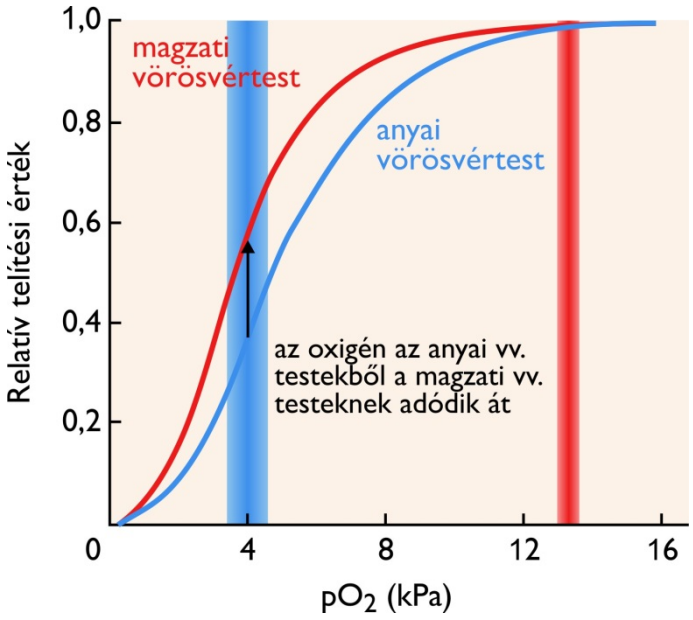
Az **anyai hemoglobin** nem más, mint a már eddig bemutatott, $\alpha_2\beta_2$ szerkezetű hemoglobin. A **magzati** hemoglobin összetétele azonban ettől eltér: $\alpha_2\beta_2$ összetételű hemoglobin helyett a magzatban $\alpha_2\gamma_2$ szerkezetű fehérje termelődik. A magzatban a β-lánc szintéziséért felelős gén nem fejeződik ki, helyette egy másik, a γ-láncot kódoló gén íródik át.

Az α és β-láncok esetével analóg módon a γ-lánc is génduplikáció és sorozatos mutációk terméke. A β-lánc és a **γ-lánc** 72%-ban azonosak egymással. A számos aminosav csere közül kiemelendő a **His143Ser** csere.

A β-láncban lévő 143-as hisztidin helyett a γ-láncban szerin szerepel. A **His143** egyike azoknak a pozitív töltésű oldalláncoknak, amelyek a **BPG-kötésben részt vesz**nek. A His143Ser aminosav csere miatt a γ-láncot tartalmazó **magzati hemoglobin kisebb affinitással köti a BPG-t**, mint az anyai hemoglobin, és ennek megfelelően az anyai hemoglobinhoz képest **nagyobb affinitással köti az oxigént**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A születést követően az újszülöttben leáll a γ-láncot kódoló gén kifejeződése, és aktivizálódik a β-láncot kódoló gén. Ezzel szinkronban a magzati vörösvértestek lebontásra kerülnek, miközben új, immár, $\alpha_2\beta_2$ szerkezetű hemoglobint tartalmazó vörösvértestek keletkeznek.

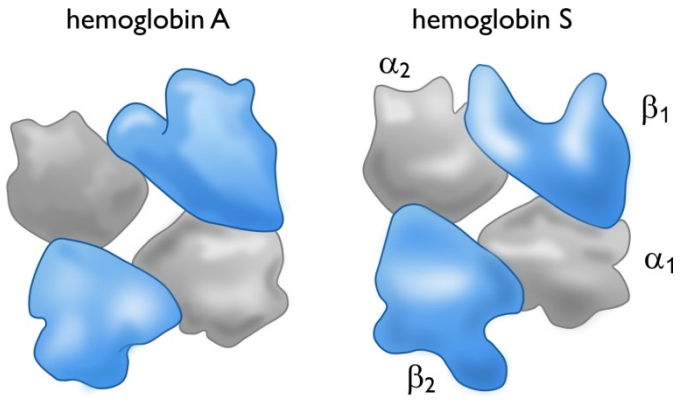


7.26. ábra: Az anyai, és az annál nagyobb oxigénaffinitású magzati hemoglobin eltérő telítési görbéje

7.13. Egy örökletes betegség, a sarlósejtes anémia

A **sarlósejtes anémia** egy örökletes betegség, amely mögött egy, a **hemoglobin β-lánc** génjében bekövetkezett **pontmutáció** áll. Ennek hatására a hemoglobin β-láncában a 6. pozícióban lévő, **negatív töltésű glutaminsav apoláros valinra cserélődik** (Glu6Val). Az ilyen mutáns hemoglobin jelölése a normál (A-típusú) hemoglobinnal szemben **hemoglobin-S**, vagy röviden HbS.

Az aminosav-csere a tetramer hemoglobin β-láncának felszínén egy korábbi negatív töltésű terület helyén egy hidrofób felületet hoz létre (lásd **7.27. ábra**).



7.27. ábra: A sarlósejtes anémiát egyetlen aminosav csere okozza, amely növeli a hemoglobin molekulák aggregációs képességét

Ez a hidrofób felszín egy kedvező kötőfelszínre talál egy másik tetramer hemoglobin β-láncán, de csak akkor, ha az éppen T konformációban van. Mindennek az az eredménye, hogy főleg erős fizikai megterheléskor, amikor a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

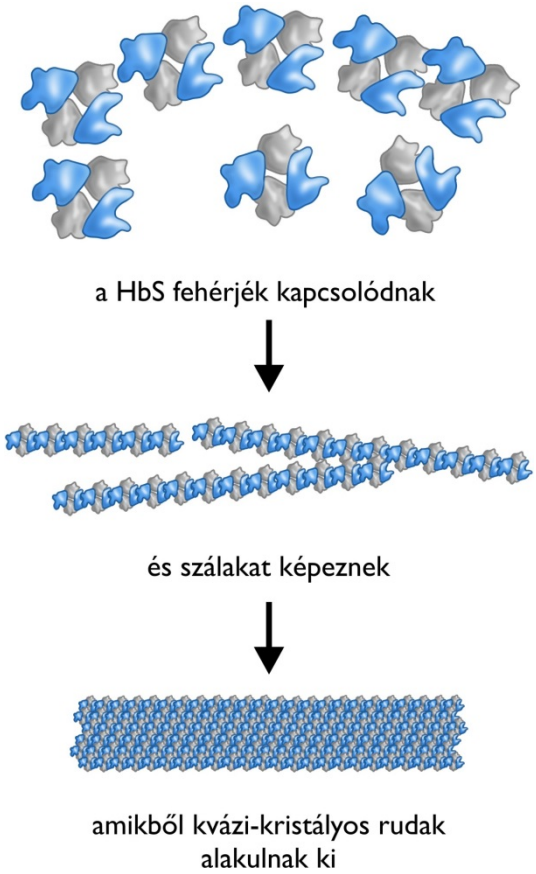
T konformer aránya emelkedett, a hemoglobin molekulák szabályos rend szerint **aggregálódnak**, és hosszú kristályszerű HbS rudakat alakítanak ki a vörösvértestekben (lásd **7.28. ábra**).

A Hb-S nagyon gyengén képes oxigénkötésre, ennek lesz a következménye az anémia, azaz a „vérszegénység”. (Valójában nem a vér mennyisége, hanem a vér oxigénszállító képessége csökken).

Ennek eredményeként a vörösvértestek szerkezete összeomlik, sarlóra emlékeztető alakot vesznek fel.

Az aggregáció különösen a mutációra **homozigóta egyéneknél súlyos**, hiszen ezek kizárólag a hibás β-láncot termelik, vagyis minden hemoglobin molekulájuk hordozza az aminosav cserét, és így részt tud venni az aggregálódásban. A heterozigóták esetében a hemoglobinok egy része vadtípusú (azaz nem tartalmaz hibás szekvenciájú fehérjeláncot), így az aggregációs hajlam is kisebb.

A sarlósejtes anémia rendkívül súlyos betegség, homozigóta esetben korai elhalálozást okoz. Ezért rejtély volt, hogy vajon miért maradt fenn viszonylag nagy arányban az emberi populációban a hibás allél. A rejtély megoldására az vetett fényt, hogy a sarlósejtes anémia előfordulási gyakorisága azokon a területeken a legmagasabb, ahol a malária is a legelterjedtebb. Kiderült, hogy a sarlósejtes anémiában szenvedők (pontosabban a hibás gént egy példányban hordozó **heterozigóta** egyének) **részlegesen védettek a maláriát okozó plazmódium fertőzéssel szemben**. Ez a részleges védettség az oka annak, hogy a maláriával fertőzött területeken folyamatosan fennmarad a sarlósejtes anémiát okozó génváltozat.



7.28. ábra: A sarlósejtes anémiát végső soron a hemoglobinok rendezett aggregációja váltja ki

Tudománytörténeti érdekesség, hogy a sarlósejtes anémia volt az első olyan örökletes betegség, amelynél kimutatták, hogy azt egyetlen fehérje egyetlen aminosavcseréje okozza. A Linus Paulinghoz és munkatársaihoz fűződő első eredmények 1949-ben születtek, amikor az akkor bevezetett elektroforézissel sikerült kimutatni, hogy az eredeti és a megváltozott hemoglobin formák elektromos töltése eltérő. Az ötvenes évek végére különböző analitikai vizsgálatokkal a töltéskülönbség okát is azonosították.

A sarlósejtes anémia molekuláris hátterét a **4. animáció** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

8. fejezet - Az enzimműködés alapjai

(szerző: Pál Gábor)

A hemoglobin példáján láttuk, hogy milyen összetett lehet egy fehérje működése. A hemoglobint kifinomult szabályozása és nagy hatékonysága miatt szokták „tiszteletbeli enzimnek" is emlegetni. Ami miatt a hemoglobin természetesen nem enzim, az az, hogy az enzimek definíció szerint kémiai reakciókat katalizálnak, az oxigénszállítás során pedig nem történik kémiai átalakítás. Ebben a fejezetben áttérünk az enzimekre. Először az enzimműködés legalapvetőbb vonásait mutatjuk be, majd megismerkedünk az enzimkatalízis termodinamikai értelmezésével. Egy külön fejezetben megvizsgáljuk, hogy milyen biokémiai mechanizmusok állhatnak néhány konkrét enzimatikus katalízis hátterében (lásd **8.5. fejezet**), majd egy újabb fejezetben áttekintjük az enzimkatalizált reakciók sebességének matematikai leírását, tehát az enzimkinetika alapjait (lásd **9. fejezet**).

Minden sejtben kémiai reakciók százai zajlanak egyidejűleg. A reakciók zöme olyan, ami katalizátor nélkül nem menne végbe mérhető sebességgel. Például a sejtekben a glükóz másodpercek alatt vízzé és széndioxiddá alakul, míg egy steril oldatban katalizátor nélkül száz év alatt sem, pedig termodinamikailag kedvező, exergonikus a folyamat.

Az élő szervezetben a (bio)kémiai reakciókat enzimek katalizálják. Az **enzim**ek túlnyomó többsége **fehérje**, **de** ismertek **RNS-alapú** enzimek is, **ribozimek**, amelyek szintén központi szerepet töltenek be az élő rendszerek működésében (lásd a riboszómákon zajló peptidkötés kialakulását a **16. fejezet**ben).

Az, hogy egy reakció milyen irányban zajlik le, mint korábban már láttuk, kizárólag az abban szereplő komponensek szabadentalpia-különbségén múlik, ami a komponensek anyagi minőségétől és aktuális koncentrációjától függ. Az **enzimek** tehát **nem változtatják meg a kémiai reakciók irányát, pusztán az egyensúlyra vezető reakciók sebességét növelik meg mindkét irányban** (azaz gyorsabban beáll a kémiai egyensúly)**.**

Az enzimek hatalmas, tipikusan **10^6-10^{17}-szeres sebességfokozás**t képesek biztosítani, miközben az egyensúly helyzetét nem változtatják meg, tehát **az egyensúlyi állandó értéke nem változik**.

Az **8.1. táblázat** néhány kémiai reakció esetében azt illusztrálja, hogyan viszonyul egymáshoz a nem-katalizált, és a katalizált reakció sebessége.

8.1. táblázat: Néhány jellegzetes reakció nem katalizált és katalizált sebességének összehasonlítása

Enzim	A nemkatalizált reakció féléletideje	k_{un} (1/sec)	k_{cat} (1/sec)	k_{cat}/k_{un}
OMP dekarboxiláz	78 millió év	$2{,}8\times10^{-16}$	39	$1{,}4\times10^{17}$
Staphylococcus proteáz	130 ezer év	$1{,}7\times10^{-13}$	95	$5{,}6\times10^{14}$
karboxipeptidáz A	7,3 év	$3{,}0\times10^{-9}$	578	$1{,}9\times10^{11}$
trióz-foszfát-izomeráz	1,9 nap	$4{,}3\times10^{-6}$	4300	$1{,}0\times10^{9}$
korizminsav-mutáz	7,4 óra	$2{,}6\times10^{-5}$	50	$1{,}9\times10^{6}$
szénsav-anhidráz	5 sec	$1{,}3\times10^{-1}$	1×10^{6}	$7{,}7\times10^{6}$

8.1. Az enzimek specifitása

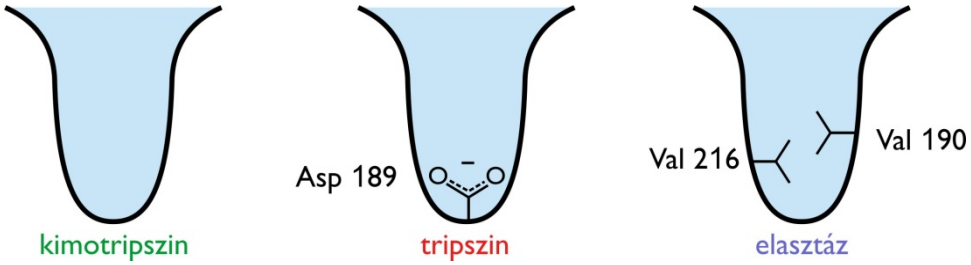
Az **enzimek** mind a kémiai reakció típusa, mind pedig az átalakított molekula szempontjából **specifikusak**. Tehát minden enzim csak egy jól körülhatárolható kémiai reakciót katalizál, és a reaktánsok (szubsztrátok) köre is szigorúan meghatározott. A szubsztrát-specifitás mértéke ugyanakkor **enzimenként eltérő** lehet. Erre jó példa a különböző fehérjebontó enzimek, a proteázok esete. A **proteázok** peptidkötések és egyéb amidkötések valamint **észterkötések hidrolízisé**t katalizálják. Ez minden proteáz esetében így van. A kémiai reakció mechanizmusa miatt minden olyan enzim, amely peptidkötések hidrolízisét katalizálja, óhatatlanul katalizálja az észter kötések hidrolízisét is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A **szubsztrát-specifitás** tekintetében azonban az egyes proteázok között **óriási különbségek** vannak, amelyek jól igazodnak az adott proteáz biológiai funkciójához. A **szubtilizin** nevű proteázt a *Bacillus* nemzetségbe tartozó (pl. *Bacillus subtilis*) baktériumok termelik, az enzimet a környezetükbe ürítik. A baktériumok nem tudnak táplálék gyanánt fehérjéket felvenni a környezetükből, nem képesek endocitózisra. A környezetbe juttatott szubtilizin szinte válogatás nélkül képes az ott lévő fehérjéket bontani. Mivel ez az enzim „pán-specifikus", azaz a **legtöbb oldallánc melletti peptidkötés hasadás**át képes katalizálni, ezért a reakció eredményeként kispeptidek keletkeznek, amelyek már átjutnak a baktérium külső membránján.

A magasabbrendűek táplálékfehérje emésztését egymással komplementer specifitású enzimek együttese végzi. A végeredmény itt is az kell, hogy legyen, hogy kis peptidek keletkezzenek, mert csak ezek szívódnak fel a bélrendszerben. A hasnyálmirigyben termelődő tripszin, kimotripszin és elasztáz együttese hatékony rendszert képez. A **tripszin csak bázikus, Lys és Arg oldalláncok melletti** kötés hasadását katalizálja, a **kimotripszin** a nagyméretű aromás, Trp, Tyr és Phe oldalláncok, míg az elasztáz a **kisméretű alifás pl. Ala, Val, Leu mellett hasít.** Ezek az enzimek tehát már meglehetősen specifikusak.

A szubsztrát specifitást a szubsztrátkötő hely jellege határozza meg (lásd **8.1. ábra**).



8.1. ábra: A három hasnyálmirigy proteáz eltérő kötőzsebe jól magyarázza az enzimek eltérő specifitását

A röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározások eredményeként ismerjük a bemutatott peptidázok szubsztrátkötőhelyeit. A kimotripszin kötőzsebe nagy, és apoláros, a tripszin kötőzsebe alján egy negatív töltésű aszpartilcsoport van, az elasztáz kötőhelye pedig a kimotripszinére hasonlít, de a zseb szűkebb, mert annak oldaláról valin oldalláncok nyúlnak befelé. Mindez tökéletes összhangban áll ezeknek az enzimeknek az imént említett specifitásával.

A rendkívül precízen szabályozott véralvadás folyamatában résztvevő proteázok a fent említett enzimeknél jóval szelektívebbek. A **trombin** például **csak az Arg-Gly** közötti **kötés** hasadását katalizálja, tehát monospecifikus. Általános érvényű megfigyelés, hogy az enzimek sztereospecifikusak, tehát mindig csak az egyik sztereoizomer forma átalakulását katalizálják.

8.2. Kofaktorok

Számos olyan kémiai reakció van, amely katalíziséhez nem elegendő a húsz aminosav biztosította kémiai repertoár. (A metabolizmus szempontjából döntő jelentőségű redox-reakciók például kizárólag kofaktorok jelenlétében mennek végbe.) Ezek katalízisében nem-fehérje természetű anyagok, úgynevezett **kofaktorok** működnek közre. A kofaktorok olyan atomok, ionok vagy szerves molekulák, amelyek sztöchiometrikus mennyiségben, közvetlen szerepet játszanak a katalízisben. A **kofaktor nélküli**, önmagában kémiai katalízisre nem képes enzimet **apoenzimn**ek, míg a kofaktorral komplexben lévő teljes, **funkcióképes formát holoenzim**nek nevezik.

Egyes esetekben a kofaktor szerkezetileg is meghatározó eleme az enzimnek, és eltávolítása csak az enzim denaturálásával végezhető el. Az ilyen kofaktorokra a „**prosztetikus csoport**" kifejezést alkalmazzák, függetlenül attól, hogy a kofaktor kovalensen van-e az enzimhez kötve, vagy sem. Azokat a kofaktorokat, amelyek szerves molekulák, „**koenzimek**"-nek is nevezik. A **vitaminok** zöme **koenzim** vagy a koenzim **prekurzor**a, kiindulási anyaga. A koenzimek is lehetnek prosztetikus csoportok, de lehetnek reverzibilisen kötődő **ko-szubsztrát**ok is, amelyek a reakció végén leválnak az enzimről. A redoxreakciókban szerepet játszó kofaktorok közül a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) például prosztetikus csoport, míg a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) ko-szubsztrát

A legfontosabb fémion-alapú kofaktorokat a **8.2. táblázat,** míg a szerves molekula alapúakat, tehát koenzimeket a **8.3. táblázat** foglalja össze.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

8.2. táblázat: Fém-alapú kofaktorok

Fémion vagy fématom kofaktor	A kofaktort igénylő enzim
Cu^{2+}	citokróm-oxidáz
Fe^{2+} vagy Fe^{3+}	citokróm-oxidáz, kataláz, peroxidáz
K^{+}	piroszőlősav-kináz
Mg^{2+}	hexokináz, piroszőlősav-kináz, glükóz-6-foszfatáz
Mn^{2+}	ribonukleotid-reduktáz
Mo	dinitrogenáz
Ni^{2+}	ureáz
Se	glutation-peroxidáz
Zn^{2+}	szénsav-anhidráz, alkohol-dehidrogenáz

A fémek az esetek többségében ionos formában szerepelnek az enzimek katalitikus centrumában. A **fémionok**, és különösen a kisméretű, többértékű fémionok olyan nagy pozitív töltéssűrűséggel rendelkeznek, amilyennel egyetlen aminosav csoport sem bír. Általában ez a nagy töltéssűrűség járul hozzá a katalízishez azáltal, hogy polarizálja a reakcióban résztvevő csoportok elektronfelhőjét.

A **koenzimek** tipikus **csoportátvivő**k olyan reakciókban, amelyekben valamilyen kémiai csoport kerül át egyik szubsztrátról a másik szubsztrátra. A katalízisben résztvevő koenzim a reakció során kémiailag módosul, tehát „n-edik" szubsztrát! Az esetek egy részében többlépéses kémiai reakcióról van szó, és a teljes folyamat végére a koenzim a kiindulási állapotába kerül. Más esetekben a koenzimet egy, az előzőtől független kémiai reakcióban egy másik enzim által regenerálni kell.

A **8.3. táblázat** a legfontosabb koenzimeknél feltünteti, hogy azok milyen kémiai csoport átvitelében játszanak szerepet, és azt is bemutatja, hogy az adott koenzim mely vitamin átalakulásával jön létre. Példaként egy-egy, az adott koenzimmel működő enzim is megnevezésre kerül. Minden koenzimre igaz, hogy nem egyetlen enzimmel, hanem hasonló kémiai átalakulást katalizáló enzimek egy csoportjával működik együtt. A NAD koenzim például számos dehidrogenáz enzim közös koenzime.

8.3. táblázat: Koenzimek és vitaminok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Koenzim	Vitamin	Szállító csoport	Példa enzim
tiamin-pirofoszfát (TPP)	B_1 (tiamin)	aldehidek	piroszőlősav-dehidrogenáz
flavin-adenin-dinukleotid (FAD)	B_2 (riboflavin)	H atom	borostyánkősav-dehidrogenáz
nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD)	niacin	hidrid-ion ($:H^-$)	alkohol-dehidrogenáz
koenzim-A (CoA)	pantoténsav	acilcsoport	acetil-CoA-karboxiláz
biocitin	biotin	karboxilcsoport	piroszőlősav-karboxiláz
piridoxál-foszfát (PLP)	B_6 (piridoxin)	aminocsoport	glikogén-foszfatáz
5'-dezoxiadenozil-kobalimin	B_{12}	H atom és alkilcsoport	metilmalonil-CoA-mutáz
tetrahidrofólsav (THF)	fólsav (B_9)	egyszénatomos csoportok	timidilát-szintáz

8.3. Az enzimek osztályozása

Az élő szervezetben működő különböző enzimek száma hatalmas, így annak érdekében, hogy a kutatók egyértelműen tudjanak egy-egy enzimre hivatkozni, létre kellett hozni egy egyértelmű osztályozási rendszert, egyfajta katalógust. Ezt mutatja be a **8.4. táblázat.**

8.4. táblázat: Az enzimek reakciótípus szerinti osztályozása

Osztály	Reakciótípus	Példa
1. oxidoreduktázok	redoxi elektronok, H atomok,H^--ionok átvitele	tejsav-dehidrogenáz
2. transzferázok	csoportátvitel pl. foszforil csoport	NMP-kináz
3. hidrolázok	hidrolízis, funkciós csoport átvitele vízre	kimotripszin
4. liázok	csoportátvitel kettős-kötésre, vagy kettőskötés kialakítása csoportelvonással	fumaráz
5. izomerázok	intramolekuláris csoport-átvitel	trióz-foszfát-izomeráz
6. ligázok	C–C, C–S, C–O és C–N kötés kialakítása ATP hasadással kapcsolt kondenzációs reakcióban	aminoacil-tRNS-szintetáz

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az **enzimek katalogizálásá**nál egy **négyszintű** beosztást alkottak, mellyel végül minden enzim egy négyjegyű kódszámmal azonosítható. Az első szintet a katalizált kémiai reakció szerint hat csoportra osztották fel. Ennek megfelelően **hat enzim osztály**t különítettek el az alábbiak szerint: **oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok és ligázok**.

A beosztás többi elvét a hexokináz enzim példáján mutatjuk be. Az enzim-katalógusban a hexokináz a 2.7.1.1. sorszámot kapta, mivel ez az enzim egy transzferáz, vagyis a 2. osztályba tartozik, a transzferált csoport egy foszforil-csoport (7. típus), a foszfotranszfer hidroxilra történik (1. típus), és a foszfotranszfer D-glükózra történik (1. típus).

8.4. Az enzimkatalízis termodinamikai alapjai

Mielőtt rátérnénk arra, hogy az enzimek miként képesek megnövelni a kémiai reakciók sebességét, először azt fontos megértenünk, hogy általánosságban mi szabja meg a nem katalizált kémiai reakciók sebességét. Ha ezt már megértettük, csak akkor alkothatunk megalapozott koncepciókat arról, hogy az enzimek hogyan képesek sebességet növelni.

A **8.1. egyenlet**tel jelzett, nem katalizált reakció sémájában az egymással egyensúlyra vezető reakcióba lépő anyagokat „A” illetve „B”, míg a reakció eredményeként keletkező terméket „P” (produktum) jelöli.

$$A + B \Leftrightarrow P$$ **8.1. egyenlet**

A fenti reakcióban, amikor még csak A és B vannak jelen, tehát termék még nem keletkezett, a reakció sebessége a **8.2. egyenlet**tel írható le, ahol „V” a reakció sebessége, a szögletes zárójel moláris koncentrációkat jelent, és „t” az időt jelzi. A reakció sebessége tehát nem más, mint a termékkoncentráció időbeni változásának üteme.

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B]$$ **8.2. egyenlet**

Mivel a kémiai reakcióhoz a reagáló molekuláknak találkozniuk, „ütközniük” kell, intuitívan is belátható, hogy a **reakciósebesség egyenesen arányos** kell, hogy legyen az egymással **reagáló molekulák koncentrációjával**. Kétszer akkora koncentráció kétszeresére növeli az ütközés valószínűségét. A koncentrációkon felül van egy másik szorzótényező is, a „k”. A „k” egy, a reakcióra jellemző arányossági tényező, a reakció sebességi állandója.

A reakciónak tehát fontos jellemzője ez a **sebességi állandó**. A reakció sebessége szempontjából a lényeget éppen ez a „k” rejti, a fő kérdés, hogy mitől függ ennek az értéke. A lehető legegyszerűbb mechanizmus modellt, amely már értelmezni tudja, hogy mitől függ a k sebességi állandó értéke, a **8.3. egyenlet** mutatja.

$$A + B \Leftrightarrow X^* \Rightarrow P$$ **8.3. egyenlet**

Tegyük fel, hogy a két molekula reakciója során egy pillanatszerűen gyors, egyensúlyra vezető folyamatban kialakul egy, „X*” molekula, amely az egymással reagáló molekulákhoz képest „aktivált állapotban”, más szóval magasabb szabadentalpia szinten van.

Ezt az X* molekulát „**átmeneti állapotnak**” (angolul *transition state*) nevezzük (ami annak tükrében, hogy egy konkrét molekuláról van szó talán szokatlannak hat). Az itt tárgyalt leírásban ez az X* molekula alakul át P termékké. Az X* molekulát eredményező kémiai reakció egyensúlyi állandóját (figyelem, ez nem sebességi állandó!) K^*, míg az X*→P lépésre vonatkozó sebességi állandót k’ jelöli. A 8.3. séma a **8.4. egyenlet**hez vezet.

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k'[X^*]$$ **8.4. egyenlet**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A **termékkeletkezés sebessége** tehát végső soron **az átmeneti állapot koncentrációjának, és egy** – látszólag további bonyodalomként – újonnan bevezetett **sebességi állandónak**, a *k'*-nek **a szorzata**.

Első lépésként vizsgáljuk meg, hogy mitől függ az átmeneti állapot koncentrációja. Ez átvezet bennünket a termodinamika területére. Az X* egy *K** egyensúlyi állandóval jellemzett egyensúlyban van a kiindulási anyagokkal a **8.5. egyenlet** szerint.

$$K^* = \frac{[X^*]}{[A][B]}$$ **8.5. egyenlet**

A *K** egyensúlyi állandóra felírható a kémiai reakciók egyensúlyi állandója és a kémiai reakciót kísérő standard szabadentalpia változás közötti összefüggés a **8.6. egyenlet** szerint.

$$-RT \ln K^* = \Delta G^*$$ **8.6. egyenlet**

A **8.6. egyenlet**ben szereplő *ΔG** az a szabadentalpia különbség, amely az alapállapotú A és B molekulák és az aktivált állapotú X* átmeneti állapot szabadentalpia értékei között van. A **ΔG*** más néven **a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpia** (amit hibásan leegyszerűsítve gyakran aktiválási energiának is neveznek).

A **8.6. egyenlet**ből a *K** két egyszerű algebrai átalakítással a **8.7.** és **8.8. egyenlet**ek szerint fejezhető ki.

$$\ln K^* = \frac{-\Delta G^*}{RT}$$ **8.7. egyenlet**

$$K^* = e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}}$$ **8.8. egyenlet**

A **8.8. egyenlet** és a **8.5. egyenlet** alapján adódik a **8.9. egyenlet**sor, amelynek végeredményét a **8.10. egyenlet** mutatja.

$$V = k'[X^*] = k'(K^*[A][B]) = k' e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B]$$ **8.9. egyenlet**

$$V = k' e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B]$$ **8.10. egyenlet**

A reakciósebesség tehát a már említett A és B molekulák koncentrációján, valamint a k' sebességi állandó értékén felül a *ΔG** aktiválási szabadentalpia értékétől függ.

Ha a *ΔG** értéke 0, akkor az $e^{-\Delta G^*/RT}$ értéke 1. Minél nagyobb pozitív számértéke van az aktiválási szabadentalpiának, annál kisebb lesz az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező értéke, közelítve a nullához. Az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező értéke tehát 0 és 1 között lehet.

Képszerűen megfogalmazva, az $e^{-\Delta G^*/RT}$ [A][B] szorzatban szereplő $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező azt mutatja meg, hogy az A és B molekulák ütközésének mekkora hányada eredményez X* átmeneti állapotot. Ha a szorzótényező 1, akkor minden ütközés átmeneti állapotot eredményez, ha 0, akkor az ütközések nem eredményeznek átmeneti állapotot.

Előbbi esetben a reakciósebesség maximális, míg az utóbbi esetben természetesen nulla. Tehát, minél nagyobb a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpia, annál lassabb lesz a reakció.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Tehát abban az elméleti esetben, ha a ΔG^* értéke 0, és így az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező értéke 1, a reakció maximális ütemben zajlik. Csakhogy még nem esett szó arról, hogy mekkora lehet ez a maximális ütem. Az $e^{-\Delta G^*/RT}$ szorzótényező ennek az elméleti maximális ütemnek a szorzója. Ezt a maximális lehetséges ütemet a *k'* sebességi állandó jelenti.

A fenti modell a *k'* sebességi állandó mibenlétére is egyszerű magyarázatot ad az alábbiak szerint. Ahhoz, hogy az átmeneti állapot termékké alakuljon, legalább egy kémiai kötésnek fel kell bomlania. **A k' sebességi állandó** (képszerűbben megnevezve sebességi ráta, vagyis sebességi ütem) azt fejezi ki, hogy milyen ütemben, **milyen gyakorisággal (frekvenciával) képes az adott kémiai kötés felszakadni**.

Ezt a **8.11. egyenlet** fogalmazza meg, amelyben a ν (nű) azt a frekvenciát jelzi, amellyel az elbomlandó kötés rezeg, a κ (kappa) pedig az átviteli együttható. A κ azt mutatja meg, hogy a már kialakult átmeneti állapot milyen arányban alakul termékké, illetve alakul vissza kiindulási anyagokká. Ha a kappa értéke 0,5, akkor az esetek felében termék irányba, az esetek másik felében visszafelé alakul át, ha a kappa értéke 1, akkor az átmeneti állapot kizárólag termék irányba alakul át.

$$k' = \kappa\nu$$ **8.11. egyenlet**

Az egyszerűség kedvéért vegyük azt az esetet, amikor az átviteli együttható értéke 1.

A kötés rezgésének energiája a **8.12. egyenlet**ben szereplő módon, a Planck törvény szerint függ a rezgés frekvenciájától.

$$\nu = \frac{E}{h}$$ **8.12. egyenlet**

Az egyenletben *E* a rezgő kötés energiáját, *h* a Planck állandót jelzi. Az egyenletben szereplő energia ugyanakkor egy másik módon is felírható a **8.13. egyenlet** szerint, amelyben k_b a Boltzmann állandót, *T* pedig a Kelvin skálán vett hőmérsékletet jelzi.

$$E = k_B T$$ **8.13. egyenlet**

A 8.11-8.13. egyenleteket kombinálva kapjuk a **8.14. egyenlet**et.

$$k' = \frac{k_B T}{h}$$ **8.14. egyenlet**

A **8.4.**, **8.10.** és a **8.14. egyenlet**ek kombinálásával kapjuk a **8.15.** illetve **8.16. egyenlet**eket, amik kifejtik, hogy végül is mitől függ egy nem katalizált kémiai reakció sebessége.

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}}$$ **8.15. egyenlet**

$$V = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^*}{RT}} [A][B]$$ **8.16. egyenlet**

Mint látható, a reakció **k sebességi állandó**ja **fordítottan arányos a reakcióra jellemző aktiválási szabadentalpiával**, és összetett módon függ a hőmérséklettől. A hőmérséklet mind a pre-exponenciális

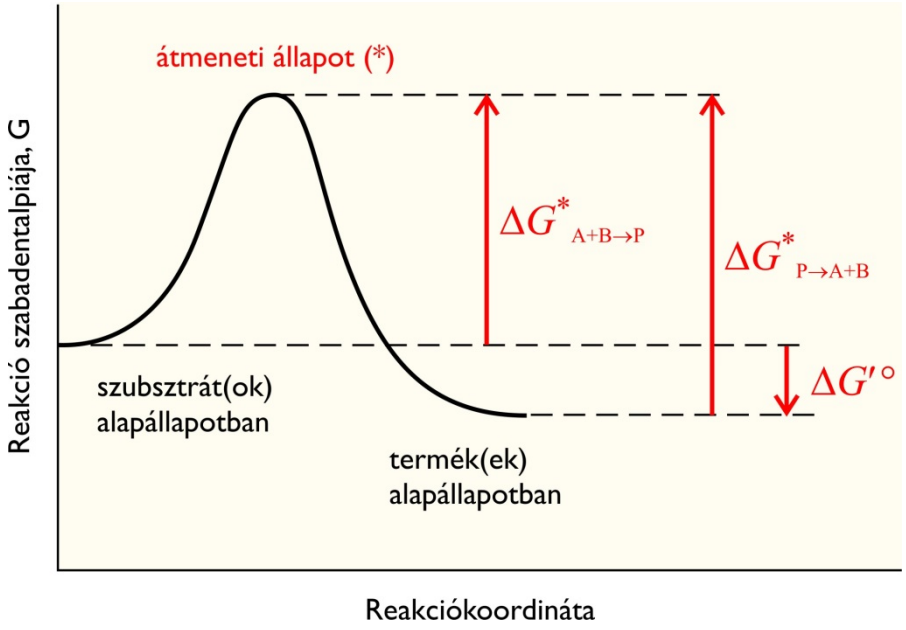
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

szorzótényezőben, mind pedig az exponenciális tag kitevőjének nevezőjében szerepel. Mindkét tag jelzi, hogy **a hőmérséklet emelése növeli a reakció sebességi állandóját**. A pre-exponenciális tagban, amely a *k'* sebességi állandót fejti ki, a hőmérsékletemelés növeli az elbomló kötés rezgési frekvenciáját, míg az exponenciális tagban a hőmérsékletemelés növeli azon ütközések arányát, amelyek átmeneti állapotot eredményeznek. Az egyenlet tehát jó összhangban van azzal az általános érvényű megfigyeléssel, miszerint a hőmérséklet emelése növeli a kémiai reakciók sebességét.

Maga a reakciósebesség a **8.4. egyenlet**ben leírtak szerint a k sebességi állandón kívül egyenesen arányos a reakcióba lépő anyagok koncentrációjával is.

A kémiai reakciók sebességére vonatkozó termodinamikai modellt a **8.2. ábra** szemlélteti.

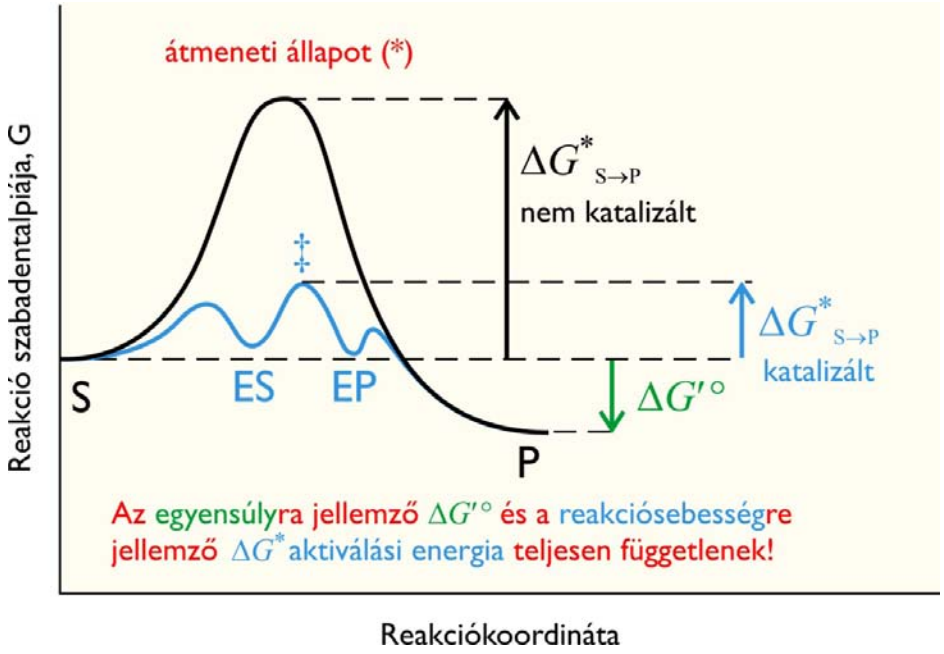
Az ábra grafikusan mutatja be, hogy a szubsztrátoknak egy alapállapotból egy magasabb szabadentalpia szintű aktivált átmeneti állapotba kell kerülniük. Az ábra azt is mutatja, hogy **az egyensúlyi állapot**ban kialakuló reagens arányok, amelyeket a reakciót kísérő standard szabadentalpia változás ($\Delta G'^{\circ}$) értéke jelez, **függetlenek a reakció sebességétől, amit az aktiválási szabadentalpia (ΔG*) értéke jellemez**.



8.2. ábra: A kémiai reakciók sebességére vonatkozó termodinamikai modell

A termodinamikai leírása egyértelműen megmutatja, hogy az enzimek milyen módon növelik a kémiai reakció sebességét: az **enzimek csökkentik a reakció aktiválási szabadentalpiáját** (lásd **8.3. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.3. ábra: Az enzimek azáltal növelik a reakció sebességét, hogy csökkentik a reakció aktiválási szabadentalpiáját

A kérdés, hogy alapvetően milyen módokon csökkenthető a ΔG^*. Ennek megválaszolásához idézzük fel, hogy a szabadentalpia változás minden esetben, így az aktiválási szabadentalpia esetében is, felbontható egy entalpiával kapcsolatos és egy entrópikus tagra a **8.17. egyenlet** szerint.

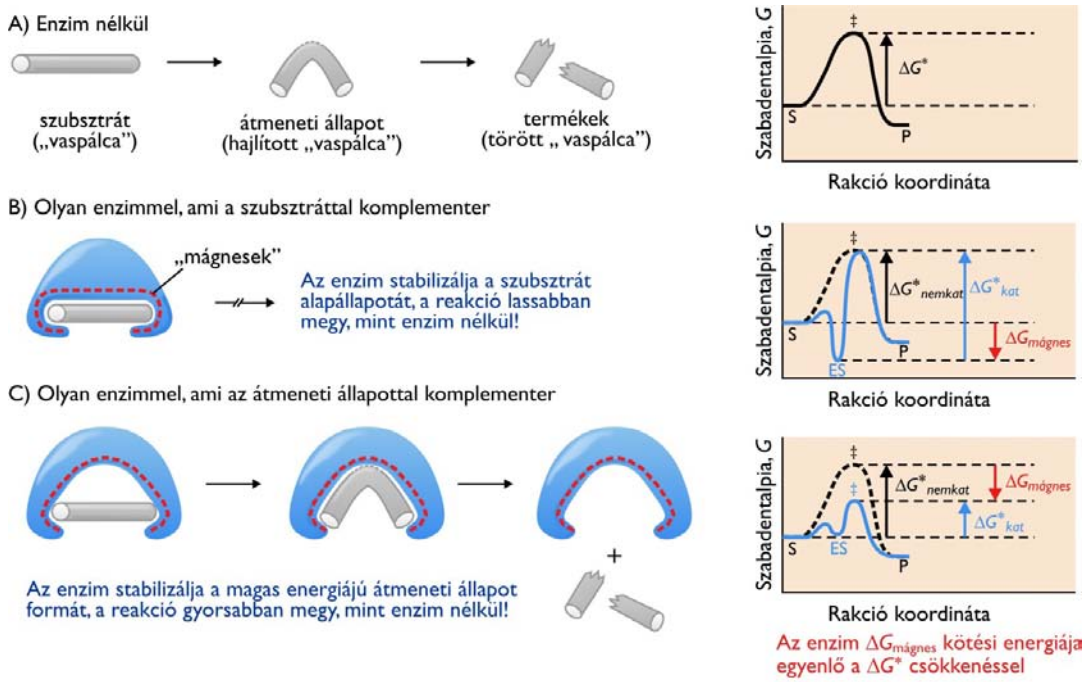
$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \qquad \textbf{8.17. egyenlet}$$

A reakciósebesség szempontjából kedvezőtlen, sebességet csökkentő, magas ΔH^* tag azt jelenti, hogy az átmeneti állapothoz (például egy energetikailag kedvezőtlen elektroneloszlás miatt) magas energiaszint tartozik, ami egyben azt is jelenti, hogy az átmeneti állapot nagyon alacsony arányban jelenik meg. Az **enzim azáltal csökkenti az entalpia tagot, hogy stabilizálja az átmeneti állapotot**, kedvezőbb vonzó kölcsönhatásokat alakít ki az átmeneti állapottal, mint a szubsztráttal. Az enzimek tehát olyan **aktív hely**el rendelkeznek, amely **komplementer az általuk katalizált kémiai reakció átmeneti állapotával**. Érdemes megjegyezni, hogy azt, hogy az enzimek a kémiai reakciót az átmeneti állapot stabilizálásán keresztül gyorsítják, elsőként Linus Pauling javasolta. Ezt az elvet szemlélteti a **8.4. ábra.**

Az ábrán illusztrált modell az enzim működését ahhoz hasonlítja, ahogyan egy mágnessel (pl. nagy energiájú elektromágnessel) gyorsítani lehetne egy rezgő vaspálca eltörését.

A modell szerint az enzim-átmeneti állapot komplexben rejlő, entalpiával kapcsolatos kötési energia (a példában a megfelelő alakú mágnes, és a meghajlított vaspálca közötti kölcsönhatás) az, ami az aktiválási szabadentalpia csökkenésére használódik fel.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.4. ábra: Az enzimek kötőzsebe az átmeneti állapottal komplementer, így az átmeneti állapotot stabilizálja

Az ábra azt is illusztrálja, hogy amennyiben egy enzim rendkívül szorosan illeszkedne a szubsztráthoz (a mágnes az egyenes vaspálcához), tehát nagy kötési energia tartozna az enzim-szubsztrát komplexhez, akkor az enzim éppenséggel lassítaná a reakciót. A szubsztrát a komplexben az alapállapotnál alacsonyabb szabadentalpia szintre kerülne, és emiatt az aktiválási szabadentalpia szintje éppenséggel emelkedne.

A reakciósebesség szempontjából kedvezőtlen negatív ΔS^*, tag azt jelzi, hogy az átmeneti állapot lényegesen rendezettebb, mint a kiindulási állapot. A rendeződés miatt az átmeneti állapot létrejöttének magas, entrópiával kapcsolatos ($-T\Delta S^*$ formában kifejezett) energetikai ára van. Az enzim entrópikus szempontból oly módon gyorsíthatja a kémiai reakciót, hogy a kötőzsebe egymáshoz éppen megfelelő távolságba és orientációba hozza, tehát rendezi az egymással reakcióba lépő molekulákat.

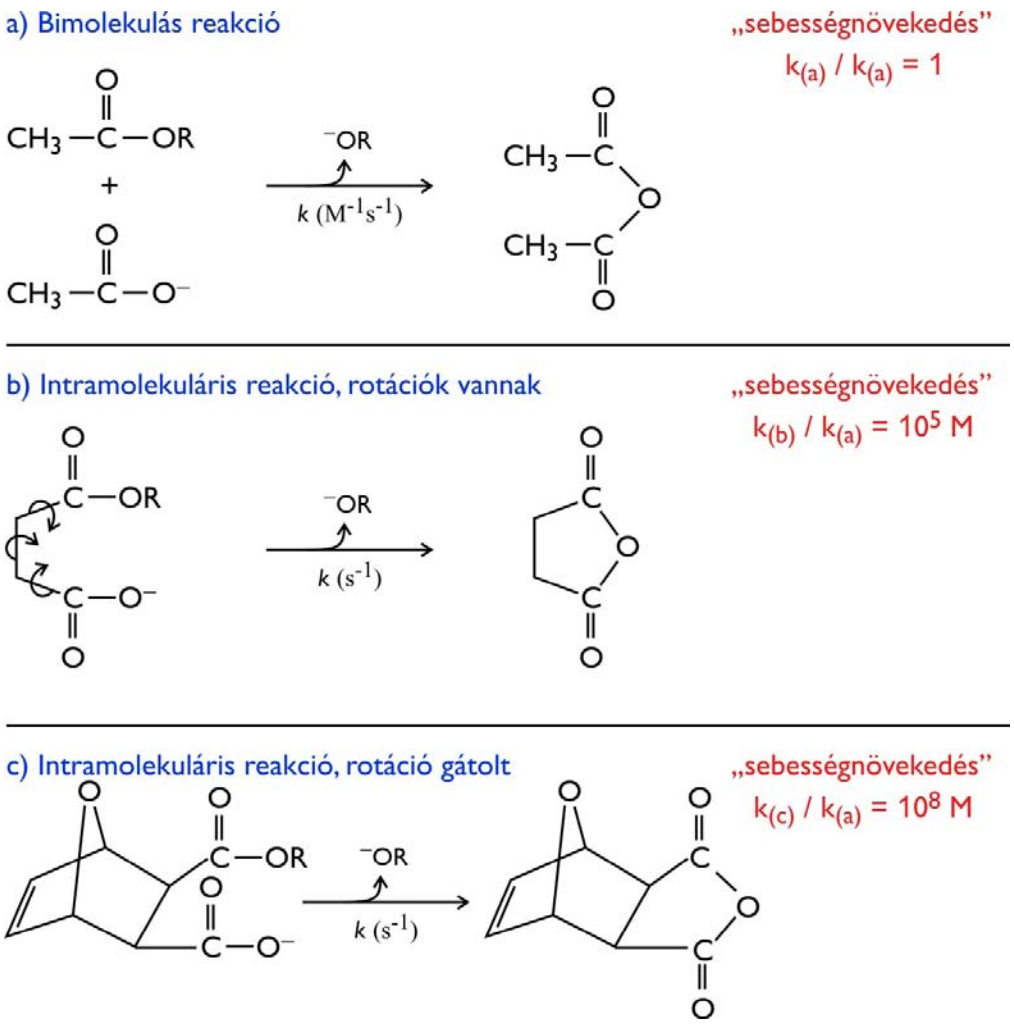
Ezt az entrópiával kapcsolatos jelenséget enzimkatalízistől független esetekben is ki lehet mutatni. Ezt az alábbi elegáns példán keresztül nézzük meg.

A **8.5. ábrán** szereplő példában ugyanaz a fajta kémiai reakció zajlik le azonos kémiai csoportok között. Az egyetlen eltérés az, hogy a reakcióban résztvevő kémiai csoportok egymáshoz képest orientálva vannak-e.

Demonstrálható, hogy egy **reakció sebességét nagymértékben növeli**, ha a reakcióba lépő csoportok egymáshoz közel, és megfelelő pozícióban rögzítve vannak (**proximitás és orientáció**). A konkrét példában egy karbonsav-észter és egy karbonsav reagál, és egy karbonsav-anhidrid keletkezik.

A **8.5. ábra** a) példában a reakció bimolekulás, tehát két molekulának kell ütköznie. A reakció sebességét a termék keletkezés ütemével (d[P]/dt) fejezzük ki, aminek mértékegysége M/s, azaz Ms^{-1}-nek adódik. Ebben az esetben a reakciósebesség két molekula koncentrációjával arányos. A V=k[A][B] egyenletben szereplő sebességi állandó mértékegysége $M^{-1}s^{-1}$, azért, hogy a sebesség mértékegysége a már említett Ms^{-1} legyen.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.5. ábra: Az egymással reagáló csoportok megfelelő közelségbe és orientációba kényszerítése rendkívüli mértékben növeli a reakció sebességét

A **8.5. ábra** b) és c) eseteiben az a) esettel azonos kémiai csoportok között, de egyetlen molekulán belül zajlik le a reakció. Ezért ebben az esetben a reakció sebessége csak egyetlen molekula koncentrációjával lesz arányos. A sebességi állandó mértékegysége ennek megfelelően nem Ms^{-1}, hanem s^{-1} lesz. De miért fontos ez?

A b) és c) esetekben a reakció lényegesen nagyobb sebességgel zajlik, mint az a) esetben. A sebességnövekedés aránya kifejezhető a sebességi állandók arányával. Az eltérő mértékegységek miatt, amikor a b) illetve a c) esetek sebességi állandóját elosztjuk az a) eset sebességi állandójával, az eredményt moláris koncentráció mértékegységben kapjuk meg. Ennek a hányadosnak a neve "effektív koncentráció". Formálisan azt mutatná meg, hogy milyen koncentrációban kéne, hogy legyenek a bimolekulás reakció komponensei ahhoz, hogy akkora legyen a reakciósebesség, mint az adott egymolekulás reakcióban.

A b) esetben a reakció sokkal gyorsabban zajlik, mint az a) esetben, mivel a két egymással reagáló funkciós csoport nem a reakcióedény teljes térfogatában diffundálva találkozik, hanem egy jóval kisebb térben mozogva. Látszólag tehát egy egyszerű koncentrációnövekedésről van szó, ugyanannyi csoport kisebb térfogatban van jelen.

A b) esetben a két funkciós csoport közel van egymáshoz, de nincsenek egymás felé orientálva. A c) esetben a két csoport nem csak közel van egymáshoz, de egymáshoz is van irányítva, így még a b) esetben látotthoz képest is ezerszer nagyobb a sebességi állandó. A b) és c) esetek azonban nagyságrendileg azonos méretű térrészben vannak, a számolás eredményeként kapott "effektív koncentrációk", 10^5 M illetve 10^8 M pedig a valóságban nem jöhetnek létre.

A sebesség növekedése tehát nem fogható fel pusztán valamilyen megnövelt koncentráció hatásának. Az itt látott sebességnövekedésben a döntő szerepet a konformációs entrópia csökkenése, vagyis a preferált térbeni elrendeződés

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

játssza. Míg a bimolekulás esetben a reakció végbemenetelét nagy entrópia csökkenés kíséri, az egymolekulás reakciókét nem.

8.5. Az enzimkatalízis molekuláris mechanizmusa

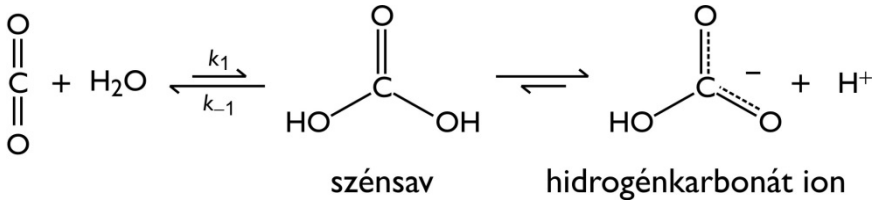
Az eddigiekben megtárgyaltuk az enzimkatalízis termodinamikai hátterét, de még nem esett szó arról, hogy konkrétan milyen molekuláris mechanizmusok keretében megy végbe a sebességnövelés. Az alábbiakban ezt foglaljuk össze, és az egyes megoldási típusokat konkrét példán keresztül részleteiben is megtárgyaljuk.

Molekuláris mechanizmus szerint három fő típust különítünk el, a **fémion-katalízis**, az **általános sav-bázis katalízis**t és a **kovalens katalízis**t. Mindegyik típusra igaz, tehát az enzimekre általánosan jellemző, hogy az enzim több száz aminosav csoportja közül elkülöníthető néhány csoport, amely szoros együttműködésben kulcsszerepet játszik a katalízisben. Ezek a csoportok alkotják az enzimnek az úgynevezett **aktív centrum**át. Az enzimek egy részében ettől világosan elkülöníthető a **szubsztrátkötő hely**, amely a szubsztrátot, illetve az átmeneti állapotot stabilizálja.

8.5.1. Fémion katalízis

A fémionok már említett nagy töltéssűrűsége a katalízisben számos eltérő módon is szerepet játszhat. A legegyszerűbb esetben segíthet a szubsztrát megkötésében. A foszforilált szubsztrátok esetében például tipikus, hogy az enzim valamilyen fémiont is használ. Egyes átmeneti állapotok negatív töltést hordoznak, így ezeket a fémion stabilizálhatja. A **fémionok elektronelszívó hatása növelheti egyes csoportok**, pl. a víz savas karakterét, tehát **protonleadó képességét**. A protonleadást követően visszamaradó, fémionhoz kötött hidroxil erős nukleofil.

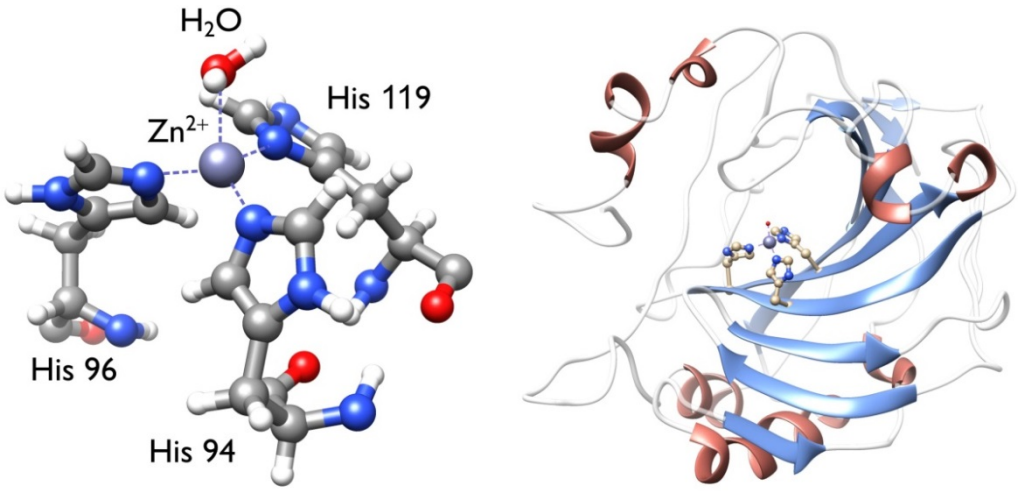
Erre a mechanizmusra jó **példa** a **szénsavanhidráz enzim** működése. A reakció, amit ez az enzim katalizál, a víz reverzibilis reakciója széndioxiddal (lásd **8.6. ábra**).



8.6. ábra: A víz reverzibilis reakciója széndioxiddal

A katalizálatlan reakció önmagában is viszonylag gyors, de a szervezetben sokkal gyorsabban kell végbemennie. A szövetekben a sejtek által termelt CO_2 a koncentrációviszonyoknak megfelelően vízzel reagálva szénsavat képez. Ennek a folyamatnak pillanatszerűen kell végbemennie ahhoz, hogy ne keletkezzenek buborékok, amelyek trombózist okozhatnak. A tüdőben a reakció a koncentráció-viszonyoknak megfelelően ellenkező irányban zajlik. Itt is hasonlósan gyors reakcióra van szükség, de ebben az esetben ahhoz, hogy a tüdőben áthaladó vér nagy sebességgel megszabadulhasson a széndioxidtól, a gáz halmazállapotú széndioxid kilégzésre kerülhessen.

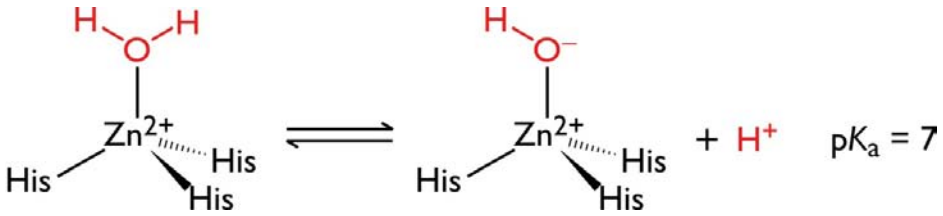
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.7. ábra: A szénsavanhidráz enzim szerkezete és az aktívhely felépítése (PDB: 1CA2)

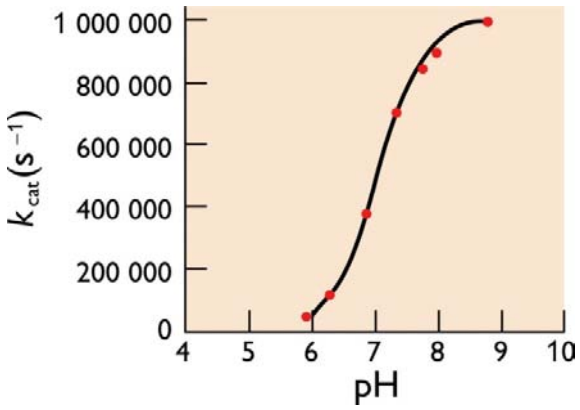
A szénsavanhidráz enzim **aktívhely**én egy **cinkion** található, amit **három hisztidil oldallánc** N-atomjai **koordinál**nak. A **negyedik koordinációs pozícióban** egy **víz**molekula van (lásd **8.7. ábra**).

Ez a vízmolekula központi szerepet játszik a reakció katalízisében. A cinkionon keresztüli koordinációja miatt ez a vízmolekula már neutrális közegben, tehát pH 7,0 körül felerészben leadja a protonját. Ugyanez a disszociáció mérték az oldatban lévő víz-molekuláknál csak kb. 15,7-es elméleti pH értéknél következne be. A **cinkion** tehát jelentősen **növeli a vízmolekula savasságát**, és **ezáltal nukleofil OH^-** csoportot állít elő (lásd **8.8. ábra.** és **8.9. ábra**).



8.8. ábra: A szénsavanhidráz aktívhelyén hisztidil oldalláncokkal koordinált cinkion aktivál egy vízmolekulát

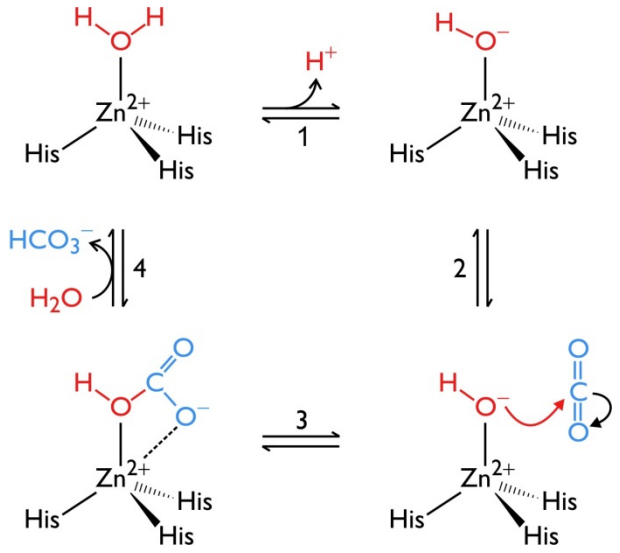
A reakció sebességének pH-függése mutatja, hogy abban egy pK_a»7 értékkel rendelkező disszociációra képes funkciós csoport vesz részt. Ez a cinkion által aktivált vízmolekulának felel meg (lásd **8.9. ábra**).



8.9. ábra: A szénsavanhidráz katalitikus aktivitásának pH-függése

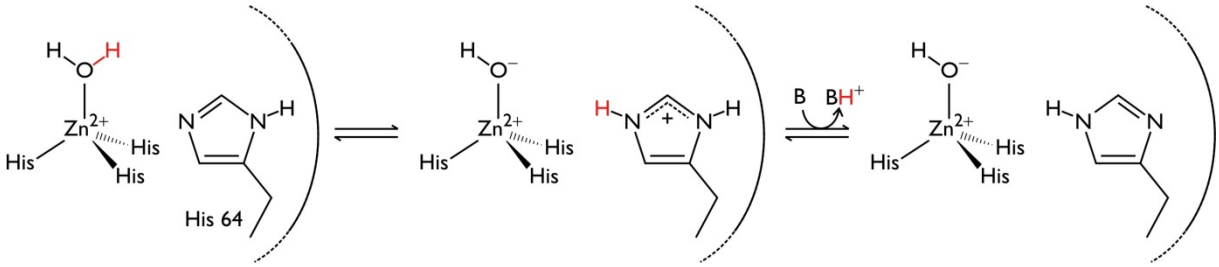
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A cinkion által aktivált **OH^-** sokkal erősebb **nukleofil**, mint a víz, ezért hatékonyabban **támadja a széndioxido**t. A keletkező hidrogénkarbonát anion egy vízre cserélődik, ami újfent protont ad le. Az enzim-katalizálta reakcióban másodpercenként mintegy egymillió ilyen ciklus játszódik le (lásd **8.10. ábra**).



8.10. ábra: A szénsavanhidráz enzim által katalizált reakció lépései

A ciklus egyetlen lépése sem lehet lassabb, mint maga a teljes katalizált reakció, tehát a proton első lépésben történő eltávolítása is legalább másodpercenként egymilliószor meg kell, hogy történjen. Erre egy „proton csatorna" szolgál (lásd **8.11. ábra**). Egy hisztidin veszi át a protont, ami az oldatban pufferként található kisméretű bázisoknak adja azt át.



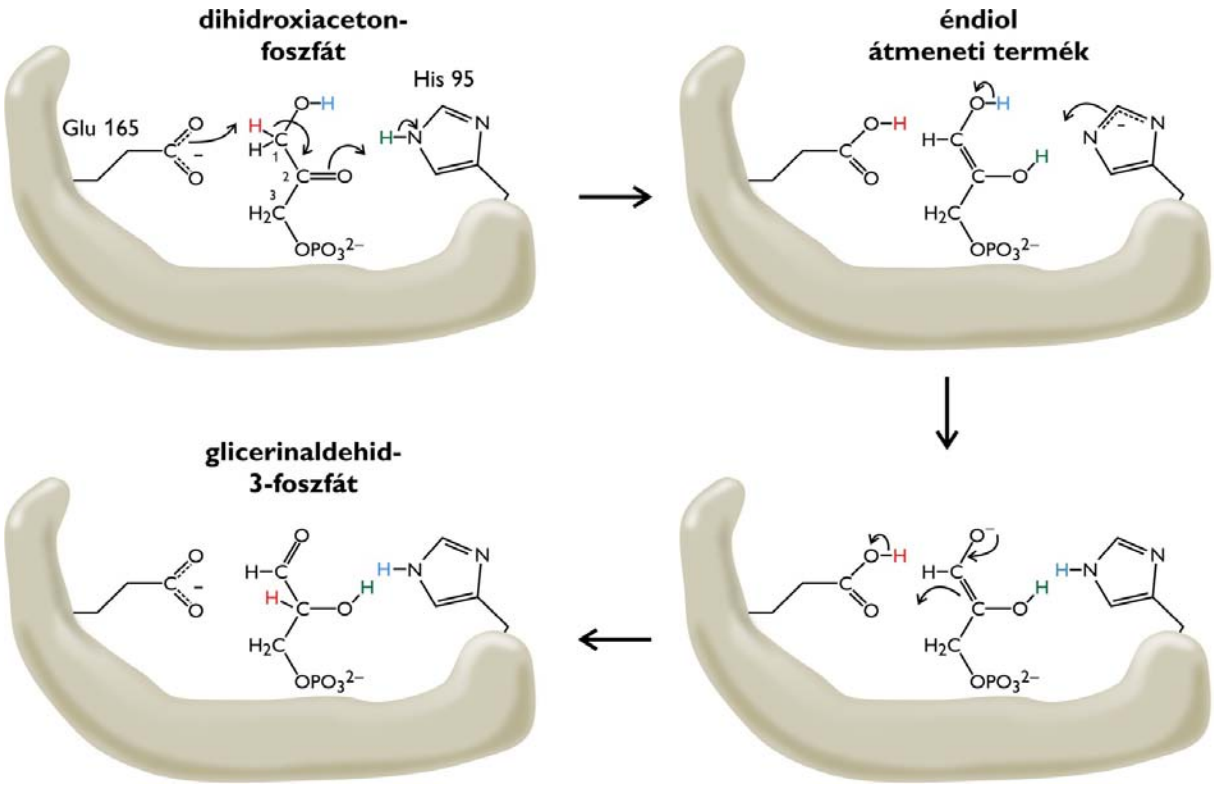
8.11. ábra: A szénsavanhidráz által katalizált reakció részletes molekuláris mechanizmusa

8.5.2. Általános sav-bázis katalízis

Egyes kémiai reakciók katalizálhatók savval, bázissal, esetleg mindkettővel. A katalízis ennél a mechanizmus típusnál gyakran abban áll, hogy az átmeneti állapotban egy nagy energiájú (emiatt kis frekvenciával kialakuló), negatívan töltött csoport ideiglenes protonálódik, majd később protont ad le. Az első lépést sav képes katalizálni, a másikat bázis. Vizes oldatban, savas közegben H_3O^+, lúgos közegben OH^- lehet a katalizátor, és ekkor specifikus sav, illetve specifikus bázis katalízisről beszélünk. A kétféle katalízis egy időben nem mehet végbe nagy hatékonysággal, hiszen vagy a hidroxónium ion koncentrációja magas, vagy a hidroxid ioné.

Egy általános HA sav, illetve B: bázis ugyanilyen katalizáló szerepet tölthet be. Ekkor általános sav illetve bázis katalízisről beszélünk. Egy **enzim aktív helyén egyszerre** lehet jelen **általános sav** és **általános bázis**, ezért a kétféle katalízis egyszerre végbemehet. Jó **példa** erre a **trióz-foszfát-izomeráz enzim** mechanizmusa (lásd **8.12. ábra**). Az enzim a glikolízis egyik lépését katalizálja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.12. ábra: Az általános sav-bázis katalízis szép példája a trióz-foszfát-izomeráz enzim működése

Az enzim **aktívcentrum**ának oldalláncai rendre két különböző szubsztrát-csoporttal reagálnak a reakció során. Ha az egyiktől protont vesznek fel, akkor a protont majd egy másiknak adják le, illetve ha az egyiknek protont adnak le, akkor a protont majd egy másiktól veszik fel. Így alakul át a szubsztrát. Az enzimatikus reakció első lépésben az enzim egyik **glutaminsav**ának (Glu165) disszociált karboxilcsoportja funkcionál bázisként, és egy **hisztidin** (His 95) nem-protonált imidazol csoportja tölti be a sav szerepét. (A nem protonált imidazol ebben az esetben tehát sav, de az ismert esetek nagyobbik részében bázisként működik).

Az első lépésben a dihidroxiaceton-foszfát egyik része tehát protont veszít, másik része protont nyer, és ennek megfelelően elektronszerkezete átrendeződik, egy éndiol átmeneti állapot keletkezik. (Az enzim nélküli reakcióban egy kedvezőtlenül magas energiájú töltés-szeparáció jönne létre az átmeneti termékben. A C_1 szénatom pozitív töltésű lenne, míg a karbonil oxigén negatív.)

A második lépésben a negatív töltésű imidazol bázisként protont vesz fel az éndiol C_1 szénatomjához kapcsolódó hidroxilcsoporttól. A negatív töltés megjelenése a két szénatom közötti kettőskötés felbomlásához vezet. A glicerinaldehid-3-foszfát kialakulásához vezető utolsó lépésben a protonált Glu165 immár savként protonálja a negatív töltésű átmeneti állapotot. Tessék felfigyelni rá, hogy a **hisztidin** oldallánca **általános sav**ként **és bázis**ként is funkcionál!

8.5.3. Kovalens katalízis

Az előző két reakciómechanizmus típusban az enzim azáltal csökkentette az aktiválási szabadentalpiát, hogy polarizálta a reakcióban résztvevő molekulák kötéseit, illetve protonokat vett fel ezektől a molekuláktól és / vagy protonokat adott át nekik. Ezeknek az eseteknek egy részében az átmeneti állapot pontosan ugyanaz a molekula a nem katalizált, és a katalizált folyamatban. Az eltérés csak az, hogy a katalizált folyamatban az enzim elősegíti az átmeneti állapot kialakulását, illetve stabilizálja a már létrejött átmeneti állapotot. Az első két mechanizmus típusban az enzim és a reakcióban szereplő molekulák között azonban nem alakul ki kovalens komplex.

A **kovalens katalízis** különlegessége éppen abban áll, hogy **átmeneti kovalens kötés** alakul ki **az enzim és az átalakuló szubsztrát között**. Az enzim ezáltal teljesen új reakcióutat nyit meg, olyat, ami az enzim hiányában

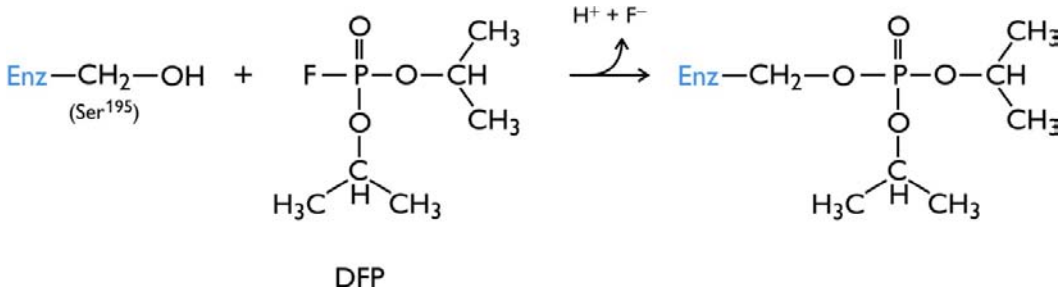
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

nem valósulhatna meg. Erre jó **példa** a **szerin-proteázok** működése, amit a **kimotripszin** működésén keresztül mutatunk be.

Mielőtt a részleteket ismertetnénk, fontos megjegyezni, hogy a három felsorolt katalitikus mechanizmus típus nem zárja ki egymást. **Egyes enzimreakciókban** akár **mindhárom mechanizmus** tetten érhető. A **kimotripszin** esetében például a **kovalens katalízis** mellett **sav-bázis katalízis** is szerepet játszik.

A kimotripszin a szerin-proteázok közé tartozik. A **szerin-proteázok** az élő szervezetben peptidkötések hidrolízisét katalizálják. A reakciót szintetikus szubsztrátokkal vizsgálva ugyanakkor kiderült, hogy nem csak **peptidkötés** (R-CONH-R'), de **észterkötés** (R-COO-R') **hidrolízis**ét is képesek katalizálni.

A szerin-proteázok a nevüket egy különlegesen **reakcióképes szerin** oldalláncról kapták. Amikor kimotripszint reagáltattak **diizopropil-fluoro-foszfát**tal (DFP), azt tapasztalták, hogy a DFP-kezelt enzim inaktiválódott. (A DFP veszélyes méreg, mert az ingerületátvitelben meghatározó szerepet játszó acetil-kolin észterázt is gátolja, mely enzim azt itt ismertetett mechanizmussal analóg módon működik.) Ez a totális **gátlás** arra utalt, hogy az enzimnek valamelyik, a katalízisben kulcsfontosságú csoportja módosult. A módosítás helyét peptidanalitikai módszerekkel határozták meg. Kiderült, hogy a kimotripszinben szelektíven csak a **Ser195 hidroxil**ja módosult (lásd **8.13. ábra**).



8.13. ábra: A diizopropil-fluoro-foszfát egyetlen konkrét szeril oldalláncot módosítva inaktiválja a kimotripszint

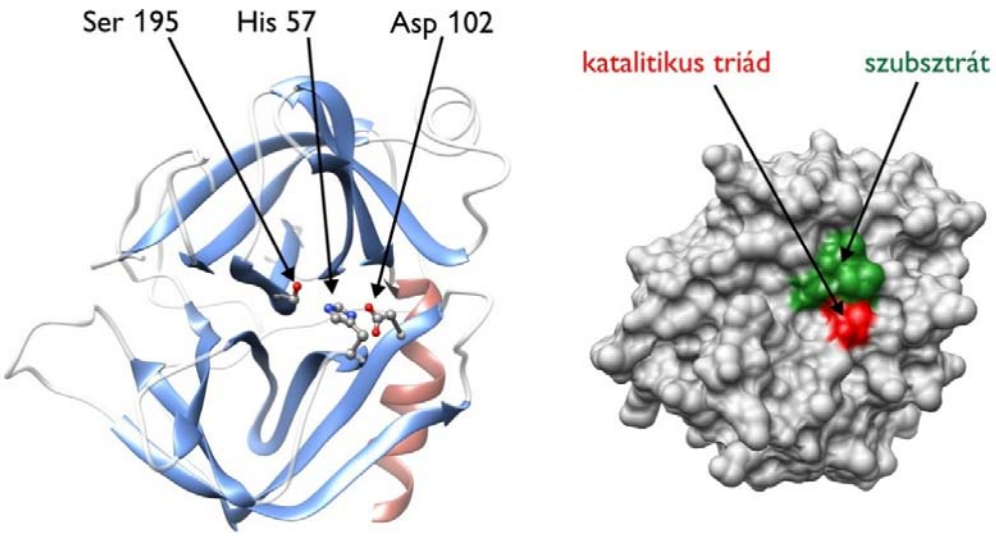
Ez a felismerés egyszerre két igen lényeges információt tárt fel. Az egyik az, hogy a Ser195 elengedhetetlen résztvevője a katalízisnek, hiszen módosítása tökéletesen inaktiválja az enzimet.

A másik, hogy a Ser195 valami miatt különlegesen reakcióképes, ugyanis maga a DFP nem különösebben reaktív, sem szabad szerin aminosavval, sem más, a fehérjében lévő egyéb szerin oldallánccal nem reagál. Ez egyértelműen arra utalt, hogy a Ser195 csoportot valami aktiválja.

A kimotripszin által katalizált **reakció sebességének pH-függése** arra utalt, hogy a katalitikus centrumban egy **hisztidin**nek is fontos **szerepe** van. Ezt a hisztidint később az enzim röntgendiffrakciós szerkezete igazolta, és azt is feltárta, hogy egy harmadik oldalláncnak, **egy aszpartát**nak is elengedhetetlen szerepe van (lásd **8.14. ábra**). A három oldallánc, a **Ser195, His57, Asp102** együttműködő egységére bevezették a **katalitikus triád** elnevezést.

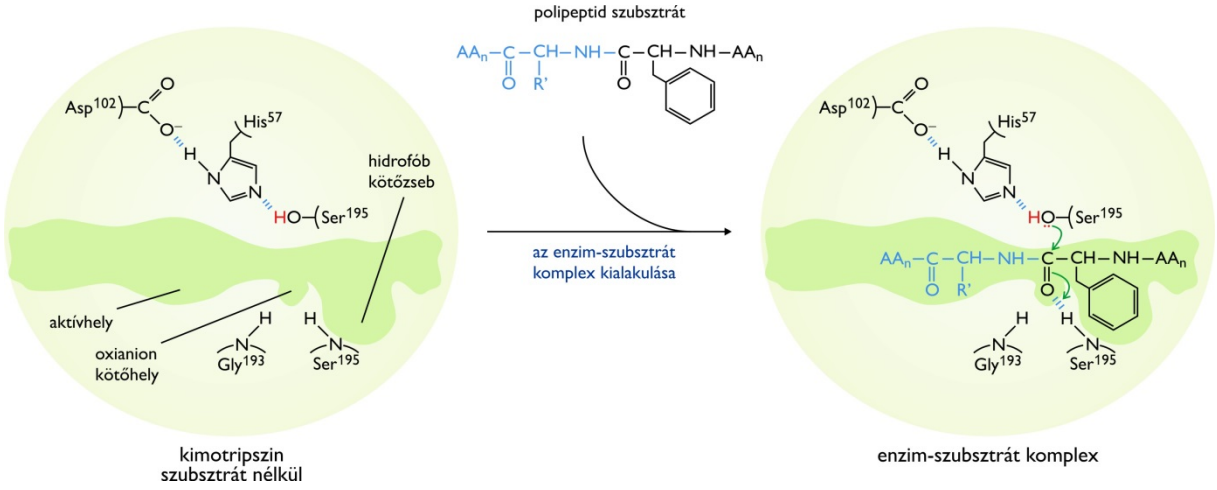
A reakció számos lépésből áll, de a teljes folyamat **két fő szakasz**ra bontható, a kovalens enzim-szubsztrát köztitermék kialakulásához vezető **acilezés** és az ennek elbomlását eredményező d**ezacilezés** fázisára. Az acilezés végére egy **átmeneti termék** és az enzim között a reaktív szerin oldalláncon keresztül kovalens kötéssel acilszerin alakul ki (**acilenzim**), ami a második szakaszban a dezacilezés során hidrolízissel bomlik. A katalízis során egy kedvezőtlenül magas energiájú, töltéssel rendelkező, **átmeneti állapot** is kialakul, **amit az enzim stabilizál** (lásd az enzimreakció termodinamikai leírását). A reakcióban sav-bázis reakciólépés is szerepel, így ez a folyamat az enzimekről mondott alapelvek számos elemét mutatja. A szerin-proteázok esetében az enzimen jól elkülöníthető a szubsztrát megkötéséért felelős szubsztrátkötő zseb, és a katalízis lezajlásának helyszíne, az aktív hely. A szubsztrátkötő apparátus pozícionálja a hasítandó kötést a katalitikus apparátushoz. A **kötési energia** az **aktiválási energia csökkentésére** fordítódik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.14. ábra: A kimotripszin térszerkezete, a katalitikus triád és a szubsztrátkötő hely bemutatása (PDB: 1GCT)

Nézzük meg részletesen, hogyan katalizálja a kimotripszin a peptidkötés hidrolízisét (lásd **8.15. ábra-8.22. ábra**).

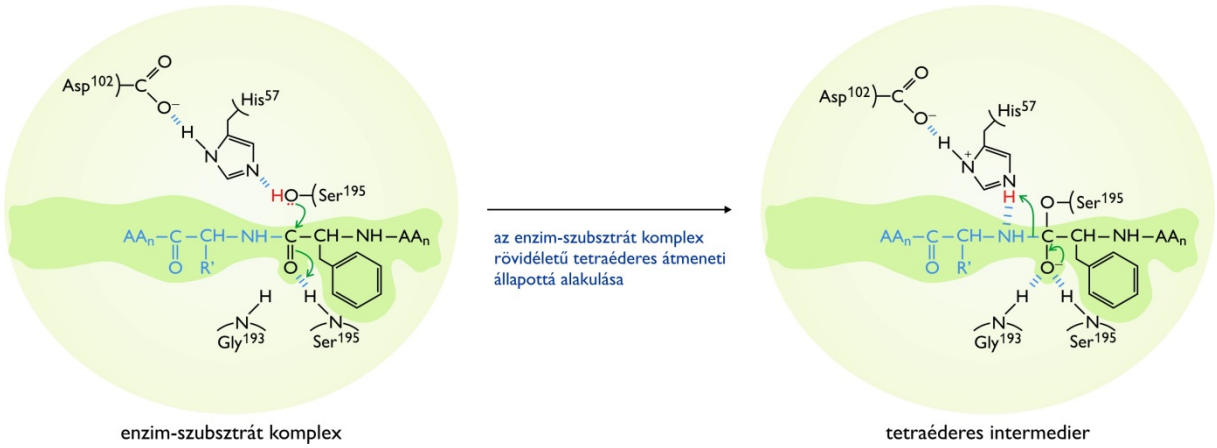


8.15. ábra: Szubsztrátkötés, a nem-kovalens Michaelis-komplex kialakulása

Első lépésként a **szubsztrátkötő zseb** megköti a szubsztrátot. A kimotripszinnek van egy nagyméretű apoláros zsebe, amely elsősorban **Trp, Tyr és Phe oldalláncok**at tud hatékonyan megkötni. A kötőzseb a hasítandó peptidkötést a katalitikus triádhoz képest **optimális helyzetb**e pozícionálja (lásd **8.15. ábra**). A kötőzsebbe került csoport karbonil szénatomja közel kerül a Ser195 hidroxil oxigénjéhez. Ezt a **nem-kovalens komplexet Michaelis-komplex**nek nevezik.

A második lépésben kialakul egy **tetraéderes átmeneti állapot** (lásd **8.16. ábra**). Az Asp102 és a His57 között hidrogénhíd van, ami növeli a His57 bázikusságát. A **His57 protont von el a Ser195 oldallánctól**. Mint látható, a reakciónak ez az eleme, egy **általános bázis katalízis**. Az így aktivált **Ser195 oldallánc támadja a szubsztrát karbonil szénatomját**. Az eredmény egy labilis, nagyenergiájú, negatív töltésű tetraéderes **átmeneti állapot**, amit az úgynevezett **oxianion kötőhely stabilizál két hidrogénhíd kötéssel**. Ezek a kötések egy-egy peptidkötés NH-csoporton keresztül alakulnak ki.

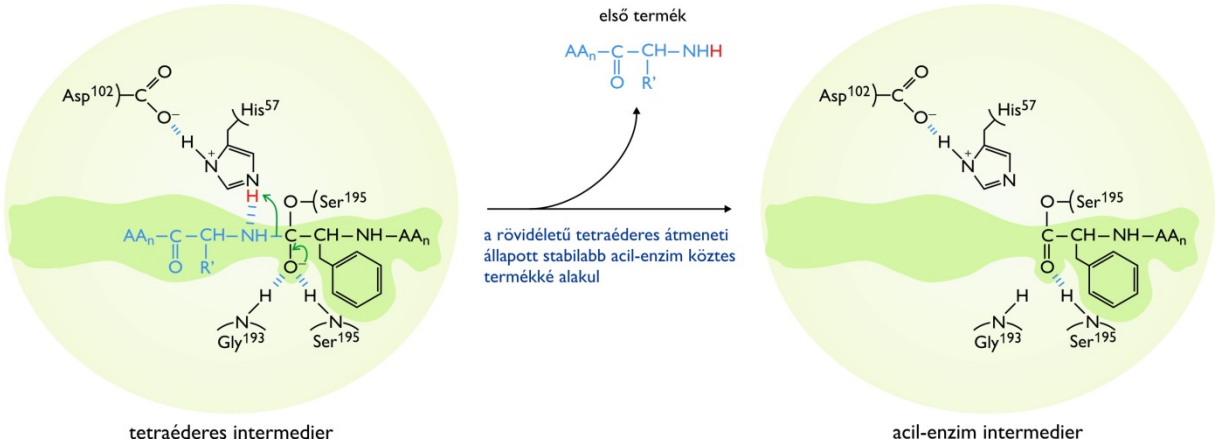
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.16. ábra: Az első tetraéderes átmeneti állapot kialakulása

A tetraéderes **átmeneti állapot** olyan rövidéletű, hogy **nem izolálható**, sőt, eddig detektálni sem sikerült. Létezését elméleti számítások támasztják alá, továbbá az, hogy az átmeneti állapotot imitáló szintetikus molekulák hatékonyan gátolják az enzimet. Szintén az átmeneti állapot létét támasztják alá a **katalitikus antitestek** (**abzimek**; az antitest, *antibody* és az enzim szóból). Ezeket átmeneti állapot analógok, mint antigének ellen termeltetik. Az abzimek a hozzáadott „normál” szubsztrátot enzimként átalakítják.

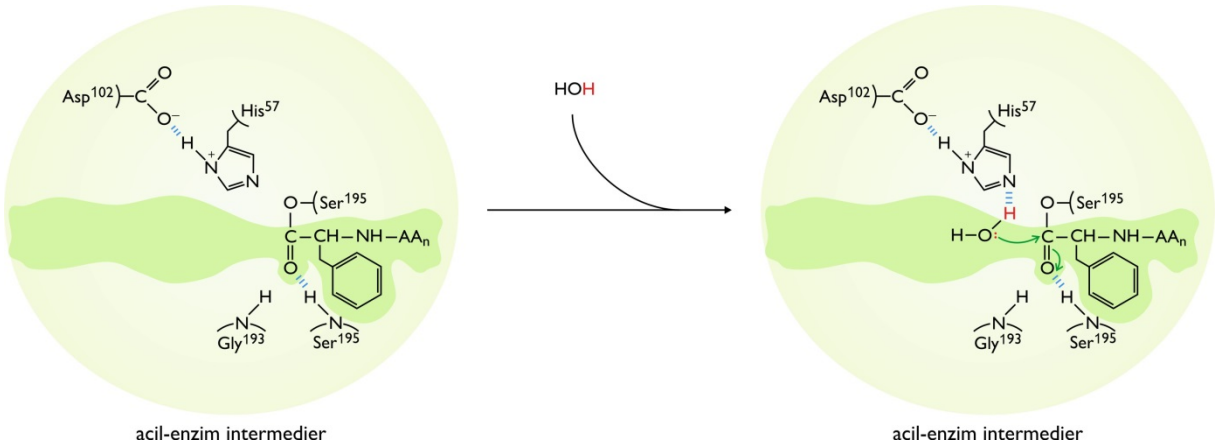
A His57 a Ser195-től felvett proton segítségével hidrogénhidat létesít a tetraéderes átmeneti állapot nitrogénjével. Ez a kötés elősegíti majd a peptidkötés hasadását a következő lépésben (lásd **8.17. ábra**).



8.17. ábra: Az acilenzim kialakulása, az első termék távozása

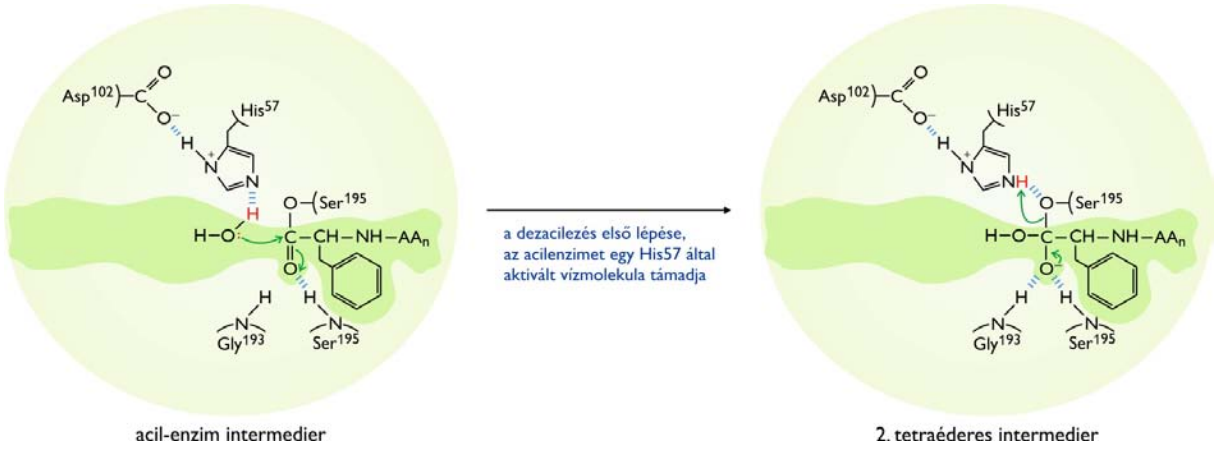
A harmadik lépésben a **His57 protonálja az első termék távozó csoportját**, ami egy **általános sav katalízis** lépés. Így kialakul az első termék távozó csoportja, vagyis az N-terminális aminocsoportja, és az **első termék**, vagyis **a polipeptid C-terminális felé eső része** távozik az enzimről. A polipeptid első, **aminoterminus felé eső része** azonban egy **észterkötésen keresztül kovalensen** kötve marad az enzimhez. Ezt intermediert **acilenzim**nek nevezzük. Az acilenzim a tetraéderes átmeneti állapottal ellentétben egy valódi **átmeneti termék**, ami speciális szubsztrátok esetén detektálható, sőt **izolálható is**. Ezzel az első szakasz, az acilezés szakasza lezárult.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.18. ábra: A vízmolekula aktiválása

A reakció negyedik lépésében megkezdődik a **dezacilezés** fázisa. A **His57** egy hidrogénhíd kölcsönhatáson keresztül **aktiválja a belépő vízmolekulát**, ami ezáltal **nukleofil támadás**t intéz **az acilenzim**, vagyis a szubsztrát és az enzim között kialakult labilis észterkötés **karbonil szénatomja ellen**. (lásd **8.18. ábra**).

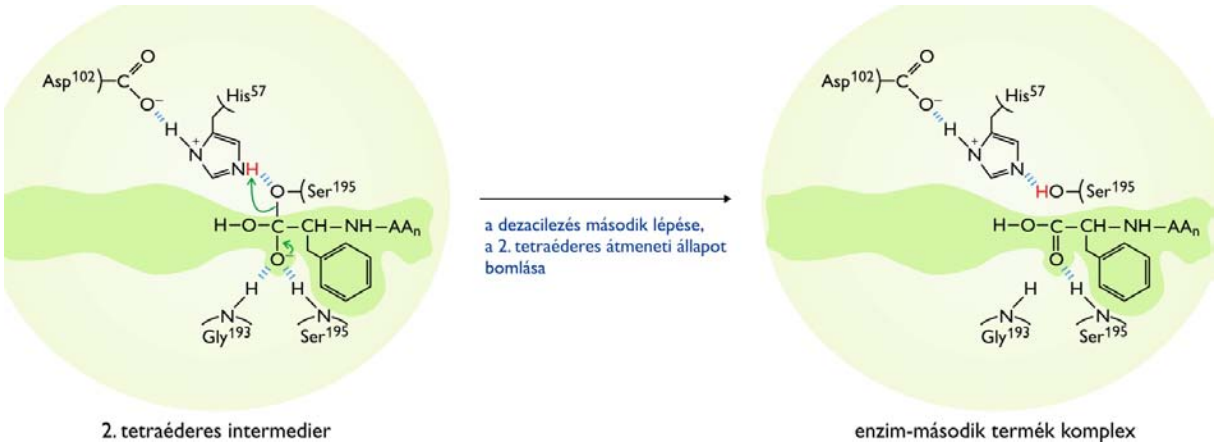


8.19. ábra: A második tetraéderes átmeneti állapot kialakulása

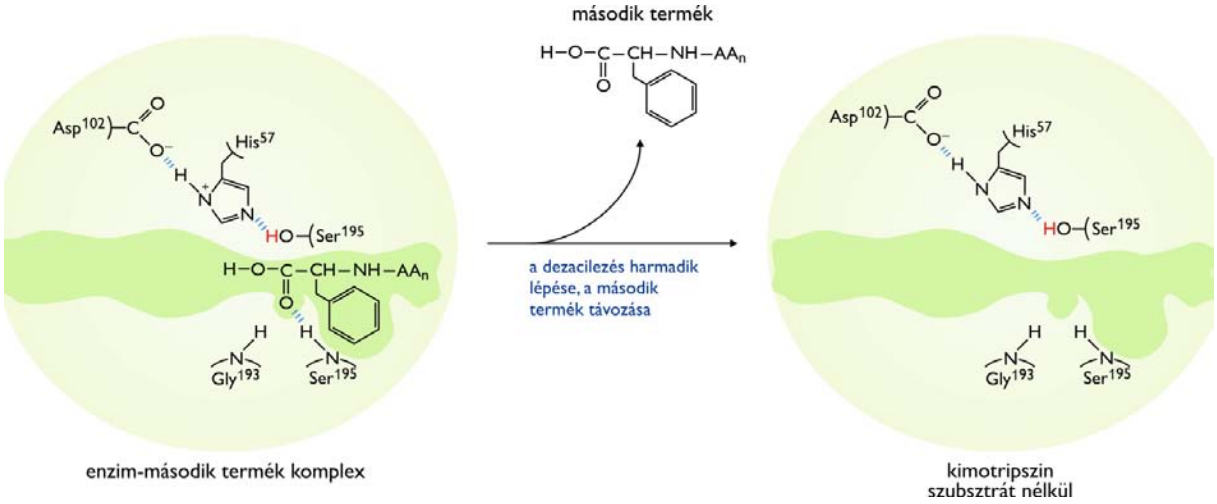
A reakció ötödik lépésében **újabb** rövidéletű, negatív töltésű **tetraéderes átmeneti állapot** alakul ki, amit újfent az oxianion kötőhely stabilizál (lásd **8.19. ábra**). A His57 a víztől átvett protonon keresztül (újabb általános bázis katalízis lépés) hidrogénhidat alakít ki a Ser195 oxigénjével, elősegítve a második termék kialakulását.

A reakció hatodik lépésében a His57 hidrogénhíd kölcsönhatásban szereplő **protonja átkerül a Ser195 oxigénjére**, és kialakul a második termék (lásd **8.20. ábra**). Az első termék az eredeti peptid második fele volt, és az annak megfelelő új N-terminális alakult ki az első termék távozása előtt. A **második termék az eredeti peptid első, N-terminális részé**nek felel meg, és távozása előtt ennek új C-terminálisa alakul ki.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.20. ábra: Az acilenzim elbomlása

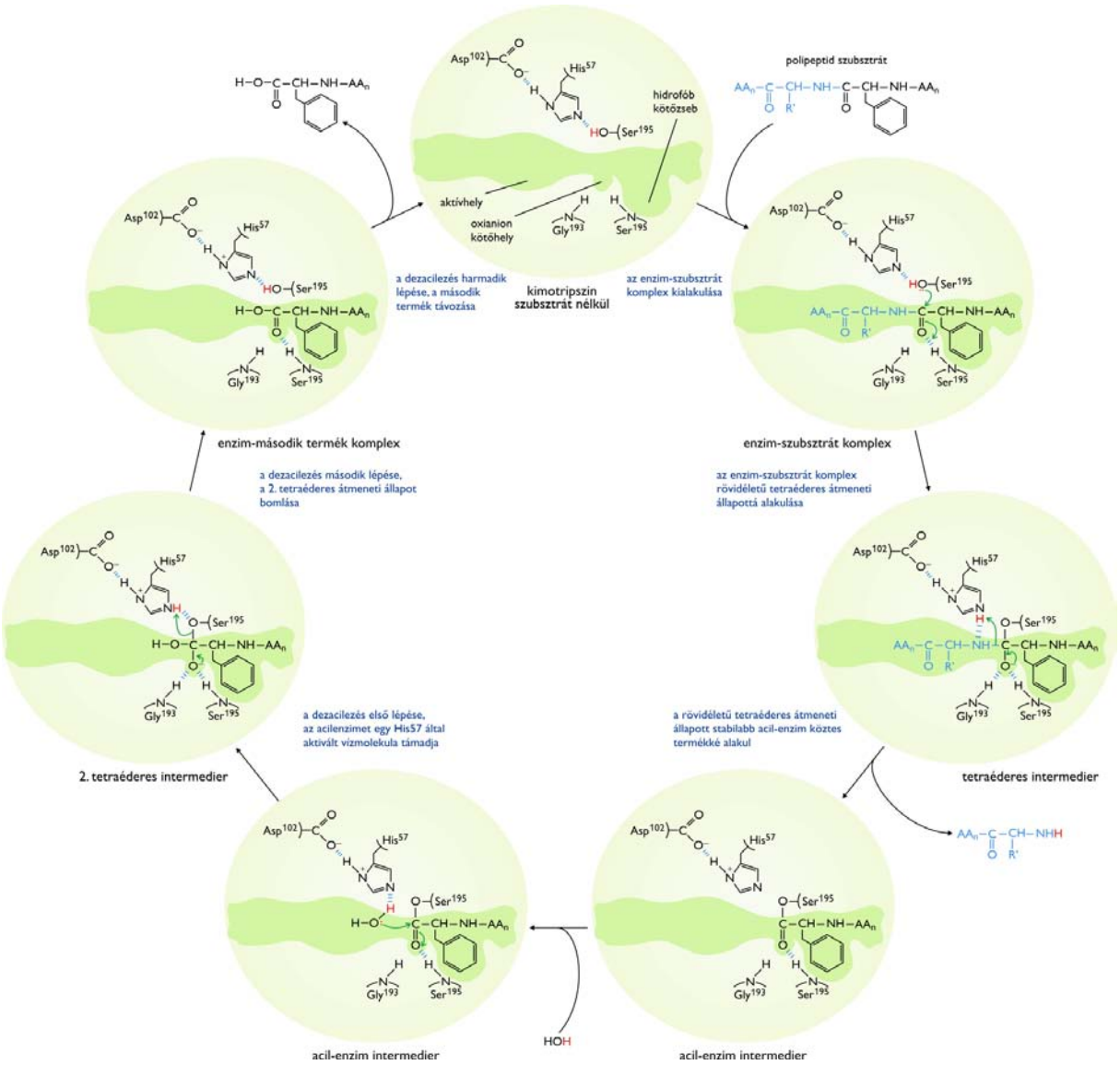


8.21. ábra: A második termék távozása

A reakció utolsó, hetedik lépésében **távozik a második termék**, és visszakapjuk az **enzim eredeti állapot**át (lásd **8.21. ábra**).

A reakciósor könnyebb áttekinthetősége érdekében a teljes ciklust egyetlen közös ábrában is bemutatjuk (lásd **8.22. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



8.22. ábra: A kimotripszin működési mechanizmusának összefoglaló ábrája

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

9. fejezet - Enzimkinetika

(szerző: Pál Gábor)

Az enzimreakciók termodinamikai értelmezésének és a háromféle katalízis mechanizmusának bemutatását követően áttérünk az **enzimkinetik**a alapvető összefüggéseinek leírására. Kifejezetten arra fókuszálunk, hogy miként lehet megmérni **a katalizált reakció sebesség**ét, milyen fő **kinetikai paraméterek** jellemzik az enzimatikus reakciót, mi jellemző a leghatékonyabb enzimekre, és milyen mechanizmusokkal lehet az enzimeket gátolni.

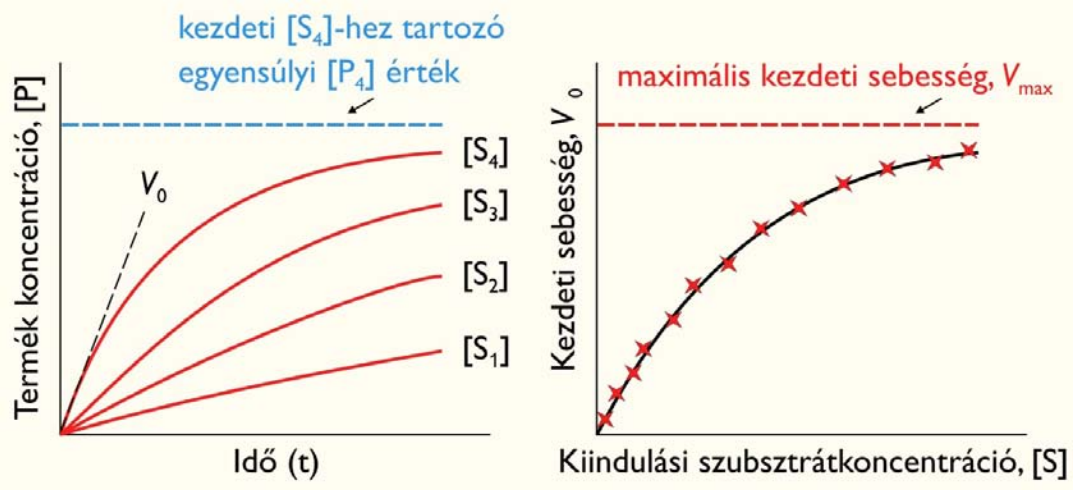
Mivel itt már kizárólag enzimkatalizált reakciókról lesz szó, a **kiindulási anyag**unkat **szubsztrát**nak nevezzük majd, és S jelöléssel hivatkozunk rá. A terméket továbbra is P betű jelzi.

A korábbi A + B → P sémával szemben a lehető legegyszerűbb, S → P esettel foglalkozunk.

Az enzimkinetika tudományág kialakulásának hajnalán az enzimek fizikai mibenlétéről, a sebességnövelés lehetséges mechanizmusairól még szinte semmit nem tudtak.

A legegyszerűbb elsőrendű kémiai reakciónál a fenti jelöléseket használva a nem katalizált S → P reakció sebessége $V = d[P]/dt = k[S]$. Más szóval a reakció sebessége egyenesen arányos S koncentrációjával. A sebesség így elvileg „végtelenségig" növelhető, annak csak S oldhatósága szabna gátat.

Amennyiben egy **enzim** katalizálja az átalakulást, a reakció nagyságrendekkel gyorsabban zajlik, ugyanakkor **jellegzetes**en eltérő az **[S]-V függvény**. Állandó [E] esetén kis [S] értékeknél az [S] növelésével a V reakciósebesség közel egyenes arányban, tehát lineárisan növekedik, de egyre nagyobb kiindulási [S] esetén a V egyre kevésbé növekedik, és egy maximális érték felé tart (lásd **9.1. ábra** jobb oldala). Ez az úgynevezett **telítési (**vagy **szubsztráttelítési) görbe**.



9.1. ábra: A termékkoncentráció–idő valamint a kezdeti sebesség-szubsztrátkoncentráció grafikonok

9.1. A Michaelis-Menten kinetika első modellje

Az első kinetikai modell, amely sikeresen magyarázta a fenti jelenséget, Leonor Michaelis és Maud Menten nevéhez fűződik, és azon a ma már triviálisnak tűnő feltételezésen alapult, hogy az enzim és a szubsztrát között fizikai kapcsolat jön létre, ami egy átmeneti **enzim-szubsztrát komplex**et eredményez. Ezt a sémát a **9.1. egyenlet** mutatja, ahol ES jelöli a ma már Michaelis nevével fémjelzett komplexet.

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\leftrightarrows}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

9.1. egyenlet

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A fenti, legegyszerűbb séma a következő feltételezéseken alapul. Az enzim és a szubsztrát között pillanatszerűen gyors reakcióban kialakul az ES komplex, ezért ennek a részreakciónak a sebességi állandóival a modell nem is foglalkozik. Ezek helyett csak az **egyensúlyi állandó**t (K_S) (nem-kovalens E-S kölcsönhatás esetén ez egy disszociációs állandó) definiálják a **9.2. egyenlet** szerint.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$$ **9.2. egyenlet**

A modell szerint az ES komplex termékké bomlásának üteme, a katalitikus sebességi állandó, amelynek jelölése k_{cat}, lényegesen alacsonyabb értékű, mint az egyensúlyi állandóban rejlő sebességi állandók. E szerint a modell szerint a termék irányú bomlás olyan alacsony ütemű, hogy (a mérés során) praktikusan nem befolyásolja az [E], [S] és [ES] egyensúlyi koncentrációkat.

Vezessük le, hogy a fenti reakció séma, és kiindulási feltételek esetén milyen függvény szerint függne a kezdeti sebesség a szubsztrát koncentrációjától.

A **9.1. egyenlet**ben szereplő sémából következik a reakciósebességnek a **9.3. egyenlet**e, amely egy elsőrendű kémiai reakciót tükröz, amelyben a termékkeletkezés sebessége kizárólag egyfajta anyagnak, az ES komplexnek a koncentrációjával arányos.

$$V_0 = k_{cat}[ES]$$ **9.3. egyenlet**

A séma nem számol azzal, hogy az enzimből és a termékből a fordított irányú reakcióból szintén ES jöhet létre, mivel a reakció legelejét vizsgáljuk, amikor még nem keletkezett termék. Ezért is fontos hangsúlyozni, hogy az így definiált sebesség **kezdeti**, nulla időpillanathoz tartozó **reakciósebesség** (ezért $\mathbf{V_0}$ a jelölése).

Ahhoz, hogy olyan egyenlethez jussunk, amely ES nem ismert koncentrációja helyett ismert enzim és szubsztrát-koncentrációkat tartalmaz, a **9.2. egyenlet**et felhasználva ki kell fejeznünk az ES koncentrációt a kísérletben beállított, tehát ismert koncentrációkkal.

Ehhez vegyük figyelembe, hogy a szabad enzimkoncentráció, a teljes enzimkoncentráció, és az ES komplexben lévő enzimkoncentráció között a **9.4. egyenlet**ben felírt, egyszerű összefüggés áll fenn:

$$[E] = [E]_T - [ES]$$ **9.4. egyenlet**

A 9.4 egyenletet a 9.2 egyenlettel kombinálva kapjuk a **9.5. egyenlet**et:

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E]_T[S] - [ES][S]}{[ES]}$$ **9.5. egyenlet**

Mindkét oldalt megszorozva az ES koncentrációval a **9.6. egyenlet**et kapjuk.

$$K_S[ES] = [E]_T[S] - [ES][S]$$ **9.6. egyenlet**

A **9.7. egyenlet**ben az ES tartalmú tagokat egymás mellé rendezzük,

$$K_S[ES] + [ES][S] = [E]_T[S]$$ **9.7. egyenlet**

majd a **9.8. egyenlet**ben kiemeljük az [ES]-t a szorzatok összeadásából:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$[ES](K_S + [S]) = [E]_T[S]$$ **9.8. egyenlet**

Végül mindkét oldalalt elosztjuk [ES] szorzójával, így a **9.9. egyenlet**hez jutunk:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_S + [S]}$$ **9.9. egyenlet**

Ezzel az ismeretlen ES koncentrációt az ismert teljes enzimkoncentráció, a szabad szubsztrát koncentráció, és az egyensúlyi állandó segítségével fejeztük ki.

Amennyiben olyan kiindulási körülményt teremtünk, amelyben a teljes szubsztrát koncentráció nagyságrendekkel meghaladja a teljes enzimkoncentrációt, úgy az a szubsztrát mennyiség, amely ES komplexbe kerül, elhanyagolható lesz az összes szubsztrát mennyiségéhez képest. (Ez a kísérletek során rendszerint könnyen biztosítható, de érdemes megjegyezni, hogy az élőlényekben zajló valós folyamatokban az esetek jó részében nem teljesül). Emiatt a szabad szubsztrát koncentráció (a reakció elején) praktikusan megegyezik majd a teljes szubsztrát koncentrációval, tehát mind az $[E_T]$, mind az [S] kísérletesen meghatározott, ismert értékű adat.

A következő lépésben a 9.3 egyenlet alapján mindkét oldalt megszorozzuk a k_{cat} sebességi állandóval, ami a kezdeti sebességet fogja megadni a **9.10. egyenlet** szerint.

$$V_0 = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat}[E]_T[S]}{K_S + [S]}$$ **9.10. egyenlet**

Vegyük észre, hogy az elérhető legmagasabb, tehát maximális sebességi értéket, amelynek jelölése $\mathbf{V_{max}}$, akkor kapjuk, ha **az összes enzim ES komplexben van**. Ebben az esetben a szubsztrát telíti az oldatban jelenlévő enzim molekulákat. Ekkor tehát [ES] = $[E_T]$. A 9.10. egyenlet jobboldalán a számlálóban szereplő $\mathbf{k_{cat}\ E_T}$ **szorzat tehát nem más, mint maga a** $\mathbf{V_{max}}$. Ennek figyelembevételével kapjuk a **9.11. egyenlet**et, ami a legegyszerűbb, eddig tárgyalt enzimkinetikai modell végső egyenlete:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]}$$ **9.11. egyenlet**

Ez az **egyenlet egy derékszögű hiperbola függvény**, amelynek általános felírása: $Y=P_1X/(P_2+X)$, ahol X a független változó, jelen esetben a szubsztrát koncentráció, Y a függő változó, jelen esetben a kezdeti sebesség, a P_1 és P_2 pedig a függvény paraméterei, jelen esetben a két állandó, a V_{max} és a K_S.

Vegyük észre, hogy ez az egyenlet kiváló összhangban van a már említett, a **9.3. ábrán** is bemutatott tapasztalati [S]-V_0 összefüggéssel az alábbiak szerint. Amikor $[S] \ll K_S$, akkor [S] a nevezőben elhanyagolható, és a **9.12. egyenlet**hez jutunk:

$$V_0 = \frac{V_{max}}{K_S}[S]$$ **9.12. egyenlet**

A **9.12. egyenlet**ben a szubsztrát koncentráció szorzója két állandó hányadosa, amely hányados maga is állandó. A K_s értékéhez képest elhanyagolhatóan alacsony szubsztrát koncentráció tartományban tehát a kezdeti sebesség

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

– a tapasztalattal egyezően –, lineáris függvénye a szubsztrát koncentrációnak, tehát ez egy (szubsztrátra nézve) **elsőrendű reakció egyenlete**.

Amikor [S]>>K_S, akkor a 9.11. egyenletben éppenséggel a K_S lesz elhanyagolható az [S] értékéhez képest a nevezőben. Az elhanyagolást elvégezve a **9.13. egyenlet**hez jutunk:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S]} = V_{max}$$ **9.13. egyenlet**

Amikor tehát a szubsztrát koncentrációja nagymértékben meghaladja a K_S értékét, a szubsztrát telíti az enzimet, minden enzim ES komplexbe kerül, a kezdeti sebesség eléri a maximálisan elérhető értéket, további szubsztrát koncentráció növelésével a sebesség már nem növelhető. Ebben a szubsztrát koncentráció tartományban a kezdeti sebesség tehát már gyakorlatilag nem függ a szubsztrát koncentrációjától, a reakció a szubsztrátra nézve nulladrendű. A **9.3. ábrán**szereplő grafikont emiatt szokás telítési görbének, vagy **szubsztráttelítési görbé**nek nevezni.

Amikor a szubsztrát koncentrációja éppen megegyezik a K_S számértékével, akkor a reakció kezdeti sebessége éppen a V_{max} érték fele. Az itt levezetett **9.11. egyenlet** tehát leíró értelemben jól használható. Ugyanakkor mégis alapvető problémákat vet fel. Minél hatékonyabb egy enzim, annál inkább tarthatatlan az a kiindulási feltételezés, hogy az enzimkatalízis során a nagysebességgel zajló szubsztrát fogyás ne mozdítaná be az enzim, a szubsztrát és az ES komplex között – az eredeti feltételezés szerint pillanatszerűen gyorsan - kialakuló egyensúlyt. A fenti leírás tehát éppen a **leghatékonyabb enzimek jellemzésére nem alkalmas.**

A másik probléma az, hogy a fenti modell ellentmondásban van a termodinamikai bevezetőben leírtakkal is. A K_S egy disszociációs állandó, ami mint ilyen, kötéserősség, más szóval affinitás jellemzésére is alkalmas. A K_S ebben a modellben megadja, hogy az enzim mennyire stabil kölcsönhatást létesít a szubsztráttal, milyen „erősen” köti azt. A modell szerint minél alacsonyabb a K_S, annál hatékonyabb az enzim, hiszen annál alacsonyabb szubsztrát koncentráción éri el a reakció sebessége V_{max} értékének a felét. Csakhogy a valóságban minél stabilabb kölcsönhatást létesít az enzim a szubsztráttal, annál lassabbnak kell lennie a reakciónak, hiszen az enzim éppenséggel stabilizálná a szubsztrátot. Az **enzimnek** természetesen meg kell kötnie a szubsztrátot, de igazán hatékonyan a rendkívül instabil **átmeneti állapottal kell** kölcsönhatást létesítenie, azt kell **stabilizálnia** (lásd **8. fejezet**).

9.2. A Michaelis-Menten kinetika továbbfejlesztett modellje

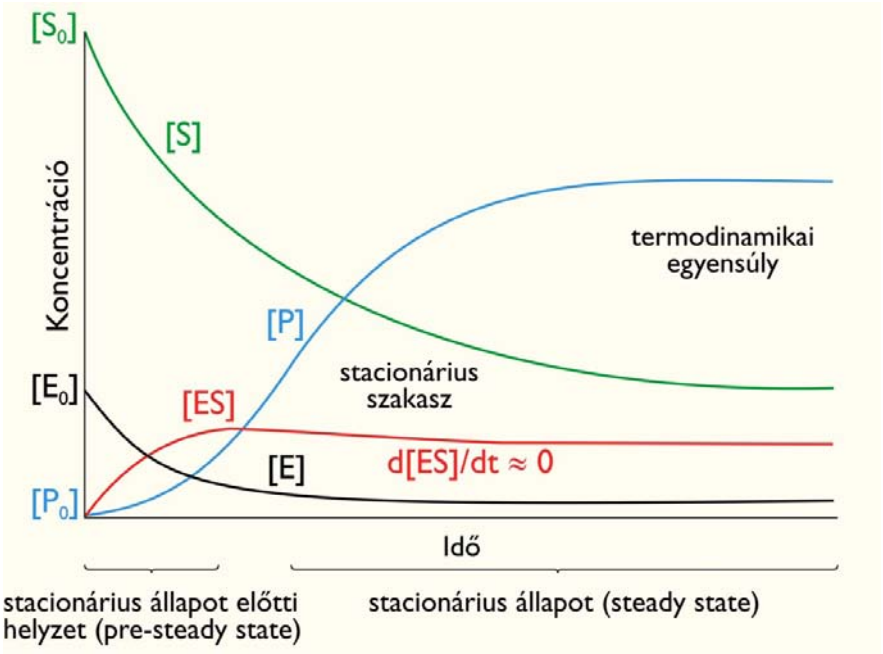
A fent említett ellentmondások miatt az enzimkinetikai modellt tovább kellett fejleszteni az alábbiak szerint.

A **továbbfejlesztett séma** már számol az enzim és a szubsztrát ES komplexhez vezető reakciójának sebességi állandójával (jelölése k_1), valamint az ES komplex enzimre és szubsztrátra történő visszaalakulásának sebességi állandójával (jelölése k_{-1}). A sémát a **9.14. egyenlet** mutatja.

$$E + S \underset{k_1}{\overset{k_{-1}}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$ **9.14. egyenlet**

A modell szerint az enzim és a szubsztrát oldatának összekeverésekor nem egy **dinamikus egyensúly**, hanem egy **stacionárius állapot** (angolul ***steady-state***) áll be szinte pillanatszerű gyorsasággal. A stacionárius állapotban a körülményektől függően akár hosszú ideig **állandó** lehet az **ES komplex koncentráció**ja. (Pontosabban megfogalmazva az ES koncentrációja a pillanatszerű emelkedés után folyamatosan csökken, de ez a csökkenés jóval kisebb ütemű, mint a szubsztrát fogyásának vagy a termék keletkezésének az üteme, és a modellben elhanyagolható.) Ehhez az kell, hogy az ES komplex kialakulásának k_1 sebességi állandóval jellemzett üteme éppen megegyezzen az ES komplex elbomlásának ütemével. Ezt a **9.2. ábra** szemlélteti.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



9.2. ábra: A stacionárius modell: az ES komplex azonos ütemben keletkezik és fogy, koncentrációja állandó

A reakciót szubsztrát hozzáadásával indítjuk. (Az ábra arányai csalnak, hogy egyetlen oldalon be lehessen mutatni a lényeget. A stacionárius szakasz valójában már néhány ezredmásodperc alatt kialakul, és akár percekig is fennmaradhat. A valóságban az [S] sokkal magasabbról indul, hiszen **[S] >> [E]**.)

A bomlás egyrészt végbemehet a termék kialakulásának irányában k_2 sebességi állandóval, illetve ezzel ellentétes irányban, szabad enzimet és szubsztrátot eredményezve k_{-1} sebességi állandóval. A stacionárius állapot kialakulását a **9.2. ábra** illusztrálja, annak fent körülírt feltételét pedig a **9.15. egyenlet** írja le.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \qquad \textbf{9.15. egyenlet}$$

Ezt a feltételezést elsőként G.E. Briggs és James B.S. Haldane javasolta, ennek ellenére az alábbiakban kifejtett, **továbbfejlesztett modellt is Michaelis-Menten kinetikának**, és az abból fakadó **egyenletet Michaelis-Menten egyenletnek hívjuk**. Az egyenletben $k_1[E][S]$ sebességgel keletkezik az ES komplex, amely visszafelé $k_{-1}[ES]$ sebességgel, termék irányban pedig $k_2[ES]$ sebességgel bomlik. A keletkezés és a kétirányú elbomlás eredő sebessége, vagyis **az ES komplex koncentrációjának változása nulla**.

A következőkben a 9.15. egyenletet rendezzük át több lépésben úgy, hogy ismét a mérhető, illetve kísérletesen megszabott [E] és [S] koncentrációk szerepeljenek a végső egyenletben. Ez a továbbfejlesztett modell is alapfeltételként szabja meg, hogy a szubsztrát koncentrációja nagyságrendekkel haladja meg az enzimkoncentrációt. A termékkeletkezés üteme itt is egyszerűen megadható a **9.16. egyenlet** szerint, amely analóg az első modell 9.3. egyenletével.

$$V_0 = k_2[ES] \qquad \textbf{9.16. egyenlet}$$

A korábbi modellben k_{cat} néven jelzett sebességi állandó helyett a továbbfejlesztett sémából származó k_2 megnevezést alkalmazzuk.

A 9.15. egyenletet átrendezve kapjuk a **9.17. egyenlet**et.

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \qquad \textbf{9.17. egyenlet}$$

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A korábban már látott módon, a szabad enzim koncentrációját a teljes enzimkoncentráció és az ES koncentráció különbségeként fejezzük ki a **9.18. egyenlet** szerint.

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$ **9.18. egyenlet**

Az egyenletben egyszerű algebrai átalakítással felbontjuk a zárójeles tagot, így a **9.19. egyenlet**et kapjuk.

$$k_1[E]_T[S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$ **9.19. egyenlet**

Ezután az [ES] tagot tartalmazó részeket azonos oldalra rendezve adódik a **9.20. egyenlet.**

$$k_1[E]_T[S] = (k_{-1} + k_2)[ES] + k_1[ES][S]$$ **9.20. egyenlet**

Ebből az egyenletből kiemeljük az [ES] szorzót, így a **9.21. egyenlet**hez jutunk.

$$k_1[E]_T[S] = (k_{-1} + k_2 + k_1[S])[ES]$$ **9.21. egyenlet**

A **9.22. egyenlet**ben az [ES] tagot baloldalra rendezzük.

$$[ES] = \frac{k_1[E]_T[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}$$ **9.22. egyenlet**

A jobb oldalon a számlálót és a nevezőt is elosztjuk a k_1 sebességi állandóval, ami a **9.23. egyenlet**hez vezet.

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$ **9.23. egyenlet**

A nevezőben megjelenő törtre a **9.24. egyenlet**ben definícióként bevezetjük **a Michaelis-állandó (Michaelis-konstans)** elnevezést, amelynek rövidítése $\mathbf{K_M}$.

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \equiv K_M$$ **9.24. egyenlet**

Mint látható a K_M azt mutatja meg, hogy milyen arányban van az ES komplex kétirányú elbomlásának és egyirányú keletkezésének az üteme. Más szóval azt jelzi, hogy mennyire bomlékony az ES komplex. A **9.1. táblázat** néhány enzim-szubsztrát pár jellemző K_M értékét foglalja össze.

9.1. táblázat: Néhány enzim Michaelis-konstans értéke

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Enzim	Szubsztrát	K_M (mM)
kataláz	H_2O_2	1100
β-galaktozidáz	D-laktóz	4
szénsavanhidráz	CO_2	26
kimotripszin	N-benzoil-tirozin-amid	2,5

A 9.24. egyenletet a 9.23. egyenletbe építve a **9.25. egyenlet**et kapjuk.

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$ **9.25. egyenlet**

A 9.16. egyenlet és a 9.25. egyenlet kombinálása a **9.26. egyenlet**hez vezet.

$$V_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$ **9.26. egyenlet**

Ahogy az egyszerűbb modell 9.10. egyenlete nyomán már jeleztük, az elérhető legmagasabb, $\mathbf{V_{max}}$ sebességi értéket akkor kapjuk, ha az összes enzim ES komplexben van, vagyis $\mathbf{[ES] = [E]_T}$. A 9.26. egyenletben szereplő k_2E_T szorzat tehát nem más, mint a V_{max}. Ennek figyelembevételével kapjuk a **9.27. egyenlet** a kiemelten fontos **Michaelis-Menten egyenletet**, ami a továbbfejlesztett enzimkinetikai modell végső egyenlete:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$ **9.27. egyenlet**

Vegyük észre, hogy ez az egyenlet formailag megegyezik a korábbi modell 9.11. egyenletével, ezért a 9.12. és 9.14. egyenletben ismertetettek szerint ez az egyenlet is összhangban van a tapasztalattal. Abban a szubsztrát koncentráció tartományban, ahol $[S] \ll K_M$, a V_0 lineárisan függ [S] értékétől, míg abban a tartományban, ahol $[S] \gg K_M$, a reakció már nem függ az [S] értékétől, és a maximális, V_{max} sebességgel zajlik.

Amennyiben az [S] értéke éppen megegyezik a K_M számértékével, akkor a reakció a V_{max} felének megfelelő sebességgel zajlik.

Formailag tehát sok a hasonlóság, de az értelmezésben lényegi különbségek vannak. Vegyük észre, hogy az egyszerű modell K_S állandója, és a továbbfejlesztett modell K_M állandója nem ugyanazt fejezik ki. A **9.28. egyenlet** mutatja, hogy a disszociációs állandó jellegű K_S egyensúlyi állandó hogyan származtatható a k_1 és k_{-1} sebességi állandókból.

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$$ **9.28. egyenlet**

Mint azt már írtuk, a K_S egyfajta affinitási jellemző, amely jelzi, hogy az enzim milyen erősen köti a szubsztrátot. A 9.28. és a 9.24. egyenlet összehasonlításából látható, hogy a **K_M csak akkor lenne egyenértékű a K_S állandóval, ha igaz lenne, hogy $k_2 \ll k_{-1}$,** azaz ha az ES komplex termék irányú átalakulásának az üteme sokkal alacsonyabb

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

lenne, mint a szubsztrát irányú visszabomlásának az üteme. Márpedig minél hatékonyabb egy enzim, annál inkább fordított a helyzet, annál inkább igaz, hogy $k_2 >> k_{-1}$.

Tehát minél hatékonyabb az enzim, annál kevésbé tekinthető a K_M egyfajta enzim-szubsztrát affinitási jellemzőnek. Ez a fajta értelmezés, mint már említettük, amúgy is ellentmondana az enzimkatalízis termodinamikai leírásának.

Míg a K_M és a K_S nem feleltethető meg egymásnak, a továbbfejlesztett modellben szereplő $\mathbf{k_2}$ sebességi állandó, amennyiben az ES komplex valóban egyetlen lépésben bomlik enzimre és termékre, **megfelel** az egyszerűbb modellben bevezetett $\mathbf{k_{cat}}$ **sebességi állandónak**. (Több átmeneti állapoton keresztül zajló, összetettebb katalízis mechanizmus esetén a k_{cat} sebességi állandót olyan egyenlet adja meg, amelyben minden egyes lépés sebességi állandója szerepel). A $\mathbf{k_{cat}}$ tulajdonképpen **az enzim**nek, mint kémiai katalizátornak a **hatékonyságát jellemzi** attól az állapottól kezdve, amikor az ES komplex már kialakult.

Vizsgáljuk meg, hogy a **9.29. egyenlet** és **9.30. egyenlet**ek szerint mi a k_{cat} sebességi állandó fizikai jelentése.

$$V_{\max} = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{\max} = k_{cat}[E]_T \qquad \textbf{9.29. egyenlet}$$

$$k_{cat} = \frac{\left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{\max}}{[E]_T} \qquad \textbf{9.30. egyenlet}$$

Mint láttuk, **a maximális sebesség a $\mathbf{k_{cat}}$ és a teljes enzimkoncentráció szorzata**. A 9.30. egyenlethez úgy jutunk, hogy elosztjuk a termék koncentrációváltozásának 9.29. egyenletben kifejtett sebességét a teljes enzim koncentrációval. Mivel a termék és az enzim azonos oldattérfogatban vannak, az arány mennyiségek hányadosa lesz. Azt adja meg, hogy egyetlen enzimmolekula időegységenként hány termék molekula keletkezését katalizálja. A $\mathbf{k_{cat}}$ sebességi állandót emiatt **átviteli szám**nak is nevezik, **dimenziója 1/t**, ahol t az időt jelöli. A **9.2. táblázat** néhány reprezentatív enzim-szubsztrát párra vonatkozó k_{cat} értéket mutat be.

9.2. táblázat: Néhány enzim átviteli száma

Enzim	k_{cat} (s^{-1})
szénsavanhidráz	600.000
tejsav-dehidrogenáz	1.000
kimotripszin	100
DNS-polimeráz I	15
lizozim	0,5

Természetesen minél magasabb a k_{cat} értéke, annál hatékonyabb az enzimreakció. Vegyük észre, hogy a továbbfejlesztett modellben, amennyiben a $k_{cat} = k_2$, ez a sebességi állandó a K_M állandót definiáló törtben is szerepel, mégpedig a számlálóban. A magas k_{cat} érték tehát növeli a K_M állandót. Ugyanakkor az is belátható, hogy minél alacsonyabb a K_M értéke, annál hatékonyabb az enzim, annál alacsonyabb szubsztrát koncentráción éri el a fél-maximális sebességet a reakció. Mindezek alapján kérdés, hogyan jellemezhető legjobban az enzim hatékonysága?

A leghatékonyabb enzimtől azt várjuk, hogy már nagyon alacsony szubsztrát koncentráción is magas sebességgel dolgozik, és magas az átviteli száma is. Mint már kifejtettük, olyan alacsony szubsztrát koncentráció tartományban, **ahol $[S] << K_M$, a reakciósebesség lineárisan függ a szubsztrát koncentrációjától**. Ezt mutatja a **9.31. egyenlet.**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$V_0 \cong \frac{k_{cat}}{K_M}[E][S] \qquad \textbf{9.31. egyenlet}$$

Az egyenletben szereplő $\mathbf{k_{cat}/K_M}$ hányados egy **másodrendű reakció sebességi állandó**ja. Ez a hányados mutatja meg, hogy a „legnehezebb" szituációban, amikor a szubsztrát koncentrációja nagyon alacsony, mennyire hatékony az enzim. A $\mathbf{k_{cat}/K_M}$ hányadost emiatt „**katalitikus hatékonyság**nak" is szokták nevezni. Ugyanez a hányados **azt is megmutatja, hogy az enzim milyen mértékben szelektív egy szubsztráton.** Egy olyan oldatban, ahol azonos, alacsony koncentrációban többféle szubsztrát is jelen van, az enzim ezeket a rájuk vonatkozó k_{cat}/K_M értékek arányában fogja átalakítani. A $\mathbf{k_{cat}/K_M}$ hányadost ezért „**specifitási állandó**nak" is szokták nevezni.

Nézzük meg, hogy a modellünk szerint mi szab határt a katalitikus hatékonyságnak, mi jellemző a lehető leghatékonyabb enzimekre. A **9.32. egyenlet**sorban 9.31. egyenletben szereplő k_{cat} illetve K_M állandókba helyettesítsük be a modellből, illetve a definícióból adódó sebességi állandókat.

$$V_0 = \frac{k_2}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}}[E][S] = \frac{k_2 k_1}{k_{-1}+k_2}[E][S] \approx k_1[E][S] \qquad \textbf{9.32. egyenlet}$$

Az egyenletrendszer jobboldali része szerint akkor, és csak akkor, ha a $k_2 >> k_{-1}$, a nevezőben a k_{-1} tag elhanyagolható lesz, és a k_2 taggal egyszerűsíteni lehet. A $\mathbf{k_2 >> k_{-1}}$körülmény azt jelenti, hogy az ES komplex szinte kizárólag termék irányba bomlik, a fordított irányban nem. A reakció $\mathbf{k_{cat}/K_M}$ értéke ekkor jó közelítéssel **megegyezik $\mathbf{k_1}$ értékével**. Ez tehát azt jelenti, hogy ekkor kizárólag az enzim és szubsztrát ES komplexhez vezető találkozásának üteme szabja meg a reakció sebességét. Magától értetődő, hogy ennél gyorsabb a reakció nem is lehet, hiszen nem keletkezhet nagyobb ütemben termék, mint amilyen ütemben ES komplex keletkezik az enzimből és a szubsztrátból.

Első megközelítésben **a leghatékonyabb enzimek működésének** tehát **a diffúzió szab határt**, amely megszabja, hogy milyen gyakran találkozhat az enzim és a szubsztrát. A diffúzió sebessége jól számolható a diffundáló molekulák méretének és az oldat viszkozitásának ismeretében. A **9.3. táblázat** néhány „**tökéletes enzim**" természetes szubsztrátokon meghatározott k_{cat}/K_M értékét foglalja össze. A táblázat adatai arra utalnak, hogy az adott enzimatikus reakciók sebességét a diffúzió határozza meg.

9.3. táblázat: Néhány enzim katalitikus hatékonysága

Enzim	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
szénsavanhidráz	$8{,}3 \times 10^7$
acetilkolin-észteráz	$1{,}6 \times 10^8$
triózfoszfát-izomeráz	$2{,}4 \times 10^8$
kataláz	$4{,}0 \times 10^7$

Egyes enzimreakciók esetében azonban kiderült, hogy azok **nagyobb sebesség**gel zajlanak**, mint a** számolt **diffúzió** sebessége. Legalább két olyan körülmény ismert, amely ilyen jelenséget eredményezhet. Egyes szubsztrátok jelentős töltéssel bírnak. Amennyiben az enzim szubsztrátkötő felszíne szintén jelentős, a szubsztrátéval ellentétes töltéssel bír, úgy a viszonylag távolra ható **elektrosztatikus kölcsönhatás**, és annak **orientáló jellege** miatt az enzim szubsztrátkötő helye és a szubsztrát hatékonyabban talál egymásra, mint azt az egyszerű diffúzió lehetővé tenné.

A másik lehetőséget arra, hogy a szubsztrát ne egyszerű diffúzióval találkozzon az enzimmel, a **multienzim komplexek** szolgáltatják. Az anyagcsere folyamatok során rendszerint számos köztes terméken keresztül alakul át egy-egy kiindulási anyag végső termékké. Az egyik lépést katalizáló enzim terméke ilyenkor a soron következő

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

lépést katalizáló enzim szubsztrátja. Amennyiben ezek az enzimek egy nagyobb multi-enzim komplex alegységei, úgy a keletkező köztes termékek enzimről enzimre „adogatódhatnak” anélkül, hogy az oldatba kerülve diffúzióval jutnának a soron következő enzimhez.

9.3. A kezdeti sebesség értékek és a fő kinetikai paraméterek meghatározása.

A kinetikai mérések során rendkívül fontos, hogy a **hőmérsékletet állandó értéken** tartsuk, és ez az érték lehetőleg legyen közel a vizsgált enzim hőmérséklet optimumához. A reakció során a pH értékét is állandóan kell tartani megfelelő pufferek alkalmazásával. Minden enzimreakcióhoz tartozik egy **optimális pH érték**, érdemes az ennek megfelelő pH értéket beállítani. Olyan puffert kell választani, amely önmagában nem befolyásolja a vizsgált kémiai reakciót, illetve a detektálást. Az ATP-ázok aktivitását például gyakran a keletkező foszfát mérésén keresztül vizsgálják. Ilyen esetben természetesen nem lehet foszfát puffert alkalmazni (a biológiai pufferekről lásd **2.5.7. fejezet**).

Amint az a fejezetben már többször említésre került, egy általánosan „P”-vel jelzett terméket eredményező (enzimkatalizált) kémiai reakció sebessége (V_0) definíció szerint nem más, mint a P anyag koncentrációjának időbeni változása: $V_0 = d[P]/dt$. Egy általánosan felírt S → P reakció esetén az előzővel egyenértékű sebesség definíció az, amely a szubsztrát koncentráció ([S]) csökkenését veszi figyelembe: $V_0 = -d[S]/dt$. A **V_0 méréséhez tehát vagy a termék, vagy a szubsztrát koncentrációját kell mérnünk**.

A kémiai átalakulás minden esetben elektronszerkezet-változással jár. A megváltozott elektronszerkezet megváltozott fény általi gerjeszthetőséget is jelent, ami az esetek egy részében **spektroszkópiai módszerekkel** jól mérhető. Legegyszerűbb esetben a termék optikai tulajdonságai, fényelnyelési, esetleg fluoreszcencia spektruma mérhetően eltérnek a szubsztrát (és minden más oldatkomponens) említett paramétereitől. Ilyen esetben a termék keletkezése, illetve a szubsztrát fogyása folyamatában követhető. Megfelelő koncentrációtartományban a fényelnyelés (abszorbancia) mértéke, fluoreszcencia esetén pedig a kibocsájtott fény intenzitása egyenesen arányos annak a molekulának a koncentrációjával, amely a fényt elnyeli, illetve kibocsájtja. Ennek alapján a spektroszkópiai méréssel a termék (vagy a szubsztrát) koncentrációjának időbeli változása pontosan mérhető.

Amennyiben sem a termék, sem a szubsztrát nem rendelkezik jól mérhető optikai tulajdonságokkal, akkor is lehetőség nyílhat spektroszkópiai mérésre, amennyiben a keletkezett terméket egy specifikus, pillanatszerűen lejátszódó kémiai reakcióba lehet vinni (**kapcsolt reakció**), amelynek eredményeként optikailag aktív (fényelnyelő, illetve fluoreszkáló) molekula keletkezik. Ha ez a második reakció olyan körülmények között zajlik, amely összeegyeztethető az enzimatikus reakció során alkalmazandó oldatkörülményekkel (pH, hőmérséklet) akkor az ilyen típusú mérés is lehet folyamatos.

Ha azonban ez a második reakció csak az enzimreakcióval össze nem egyeztethető körülmények között megy végbe (például extrém pH értéken, vagy magas hőmérsékleten), akkor a kinetikai mérést csak szakaszosan lehet elvégezni. Ilyenkor abból az oldatból, amelyben az enzimreakciót elindítottuk, különböző időpillanatokban mintát veszünk, az enzimet az oldatösszetétel megfelelő, gyors megváltoztatásával inaktiváljuk, és elvégezzük az optikai jelet generáló második reakciót. Érdemes megjegyezni, hogy olyan kémiai reakciókat, amelyek **proton felszabadulás**sal, **vagy proton felvétel**lel járnak, a pH-változáson keresztül is követni lehet. Pontosabban, az ilyen esetekben egy automata készülék, az úgynevezett **pH-stat** alkalmazásával a pH-t állandóan tartják. A reakciót annak a meghatározásán keresztül követik, hogy az idő függvényében a készüléknek mennyi savat vagy bázist kell a reakciótérbe adagolnia ahhoz, hogy a pH állandó maradjon.

A kezdeti sebesség folyamatos méréssel történő meghatározásának elvét a **9.1. ábra** baloldalon lévő grafikonja illusztrálja. A reakciót vagy az enzim, vagy a szubsztrát bemérésével indítjuk, és az oldat gyors összekeverését követően haladéktalanul elkezdjük a mérést. A mérés során természetesen csökken a szubsztrát koncentrációja. Ezzel kapcsolatban arra kel törekedni, hogy ez a csökkenés elhanyagolható mértékű legyen, hiszen a csökkenő szubsztrát koncentráció csökkenő sebességet eredményez, ahogy azt a **9.1. ábra** baloldalán lévő grafikonok is mutatják. Ennek a nem kívánt effektusnak a mértéke ráadásul függ a szubsztrát koncentrációjától, ami a **9.1. ábra** jobboldalán szereplő, telítési görbéről is leolvasható. Jóval a K_M érték alatti szubsztrát koncentráció esetén az [S]-V_0 függvény jó közelítéssel lineáris, míg jóval a K_M érték feletti szubsztrát koncentráció tartományban a V_0 csaknem független az [S] értékétől.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ebből következik, hogy minél alacsonyabb szubsztrát koncentráción dolgozunk, arányaiban annál nagyobb sebességcsökkenést okoz azonos arányú (pl. 10%-nyi) szubsztrát koncentráció csökkenés. Jóval a K_M érték alatti szubsztrát koncentráció tartományban 10 %-os [S] csökkenés ~ 10%-os V_0 csökkenést eredményez, míg jóval a K_M érték feletti tartományban ennél lényegesen kisebb mértékű a V_0 csökkenés. Általánosan elfogadott javaslat, hogy **a kezdeti sebességet olyan módon kell megmérni, hogy a mérés időtartama alatt a szubsztrát koncentrációja 10%-nál kisebb mértékben csökkenjen**. Ilyen feltétel mellett a mért kezdeti sebesség értéke 10 % alatti hibával lesz meghatározva.

A fő **kinetikai paraméterek**, tehát a $\mathbf{V_{max}}$ és a $\mathbf{K_M}$ értékek, **meghatározásához különböző kezdeti szubsztrát koncentrációkon ([S]) mérjük meg a kezdeti sebesség értékeket**. Amennyiben megfelelően választottuk meg a szubsztrát koncentráció tartományt, úgy a kezdeti sebesség értékeket a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázolva a mérési pontok egy telítési görbére illeszkednek, ahogy azt a **9.1. ábra** jobboldalon szereplő grafikonja illusztrálja.

A kinetikai paraméterek minél pontosabb meghatározásához a kezdeti szubsztrát koncentrációt széles határok között érdemes változtatni. Az [S] értékével érdemes a ~ 0,2 K_M – 5 K_M tartományt legalább 8 mérési ponttal lefedni. Azt, hogy pontosan milyen koncentráció tartományban kell mérni, természetesen csak előzetes próbálkozások alapján lehet kideríteni, amelyek során becslést adhatunk a K_M értékére.

Miután a fent említett összefüggések figyelembevételével meghatároztunk egy sereg [S] értékhez tartozó V_0 értéket, minden információ rendelkezésünkre áll ahhoz, hogy ezeknek az elsődleges mérési adatoknak az alapján meghatározzuk a fő kinetikai paramétereket, azaz a V_{max}, ak$_{cat}$, és a K_M értékét.

Az első kinetikai vizsgálatokra még olyan korszakban került sor, amikor nem léteztek számítógépek, így az adatsorok kiértékelése lényegesen nagyobb problémát jelentett. A **9.1. ábra** jobboldalán látható grafikon esetében az **[S] - V_0 függvény** egy telítési görbe. Pusztán **vizuális kiértékelés**sel természetesen nem lehet megállapítani, hogy ez az érték milyen maximális, tehát V_{max} értékhez tart. Ugyanilyen okból azt sem lehet ilyen módon megállapítani, hogy a $V_{max}/2$ értékhez tartozó szubsztrát koncentráció, amely megegyezik a K_M értékével, mekkora. Számítógépek hiányában a hiperbolához való illesztés igen nehézkes volt.

Az ilyen **nem lineáris összefüggések kiértékelésé**re, tipikus megoldásként a következő eljárást vezették be. A mért adatokra vonatkozó összefüggés egyenletét úgy alakították (transzformálták) át, hogy annak formája lineáris legyen, vagyis a **származtatott adatok grafikus ábrázolása**kor a pontok egyenesre essenek. Így a probléma leegyszerűsödött egy egyenes illesztési feladatra, amelyet számítógép nélkül is el lehetett végezni. A kinetikai paraméterek meghatározására **ma már** nem ezt a módszert alkalmazzák (hanem számítógépes programokkal **nem-lineáris regresszió**val illesztenek, lásd később), mégis fennmaradt ez az eljárás, mert mint a későbbiekben látni fogjuk, enzim gátlások esetén a linearizált egyenletek grafikonjai világosan megmutatják, hogy a vizsgált inhibitor milyen mechanizmussal gátolja az enzimet.

A **Michaelis-Menten** kinetikát leíró **9.27. egyenlet** legelterjedtebb **linearizálás**át Hans Lineweaver és Dean Burk vezette be. Az általuk javasolt transzformálás a róluk elnevezett **Lineweaver-Burk egyenlet**hez vezet (lásd **9.35. egyenlet**). A transzformálás a következőképpen történik.

Vesszük **a 9.27. egyenlet mindkét oldalának reciprok**át, ami a **9.33. egyenlet**hez vezet.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]}$$

9.33. egyenlet

A **9.34. egyenlet**et úgy kapjuk, hogy felbontjuk a 9.33. egyenlet jobboldalán szereplő tört számlálóját.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

9.34. egyenlet

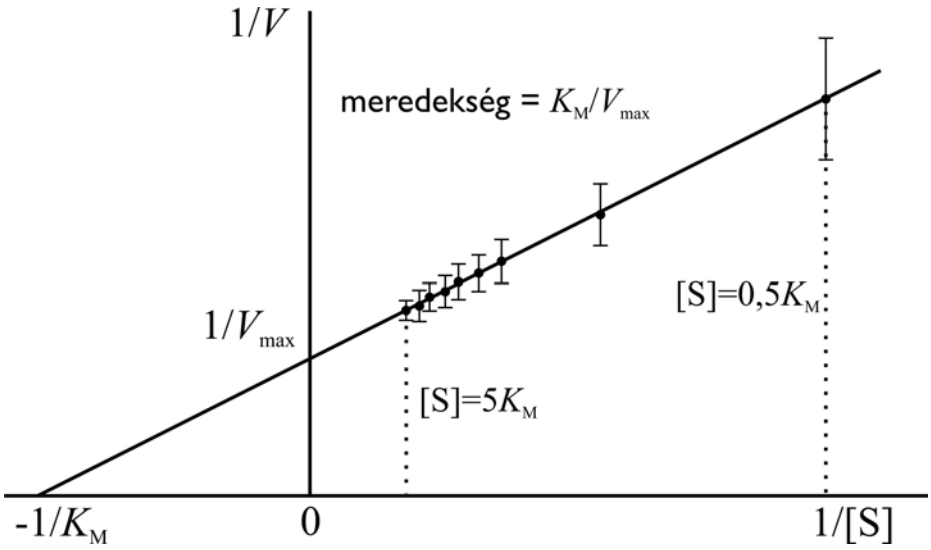
Ekkor a 9.34. egyenlet jobboldalán lévő második tagban szereplő törtet egyszerűsíteni lehet, ami a **9.35. egyenlet**hez vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

9.35. egyenlet

Az ehhez az egyenlethez tartozó grafikon nem más, mint a **9.1. ábra** jobboldali részén található grafikon „**kettősreciprok" formá**ja. Míg ott a V_0 értékeket ábrázoltuk az [S] függvényében, itt az $1/V_0$ értékeket ábrázoljuk a 1/[S] függvényében. Mint ahogy azt a **9.3. ábra** is illusztrálja, a **9.35. egyenlet grafikonja egy egyenes**.



9.3. ábra: A Lineweaver-Burk féle kettősreciprok ábrázolás.

Az egyenes általános egyenlete, Y=a*X+b szerint itt $Y=1/V_0$; X=1/[S]; $a=K_M/V_{max}$ és $b=1/V_{max}$. **Az egyenes meredeksége**, „a" (ami nem más, mint az egyenes X-tengellyel bezárt szögének tangense) tehát **megadja a K_M/V_{max} értéket**, az **Y tengely metszet**e (ahol X, tehát 1/[S] értéke 0) megadja az **$1/V_{max}$ értéket**, míg az **X-tengely metszete**, (ahol Y, tehát $1/V_{0\ értéke}$ 0) megadja a **$-1/K_M$ érték**et.

A meredekség, és bármelyik tengelymetszet alapján tehát mind a V_{max}, mind a K_M érték meghatározható. Ez a megoldás ugyan elegánsan egyszerű, de az ezzel az eljárással történő kiértékelés komoly hibákhoz vezethet. A kettősreciprok ábrázolásban a legkisebb szubsztrát koncentrációkhoz tartozó legkisebb, ezért óhatatlanul a legnagyobb mérési hibával meghatározott, kezdeti sebességadatok reciprokai lesznek a legnagyobb számértékű mérési adatok. Így ezek befolyásolják legnagyobb mértékben az illesztett egyenes paramétereit. Emiatt mind a K_M, mind pedig a V_{max} így meghatározott értéke pontatlan lehet.

A számítógépek elterjedésével új megoldás született az adatok kiértékelésére. Ez a **nem-lineáris regresszió**. Ennek során az elsődleges, [S] - V_0 adatsorhoz illesztünk megfelelő szoftver alkalmazásával a **9.27. egyenlet**nek megfelelően derékszögű hiperbolát. A program egy algoritmus alapján, iteratív módon megkeresi azt a V_{max}; K_M adatpárt, amelyek **9.27. egyenlet**be történő behelyettesítésével kapott függvényre a mérési pontok a legkisebb eltéréssel illeszkednek.

A legtöbb kiértékelő program igényli, hogy megadjunk egy-egy V_{max} illetve K_M értéket, amellyel elindítja az iteratív optimumkeresést. Amennyiben tudjuk, hogy a mérés során mekkora volt a bemért enzim $[E]_T$ koncentrációja, úgy a kiértékelés során kapott V_{max} érték ismeretében a **9.26. egyenlet** alapján a Vmax értéket az $[E]_T$ értékével elosztva megkapjuk az átviteli számot, vagyis a k_{cat} értékét is.

Érdemes megjegyezni, hogy amennyiben csak a k_{cat}/K_M hányadost, tehát a katalitikus hatékonyságot kívánjuk megmérni, úgy az közvetlenül, akár egyetlen méréssel is meghatározható. A **9.31. egyenlet**hez vezető gondolatmenet alapján amennyiben a V_0 értéket a K_M értékénél nagyságrendekkel alacsonyabb szubsztrát koncentráción határozzuk meg ismert $[E]_T$ bemérési enzim koncentráción, úgy a **9.31. egyenlet** alapján a k_{cat}/K_M hányados közvetlenül

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

meghatározható. Ezt a fajta mérést azonban csak olyan enzim-szubsztrát pároknál lehet elvégezni, amelyeknél a keletkező termék nagyon nagy érzékenységgel mérhető, hiszen nagyon alacsony szubsztrát koncentráción mérve nagyon alacsony termék koncentrációkat kell pontosan meghatároznunk az idő függvényében.

9.4. Enzimgátlás típusok

Az enzimek központi szerepet játszanak az életfolyamatokban. A legtöbb enzim esetében igaz, hogy annak működésére csak bizonyos körülmények között van szükség, és amikor ezek a körülmények megszűnnek az enzim aktivitása felesleges, vagy akár káros is lehet. Ennek megfelelően a legtöbb enzim aktivitása szabályozás alatt áll. Ez a szabályozás rendkívül sok szinten megtörténhet, kezdve az enzim génjének transzkripciós szabályozásától egészen az enzim szabályozott lebontásáig (lásd **17. fejezet**). Ebben a fejezetben kizárólag olyan **reverzibilis, nem kovalensen kötődő inhibitorok** eseteit vesszük sorra, amelyek az enzimnek a szubsztrát kötését és/vagy katalitikus apparátusának működését gátolják. Az ilyen gátlószerek mechanizmusa **három fő csoport**ba osztható: **kompetitív, unkompetitív és kevert típus**. A **kevert típus** további két altípusra, a **nonkompetitív és vegyes típus**ú gátlásokra osztható.

Azt, hogy egy adott gátlószer melyik **típus**ba tartozik, **kinetikai mérésekkel meg lehet határozni**.

Az ilyen méréseknél a leggyakrabban úgy járunk el, hogy különböző, egy-egy kísérletben állandóan tartott bemérési inhibitor koncentráció mellett a **9.3. fejezet**ben leírt módon meghatározzuk a V_{max} és K_M kinetikai paramétereket. Amennyiben a mérési adatokat a Lineweaver-Burk féle kettősreciprok ábrázolásban értékeljük ki, a kapott egyeneseknek a gátolatlan reakcióra vonatkozó egyenestől való eltérése fényt derít arra, hogy az inhibitor melyik gátlási típus szerint működik.

9.4.1. Kompetitív gátlás

A **kompetitív** (versengő) **inhibitorok versengenek a szubsztráttal az enzim szubsztrátkötő helyéért**, mivel az inhibitor és a szubsztrát egymással átfedő (részben, vagy egészben megegyező) kötőhelyre kötődnek. **Hármas komplex**, tehát olyan, amelyben az enzimhez egyidejűleg a gátlószer és a szubsztrát is kötődne**, nem jöhet létre**. A kompetitív inhibitorral komplexet alkotó enzim tehát tökéletesen inaktív.

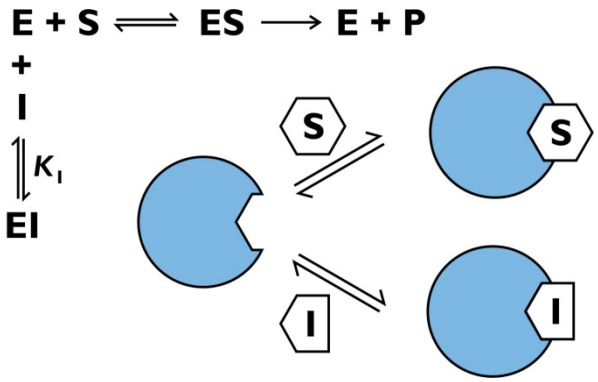
Egyfajta köznyelvi kifejezéssel élve a kompetitív inhibitorok esetében gyakran úgy fogalmaznak, hogy azok mintegy „leszorítják”, vagy „kiszorítják” a szubsztrátot az enzim kötőhelyéről. Ezek a szemléletesnek szánt kifejezések sajnos éppenséggel félrevezetőek. Szó sincs ugyanis arról, hogy az inhibitor az ES komplexhez kötődve valamilyen módon aktívan „kitúrná” a szubsztrátot az enzim kötőzsebéből. Ez már csak azért sem lehetséges, mert hármas komplex, mint említettük, itt nem alakul ki. Pusztán arról van szó, hogy két kötési egyensúly alakul ki párhuzamosan. A koncentrációviszonyoknak megfelelően az oldatban kialakul egy enzim – inhibitor kötődésre vonatkozó egyensúly, valamint egy enzim – szubsztrát kötődésre vonatkozó egyensúly. (Ez utóbbi a szubsztrát átalakítása miatt nem valódi egyensúly, hanem helyesebben megnevezve egy stacionárius állapot, lásd **9.2. ábra**).

Az enzim és az inhibitor között kialakuló egyensúlyt a **9.36. egyenlet** írja le, ahol a K_I egy disszociációs állandónak felel meg.

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$ **9.36. egyenlet**

A két egyensúly egymástól nem független, hiszen az azokban kialakuló ES és EI komplexek ugyanazzal a szabad E enzimmel tartanak egyensúlyt. Az inhibitor koncentráció növelésével az EI koncentráció növekedése csak az ES koncentráció csökkenésével valósulhat meg, és fordítva, a szubsztrát koncentráció növelése csak az EI komplex koncentrációjának rovására növelheti az ES komplex koncentrációját. A kompetitív gátlás a **9.4. ábra** szemlélteti.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



9.4. ábra: A kompetitív gátlás sémája

A Michaelis – Menten egyenlet levezetésénél felhasználtuk azt a tényt, hogy a teljes enzimkoncentráció felírható a szabad enzim koncentrációjának és a szubsztráttal alkotott komplexben lévő enzim koncentrációjának az összegeként: $[E]_T=[E]+[ES]$. Kompetitív inhibitor jelenlétében azonban $[E]_T=[E]+[ES]+[EI]$. Amennyiben ennek az eltérésnek a figyelembevételével vezetjük le a Michaelis - Menten egyenletet, úgy egy itt részleteiben nem bemutatott levezetés végén a **9.37. egyenlet**hez jutunk.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{(\alpha K_M + [S])}$$ **9.37. egyenlet**

A 9.37 egyenletben szereplő α jelentését a **9.38. egyenlet** tartalmazza.

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$ **9.38. egyenlet**

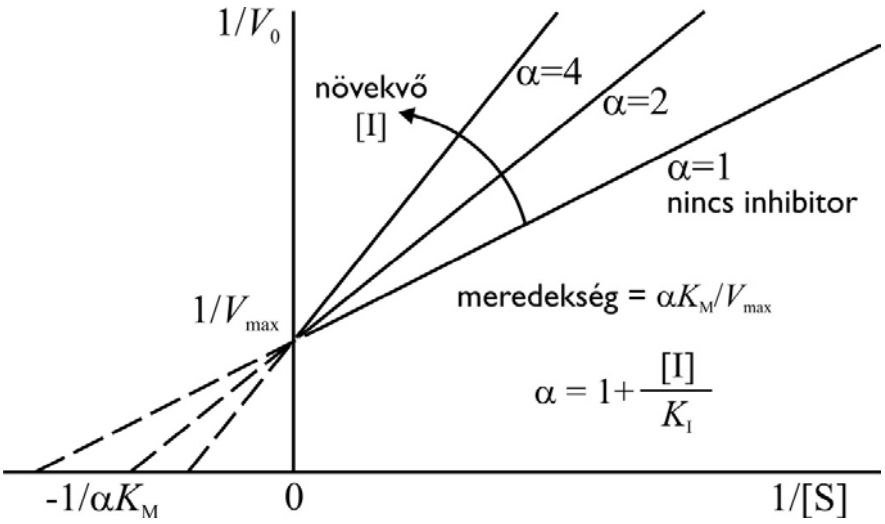
Jól látható, hogy inhibitor hiányában az α értéke 1, tehát visszakapjuk az eredeti egyenletet, míg inhibitor jelenlétében az α értéke egy egynél nagyobb szám. Minél nagyobb mértékben haladja meg az inhibitor koncentrációja a K_I disszociációs állandó értékét, annál nagyobb az α értéke. A 9.37 egyenlet világosan jelzi, hogy amennyiben a kinetikai paramétereket **kompetitív inhibitor** jelenlétében határozzuk meg, úgy az így kapott **V_{max} érték megegyezik** majd az inhibitor távollétében zajló kísérletekből kapott értékkel, míg a **K_M értéke magasabb** lesz, **mint inhibitor hiányában**. Mivel ennél a gátlási típusnál az inhibitor verseng a szubsztráttal, intuitíven belátható, hogy kellően magas, „végtelen” szubsztrát koncentráción az inhibitor jelenléte elhanyagolható lesz, tehát a V_{max} érték nem módosul, ugyanakkor a fél-maximális sebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, amely megadja a K_M számértékét, magasabb lesz, mint inhibitor hiányában. A **9.37. egyenlet** éppen ezt fejezi ki.

Amennyiben a **kettős reciprok ábrázolás**hoz átrendezzük a 9.37 egyenletet, a 9.35 egyenlet párjaként a **9.39. egyenlet**hez jutunk.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$ **9.39. egyenlet**

Az ehhez tartozó, a **9.5. ábrán** bemutatott grafikon világosan mutatja, hogy inhibitor jelenlétében a kettős reciprok ábrázolásban a gátolatlan esethez képest **nagyobb meredekségű egyenesek**et kapunk, de az Y-tengely metszete nem változik. A grafikon jól mutatja a kettős reciprok ábrázolás előnyét abban, hogy látványosan jelzi, milyen gátlási mechanizmusba tartozik az inhibitor.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



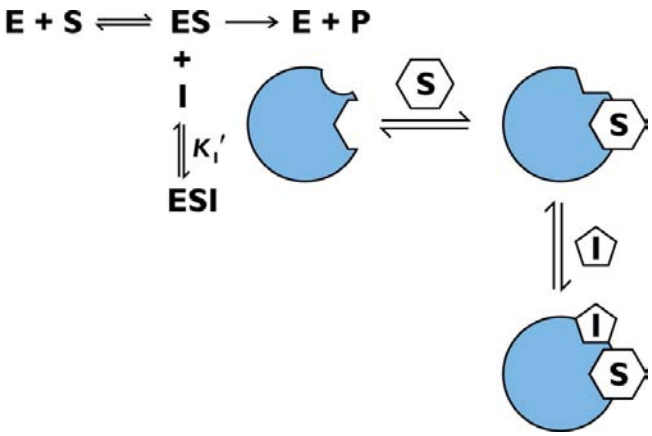
9.5. ábra: A kompetitív gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása

Mivel azonos kötőhelyért versenyeznek, nem meglepő, hogy a **kompetitív inhibitorok** szerkezetükben, polaritás mintázatukban rendszerint hasonlítanak a szubsztráthoz. Ezen tulajdonságuk miatt kiválóan **alkalmasak az enzim szubsztrátkötő mechanizmusának vizsgálatára**. Számos kompetitív inhibitor és a szubsztrát szerkezetének összehasonlításával gyakran kikövetkeztethető, hogy az enzim a szubsztrátnak mely csoportjain keresztül létesít az ES komplexben kapcsolatot. Ez az indirekt megközelítés azért releváns, mert míg a csak rövid ideig létező, átmeneti jellegű ES komplex térszerkezetét igen nehéz közvetlenül meghatározni, addig az enzim-inhibitor komplexek röntgendiffrakciós szerkezete könnyebb meghatározni.

(Érdekességként megemlítendő, hogy metanol mérgezés esetén azért adnak a páciensnek etanolt, mert az etanol egyfajta kompetitív inhibitorként, pontosabban versengő szubsztrátként működik. Az alkohol dehidrogenáz enzimnek mindkét alkohol a szubsztrátja. Az enzimreakció során a metanolból formaldehid keletkezik, ami a metanolnál lényegesen mérgezőbb. Az etanol jobb szubsztrátja az enzimnek, így etanol beadásával az érhető el, hogy időegység alatt kevesebb metanol alakuljon formaldehiddé. A szervezet így időt nyer arra, hogy a metanol egy részét még annak átalakulása előtt kiválaszthassa.)

9.4.2. Unkompetitív gátlás

Az ún. unkompetitív **inhibitor**ok **kizárólag az ES komplexhez kötődnek**, a szabad enzimhez nem. Ezt a kölcsönhatási sémát a **9.6. ábra** mutatja.



9.6. ábra: Az unkompetitív gátlás sémája

Ennél a gátlási típusnál a kinetikai egyenlet a **9.40. egyenlet** szerint módosul.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + \alpha'[S]}$$ **9.40. egyenlet**

A kölcsönhatási sémában jelzett K_I' jelentését a **9.41. egyenlet** mutatja.

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$ **9.41. egyenlet**

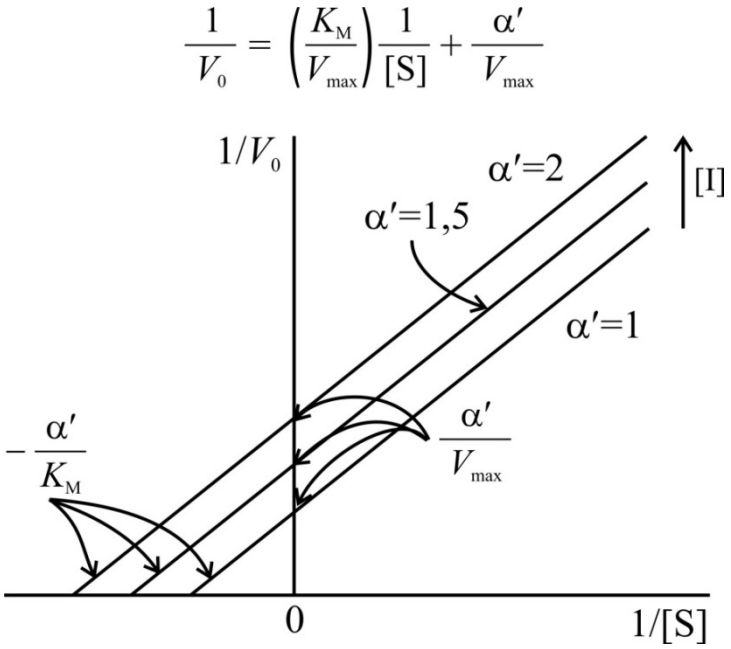
A 9.40 egyenletben szereplő α' jelentése a 9.38 egyenletben szereplővel analóg, és a **9.42. egyenlet** mutatja.

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$ **9.42. egyenlet**

A 9.40 egyenlet **kettős reciprok átalakítása** a **9.43. egyenlet**et eredményezi.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$ **9.43. egyenlet**

A 9.43 egyenlethez tartozó grafikon a **9.7. ábrán** szerepel.



9.7. ábra: Az unkompetitív gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása

A grafikon elemzéséből látható, hogy **mind a K_M, mind a V_{max} értékek el vannak osztva α' értékével** (tehát a reciprokok meg van szorozva α' értékével). Ez azt jelenti, hogy az inhibitor jelenlétében – szemben a kompetitív inhibitorokkal -, az eredetinél alacsonyabb maximális sebesség érhető el, és amilyen arányban csökken ez a V_{max} érték, ugyanolyan arányban csökken a fél-maximális sebességhez tartozó szubsztrát koncentráció, azaz a K_M értéke is. Mivel **mindkét kinetikai paraméter azonos arányban csökken**, a hányadosuk értéke, tehát **az egyenesek**

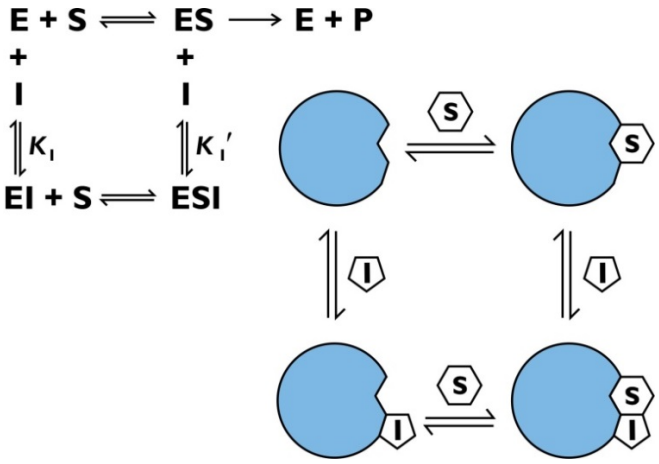
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

meredeksége nem változik. Megemlítendő, hogy, bár ez a gátlás is reverzibilis, az unkompetitív gátlószer hatása nem függeszthető fel a szubsztrát-koncentráció növelésével!

9.4.3. Kevert típusú gátlás

A két fentebb említett gátlási típus kombinációjaként olyan gátlószerek is léteznek, amelyek **mind a szabad enzimhez, mind pedig az ES komplexhez képesek kötődni**. Ennek a kevert típusú gátlásnak az általánosabb alesete a vegyes típusú gátlás. Ennek sémáját a **9.8. ábra** mutatja.

Ahogy azt a kölcsönhatási séma mutatja, a gátlószer nem azonos affinitással kötődik a szabad, illetve az ES komplexben lévő enzimhez.



9.8. ábra: A vegyes típusú gátlás sémája

Az ebből a sémából eredő kinetikai egyenletet a **9.44. egyenlet** mutatja.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{(\alpha K_M + \alpha'[S])}$$ **9.44. egyenlet**

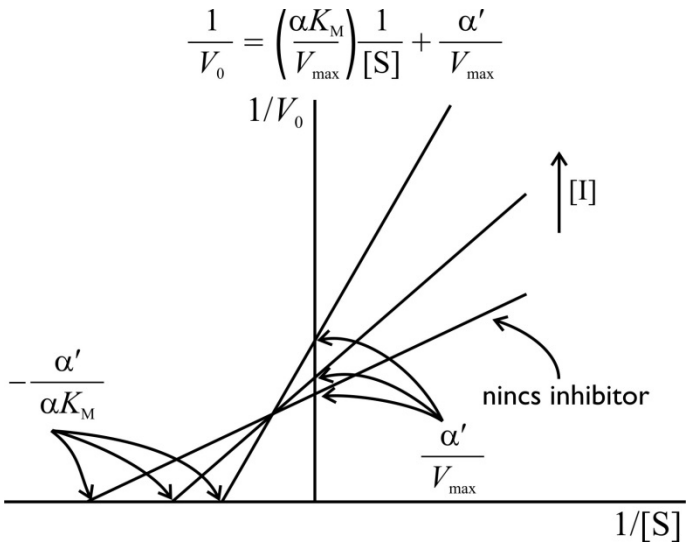
Ennek kettős reciprok átalakítása a 9.45. egyenletet eredményezi.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$ **9.45. egyenlet**

Az α és α’ jelentése megegyezik azzal, amit a kompetitív illetve az unkompetitív inhibitoroknál láttunk.

A kettős reciprok függvényhez tartozó grafikus ábrázolást a **9.9. ábra** illusztrálja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



9.9. ábra: A vegyes típusú gátlás Lineweaver-Burk féle kettős reciprok ábrázolása

Kettősreciprok ábrázolásban tehát mindhárom gátlási típushoz **jellegzetesen eltérő grafikon** tartozik. Ezeknek a grafikonoknak a gátolatlan reakció grafikonjától való eltérése diagnosztikus értékkel bír, elárulja, hogy milyen típusú az inhibitor.

Megjegyzendő, hogy a vegyes gátlás mellett **a kevert típusú gátlás** másik – inkább csak elméletben létező – **variánsa a non-kompetitív gátlás**. Ez egy olyan eset, amikor **az inhibitor azonos affinitással kötődik a szabad enzimhez és az ES komplexhez**. Ekkor kétféle α érték helyett is csak egyetlen szerepel, így belátható, hogy a 9.9. ábrán szereplő grafikon úgy módosul, hogy a különböző inhibitor koncentrációkhoz tartozó egyenesek az X-tengelyt mind egy pontban metszik (hiszen a $-1/K_M$ szorzója α / α=1), míg az Y-tengely metszetek rendre az α / Vmax értékekre esnek.

Az egyes típusok esetében az α, illetve α' értékek természetesen az egyenletek, illetve grafikonok alapján meghatározhatók, és ezeken keresztül a megfelelő gátlási állandók is kiszámíthatóak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

10. fejezet - Szénhidrátok

(szerző: Nyitray László)

Ebben a fejezetben az élő rendszerekben előforduló fontosabb egyszerű **szénhidrátok**at és összetett szénhidrátokat, **glikokonjugátumok**at tárgyaljuk. Feltételezzük, hogy az olvasó foglalkozott már szerves kémiával, ezért a cukrok általános tulajdonságait csak ott említjük, ahol ez a megértéshez szükséges. A cukrok sztereokémiájának jelentőségéről röviden szó esett a kémiai bevezetőben (lásd **2.2.2. fejezet**).

A szénhidrátoknak többrétű szerepe van az élőlényekben. Egyrészt a zsírokkal és a fehérjékkel együtt tápanyagok, azaz **energiaforrás**ként szolgálnak. A metabolizmus központi anyagcsere útvonalain cukormolekulák átalakulásai történnek (például glikolízis, a glükóz direkt oxidációja, glükoneogenezis, glikogén anyagcsere).

Lehet csak **szerkezeti szerep**ük is (lásd például a növényi sejtfalalkotó cellulóz), de ennél fontosabb, hogy **biológiai információt** is **hordozhatnak**. Ez utóbbi szerepük elsősorban a **glikoproteinek** (és részben glikolipidek) „cukormintázatában" jelenik meg, melynek nagy jelentősége van többek között a sejt-sejt kommunikációban. A cukrok információhordozó tulajdonságukat nagyfokú diverzitásuknak köszönhetik. A „**cukorkód**ban" rejlő információtartalom feltárása a ma biokémiájának egy izgalmas ága. Egy élőlény teljes szénhidrát készletének feltárásával foglalkozik a rendszerbiológia részét képező **glikomika** (a szénhidrátok biológiai szerepével pedig a glikobiológia).

A szénhidrátok közé az egyszerű (3-9 szénatomszámú) cukrok, a **monoszacharidok**, valamint a belőlük felépülő **poliszacharidok** (glikánok) tartoznak. Külön csoportot alkotnak az **összetett szénhidrátok** (glikokonjugátumok), melyekben cukrokon kívül más komponens is található. Többek között ide tartoznak a **glikolipidek és a glikoproteinek**. (A biokémiában az összetett szénhidrátokban található cukorrészeket, a poliszacharidok általános nevével egyezően szintén glikánnak nevezik.)

10.1. Monoszacharidok

Az egyszerű cukrok legalább három hidroxilcsoportot tartalmazó aldehidek és ketonok, melyek sejtes körülmények között elsősorban gyűrűs **piranóz** vagy **furanóz formá**ban (intramolekuláris hemiacetál és hemiketál) vannak jelen. Ebben az e-könyvben a nyílt láncú formával nem foglalkozunk. Nem térünk ki külön a gyűrűs formák konformációs állapotaira sem. Ábrázolásmódjuknál a **Haworth-projekció**t követjük, ami egy egyszerű háromdimenziós perspektivikus szerkezeti képletet jelent (lásd **10.1. ábra**).

A poliszacharidokban és az összetett szénhidrátokban a monoszacharidok hidroxil- és aminocsoportokon keresztül, kondenzációs reakcióban kialakuló **glikozidos-kötés**sel kapcsolódhatnak egymáshoz illetve az összetett szénhidrátokban a fehérjékhez, lipidekhez. A hidroxilcsoporton keresztül létrejött kötések neve **O-glikozidos**, az aminocsoporton keresztüli pedig **N-glikozidos**.

A biológiailag fontos monoszacharidok közül a **10.1. táblázat** sorol fel néhányat, a rövidítésükkel és a biokémiában használt szimbólumukkal együtt. A **10.1. ábra** néhány hexóz cukorszármazék képletét mutatja.

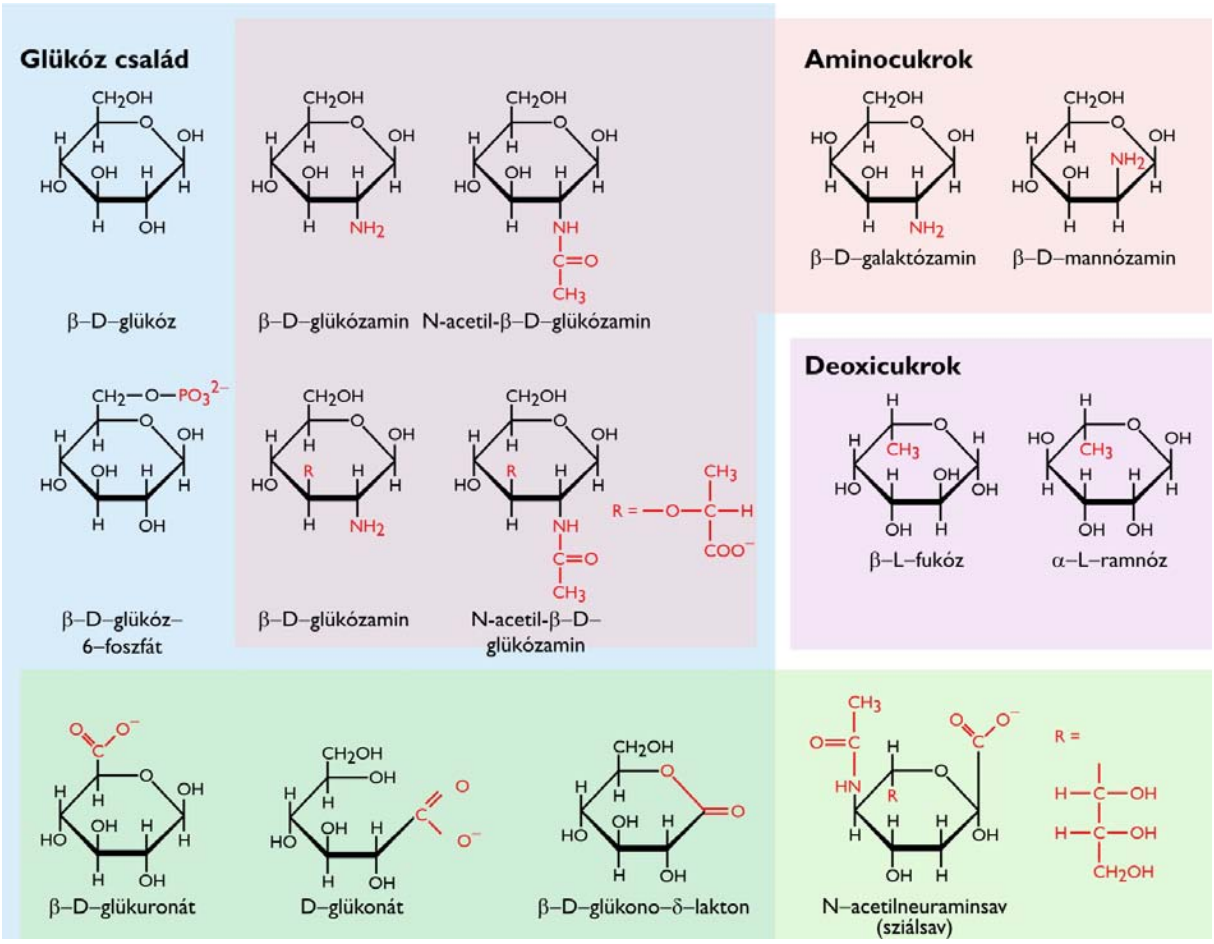
A **10.1. táblázat**ban felsorolt monoszacharidok közül valószínűleg nem szükséges különösebben bemutatnunk a **glükóz**t (aldo-hexapiranóz; szőlőcukor; rövidítése: **Glc** és nem Glu, hogy ne keverjük össze a glutaminsav rövidítésével), a **fruktóz**t (keto-pentafuranóz; gyümölcscukor; **Fru**), a **galaktóz**t (a Glc C-4 epimerje, a tejcukor egyik komponense; **Gal**), a **ribóz**t (aldopentóz; **Rib**) és dezoxi-párját, a **dezoxiribóz**t. Közülük a legédesebb a fruktóz, majd csökkenő sorrendben a szacharóz, glükóz és a galaktóz. (Ezt a tulajdonságot „kóstoló személyek" érzékelése alapján, relatív skálán állapítják meg, melyben az egység édessége a diszacharid szacharóznak van.) Érdekességként megjegyezzük, hogy vannak édes fehérjék is, például egy afrikai gyümölcsből izolált fehérje, a taumatin 2000-szer édesebb a nádcukornál (szacharóz).

10.1. táblázat: Néhány biológiailag fontos monoszacharid

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Nómenklatúra	Rövidítés	C-atom	Ikon	Nómenklatúra	Rövidítés	C-atom	Ikon
arabinóz	Ara	5		glükuronsav	GlcA	6	
fruktóz	Fru	6		galaktózamin	GalN	6	
fukóz	Fuc	6		glükózamin	GlcN	6	
galaktóz	Gal	6		N-acetil-galaktózamin	GalNAc	8	
glükóz (dextróz)	Glc	6		N-acetil-glükózamin	GlcNAc	8	
mannóz	Man	6		muraminsav	Mur	9	
ramnóz	Rha	6		N-acetil-muraminsav	Mur2Ac	11	
ribóz	Rib	5		N-acetil-neuraminsav (sziálsav)	Neu5Ac (Sia)	11	
xilóz	Xyl	5					

A **mannóz** (aldohexóz, a Glc C-2 epimerje; Man) elsősorban glikoproteinek cukorkomponenseként ismert. A beépülését katalizáló enzim mutációja genetikai betegséget okoz (kongenitális glikozilációs rendellenesség). Az **arabinóz**, ellentétben a természetben preferált D-cukrokkal (lásd **2.2.2. fejezet**) a természetben a polimerjeiben (hemicellulóz és pektin) is az L-izomer formában van jelen. A **xilóz** egy aldopentóz, a szemicellulóz előanyaga, ezáltal a biomasszában a legnagyobb mennyiségben előforduló monoszacharid. A **ramnóz** és a **fukóz** dezoxicukrok. Az előbbi növényi poliszacharidokban és a tuberkulózist okozó baktérium külső sejtfalában, az utóbbi sejtfelszíni glikoproteinekben fordul elő.



10.1. ábra: Hexóz származékok szerkezeti képlete (Haworth ábrázolással)

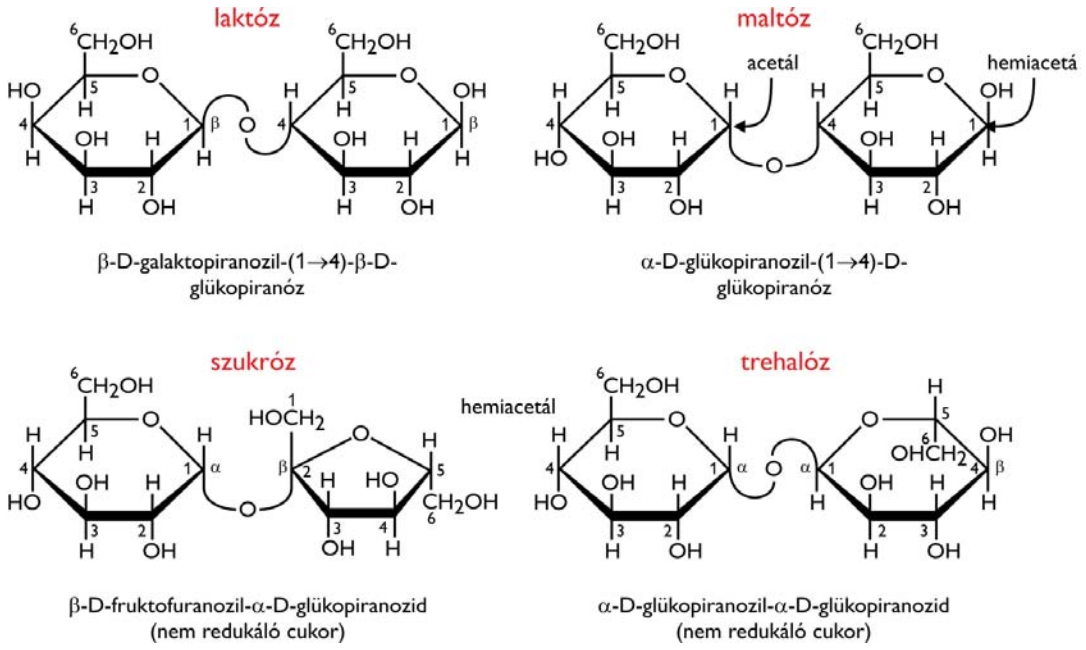
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

10.2. Diszacharidok

A fontosabb diszacharidokat a **10.2. ábra** mutatja be, a glikobiológiában használt szisztematikus elnevezésükkel együtt.

A cukoregységek, legyen szó akár di-, akár oligo- és poliszacharidokról, **O-glikozidos kötés**sel kapcsolódnak egymáshoz. A tejcukorban (l**aktóz**) például egy β-D-galaktóz C-1 szénatoma van glikozidos kötésben a β-D-glükóz C-4 hidroxiljával, a létrejött diszacharid neve: β-D-galaktopiranozil-(1→4)-β-D-glükopiranóz (rövidítve: Gal(β1→4)Glc).

A malátacukorban (**maltóz**) két α-D-glükóz kapcsolódik egymáshoz, szintén 1→4 glikozidos kötéssel, ezért a szisztematikus elnevezése: α-D-glükópiranozil-(1→4)-D-glükopiranóz (Glc(α1→4)Glc).



10.2. ábra: Diszacharidok szerkezeti képlete

A répacukorban (**szacharóz** vagy **szukróz**) mindkét monoszacharid (β-D-fruktóz, α-D-glükóz), a gyűrűs cukor anomer szénatomjával vesz részt a kötésben, ezért ún. **nem-redukáló diszacharid** keletkezik (az aldehid- illetve keto-forma nem tud kialakulni). A szisztematikus neve: β-D-fruktofuranozil-α-D-glükopiranozid (Fru(2β→α1)Glc).

A diszacharidokat hidrolizáló enzimek (szukráz, laktáz, maltáz), az állatok emésztőrendszerében az epiteliális sejtek mikrobolyhainak külső oldalán helyezkednek el.

Megemlítjük még a rovarok hemolimfájában „vércukorként” megtalálható (de más élőlénycsoportokban is előforduló) **trehalóz**t, egy másik nem-redukáló diszacharidot (Glc(α1→α1)Glc), melynek érdekessége, hogy igen nagy a vízvisszatartó képessége, ezért az anhidrobiózisra (azaz a kiszáradás túlélésére) képes állatokban (kerekesférgek, medveállatkák stb.) nagyobb mennyiségben van jelen.

10.3. Poliszacharidok

A fontosabb homo- és heteropoliszacharidok jellemző tulajdonságait a **10.2. táblázat**ban foglaltuk össze.

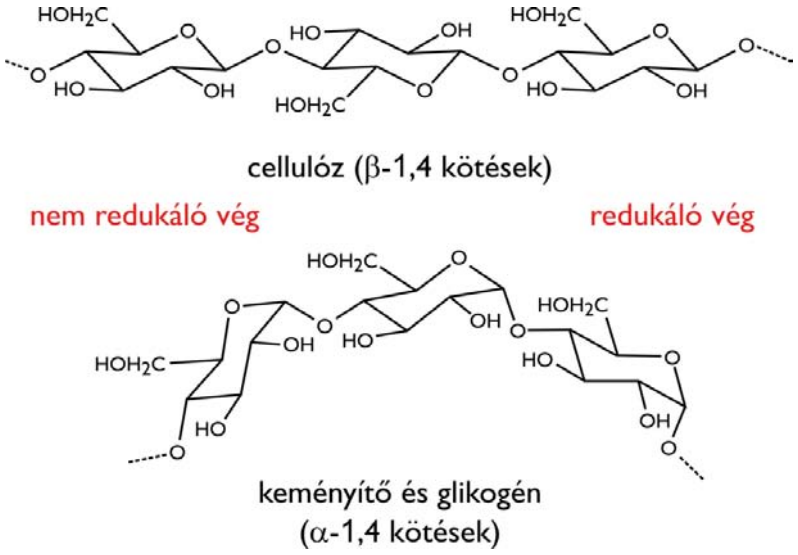
10.2. táblázat: Poliszacharidok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Polimer	Típus	Ismétlő egységek	Egység	Eredet/funkció
amilium: amilóz	homo	(α1→4)Glc, lineáris	50-5000	növény: energiatárolás
amilopektin	homo	(α1→4)Glc, α1→6 elágazás (25-30 egységenként)	$<10^6$	növény: energiatárolás
glikogén	homo	(α1→4)Glc, α1→6 elágazás (8-12 egységenként)	<50 000	állat és baktérium: energiatárolás
cellulóz	homo	(β1→4)Glc	<15 000	növényi sejtfal
kitin	homo	(β1→4)GlcNAc	nagyon sok	ízeltlábú kültakaró
dextrán	homo	(α1→6)Glc, α1→3 elágazó	széles tartomány	bakteriális extracelluláris adhézív, dentrális plakk
agaróz	hetero	3)D-Gal(β1→4)3,6-anhIdro-L-Gal(α1	1000	vörösalga sejtfal
pektin	hetero	D-GalA(α1→4); (Gal, Xyl, Rhm, Ara)	100-1000	növényi sejtfal (gyümölcs)
peptidoglikán	hetero +peptid	4)Mur2Ac(β1→4) GlcNAc(β1	nagyon sok	bakteriális sejtfal
hialuronsav	hetero (savas)	4)GlcA(β1→3) GlcNAc(β1	<100 000	gerinces ECM (viszkozitás)

A **poliszacharidok** (**glikánok**), a polipeptidekkel és a nukleinsavláncokkal ellentétben lehetnek elágazók is. Összetételük szerint léteznek **homo**- és **heteropoliszacharid**ok.

A természetben az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló biomolekula, a **cellulóz** homopolimer, **β-D-glükóz egység**ek (több tízezer), **β1→4 glikozidos kötés**ekkel kapcsolódnak össze **lineáris** polimerré (lásd **10.3. ábra**). Becslések szerint évente ~10^{12} tonna cellulóz szintetizálódik a növények sejtfalanyagaként. Mivel a glükóz egységek β-konfigurációban vannak, a kialakuló cellulózláncok **nyújtott konformáció**júak, könnyen képeznek vízben oldhatatlan fibrillumokat, kötegeket, amelyeket a láncok közötti hidrogénhidak tartanak össze. Közismert, hogy az állatokban hiányzik a lebontásukért felelős celluláz enzim.

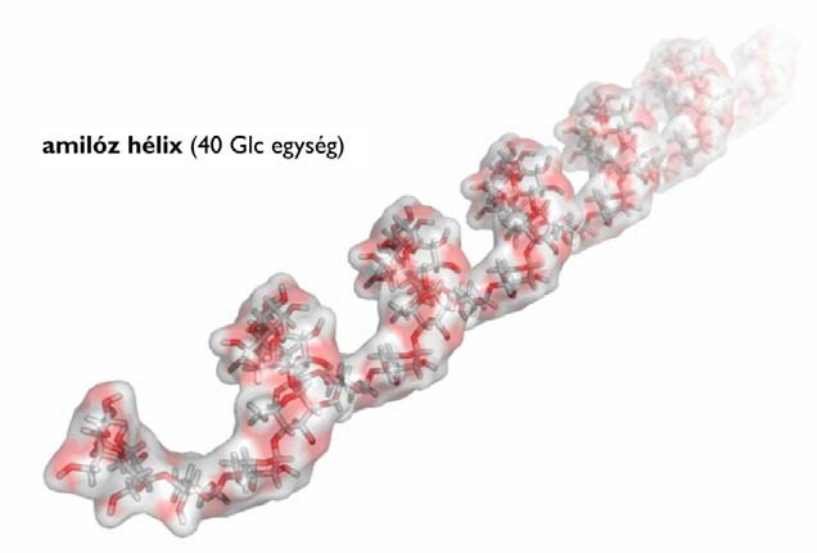


10.3. ábra: A cellulóz, a keményítő és a glikogén szerkezete (részlet)

A cellulóz mellett, a faanyag, a **lignin** is nagy mennyiségben szintetizálódik a természetben (>10^6 t/ év). A lignin egy komplex heteropolimer (nem szénhidrát!), fenilalanin és tirozin aminosavakból és glükózból indul ki a szintézise, s a pontos szerkezetét még ma sem ismerjük (de erősen hidrofób tulajdonságú).

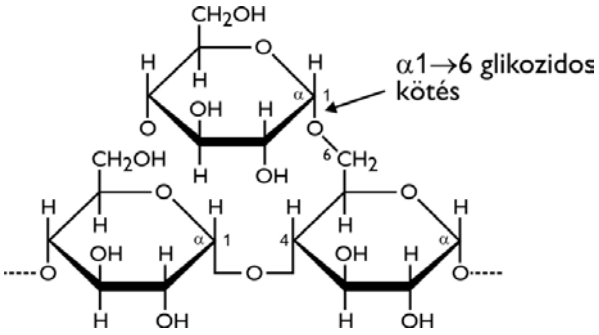
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az α-D-glükózból felépülő homopolimerek a **keményítő** (**amilum**) és az „állati keményítő” néven is ismert **glikogén**, az állatok legfontosabb szénhidrát energiaraktározó vegyülete. A α1→4 glikozidos kötés (lásd **10.3. ábra**) miatt ezek a láncok el nem ágazó formában **helikális konformáció**t vesznek fel (lásd **10.4. ábra**).



10.4. ábra: Az amilóz helikális szerkezete

A keményítő valójában a **lineárisamilóz** (lásd **10.4. ábra**) és az **elágazóamilopektin** molekulák keveréke. Az **elágazások** mindig **α1→6** glikozidos kötések (lásd Haworth-féle ábrázolásban a **10.5. ábrán**). A 2-200 ezer glükóz monomerből felépülő amilopektin láncok 25-30 egységenként ágaznak el.



10.5. ábra: Elágazások (α1→6 glikozidos kötések) a keményítőben

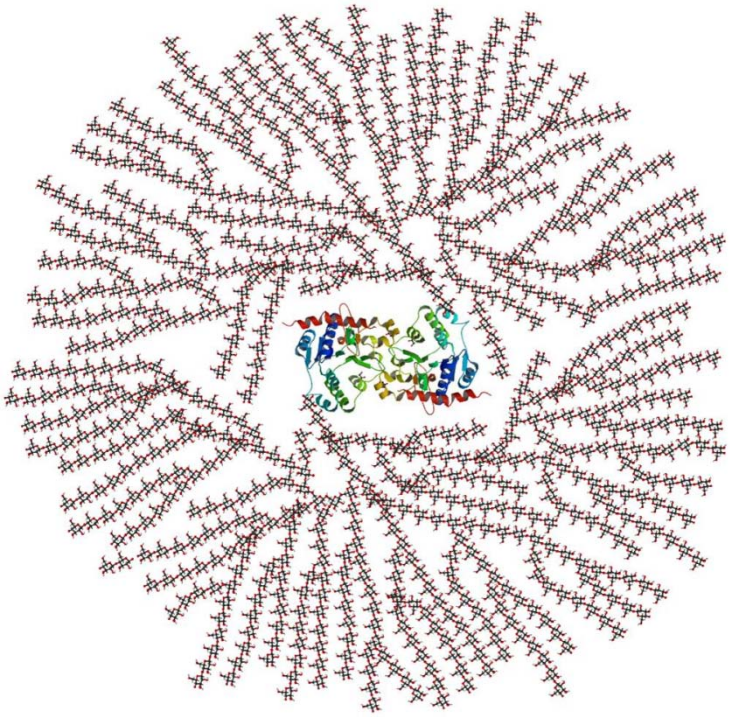
A **glikogén** az amilopektinhez hasonlít, de az **α1→6 elágazások 8-12 egységenként** követik egymást (ennek következtében a glikogén még kompaktabb szerkezetű lesz, mint a keményítő). Az állati sejtek citoplazmájában megfigyelhető **glikogén részecskék**ben (amelyek májsejtekben a nedves tömeg 7%-át is kitehetik), a ~50 ezer α-D-glükózból álló láncok a bioszintézisükben résztvevő enzim, a **glikogenin** köré szerveződnek (lásd **10.6. ábra**).

(A glikogén-szintáz enzim működéséhez templátra van szükség, mely minimum 4 glükóz egységet tartalmaz. A lánckezdést végzi a glikoziltranszferáz aktivitású glikogenin. A növekvő glükózlánc az enzimen egy Tyr oldallánchoz kapcsolódik. Az aktivált glükóz egységek – mint az a glikozidos kötések kialakítására általánosan igaz – UDP-glükózból származnak.).

A sejtek vajon miért glikogén és nem glükóz formájában tárolják a hasznosítható kémiai energiát? Gondoljunk bele, ha a májsejtekben a glikogén (aminek a koncentrációja ~0,01 μM) glükózként lenne jelen (0,4 M-os koncentráció!), az a sejt számára elviselhetetlen ozmotikus körülményeket jelentene.

A **kitin** N-acetil-glükózamin monomerekből β-1→4 kötésekkel létrejövő lineáris poliszacharid, az ízeltlábúak külső vázának fő alkotóeleme (a bioszférában évente 10^9 t szintetizálódik). A cellulózhoz hasonlóan fibrillumokat alkot és az állatok nem tudják lebontani (nincs kitináz enzimük).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.6. ábra: Egy glikogén részecske szerkezete (középen a glikogenin fehérje)

A **dextrán** α1→6 glükóz egységekből felépülő poliszacharid, amelyben elsősorban α1→3, de ezenkívül α1→2 és α1→4 elágazások is előfordulnak. Egyes baktériumok és élesztők szintetizálják, a fogakon lerakódó plakkok egyik fő komponense. Biokémiai jelentősége még, hogy különböző, kémiai kereszkötésekkel térhálósított változatait gélszűréshez, makromolekulák és kisebb biomolekulák méret szerinti kromatográfiás szétválasztásához használják (pl. Sepharose néven, lásd **6.3. fejezet**).

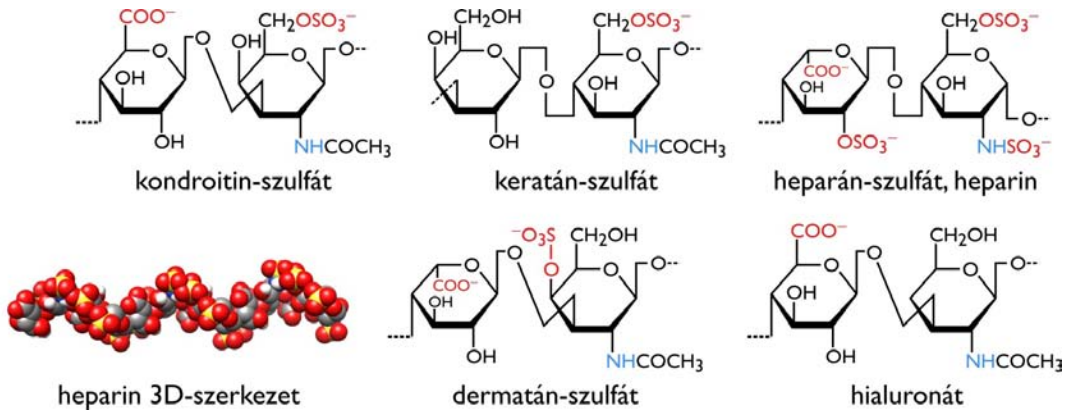
A vörösmoszatok sejtfalából származó, sokoldalú felhasználású heteropoliszacharid az **agaróz** (lásd pl. baktériumtenyészetek agar táptalaja, DNS agaróz gélelektroforézise a **19.2.1. fejezet**ben), amelyben D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktóz β1→4 kötéssel diszacharid egységeket alkot, amelyek a1→3 glikozidos kötéssel hoznak létre láncokat. Az **agar**ban, (ami kémiailag nem homogén vegyület) a cukoregységekhez több-kevesebb szulfát- és piruvát-csoport is kapcsolódik.

10.3.1. Glikózaminokligánok

A **glikózaminoglikánok** (GAG, régebbi elnevezéssel **mukopoliszacharidok**) **ismétlődő diszacharid egységek**ből felépülő lineáris heteropolimerek (lásd a hialuronsav a **10.2. táblázat**ban), a fibrilláris fehérjékkel (kollagén, elasztáz, fibronektin) együtt az extracelluláris mátrix fontos összetevői. A GAG láncok a hialuronsav (hialuronát) kivételével, amely akár 50.000 egységből is állhat, 20-90 diszacharidból épülnek fel. A diszacharid egyik komponense mindig GlcNAc vagy GalNAc, a másik pedig általában valamilyen karboxilcsoportot tartalmazó cukorszármazék (pl. GlcA). Gyakran tartalmaznak észterkötéssel kialakuló szulfátcsoportokat is, ami a karboxilokkal együtt nagy negatív töltést eredményez. A molekulán belüli taszító kölcsönhatások nyújtott térszerkezetet hoznak létre.

A töltésmintázat információt hordozhat, ami lehetővé teszi, hogy specifikusan kötődhessenek fehérjékhez. Legfontosabb képviselőit a **10.7. ábra** mutatja be, külön kiemelve a **heparin** térszerkezetét (ami egy természetes véralvadásgátló szer, a biomolekulák között a legnagyobb negatív töltéssűrűséggel bír, s a proteáz-inhibitor antitrombin aktiválásán keresztül hat).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.7. ábra: Glikózaminoglikánok szerkezete. A heparin térszerkezetét térkitöltő modellben ábrázoltuk.

A glikózaminoglikánok érdekes módon csak az állatokra és a baktériumokra jellemzőek, a növényvilágból hiányoznak. A **hialuronsav** (*hyalos*: üveg) viszkózus, átlátszó oldatot alkot, s az izületi valamint üvegtesti folyadék egyik fő komponense. A porcok és inak extracelluláris mátrixában is megtalálható, rugalmasságot biztosít ezen szöveti képletek számára. A **kondroitin-szulfát** (*chondros*: porc) nevének megfelelően a porcok, inak, kötőszöveti szalagok és az aortafal rugalmasságához járul hozzá. A **dermatán-szulfát** (*derma*: bőr) a bőrszövet rugalmasságát növeli, de szintén jelen van az érfalak, a szívbillentyűk extracelluláris mátrixában is. A **keratán-szulfát** a keratint is tartalmazó képződményekben fordul elő.

10.4. Glikokonjugátumok

A cukor és egyéb biomolekulák között kovalens kötéssel létrejövő összetett polimereket nevezzük **glikokonjugátumok**nak.

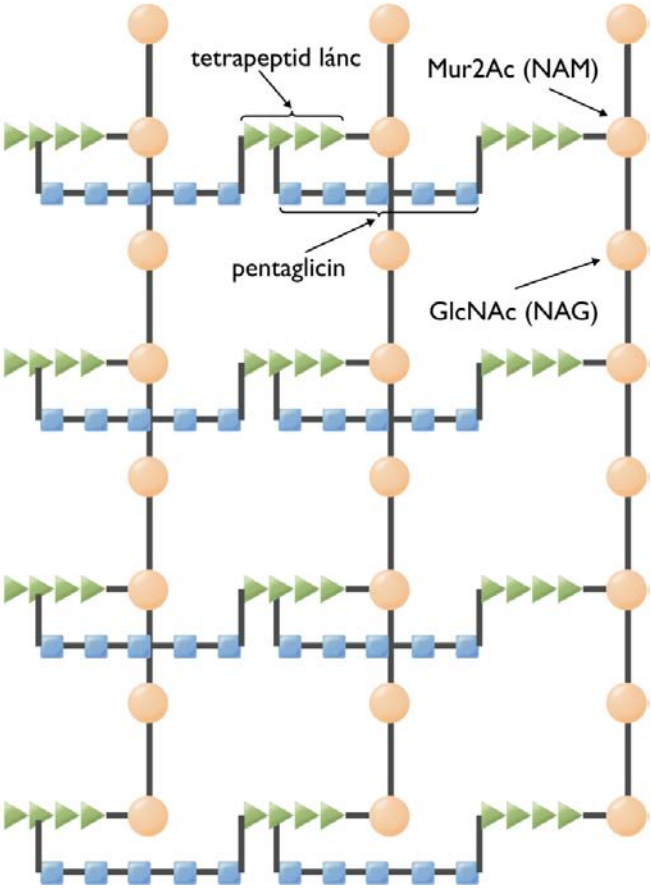
Az eubaktériumok sejtfalát felépítő egyetlen „óriásmolekulában”, a **peptidoglikánok**ban (régebbi neve murein) poliszacharid láncokat kötnek össze rövid peptidszakaszok. Az extracelluláris mátrix egyik fő komponense, a **proteoglikánok** esetében egy központi fehérjéhez (*core protein*) kapcsolódnak GAG láncok. A **glikoproteinek**nél a polipeptidlánchoz változatos felépítésű oligoszacharidok kapcsolódnak. A sejtmembrán külső oldalán találhatók (integráns membránfehérjékben csak az extracelluláris oldalon lévő polipeptidlánc részhez kapcsolódnak!), az organellumoknál viszont a sejtkompartmentum belseje felé néznek. A cukorrészek változatossága teszi lehetővé, hogy mind a proteoglikánok, mind a glikoproteinek információhordozó makromolekulák lehessenek. A **glikolipidek**kel a **11.2.2. fejezet** foglalkozik.

10.4.1. Peptidoglikánok

A **peptidoglikán** GAG láncaiban β1→4 glikozidos kötéssel összekapcsolt **N-acetil-glükózamin** (GlcNAc; vagy NAG) és **N-acetil-neuraminsav** (Mur2Ac vagy NAM) egységek váltakoznak. A Mur2Ac protomerekhez kapcsolódik egy fajspecifikus **tetrapeptid lánc** (például a *Staphylococcus aureus*-ban: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala), amelyet egy **pentaglicin kereszthíd** kapcsol egy szomszédos lánchoz, ezzel térhálósítva a sejtfalat (lásd **10.8. ábra**).

Megjegyzendő, hogy a murein szintézis utolsó lépését katalizáló **transzpeptidáz** enzimet **gátolják** a **penicillin** antibiotikum és származékai. (A transzpeptidáz a pentaglicin terminális Gly és a GAG láncra szintetizálódott tetrapeptid terminális D-Ala aminosav közötti peptidkötés létrejöttét katalizálja, létrehozva a kereszthidakat). Szintén érdemes megemlíteni, hogy a **lizozim** enzim (a nyál és a könny antibakteriális enzime) a sejtfal GAG láncát a NAG és NAM egységek közötti glikozidos kötés hidrolízisével teszi tönkre.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

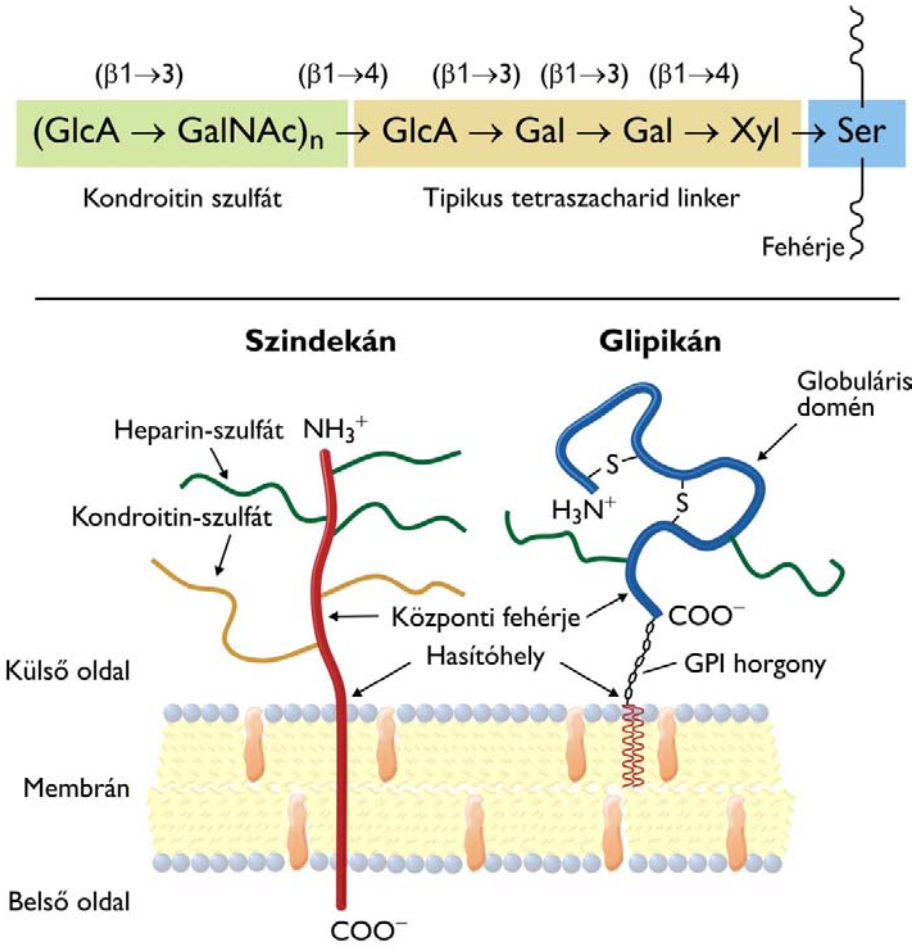


10.8. ábra: Egy peptidoglikán vázlatos szerkezete

10.4.2. Proteoglikánok

A **proteoglikánok** jelentőségét mutatja, hogy emlősökben legalább 40-féle fordul elő, melyek a központi fehérjeegységben és a hozzá kapcsolódó GAG láncokban is különböznek. A GAG láncok általában **tetraszacharid linker**en keresztül kapcsolódnak a **polipeptidlánc** egyik **Ser** oldalláncához (**O-glikozidos kötés**sel), mint azt a **10.9. ábra** szemlélteti.

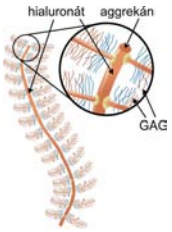
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.9. ábra: A szindekán és glipikán proteoglikánok. Az ábra felső részén a kondroitin-szulfát és a linker oligoszacharid szerkezete látható.

Az **szindekán** és a **glipikán** család *core* proteinjei membránfehérjeként szintetizálódnak, de miután az extracelluláris régiójukhoz 3-5 heparán-szulfát (vagy keratán-szulfát) kapcsolódott, az ún. ektodomén (extracelluláris domén) le is hasadhat (lásd **10.9. ábra**). Az ábra tanúsága szerint a szindekán integráns memránfehérje, mely egy transzmembrán α-hélixszel, míg a glipikán ún. membránhorgonnyal kapcsolódik a membránhoz (a membránfehérjékre visszatérünk a **17.4. fejezet**ben). A cukorláncokon keresztül mindkét proteoglikán specifikusan kötődhet sejtfelszíni receptorokhoz, ún. ko-receptorként funkcionálhat, vagy az extracelluláris mátrix (ECM) egyes fehérjéihez kötődve tölthet be fontos szabályozó, „szövetorganizáló" szerepet.

A proteoglikánok hialuronsavhoz kapcsolódva szupramolekuláris komplexeket is képezhetnek. Az **aggrekán**ban egy 250 kDa-os központi fehérjéhez számos kondroitin- és heparán-szulfát GAG lánc kapcsolódik. Ezek a „dekorált" fehérjeláncok kapcsolódnak a hosszú hialuronsav lánchoz, ~2×10^8 Da (200 MDa) molekulatömegű aggregátumokat létrehozva (lásd **10.10. ábra**). Az aggrekán aggregátumok kapcsolódnak a kollagén fibrillumokhoz és más ECM komponensekhez, s főleg a porcszövetben töltenek be kiemelt szerepet.



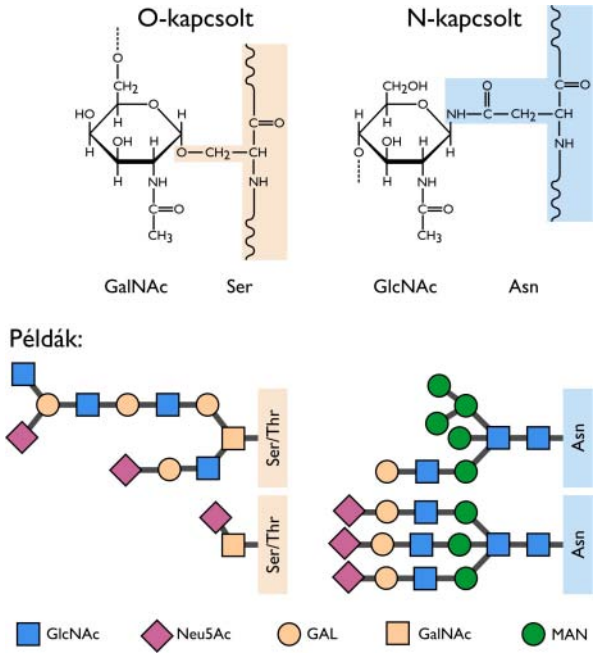
10.10. ábra: Az aggregán (egy proteoglikán) vázlatok szerkezete

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

10.4.3. Glikoproteinek

A **glikoproteinek**ben egy vagy több **oligoszacharid lánc** (az anomer C-n keresztül) kovalensen kötődik a polipeptidlánchoz. A cukorrész a fehérje tömegének 1-70%-a lehet. Az oligoszacharidok kétféle módon kapcsolódhatnak: **N-glikozidos** kötéssel **Asn** oldallánchoz (N-kapcsolt), **O-glikozidos** kötéssel pedig **Ser** vagy **Thr** hidroxilcsoporthoz (O-kapcsolt) (lásd **10.11. ábra**).

Az O-kapcsolt aminosav környéke sok Gly, Val, Pro aminosavat tartalmaz, míg az N-kapcsolt régió konszenzus szekvenciája: Asn-{Pro}-(Ser, Thr) (a kapcsos zárójel azt jelenti, hogy bármilyen aminosav lehet az adott a pozícióban, ebben az esetben Pro kivételével). Az előző két összetett szénhidrát csoporthoz képest a glikoproteinekben a cukorrészek ugyan kisebb mennyiségben vannak jelen, de ezek **sokszor elágazóak** és többféle monoszacharidot tartalmaznak (lásd „cukorkód”, **10.5. fejezet**).



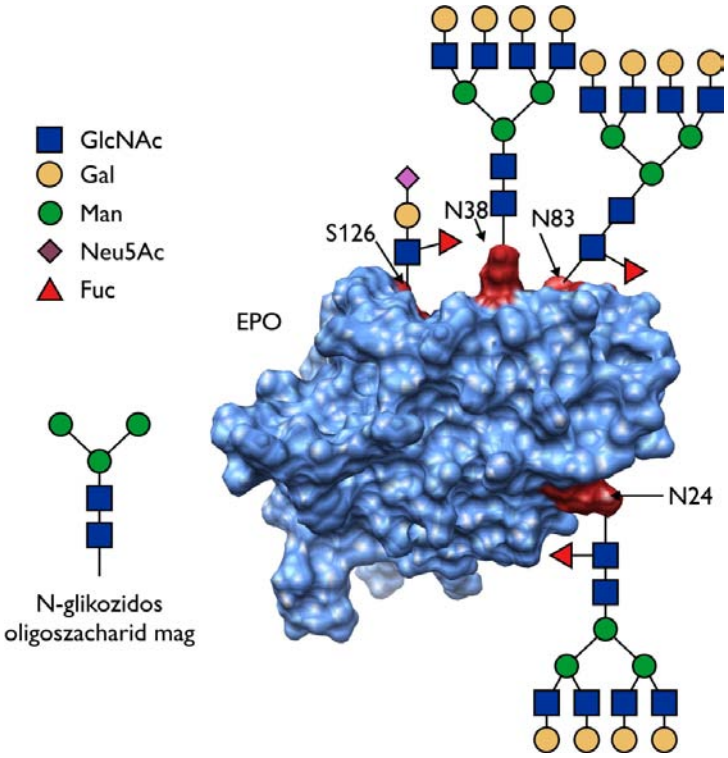
10.11. ábra: Glikoproteinek cukorrészének két kapcsolódási módja.

Az emlős fehérjék körülbelül fele glikoprotein! A humán genom 1%-a a glikoproteinek cukorrészeinek a kialakításában szerepet játszó enzimet kódol. A legnagyobb mennyiségben jelen levő glikoproteinek az állatokban a **mucinok**. Nagy mennyiségben (a teljes tömeg 70%-a) tartalmaznak elsősorban O-glikozidos kötésekkel kapcsolódó GalNAc egységeket. Az epiteliális sejtek sejtmembránjában helyezkednek el vagy szekretálódnak (a legtöbb szekrétumban jelen vannak). Erősen hidratálódnak, a szekrétumokat „nyúlóssá” teszik. Több betegégben megemelkedik az expressziós szintjük (cisztás fibrózis, egyes ráktípusok).

Példaként az **eritropoetin (EPO**; egy fehérjehormon) szerkezetét mutatjuk be, kiemelve az oligoszacharid csoportokat (az utóbbinál a biokémiában használt rövidítéssel megnevezve őket; lásd **10.12. ábra**).

Az EPO három N-glikozidos és egy O-glikozidos glikán-csoportot tartalmaz. Megjegyzendő, hogy az N-glikozidos módosítások általában „magként” (*core*) tartalmazzák a **10.12. ábra** feltüntetett öttagú oligoszacharid-csoportot. A vesesejtekben szintetizálódó EPO a vörösvérsejtek kialakulását serkenti a csontvelőben, azáltal, hogy az éretlen vörösvérsejtek membránjában lokalizált EPO-receptorhoz kötődik és fokozza a sejtosztódást és a differenciálódást. Az anémiát csökkentő szerep miatt a rekombináns EPO-t gyógyszerként is használják. „Hírhedtebb” szerepe, hogy sok sportoló is élt már vele, hiszen az extra oxigénnel a kitartást igénylő sportágakban lehet fokozni a teljesítményt (lásd a például a kerékpársport elhíresült eseteit). Az EPO, mint doppingszer kimutatása a rekombináns és a természetes fehérje közötti kismértékű glikozilációs mintázatbeli különbségen alapul (izoelektromos fókuszálással történik a kimutatás).

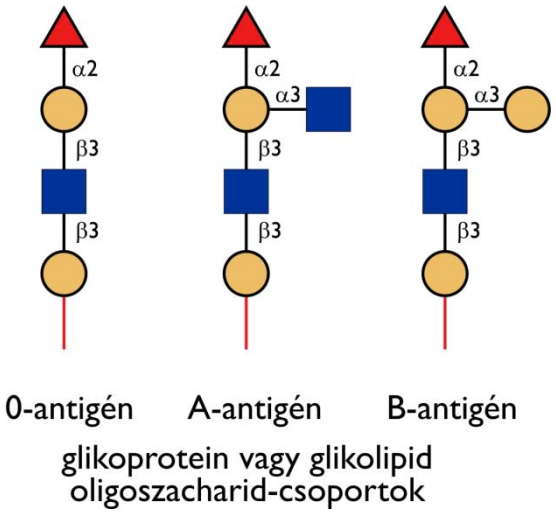
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.12. ábra: Az eritropoetin térszerkezete. Az oligoszacharid egységeket ikonokkal ábrázoltuk (PDB: 1BUY)

Röviden megemlítjük, hogy az **ABO vércsoportok** megkülönböztetése a vörösvértestek membránjában elhelyezkedő **glikoprotein** (és **glikolipid**) **glikáncsoportj**án alapszik (lásd **10.13. ábra**).

Az A- és B-antigén egy extra monoszacharid-csoportot tartalmaz, ami vagy GalNAc (A) vagy Gal (B). A genetikai hátteret egy **glikoziltranszferáz enzim allélje**i adják: a 0 vércsoport esetén egy időelőtti stop kodon miatt nem keletkezik aktív enzim. Az A- és B-izoenzim 4 aminosavban különbözik 354-ből, aminek eltérő szubsztrátspecifitás lesz a következménye.



10.13. ábra: Az AB0 vércsoport antigének

10.5. A „cukorkód” és jelentősége

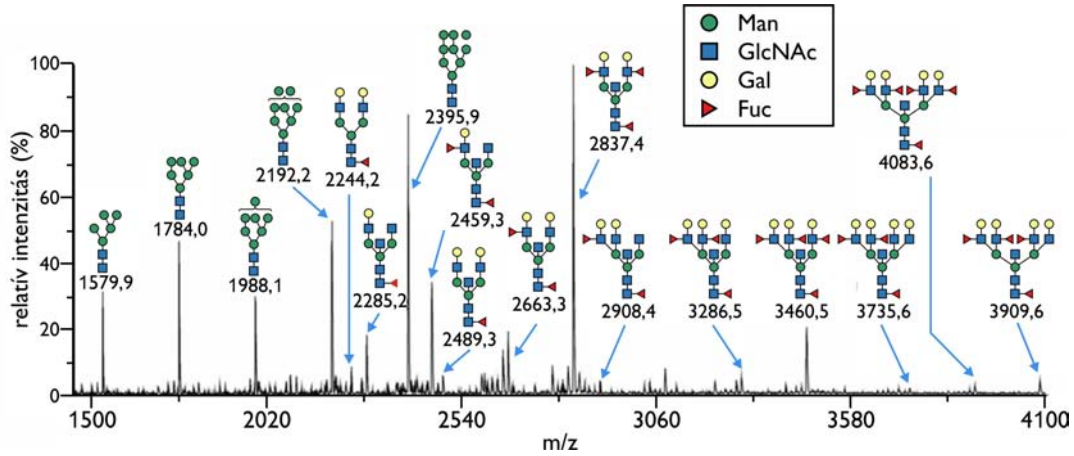
A cukrok biológiai szerepével foglalkozó glikobiológia (a biokémia egy ága) a reneszánszát éli, köszönhetően annak a felismerésnek, hogy a glikokonjugátumok monoszacharid egységei változatosságuk folytán biológiai

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

információt hordozhatnak – ezt nevezik manapság „**cukorkód**nak”. Az információtartalom méretére egy példa: 20 féle monoszacharidból $6{,}4 \times 10^7$ hexamert (ez a glikoproteinek oligoszacharid-csoportjainak átlagos monomer száma) lehet alkotni.

Az oligoszacharid-csoportoknak szerepük lehet a fehérjék intracelluláris célbajuttatásában (*targeting*), a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában, a sejt- és szöveti differenciálódásban és általában az extracelluláris jeltovábbító rendszerekben.

A **cukorkód** megfejtését az tette lehetővé, hogy az oligoszacharid-csoportokat „szekvenálni” lehet, azaz a glikoproteineken (glikolipideken) a cukoregységek sorrendjét, elágazásait meg lehet határozni. A **szekvenálás** alapja, hogy az olioszacharidokat speciális N- és O-glikozid specifikus **glikoziláz enzimek**kel le lehet hasítani a glikokonjugátumokról. A hidrolizátum komponensei szeparálás után **tömegspektrometriával** azonosíthatók. Az **10.14. ábra** egy tömegspektrogramot mutat be (a 7 és 19 monomer közötti méretű oligoszacharidok tömegét és összetételét is feltüntettük). Egy organizmus teljes cukorkészletével, beleértve az glikroproteinek glikán-csoportjait is, a rendszerbiológia része, a **glikomika** foglalkozik.



10.14. ábra: Oligoszacharidok analízise tömegspektrometriával

A cukorkód szerepét a specifikus szénhidrátkötő fehérjéken, a lektineken keresztül mutatjuk be.

10.5.1. Specifikus szénhidrátkötő fehérjék: lektinek

Fontos tudatosítanunk, hogy a **lektinek** nem glikoproteinek, hanem a glikoproteineken a **szénhidrát-kódot felismerő fehérjék** (nevüket a latin *legere*, kiválasztani szóból kapták). Legfontosabb szerepük a sejt-sejt, valamint a sejt és az ECM közötti felismerés közvetítése, azon kívül jeltovábbítás különböző szabályozási útvonalakon. A fehérjékről „lelógó” **oligoszacharid-csoport**oknak határozott **térszerkeze**te van, amit a lektinek kötőhelye „leolvas”, azaz specifikusan felismer. A felismerésben a már sokszor ismertetett másodlagos kötőerők játszanak szerepet. Egy-egy ilyen kölcsönhatás gyenge, de a lektinen egyrészt több glikán-kötőhely lehet, másrészt több lektin egyszerre közvetít például egy sejt-sejt kölcsönhatást, s érvényesül a „sok kicsi sokra megy” elv, a számos gyenge interakció szinergikus módon erős kötést eredményez. Néhány lektint a **10.3. táblázat** sorol fel.

10.3. táblázat: Lektin fehérjék

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

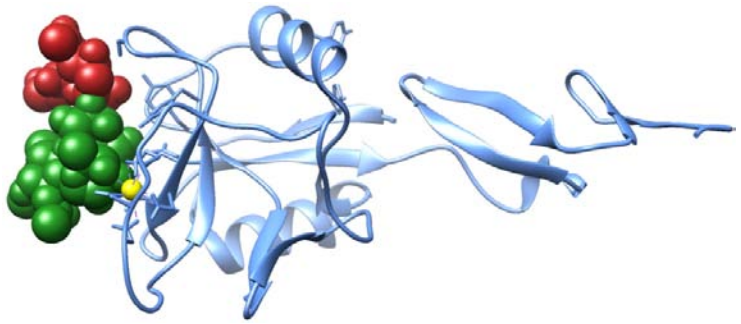
Lektin fehérje	Forrás	Szénhidrát ligandum
konkanavalin-A	növény	Man, Glc
ricin	ricinus	Gal(β1→4)Glc (LD_{50} ≈ 1,7 mg/felnőtt)
mannóz-6-foszfát receptor	Golgi-membrán	Man-6-P
szelektinek (Ca^{2+}-kötő)	állatok	Terminális Neu5Ac (Lewis X antigén)
hemagglutinin	influenza vírus	Neu5Ac(α2→6)Gal(β1→4)Glc
enterotoxin (hőérzékeny, LT)	*E. coli*	Gal
kolera-toxin	*Vibrio cholerae*	GM1 gangliozid (pentaszachaid)

Sok lektin homotetramer, mint például a növényi eredetű **konkanavalin-A**. A **növényi lektin**ek szerepe nem teljesen tisztázott (talán a rovarok elriasztása a magok elfogyasztásától), de glikoprotein-specifitásukat ki lehet használni glikánok és glikokonjugátumok izolálására affinitás-kromatográfiával.

A **ricin** magjában előforduló ricin az egyik legerősebb fehérjeméreg. A fél-letális dózisa (LD_{50}) 1,7 mg/felnőtt. (A ricin két, diszulfidhíddal összekötött láncból áll. A B-lánc egy lektin, ami elősegíti a fehérje sejtekbe jutását. Az A-lánc egy rendkívül specifikus N-glikozidáz, amely egyetlen adenint lehasítva az eukarióta riboszóma 28S RNS komponenséről inaktiválja a riboszómát. Az utóbbi tulajdonsága magyarázza, hogy a RIP, azaz riboszóma inaktviáló protin toxinok családjába tartozik)

A **szelektinek Ca^{2+}-kötő sejtadhéziós molekulák** (CAM: *cell adhesion molecule*). Szerepükre szép példa a vérlemezek (*platelet*) és endotél sejtek felszínén található P-szelektinek (*platelet*-típus) és L-szelektinek (leukocita-típus), melyek kettős kapcsolatot létesítenek a véredények endotélsejtjei és az érfal mentén „gördülő" neutrofil limfociták sejtfelszíni glikoproteinjeivel. Ez a kölcsönhatás, kiegészülve az integrin transzmembrán fehérjék sejt-sejt kölcsönhatásaival, gyulladás szignál hatására alakul ki, leállítja a keringő fehérvérsejtet, amely aktív mozgással kipréselődik az endotélsejtek között (extravazáció), hogy a fertőzés helyén gyulladást okozzon.

A szelektinek terminális sziálsavat tartalmazó glikoproteinekhez kötődnek. A sziálsav az ún. **szialil-Lewis-X tetraszacharid antigén** (Neu5Ac(α2→3)Gal(β1→4)Fuc(α1→3)GlcNAc) része. Ez az antigén az áttétre hajlamos tumorsejtek felszínén is megjelenik, ezért a szelektin-sziálsav kölcsönhatás (lásd **10.15. ábra**) gátlása ígéretes gyógyszercélpont.

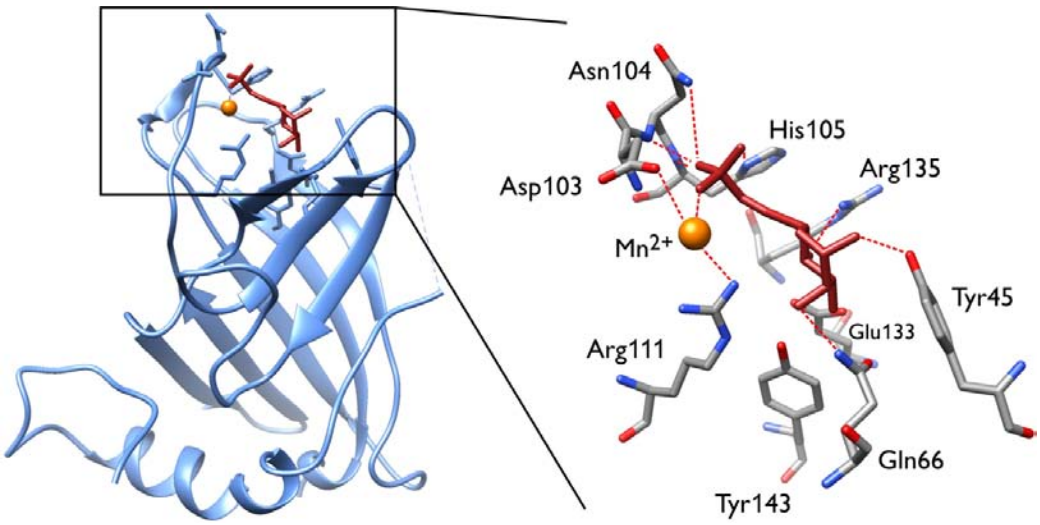


10.15. ábra: Egy szelektin és a szialil-Lewis-X antigén komplexének térszerkezete. A fehérjét szalaggal, a ligandumot golyókkal ábrázoltuk. A sziálsav piros, a többi cukoregység zöld, a ligandumkötésben résztvevő Ca^{2+} sárga (PDB: 1G1R).

A fenti folyamat molekuláris részleteit (beleértve a sejten belüli molekuláris történéseket, a génaktivációt, a transzlációt, a citokinek kijutását a sejtből, a citoszkeleton átalakulását, a sejtfelszíni CAM fehérjék kapcsolódását) mutatja be a függelékben megtekinthető „Inner Life of a Cell" című **1. animáció.**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A mannóz-6-foszfát egy fehérje lokalizációs szignál, a hordozója végső soron a lizoszómába fog kerülni. A **mannóz-6-foszfát-receptor** a fehérjék célbajuttatásában (*protein targeting*) fontos szerepet betöltő organellum, a Golgi-komplex membránjában lokalizálódik. A receptor extracitoplazmatikus doménje (amely a Golgi-komplex belseje felé néz) és a cukorcsoport közötti kölcsönhatást a **10.16. ábra** szemlélteti. A Man-6-foszfát megkötésében egy mangánionnak is szerepe van. Az ábrán feltüntettük a cukorcsoport és a receptor ligandum-kötő oldalláncai között kialakuló H-hidakat. A lizoszómában a ligandum disszociál a receptorról, mivel, a savanyú pH-n az egyik hisztidin (His105) imidazol oldallánca protonálódik, ezáltal megszűnik egy H-híd kölcsönhatás, ami az affinitás csökkenésével jár.

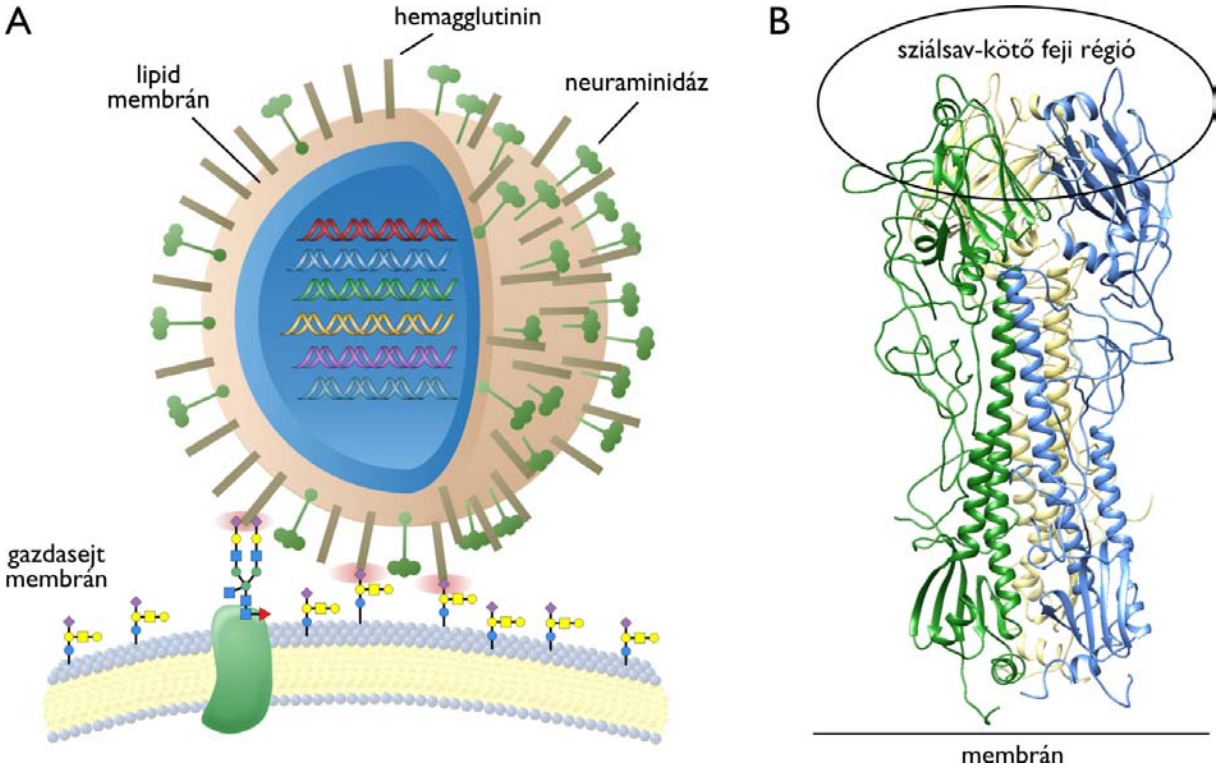


10.16. ábra: A mannóz-6-foszfát receptor és a Man-6-foszfát ligandum térszerkezete. A jobb oldalon kölcsönhatási felszín részletei láthatók (PDB: 1M6P)

Az influenzavírus a gazdasejtekhez a virális **hemagglutinin** (HA) lektinen keresztül kötődik. A homotrimer HA a membránban található glikoproteinek terminális Neu5Ac(α2→6)Gal(β1→4)Glc oligoszacharid-csoportját (elsősorban a terminális sziálsavat) ismeri fel (lásd **10.17. ábra**).

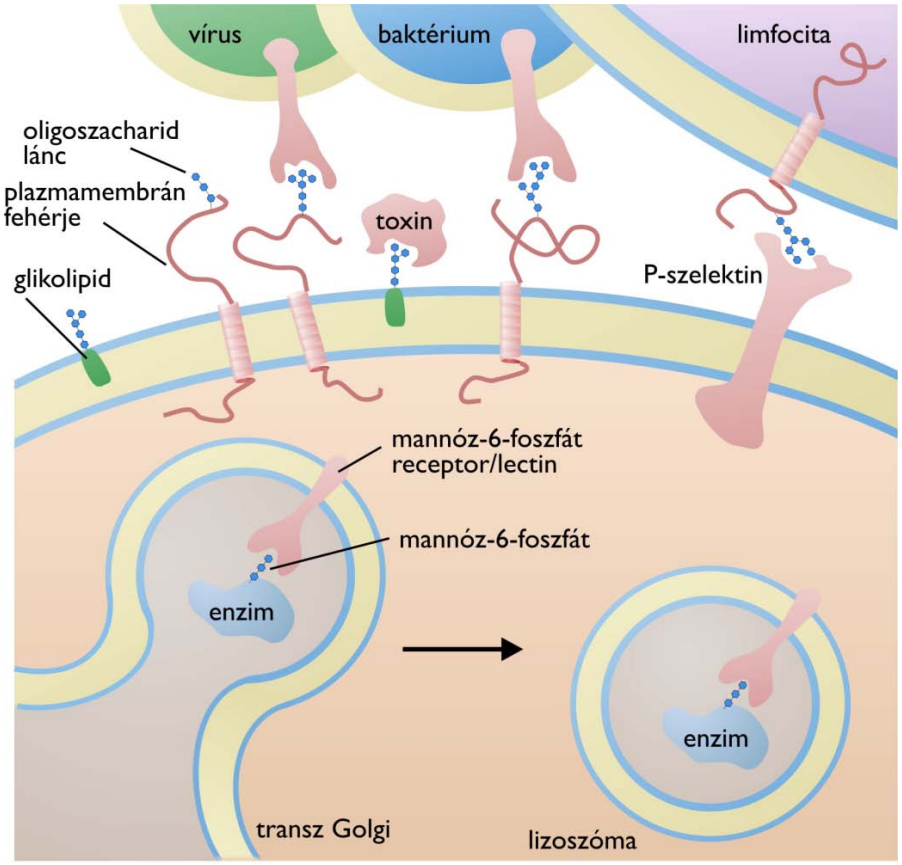
A vírusrészecske az RNS genom szaporodása után sejtmembránnal körülvéve kerül ki a sejtből, s hogy újabb sejteket fertőzhessen, meg kell szabadulnia membránkapcsolattól. Erre szolgál egy másik virális fehérje, a **neuraminidáz** (NA), amely a sziálsavat egy glikozidos kötéssel lehasítja a membrán glikoproteinekről, ezáltal a vírusrészecske felszabadul. A **neuraminidáz inhibitor**ait (például Tamiflu) az influenza elleni gyógyszerként használják. Megemlítjük, hogy a HA szénhidrát-specifitásának a vírus fajspecifitásában is szerepe van: a H5N1 szerotípus (a rövidítés a vírus szerotípusokban antitestekkel megkülönböztethető HA és NA izoformákra utal) madarakat fertőz, mert a HA más szénhidrátokat ismer fel.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



10.17. ábra: Influenza vírus és a gazdasejt kapcsolata (A) **és hemagglutinin fehérje szerkezete** (B) (PDB: 1HGD)

A cukorkód sokoldalú szerepét a lektinek működésében a **10.18. ábra** foglalja össze.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

10.18. ábra: A lektinek és glikoproteinek szerepe sejt-sejt kapcsolatok és a sejtadhézió kialakításában

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

11. fejezet - Lipidek és biomembránok

(szerző: Nyitray László)

A lipidek képviselik a biomolekulák kémiailag legváltozatosabb csoportját. Közös jellemzőjük, hogy mindegyikük teljesen vagy döntően **hidrofób/lipofil vegyület**. Egy fontos alcsoportjuk van, amely egy molekulán belül hidrofób és hidrofil tulajdonsággal is rendelkezik, vagyis **amfipatikus** (vagy **amfifil;** az *amphis* görögül mindkettő). Ezek a típusú molekulák kiemelten fontosak a biokémikus számára, hiszen a közéjük tartozó **foszfolipidek** a biomembránok fő alkotóelemei. A lipidek nem polimerek, nem makromolekulák, de több típusuk összetett molekula, melyek építőkövei, a biopolimerek kialakulásánál általános kondenzációs reakcióval kapcsolódnak össze. Biológiai szerepük a tartalék tápanyagoktól, a biomembránok felépítésén át enzim kofaktorokig, vitaminokig és jelátvivő molekulákig terjed, tehát igen sokrétű. Típusaikat a **11.1. táblázat** mutatja be, egy-két példát is megemlítve.

11.1. táblázat: A lipidek típusai

Típus	Példák
zsírsav	palmitinsav, sztearinsav, olajsav, arachidonsav...
neutrális zsírok	homo- és hetero-trigliceridek
glicerofoszfolipidek	foszfatidil-kolin, -szerin, -etanolamin, -inozitol
szingolipidek	szfingomielin, gangliozidok
glikolipidek	gangliozidok, lipopoliszacharid komponensek
szteroidok (szterol lipidek)	koleszterin, progeszteron, epesavak
izoprén (terpén) származékok	A-, E-, K-vitamin, ubiquinon (CoQ), farnezol, geraniol
eiokozanoidok (C20)	prosztaglandinok, tromboxán, leukotrién
poliketidek	rezveratrol, tetraciklin, aflatoxin

11.1. Zsírsavak és neutrális zsírok

Az energiaraktározó biomolekulák közé tartoznak a zsírsavak és a neutrális zsírok. Az utóbbiakban egy glicerinhez három zsírsav molekula kapcsolódik észterkötéssel.

A **zsírsavak** 4-34 szénatomból álló alifás, nem elágazó, telített vagy telítetlen karbonsavak (a kettős kötés általában cisz-pozícióban van). A fontosabb zsírsavakat a **11.2. táblázat** foglalja össze. A szokásos nevezéktan szerint a karboxilcsoport szénatomja az 1-es, a láncvégző szénatom a legnagyobb számot kapja, a telítetlen kötések jele Δ (delta) és felsőindexben van a telítetlen kötés előtti szénatom száma. Például az olajsav szisztematikus elnevezése: cisz-Δ^9-oktadekanoát vagy számokkal leírva 18:1(Δ^9). Ettől a nevezéktantól eltérően a **többszörösen telítetlen zsírsavaknál** (PUFA: *polyunsaturated fatty acids*) a számozás megfordul, a láncvégi metilcsoportnál kezdődik, amit görög abc utolsó betűjével, ω-val jelölnek.

Fizikai tulajdonságaik– s ez elsősorban a membránalkotó zsírsavak esetében fontos, – erősen függnek a lánchossztól és a telítettség (szaturáció) mértékétől. A 18 szénatomszámú telített sztearinsav olvadáspontja 69,6ºC, az ugyanolyan szénszámú, de egyszeresen telítetlen olajsavé viszont 13,4ºC. A telítetlenség és a rövidebb lánchossz növeli a zsírsavak oldékonyságát és a membránok fluiditását.

Érdekességként kiemeljük a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) jelentőségét az emberi táplálkozásban. Az ún. omega-3 (az ω-pozíciótól számított első kettőskötés a láncvégi metiltől számított 3. szénatom után van) és az omega-6 PUFA esszenciális zsírsavak, mivel a humán genomból hiányoznak a szintézisükhöz szükséges egyes fehérjék génjei, ezért ezeket a zsírsavakat készen, a táplálékkal kell felvennünk. Az omega-3 PUFA linolénsavból (ALA, 18:3($\Delta^{9,12,15}$) (lásd **11.2. táblázat**) szintetizálódik két másik omega-3 PUFA, az eiokozapenténsav (EPA; szisztematikus rövidítéssel: 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$)) és a dokozahexaénsav (DHA; 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)). A6-PUFA-k közé tartozik a linolsav (18:2($\Delta^{9,12}$)) és az arachidonsav (20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Számos vizsgálat azt mutatja, hogy az omega-6 és az omega-3 PUFA-k aránya az elfogyasztott ételekben kihat az egészségi állapotra. Minél jobban eltolódik ez az arány az omega-6 zsírok felé, annál magasabb a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának veszélye. Az optimális arány 1:1 és 4:1 között van, viszont az tradicionális európai és amerikai étkezésnél ez az arány 10:1 és 30:1 között van. A „mediterrán konyha" ételei (olivaolaj, halolaj) viszont több EPA-t és DHA-t tartalmaznak, ami kedvező élettani hatású.

11.2. táblázat: Néhány fontosabb zsírsav

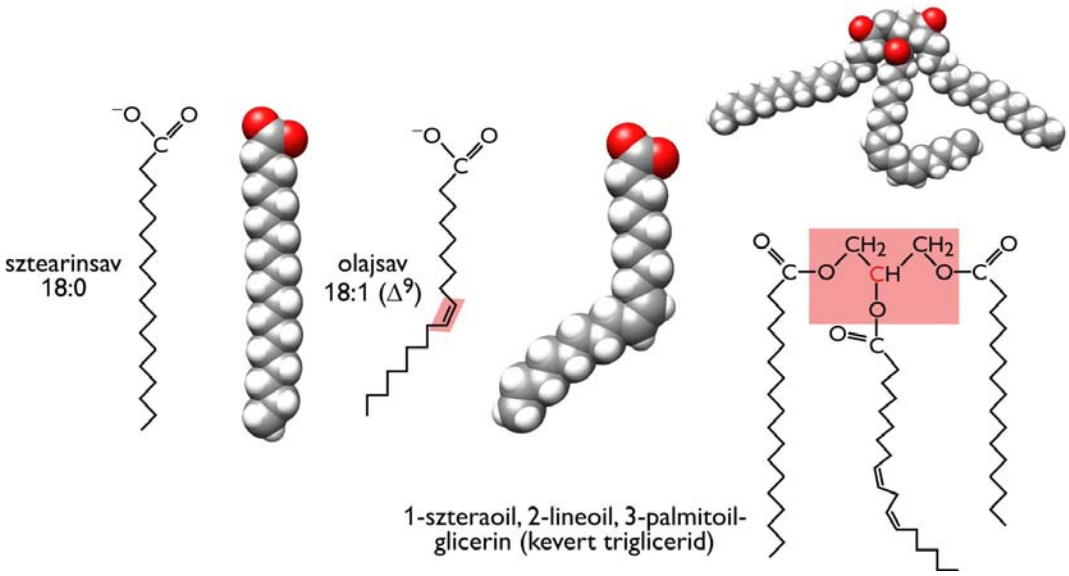
Szénatomok száma	Kettős kötések száma	Közönséges név	Szisztematikus név	Képlet
12	0	Laurinsav	n-dodekánsav (12:0)	$CH_3(CH_2)_{10}COO^-$
14	0	Mirisztinsav	n-tetradekánsav (14:0)	$CH_3(CH_2)_{12}COO^-$
16	0	Palmitinsav	*n*-hexadekánsav (16:0)	$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$
18	0	Sztearinsav	*n*-octadekánsav (18:0)	$CH_3(CH_2)_{16}COO^-$
20	0	Arachinsav	*n*-eikozánsav (20:0)	$CH_3(CH_2)_{18}COO^-$
22	0	Behénsav	*n*-dokozánsava (22:0)	$CH_3(CH_2)_{20}COO^-$
24	0	Lignocerinsav	*n*-tetrakozánsav (24:0)	$CH_3(CH_2)_{22}COO^-$
16	1	Palmitoinsav	*cisz*-9-hexadecénsav (16:1(Δ^9)))	$CH_3(CH_2)_5CH{=}(CH_2)_7COO^-$
18	1	Olajsav	*cisz*-9-octadecénsav (18:1(Δ^9))	$CH_3(CH_2)_7CH{=}(CH_2)_7COO^-$
18	2	Linolsav	*cisz*,*cisz*-9,12-oktadecéndiénsav (18:2($\Delta^{9,12}$))	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COO^-$
18	3	Linolénsav	*all-cisz*-9,12,15-oktadekatriénsav (18:3($\Delta^{9,12,15}$))	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COO^-$
20	4	Arachidonsav	*all-cisz*-5,8,11,14-eikozatetraénsav (20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)))	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$

A **trigliceridek** (**neutrális zsírok**) a glicerin mindhárom alkoholos hidroxilján észteresített származékai, az állatok és sok növény (olajos magvak) legnagyobb mennyiségben rendelkezésre álló energiaraktározó vegyületei. A legtöbb triglicerid **kevert**, azaz **háromféle zsírsav**at tartalmaz (lásd **11.1. ábra**).

Mi a zsírok (és olajok) előnye a poliszacharid energiaraktározó vegyületekkel szemben? Egyrészt, mivel redukáltabbak, több energiát lehet kinyerni belőlük a sejtlégzés során (a zsír energiatartalma: 37 kJ/g, a szénhidráté: 17 kJ/g). Másrészt hidrofóbok révén nincs hidrátburkuk, következésképpen a tárolásuk kevesebb vizet igényel (1 g glikogén 2 g vizet vesz fel). Ezért az emlősök sokkal többet tudnak tárolni zsírból, mint szénhidrátból (egy nem túlsúlyos ember 15-20 kg zsírt hordoz, amely több hónapra elegendő energiát tárol, míg a máj és izom szénhidrátraktáraiban csak egy napra elegendő tartalék van).

Említsünk meg a trigliceridek kapcsán is egy fontos táplálkozásbiológiai tényt. A **zsírokat és olajokat** egyes esetekben az avasodás megakadályozása, más esetekben az olvadási pont emelése érdekében (a margarin ezért szilárd, holott növényi olajokat tartalmaz) **részlegesen hidrogénezik**, mielőtt kikerülnek az üzletek polcaira. Néhány telítetlen kötés redukálása mellett a kellemetlen mellékreakció, a cisz-kettőskötések **transz-telítetlen kötés**sé alakulása, ugyanis ezek a módosított zsírok szintén kardiovaszkuláris betegségek kialakulásához vezethetnek. Negatív hatásukat többek között azzal fejtik ki, hogy növelik a vérben a „rossz" koleszterinszállító lipoprotein, az LDL (*low density lipoprotein*) mennyiségét a „jó" koleszterinszállító HDL (*high density lipoprotein*) rovására. A „*fast food*" elkészítéséhez használt hidrogénezett olajok is a fenti oknál fogva szerepelnek a kerülendő élelmiszerek listáján.

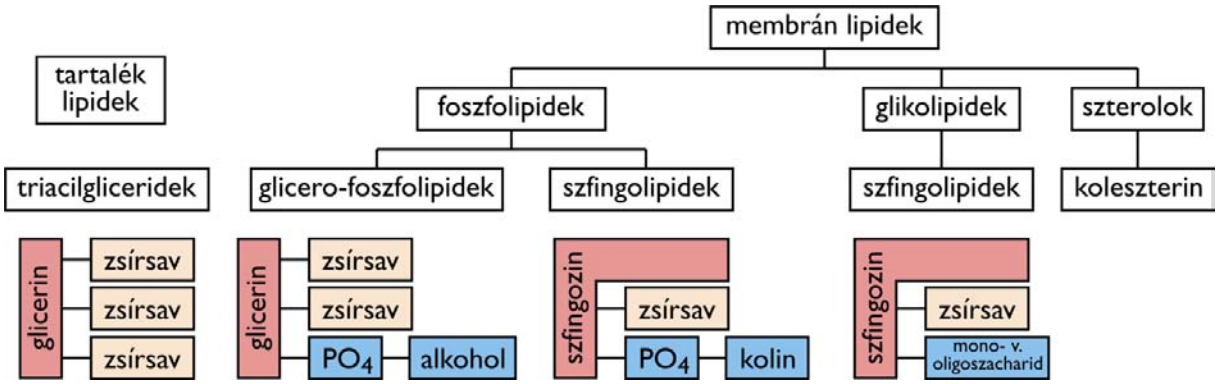
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.1. ábra: Zsírsavak és egy kevert triglicerid szerkezeti képlete és térszerkezete

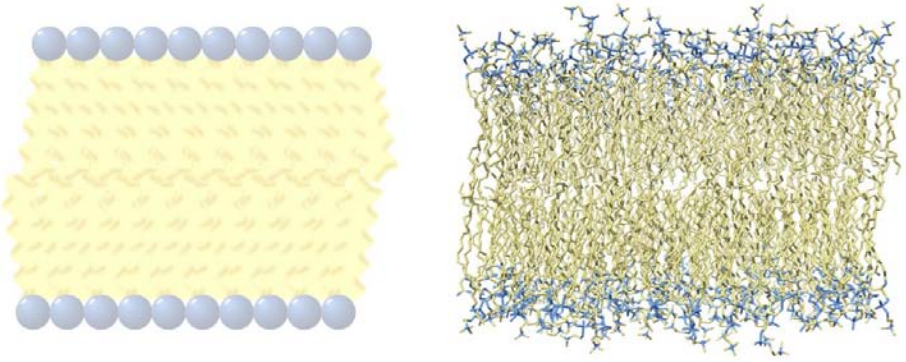
11.2. Membránalkotó lipidek

A membránalkotó szerkezeti lipidek típusait és összetételét (a trigliceriddel összevetve) a **11.2. ábra** mutatja.



11.2. ábra: A trigliceridek, foszfolipidek és glikolipidek vázlatos szerkezete

Ahogy már említettük, a **foszfolipid**ek és **glikolipidekamfipatikus molekulák** – egy **polárosfejirész**hez kapcsolódik a **zsírsavakés a szfingozinapoláros lánc**a. Ezek a Janus-arcú molekulák, mint arról már korábban is írtunk (lásd **2.5.3. fejezet**), kiválóan alkalmasak **membrán kettősrétegek** létrehozására. Egy ilyen kettősréteg vázlatos rajzát és egy membránrészlet térszerkezeti modelljét mutatja be a **11.3. ábra.**



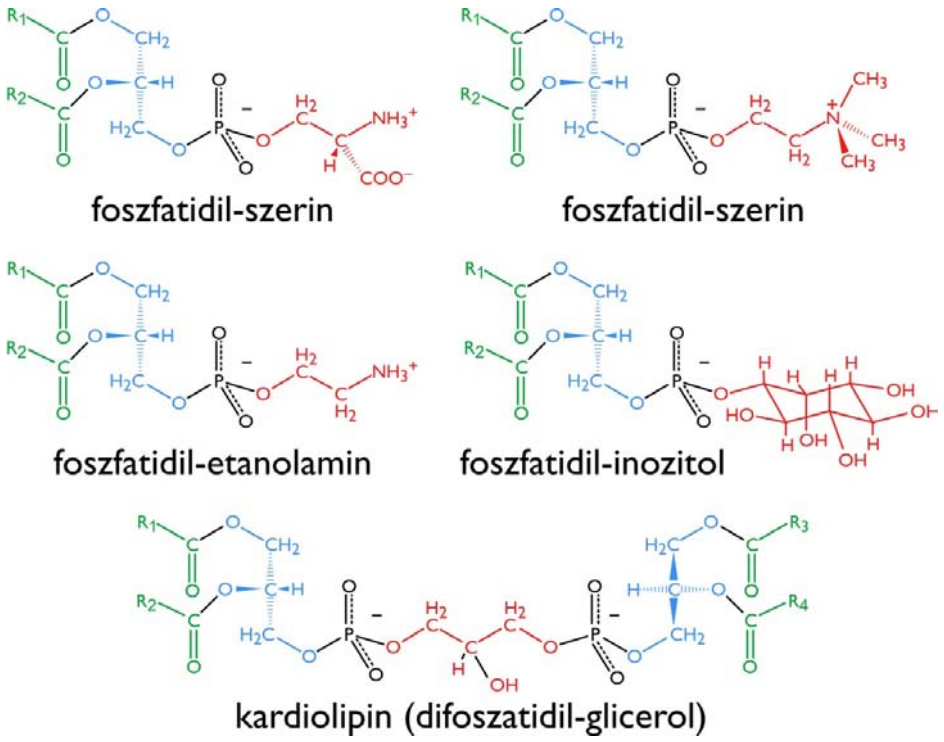
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

11.3. ábra: Membrán kettősréteg sémája és térszerkezeti modellje

11.2.1. Glicerofoszfolipidek és szfingolipidek

A **foszfolip**idek kétféle **váz**on alakulnak ki, a **glicerin**en (glicerofoszfolipidek) és a szerkezetileg hasonló **szfingozin**on (szfingo-foszfolipidek).

A membránokban legnagyobb mennyiségben előforduló **glicerofoszfolipidek**ben (más néven **foszfoglicerátok**) a glicerint a C1-es és C2-es szénatomon többféle zsírsav, a C3-as szénatomon pedig egy foszfát észteresíti. Ez a **foszfatidsav**, amely minor membránkomponens, mivel a foszfátcsoporthoz többnyire egy további molekula kapcsolódhat észterkötéssel, kialakítva a teljes fejcsoportot. A leggyakoribb membránalkotó foszfoglicerátok a **foszfatidil-szerin**, **foszfatidil-kolin**, **foszfatidil-etanolamin** és a **foszfatidil-inozitol**. A **kardiolipin**ben két foszfatidsavat egy glicerin köt össze (lásd **11.4. ábra**). Ez a foszfolipid a mitokondrium belső membrán lipidjeinek közel 20%-át teszi ki (lásd **11.15. ábra**).



11.4. ábra: Glicerofoszfolipidek szerkezeti képlete

A **foszfatidil-kolin** a membránlipidek között a legnagyobb százalékban fordul elő, könnyen izolálható tojássárgájából. A foszfatidil-kolint **lecitin**nek is hívják, de az valójában több foszfolipid keveréke.

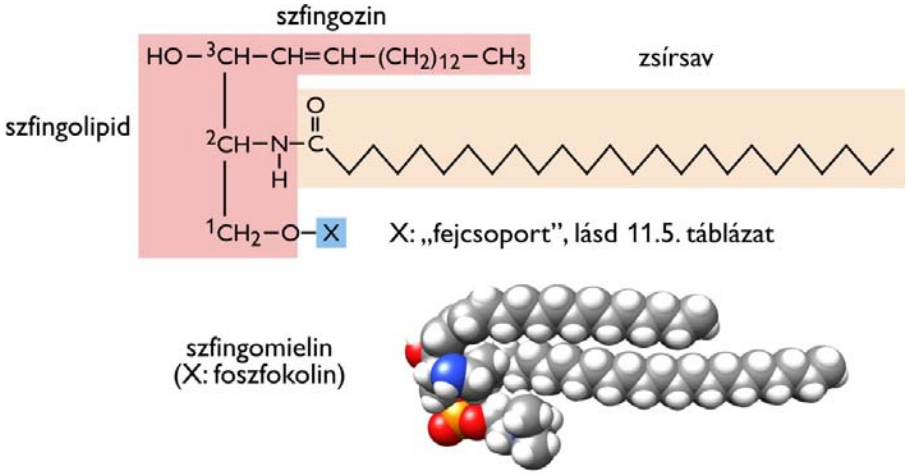
A 18 szénatomos aminoalkohol **szfingozin** C2-es atomjának aminocsoportjához egy zsírsavacil-csoport kapcsolódik, míg a C1-es szénen levő hidroxilhoz különböző funkciós csoportok kapcsolódhatnak, többek között cukoregységek is (az már egy glikolipid lesz). A különböző **szfingolipidek** nevét és összetevőit a **11.3. táblázat** foglalja össze, míg a vázszerkezetet és a szfingomielin térszerkezetét **11.5. ábra** mutatja be

11.3. táblázat: Szfingolipid típusok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Szfingolipid	„Fejcsoport” (X)
ceramid	hidroxil (X: –H)
szingomielin	foszfokolin vagy foszfoetanolamin
cerebrozid	glükóz vagy galaktóz
GM2 gangliozid	oligoszacharid (terminális sziálsav)

A **ceramid** szabadon ritkán fordul elő, a többi szfingolipid szintézisének köztes terméke. A **szfingomielin**nek, a foszfatidil-kolinhoz hasonlóan (amihez a térszerkezete nagyon hasonlít) a fejcsoportban pozitív töltése is lehet, a foszfátcsoport negatív töltésén kívül. Nagy mennyiségben van jelen a mielinhüvellyel rendelkező idegsejtek membránjában (innen ered a nevük is).



11.5. ábra: A szfingolipidek vázszerkezete és a szfingomielin térszerkezete

11.2.2. Glikolipidek

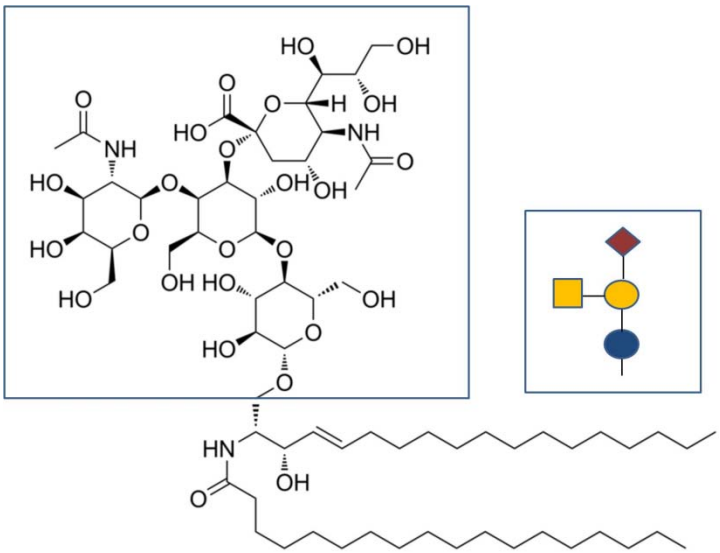
A **glikoszfingolipidek** fejcsoportján a cukoregységek mindig a membrán külső oldala felé néznek, hasonlóan a glikoproteinek cukorcsoportjaihoz (lásd **10.4.3. fejezet**).

A **cerebrozidok**ban a cukoregység az idegsejtek membránjában galaktóz, a többi sejttípusnál glükóz. Nevezik őket neutrális glikolipideknek is, mivel a foszfátcsoport hiánya miatt a fejcsoporton nincs töltés. A **gangliozidok** a legkomplexebb szfingolipidek, mivel oligoszacharid-csoportot tartalmaznak. A cukrok között mindig van terminális sziálsav (a GM típusokban egy). A GM2 gangliozidban például a szfingozinhoz egy tetraszacharid kapcsolódik, s az így létrejövő szfingolipid szisztematikus neve: β-D-GalNAc-(1→4)-[α-Neu5Ac-(2→3)]-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-(1↔1)-*N*-oktadekanoilszfingozin (lásd **11.6. ábra**).

A glikoszfingolipidek ugyanazokat a **vércsoport antigéneke**t hordozhatják (pl. AB0), mint a glikoproteinek (lásd **10.4.3. fejezet**).

A glikoszfingolipidek a membrán külső rétegében dúsulnak fel, s nem csak szerkezeti szerepük van, hanem részt vehetnek jeltovábbítási rendszerekben is. A gangliozidok összetétele jelentős változáson megy keresztül az egyedfejlődés során, s érdekes módon a **rákos sejtek** felszínén is, akár diagnosztikus jelentőséggel bíró **specifikus gangliozid mintázat** jelenhet meg. Lebomlásuk hiánya genetikai betegséghez vezethet – példa erre az askenázi zsidóság körében gyakori recesszív öröklődésű **Tay-Sachs betegség**, amit a gangliozid cukorcsoportjait lehasító egyik enzim, a hexózaminidáz-A hiánya vált ki. Az idegsejtekben felhalmozódik a **GM2 gangliozid**, ami végső soron mentális leépüléshez és halálhoz vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.6. ábra: GM2 gangliozid szerkezete. A tetraszacharid-csoport szerkezeti képletét (bal oldali keret) és a standard sémáját is ábrázoltuk (az ikonok leírását lásd **10.1. táblázat**).

A **lipopoliszacharidok**ban a cukoregységek közvetlenül zsírsavakhoz kapcsolódnak. Elsősorban a Gram-negatív baktériumok külső membránjában fordulnak elő. A gerinces immunrendszer antitesteket termel ellenük. Egyes bakteriális lipopoliszacharidok lipid összetevője endotoxinként ún. toxikus sokk szindrómát okozhat.

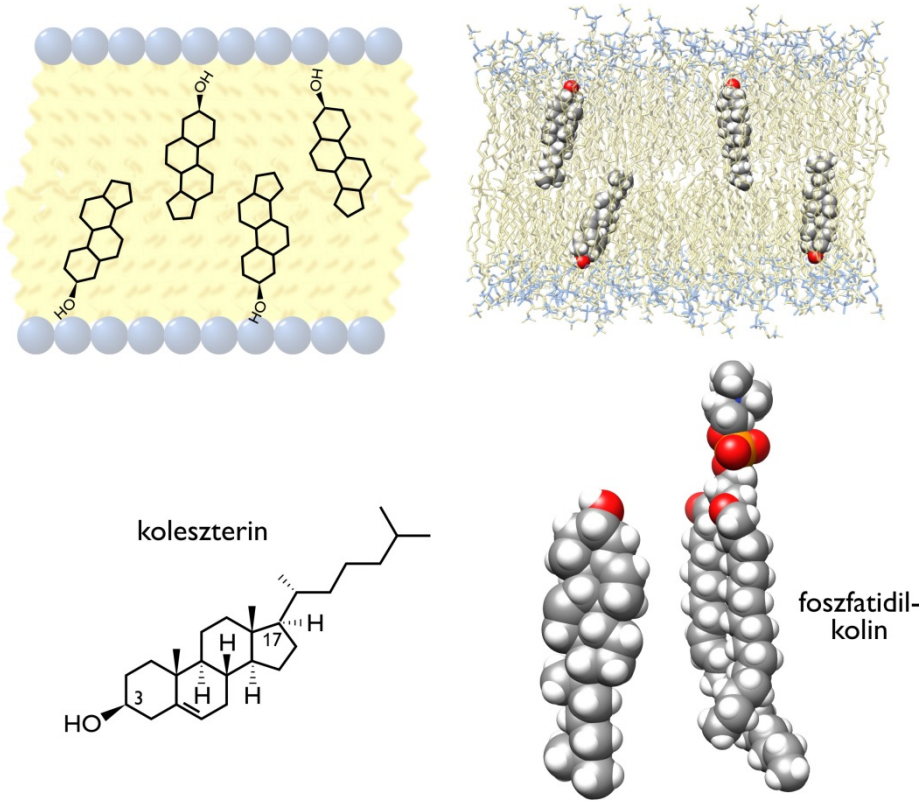
11.2.3. Koleszterin

A membránalkotó lipidek harmadik csoportjának prominens képviselője a **koleszterin**, egy szteránvázas vegyület. A szterolok közé tartozik, mivel a gyűrű 3-as szénatomján egy hidroxilcsoport található, amely a glicerofoszfolipidek és szfingolipidek fejcsoportjával léphet nem-kovalens kölcsönhatásba. A szteroid gyűrű 17-es szénatomjához egy nyolc szénatomos alkillánc kapcsolódik. A szerkezetéből következik, hogy a membrán kettősrétegben a zsírsavláncokkal párhuzamosan helyezkedik el (lásd **11.7. ábra**).

A koleszterin szerepe elsősorban a **membrán fluiditásának csökkentése**: minél nagyobb koncentrációban van jelen (idegsejtekben ez akár 25% is lehet), annál kevésbé „félfolyékony” a membrán (lásd **11.5.1. fejezet**), mivel gátolja a zsírsavcsoportok szabad laterális mozgását. Ezen kívül számos szteránvázas biomolekula (epesavak, D-vitamin, szteroid hormonok) előanyaga.

Köztudomású, hogy a vér magas koleszterinszintje (**hiperkoleszterinémia**) érelmeszesedéshez (ateroszklerózis), és ezen keresztül különböző kardiovaszkuláris betegségekhez vezethet. A magas koleszterinszintet okozhatja túlzott koleszterin bevitel, vagy a koleszterin szintézisének, szállításának illetve feldolgozásának a zavara. Ez abban is jelentkezik, hogy a koleszterint (részben koleszterin-észter formájában) a májból az egyéb szövetek felé szállító LDL (*low density lipoprotein*) részecskék mennyisége megnövekedik a vérben. A koleszterin és egyéb lipidek lerakódása az artériák falában, ún. ateroszklerotikus plakkok kialakulásához, és egy immunfolyamat következtében krónikus érfal gyulladáshoz vezet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

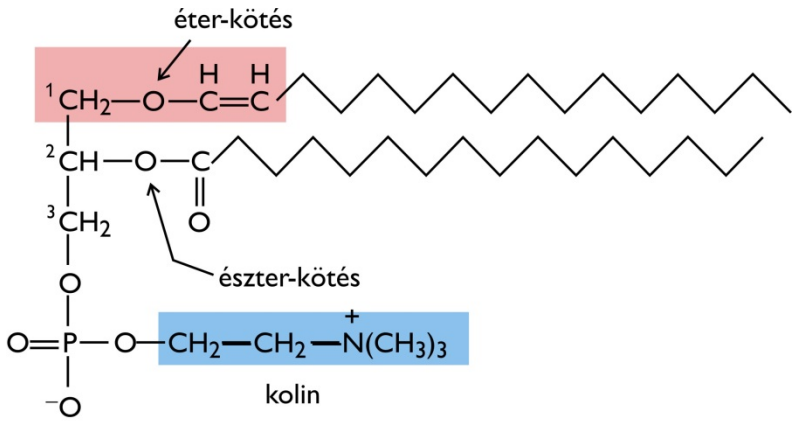


11.7. ábra: A koleszterin szerkezete és elhelyezkedése a membrán kettősrétegben. Összehasonlításképpen egy foszfolipid (foszfatidil-kolin) térszerkezetét is bemutatjuk

Ezeknek a betegségeknek a kialakulása megakadályozható gyógyszeresen, elsősorban a koleszterin bioszintézisében kulcsszerepet játszó enzim, az endoplazmatikus retikulum membránjában található **HMG-CoA-reduktáz** (HMG: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-) gátlásával. Ez az enzim a sok lépésből álló anyagcsereút egyik szabályozott enzime, ezért a kompetitív gátlása hatékonyan csökkenti a végtermék koleszterin mennyiségét. A gátlószerek, a természetes és szintetikus **sztatinok** igen hatékonyan csökkentik a vér koleszterinszintjét az enzim gátlásán keresztül (K_i értékük ~1 nM).

11.2.4. Éterlipidek

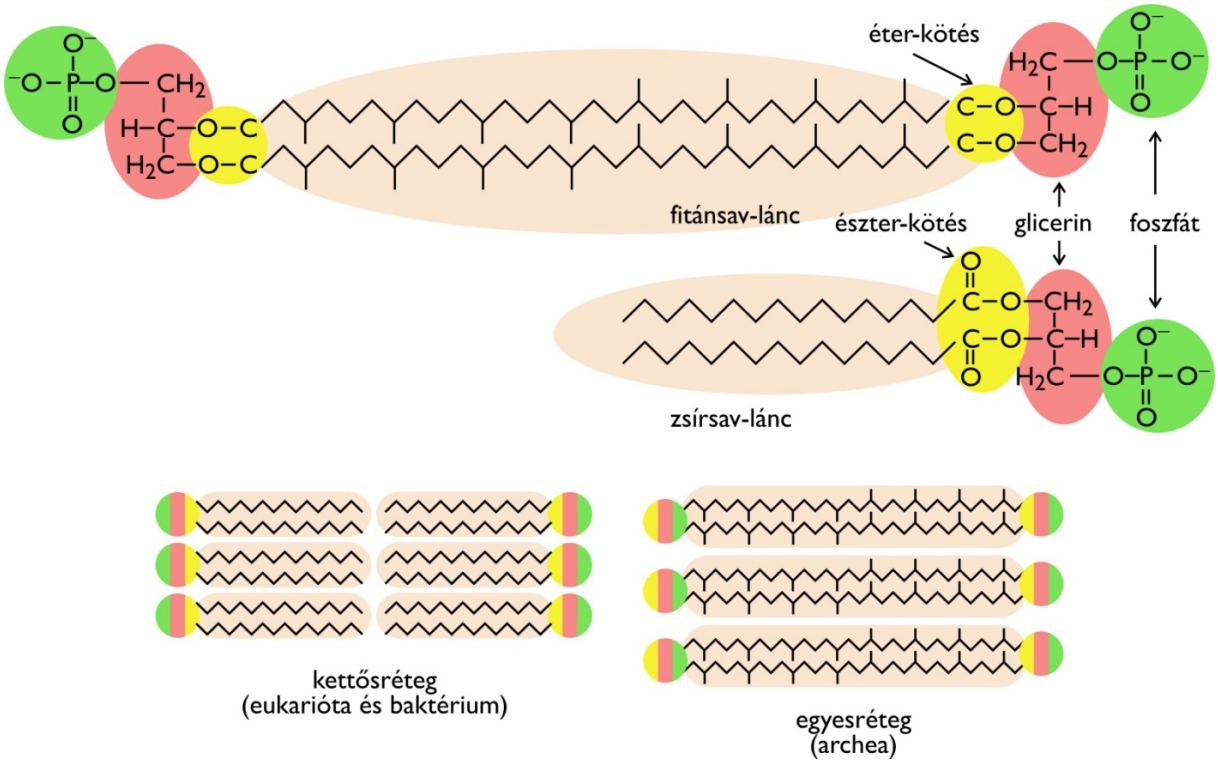
Végül szólnunk kell a membránalkotó lipidek egy különleges csoportjáról, az **éterlipidek**ről, amelyekben a zsírsavak nem észter, hanem éterkötéssel kapcsolódnak a glicerinhez. Az állatokban a **plazmalogén** a szívizomszövet membránjában van jelen nagy mennyiségben, a **vérlemezke-akitváló faktor** (PAF: *platelet-activating factor*) pedig egy jeltovábbító citokin (lásd **11.8. ábra**).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

11.8. ábra: A vérlemezke-aktiváló faktor, egy éterlipid szerkezete

Az extrém körülmények között élő **archeákban** („ősbaktériumok") az éterlipidek meghatározó **membránalkotók**. Ennek a valószínűsíthető oka, hogy az éterkötés a hidrolízissel szemben stabilabb (alacsony pH-n és magas hőmérsékleten is) az észterkötésnél. Az archeákban előforduló éterlipidekben a fejcsoporthoz az izoprén-származék fitánsav 20 szénatomos láncai kapcsolódnak, ráadásul difitanil-csoportként két glicerofoszfátot összekapcsolva (ezért az elnevezésük GDGT: glicerol-dialkil-glicerol-tetraéter). Ez utóbbi ténynek köszönhető, hogy sok archea membránja **egyesrétegű** (*monolayer*), mivel egy GDGT kétszer olyan hosszú, mint a közönséges glicerofoszfolipidek. Az archea éterlipidek felépítését és az egyrétegű membrán vázlatos összehasonlítását a kettősrétegű membránnal a **11.9. ábra** mutatja be.



11.9. ábra: Éterlipidek és foszfolipidek,valamint a belőlük kialakuló membránok vázlatos felépítése

11.3. Egyéb lipidek: jelátviteli molekulák, kofaktor, pigmentek

Számos további lipid található az élő szervezetekben, melyek működhetnek jelátviteli molekulaként, vitaminként kofaktor vagy antioxidáns molekulák előanyagaként és egyéb feladatokat is betölthetnek (pigmentek, elektronszállítók, anyagcsere intermedierek).

11.3.1. Jelátviteli lipidek

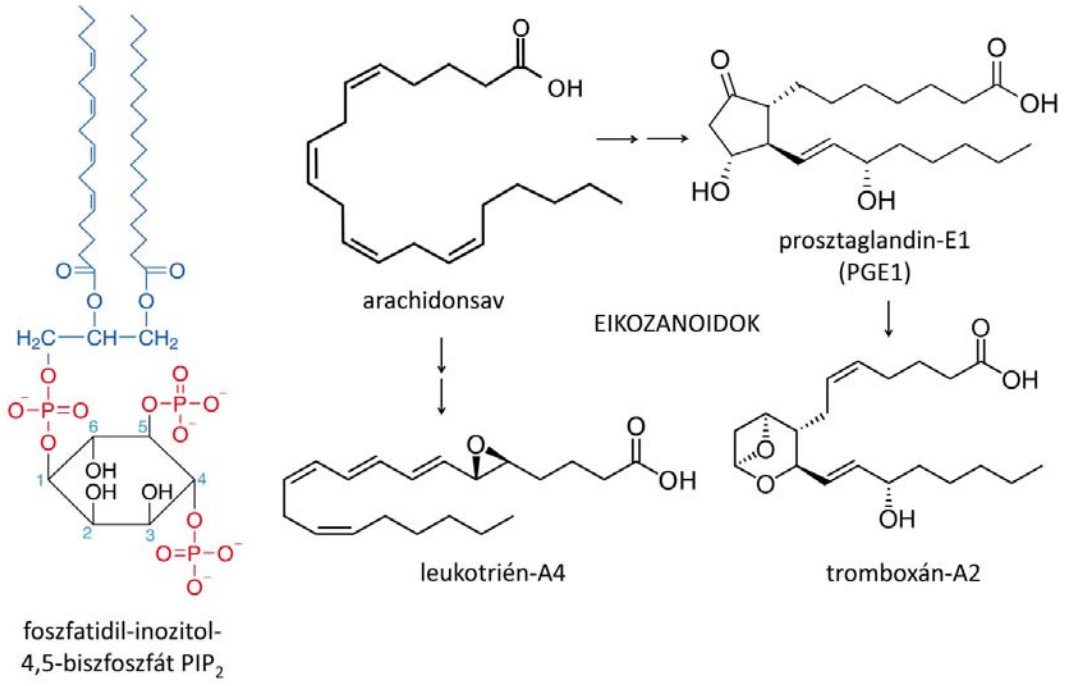
A lipidek egy része, mint már jeleztük fentebb, **jelátviteli molekula**ként működik. A foszfatidil-inozitol foszfolipid kétszeresen foszforilált származéka (**PIP_2: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát**; lásd **11.10. ábra**) a membrán kettősréteg belső oldalán helyezkedik el, s a foszfolipáz-C enzim hatására két jeltovábbító ún. **másodlagos hírvivő** (*second messenger*) molekula keletkezik belőle: a hidrofil **inozitol-triszfoszfát** és a lipofil **diacil-glicerol**. Az utóbbi a protein-kináz C enzim allosztérikus aktivátora (lásd **17.3.2. fejezet**). (A jeltovábbítás további részleteivel ebben az e-könyvben nem foglalkozunk.).

Szintén a **11.10. ábrán** tüntettünk fel három, a 20 szénatomos telítetlen zsírsavból, az **arachidonsavból** ($20{:}4(\Delta^{5,8,11,14})$) szintetizálódó **eikozanoid** lipidet (az *eikosi* görögül 20-at jelent): egy-egy prosztaglandint,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

tromboxánt és leukotriént. Ezek közül a **parakrin hormonok** közül a legszélesebb hatásuk a **prosztaglandinok**nak van – simaizom-összehúzódás, alvás-ébrenlét ciklus, testhőmérséklet emelés (láz), gyulladás és fájdalom kiváltás, hogy csak néhányat említsünk. A vérlemezkék által termelt **tromboxánok**nak szerepük van a véralvadásban, a vérnyomás emelésében. A **leukotriének** (fő keletkezési helyükről, a leukocitákról kapták a nevüket) legfontosabb szerepe a simaizom-kontrakció fokozása, amely túlműködés esetén a tüdőhólyagocskákban asztmás rohamhoz és anafilaxiás sokkhoz is vezethet.

Érdemes megjegyeznünk, hogy a leggyakrabban használt, fájdalom- és lázcsillapító, valamint gyulladásgátló gyógyszereink az eikozanoidok szintézisében kulcsszerepet betöltő **prosztaglandin-H_2-szintáz** (más néven ciklooxigenáz-1, COX1) enzimet **gátolják**. Ezek közé az ún. nem-szteroid gyulladásgátló gyógyszerek (NSAID: *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug*) közé tartozik például az **aszpirin** és az **ibuprofén**.



11.10. ábra: Jelátviteli lipidek szerkezete. Az eiokozanoidok az arachidonsavból keletkeznek.

Itt nem részletezzük a sokféle szteroid hormont: nemi hormonok (ösztrogének, tesztoszteron), vesekéreg hormonok (kortizonok, aldoszteron). Hatásmechanizmusukat később tárgyaljuk (lásd **18.3.4. fejezet**).

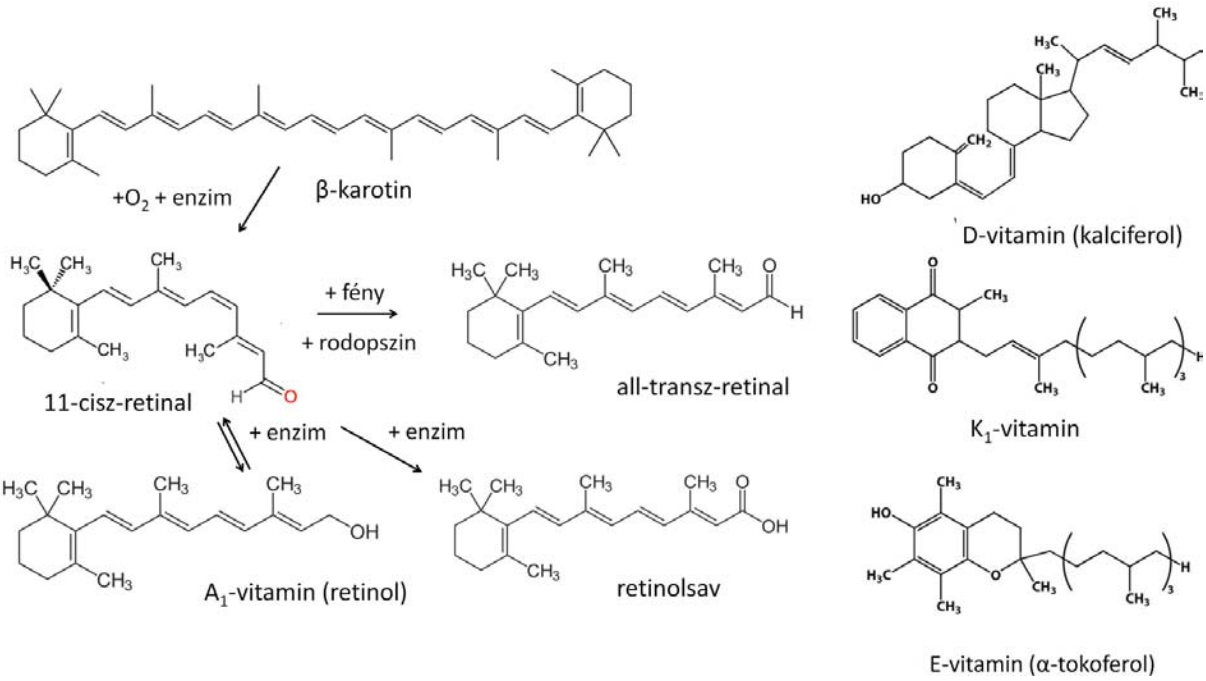
11.3.2. Lipofil vitaminok és származékaik

A **lipofil vitaminok**at, származékaik és előanyagaik egy részét a **11.11. ábra** mutatja be. A **D-vitamin (kolekalciferol) szterol**, amit a bőrszövet egyes sejtjei szintetizálnak 7-dehidrokoleszterinből a napsugárzásban levő UV fény hatására, de a táplálékkal is fel kell vennünk valamennyit a normális Ca^{2+}-homeosztázis érdekében.

Az **izoprén származék** (izoprenoid vagy terpenoid) **A-vitamin** (**retinol**) a látásreceptor rodopszin fehérje kofaktorának, a **retinal**nak az előanyaga. A gerincesekben **β-karotén**ből (egy karotenoid pigment, a sárgarépa színanyaga) szintetizálódik. A retinol oxidációs terméke, a **retinolsav** az epitélsejtek differenciálódásához szükséges, a génexpresszióra hat (lásd **18.3.4. fejezet**).

Az **E-vitamin** (α-tokoferol) és a **K_1-vitamin** is egy szubsztituált aromás gyűrűből és egy hidrofób izoprén láncból áll (lásd **11.11. ábra**). Az E-vitamin antioxidánsként ismert (a vízoldékony C-vitaminhoz hasonlóan), míg a K_1-vitamin a véralvadásban szerepet játszó egyes fehérjék poszttranszlációs módosításához elengedhetetlen kofaktor.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.11. ábra: Lipid vitaminok

11.3.3. Kofaktorok, pigmentek egyéb lipidek

Az **ubikinon** (**koenzim-Q**, CoQ_{10}) a mitokondrium belső membránjában működő elektrontranszportlánc egyedüli lipid komponense. A **plasztokinon** hasonló szerepet tölt be a kloroplasztiszokban.

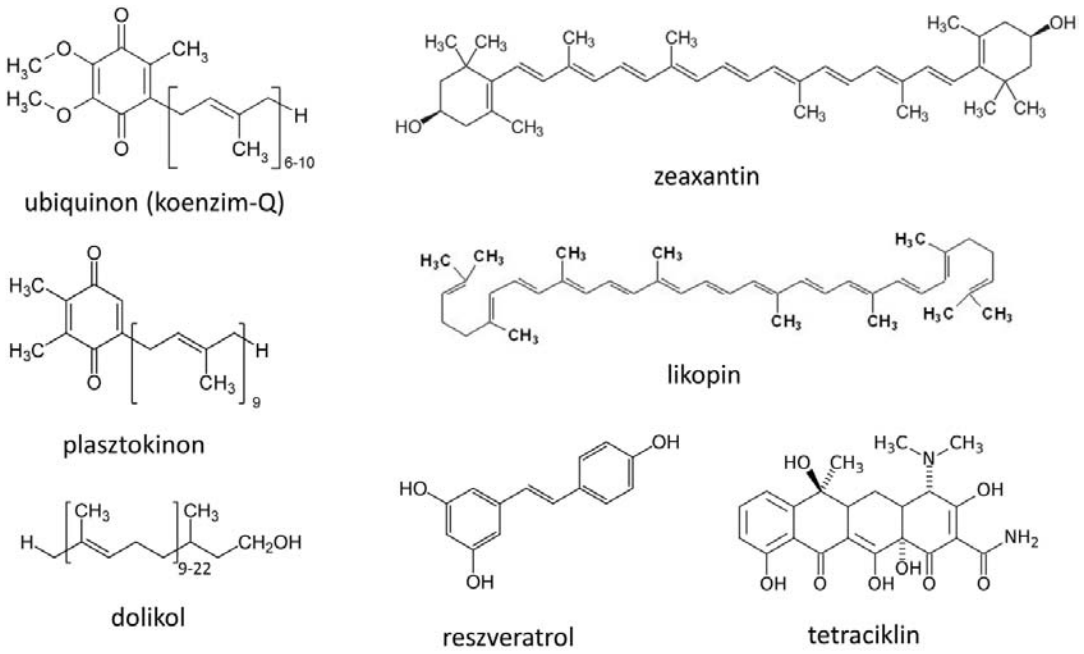
A **dolikol** (9-22 izoprén egységet és egy hidroxilcsoportot tartalmaz) aktivált cukorrészeket köt a komplex poliszacharidok, a bakteriális sejtfal, a glikoproteinek, glikolipidek szintézise során.

A **pigmentek** közül a **karotenoidok** a legismertebbek (tetraterpenoidok, azaz négy izoprén egységből állnak). A már említett **β-karotén**en kívül a sárga **xantofilek** közül a **zeaxantin**t (nevét a kukorica latin nevéről kapta: *Zea*) és a vörös **likopin**t (a paradicsom, a csipkebogyó színanyaga) említjük. A pigmentek intenzív színüket a delokalizált izoprén kettőskötés-rendszer könnyű gerjeszthetőségének köszönhetik. Ezzel függ össze az is, hogy a pigmenteknek fiziológiásan antioxidáns hatásuk van.

Utolsónak a **poliketidek**et (polifenolok) villantjuk fel. Tartozik ide antibiotikum (például a fehérjeszintézist gátló **tetraciklin**), toxinok (például az *Aspergillus* gombák termelte karcinogén **aflatoxin**ok) és sok növényi másodlagos anyagcseretermék is, mint például a vörösborban is megtalálható, feltételezetten jótékony hatású **rezveratrol**, aminek a hatásmechanizmusát intenzív kutatások próbálják felderíteni.

A felsorolt izoprenoid és poliketid lipideket a **11.12. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

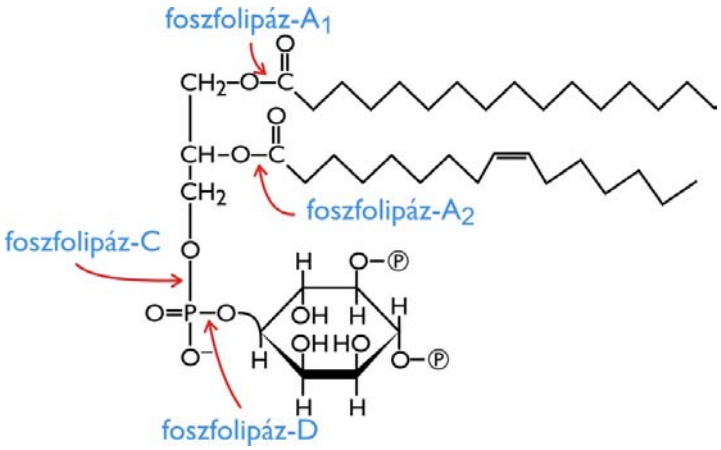


11.12. ábra: Néhány izoprenoid és poliketid lipid szerkezete

11.4. A lipidek vizsgálati módszerei

A lipidek biológiai szerepét, a „vízoldhatatlanságuk” miatt nehézkesebb vizsgálni, mint a hidrofil molekulákét. Pedig a jelentőségük nagy, mivel a membránok lipidösszetétele változik a sejtek differenciálódásakor, kóros állapotokban (például rákos transzformáció), vagy gyógyszerek alkalmazása során. Ezért is fontos, hogy tisztában legyünk a vizsgálati módszereikkel. Az alaptechnikák annyiban térnek el a **6. fejezet**ben ismertetettektől, hogy apoláros molekulákkal kell dolgozni.

A lipidek kivonása a homogenizált szövetekből, sejtekből kloroform/metanol/víz keverékével történik. Az összetett lipideknél **foszfolipáz enzimek**et (lásd **11.13. ábra**) alkalmaznak az egyes komponensek szétdarabolására.



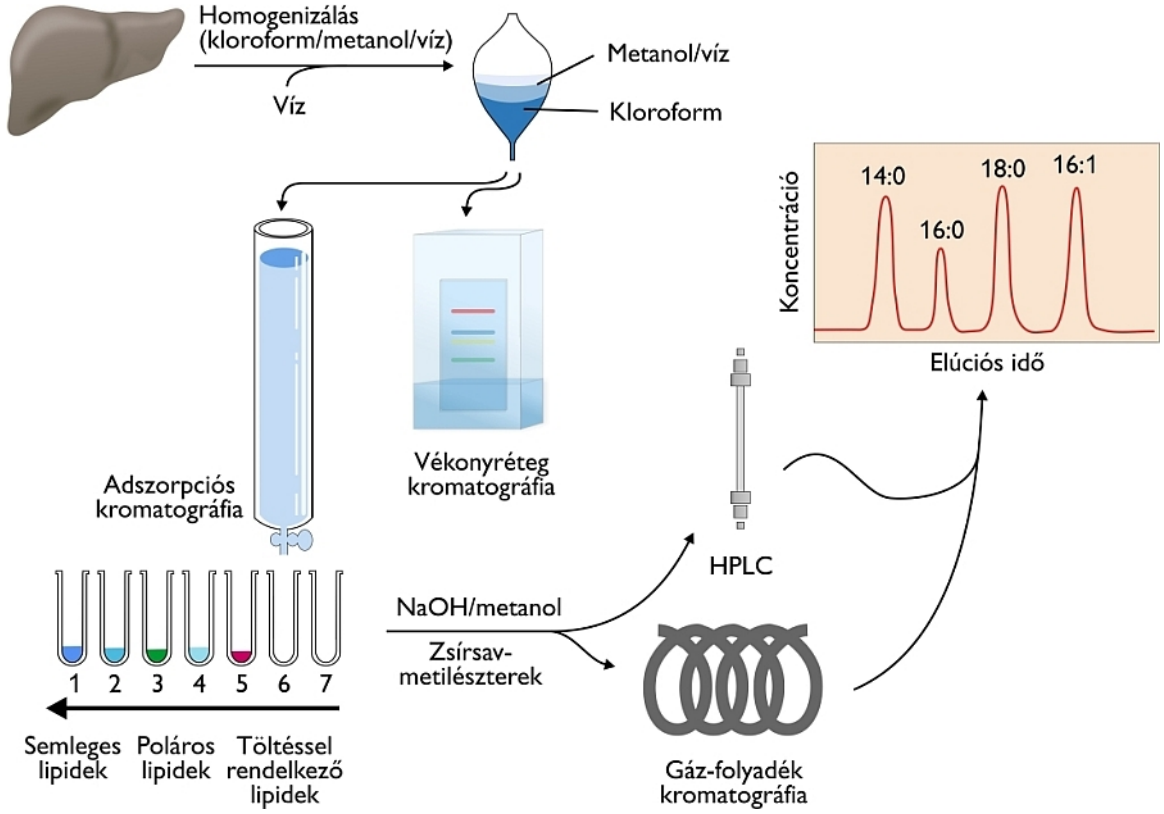
11.13. ábra: Glicerofoszfolipidek lebontása foszfolipázokkal

Az említett szeparációs eljárásokat további, nagyobb hatékonyságú HPLC és/vagy gázkromatográfiás elválasztás követi, majd az egyes lipidek azonosítására (a fehérjékhez és az oligoszacharidokhoz hasonlóan) a **tömegspektrometria** a legalkalmasabb és legpontosabb (Dalton felbontású) módszer. A lipidek vizsgálatának általános sémáját a **11.14. ábra** foglalja össze.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A különböző tulajdonságú lipidek, lipidkomponensek szétválasztása leggyakrabban **vékonyréteg** (TLC: *thin-layer chromatography*) vagy **adszorpciós kromatográfiával** történik, mindkét módszerrel általában szilikagéleken (a papíralapú elválasztást már csak ritkán alkalmazzák). Mindkét kromatográfiás eljárásnál a polaritásuk függvényében szeparálódnak a lipidek.

A rendszerbiológia új ága, a **lipidomika** a lipidek teljes körű vizsgálatára törekszik. Célja, hogy feltárja a lipidek fajtáit, szöveti illetve sejten belüli lokalizációjukat, funkciójukat és kölcsönhatásaikat, valamint az adatokat adatbázisokba rendezze és elemezze sejt/szövet típusok, beteg és egészséges lipidomok összehasonlításával. Jelenleg már több mint 35 ezer biológiai szereppel bíró lipidet tartalmaznak az ezzel foglalkozó adatbázisok. A humán **lipidom** feltárása még folyamatban van - csak a vérplazmában eddig >600 lipidet azonosítottak.



11.14. ábra: Lipidek biokémiai vizsgálatának sémája

11.5. Biomembránok

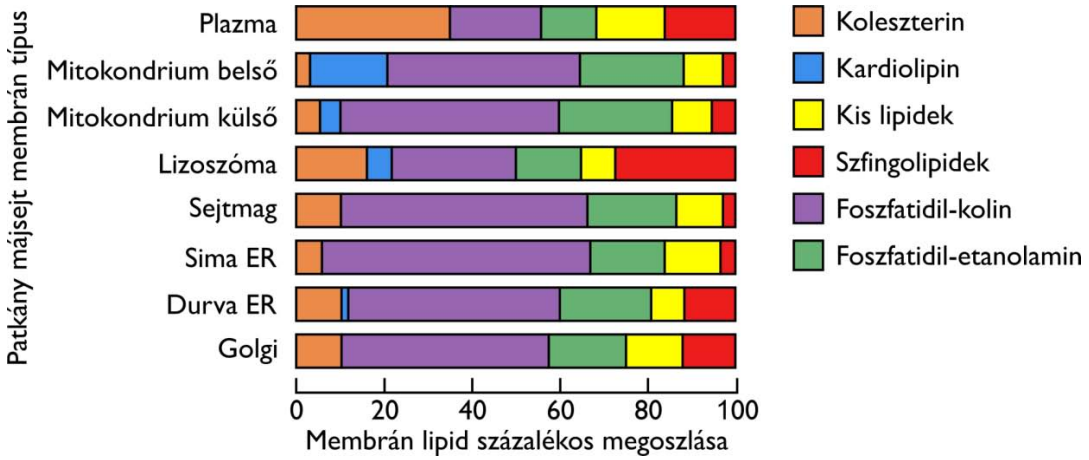
A membránok kialakulásának (**2.5.3. fejezet**) és összetevőinek (**11.2. fejezet**) bemutatását követően most áttekintjük a biológiai membránok általános sajátságait, majd a membránfehérjék tulajdonságait és funkcióit tárgyaljuk röviden.

11.5.1. A biomembránok általános tulajdonságai

A **biológiai membránok** alapvető tulajdonságait az határozza meg, hogy **foszfolipid kettősréteg** alkotja ezeket. A membránok vastagsága 60-100 Å. Ez alól kivétel csak az archeák között van, amelyeknél előfordul éterlipidekből felépülő egyrétegű sejtmembrán is (lásd **11.2.4. fejezet**).

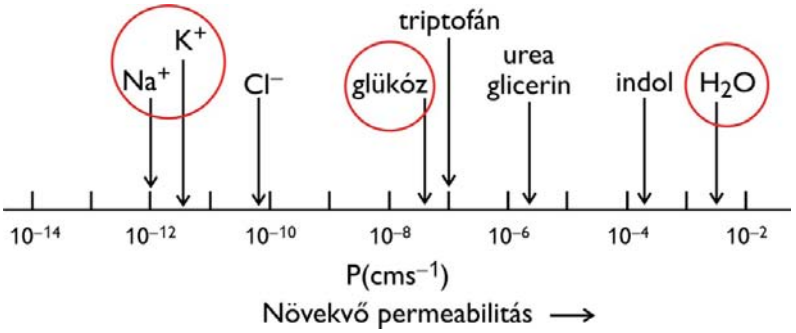
A membránok **lipidösszetétel**e sejt **specifikus**, de jellegzetes különbséget mutat a sejtmembrán (plazmamembrán) és az organellumok membránjainak összetétele is. Ezt tünteti fel egy patkány májsejt esetében a **11.15. ábra.** Az ábrából az is kitűnik, hogy a membránok leggyakoribb alkotóelemei a glicerofoszfolipidek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.15. ábra: Biomembránok lipidösszetétele

A membrán kettősréteg egymás felé néző apoláros belső része közel átjárhatatlan (impermeábilis) a legtöbb poláros molekula és főleg az ionok számára. Ez alól kivétel az oxigén és széndioxid gáz, s részben a vízmolekulák (de vannak olyan membránok, amelyeken a víz is nagyrészt csak vízcsatornákon, **aquaporin** fehérjéken keresztül közlekedik a membrán két oldala között). Természetesen az apoláros molekulák (például szteroid hormonok) szabadon átdiffundálnak a membránokon. A kismolekulák (és ionok) **permeabilitás**a arányos a vizes és apoláros oldószerben mérhető oldhatóságuk arányával (lásd **11.16. ábra**).



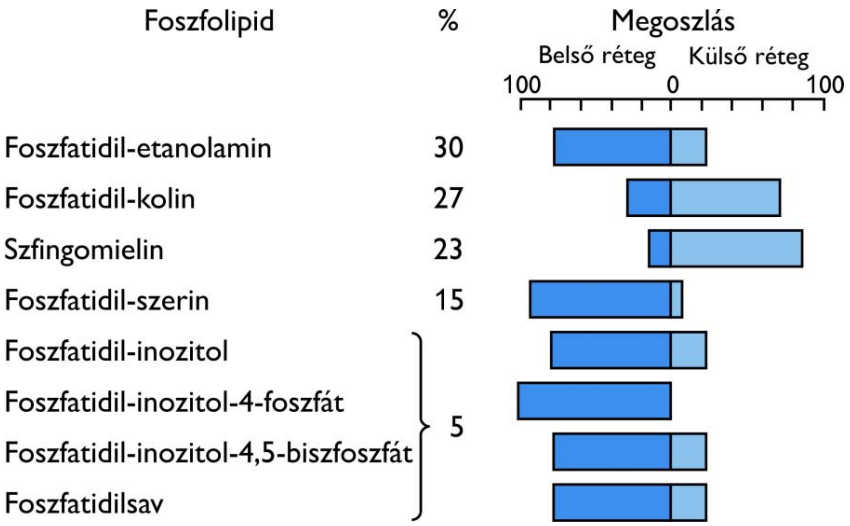
11.16. ábra: A membrán kettősréteg permeabilitása

A membránok a lipideken kívül sok fehérjét is tartalmaznak (a lipid-fehérje arány 1:4 és 4:1 között változik). Ezenkívül szénhidrátok (cukrok) is vannak a membránokban, de kizárólag összetett fehérjék (**glikoproteinek**) vagy lipidek (**glikolipidek**) részeként.

Igen fontos tény, hogy a membránok nem-kovalens, **önszerveződő struktúrák**, amelyek a komponenseikből minden külső energia bevitel nélkül összeállnak. Ez magyarázza „önjavító" tulajdonságukat is. A membránszerveződés **hajtóereje** a komponensek kémiai természetéből adódó **hidrofób effektus** (lásd **2.5.3. fejezet**).

A membránok **aszimmetrikus**ak. A kettősréteget felépítő lipidek megoszlása a külső és belső molekularéteg között is valamelyest különböző (lásd **11.17. ábra**), a membránfehérjék azonban kivétel nélkül aszimmetrikusan ágyazódnak a membránba (**11.5. fejezet**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.17. ábra: Foszfolipidek aszimmetrikus megoszlása a membrán kettősrétegben

A membránok „**félfolyékony**” tulajdonságúak (1972-ben Singer és Nickolson dolgozták ki az ún. fluid mozaik membrán modellt). Másképpen az is mondhatjuk, hogy a lipidek (és részben a fehérjék) orientált kétdimenziós folyadékot képeznek és erősen dinamikus tulajdonságokkal rendelkeznek. Mit jelent ez? A membrán síkjában, két dimenzióban a molekulák viszonylag szabadon mozognak a hőmozgás következtében, viszont a membrán két oldala között (*flip-flop* diffúzió) erősen korlátozott a mozgásuk.

A membrán **fluiditás**át a **lipidösszetétel befolyásolja**, mint arról már korábbi is írtunk. A fluiditás befolyásolható a foszfolipidek zsírsavláncainak hosszával és telítettségével (ez a baktériumokra jellemező), illetve a koleszterin mennyiségének változtatásával (ez az állati sejtekre jellemző).

A sejtmembránon belül kialakulhatnak eltérő összetételű **mikrodomének**, ún. **lipid tutajok**, amelyeket főleg koleszterin és szfingolipidek alkotnak, és speciális fehérjék (főleg receptorok) kötődnek hozzájuk.

A sejtmembránok **elektromosan polarizáltak**, a membrán belső oldala negatív töltéstöbblettel rendelkezik, ami körülbelül -60 mV feszültséget hoz létre. Ezt a potenciálkülönbséget **membránpumpa fehérjék** tartják fenn (a legfontosabb a **Na^+-K^+-ATP-áz**) A membránpotenciál és változása az alapja egyes transzportfolyamatoknak, a membránban lejátszódó energiatranszdukciós folyamatoknak (például ATP-szintézis) és az erre szakosodott sejtek ingerületvezetésének is.

11.5.2. Membránfehérjék és szerepük

A membránfehérjék vagy beágyazódnak a membránba (**integráns membránfehérjék**) vagy csak valamelyik réteggel lépnek kölcsönhatásba (**perifériás membránfehérjék**). Az integráns fehérjék közül a transzmembrán fehérjék szerepük szerint lehetnek **receptor**ok, **csatornafehérjék**, **pumpá**k (aktív transzport), **enzimek** és energiatranszdukcióra képes **motorfehérjék** (ATP-szintáz, bakteriális ostor motorfehérje komplexe). Az integráns fehérjék a membrán merevségét fokozzák.

Érdemes felhívnunk a leendő kutatók figyelmét arra, hogy a membránfehérjék nagyfelbontású háromdimenziós szerkezetéről és ez által részletes működésükről jelenleg a többi fehérjecsoporthoz (globuláris, fibrilláris) képest jóval kevesebb információ áll a rendelkezésünkre. Ennek egyik oka, hogy a membránfehérjéket nehezen lehet kristályosítani, ezért annak ellenére, hogy az összes fehérje 20-30%-a ebbe a kategóriába tartozik, az ismert atomi felbontású térszerkezeteket tároló adatbázisban (PDB: *Protein Data Bank*) az arányuk csak ~0,1%. Továbbá az is kérdéses, hogy a kristályosított forma térszerkezete mennyire egyezik meg a membrán hidrofób közegébe ágyazott funkcionális térszerkezettel.

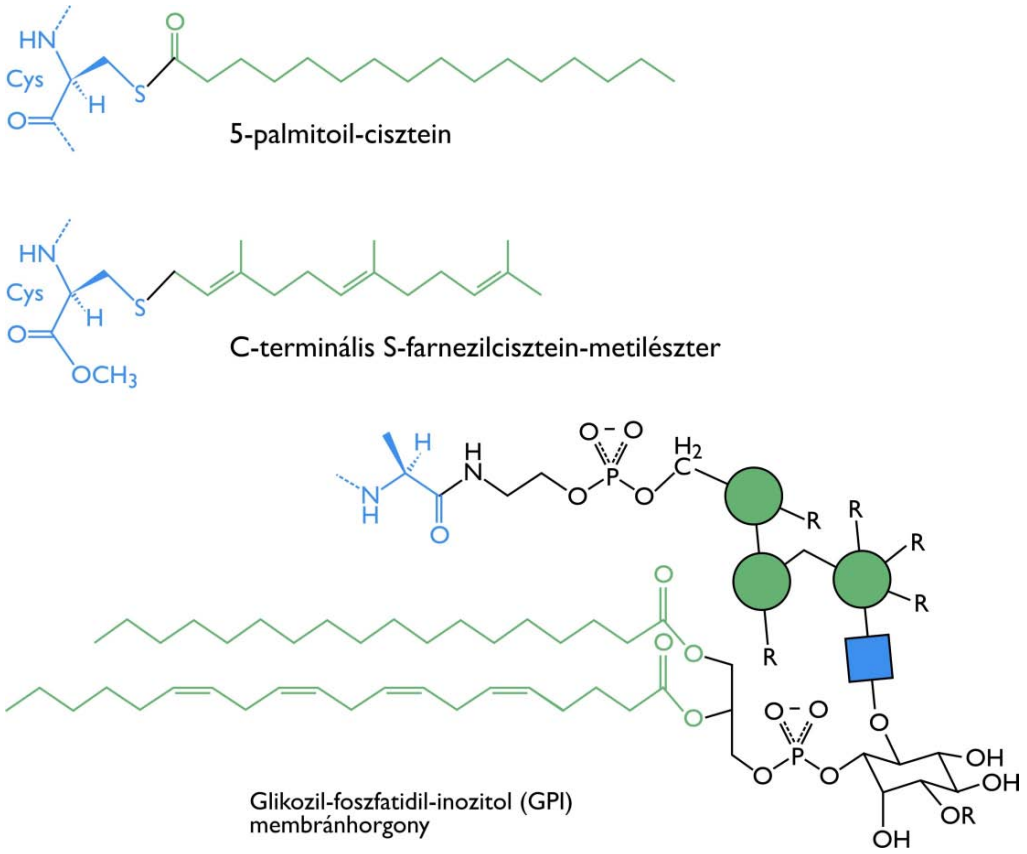
11.5.2.1. A membránfehérjék szerkezeti típusai

A **perifériás membránfehérj**ék felszíni poláris oldalláncaik a **lipid kettősréteg fejcsoportjaival vagy integráns membránfehérjék** külső **poláros felszínével** alakítanak ki hidrogénhidakkal és más elektrosztatikus kötésekkel

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

kölcsönhatást (példaként említjük a mitokondriális elektrontranszportlánc komponensét, a **citokróm-c** fehérjét). A kölcsönhatás természetéből adódóan ezeket a fehérjéket a membránokról nagy koncentrációjú sóoldattal (pl. 1 M NaCl) vagy a pH változtatásával oldatba lehet vinni.

Ezzel szemben az **integráns membránfehérjék** csak detergensekkel vonhatók ki a membránból, mivel közvetlen **kölcsönhatásba lépnek a membránok hidrofób részével**. Több módon kapcsolódhatnak a membránnal: az egyik lehetőség, az ún. **lipidhorgonnyal** történő kapcsolódás. Ez lehet zsírsav (pl. palmitoil-csoport vagy farnezil-csoport) vagy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgony (lásd **11.18. ábra**)



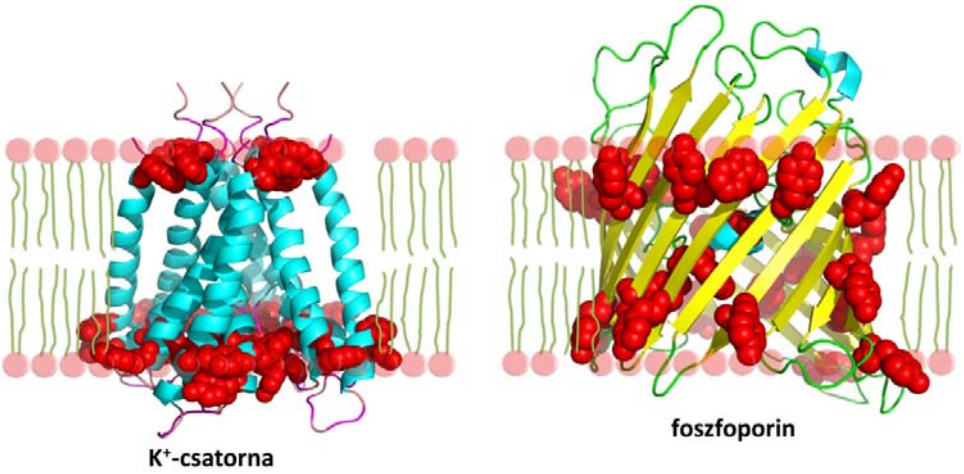
11.18. ábra: Membránfehérjék lipidhorgony típusai

Néhány integráns membránfehérjét már bemutattunk az **5.3. fejezet**ben. Láttuk, hogy a polipeptidlánc **transzmembrán** része valamilyen szabályos másodlagos szerkezetet vesz fel (hogy az összes potenciális főlánc hidrogénhíd kialakulhasson), s az esetek nagy többségében egymással kölcsönható **amfipatikus α-hélixek** alakulnak ki – a hidrofób membránkörnyezet felé néző oldalláncok apolárosak, míg az egymás felé néző oldalláncok polárosak. Több α-hélix együttesen hidrofil csatornát tud kialakítani (lásd később).

Léteznek, bár jóval kisebb számban **β-szerkezetű membránfehérjék** is, amelyekben legalább 16, alternálva poláros és apoláros aminosavakból álló β-lánc egy nyitott β-hordó szerkezetet hoz létre. A baktériumok, mitokondriumok és a kloroplasztiszok membránjában a **porinok** hidrofil csatornákat alkotnak (lásd **5.3. fejezet** és **5.17. ábra - 5.19. ábra**).

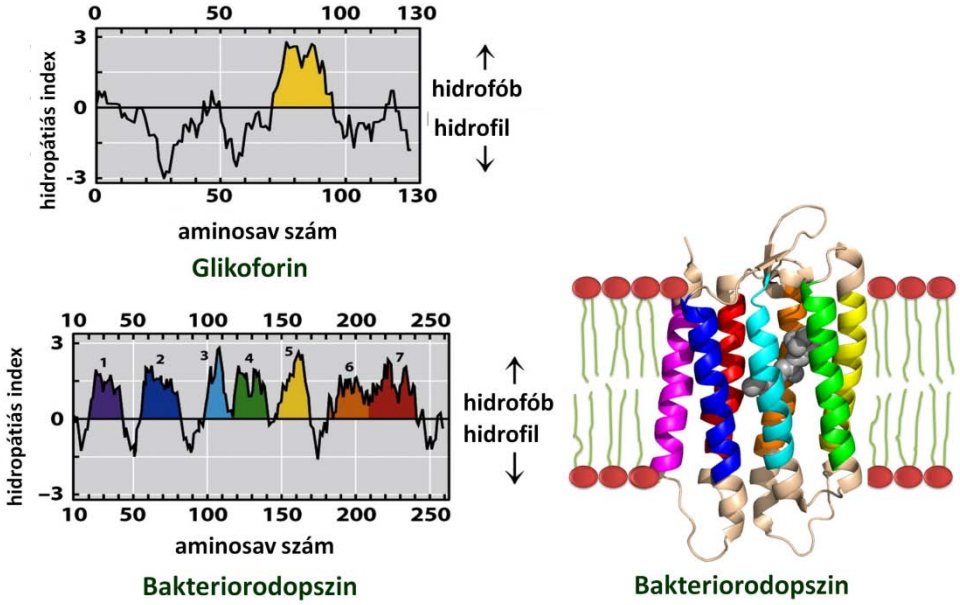
Szerkezeti érdekességként megjegyezzük még, hogy a transzmembrán peptidszakaszok – legyenek akár α-hélixek, akár β-láncok – membránhoz rögzítéséhez jelentősen hozzájárulnak a Trp és Tyr oldalláncok, melyek hidrofób és egyúttal hidrofil karakterű aromás oldalláncaikkal egyszerre tudnak kölcsönhatásba lépni a membrán foszfolipidek poláros fejcsoportjával és az apoláros zsírsavlánccal is. Ezt bizonyítja, hogy ezek az aminosavak szinte kizárólag a kettősréteg két külső szélén csoportosulnak, mint azt a **11.19. ábra** mutatja egy a-helikális (K^+-csatorna) és egy β-hordó szerkezetű (foszfoporin) membránfehérjénél.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.19. ábra: Membránfehérjék Trp és Tyr aminosavainak (piros színnel) elhelyezkedése (PDB: 1BL8 és 1PHO)

Azt is megemlítettük korábban, hogy a membránon átívelő peptidszakaszok az aminosavmaradékok jellegzetessége miatt a szekvenciákból az ún. **hidropátiás-index** (és más, újabban kifejlesztett bioinformatikai algoritmusok) segítségével megjósolhatók (lásd **11.20. ábra**).

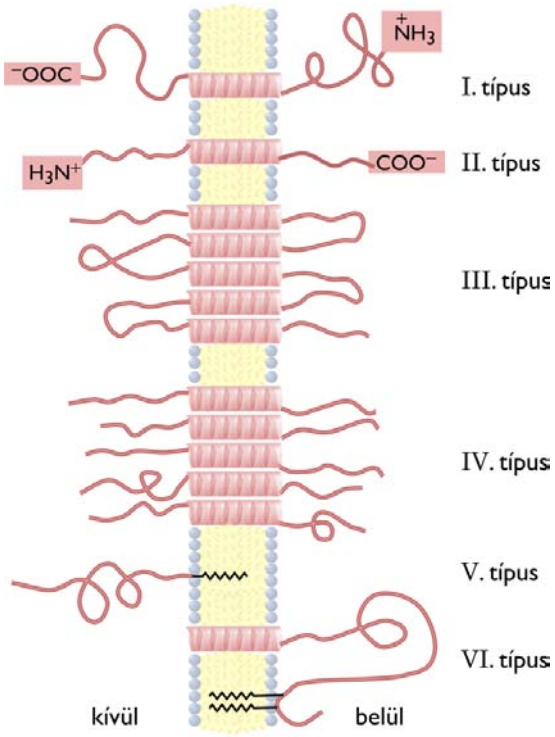


11.20. ábra: Hidropátiás-indexek és a bakteriorodopszin transzmembrán α-hélixei (PDB: 2AT9)

Az integráns membránfehérjék osztályozása történhet a membránba történő beágyazódásuk (**topológia)** alapján. A hét fő osztályukat a **11.21. ábra** mutatja be.

Az első két osztályba tartozó fehérjéknek kizárólag **egy transzmembrán hélix**e van. Ide tartoznak a **tirozin-kináz receptorok**, például a növekedési hormon vagy az EGF (epidermális növekedési faktor) receptor. (Megjegyzendő, hogy ezek a receptorok a működésük során általában dimerizálódnak, sőt az inzulin receptor ligandum nélkül is két láncból áll). Nevüket onnan kapták, hogy enzimaktivitással is rendelkeznek - foszforilcsoportot képesek ATP-ről vagy a saját láncaikra (autofoszforiláció) vagy valamilyen célfehérje tirozin oldalláncaira átvinni, és ez által az aktivitásukat szabályozni (lásd **17.3.1. fejezet)**.

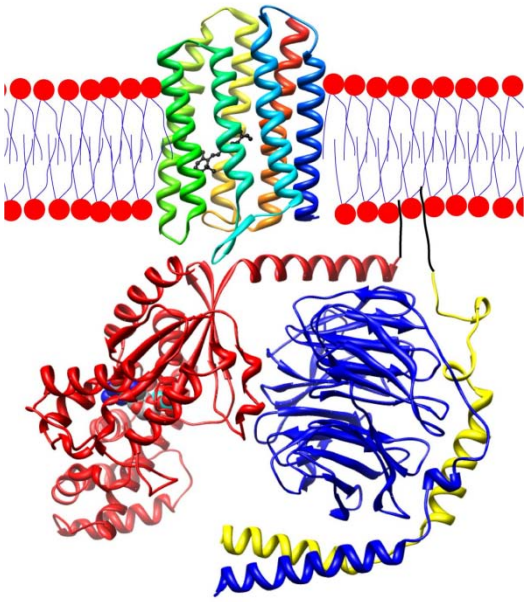
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.21. ábra: Az integráns membránfehérjék osztályozása. (A III típusnál a hét memránhélixből csak öt látszik)

A III-as osztály a legnépesebb – ide tartoznak a **hét transzmembrán α-hélix**et tartalmazó, zömükben receptorfehérjék (lásd **11.22. ábra**).

Az emberben közel 800 különböző **G-fehérje kapcsolt receptor** (**GPCR**, más néven 7TM receptor) működik. A látásrecepcióért felelős **rodopszin** térszerkezetét, a hozzá kapcsolt szabályozófehérjével az ún. heteotrimer G-fehérjék közé tartozó transzducinnal együtt a **11.22. ábra** mutatja be. Látszik az ábrán a hét transzmembrán hélix közé beékelődő kofaktor, a retinal, és az is, hogy a transzducin két lipidhorgonnyal is kapcsolódik a membránhoz.

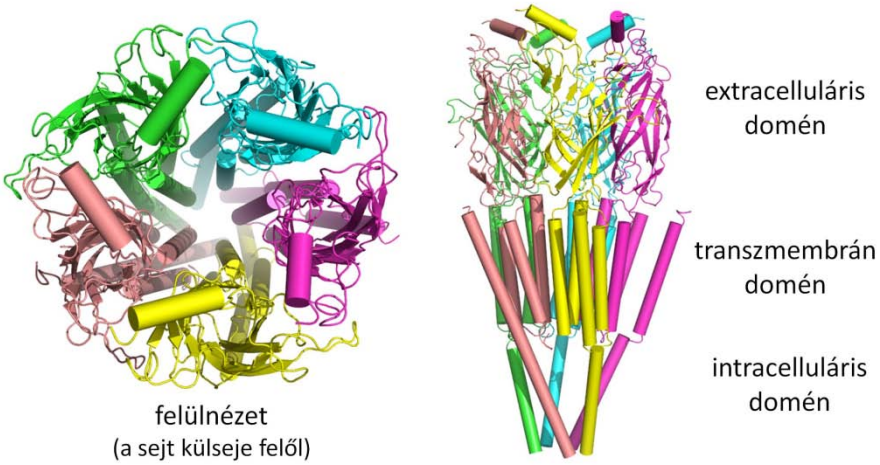


11.22. ábra: A rodopszin és a transzducin komplexének szerkezete (PDB: 1GOT). A rodopszin hét transzmembrán α-hélixét különböző színek jelölik. A transzducin egy heterotrimer G-fehérje, a három alegysége

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

piros, kék és sárga (az α-alegységhez kötődő GTP golyó modellben látszik). Az α- és a g-alegységek membránhorgonnyal kapcsolódnak a membránhoz is

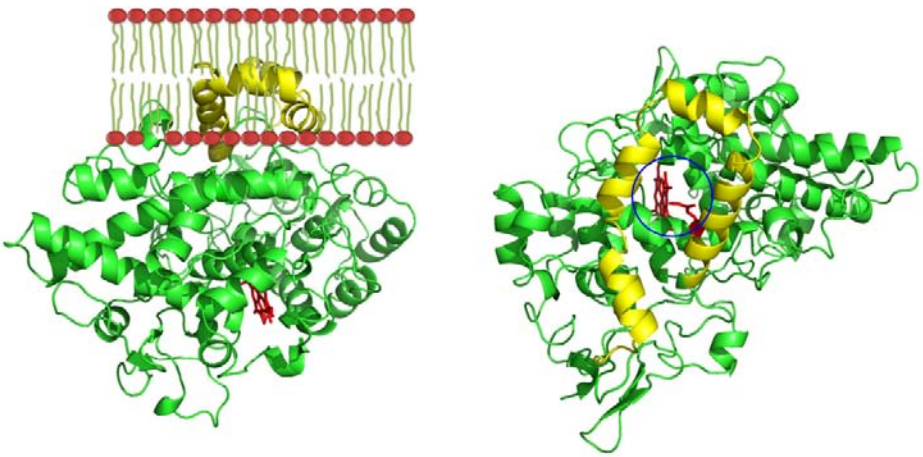
A IV-es típusú integráns membránfehérjék **több alegységből** származó **transzmembrán α-hélix**ei **membráncsatornát** alkotnak. Ebbe az osztályba tartozik például többek között az ideg-izom ingerületáttevődést közvetítő **nikotin-szenzitív acetilkolin-receptor** (nAcCoA-receptor; lásd **11.23. ábra**).



11.23. ábra: A nikotin-szenzitív acetilkolin-receptor térszerkezete (PDB: 2BG9)

A **ligandum-függő kapuzó ioncsatorna receptor**ok közé tartozó 268 kDa-os membránfehérje alegységszerkezete $\alpha_2\beta\gamma\delta$, tehát heteropentamer, s a négy α-hélixet tartalmazó transzmembrán domének együttesen alakítják ki az acetilkolin-kötődés hatására kinyíló csatornát, amit az **11.23. ábra** bal oldalán felülnézetben látunk. Az acetilkolin a főleg β-lemezes szerkezetű extracelluláris doméneken belül a két a alegységhez köt.

A következő két osztályba valamilyen **membránhorgonny**al illetve azon kívül transzmembrán hélixszel is rendelkező membránfehérjék tartoznak. A **lipidhorgonyok**at már bemutattuk (lásd **11.18. ábra**). Vannak olyan integráns membránfehérjék is, melyek α-hélixei csak az egyik foszfolipid rétegbe merülnek be (**hélixhorgony**). Ebbe az osztályba tartoznak többek között a lipidek metabolizmusában résztvevő egyes enzimek. **Példa**ként az eikozanoidok (lásd **11.3.1. fejezet**) szintézisében kulcsszerepet játszó, farmakobiokémiai szempontból fontos enzimet, a **prosztaglandin-H_2-szintáz**t említjük, és bemutatjuk a szerkezetét is (lásd **11.24. ábra**). A membránba merülő hélixeken keresztül kialakul a fehérjében egy hidrofób csatorna, ami elvezet az aktív centrumig, és rajta keresztül a szubsztrát arachidonsav közvetlenül a lipidrétegből diffundálhat az enzim aktív helyéhez. Az aszpirin és az ibuprofén hatóanyaga ezt a csatornát blokkolja (lásd **11.3.1. fejezet**).



11.24. ábra: A prosztaglandin-H_2-szintáz enzim térszerkezete. A körrel jelölt hidrofób csatorna alján van az enzim aktív helye. A csatornát „eltorlaszoló” inhibitor molekula piros (PDB: 1PTH)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Végül a VII-as típusba (ez a **11.21. ábra** nem szerepel) tartoznak a már említett transzmembrán **β-hordó szerkezetű csatornafehérjék (**lásd például a **11.19. ábra)**.

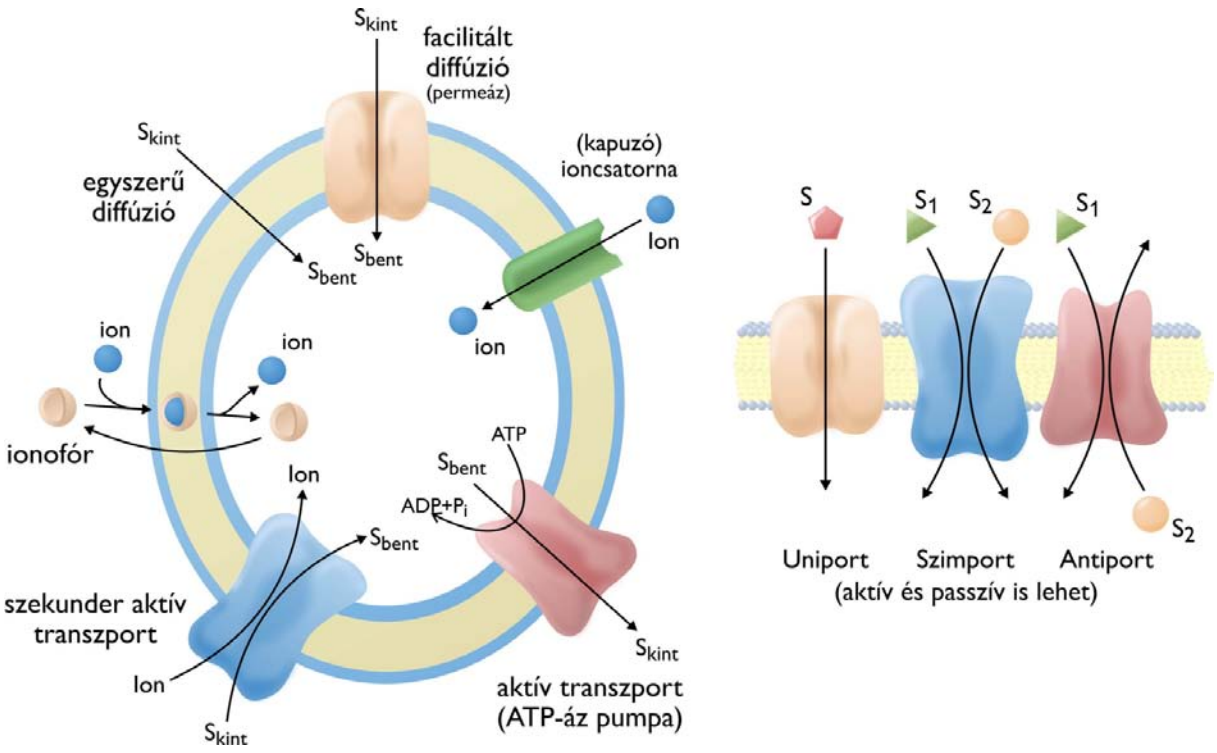
11.5.2.2. A membránfehérjék funkcionális típusai: pumpák és transzporterek

Funkcionális szempontból a membránfehérjék lehetnek **pumpá**k, **transzporterek**, **csatornafehérjék, kapuzó-csatornák, receptoro**k, **enzimek** és energiatranszdukcióra képes **fehérjék** (ATP-szintáz, bakteriális ostor motorfehérje komplexe). Ebben a fejezetben csak felvillantunk néhány példát, működésük részleteiről az elektronikus biokémia könyv egy későbbi „kötetében" lesz szó (az energiatranszdukcióra képes motorfehérjéket és a jeltovábbításban szereplő receptorokat is csak ott fogjuk tárgyalni).

Kezdjük a bemutatást a membránon keresztül történő anyagforgalmat lebonyolító fehérjékkel (lásd **11.25. ábra**). Az anyagforgalmat tekintve beszélhetünk **aktív** és **passzív transzport**ról. Az aktív transzport energiaforrása az ATP (**ATP-áz pumpák**) vagy a membrán két oldala között fennálló elektrokémiai potenciálkülönbség (**másodlagos aktív transzporterek**). A passzív transzport történhet egyszerű diffúzióval vagy **facilitált diffúzió**val, amit **transzporter** (*carrier*: szállítófehérje, vagy másik elnevezésük a **permeáz**) **fehérjék** közvetítenek. Megjegyzendő, hogy a permeázok lehetnek másodlagos aktív transzporterek is Az ionok mozgása az alacsonyabb koncentrációjú membránoldal felé történhet ún. ionofórokkal (lipofil, ionkötő molekulák) vagy **membráncsatornák**on, legtöbbször szabályozott, ún. **kapuzottioncsatorná**kon keresztül (ez utóbbiak egyúttal receptorok is, mint például a bemutatott acetilkolin-receptor).

A membráncsatornák kapcsán fontos megjegyeznünk, hogy az átáramló ion vagy kismolekula nem telíti őket, ellentétben a pumpákkal és a transzporter fehérjékkel, melyekhez ligandumok kötődnek. Ennélfogva a szállító- és pumpafehérje telíthetők (másképpen fogalmazva, a csatornán keresztüli mozgás sebessége egyenesen arányos az ion vagy kismolekula koncentrációjával).

A membránfehérjék által közvetített transzport a szállítandó molekula/ion iránya alapján lehet: uniport, **szimport** és **antiport** (lásd **11.25. ábra**).



11.25. ábra: A membránokon keresztül történő anyagáramlás és a transzportfehérjék típusai.

Röviden bevezetjük a transzportfolyamatok termodinamikai hátterét. A membrán két oldala között, ha egy töltés nélküli molekula koncentrációjában különbség van, akkor a két oldal közötti **szabadentalpia különbség**:

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

$$\Delta G = RT\, ln\, (c_2 / c_1)$$ **11.1. egyenlet**

Ha töltéssel rendelkező részecskéről vagy ionról van szó, akkor a **koncentrációkülönbség** kiegészül az elektorkémiai potenciállal (**membránpotenciál**),

$$\Delta G = RT\, ln\, (c_2 / c_1) + ZF\Delta V$$ **11.2. egyenlet**

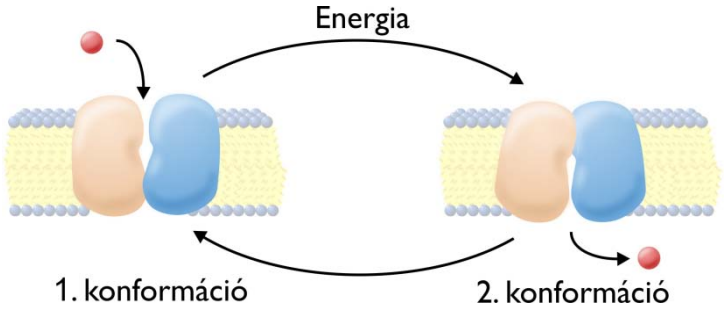
ahol a *Z* a transzportálódó részecske töltése, *F* a Faraday állandó (96,5 $kJV^{-1}mol^{-1}$). A **transzport aktív, ha a ΔG pozitív, passzív ha a ΔG negatív**.

Az **ATP-áz pumpák** szerepe többek között a minden sejtre jellemző membránpotenciál kialakítása, a kiemelkedően fontos szabályozó ion, a Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának alacsony szinten tartása, valamint egyes kismolekulák mozgatása a membrán két oldala között a koncentrációgradienssel szemben.

(Érdemes itt egy rövid kitérőt tennünk és feltenni a kérdést, hogy honnan eredhet a Ca^{2+} kiemelt szerepe a molekuláris szintű szabályozásban? Az evolúciónak már feltehetően a korai szakaszában alapvető szerepet kaptak a foszfátion tartalmú nukleotidok és nukleinsavak. A sejtek környezetében gyakorlatilag mindenütt előforduló kalciumion jelenléte miatt felmerült viszont egy szervetlen kémiai probléma: a kalcium-foszfát só igen rossz oldékonysága. Ezért a sejteknek „ki kellett találni" valamilyen mechanizmust, hogy eltávolítsák a sejten belüli Ca^{2+}-ot. A ma élő sejtekben az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ~10^{-7} M, ami a Ca^{2+}-pumpák működésének köszönhető. A Ca^{2+}-regulációhoz ezek után már csak annyi kellett, hogy megjelenjenek szabályozottan nyitható Ca^{2+}-csatornák a membránban, a sejten belül pedig a megemelkedett Ca^{2+}-koncentrációra válaszolni képes fehérjék – ez utóbbiak közé tartozik a kalmodulin (lásd **5.9. ábra**).)

Az ATP-áz pumpák három fő családja közül az ún. **P-típusú Ca^{2+}-pumpá**t és egy ún. **ABC-transzporter**t mutatunk be röviden. A P-típusú ATP-áz pumpák közé tartozik a membránpotenciált fenntartó K^+-Na^+-ATP-áz membránfehérje is (egy ATP-t felhasználva antiporterként a sejt belsejéből 3 nátriumion pumpál ki és egyidejűleg 2 káliumiont pumpál be a sejtbe).

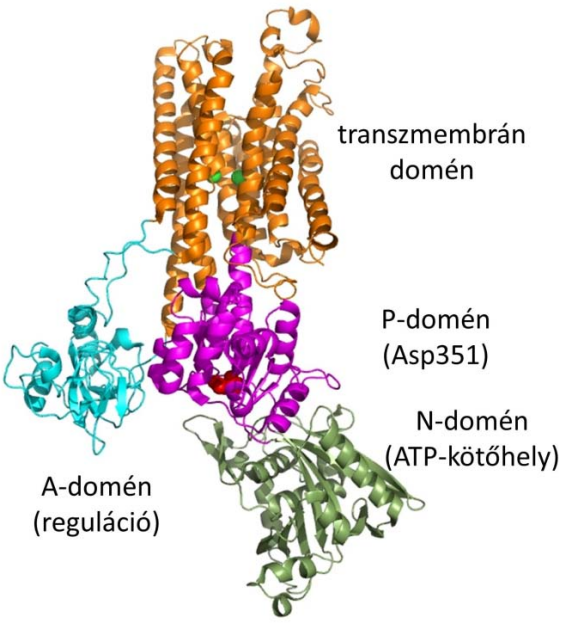
A pumpák működését (de a permeázok és részben a kapuzó ioncsatornákét is) egy vázlatos szerkezeti ábrával lehet szemléltetni (lásd **11.26. ábra**). Ezek szerint a membránfehérje **két konformációs állapot**ban lehet, úgy, hogy a szállítandó ion vagy molekula számára hol a membrán egyik, hol a másik oldala felé van kötődési illetve átjárási lehetőség. A két állapot között, aktív transzport esetén az ATP-ből származó szabadentalpia fordítódik a konformáció „átbillentésére" úgy, hogy az ion vagy molekula a nagyobb koncentráció felé disszociálhasson a pumpáról.



11.26. ábra: A membrántranszport fehérjék működésének általános sémája

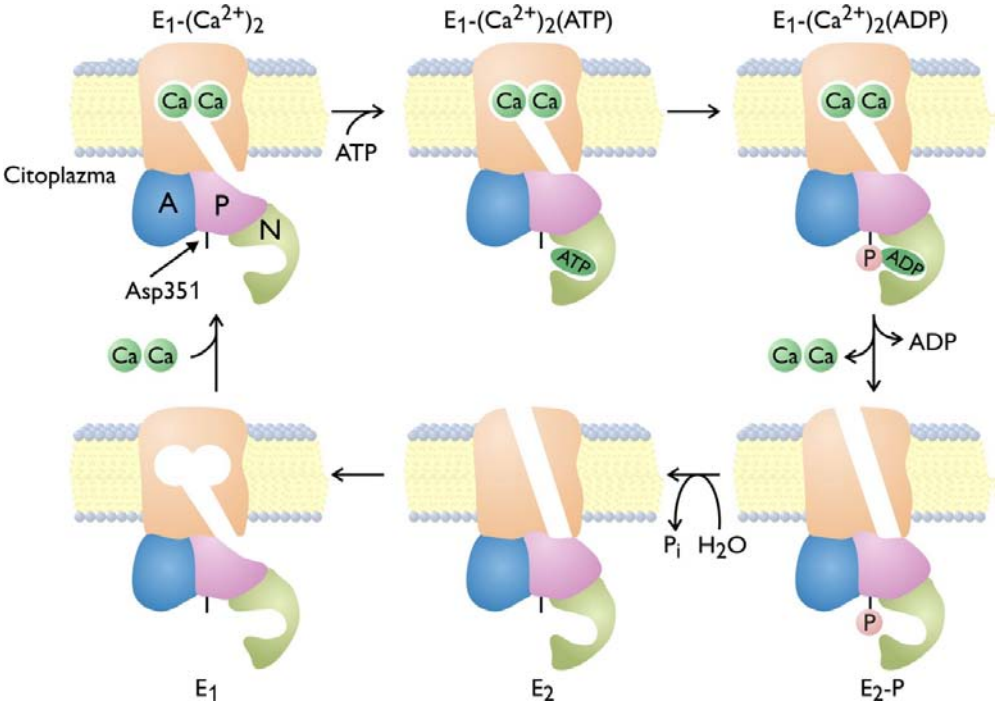
A vázizmok szarkoplazmatikus retikulumában lokalizált SERCA (*sarcoplasmic reticuluum Ca^{2+} ATPase)* **Ca^{2+}-pumpa** térszerkezetét a **11.27. ábrán**, míg a vázlatos működését a **11.28. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



11.27. ábra: A SERCA Ca^{2+}-pumpa térszerkezete (PDB: 1SU4)

A fehérje négy szerkezeti-funkcionális doménjének együttműködése eredményezi az egy ATP hidrolíziséből származó energiával a 2 kalciumion kipumpálását. A reakció közben átmenetileg az ATP-ből lehasadó foszfátion egy Asp351-es oldalláncra kerül kovalens kötéssel, ezért hívják ezeket a pumpákat P-típusúnak. Anélkül, hogy a részletekbe belemennénk, az **E_1 és E_2 állapot** felel meg az előbb ismertetett általános séma két konformációjának, amit az ATP-kötés és hidrolízis, valamint az **ADP disszociáció és a kovalensen kötött foszfát hidrolízise** „kapcsolgat". A **11.27. ábrán** látható térszerkezet az $E_1(Ca^{2+})_2$ állapotnak felel meg, amikor a transzmembrán domén a magasabb kalciumion koncentráció oldaláról köti az iont.

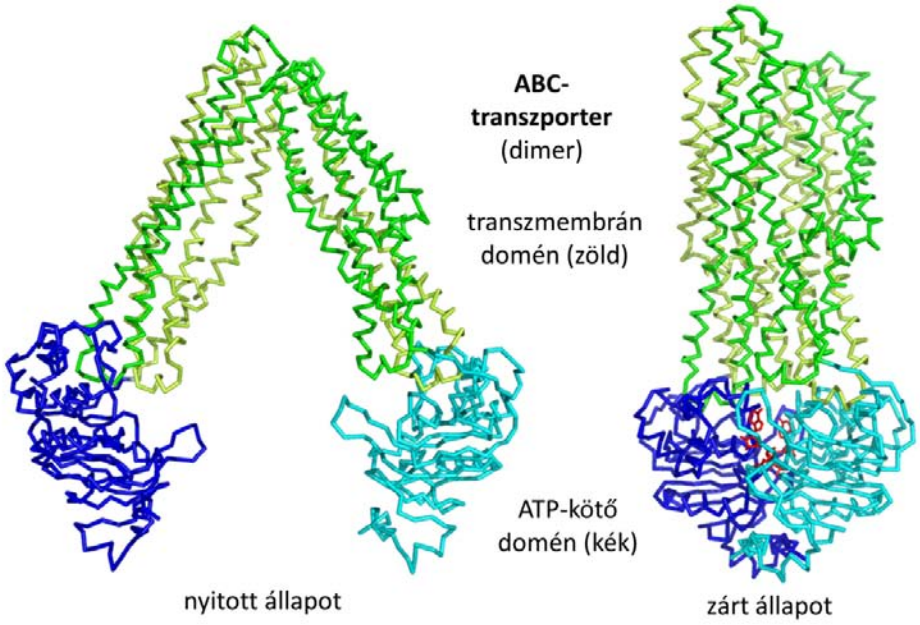


11.28. ábra: A Ca^{2+}-pumpa ATP-áz működésének sémája

Az **ABC-transzporterek** (nevüket arról kapták, hogy tipikus ATP-kötő doménjük van; ABC: *ATP Binding Cassette*). Biológiai jelentőségüket elsősorban a pumpacsalád egyes tagjainak ún**. multidrog-rezisztenciát** okozó

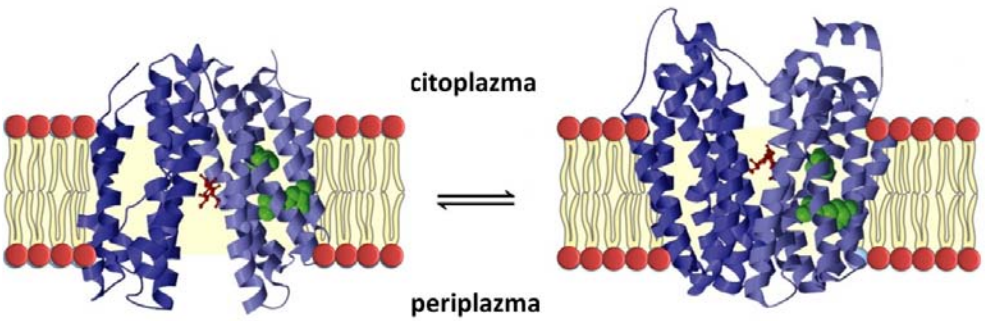
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

szerepének köszönhetik. A tumorsejtek elég gyorsan rezisztenssé tudnak válni citotoxikumokkal szemben. Kiderült, hogy a jelenség molekuláris hátterében egy **MDR** (*multidrog resistance*) nevű ATP-áz membránfehérje túltermelődése felelős. Ezek a fehérjék meglepően széles ligandum-spektrummal rendelkeznek, s például a sejt által „sosem látott" gyógyszereket is, mint xenobiotikumokat (a sejt számára idegen molekula) ki tudják pumpálni. Fiziológiásan a család tagjai sok más (endogén és exogén) molekula transzportjában is szerepet játszanak. Két szerkezeti állapotukat (nyitott és zárt) a **11.29. ábra** mutatja be.



11.29. ábra: Egy ABC-transzporter pumpafehérje két szerkezeti állapota (PDB:3B60, 3B5W)

A szintén energiaigényes **másodlagos transzporter**ek közül példánk a **laktóz-permeáz**. Ez a membránfehérje végzi az *E. coli* baktérium környezetéből a laktóz felvételét a sejtek belső membránján keresztül az ún. proton-hajtóerő potenciális energiáját felhasználva (**facilitált transzport**). A protongradienst az aerob sejtlégzés során a membránban található elektrontranszportlánc komponensei hozzák létre (a folyamatot részletesen az e-könyv második kötetének anyagcsere fejezeteiben tárgyaljuk). A laktóz-permeáz tehát egy **szimporter** (laktóz és protonok párhuzamos transzportja), melynek kifelé és befelé nyitott konformációs állapotát a **11.30. ábra** mutatja. A periplazma oldal felőli extra hidrogénionok az ábrán is feltüntetett egyik Glu oldalláncot protonálják, majd a permeáz köti a szállítandó cukor ligandumot és „átfordul" a citoplazma felé. Ekkor a protonált Glu közelebb kerül egy Arg oldallánchoz (az ábrán szintén feltüntettük), ami elősegíti, hogy leadja a protont és ezzel a konformációs egyensúly újból a kifelé nyitott állapot felé tolódik vissza.



11.30. ábra: A laktóz-permeáz másodlagos aktív transzporter két térszerkezeti állapota (PDB: 2Y5Y). Az ábrán a laktóz ligandum piros, a konformációs átmenetet befolyásoló Glu és Arg oldalláncok zöldek.

A legtöbb másodlagos transzporter, a laktóz-permeázhoz hasonlóan 12 membránhélixből áll, amelyek az evolúció során génduplikációval alakultak ki egy 6 membránhélixet tartalmazó fehérjéből. Az ősi család igen sokrétű

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

feladatot lát el, a kólibaktériumban például a 4000 génből 160 másodlagos transzporter funkciót betöltő fehérjét kódol.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

12. fejezet - Nukleinsavak

(szerző: Pál Gábor)

A fehérjék mellett a nukleinsavak jelentik az élő szervezet másik alapvető makromolekula típusát. A nukleinsavak központi szerepet játszanak az öröklődő biológiai információ tárolásában és fehérjékbe történő kifejezésében. Hosszú, rögös, buktatókkal nehezített út vezetett odáig, hogy a kutatók végül felismerjék a nukleinsavaknak ezt a meghatározó szerepét. Ebben a fejezetben három fő kérdéskört tekintünk át. Megismerkedünk azzal, hogyan sikerült feltárni a nukleinsavak alapvető kémiai felépítését, felidézünk néhány meghatározó kísérletet, amelyek igazolták, hogy a DNS az örökítő anyag, és megismerkedünk a DNS térszerkezetével.

12.1. A nukleinsavak kémiai felépítése

A nukleinsavak felépítésével kapcsolatos első eredmények **Friedrich Miescher** német orvos-kémikus nevéhez fűződnek, aki 1868 körül igyekezett meghatározni a sejtmag kémiai összetételét. Vizsgálatához fehérvérsejteket akart használni, mivel ezek magja a sejt méretéhez képest nagy. Sejtizoláló módszerek híján a szervezetre bízta a fehérvérsejtek dúsítását: mintának **genny**et használt, mivel abban nagyon sok az elpusztult fehérvérsejt. Kimutatta, hogy a mintában egy savas, **foszfor-tartalmú anyag** van. Ezt később **nukleinsav**nak nevezték el. Később lazac hímivarsejtekből ugyanilyen anyagot izolált.

A nukleinsavak kémiai összetételének megbízható azonosítása azonban csak az 1950-es évek elejére fejeződött be elsősorban Phoebus Levene és Alexander Todd munkája nyomán.

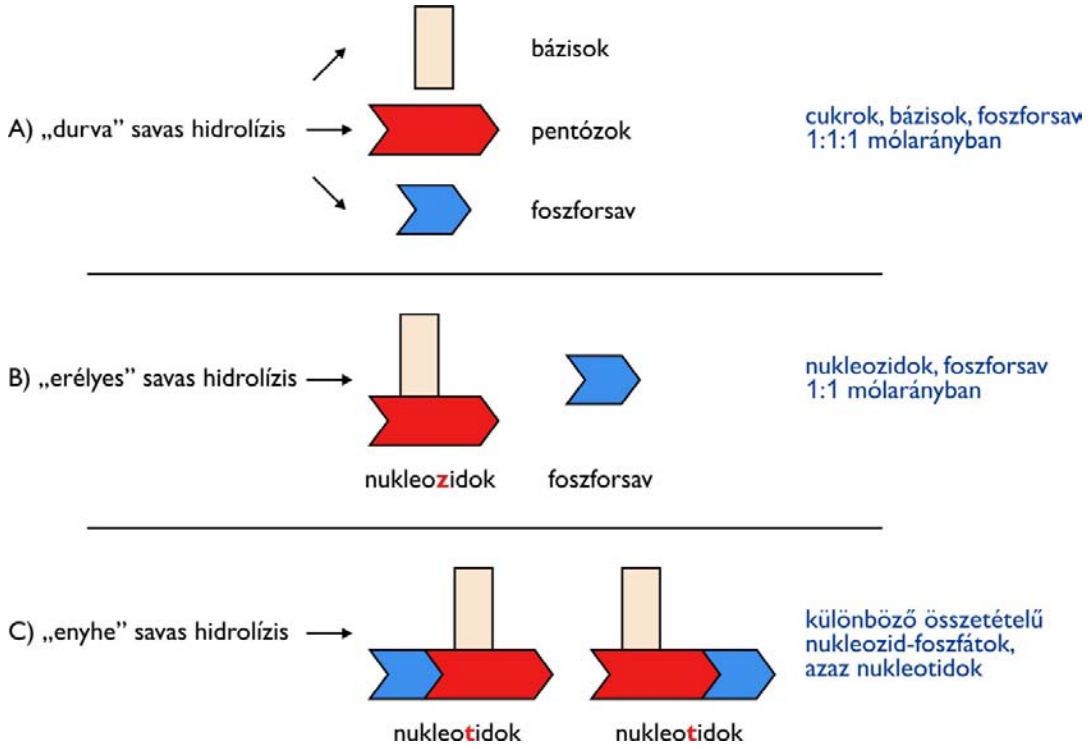
Levene azonosította a nukleinsavakban szereplő ribózt, illetve dezoxiribózt, valamint a bázisokat, és tisztázta ezek egymáshoz kapcsolódásának módját is. Ugyanakkor bevezetett egy olyan téves elképzelést, a tetranukleotid hipotézist, amely sokáig visszavetette a nukleinsavak valós szerepének kiderítését. A tetranukleotid hipotézis szerint a nukleinsavak négy monomerből álló egységekben léteznek. Minden ilyen tetranukleotidban négyféle monomer van jelen. A nukleinsavak valós, lineáris polimer szerkezetét végül Levene munkájára támaszkodva Todd tárta fel.

A fehérjék kémiai felépítésének felderítésénél az Emil Fischer által alkalmazott savas hidrolízis volt a kulcstechnika. A nukleinsavaknál is ugyanezzel próbálkoztak a kutatók, de a fehérjéknél tapasztaltakhoz képest a nukleinsavak esetében nehezebben értelmezhető eredményt kaptak. A fehérjéknél a savas hidrolízis oligopeptideket, és végső soron aminosavakat eredményezett, és viszonylag egyszerű volt bebizonyítani, hogy a fehérjék aminosavak polimerei. A nukleinsavak esetében azonban a hidrolízis körülményeitől függően hol ilyen, hol olyan egyszerűbb-összetettebb építőegységeket kaptak az alábbiak szerint.

„Durva” körülményeket (erősen savas pH, magas hőmérséklet, hosszú idő) alkalmazva **teljes savas hidrolízis**t tudtak elérni, amelynek végeredménye **foszforsav**, egy **öt-szénatomos cukor**, és egy **nitrogén tartalmú gyenge bázis** volt 1:1:1 mólarányban (lásd **12.1. ábra**, felső panel). Ezekből a vizsgálatokból kiderült, hogy **kétféle nukleinsav** van. Az egyikben a pentóz **ribóz**, ezért ezt **ribonukleinsavnak (RNS)** nevezték el, a másikban dezoxiribóz, ezért ezt **dezoxiribonukleinsavnak (DNS)** nevezték el.

Amennyiben a hidrolízist az előzőnél kevésbé durva, de azért „erélyes” körülmények között hajtották végre, 1:1 arányban foszforsavat, és egy összetett vegyület típust, nukleozidot kaptak, amelyben egy cukor és egy bázis volt kovalens kötéssel összekötve (lásd **12.1. ábra**, középső panel).

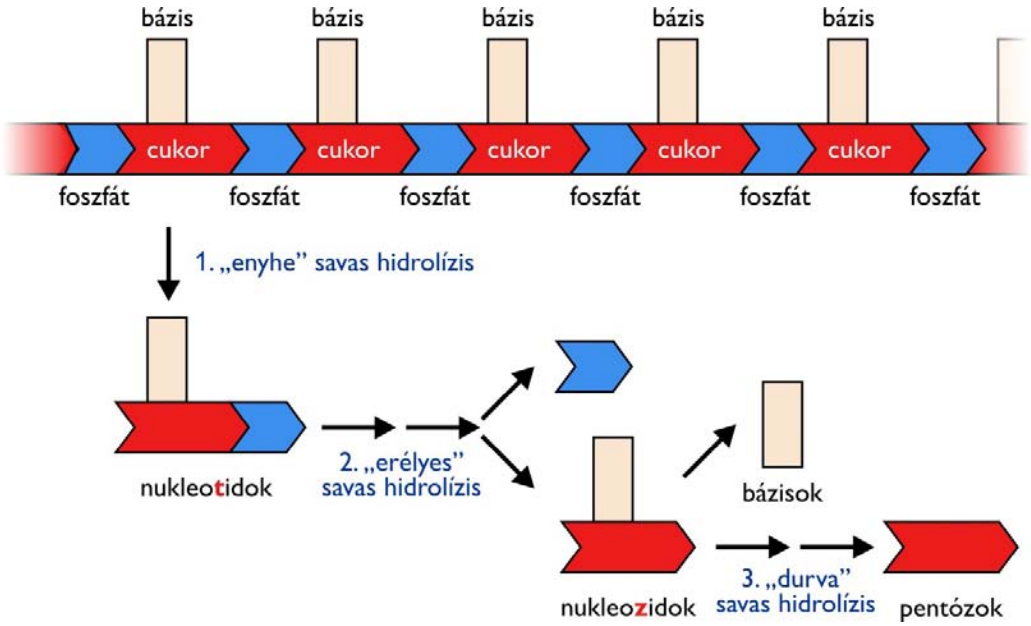
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.1. ábra: A nukleinsavak összetétel-analízise különböző intenzitású savas hidrolízissel

Végül „**enyhe" savas hidrolízis** esetében különböző összetételű **nukleozid-foszfátok**at, vagyis nukleotidokat kaptak, amelyekben a 3-féle vegyülettípus, tehát a pentóz, a bázis és a foszforsav kovalensen kapcsolódott egymáshoz.

A modellt, ami a három eltérő intenzitású hidrolízis eredményeiből következett, a **12.2. ábra** mutatja.



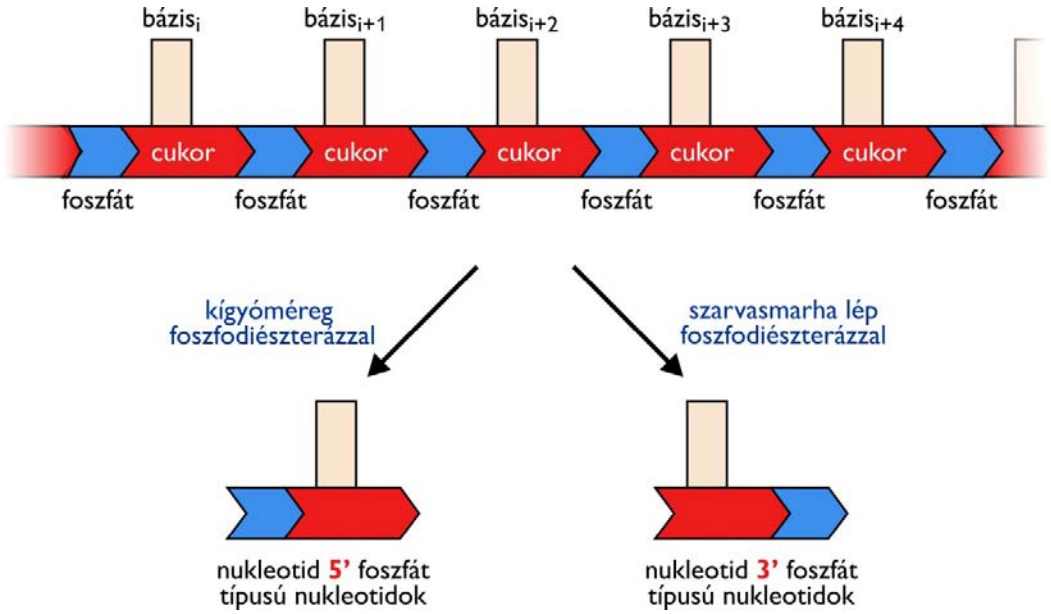
12.2. ábra: A hidrolízisek eredményéből levont legegyszerűbb modell a nukleinsavak kémiai szerkezetére

A legegyszerűbb modell szerint tehát **a nukleinsavak lineáris polimerek**, amelyekben egy **monoton cukorfoszfát gerinc** minden cukor részletéhez 1-1 bázis kapcsolódik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

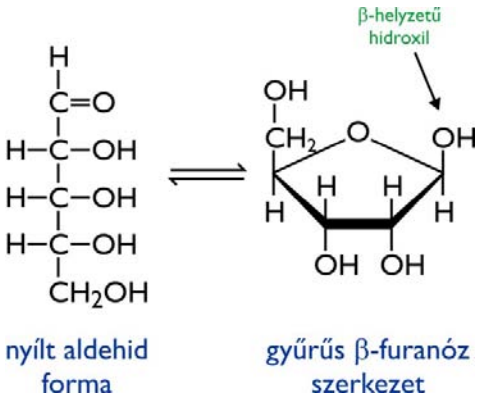
A legegyszerűbb modellben **foszfodiészter kötések** tartják össze a szomszédos cukor részeket. A modell igazolásában döntő szerepe volt annak, hogy a savas hidrolízis helyett nukleinsav bontó enzimek, tehát nukleázok hidrolízisének eredményét is vizsgálták. Az enzimek specifikus módon képesek kémiai reakciókat katalizálni, így vélhető volt, hogy a savas hidrolízisnél szelektívebb hasításokat lehet velük elérni.

Valóban, így is történt. Amikor ugyanannak a DNS mintának egyik részét kígyóméregből származó foszfodiészteráz enzimmel kezelték, akkor a termékek olyan nukleotidok voltak, amelyeken a foszfátcsoportok rendre a cukor 5'-hidroxiljával voltak észter kötésben. Amikor azonban szarvasmarha lépből izolált foszfodiészterázt alkalmaztak, akkor olyan nukleotidok keletkeztek, amelyekben a cukor 3' hidroxiljét észteresítette a foszforsav (lásd **12.3. ábra**).



12.3. ábra: Enzimkatalizált hidrolízis igazolja a nukleinsavak lineáris, el nem ágazó szerkezetét

Nézzük meg részletesebben a nukleinsavak egyes alkotóvegyületeit. A nukleinsavak **cukor rész**e egy **öt-szénatomos aldóz**. Az aldehid csoport csak a nyíltláncú formán van jelen. A nukleinsavban a **gyűrűs, furanóz** forma van jelen. A csak a gyűrűs forma C1' szénatomjához kapcsolódó **glikozidos-OHβ-helyzetű**, vagyis a gyűrű síkjához képest azonos irányban áll, mint a C4' szénatomhoz kapcsolódó $–CH_2$-OH csoport (lásd **12.4. ábra**).



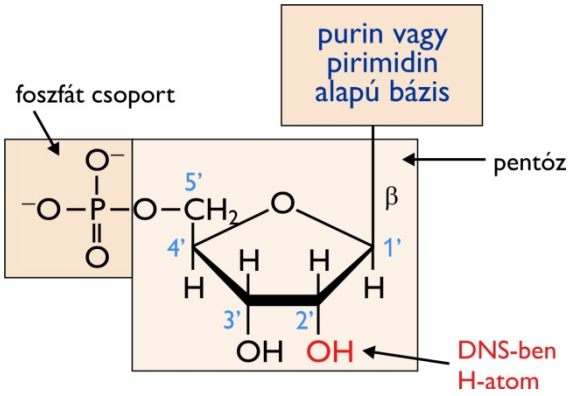
12.4. ábra: A nukleinsavak cukorrésze egy 5-szénatomos aldóz (a képen a ribóz szerepel)

A bázis a csak a gyűrűs formában meglévő glikozidos hidroxilcsoport lecserélésével kapcsolódik a cukorhoz. Emiatt a cukor **stabilan gyűrűs formá**ban rögzül, hiszen a hidroxil hiányában nem tud reverzibilisen felnyílni (lásd **12.5. ábra**).

A **nukleinsavak monomer egysége**, amelynek ismételt beépülésével jön létre a polimer, **a nukleotid** (lásd **12.5. ábra**). A nukleinsavakban lévő cukorrész szénatomjainak számozása a cukrok általános számozását követi, de a

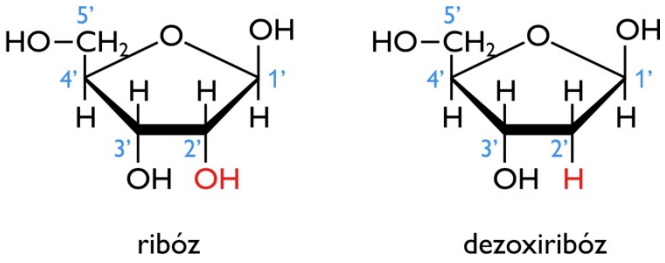
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

pozíció egy vesszőjelet is kap, ami megkülönbözteti a cukorban lévő szénatomokat a bázisban lévőktől (mely utóbbiaknál nem alkalmazzák a vesszős jelölést).



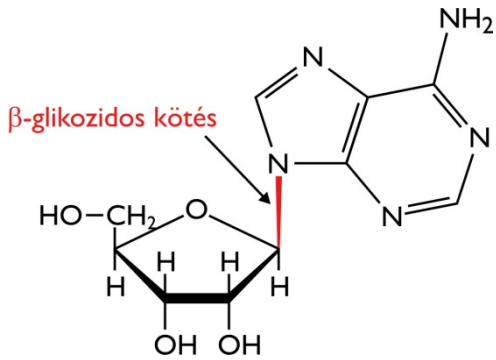
12.5. ábra: A polimer nukleinsavak alapegysége a nukleotid

Az **RNS-ben** szereplő cukorrész, a **ribóz** mind a 3', mind a 2' szénatomján hidroxilcsoportot hordoz. A DNS-ben szereplő 2'-dezoxiribóz azonban a nevéhez híven a 2' szénatomján nem hordoz hidroxilt, azt egy hidrogénatom helyettesíti (lásd **12.6. ábra**).



12.6. ábra: Az RNS-alkotó ribóz és a DNS-alkotó dezoxiribóz

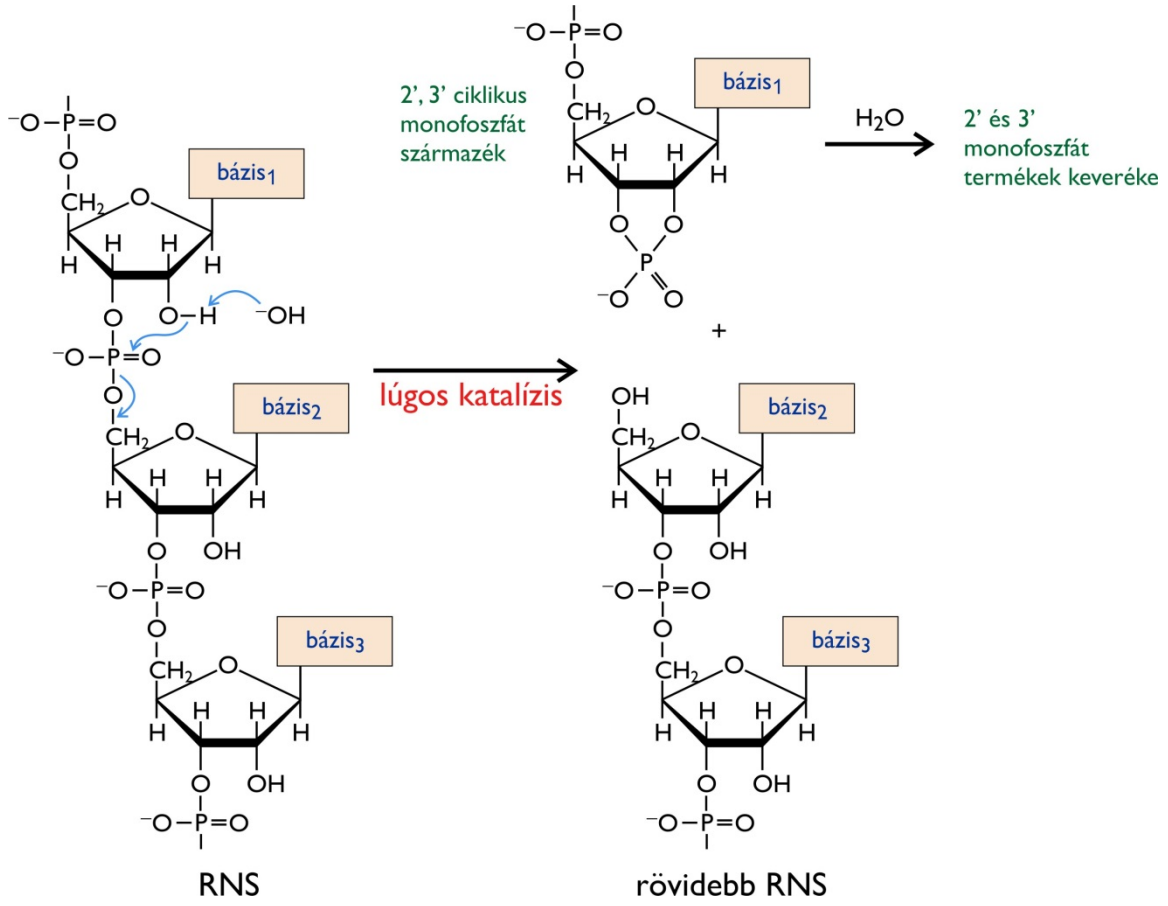
A kötést, amivel a nukleinsavakban **a bázis a cukorhoz** kapcsolódik, N-glikozidos kötésnek nevezzük. A bázis örökli az eredeti glikozidos hidroxil β-helyzetét, ezért ez egy **β-N-glikozidos kötés** (lásd **12.7. ábra**).



12.7. ábra: A cukor és a bázis között β-N-glikozidos kötés van

A nukleinsavak kémiai felépítésének felderítésében a **lúgos hidrolízis**t is megpróbálták. Meglepetésre kiderült, hogy az **RNS** bázis-katalizált hidrolízissel **gyorsan lebomlott**, míg a **DNS ellenálló**nak bizonyult (lásd **12.8. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.8. ábra: Az RNS lúgos hidrolízise

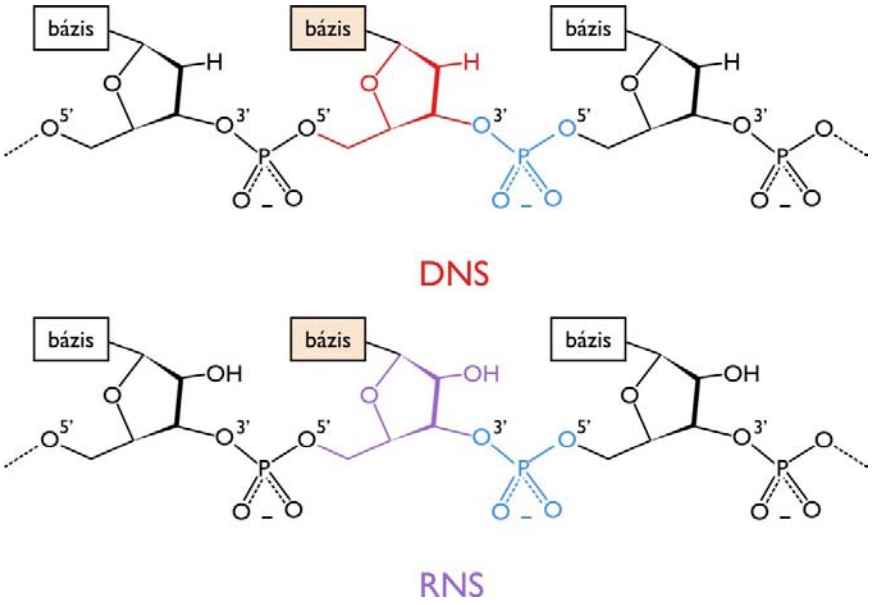
Az RNS kémiai felépítésének felderítését hátráltatta, hogy lúgos hidrolízis után a keletkezett nukleotid termékekben a foszfátcsoport vegyesen a 3' és a 2' hidroxilt észteresítette, tehát nem volt világos, hogy a kiindulási anyagban milyen volt a foszfodiészter kötések elrendeződése.

Ma már ismert tény, hogy **az RNS** – a DNS-sel szemben – azért érzékeny **báziskatalizált hidrolízis**re, **mert rendelkezik 2'-OH csoporttal**. Lúgos közegben az oldatban lévő hidroxidionok protont vonnak el a 2'-OH csoporttól, amely így erős nukleofil csoporttá válik, és molekulán belüli támadást intéz a mellette lévő, a 3'-hidroxilt észteresítő foszfát foszforatomján (lásd **12.8. ábra**). A reakció **köztes terméke** egy olyan vegyület, amelynek ribóz csoportját egyetlen foszforsav észteresíti egyszerre a 2'-, és a 3'-hidroxilcsoporton. Ez a **2',3'-ciklikus monofoszfát** származék bomlik fel vegyesen 2'-monofoszfát, illetve 3'-monofoszfát formára.

Az **RNS esetében is** enzimes hasítások termékeinek vizsgálata igazolta, hogy a foszforsav a ribóz 3'- és 5'-hidroxiljait észteresíti, és az egyes nukleotid egységeket szabályos sorrendben, **3'-5' foszfodiészter kötések** kapcsolják össze. A **12.9. ábra** mutatja a DNS és az RNS láncot, kihangsúlyozva a 2'-szénatom eltérő szubsztitúcióját. Látható, hogy mindkét vegyület lineáris polimer, amelyben a cukorfoszfát gerinc azonos kapcsolódási rendszerben alakul ki. Mindkét molekula egyedi tulajdonságát **a bázisok sorrendje** jelenti.

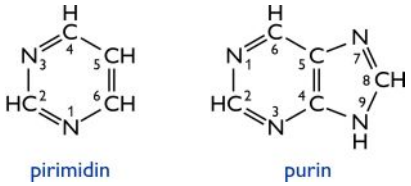
Mindkét el nem ágazó polimernek **irányultság**a van. Az egyik végen a ribóz 5'-, a másikon a 3'-hidroxilcsoportja található. A láncnak tehát van egy **5'-vég**e, és egy **3'-vég**e.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



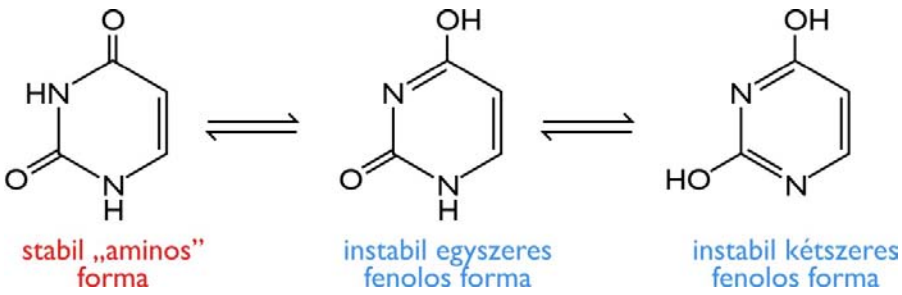
12.9. ábra: A nukleinsavak információt hordozó molekulák, az információt a bázisok sorrendje jelenti

Ezek után térjünk rá a bázisok ismertetésére. A DNS-ben és az RNS-ben előforduló bázisok kémiai felépítése **kétféle heterociklusos** szerves **bázis** szerkezetéből vezethető le, az egyik a **pirimidin**, a másik a **purin** (lásd **12.10. ábra**). A pirimidin és a purin a nukleinsavak bázisainál erősebb bázisok. Míg ezek a bázisok semleges kémhatáson képesek protont felvenni, a **nukleinsavak bázisai fiziológiás pH-n nem vesznek fel protont**. A purin váz egyes atomjainak pirimidinétől eltérő számozási logikáját Emil Fischer vezette be. Ez a számozás öröklődik a nukleinsavak bázisainál is.



12.10. ábra: A nukleinsavakban található bázisok pirimidin illetve purin származékok

A heterociklusos vegyületek esetében a molekula eltérő **tautomer állapotok**ban fordulhat elő. Az egyes tautomer formák termodinamikai egyensúlyban állnak egymással, rendszerint csak az egyik forma dominál. Ezt a **12.11. ábra** az RNS-alkotó uracil bázis példáján mutatja be.

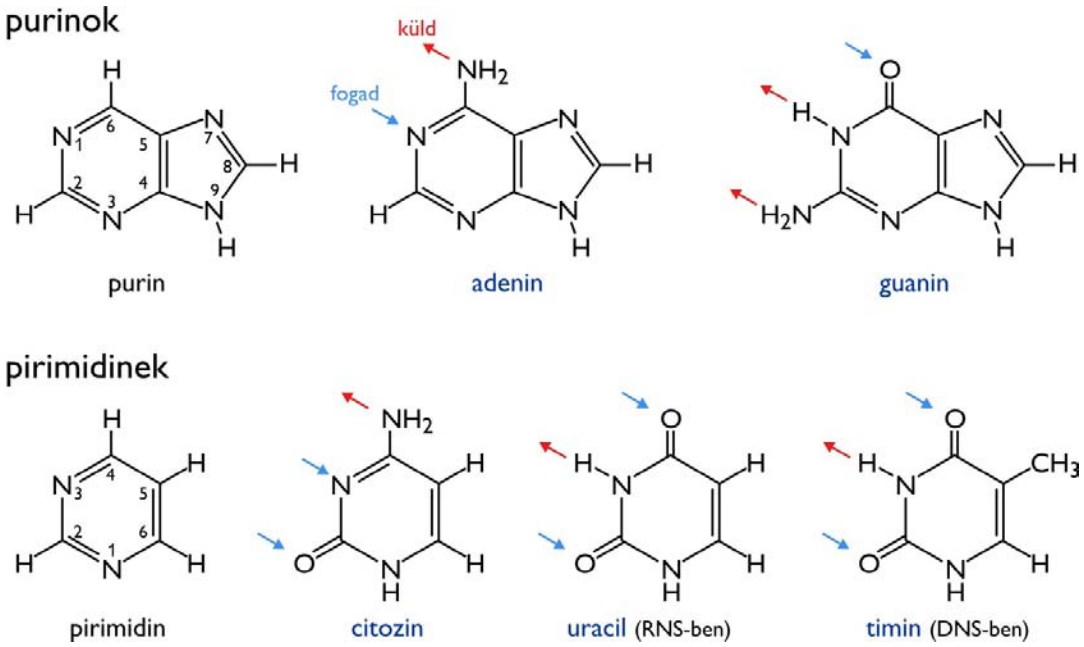


12.11. ábra: Az uracil tautomer állapotai

Amikor a nukleinsavak kémiai felépítését feltárták, még nem volt megbízható ismeret arra vonatkozóan, hogy mely tautomer formák a stabilabbak, tehát ennek megfelelően melyek fordulnak elő a legnagyobb arányban. Mint később látni fogjuk, a DNS kettősspirál szerkezeti modelljének megalkotása csak a helyes tautomer állapotok alkalmazásával volt lehetséges.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A **12.12. ábra** mutatja be az RNS-ben illetve a DNS-ben előforduló bázisokat azok stabil tautomer formájában. Az ábra jelzi, hogy ebben a formában a bázis egyes funkciós csoportjai milyen szerepet játszanak hidrogénhíd kötés kialakítása során. Az ábrán szereplőtől eltérő tautomer állapotok eltérő hidrogénhíd mintázatokat jelentenének.



12.12. ábra: A nukleinsav bázisok egyes csoportjai H-hidas kölcsönhatásban küldő, vagy fogadó szerepet játszhatnak

A **12.1. táblázat** összefoglalva ismerteti a bázisok**, nukleozidok és nukleotidok nevezéktaná**t mind az RNS, mind a DNS tekintetében.

12.1. táblázat: Bázisok, nukleotidok, nukleozidok nevezéktana

Bázisok, nukleotidok, nukleozidok nevezéktana			
Bázis	Nukleozid	Nukleotid	Nukleinsav
purinok			
adenin	adenozin	adenozin-foszfát	RNS
	dezoxiadenozin	dezoxiadenozin-foszfát	DNS
guanin	guanozin	guanozin-foszfát	RNS
	dezoxiguanozin	dezoxiguanozin-foszfát	DNS
pirimidinek			
citozin	citidin	citidin-foszfát	RNS
	dezoxicitidin	dezoxicitidin-foszfát	DNS
timin	timidin ill. dezoxitimidin	timidin- ill. dezoxitimidin-foszfát	DNS
uracil	uridin	uridin-foszfát	RNS

Az elnevezések önkényesek, ugyanis a bázisok neve izolálásukkal kapcsolatos. A guanint például először madárürülékből (guanó), a timint pedig a csecsemőmirigyből (timusz) izolálták.

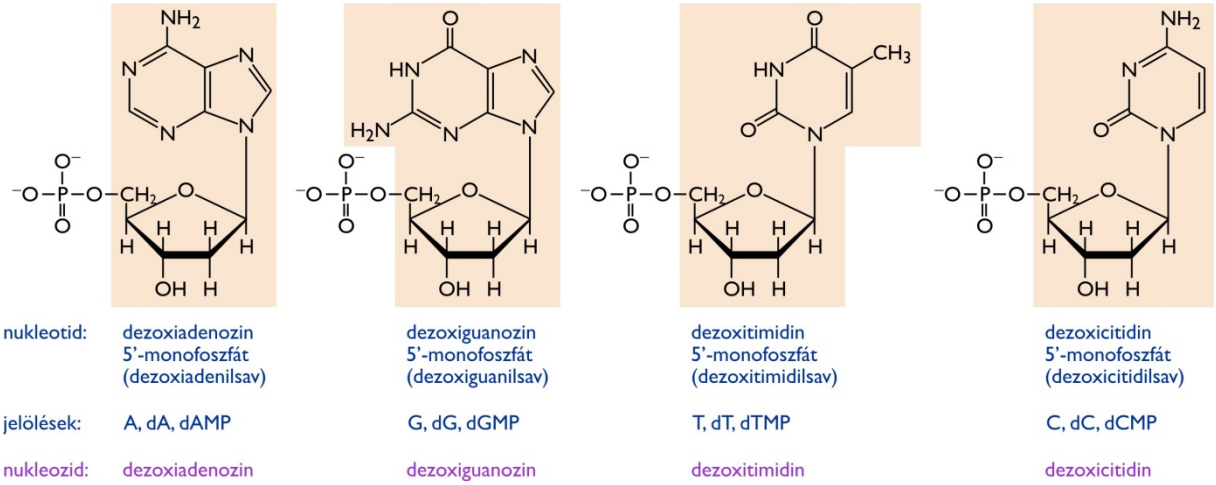
A nevezéktan elsajátításában ügyelni kell arra, hogy a citozin bázis nevének alakja hasonlít a guanozin és adenozin nukleozidok nevének alakjára.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

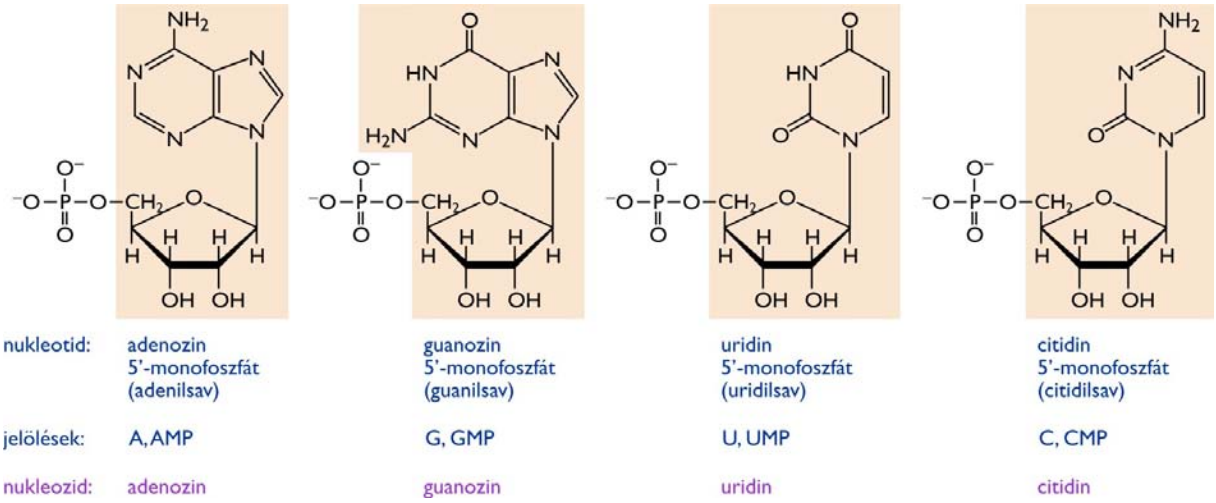
A **két purin bázis** és a **citozin egyaránt RNS- és DNS-alkotó**, míg **az uracil csak RNS-ben**, **a timin** pedig **csakDNS-ben** fordul elő. (Pontosabban bizonyos RNS-ek esetében az RNS-láncban lehet jelen timin, de az csak az RNS szintézisét követően, tehát utólagos kémiai módosítás eredményeként jelenhet meg.)

Emiatt a nukleozidoknál a timidinnél sokszor lehagyják a dezoxi előtagot. A timidin abban a ritkább esetben kap új nevet, amikor RNS alkotóként szerepel, mint különlegesen módosult nukleozid, illetve nukleotid. Ilyenkor a ribotimidin nevet kapja.

A **nukleotidok**, lévén savas molekulák, régies néven savként is nevezhetők. Pl. az adenozin 5'-monofoszfát az adenilsav. Az 5'-monofoszfát nukleotidok elnevezéseit DNS illetve RNS tekintetében a **12.13. ábra** illetve a **12.14. ábra** foglalják össze. A szerkezetek a semleges kémhatású közegben előforduló szabad nukleotidokat mutatják be, melyeken a foszfát két negatív töltést hordoz. A bázisok a legstabilabb tautomer szerkezetben szerepelnek. A rózsaszínnel kiemelt részletek a megfelelő **nukleozidok**at mutatják. Az ábrákon szereplő, számozást nem mutató rövidítések mindig feltételezik, hogy a foszfát az 5' szénen van.



12.13. ábra: DNS-alkotó nukleotidok és nukleozidok

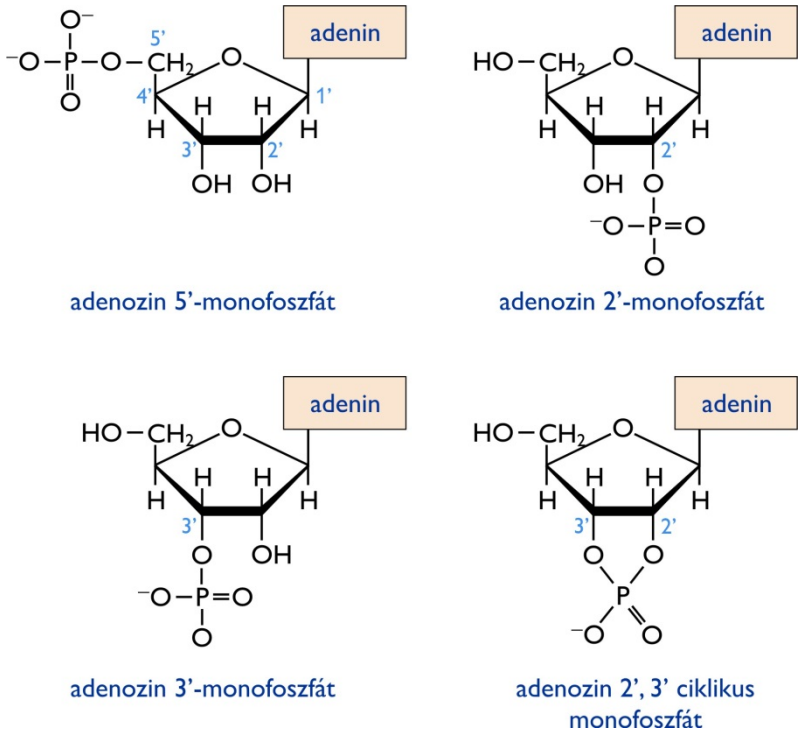


12.14. ábra: RNS-alkotó nukleotidok és nukleozidok

A nukleotidoknál meg kell nevezni a foszfátok számát és kapcsolódási helyét. Ha például a foszfát az adenozinon az 5' pozícióban van, akkor az elnevezés adenozin 5'-monofoszfát, 5'-AMP.

Mivel a szabadon előforduló nukleotidoknál a foszfát leggyakrabban az 5' helyen található, ilyenkor ezt sokszor elhagyják (5'AMP helyett csak AMP-t írnak) és csak akkor jelzik a foszfátcsoport helyét, ha az nem az 5'-hidroxilt észteresíti (lásd **12.15. ábra**).

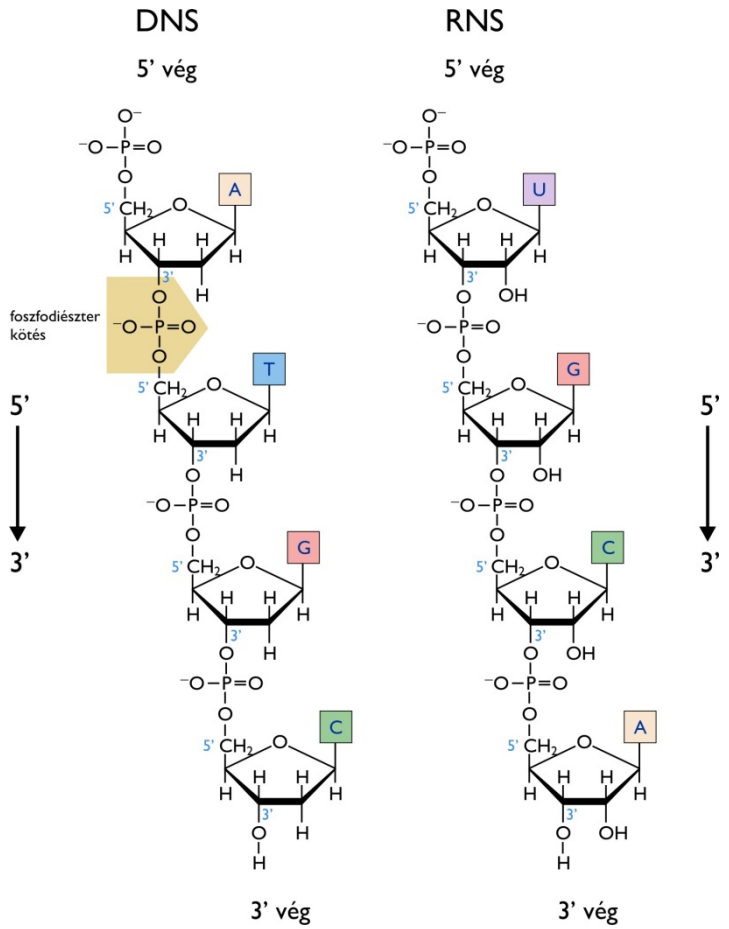
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.15. ábra: A nukleotidok számos pozícióján lehet foszfátcsoport

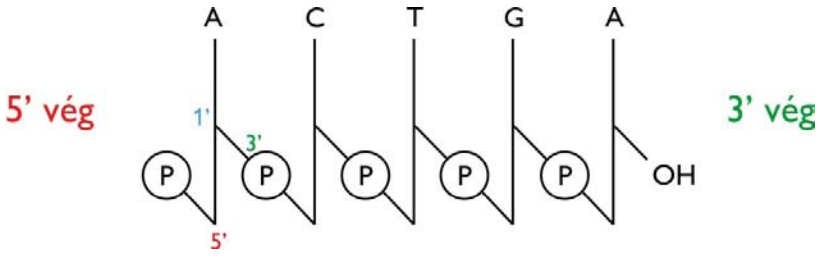
Mind a DNS, mind pedig az RNS láncának **irányultság**a van, mely annak köszönhető, hogy a ribóz, illetve a dezoxiribóz egy aszimmetrikus molekula. A lánc irányát **a ribóz szubsztituált hidroxiljai szerint** jellemezzük. A **lánc felírás**ánál az irányt jelölni kell! Ha nincs jelölve, akkor megegyezés szerint a felírás **5'→3' irány**t jelent. A cukorfoszfát gerinc mindkét nukleinsav esetében monoton jellegű. A változatosságot, az információt a különböző bázisok egymás utáni sorrendje jelenti (lásd **12.16. ábra**). Vegyük észre, hogy a fehérjéknél a főláncon az egymást követő aminosav oldalláncok jelentik a specifikus információt.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.16. ábra: A nukleinsavaknak 5'-3' irányultságuk van

A bázissorend jelölése történhet a cukorfoszfát gerinc részleteinek bemutatása nélkül is, például a **12.17. ábrán** bemutatott módon.



12.17. ábra: A nukleinsav lánc sematikus ábrázolása

A cukorfoszfát gerinc lineáris és monoton szerkezete miatt ugyanakkor egy nukleinsav jellemezhető pusztán a bázisok egymás utáni sorrendjével, tehát az úgynevezett szekvenciával is. Az alábbi egyszerűsítéseket vezették be lépésekben ahhoz, hogy szövegesen is egyszerű legyen a szekvenciát rögzíteni. Az egyszerűsítés három lépésben történhet.

5'-pApCpGpTpA-3'

Ebben az esetben még jelezzük a foszfát-észtereket. A következő egyszerűsítési lépésben elhagyhatjuk a nyilvánvalóan jelenlévő köztes foszfodiészter kötések jelölését:

5'-pACGTA-3'

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

További egyszerűsítésként, ha egyetlen lánc van, akkor azt megegyezés szerint 5’-végtől 3’-vég felé haladva írjuk fel, így a terminálisokat sem kell feltüntetni, és elérjük a lehető legegyszerűbb formát:

pACGTA

A terminális foszfátcsoportot (ha van) természetesen ilyenkor is jelezni kell.

12.2. A nukleinsavak örökítő szerepének bizonyítása

A kutatók számára a huszadik század első felében már ismertté vált, hogy az élő szervezetben a legkülönbözőbb funkciókat fehérjék töltik be. Már a monomer egységek diverzitása tekintetében is világos volt, hogy a fehérjék kémiailag sokkal változatosabbak, mint a nukleinsavak. Az elsőként megismert enzimeknek ráadásul mindegyike fehérje volt. Mindezek alapján nem tűnt kétségesnek, hogy az a vélhetőleg rendkívül komplex rendszer, amely képes a szervezetre vonatkozó biológiai információ tárolására, és generációról generációra történő átadására, fehérjéken alapul. Ráadásul a negyvenes évek közepéig elfogadott volt Levene hibás tetranukleotid hipotézise, amely kizárta, hogy a DNS információhordozó legyen. Az alábbiakban három olyan kísérletet tekintünk át, amelyek az örökletes információ átadásának miként jét kutatták.

12.2.1. A Griffith-kísérlet

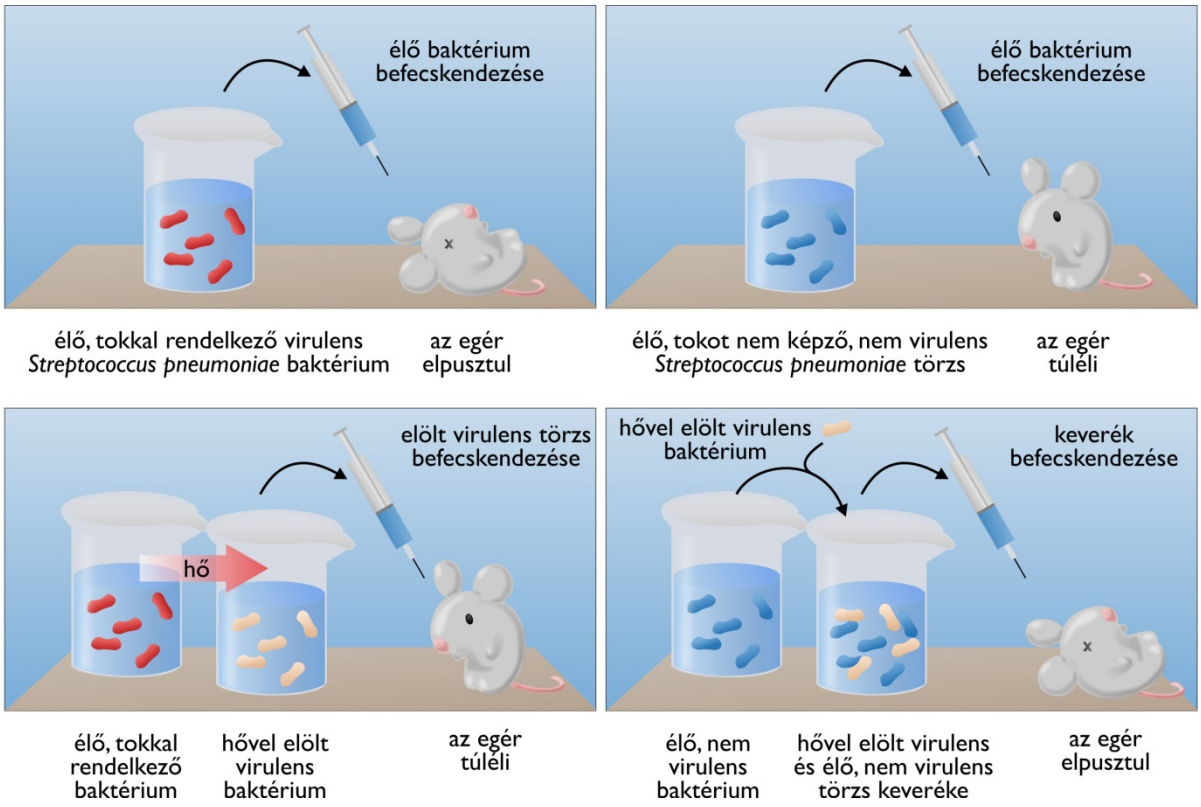
Frederick **Griffith** angol bakteriológus a bakteriális tüdőgyulladás egyik kórokozójával, a *Streptococcus pneumoniae*-val kísérletezett. Az említett baktériumot ki lehetett tenyészteni tüdőgyulladásos betegek szervezetéből. Több eltérő törzset is kitenyésztettek, amelyeket úgynevezett szerológiai tesztekkel, illetve az agar lemezen szaporodó baktériumok által létrehozott telepek eltérő morfológiája alapján lehetett azonosítani. A törzsek között volt betegséget okozó (**virulens**) úgynevezett **S-törzs**, ami sima felszínű (*smooth*) telepeket képezett, és betegséget nem okozó (**nem-virulens**) **R-törzs**, ami durva felszínű (*rough*) telepeket képzett. Ismeretes volt, hogy az S-törzs egy poliszacharid-alapú tokot hoz létre, míg az R-törzs nem rendelkezik ilyen tokkal. A két törzs természetesen generációról generációra örökítette ezt a tulajdonságát. Az akkori ismeretek szerint ezek a tulajdonságok megváltoztathatatlan sajátjai voltak ezeknek a törzseknek. Griffith azt vizsgálta, hogy ez valóban így van-e, vagy esetleg a két törzs egymásba alakulhat.

Amikor Griffith az S-törzzsel fertőzött egereket, az egerek elpusztultak (lásd **12.18. ábra**). Ma már tudjuk, hogy a tok jelenléte akadályozta az egér immunrendszerének hatékony védekező reakcióját. Amikor R-törzzsel fertőzte az egereket, az egerek nem betegedtek meg (mivel az immunrendszerük sikerrel elpusztította a tok nélküli sejteket).

Amikor hővel elölt S-törzset juttatott az egerekbe, az egerek túléltek, tehát nem valamilyen hőstabil toxin okozta a megbetegedést. Amikor azonban hővel elölt S-törzs és kezeletlen R-törzs keverékét juttatta be az egerekbe, az egerek egy része elpusztult. Az elpusztult egerekből Griffith ki tudta tenyészteni mind az R-törzset, mind pedig az S-törzset.

Griffith azt a következtetést vonta le a kísérletekből, hogy az elölt **S-törzsből** valamilyen **örökletes információt hordozó anyag átjut az élő R-törzs sejtjeibe**, és a sejtek egy részét stabilan S-törzzsé alakítja, mintegy áttranszformálja. A jelenséget **transzformáció**nak nevezte el. Mivel akkoriban már ismert volt a fehérjék hődenaturációja, Griffith feltételezte, hogy a transzformáló anyag nem fehérje, de az anyag kémiai mibenlétéről ennél többet nem állapított meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.18. ábra: A Griffith-kísérlet

12.2.2. Az Avery-MacLeod-McCarty kísérlet

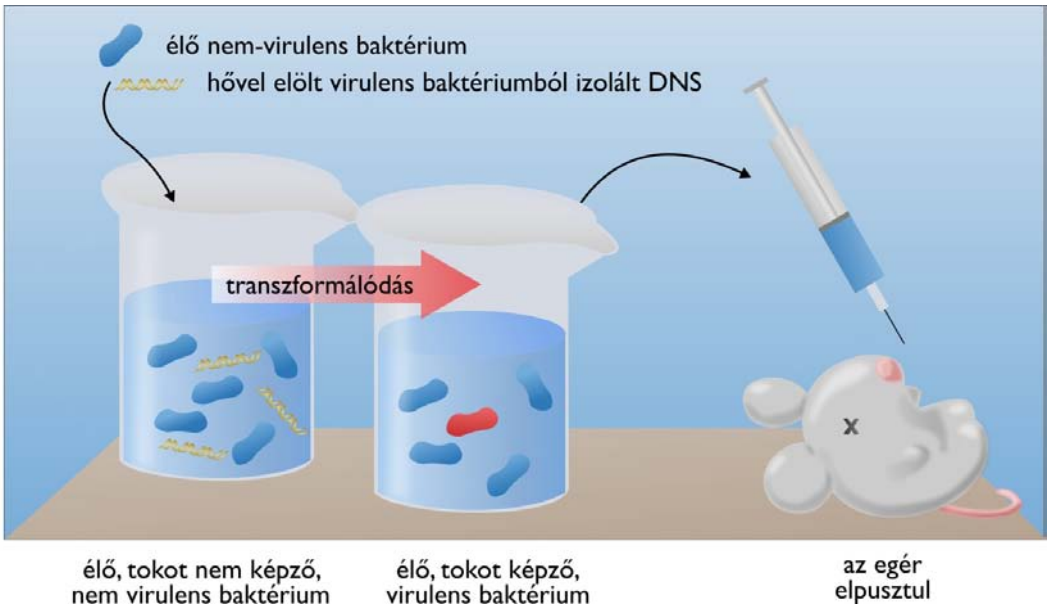
Oswald T. Avery, **Colin MacLeod** és **Maclyn McCarty1944**-ben a Griffith kísérlet alapján igyekeztek kideríteni, hogy milyen anyag kerül át a hővel elölt virulens baktériumból a nem-virulens baktériumba, tehát mi okozza a Griffith által transzformációnak nevezett jelenséget. A vizsgálat idején még nem álltak rendelkezésre mindazok a technikák, amelyekkel rendkívül nagy tisztaságban, homogén formában elő lehetett volna állítani nukleinsav-mentes fehérjepreparátumot, illetve fehérje-mentes nukleinsav-preparátumot. Avery és munkatársai a kor lehetőségei szerint elválasztották a hővel elölt virulens baktérium anyagait, és sikerült viszonylag nagytisztaságú, elsősorban DNS-t tartalmazó frakciót készíteniük. Ez a **DNS**-frakció kiváló **transzformáló hatású**nak bizonyult, de ki kellett zárniuk, hogy nem a frakcióban szennyezésként jelenlévő fehérje illetve RNS komponensek okozzák a valódi hatást.

Mivel további tisztítást nem tudtak végezni, a homogén formában történő izolálás helyett egy rendkívül ötletes, ellentétes megközelítést alkalmaztak. Akkoriban már különböző élőlényekből elő lehetett állítani – ha nem is homogén, de kellően nagy tisztaságú formában – fehérjebontó enzimeket (proteázokat), RNS-bontó enzimeket (RN-ázokat) és DNS-bontó enzimeket (DN-ázokat).

Amikor a transzformálásra képes frakciót proteázokkal, vagy RN-ázzal kezelték, a frakció transzformáló képessége nem változott (lásd **12.19. ábra**).

A transzformációt tehát nem fehérje, vagy RNS okozta. A DN-áz hatására azonban a frakció inaktív lett. Ezzel Avery, MacLeod és McCarty elsőként igazolták, hogy egy örökletes tulajdonság hátterében a DNS áll. Bár az elkövetkező években a közleményt sokan idézték, az eredmények nem győzték meg a kutatók többségét arról, hogy a DNS lenne az univerzális örökítő anyag. Ennek széleskörű elfogadásához az kellett, hogy egy teljesen független, eltérő folyamattal kapcsolatban is a DNS bizonyuljon örökítő anyagnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.19. ábra: Avery, MacLeod és McCarty igazolják, hogy a Griffith kísérletben szereplő örökítőanyag DNS

12.2.3. A Hershey-Chase kísérlet

Az örökítéssel kapcsolatos kutatások egy virágzó ágává vált az 1940-es évektől kezdve a baktériumokat fertőző vírusok, vagyis a bakteriofágok működése. Az egyik kedvelt kísérleti objektum a T2 bakteriofág volt. A T2 bakteriofág, mint minden vírus, a gazdasejtet megfertőzve úgy programozza azt át, hogy a sejt új, az eredetivel azonos vírusokat termeljen. A Griffith kísérletben megjelenő transzformáló anyaghoz hasonlóan tehát itt is valamilyen örökítő anyag jut be a sejtbe, csak most éppenséggel egy vírusból. Ez az örökítő anyag hordozza a vírusok keletkezésére vonatkozó információt. Az új fágok termeléséhez szükséges információt tehát a fág hordozza, és juttatja be a sejtbe. Ismert volt, hogy a fágok fehérjéből és DNS-ből állnak. Akkoriban az volt az általános nézet, hogy a fág fehérje komponensei rendelkeznek örökítő funkcióval.

Ahhoz, hogy eldöntsék, valójában a fág fehérje, vagy DNS komponense örökít-e, azt kellett volna kideríteni, hogy a fágfertőzés során milyen anyagot juttat a fág a baktériumsejtbe: fehérjét, vagy DNS-t.

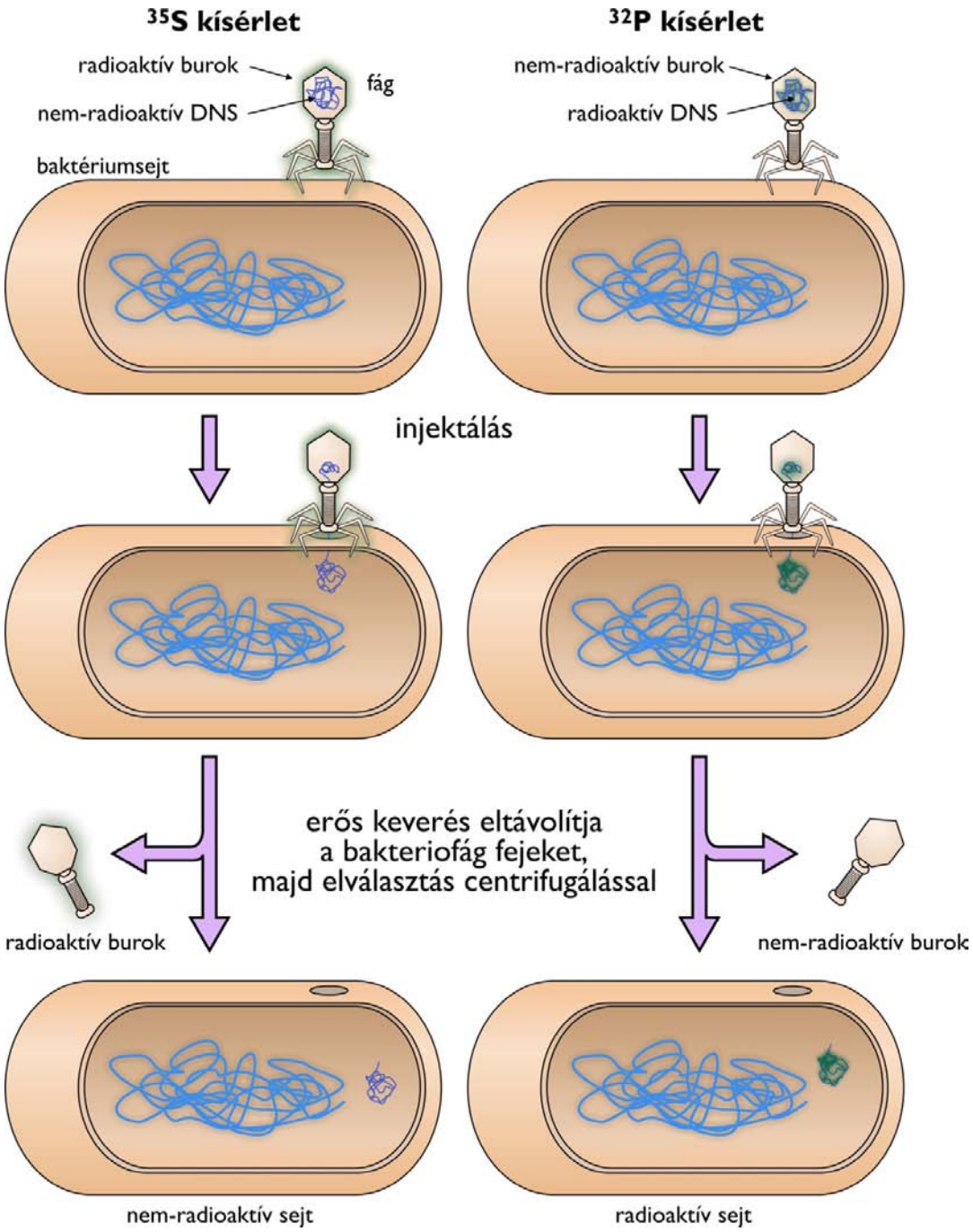
Alfred **Hershey** és laboránsa Martha **Chase 1952**-ben ennek járt utána egy rendkívül szellemes, egyesek szerint a molekuláris biológia megszületését jelentő kísérletben (lásd **12.20. ábra**).

A következő gondolatmenet mentén haladtak. A DNS tartalmaz foszfort, de nem tartalmaz ként, a fehérjék pedig tartalmaznak ként, de (általában) nem tartalmaznak foszfort. Mind a foszfor, mind a kén esetében rendelkezésre állt radioaktív izotóp forma. A kísérletben két külön baktériumtenyészetet hoztak létre. Az egyik tenyészetet radioaktív foszfort tartalmazó, a másikat radioaktív ként tartalmazó tápoldatban szaporították.

A két különbözőképpen jelölt tenyészetet fágokkal fertőzték. A **radioaktív foszfort tartalmazó** baktériumok olyan **fágok**at termeltek, amelyek DNS-e radioaktívan jelölt lett, míg a fehérjéik jelöletlenek maradtak. A **radioaktív ként tartalmazó** táptalajon növesztett baktériumok olyan **fágok**at termeltek, amelyek fehérjéi voltak radioaktívan jelöltek, míg a DNS-ük nem.

A fágokat a sejtektől centrifugálással választották el, a két tenyészetből a kétféle fágot külön-külön izolálták. Ezután következett a kísérlet érdemi része. A kétféle fág izolátummal külön-külön kísérletben radioaktívan nem jelölt baktériumokat fertőztek. A fertőzés nagyon gyors folyamat, a sejteken másodpercek alatt megtapadnak a fágok, és bejuttatják a sejtbe az örökítő anyagot.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.20. ábra: A Hershey-Chase kísérlet: a T2 fág DNS-t juttat a kóli sejtbe, ezáltal azt T2 fágok gyártására kényszeríti

A kísérlet kritikus eleme az volt, hogy a rövididejű fertőzést követően valahogyan leszedjék a baktériumok felszínéről a fágokat, hiszen azt kellett megállapítaniuk, hogy a fágtól megszabadított baktérium sejtek melyik esetben mutatnak radioaktivitást: amikor radioaktív kénnel jelölt fággal lettek fertőzve, vagy amikor radioaktív foszforral jelölt fággal.

A sejtekről a fágokat rendkívül gyors keveréssel (amelyhez egy botmixer-szerű készüléket használtak) távolították el. A nyíróerők lesodorták a fágokat a baktériumokról, majd a baktériumokat és a fágokat centrifugálással választották el egymástól.

Kiderült, hogy a **baktériumsejtbe csak a foszfor-jelölt fágból jutott be radioaktív anyag**. Ezek alapján a Hershey-Chase kísérlet is arra az eredményre jutott, hogy **a genetikai információt a DNS hordozza**. A fágok genetikájával

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

kapcsolatos eredményeikért Alfred Hershey Max Delbrück-kel és Salvador Luria-val megosztva 1969-ben orvosi Nobel-díjat kapott

Az 1952-es kísérlet után már széles körben elfogadottá vált az a megállapítás, hogy a DNS az örökítő anyag. Ennek megfelelően hatalmas versenyfutás indult el a DNS szerkezetének megfejtéséért.

A szerkezet megfejtése nem váratott magára sokáig, James Watson és Francis Crick egy évvel később megalkották a DNS térszerkezetének kettősspirál modelljét. A modell mindenben megerősítette a DNS örökítő szerepével kapcsolatos korábbi állításokat, ugyanis azonnal fényt derített arra, miként képes a DNS az örökletes információt tárolni, és azt generációról generációra változatlan formában továbbadni.

12.2.4. A Chargaff szabályok

Edwin Chargaff csoportja a 40-es évek végére kidolgozta a DNS-alkotó nukleotidok izolálásának, elválasztásának és mennyiségi meghatározásának módszereit, és az alábbi megfigyeléseket tette.

A DNS bázisok aránya fajra jellemző érték.

Rendszertanilag közeli fajok esetén az arányok hasonlóbbak, mint távoli fajoknál.

Egy adott faj egyedeinél minden sejt azonos arányban tartalmazza a DNS bázisokat.

A bázisok aránya nem függ az egyed életkorától, fiziológiás állapotától, vagy a környezettől.

Ezekkel a megfigyelésekkel kapcsolatban figyelemreméltó, hogy azok tökéletesen megfelelnek egy örökítő anyaggal szembeni elvárásoknak.

Ezen felül egy további, rendkívül érdekes, misztikusnak tűnő tényt is feltártak: **bármilyen sejtből** izolált DNS mintára igaz, hogy az adenin mennyisége megegyezik a timinével, és a guanin mennyisége a citozinéval, tehát: **A=T és G=C** (ebből következően **A+G=T+C**, illetve **A+C=G+T**).

Ezeket a megállapításokat összefoglalva **Chargaff szabályok**nak nevezték el.

12.3. A DNS térszerkezetének Watson-Crick modellje

12.3.1. A Watson-Crick modell megalkotásának rövid története

Az ötvenes évek elejére ismertté vált a DNS lánc kémiai összetétele, az egyes alkotók kapcsolódási módja, és az, hogy a DNS egy lineáris, el nem ágazó polimer. Mindez ugyanakkor nem adott magyarázatot sem a DNS akkoriban már elfogadott örökítő szerepének mibenlétére, sem olyan furcsa összefüggésekre, mint a Chargaff szabályok.

A világban számos kutatóhely egymással versengve próbálta megfejteni a DNS térszerkezetét. Ismert volt, hogy Amerikában Linus Pauling dolgozik a problémán, és mint híres, Nobel díjas vegyész, a molekulaszerkezetek szakértője, nagy esélyesnek számított.

Angliában két kutatócsoport is versenybe szállt. Az egyik a Cambridge-i Egyetem Cavendish Laboratóriumában működött, amelyet Sir Lawrence Bragg vezetett, aki 1915-ben Nobel díjat kapott a röntgenkrisztallográfiát megalapozó kutatási eredményeiért. Ebben az intézetben dolgozott John Kendrew és Max Perutz is, akik a mioglobin és a hemoglobin térszerkezetének megoldásán dolgoztak. Ugyanitt dolgozott James Watson és Francis Crick a DNS szerkezeti modelljének megalkotásán. Linus Pauling annak idején megelőzte a cambridge-i intézetet a polipeptidlánc α-hélix szerkezetének megfejtésében, így Lawrence Bragg különösen motivált volt abban, hogy ezt a versenyt most ők nyerjék meg.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A másik angliai kutatóhely a londoni King's College egyetemen működött, ahol John Randall kutatócsoportot szervezett a DNS térszerkezetének megfejtésére. Ebben a csoportban Maurice Wilkins egyfajta helyettes vezetőnek számított, ő indította el az első kísérleteket, melyekben DNS-rostok röntgenszórását vizsgálta. Randall felvette a kutatócsoportba Rosalind Franklint is, aki ugyanezen a problémán kezdett el dolgozni Wilkinstől függetlenül.

A szerkezeti modellt végül Watson és Crick alkották meg, de ebben nagy segítséget jelentettek számukra azok a szerkezeti ismeretek, amelyeket a King's College kutatói tártak fel, és amelyek számos csatornán keresztül jutottak el hozzájuk. **Rosalind Franklin** készítette el azt a világhírűvé vált **röntgendiffrakciós kép**et, amely talán a legnagyobb hozzájárulást jelentette Watson és Crick számára. Ezt a képet Wilkins mutatta meg a laboratóriumába látogató Watsonnak, mégpedig Franklin előzetes hozzájárulása nélkül.

Crick fizikus végzettségű volt, és Cambridge-ben eleinte ő is fehérjeszerkezetek röntgendiffrakciós vizsgálatán dolgozott Max Perutz témavezetésével. A fehérjékben lévő helikális struktúrák okán Crick többekkel együtt a helikális szerkezetek röntgenszórásának matematikai leírásán dolgozott. Számára a londoni kutatóhelyről származó információk alapján gyorsan egyértelművé vált, hogy a DNS helikális szerkezetű kell, hogy legyen. A szerkezeti adatokból az is kiderült, hogy a DNS molekulában valamilyen komponensek szabályos, periodikusan ismétlődő rend szerint 3,4 Å távolságra vannak egymástól.

A helyes modell létrehozásához azonban számos egyéb információra is szükség volt.

Watson és Crick első, 1951-ben megalkotott helikális DNS modellje alapvetően hibás volt. Első modelljükben, amit nem publikáltak, a cukorfoszfát gerincet helyezték belülre, a bázisok a víz felé fordultak. Ezt a modellt többek között Rosalind Franklin jogos kritikái nyomán hamar el is vetették. Érdekes módon tőlük függetlenül Pauling is egy hasonlóan hibás modellt épített, amelyben ráadásul három lánc alkotott egyetlen közös hélixet. Ezt a modellt Pauling 1953-ban publikálta is, mielőtt Watson és Crick a saját, immár helyes modelljüket közölték volna.

A korrekt modell megalkotásában Watson és Crick számára sokat segített Erwin Chargaff angliai látogatása 1952-ben, amelynek során világossá vált Watson és Crick számára, hogy az A=T és C=G szabályt mindenképpen tükröznie kell a helyes modellnek. Chargaff arra is felhívta Watson figyelmét, hogy vizes oldatban mi az egyes bázisok valós tautomer szerkezete.

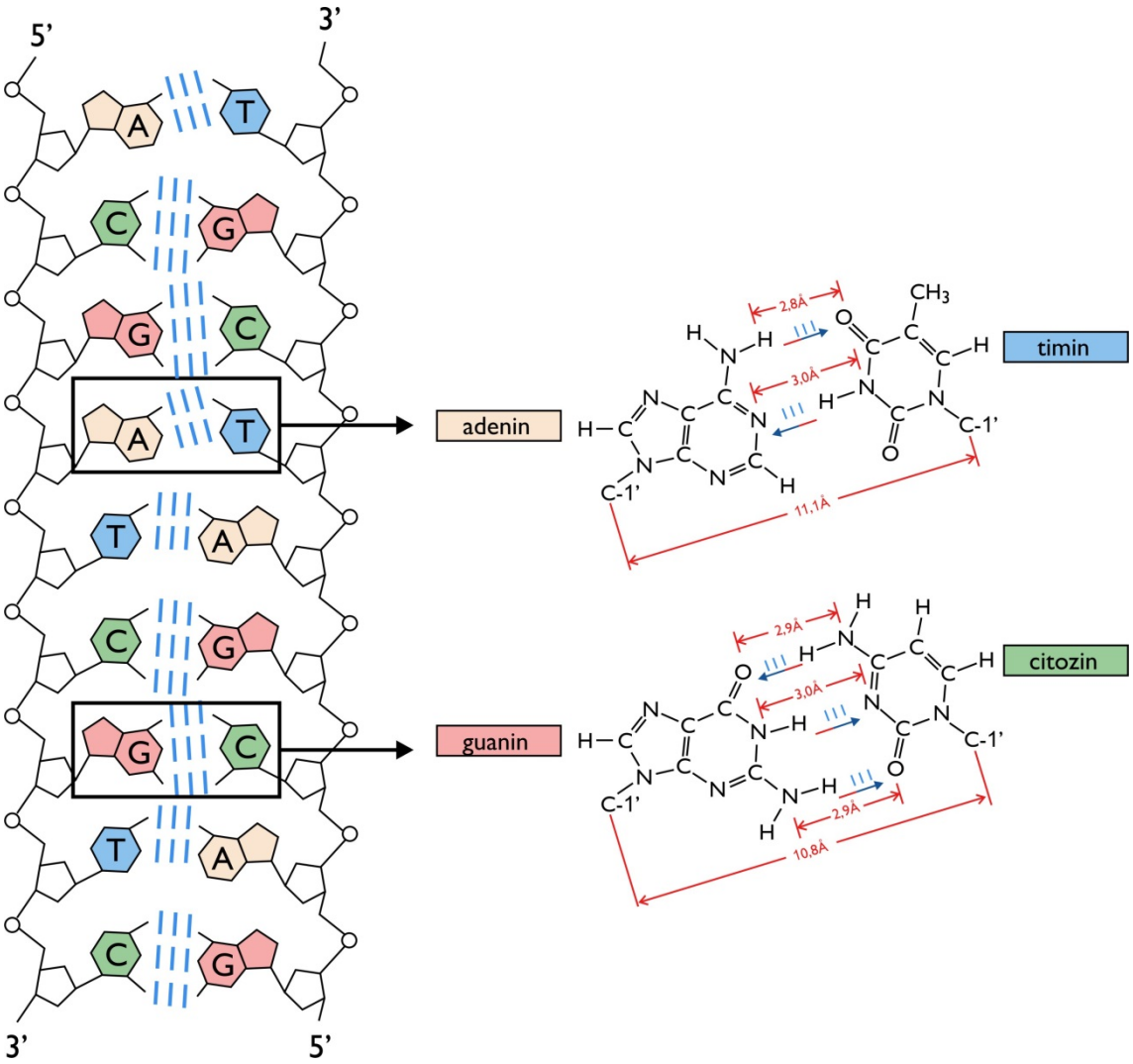
Mindezek alapján Watson volt az, aki felfigyelt arra, hogy egy megfelelő orientációban egymás felé fordított A-T pár illetve C-G pár geometriai adatai szinte azonosak, és a bázisok között lehetőség nyílik hidrogénhíd kötésekre. Ezek után már egyértelmű volt a megoldás: a DNS helikális szerkezete két láncból áll. A modellépítés során arra is rájöttek, hogy a bázisok közötti kapcsolat akkor lesz megfelelő geometriájú, ha a két lánc egymással ellentétes irányban fut, tehát a két lánc egymáshoz képest antiparallel.

James Watson és Francis Crick 1953-ban megalkotta a világ azóta talán legismertebb molekulaszerkezeti modelljét, a **kettős spirált**. Sokan ezt az eredményt tekintik a molekuláris biológia születési pillanatának. Az óriási koncepcionális áttörés annak felismerése volt, hogy a DNS molekulát **két, egymást kiegészítő lánc** együttese alkotja. Modelljük azonnal rávilágított a DNS örökítő szerepének mibenlétére is. Eredményüket a Nature folyóiratban közölték, és egy intézmények közötti megállapodás keretében ugyanabban a számban folytatólagosan Wilkins csoportja és Franklin csoportja is leírta a DNS-szerkezettel kapcsolatos saját eredményeit. Watson és Crick cikkükben megemlítették, hogy a modell megalkotásában stimulálták őket Wilkins és Franklin nem publikált eredményei. Arra is felhívták a figyelmet, hogy a **modelljük képes magyarázatot adni arra, hogy miként másolódhat a DNS-ben tárolt genetikai információ**. Watson, Crick és Wilkins 1962-ben a DNS szerkezetével kapcsolatos felfedezéseikért orvosi Nobel díjat kaptak. Bizonyára Rosalind Franklin is joggal szerepelhetett volna a díjazottak között, de ő tragikusan korán, 1958-ban rákbetegségben elhunyt.

12.3.2. A Watson-Crick modell részletes ismertetése

Első lépésben vizsgáljuk meg a modell síkban kiterített formáját (lásd **12.21. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.21. ábra: A DNS kétláncú szerkezete síkban ábrázolva és a bázispárok szerkezete

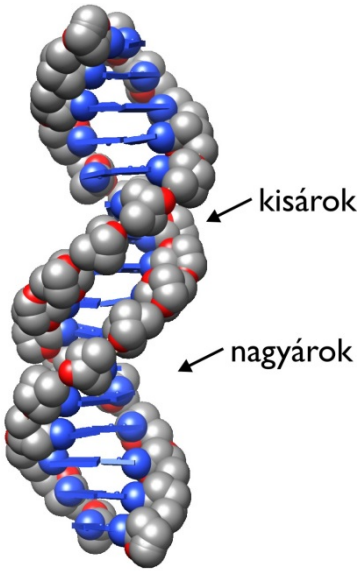
A modellben **két DNS lánc** szerepel, amelyek egymással ellentétes irányban futnak, tehát **antiparallel elrendeződésű**ek. A rendkívül poláros, és negatívan töltött cukorfoszfát gerinc a molekula külső, oldat felé néző részén fut, a részben apoláros jellegű bázisok a molekula belseje, és ezáltal egymás felé fordulnak.

A **12.21. ábra** jól illusztrálja a megfelelően párba állított DNS láncok közötti összeköttetés lényegét. A valóságnak megfelelő tautomer formákban ábrázolt bázisok közül az adenin és a timin egymással két, míg a guanin és a citozin egymással három hidrogénhíd kötést tud létesíteni. A bázis és a cukor kapcsolódási pontját a dezoxiribóz C1' szénatomja jelenti. A bázispárok tekintetében a két érintett C1' atom egymástól mért távolsága megadja a két lánc távolságát. Az A-T párban ez a távolság a 11,1 Å, míg a G-C pár esetében 10,8 Å, vagyis a két távolsági érték praktikusan megegyezik egymással.

A szerkezetből két rendkívül fontos következtetést vontak le. Az egyik, hogy a láncban bármilyen sorrendben követhetik egymást az egyes nukleotid egységek, tehát bármilyen bázissorrend létrejöhet. A másik, hogy a **két lánc szekvenciája kölcsönösen determinálja egymást (komplementerek)**, tehát ha az egyik lánc bázissorrendje ismert, abból egyértelműen következik a másik lánc bázissorrendje (és fordítva).

Nézzük meg térben is Watson és Crick eredeti modelljét (lásd **12.22. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

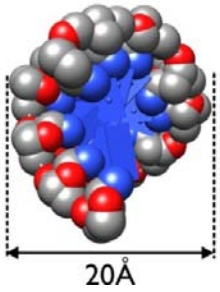


12.22. ábra: Watson és Crick modellje, a DNS kettősspirál szerkezete

A **Watson-Crick modell**ben a DNS nagyvonalakban az ún. **B-DNS konformáció**ban van. A mai ismeretek szerint ez a konformáció kis különbségekkel azonos a sejtekben lévő DNS leggyakoribb térszerkezeti típusával. A DNS két szála egy közös képzeletbeli tengely mentén tekeredik spirális alakban. A spirál, vagyis **a hélix jobbmenetes**, felülről nézve az óramutató járásával egyező irányba forogva távolodik. Ez a megállapítás mindkét szálra igaz, és az is mindegy, hogy egy-egy szálat melyik vége felől nézzük.

A **cukorfoszfát gerinc kívül** fut, a **bázisok befelé** állnak, síkjuk **majdnem merőleges a hélix tengelyére**. Az egymást követő **bázisok távolsága 3,4 Å**, ez adja a röntgenszóródási kép fő periodikusságát. A hélix egy **teljes fordulatára 10 nukleotid** rész esik (a később meghatározott kristályszerkezeti modell alapján ez az érték 10,4 nukleotid), ami egy másik, **34 Å-ös periódust** eredményez. Ez azt is jelenti, hogy a lánc a tengelye mentén nukleotidonként 36 fokot fordul.

Az azonos láncban egymást követő **bázisok** aromás **gyűrűi egymásra lapolódnak**, átfednek, közöttük vonzó, apoláros-apoláros **van der Waals kölcsönhatás** van. A térkitöltés tökéletes, nincsenek üregek. A molekula **átmérő**je **20 Å** (lásd **12.23. ábra**). A két lánc egymással szemközti bázisai **hidrogénhidas kölcsönhatás**ban vannak.



12.23. ábra: A jobbmenetes DNS kettősspirál felülnézeti képe.

A cukor síkja nagyjából párhuzamos a tengellyel, a gyűrűben lévő oxigének tengelytől való távolsága minden cukornál azonos. A glikozidos kötésben lévő C1’ szénatomok tengelytől való távolsága is azonos.

Szabályos, periodikus menetemelkedés esetén az egymással hidrogénhidas kölcsönhatással párt alkotó bázisokat a cukorhoz kapcsoló C1’ glikozidos szénatomok egymástól való távolsága is azonos kell, hogy legyen. Ez az állandó távolság tehát a szabályos stabil kettős-spirál létrejöttének feltétele. A térkitöltés kényszere miatt ez az azonos távolság csak akkor jöhet létre, ha a bázisok egyike purin, a másik pirimidin vázas.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

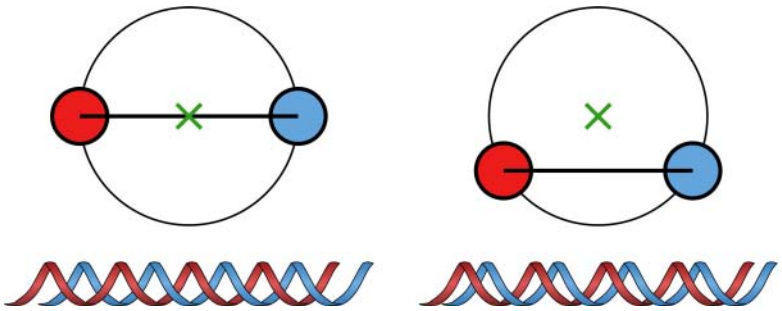
A stabil tautomer szerkezetek ismeretében az is belátható, hogy az adott geometriai kényszerek mellett stabilizáló hidrogénhíd kötéseket kizárólag A-T (T-A) és G-C (C-G) bázispárok alkothatnak. Minden ettől eltérő bázispárosodás torzítaná, és destabilizálná a szerkezetet.

Oldalnézetben jól látható, hogy a kettősspirál külsején két árok húzódik végig csigavonalban (lásd **12.22. ábra**). Az egyik keskeny, ezt **kisárok**nak hívjuk, a másik szélesebb, ennek **nagyárok** a neve. Vajon miért jön létre két eltérő méretű árok?

Először a DNS-től elvonatkoztatva, általánosságban vizsgáljuk meg, hogy egy kettőshélix szerkezet esetén mi befolyásolja a két árok relatív méretét. Készítsünk a kettőshélix tengelyére merőlegesen egy metszetet. Ebben vizsgáljuk meg, hogyan helyezkednek el egymáshoz képest az egyes hélixekhez tartozó metszet-pontok, és a hélixek közös tengelyének megfelelő metszet-pont.

Egyetlen olyan speciális eset van, amikor a közös tengelyhez tartozó pont a két hélixhez tartozó 1-1 pont által meghatározott (a két hélix adott síkban értelmezett távolságát definiáló) szakasz felező pontja. Más szóval, ebben a speciális esetben a két hélix 1-1 pontja a tengelyponthoz képest diagonálisan helyezkedik el. Ebben a kitüntetett esetben a fent említett szakasz hossza, vagyis a két hélix távolsága, megegyezik a hélixek átmérőjével. Ebben a speciális elrendeződésben a kettőshélix esetén kialakuló két árok mérete megegyezik, vagyis nem különböztethető meg egy kisebb és egy nagyobb árok.

Az általános esetben azonban az említett szakasz nem esik egybe az átmérővel, a három említett pont elrendeződése nem diagonális, és emiatt megjelenik egy kisebb, és egy nagyobb árok (lásd **12.24. ábra**) .

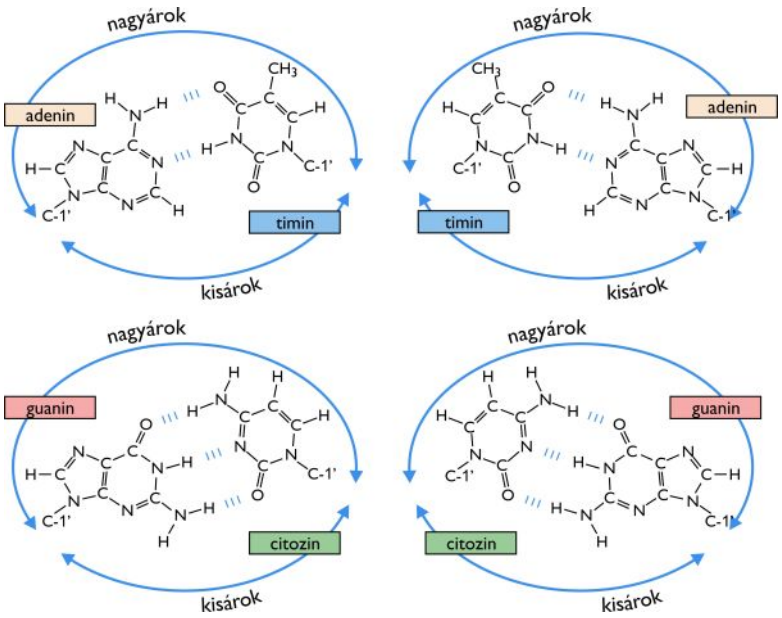


12.24. ábra: A hélix távolság, az átmérő, és a hélix árkok kapcsolata

A DNS-re ez az általános eset vonatkozik. A két C1’ szénatomot összekötő szakasz nem megy át a közös tengelyen, a szakasz távolsága alig több mint a fele a hélix átmérőjének. A DNS-ben emiatt a kialakuló két árok mérete eltér, létrejön egy folytonos kisárok, és egy folytonos nagyárok (lásd **12.22. ábra**) .

A bázispárokat, valamint a két árok kettősspirál tengelyére merőleges sík-vetületét a 12.25. ábra mutatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



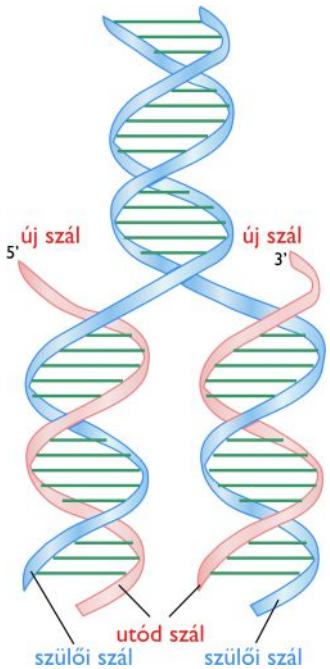
12.25. ábra: A DNS kettőspirál külsején végighúzódó nagyárok és kisárok elhelyezkedése

A **kétféle árok** létének fontos **funkcionális jelentősége** van. A DNS-kötő fehérjék általában a nagyárok felől lépnek a DNS-sel kölcsönhatásba (lásd pl. **18.1.1. fejezet**)

12.3.3. A komplementaritás következménye

A DNS kettős spirál két lánca a bázisokon keresztül szigorú, és egyértelmű szabályok szerint kapcsolódik egymással. Ennek az az eredménye, hogy az egyik szál bázissorrendje (szekvenciája) egyértelműen megszabja a vele párban álló másik szál bázissorrendjét. A **két szál** egymást mintegy kiegészíti, **egymással komplementer**. Az egyik szál szekvenciáját ismerve a másiké automatikusan adódik a szabályok ismeretében. Ez nemcsak DNS-DNS, de DNS-RNS és RNS-RNS kapcsolatra is vonatkoztatható, ugyanis az RNS-ben szereplő uracil bázispárosodás tekintetében csereszabatos a timinnel.

A DNS kettős-spirál szerkezete azonnal logikus hipotézist kínált arra, hogy miként lehet a DNS egyfajta generációról generációra átadódó, tehát öröklődő információ hordozója (lásd **12.26. ábra**).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

12.26. ábra: A DNS egymással komplementer szálai elegáns másolási módot tesznek lehetővé

Az információt a bázisok sorrendje kell, hogy hordozza, így annak hű átadásához egy olyan új kettős spirált kell létrehozni, melynek bázissorrendje pontosan megegyezik az eredetiével.

Mivel a **DNS két szál**ának bázissorrendje egymás által kölcsönösen meghatározott, a két szálat **felnyitva, és mindkettő mellé új komplementer** bázissorrendű **szál**akat létrehozva az eredeti kettős spirál helyett két új, az eredetivel azonos bázissorrendű kettős spirál jön létre, lásd replika (**másolat**) **készítés**, vagy **replikáció**.

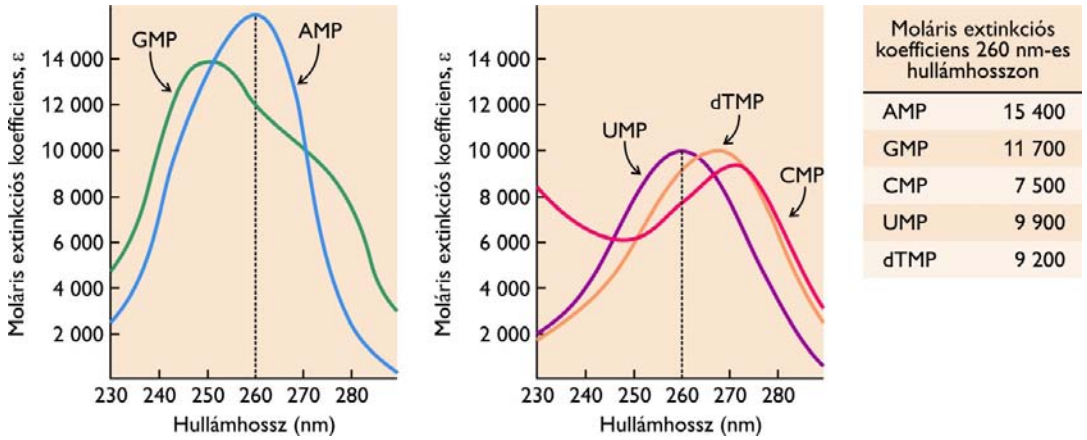
A komplementer DNS-RNS hibridek lehetősége azt is megmutatta, hogy a DNS-ben lévő információ RNS molekulákra is átírható. A **DNS-ről RNS** másolat készítése az **átírás**, a **transzkripció**.

12.3.4. A Watson-Crick modellt igazoló biofizikai mérések

A Watson-Crick modell megalkotásakor rendelkezésre álló röntgendiffrakciós adatok ugyan nagyban segítették a modell létrehozását, de nem voltak olyan minőségűek, hogy közvetlen bizonyítékul szolgálhattak volna a modell kizárólagosságát illetően. Nem lehetett egyértelműen kijelenteni, hogy másfajta szerkezet ne eredményezhetné a kapott röntgenszórási adatokat.

Éppen ezért még jó ideig élénk tudományos vita zajlott a modell érvényességét illetően. Az elkövetkező években biofizikai mérések is a modell helyességét támasztották alá.

Az aromás szerkezetű nukleinsav **bázisok** delokalizált elektronszerkezetük miatt ultraibolya tartományú fénnyel könnyen gerjeszthetők, **260 nm-es** hullámhossz körül fényabszorpciós (**extinkciós**) **maximum**uk van (lásd **12.27. ábra**).



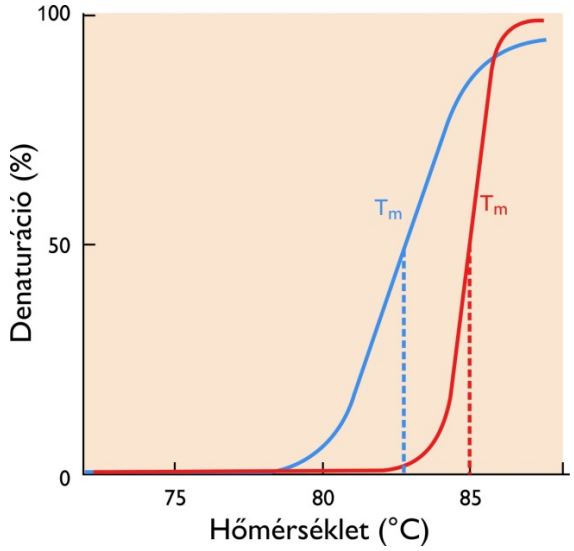
Moláris extinkciós koefficiens 260 nm-es hullámhosszon	
AMP	15 400
GMP	11 700
CMP	7 500
UMP	9 900
dTMP	9 200

12.27. ábra: Az egyes nukleinsav bázisok ultraibolya tartományban fényt nyelnek el

Ismert jelenség volt, hogy a hőmérséklet emelésének hatására a DNS oldat fényelnyelése jelentősen, mintegy 50%-kal megnő. Ezt a jelenséget **hiperkróm effektus**nak nevezték. A jelenség **reverzibilis**nek bizonyult, az eredeti hőmérsékletre visszahűtve a DNS oldat fényelnyelése az eredeti értékre csökkent, amit hipokróm effektusnak neveztek el.

A hiperkróm-hipokróm effektust a Watson-Crick modell kiválóan magyarázza. A hőmérséklet emelésének hatására az eredetileg kétszálú, natív DNS denaturálódik, a DNS két szála elválik egymástól. A bázisok az egyszálú nukleinsavban hatékonyabban nyelik el a fényt, tehát nagyobb a moláris extinkciós együtthatójuk, mint duplaszálú DNS-ben, ahol a bázisok egymással másodlagos erőkkel kölcsönhatásban vannak. Az effektus felhasználható a **DNS hődenaturációjá**nak kísérletes mérésére (lásd **12.28. ábra**).

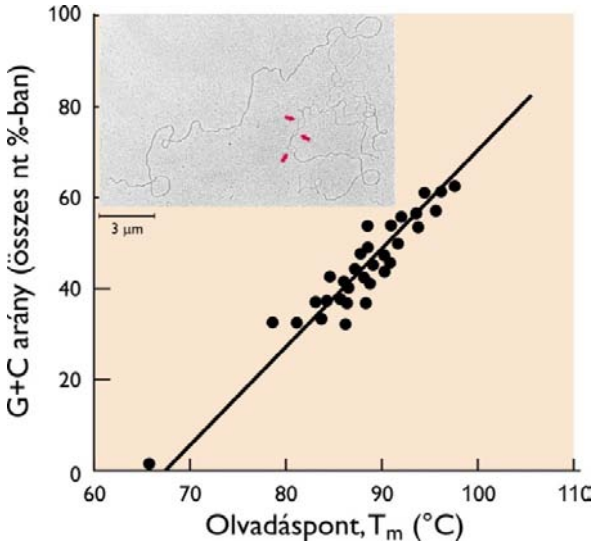
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.28. ábra: A natív kétláncú DNS szerkezet hőmérséklet emelésére denaturálódik, a láncok elválnak egymástól

A hőmérséklet emelésével a két szál elválik, a szerkezet mintegy „megolvad". Az eredmény jól jellemezhető azzal a hőmérséklettel, ahol a duplaszálú szerkezetnek éppen a fele denaturálódott (a hiperkróm effektus a maximális effektusnak éppen a fele). Azt a pontot, ahol a fényelnyelés alapján az oldatban lévő DNS molekulák 50%-a került egyszálú, tehát denaturált állapotba, **olvadási hőmérsékletnek (pontnak)** nevezték el, rövidítése $\mathbf{T_m}$ (*melting temperature*). Különböző DNS molekulák különböző görbéket eredményeztek eltérő olvadásponttal. Ami a görbékben közös volt, az a szigmoid alak, és a meredek emelkedés egy szűk hőmérséklet tartományban. A görbék rendkívül hasonlítanak a globuláris fehérjék hődenaturációjára jellemző görbékre. Ahogy ott is, a szigmoid alak itt is arra utal, hogy **a natív szerkezetet kooperatív kölcsönhatások stabilizálják**. Ha egy-egy kölcsönhatás felbomlik, az destabilizálja a maradék kölcsönhatásokat.

Mérésekkel sikerült igazolni, hogy minél **magasabb** a nukleinsavban a **G:C** bázisok összes bázishoz viszonyított **arány**a, annál **magasabb** a DNS **olvadási pont**ja (lásd **12.29. ábra**).



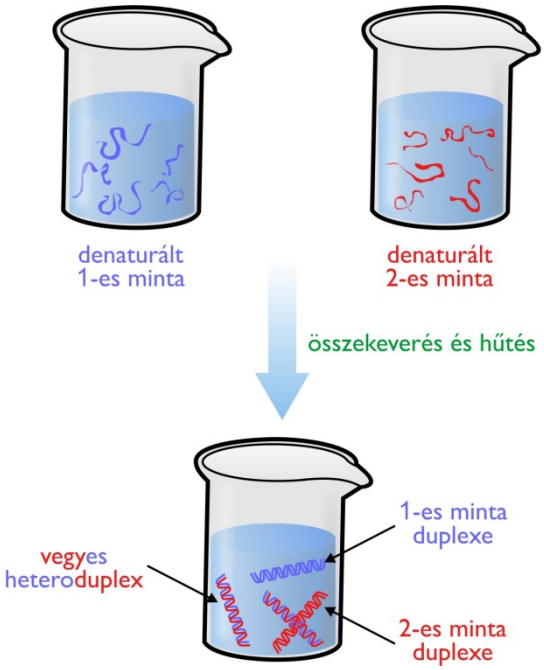
12.29. ábra: A DNS-denaturációhoz tartozó olvadási hőmérséklet arányos a DNS G:C tartalmával. A betétábrán egy DNS elektronmikroszkópos képe látható, pirossal jelölve az alacsonyabb hőmérsékleten megolvadt AT gazdag részletet.

Ezt ismét jól magyarázta a Watson-Crick modell, hiszen a modell szerint G:C párban három, míg az A:T párban csak két hidrogénhíd létesül a bázisok között.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Egy nagyméretű DNS-ben ezért először az AT bázisokban gazdag részletek „olvadnak” meg, ami elektronmikroszkóppal demonstrálható (lásd **12.29. ábra**).

A reverzibilis renaturáció miatt eltérő eredetű, pl. eltérő fajokból származó denaturált DNS-ek egymással összekeverve és renaturálva vegyes **hibrideket** képeznek. A hibridizáció mértéke a hipokróm effektuson keresztül követhető. Minél hasonlóbb két élőlény genetikailag, annál nagyobb mértékű a hipokróm effektus (lásd **12.30. ábra**).



12.30. ábra: Hasonló szekvenciájú denaturált DNS-ek renaturálásakor vegyes heteroduplexek jöhetnek létre

A DNS reverzibilis renaturációján alapszanak a géntechnológiában igen hasznos, sokféle célra használható **hibridizációs technikák** is (lásd **19.3. fejezet**)

12.3.5. A DNS magasabbrendű szerkezeti formái

Az egyes genomok ismert méretéből, a B-DNS szerkezetet feltételezve, kiszámítható az adott DNS fizikai mérete, az ún. **kontúrhossz**. A kontúrhossz minden esetben jóval nagyobb, mint a DNS-t befogadó objektum átmérője, legyen ez az objektum akár vírusrészecske, baktériumsejt, vagy egy eukarióta sejt sejtmagja. Nyilvánvaló, hogy a lineáris tengelyű kettős spirál, vagyis a klasszikus B-DNS modell önmagában nem magyarázza meg, hogyan férhet el a DNS a „tartóedényében”.

In vitro vizsgálatok alapján kiderült, hogy a teljesen hidratált, minimum szabadentalpia-szinten lévő (**relaxált**) **B-DNS egy hélixmenetére 10,4 bázis** jut.

Mint kiderült, ***in vivo***, tehát a sejtekben, a DNS ennél kissé kitekertebb, nyitottabb, abban kb. **11 bázispár** jut egy fordulatra. Ez az előzővel összevetve egyben azt is jelzi, hogy a sejtekben lévő DNS magasabb szabadentalpia-szinten van, „feszítettebb”, mint a normál B-DNS.

Amikor a DNS molekula működik, a két szálának rendszeresen fel kell nyílnia ahhoz, hogy akár az egyik (lásd transzkripció), akár mindkét szála (lásd replikáció) templátként működhessen, a rajta lévő bázissorrend „kiolvasható” legyen. A kitekertebb, feszített alapszerkezet éppenséggel elősegíti a két szál elválását.

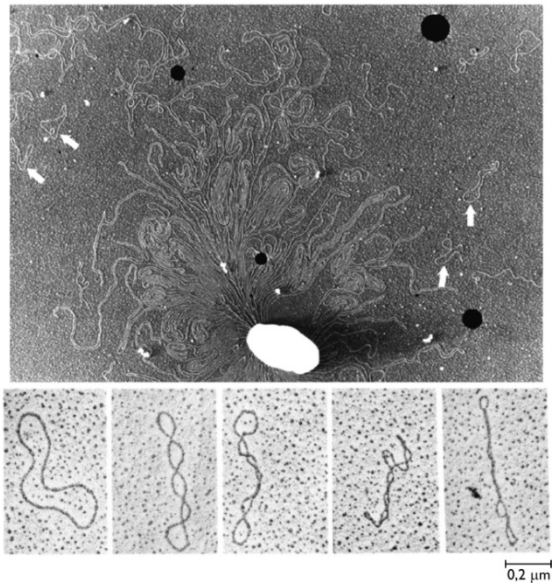
Ebben a fejezetben megismerkedünk azokkal a modellekkel, amelyek magyarázatot adnak a feszítettebb szerkezet létrejöttére (**szuperhelikalizáció**) prokariótákban és eukariótákban, és a **DNS szoros pakolására** (**kromatin struktúra**) eukariótákban.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az 1940-es évek végén elsősorban Joshua Lederberg és Edward Tatum eredményei nyomán kiderült, hogy a baktériumok is képesek egyfajta ivaros folyamatra: képesek egymásnak genetikai információt átadni a konjugációnak elnevezett folyamat révén. Edward Tatum és George Beadle emellett *Neurospora crassa* (kenyérpenész) modellen végrehajtott vizsgálataikkal kiderítették, hogy az egyes enzimek mögött jól definiálható gének állnak, felállították az „egy gén egy enzim" hipotézist. Lederberg, Beadle és Tatum 1958-ban orvosi Nobel-díjat kaptak.

Visszatérve a konjugációra: elsőként ennek a folyamatnak a felismerése tette lehetővé a bakteriális gének egymáshoz képesti sorrendjének meghatározását. A gének sorrendjének vizsgálata arra a meglepő eredményre vezetett, hogy a bakteriális genom egyetlen hatalmas köralakú (cirkuláris) DNS kell, hogy legyen. Az *Escherichia coli* genomjának mérete kb. 4,6 millió bázispár, így a 2 nm átmérőjű B DNS teljes hossza kb. 1,7 mm. Ez valahogy bele van pakolva a kb. 850-szer kisebb átmérőjű, 2 µm-es kóli sejtbe. A kóli elektronmikroszkópos vizsgálata során kiderült, hogy az óriási DNS molekulán kívül, ahhoz képest kicsi, köralakú, extrakromoszómális DNS-ek is lehetnek a sejtben. Ezeket plazmid DNS-nek nevezték el. (Egy baktérium genomja ezek szerint egy milliós nagyságrendű bázispár alkotta cirkuláris DNS-ből, amit kissé pongyola kifejezéssel „bakteriális kromoszómának" nevezünk, és maximum 100 ezer bázispár méretű, szintén cirkuláris, plazmid DNS-ekből állnak. A genetikai információ nagy részét hordozó DNS pontos elnevezése kromofór, hogy megkülönböztessük a DNS és hisztonok komplexéből szerveződő kromatintól – aminek a legkondenzáltabb, fénymikroszkóppal is látható formája a kromoszóma.)

A kétszálú, köralakú plazmid DNS-ek nem csak a legegyszerűbb köralakot vehetik fel, hanem önmagukra többszörösen feltekert **szuperhelikális formá**kat is (lásd **12.31. ábra)**.



12.31. ábra: Relaxált és szuperhelikalizált plazmid DNS-ek elektronmikroszkópos képe

Mint kiderült, az ilyen feltekeredés közvetlen kapcsolatban áll a plazmidon belüli DNS kettős-spirál szerkezetének bizonyos geometriai jellemzőivel. A jelenség leírásához és lényegi megértéséhez a matematika egyik ága, a **topológia** nyújtott segítséget, sőt, a biológusok által a köralakú DNS-nél felismert jelenség a topológia új ágát indította el. Először nézzünk két hétköznapi példát, ami közelebb vihet majd a DNS-sel kapcsolatos problémakör megértéséhez.

Mindenki találkozott a következő jelenséggel: ha egy fonalat (pl. cérnát) egyik végén rögzítünk, a másikon pedig sodrunk, akkor a fonal önmaga köré fog tekeredni, mégpedig a sodrás irányától függő irányban. A fonal kezdetben relaxált, energiaminimumon lévő szerkezetben van. A sodrás ebben a szerkezetben feszültséget okoz. A fonalban keletkező feszültséget a tapasztalt feltekeredés részben csökkenteni képes, éppen ezért megy végbe. A DNS esetéhez egy lépéssel közelebb haladva vegyünk egy spirált, tehát hélixet, ami lehet egy klasszikus telefonzsinór. Ennél jobban látható a feszültség kialakulásának oka, és a relaxáció módja. A zsinór úgy készült, hogy feszítetlen állapotában eleve spirális. Ennyiben a relaxált B-DNS jó modellje (bár ezt csak egy lánc alkotja). A feszítetlen spirál jellemezhető a **menetek sűrűségé**vel: **menetek száma / spirált alkotó szál hossza**. Ezt a menetsűrűséget növelhetjük a spirál „betekerésével", illetve csökkentjük a spirál „kitekerésével" (lásd **12.32. ábra**). A zsinórban mindkét esetben feszültség keletkezik, aminek hatására a zsinór önmaga körül tekeredni fog. Miközben a zsinór

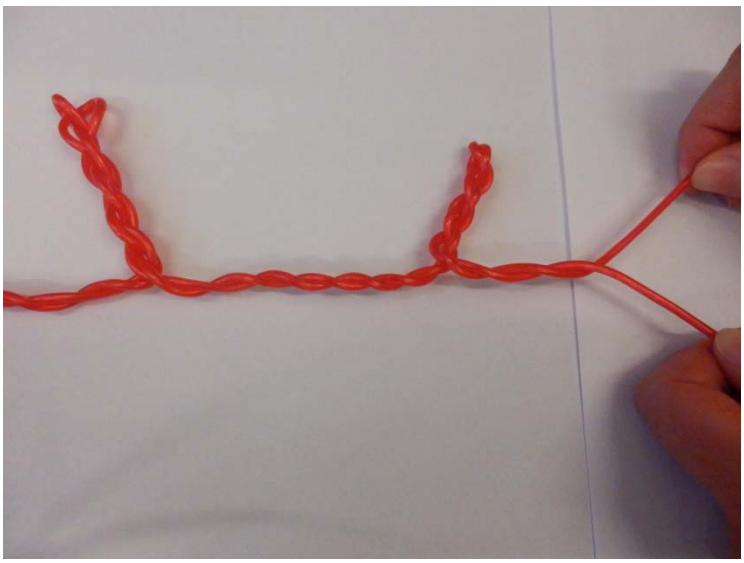
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

saját tengelye önmaga körül tekeredik, a tengely körül tekeredő spirálban az egyes menetek egymástól való távolsága alig változik az eredetihez képest! Tehát a zsinór azáltal, hogy **szuperhélix**et képez, nagyjából megőrzi az eredeti, **relaxált geometriára jellemző menetsűrűség**i állapotát.



12.32. ábra: Egy relaxált állapotban spirális fonal saját tengelye menti pödrése szuperhelikális szerkezetet eredményez

Végül a DNS modelljeként vegyünk két fonalat egy jobbmenetes kettősspirálban (lásd **12.33. ábra**).



12.33. ábra: Egy duplaszálú hélix két szálának szétnyitása menetsűrűség növekedést okoz, ami szuperhélixekhez vezet

Ezzel a példával egy, az előzőektől kissé eltérő jelenséget is szemléltethetünk. Rögzítsük a duplaszálú szerkezet egyik végét. A másik végen a két szálat kezdjük szétnyitni. A szétnyitás a még szét nem nyílt részen menetsűrűség növekedéssel jár. Az eredeti számú egymás köré tekeredés egyre rövidebb szakaszon valósul meg (lásd **12.33. ábra**).

DNS esetén az analóg esetben a még szét nem nyílt részen növekedne az egységnyi monomerszámra jutó menetek száma, vagy fordítva szemlélve csökkenne az egy menetre jutó bázisok száma. Ez, ahogy az ábra mutatja, **balmenetes szuperhélix** képződéséhez vezet. Balmenetes a szuperhélix akkor, ha a szuperhélixet a tengelye irányából szemlélve, és gondolatban a hélixen távolodva haladván a **hélix tengely**ét az **óramutató járásával ellenkező irány**ban kerüljük meg. A **balmenetes szuperhélixet pozitív**, a **jobbmeneteset negatív szuperhélix**nek is nevezik.

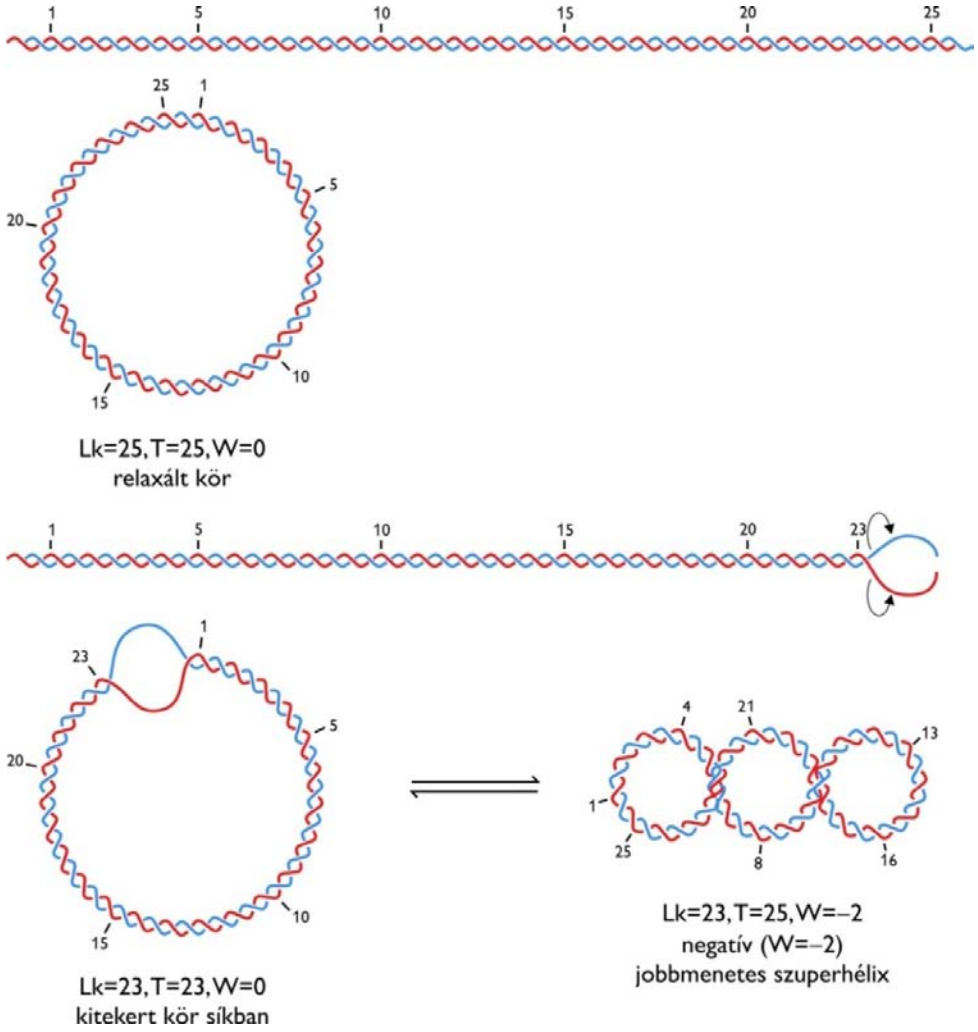
A sejtben a DNS-nek működése során gyakran fel kell nyílnia, ami energetikailag kedvezőtlen a fenti torlódás miatt. A felnyílást segítené, ha a DNS a torlódás miatt kialakuló balmenetes szuperhélix-szel ellenkező irányú, jobbmenetes szuperhélixben lenne. Egy ilyen szerkezetű DNS ugyanis a kinyílásakor relaxálódna. A jobbmenetes

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szuperhélixű DNS egy menetére több bázispár jutna, mint az energia-minimumon lévő B DNS-re jellemző 10,4 bp. Tehát a jobbmenetes szuperhélixben lévő DNS szerkezet is feszített lenne, ami miatt könnyebb lenne elválasztani a két szálát, mint a normál, relaxált DNS esetében.

A prokariótákban és az eukariótákban is működik olyan mechanizmus, ami ilyen nyitottabb DNS-t eredményez, de a két alapvető sejttípusnál a nyitottabb forma előállítása eltérő módon zajlik.

Nézzük meg először a prokarióta esetet (lásd **12.34. ábra)**.



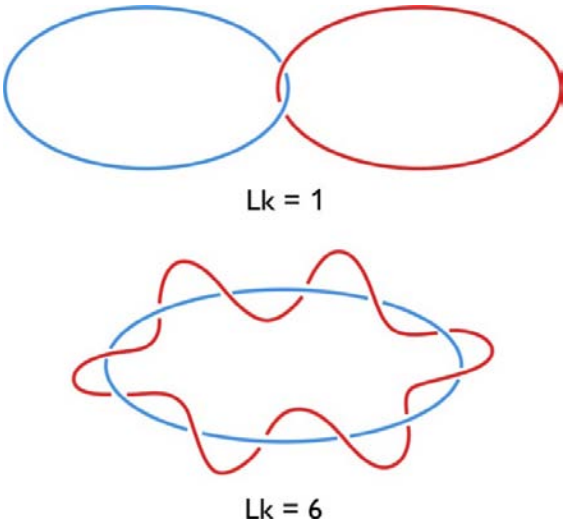
12.34. ábra: Egy köralakú duplaszálú DNS két hélixmenetét megszüntetve kétmenetnyi szuperhélixet kapunk

A **prokarióta** genom és az extra-kromoszómális plazmid **DNS** egyaránt köralakú, **cirkuláris**. A következő gondolatkísérletben vegyünk egy 25-menetet tartalmazó, 10,4 bp-menetes lineáris B DNS-t, ami tehát 25x10,4=260 bázispárt tartalmaz. A két véget kovalensen összekötve egy síkban kiteríthető, relaxált köralakú DNS-t kapunk.

A körben a két DNS szál 25-ször kerüli meg egymást, ennyiszer van egymás köré fonva. Ezt az angol „*linking number*” (**összekapcsolódási szám**) kifejezés alapján az **Lk** érték fejezi ki, tehát Lk = 25. A két szál a közös tengelyt is éppen 25-ször kerüli meg, ezért a **csavarodás érték,T** = 25 (T: *twist*). A közös tengely nem tekeredik önmaga köré, ezért a **tekeredési érték, W** = 0 (W: *writhe*). A W értéke adja meg tehát a **szuperhelikális csavarok számát**.

Az Lk érték egy topológiai fogalom. Két láncból álló kör esetében azt fejezi ki, hogy a két lánc hányszor van egymáshoz kapcsolva (lásd **12.35. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.35. ábra: Az Lk (linking number) érték azt mutatja meg, hogy két kör hányszor van egymáshoz kapcsolva

Látható, hogy ez a szám pusztán a két kör gyűrésével, hajtogatásával, forgatásával stb. nem változhat, mindaddig, amíg a két szál intakt. Az **Lk** érték **megváltozásá**hoz legalább az egyik szálnak átmenetileg fel kell nyílnia, ami DNS esetén **kovalens kötés hasadásával** kell, hogy járjon. Ez tehát mutatja, hogy az Lk egy konfigurációval kapcsolatos szám. A csak az Lk értékükben különböző köralakú DNS-ek egymásnak **topológiai izomer**jei, röviden topoizomerei.

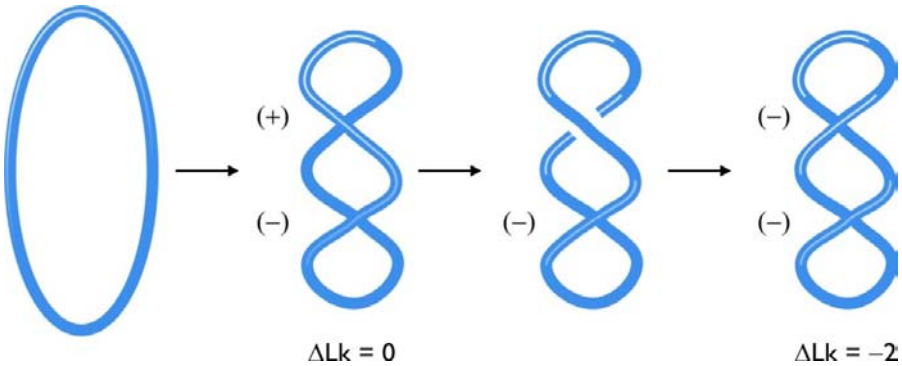
Most nyissuk ki a kört, szüntessünk meg két menetet, és zárjuk újra össze a kört. Ekkor két extrém végállapot lehetséges. 1. A DNS kör síkban marad, mindenhol megtartja a B DNS konformációt, kivéve kétmenetnyi szakaszon, ahol teljesen nyitott lesz. 2. A DNS teljes hosszában összezáródik, mindenhol egyformán, majdnem tökéletes B DNS konformációban marad, de ekkor kétmenetnyi jobbmenetes szuperhélix jelenik meg rajta (lásd **12.35. ábra**).

A két említett forma termodinamikai egyensúlyban van, de a szuperhelikális van alacsonyabb szabadentalpia szinten, ezért ez lesz a gyakoribb állapot.

A kísérlet elején egy Lk = 25, T = 25, W = 0 állapotú relaxált körből indultunk ki, a végén legstabilabb formaként egy Lk = 23, T = 25, W = -2 állapotú, két **negatív szuperhélix**et tartalmazó formát kaptunk. Vegyük észre, hogy a három paraméter között az alábbi összefüggés áll fenn: **Lk = T + W**.

A T=25 jelzi, hogy mindkét forma B-DNS konformációban van, a W érték jelzi a szuperhélixek számát, és irányát, az Lk pedig azt, hogy a láncok hányszor kerülik meg egymást.

A fenti gondolatkísérletben láttuk, hogy két menet kitekerésével egy 2 Lk értékkel kisebb topoizomer DNS jön létre, ami kétmenetnyi jobbmenetes szuperhélixet indukál. A **12.36. ábra** azt mutatja be, hogy ugyanezt a végállapotot máshogy is elérhetjük.



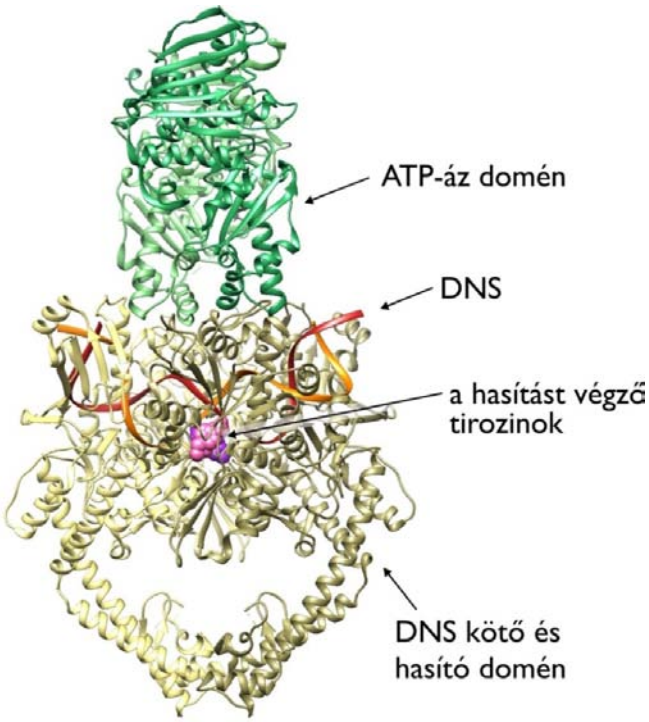
12.36. ábra: Két szuperhélix menet létrehozása a szál ideiglenes elvágásával, és egy másik szakasz átfűzésével

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ehhez a DNS két szálát elvágjuk, és a résen a másik (duplaszálú) DNS-szakaszt megfelelő irányban átfűzzük. A **prokarióta topoizomeráz II enzim** éppen ezt teszi, így képes **jobbmenetes, negatív szuperhélixek**et létrehozni köralakú DNS-ekben. Az enzim egy relaxált, alacsony szabadentalpia-szintű állapotból egy feszített, magasabb szabadentalpia-szintű formát hoz létre. Ez a folyamat önmagában tehát szabadentalpia növekedéssel járna, tehát endergonikus lenne, nem menne végbe spontán. A reakció azért megy mégis végbe, mert egy kapcsolt reakcióban egy nagy negatív szabadentalpia változással járó másik folyamat is lezajlik. Az enzim a működése során ATP-t is hidrolizál ADP-re. Az enzim felépítését és a folyamatot a **12.37. ábra**, illetve a **12.38. ábra** mutatja be.

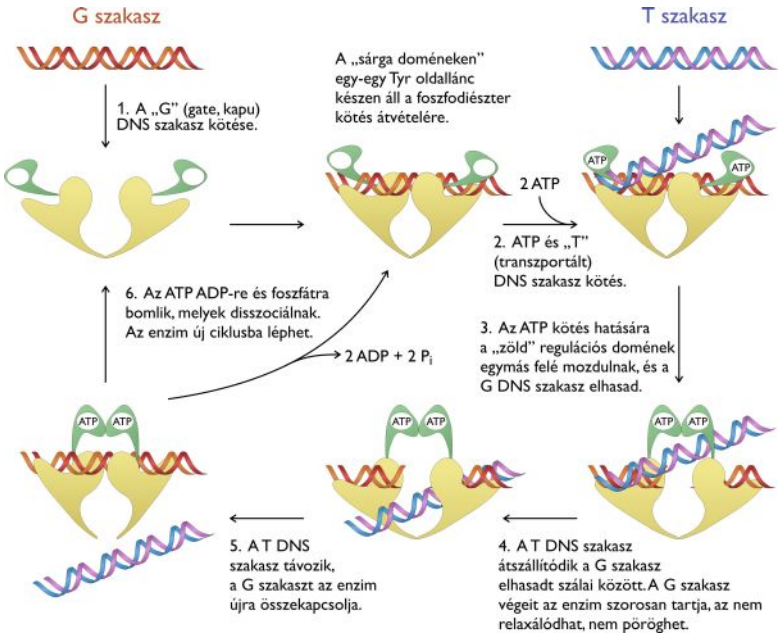
A topoizomeráz II egy kétfogású cirkuláris szimmetriával rendelkező homodimer enzim. Az alegységek kétdoménesek. Az „A" domének két Tyr oldalláncon keresztül hasítja a DNS egy-egy foszfodiészter kötését.

A „B" doménnek ATP-áz aktivitása van, az **ATP hidrolízise hajtja** termodinamikai értelemben **a reakciót**. Az ATP-ben rejlő kémiai energia mechanikai feszültség létrehozásához használódik fel, tehát a topoizomeráz II egy motorfehérje. (Minden fehérje molekuláris motornak tekinthető, ha az ATP kémiai energiáját mechanikai feszülésre vagy elmozdulásra konvertálja.)



12.37. ábra: Egy prokarióta topoizomeráz II enzim szerkezete duplaszálú DNS-sel komplexben (PDB: 1BGW)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



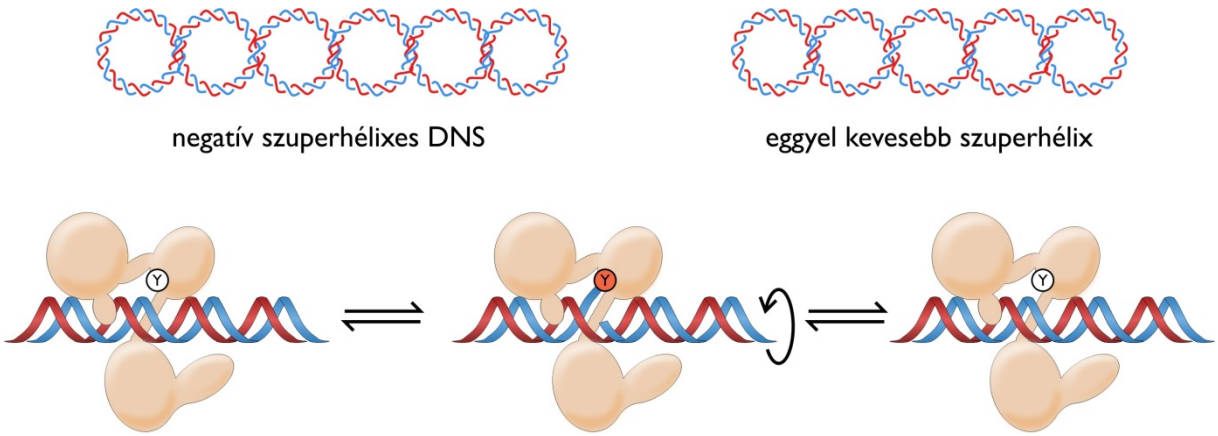
12.38. ábra: A topoizomeráz II enzim működési mechanizmusa

Alapállapotban a topoizomeráz II enzim nem köt ATP-t, és olyan konformációban van, amelyben képes egy duplaszálú DNS szakasz kötésére. Ezt a DNS-t „G" (*gate*) DNS-nek hívjuk, mert ez lesz mintegy kapuként kinyitva ahhoz, hogy egy másik duplaszálú DNS át legyen szállítva rajta. Az enzim térszerkezete a G DNS-sel alkotott komplexben kissé módosul, ezáltal képessé válik egy másik DNS szakasz, majd ezt követően ATP kötésére. Ez a másik DNS szakasz a „T", vagyis transzportált DNS. Az ATP kötés hatására az ATP-áz domének egymás felé mozdulnak, a G **DNS mindkét szálon elhasad**, de kovalensen kötve marad az enzimhez, és az A domén konformációváltozása miatt a G DNS-ben megjelenik a „kapu". A T DNS átszállítódik ezen a kapun, majd egy újabb A-domén konformációváltozás keretében , leválik az enzimről, miközben az enzim az elvágott szálakat újra összekapcsolja. Ezt követően az enzim katalizálja az ATP hidrolízisét, ADP és foszfát keletkezik, amelyek leválnak az enzimről, így az enzim visszatér az alapállapotába.

Az ATP átalakulásakor felszabaduló kémiai energia értéke megszabja, hogy mekkora maximális feszültséget lehet általa a DNS-ben létrehozni, tehát megszabja a „bepumpálható" szuperhélixek maximális számát.

A mechanikai feszültséget hordozó, negatív **szuperhelikális DNS** szerkezetet természetesen ATP felhasználása nélkül is lehet **relaxálni**, de ehhez is kémiai kötést kell bontani a DNS láncon belül. Elegendő a DNS-nek csak az egyik szálát elvágni, az elvágott szál az ép szál körül forogva kipöröghet. A sejtben ezt a folyamatot is enzim katalizálja, mégpedig a **topoizomeráz I enzim**.

Az enzim működési mechanizmusát a **12.39. ábra** illusztrálja.

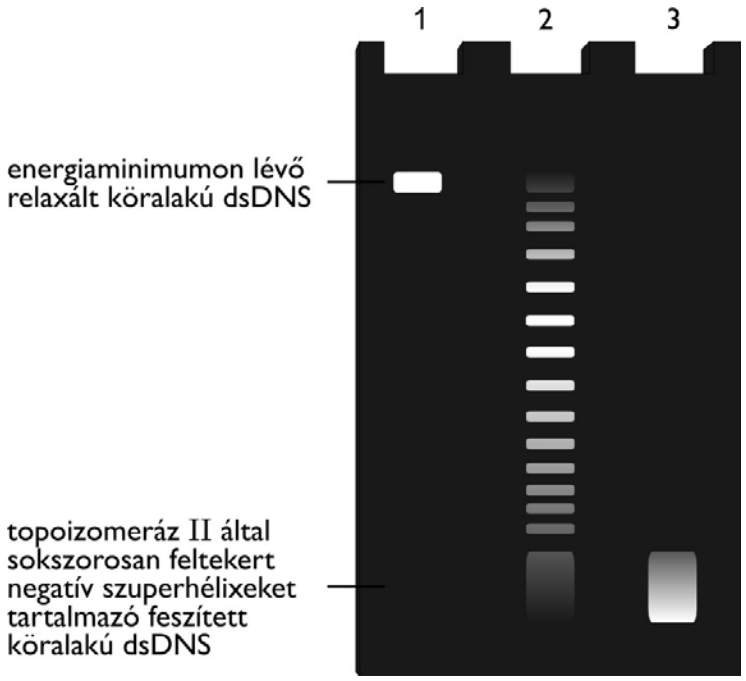


XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

12.39. ábra: A topoizomeráz I enzim működési mechanizmusa

A topoizomeráz I relaxálja a feltekert DNS molekulákat, egyenként kipörgetve egy-egy negatív szuperhélixet. A reakció során csak **egyetlen szálat hasít**, és azt egy ütemben csak egyszer hagyja a másik szál körül körbefordulni. A két szálat újra összekapcsolja.

A **12.40. ábra** egy olyan kísérletet demonstrál, amelyben egy topoizomeráz II enzimmel korábban sokszorosan feltekert, negatív szuperhélixeket tartalmazó, köralakú, kétszálú DNS-t kezelünk topoizomeráz I enzimmel. A folyamatot a topoizomeráz I hozzáadásával indítjuk, majd különböző időegységekben mintát veszünk, a mintában az enzimet denaturáljuk, majd a különböző időtartamokhoz tartozó mintákat agaróz gélelektroforézissel elemezzük.



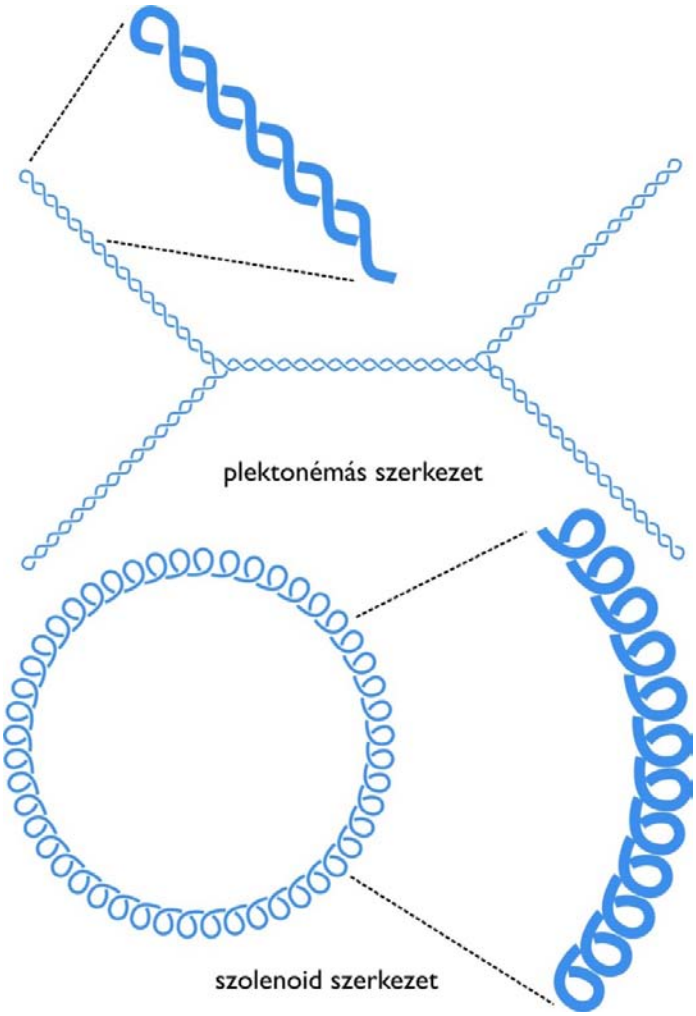
12.40. ábra: A topoizomeráz II által készített szuperhelikalizált DNS topoizomeráz I által relaxálható. A különböző számú szuperhélixet tartalmazó formák látszólagos mérete eltérő, ezért agaróz elektroforézissel elválaszthatók egymástól. Az ábra egy ilyen gélkép rajza. A topoizomeráz egyenként szűnteti meg a szuperhélixeket, ezért diszkrét intermediereket kapunk.

A **maximálisan szuperhelikalizált DNS a** kísérletben a **legkompaktabb** molekula, amely a gélben a leggyorsabban vándorol (legalul helyezkedik el). Kontrollként a relaxált körnek megfelelő topoizomert is belekeverték a mintába. A szuperhélixek számának csökkenésével a molekula Stokes-sugara egyre növekszik, így minél kevesebb szuperhélixet tartalmaz a DNS, annál lassabban vándorol a gélben. Jól látható, hogy diszkrét számú eltérő forma létezik.

Az **eukarióták** is nyitottabb DNS-t hoznak létre, de ezt merőben eltérő módon teszik. Ráadásul az eukariótáknál ennek a megoldásnak a funkciója csak részben a nyitottabb szerkezet létrehozása. Másik fő funkcióként az eukarióta DNS szuperhelikalizációja egyben a DNS tömörebb összepakolásának (**kondenzáció**jának) első lépését is jelenti.

A prokariótáknál látott jobbmenetes, negatív szuperhélix (amit plektonémának is neveznek) topológiailag egyenértékű egy balmenetes, úgynevezett **szolenoid szerkezet**tel (lásd **12.41. ábra**).

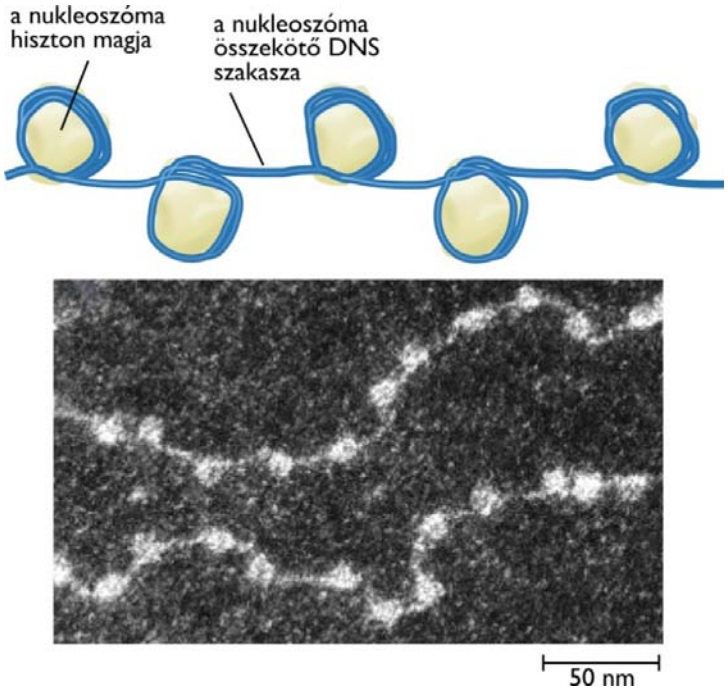
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.41. ábra: A szolenoid szerkezet egyenrangú a szuperhélixes plektonéma szerkezettel

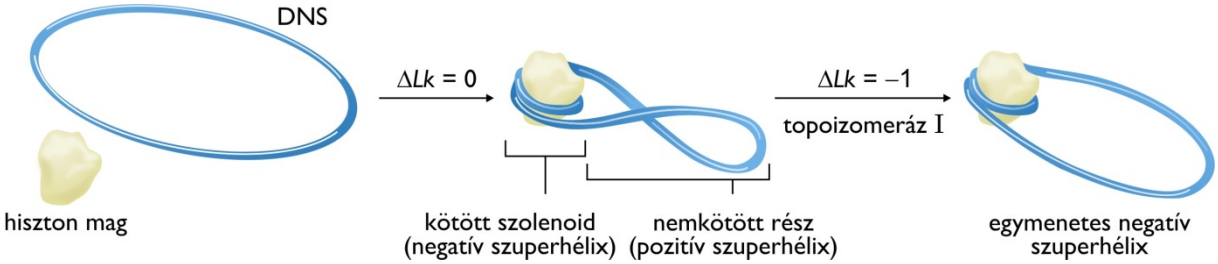
A szolenoid szerkezet csak akkor jöhet létre, ha az abban szereplő fonál, ami ebben az esetben a kettősszálú DNS, valami köré tekeredik. Ez az eukariótáknál úgy valósul meg, hogy a **DNS** egy **hiszton** fehérjékből álló **komplex** köré tekeredik. Az „orsót”, amire a DNS kettősspirál tekeredik nyolc polipeptidlánc alakítja ki a következő összetételben: **(H2A, H2B, H3, H4)$_2$**. A **hiszton magra tekeredő DNS** szerkezeti egysége az először elektronmikroszkóppal detektált **nukleoszóma**. A nukleoszómára kb. 200 bp DNS jut. Ebből **146 bp** vesz részt a hisztonmag körüli kb. **1,8 menet**nyi feltekeredésben, a maradék pedig egy rövid **összekötő rész**t alkot, ami a **H1 hiszton**fehérjéhez és más, nem-hiszton fehérjékhez kötődik (lásd **12.42. ábra**)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.42. ábra: Az elektronmikroszkópos gyöngysorszerkezet, és az annak megfelelő nukleoszómás modell

A **balmenetes szolenoid** létrehozása topológiailag egyenértékű azzal, **mint**ha **egy jobbmenetes, negatív szuperhélix**et hoznánk létre. A **12.43. ábra** egy köralakú DNS-en mutatja be, hogy egy köralakú relaxált B-DNS esetén a hiszton mag körül kialakuló szolenoid miatt a maradék, nemkötődő részen egy pozitív szuperhélix szerkezet jönne létre.



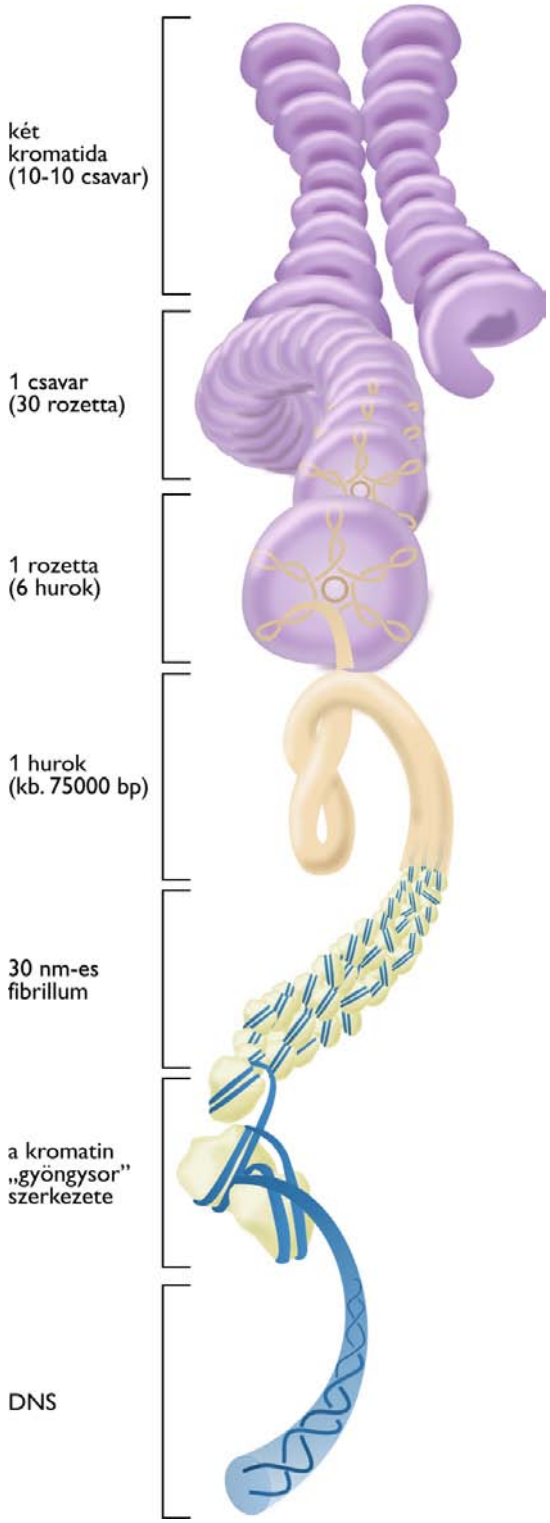
12.43. ábra: A nukleoszóma szolenoid szerkezetének létrehozása szerkezeti feszültséget, és emiatt pozitív szuperhélixeket generálna, amiket az eukarióta topoizomeráz I szüntet meg

A „végtelenül hosszú” **lineáris eukarióta DNS**-re is igaz, hogy a nukleoszómás szerkezet kialakulásakor a még **nem szolenoid szerkezetben lévő részen** a szerkezeti feszültség miatt **pozitív szuperh**élixek jelennének meg. Az eukarióta topoizomeráz I enzim a prokarióta enzimhez hasonlóan képes szuperhélix szerkezetet relaxálni, azzal a fontos különbséggel, hogy az eukarióta enzimek egy része képes pozitív szuperhélixen dolgozni (mely esetén ellenkező irányban kell megkerülnie az elvágott DNS szálnak az ép szálat).

Amikor az eukarióta topoizomeráz I a nukleoszóma szerkezet kialakulása során relaxálja a még nem nukleoszómás szerkezetben lévő részt, akkor végső soron a prokarióták negatív szuperhélix szerkezetével analóg DNS szerkezet jön létre úgy, hogy ehhez nem szükséges topoizomeráz II működés. A feszített szerkezetet a DNS és a nukleoszóma mag közötti kötési energia biztosítja.

Az eukarióta kromoszómákban a DNS egy, részben fehérjékből, részben RNS-ből álló vázhoz kapcsolódik, és ahhoz hosszú hurkokat képezve kötődik (lásd **12.44. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



12.44. ábra: Az eukarióta DNS magasabbrendű szerkezeti szintjei eredményezik a kromoszóma szerkezetet

A nukleoszómás szerkezet csak az első szintje a DNS-fehérje komplexekből létrejövő **kromatin** szerkezetek kialakulásának. A legmagasabb szerkezeti szint, ami a legnagyobb szerkezeti tömörítést, kondenzációt jelenti, a fénymikroszkóppal is látható kromoszómákat eredményezi. A **kromoszóma** szerkezet felé haladva a nukleoszómás szerkezetből kiindulva további, **magasabb szerkezeti szintek** jönnek létre, így a DNS egyre kisebb térfogatrészbe zsúfolható.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az egyik ilyen szint az úgynevezett **30 nm-es fibrillum** lehet, ami elektronmikroszkóppal megfigyelhető. A 30 nm-es fibrillumból **hurkok** képződnek, amelyek egy-egy teljes gént hordozhatnak, és a kromoszóma **vázszerkezete körül** rendeződnek el.

A jelenlegi modell szerint 6 hurok alkot egy korongszerű **rozettá**t, 30 rozetta hozhat létre egy **csavar**t, és nagyjából 10 csavar tesz ki egy teljes **kromatidá**t (a replikációt követően a sejtosztódás egy bizonyos szakaszáig minden kromoszóma két duplaszálú DNS-t tartalmaz, ezeket a duplaszálú DNS-eket hívjuk kromatidának).

Mint a következő fejezetekben látni fogjuk, a topoizomerázok fontos szerepet játszanak a DNS replikációban és a transzkripcióban.

Összefogalásképpen a DNS kémiai és térszerkezetét, valamint a Chargaff-szabályokat a **5. animáció**, a DNS magasabbrendű szerkezeti szintjeinek kialakulását pedig **6. animáció** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

13. fejezet - Replikáció (DNS szintézis) és DNS-hibajavítás

(szerző: Pál Gábor)

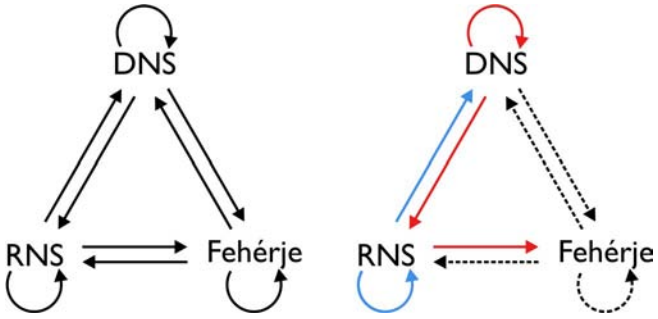
A **replikáció** az a folyamat, amelynek során az eredeti **DNS molekula megkettőződik**, és két, az eredetivel **azonos másolat** keletkezik. A replikáció folyamatában az élőlény (vagy vírus) teljes DNS állománya másolásra kerül.

Bármilyen organizmusról legyen is szó, annak örökítő anyagában őrződik mindazon információ, amely lehetővé tette, és lehetővé teszi, hogy az organizmus létezzen, túléljen, szaporodjon. Az örökítő anyagban tárolt információ tehát felbecsülhetetlenül nagy értéket képvisel. Ezzel tökéletes összhangban az evolúció során olyan kifinomult mechanizmusok jöttek létre, melyek révén az örökítő anyag másolása szinte hiba nélkül megy végbe. A **hibaráta** megdöbbentően alacsony, megközelítőleg minden egymilliárd lemásolt monomerre jut egyetlen hiba (a hibaarány tehát $\mathbf{1/10^9}$, azaz 10^{-9}).

Ugyanakkor ez a nagyon alacsony hibaarány teszi lehetővé, hogy az élőlények genetikai állománya lassan, de folyamatosan változzon, a populációkon belül genetikai változatosság jöjjön létre, az evolúció működjön.

13.1. A centrális dogma

A replikáció a genetikai információ áramlásának az egyik folyamata. Mielőtt magára a replikációra kitérnénk, ismerkedjünk meg a biológia rendszerekben zajló genetikai információáramlás általános koncepciójával (lásd **13.1. ábra**).



13.1. ábra: **Francis Crick centrális dogmája.** A baloldali kép az egyes makromolekula típusok közötti összes elméletileg lehetséges információáramlást mutatja. Információáramláson itt azt értjük, hogy az egyik makromolekula monomersorrendje alapján alakul ki egy másik makromolekula monomersorrendje. A jobboldali ábrán piros nyíl jelzi a minden élőlényben lezajló 3 általános információáramlási útvonalat, a replikációt, transzkripciót és transzlációt. Kék szín jelzi a csak egyes organizmusokban (esetleg csak vírusfertőzött élőlényekben) lezajló folyamatokat, és szaggatott nyíl azokat, amelyek a mai ismereteink szerint nem mennek végbe.

Francis Crick 1958-ban egy általános sémát alkotott arról, hogy a nukleinsavak és a fehérjék szekvenciájában lévő információ hogyan adódhat át az egyes makromolekulák között. Információáramlás alatt specifikusan azt értjük, hogy az egyik makromolekula monomersorrendje meghatározza egy másik makromolekula monomersorrendjét. Az eredeti sémát Crick 1970-ben pontosította. A sémának a „**centrális dogma”** elnevezést adta.

A háromféle makromolekula, DNS, RNS és fehérje esetében elméletileg 3x3 = 9 lehetséges információ átadás történhet. 1958-ban Crick ezek közül hármat tartott olyannak, ami nem valósulhat meg. Ezek mind a fehérje szekvencia alapján történő új polimer keletkezésre vonatkoztak. Tehát fehérje szekvenciát, mint templátot használva nem keletkezhet DNS, RNS, vagy fehérje.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A maradék 6 utat lehetségesnek nevezte. Ezek közül 1970-ben háromról már egyértelműen kijelenthette, hogy azok a teljesen általános utak. Ez a **DNS-alapú DNS-szintézis**, vagyis a **replikáció**; a **DNS-alapú RNS-szintézis**, vagyis a **transzkripció**; valamint az **RNS-alapú fehérjeszintézis**, a **transzláció**.

A három másik elméleti lehetőségből 1970-ben kettőről már ismert volt, hogy speciális esetekben végbemennek. Az **RNS genomú vírusok** egy része olyan enzimmel rendelkezik, amelyik **RNS-alapú RNS-szintézis**sel másolja a genomját. Más RNS genomú vírusokról (**retrovírusok**) pedig kiderült, hogy az RNS genomjuk alapján először egy DNS-másolat keletkezik (**RNS-alapú DNS-szintézis**) a **reverz transzkriptáz enzim** által, majd erről a DNS másolatról képződik az RNS genom.

Néhány tanulmány azt állította, hogy bizonyos speciális kezelések hatására a riboszóma képes egyszálú DNS alapján fehérjét szintetizálni. Ezt nem sikerült megbízhatóan reprodukálni, ezért a mai ismeretek szerint ez a mechanizmus, bár elméleti alapon nem zárható ki, a valóságban nem megy végbe.

A **13.1. ábra** baloldali képe az elméletileg lehetséges 9 információ átadási folyamatot illusztrálja. A **13.1. ábra** jobboldali képén piros nyilak mutatják a minden élőlényben működő 3 alap információs utat, a replikáció, transzkripciót és a transzlációt. Kék nyilak mutatják a speciálisabb információs utakat, amelyek csak az élőlények (esetleg csak vírusfertőzött élőlények) egy részében működnek.

A centrális dogma elnevezésben a dogma szó használatát sokan, és jó okkal kritizálták. A dogma megkérdőjelezhetetlen igazságot jelent. Márpedig semmi sem állhat távolabb a tudományos világnézettől, mint a megkérdőjelezhetetlenség. Minden tudományos állítás igazságtartalma megkérdőjelezhető, és amennyiben az állítás nem igaz, úgy (előbb, vagy utóbb) cáfolható.

Mint később visszaemlékezéseiben Crick megírta, amikor ezt a kifejezést választotta, nem volt tökéletesen tisztában annak jelentésével. Úgy gondolta, hogy a dogma mindig valami olyasmire vonatkozik, ami központi jelentőségű, ugyanakkor nem alapul ésszerű bizonyításon. Amikor az első modellt leírta, az információs utak zöme még nem volt bizonyítva.

Térjünk vissza a replikációra. Watson és Crick az általuk alkotott DNS térszerkezeti modell alapján egy koncepcionálisan rendkívül elegáns, egyszerűnek tűnő replikáció modellt javasolt. Mint látni fogjuk, maga a modell helytállónak bizonyult, de a konkrét megvalósulás szintjén egy rendkívül összetett folyamat.

Azt, hogy összetett kell, hogy legyen már a folyamat részleteire vonatkozó első mechanisztikus kérdések özöne is sejttette. Másrészt a **kólibaktérium** genetikai és biokémiai vizsgálata alapján az is kiderült, hogy még ebben a viszonylag egyszerű organizmusban is több mint **50 géntermék** vesz részt **a DNS másolásában**, **é**s a DNS-ben keletkező szekvencia **hibák kijavításában**.

13.2. A DNS replikációval kapcsolatos alapvető kérdések

A replikáció mechanizmusával kapcsolatban a Watson-Crick modell megjelenését követően azonnal számos alapvető kérdés vetődött fel:

A DNS replikáció során az újonnan keletkező szálak egymással képeznek kétszálú DNS-t (konzervatív modell), vagy a régi szálakkal jönnek létre vegyes régi-új kétszálú DNS hibridek (szemikonzervatív modell), vagy netán az új és a régi szálak egy láncon belül keverve fordulnak elő (mozaikos modell)?

Kémiai szempontból hogyan zajlik az új DNS szálak szintézise, és mi az energia-forrása a szintézisnek?

Milyen irányban zajlik a DNS szál szintézise – először az 5’- vég jön létre, és innen halad a folyamat a 3’-vég felé, vagy éppen fordítva? Netán vegyesen mindkettő zajlik?

Hol, és hogyan kezdődik el a replikáció, és hogyan fejeződik be?

Milyen enzimek katalizálják a folyamatot, és hogyan zajlik a katalízis molekuláris részleteiben?

Milyen pontossággal másolódik le a DNS szekvenciája?

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Milyen mechanizmusok biztosítják az információ hű másolását és megőrzését?

Ebben a fejezetben ezeknek a kérdéseknek a kifejtésére és megválaszolására kerítünk sort.

13.3. A Meselson-Stahl kísérlet: a DNS replikáció szemikonzervatív

Watson és Crick a DNS-szerkezeti modelljük megalkotásakor azonnal a legelegánsabb replikációs mechanizmust feltételezték. A **szemikonzervatív modellt**, amelyben a DNS két eredeti szála, tehát a szülői szálak teljes hosszukban elválnak egymástól, mindkettő templátként szolgál, és az új komplementer utódszálakkal összetapadva képezik a következő generáció két duplaszálú DNS-ét.

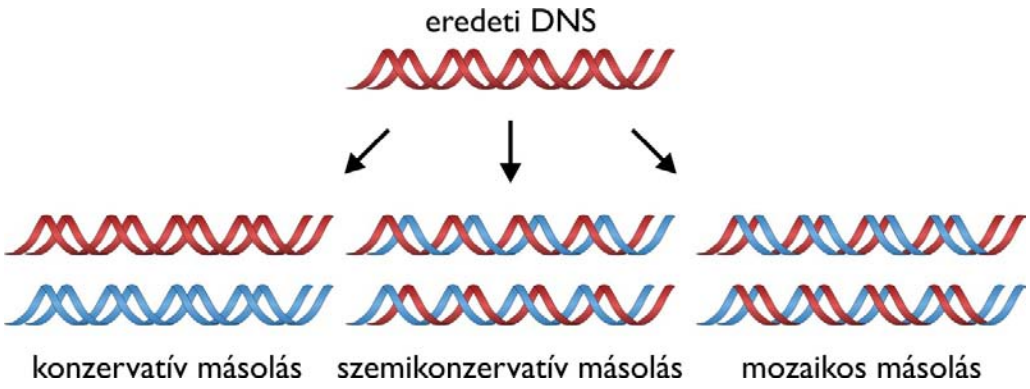
A szemikonzervatív modellben tehát a replikáció eredménye **két** olyan **duplaszálú DNS**, amelyben az **egyik** szál teljes egészében az **előző generációból** származik, míg a **másik** szál **új**onnan keletkezik.

A konzervatív modell szerint ennek éppen az ellenkezője lett volna igaz: a szülői szálak csak ideiglenesen váltak volna el egymástól, a komplementer szálak szintézisét követően a két szülői szál újra összeállt volna, az újonnan szintetizált szálak pedig egymással alkottak volna egy új párt. Ebben a modellben tehát megőrződne az eredeti szülői DNS-t, és keletkezne egy teljesen újonnan szintetizált utód DNS.

A mozaikos modell, amit Max Delbrück javasolt, meglehetősen komplikált, de egy jogos probléma látszólag egyetlen lehetséges megoldását kínálta. Delbrück arra az abban az időben joggal súlyosnak vélt technikai problémára hívta fel a figyelmet, hogy vajon miként lenne képes két egymás köré tekeredett DNS szál teljes mértékben széttekeredni. Ezt energetikailag és geometriai (topológiai) szempontból lehetetlennek tartották. Ha ezek a szálak nem tekerednének szét, akkor a keletkező két duplaszálú DNS tekeredne annyiszor egymás köré, ahányszor az eredeti DNS két szála tekeredett egymás köré. Ekkor pedig felmerül a kérdés, hogy ezt a két duplaszálú DNS-t hogyan lehetne elválasztani egymástól.

Delbrück a probléma megoldására a következő mechanizmust javasolta: mindkét szál egy időben templátként szolgál új szál szintéziséhez, de amint egy-egy 5-monomernyi (fél hélix-nyi) új szál szintetizálódik, a régi szálak elhasadnak, és az azonos irányultságú új szál és régi szál között jön létre kovalens kötés. Ennek eredményeként a replikáció után mindkét duplaszálú DNS mindkét szála 5-5 monomerként vegyesen eredeti, és újonnan szintetizált szálat tartalmazott volna, a két duplaszálú DNS hélix nem egymás köré tekeredve, hanem egymás mellett keletkezett volna.

Ezt a modellt elnevezte diszperzív modellnek, amire magyarul a mozaikos kifejezést alkalmazzuk. A három modellt a **13.2. ábra** illusztrálja.



13.2. ábra: A replikáció elméletileg lehetséges modelljei

Számos kutatócsoport igyekezett kísérletesen alapon megfejteni, hogy a három közül melyik modell a helytálló. Ezt elsőként Matthew **Meselson** és Franklin **Stahl** derítette ki egy **1957**-es kísérletben, amelyet sokan a molekuláris biológia legelegánsabb **kísérlet**ének tartanak (lásd **13.3. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A három említett modellt az különbözteti meg egymástól, hogy az első, illetve a második generációban alapvetően eltérő az egyes keletkező DNS-ekben a régi és az új DNS aránya. Olyan kísérletre volt szükség, amely valahogyan különbözővé tudja tenni a régi és az új szálakat, mégpedig olyan módon, hogy azután ez a különbség fizikai elválasztásra is módot adjon.

Meselson és Stahl az akkori időszak legmodernebb eljárásait kombinálta teljesen újszerű módon. A DNS-ben nagy arányban van nitrogén. A nitrogén leggyakoribb izotópja az ^{14}N, vagyis a 14-es tömegszámú izotóp, amely atommagjában 7 proton és 7 neutron van. Egy jóval ritkább, nem radioaktív izotóp az ^{15}N, amelyben 7 proton és 8 neutron van. Ez az izotóp, amely kémiai tulajdonságaiban természetesen tökéletesen megegyezik az ^{14}N izotóppal, akkor már elérhető volt tisztított formában.

Az előkísérlet során **kólibaktériumok**at tenyésztettek **^{15}N**, tehát nehéz nitrogén-tartalmú **tápoldatban** több generáción át. A baktérium minden N-tartalmú molekulájába bekerült a ^{15}N izotóp, így a DNS-ébe is, vagyis a sejtek „nehéz DNS-t” tartalmaztak.

Egy párhuzamos kísérletben **normál ^{14}N-tartalmú tápoldatban** is tenyésztettek kólibaktériumot, amely így „normál DNS-t” tartalmazott, amit a különbséget kihangsúlyozandó, könnyű DNS-nek fogunk nevezni.

Az így előállított nehéz és könnyű DNS tömege, és ezáltal sűrűsége, csak 1%-ban tért el egymástól, ezt az apró különbséget kellett detektálni!

Mindkét esetben izolálták a baktériumból a DNS-t. Ezek után egy akkoriban újonnan kifejlesztett technikát vetettek be, a **sűrűséggradiens centrifugálást**, amelyben egy nagy tömeg/térfogat sűrűségű anyagnak, esetükben a cézium-kloridnak az oldatát használták. Ebből a centrifugacsőben gradienst hoztak létre, a cső alja felé fokozatosan nőtt a cézium klorid koncentrációja, és emiatt a közeg sűrűsége.

Amikor ezzel a technikával centrifugálták az oldat tetejére rétegzett DNS mintát, a DNS molekulák csak addig ülepedtek, amíg a környezetük sűrűsége éppen megegyezett a saját sűrűségükkel. Ezen a ponton megálltak, mintegy „lebegtek”. Meselson és Stahl kimutatták, hogy a kétféle tenyésztésből származó DNS sűrűsége közötti eltérés elegendően nagy ahhoz, hogy a centrifugálás végére eltérő sávba rétegződjenek a centrifugacsőben. Ha tehát a két eltérő sűrűségű DNS oldatát összekeverték, akkor ezek után ezzel a speciális centrifugálással a két formát el tudták választani egymástól.

Felmerülhet az olvasóban, hogy a sűrűség különbség helyett a „nehéz-DNS” és a „könnyű-DNS” tömegét is vizsgálhatták volna. Csakhogy ezzel kapcsolatban fontos tudnunk, hogy a DNS az izolálás során fizikai behatások miatt összetöredezik, és egy olyan keveréket kapunk, amelyben a legkülönbözőbb tömegű töredékek vannak. Az egy mintából származó, legkülönbözőbb tömegű darabok sűrűsége azonban azonos, így a kizárólag sűrűség alapján szeparáló technika ezeket egy rétegbe gyűjti!

Miután világossá vált, hogy a két minta sűrűség alapján elválasztható egymástól, elindulhatott a kísérlet érdemi része (lásd **13.3. ábra**).

A kísérlet során ismét kólibaktériumokat tenyésztettek ^{15}N tápoldatban több generáción át, majd átoltották a baktériumok egy részét normál, ^{14}N-es tápoldatba. Az osztódó baktériumsejtek számát spektroszkópiai módszerrel (fényszóráson keresztül) mérték. Egy sejtosztódás után (tehát amikor a sejtszám a kezdeti érték duplájára nőtt) mintát vettek, a sejteket elölték, izolálták a DNS-t, és sűrűséggradiens centrifugálással meghatározták a sűrűségét. Ugyanezt megtették a második osztódást követően is.

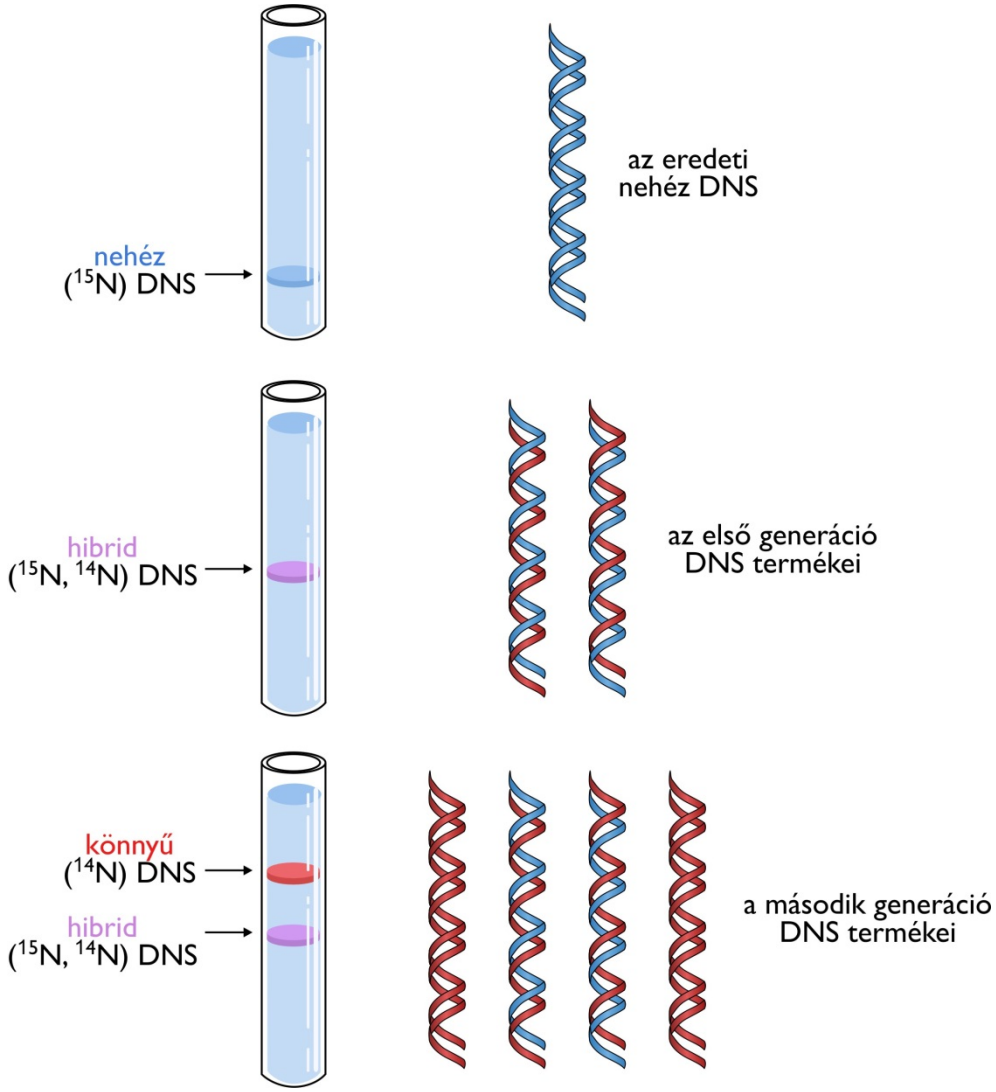
Az eredmény a következő volt. Az **első osztódás után** csak **közepes sűrűségű DNS**-t kaptak. Ez kizárta a konzervatív modellt, amely szerint 50-50%-ban nehéz-DNS-t és normál-DNS-t kellett volna kapniuk. Az eredmény azonban mind a szemikonzervatív, mind a mozaikos modellel összhangban volt.

A **második sejtosztódás**t követő eredmény szerint a mintában **50-50%-ban** volt jelen **közepes** sűrűségű, és könnyű, azaz **normális sűrűségű DNS**. Ez az eredmény a szemikonzervatív modellel összhangban volt, azonban a mozaikos modellt kizárta, hiszen 50%-ban megjelent az a forma, amelyben két, tisztán ^{14}N-es izotópot tartalmazó lánc alkotott egy közös duplaszálú DNS-t.

A mozaikos modell alapján mindig homogén sűrűségű DNS-t kellett volna izolálniuk, de annak sűrűsége generációról generációra haladva egyre jobban közelítette volna a könnyű DNS normális sűrűségét.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A kísérletnek később elvégezték egy még könnyebben értelmezhető változatát. Lúgos pH-n a DNS denaturálható, a két szál elválasztható egymástól. Magas pH-n végrehajtva a sűrűséggradiens centrifugálást nem duplaszálú DNS-eket, hanem egyszálú DNS-eket kellett megkülönböztetniük.

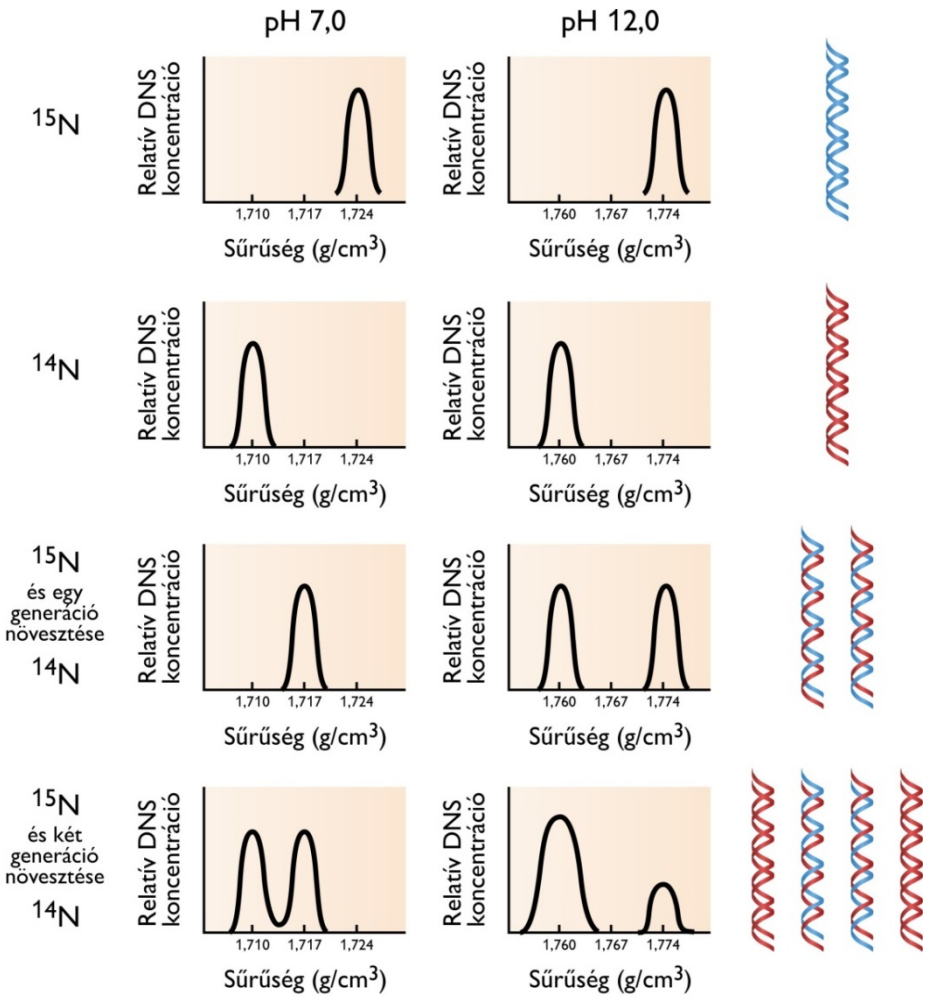


13.3. ábra: A Meselson-Stahl kísérlet bizonyítja, hogy a replikáció szemikonzervatív

Így már az első sejtosztódás után ki lehetett mutatni, hogy kétféle DNS szál van jelen, egy olyan, ami csak nehéz láncból áll, és egy olyan, ami csak normál láncból áll. Így a mozaikos modell kizárható volt.

A semleges és lúgos közegben végrehajtott kísérletek eredményét a **13.4. ábra** illusztrálja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.4. ábra: A Meselson-Stahl kísérlet kétszálú (pH 7,0) és egyszálú (pH 12,0) DNS-sel elvégezve. A DNS koncentrációját a centrifugacső tetejétől az aljáig fotometriás módszerrel határozták meg. Az ábrán a vízszintes tengely a sűrűséget, a függőleges tengely a DNS koncentrációt jelenti.

13.4. A Cairns-kísérlete: az origó és a replikációs villa kimutatása

Miután a replikáció szemikonzervatív mechanizmusa bizonyítottá vált, újabb kérdések sora merült fel:

A másolandó szálak a replikáció előtt teljesen elválnak egymástól, és csak ezek után szintetizálódik mellékük az új szál, vagy a szülői szálak egyszerre mindig csak egy kis szakaszon nyílnak szét, és mellettük folyamatosan zajlik az új szál szintézise?

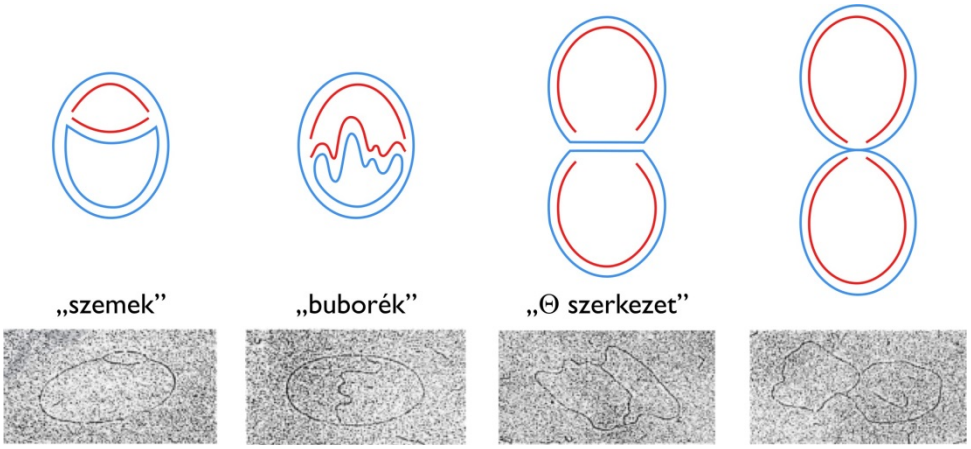
A replikáció véletlenszerű helyeken indul el, vagy előre rögzített kezdőpontokon? Az elindulás (szál szétnyílás) helyétől számítva csak az egyik irányban, vagy mindkét irányban zajlik az új szálak szintézise?

Folyamatosan, tehát egyetlen darabban másolódik a DNS, vagy kisebb darabokban?

Ezekre a kérdésekre **John Cairns** rendkívül fontos **kísérlete** adta meg a válaszokat. Kóli sejteket növesztett radioaktív, triciált (^{3}H) timidint tartalmazó táptalajon. A baktériumok felvették a radioaktív nukleozidot, és beépítették a DNS-ükbe. A bakteriális genom így radioaktívvá vált. Cairns rendkívül körültekintő eljárásokkal óvatosan feltárva a sejteket úgy tudott DNS-t izolálni, hogy az az esetek egy részében nem töredezett össze. A DNS-t tartalmazó oldatot óvatosan szétterítette egy sík felületen. A trícium bomlásából származó elektronok béta-sugárzás formájában bocsájtódnak ki, amit az autoradiográfiának nevezett módszer keretében a mintára helyezett

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

röntgenfilmen lehetett detektálni. A viszonylag alacsony szintű radioaktivitás miatt mintegy 2 hónapos expozíciós időre volt szükség ahhoz, hogy a röntgenfilmen megjelenjen a DNS molekulák képe (lásd **13.5. ábra)**.



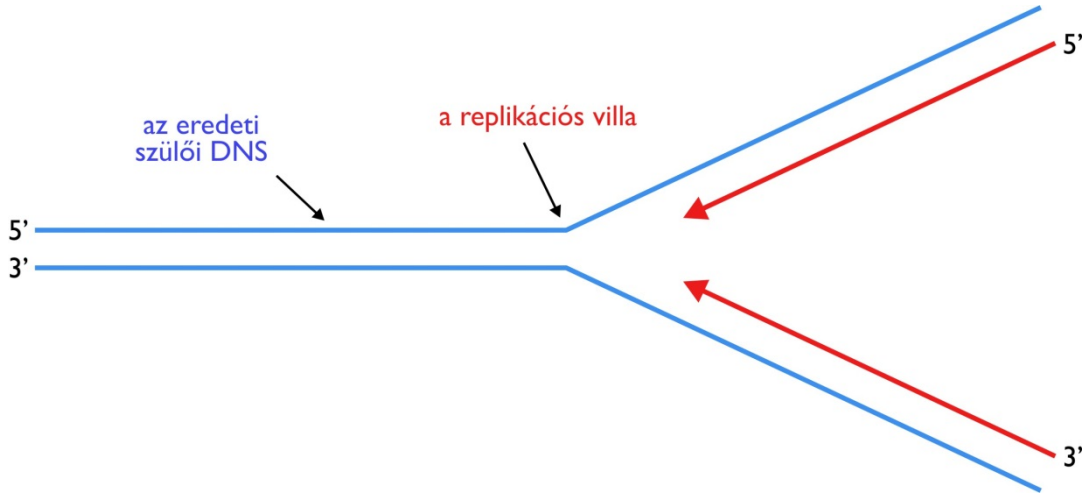
13.5. ábra: Cairns radioaktív kísérlete láthatóvá teszi a DNS szintézis topológiáját

A ~ 1,7 milliméteres hosszúságú DNS képe már kis nagyítás mellett is jól vizsgálható volt, de további nehézséget jelentett, hogy viszonylag ritkán sikerült szuperhélix-mentes, teljesen kiterített DNS-t találni. Amikor azonban ez sikerült, Cairns egyértelműen ki tudta mutatni, amit a bakteriális genetika korábban javasolt. A **kóli genom**ja valóban **egyetlen, köralakú DNS** molekula.

A DNS molekulákat különböző replikációs fázisban rögzítve kiderítette, hogy a **replikáció egyetlen ponton indul el**. Később, más eljárásokkal kombinálva azt is kiderítették, hogy az egyetlen helyen elinduló replikáció nem akárhol kezdődhet, ez az egyetlen hely a bakteriális „kromoszómának” (kromofórnak) egy szigorúan meghatározott helye, amit replikációs **origónak** neveztek el.

A különböző fázisban „lefényképezett” állapotokat sorba lehetett rendezni, és így egy logikus modellt lehetett felállítani a bakteriális kromoszóma másolásának mechanizmusára. Az origónál a két szülői szál felnyílik, egy kis szakaszon szabaddá válnak a szülői szálak. Az autoradiográfiás képek tanulsága szerint **mindkét szülői szál mentén** zajlik az új szálak **szintézis**e. A szülői szálak folyamatosan nyílnak szét, és ezzel lépést tartva keletkezik az új DNS. Először egy kis „szem” jelenik meg, majd a képződmény „buborék”-ra emlékeztet, ami egyre nagyobbá válik. Amikor a DNS-nek mintegy a fele lemásolódott, a szerkezet a görög teta betűre (θ) emlékeztet.

A DNS szerkezetének ismeretében, valamint a Cairns kísérletek alapján megjósolható volt a **replikációs villá**nak nevezett struktúra, ami a Cairns kísérletben a buborék két „szegletében” van (lásd **13.6. ábra**).



13.6. ábra: A replikációs villa egyszerűsített sémája

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A replikációs villát annak a pontnak a környezete jelöli ki, ahol a szülői DNS szálak éppen felnyíltak, hogy templátként szolgálhassanak az új szálak szintéziséhez. Mivel mindkét szál egyaránt szabaddá válik, elvileg mindkettő mellett egy időben mehet az új szál szintézise.

Cairns az eredeti kísérletét továbbfejlesztve további ismeretekhez jutott. Az eredeti kísérletben folyamatos volt a radioaktív jelölés, tehát a régi és az új szálak egyaránt jelölve voltak.

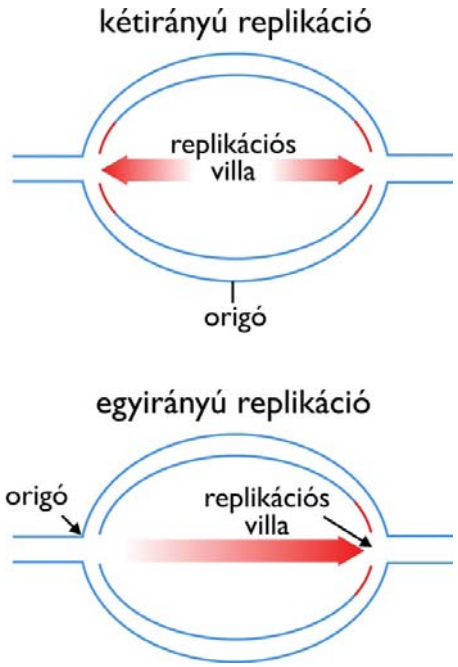
A továbbfejlesztett módszerben Cairns az alábbiak szerint járt el. A baktériumot olyan táptalajon tartotta, ami nem jelölt, és radioaktívan jelölt timidin keverékét tartalmazta, de csak alacsony százalékban tartalmazta a jelölést biztosító tríciált timidint. Ennek eredményeként a DNS, beleértve a szülői DNS-t, gyengén jelölődött, de detektálható volt. A **13.6. ábra** és **13.7. ábra** ezeket a szakaszokat kék vonallal ábrázolja.

Ezek után a baktériumot olyan tápoldatba oltotta át, amelyben nagy százalékban volt tríciált timidin, ami ezért intenzív radioaktív jelölést eredményezett. Ezt a második jelölést csak pár másodpercig alkalmazta, és a sejtet elölve leállította a replikációt. Az erősebb jelölést a **13.6. ábra** és **13.7. ábra** piros szakaszokkal mutatja.

A nagy koncentrációjú, rövid pulzusban adott radioaktív timidin az éppen újonnan szintetizálódó helyekre beépülve ezeket a helyeket intenzívebb jellel látta el. Kiderült, hogy a **13.7. ábrá**n szereplő replikációs villa mindkét szára mellett van új szál szintézis. Tehát a két régi szál szétnyílásának ütemében mindkét régi szál mellett egyidejűleg jelennek meg az új szálak. A folyamatot időben követve a jelölés a **13.6. ábra** szereplő nyilak irányában halad, miközben maga a replikációs villa is erre halad. Figyelem! Csak a jelölés megjelenése ilyen irányú, a láncépítés kémiai iránya, mint látni fogjuk, ettől az egyik lánc esetében eltér.

A replikációs buboréknak két szeglete van, így nem csak egy, hanem egyszerre két replikációs villa is lehet. A pulzusban alkalmazott jelöléssel Cairns azt is kimutatta, hogy a kóli replikációja során a buborék mindkét szegletében aktív replikációs villa működik. Mivel a **kóli kromoszóma** köralakú, ezért **a két replikációs villa** a teljes kromoszóma szempontjából **egymás felé halad** (lásd **13.7. ábra**).

Számos egyéb organizmust megvizsgálva kiderült, hogy a **kétirányú (bidirekcionális) replikáció** az általános, tehát az, amikor a replikációs buborék mindkét szegletében működik 1-1 replikációs villa. Létezik kivétel is, a **mitokondriális genom**ban, **plazmidok** és egyes vírusok replikációjakor például a buborékban csak **egy replikációs villa** működik.



13.7. ábra: A replikáció a legtöbb genom esetében kétirányú, de egyes speciális esetekben egyirányú

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

13.5. A DNS szintézis kémiája

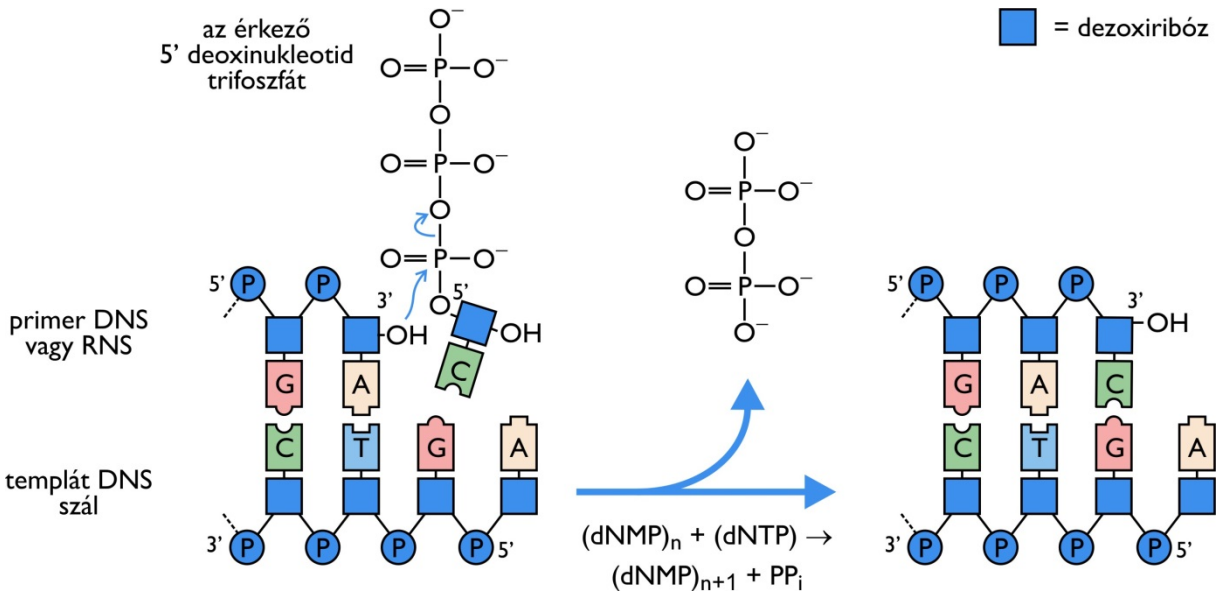
A DNS szintézis kémiai mechanizmusának feltárása elsősorban **Arthur Kornberg** nevéhez köthető. Kornberg az ötvenes évek elejéig elsősorban a koenzimek *in vivo* szintézisének a problémáján dolgozott. A dinukleotid szerkezetű koenzimek szintézisét megismerve arra jutott, hogy bizonyára a nukleinsavak sem közvetlenül az egyszerűbb építőegységekből (cukor, foszforsav, bázis) szerelődnek össze, hanem a már előre összeállított nukleotid egységekből. Szerette volna izolálni azt az enzimet, ami nukleotid szubsztrátokat használva felépíti a nukleinsavakat, de az enzim izolálásához szüksége volt ezekre a nukleotid szubsztrátokra. Ezért mintegy 5-6 év kutatómunkája során csoportjával feltárta a nukleotidok szintézisének módját, izolálva az ehhez szükséges enzimeket. Miután elő tudta állítani az összes nukleinsav alkotó nukleotidot, belevágott a DNS-szintézist katalizáló enzim izolálásába. Ehhez kóli sejtkivonatot, és radioaktívan jelölt nukleotidokat használt. A kivonathoz DNS-t adott, és az újonnan keletkező radioaktív DNS-t keresve igyekezett azonosítani a folyamatot katalizáló enzimet. Végül 1**957**-ben sikerrel járt, izolálta az elsőként megismert DNS-szintézist katalizáló enzimet, amit DNS-polimeráz I **enzim**nek nevezett el.

Ezért a sikerért, valamint az *in vivo* DNS-szintézis kémiai alapjainak feltárásáért 1959-ben orvosi Nobel-díjat kapott Severo Ochoa-val megosztva. (Severo Ochoa egy RNS-szintetizáló enzimet azonosított, nevével még találkozunk a genetikai kód megfejtése kapcsán).

Amint az Arthur Kornberg kísérletei nyomán kiderült, az enzimkatalizált DNS szintézishez az enzimen kívül három alapvető dolog szükséges:

- **Templát DNS szál**, aminek a komplementer szála szintetizálódik.
- **Szabad 3'-OH** vég, amit a templát szálhoz hibridizált DNS, vagy RNS, a „primer" biztosít.
- 5'-dNTP, vagyis **dezoxiribonukleotid-trifoszfátok** (dATP, dTTP, dGTP, dCTP).

A szintézis mechanizmusát a **13.8. ábra** mutatja be.



13.8. ábra: A DNS szintézis kémiája

Az új lánc szintéziséhez tehát **mindenképpen szükség van egy templát DNS-re**. Ennek komoly jelentősége van. DNS nem keletkezik a sejtben monomerek random összeépítésével. Egy ilyen értelmetlen DNS megjelenése jobb esetben felesleges energiapazarlást jelentene, rosszabb esetben komoly zavart okozhatna a sejt működésében. A sejtekben **a DNS szintézise szigorúan a már meglévő információ másolására korlátozódik**.

A másik érdekes információ **a primer igénye**. Ez, a részletek ismerete nélkül egy komoly tyúk-tojás problémát sejtet. Ha kell egy primer, akkor azt a primert valaminek, egy polimeráznak elő kell állítania. De hogy állíthatná elő, ha a DNS szintézishez eleve kell, hogy legyen egy primer? A megoldás a részletekben rejlik. Mint később

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

kiderült, a sejtekben primerként egy **rövid RNS** darab szolgál, **amit egy RNS-polimeráz (primáz) készít el**. Az RNS-polimerázok nem igényelnek primert az RNS szintézishez. A DNS-polimerázok DNS primert is elfogadnak. Amikor egy DNS szintézise ideiglenesen megszakad, és a DNS-polimeráz leválik, akkor a befejezetlen DNS 3'-OH vége teszi majd lehetővé, hogy egy másik DNS-polimeráz folytassa a szintézist. Ilyenkor tehát DNS a primer.

A dNTP vegyületek mind 5'-nukleozid-trifoszfátok.

A primer 3'-OH végénél az alábbi lépésekben zajlik a beépülés: a dNTP vegyületek közül az enzim random válogat. Amikor olyan dNTP köt a kötőzsebébe, amely komplementer a templát szál soron következő nukleotid egységével, tehát amikor Watson-Crick bázispárosodás jöhet létre a templát és az újonnan beépítendő monomer között, **az enzim** precízen koordinált Mg^{2+} ionok segítségével **aktiválja** (jobb nukleofillá teszi) **a primer 3'-OH csoportját,** és támadhatóbbá teszi **a dNTP α-helyzetű foszforatomját. A primer 3'-OH csoportja** ezáltal **nukleofil támadást végez a dNTP α-helyzetű foszforatomján**. Az α-β foszfátcsoportok közötti foszforsavanhidrid kötés felbomlik, **felszabadul egy pirofoszfát**, miközben kialakul egy új foszfátészter kötés a primer és a beépülő monomer között. A primer (vagy a DNS-lánc) tehát egy egységgel hosszabb lesz.

A felszabaduló **pirofoszfát hidrolízis**ét a **pirofoszfatáz** enzim katalizálja, **ezáltal** válik **irreverzibilissé a folyamat**. Az új szál tehát szigorú rendben a régi szál komplementereként keletkezik. A szál **5'→3' irányban szintetizálódik**, tehát az 5'-vég a „legöregebb", a 3'-vég a „legfiatalabb".

Ez a rögzített irány egy különleges **topológiai problémá**t vet fel.

A Cairns-féle autoradiográfiák alapján láthatóvá váló replikációs villák azt mutatták (lásd **13.5. ábra**), hogy az **antiparallel** elrendeződésű szülői **DNS** mindkét szála mellett, egyidőben zajlik a DNS szintézise. A reakció kémiai mechanizmusa viszont azt mutatja, hogy az mindig 5'→3' irányban zajlik, más szóval mindig ebben az irányban hosszabbodik a szintetizálódó szál. Hogyan folyhat tehát folytonos láncszintézis az antiparallel szálakból álló replikációs villa mindkét templát szála mellett? A válasz: sehogyan. Pontosabban lesz egy folyamatosan és egy szakaszosan szintetizálódó szál. Ennek megértéséhez nézzük meg, hogyan fedezték fel az ún. Okazaki-fragmentumokat.

13.6. Az Okazaki-fragmentumok

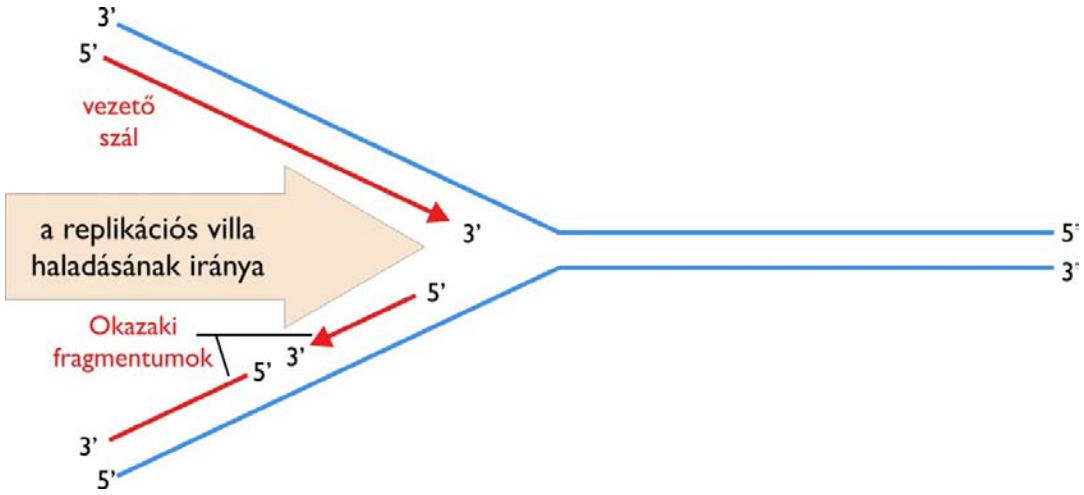
Cairns kísérletének nagy időfelbontású megismétlésével Reiji Okazaki 1968-ban megoldást talált az antiparallel láncok lemásolásának problémájára. Okazaki kimutatta, hogy csak az egyik új szál szintetizálódik folyamatosan. Természetesen az, amelyiknek az 5'→3' irányú szintézise során az újonnan keletkező lánc a replikációs villa haladásával azonos irányban növekszik (lásd **13.9. ábra**). Ezt a DNS szálat **vezető szál**nak hívjuk.

A másik szál, amelynek 5'-3' irányú növekedése ellentétes irányú a replikációs villa haladásával, csak rövidebb darabokban keletkezhet. Ezt a szálat mindig újra, meg újra el kell kezdeni szintetizálni. Az így elkezdett darabok később kapcsolódnak egyetlen folyamatos szállá. Ezt a darabokban keletkező szálat **követő szál**nak nevezzük.

De vajon hogyan tudta mindezt kideríteni Okazaki? Cairns nyomán ő is osztódó kóli sejteket vizsgált. A tríciált timidines jelölést ugyanakkor csak 10 másodpercig alkalmazta. A sejteket azonnal elölte, a DNS két szálát lúgos kezeléssel szétválasztotta. Centrifugálást használt arra, hogy megvizsgálja a keletkezett radioaktív egyszálú DNS-ek méretét. Két nagyon eltérő típust talált. Nagyon nagy DNS-eket, és sokkal kisebb, ~1000 monomeregységet tartalmazó DNS-eket, amiket később róla neveztek el **Okazaki-fragmentumok**nak. Később az is kiderült, hogy ezek 5'-végén rövid RNS darab van. A nagyon hosszú DNS-ek a folyamatosan szintetizálódó szálat jelentették, amelyek a jelölés rövid ideje alatt hosszabbá váltak. A rövidebb darabok ahhoz a szálhoz tartoztak, amelyik újra, meg újra elkezdődik, tehát szakaszokban keletkezik.

Amikor a jelölést 10 másodperc helyett 15 másodpercig alkalmazta, szinte nem talált ilyen rövid darabokat! Az öt extra másodperc már elegendő volt arra, hogy a szakaszok ne csak elkészüljenek, de össze is épüljenek. Okazaki ráadásul izolálta is azt az enzimet, a DNS-ligázt, amelyik a DNS fragmentumokat összekapcsolta. Az eukarióta DNS is Okazaki-fragmentumokban keletkezik, de ott a fragmentumok mérete kisebb (100-200 egységnyi).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.9. ábra: A replikációs villában az új szálak szintézise 5'-3'- irányú, az egyiké folytonos, a másiké szakaszos

13.7. DNS-polimerázok

A most bemutatásra kerülő DNS-polimerázokat szabatosabban **DNS-függő DNS-polimerázok**nak nevezzük. Ez a kifejezés azt jelenti, hogy az enzim DNS-templát alapján katalizálja a komplementer DNS szál szintézisét. (Mint azt a centrális dogma kapcsán már említettük, és később részletesen is látni fogjuk, léteznek RNS-függő DNS-polimerázok is).

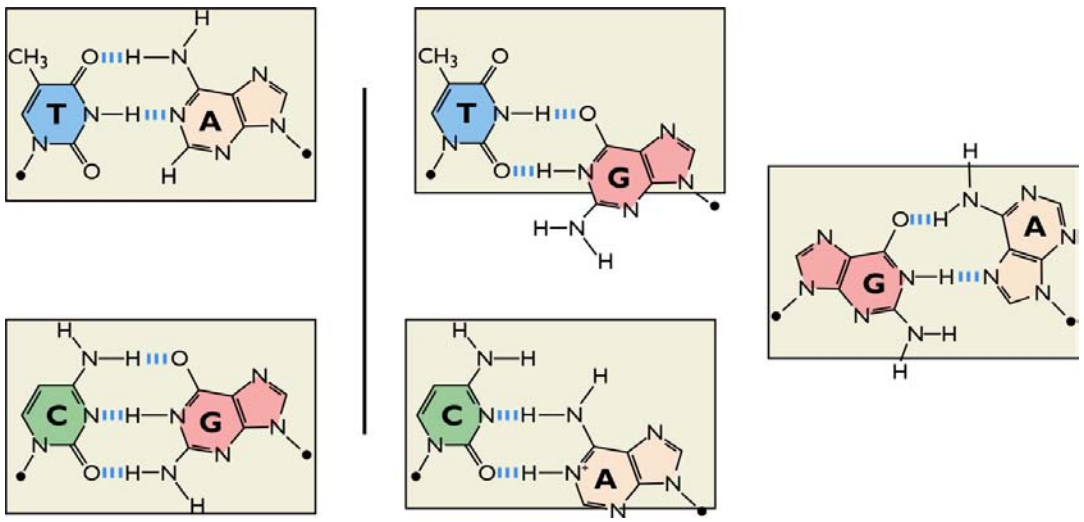
Nézzük meg, hogy általánosságban mi a szerepe egy DNS-polimeráznak, majd ezek után ismerkedünk meg a kólibaktérium két fő DNS-polimeráz enzimével.

A DNS szintézisét katalizáló enzimnek mind a négyféle DNS nukleotidot fel kell ismernie, és valahogyan le kell ellenőriznie, hogy vajon a Watson-Crick bázispárosodásnak eleget tévő nukleotid épül-e be az újonnan szintetizálódó DNS szálba. Az enzimnek részben a **bázispárosodás ellenőrzésé**n keresztül meg kell akadályoznia a nem oda illő monomer beépülését, és elő kell segítenie a megfelelő monomer beépülését.

A bázispárok megfelelőségénél az egyik fontos, de nem elégséges feltétel az, hogy legalább 2 stabil hidrogénhíd alakuljon ki a bázisok között.

A másik kritérium, hogy miközben a beépítésre váró monomer és a templát szálon lévő egység között kialakulnak a hidrogénhidak, a B-DNS szerkezet megőrződjön, ne torzuljon.

A harmadik kritérium az, hogy a kialakuló bázispár beférjen az enzim kötőzsebébe (lásd **13.10. ábra**).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

13.10. ábra: Csak Watson-Crick bázispárok (bal oldal) alakítanak úgy ki legalább 2 H-hidat, hogy közben elférnek az enzim kötőzsebében

A **13.10. ábra** bal oldalán szerepelnek a korrekt bázispárok. A háttér téglalap illusztrálja sematikusan az enzim kötőzsebének a méretét. Az ábra jobb oldalán három olyan bázispárt mutatunk be, melyeknél ugyan megfelelő számú hidrogénhíd alakulna ki, mégsem épülnek be, mert nem férnének be az enzim kötőhelyére.

Mint már említettük, Arthur Kornberg izolálta az első DNS-polimeráz aktivitással rendelkező fehérjét. Ennek megfelelően az egy alegységes fehérjének a DNS-polimeráz I nevet adta. Kimutatta, hogy az enzim egyszálú DNS templát, primer, és 5'-dNTP jelenlétében katalizálja a templáttal komplementer új DNS szál szintézisét.

A **DNS-polimeráz I** enzim **háromféle aktivitás**sal rendelkezik, melyeket elkülönült domének látnak el. Az egyik a **polimeráz aktivitás**, amellyel az enzim az új nukleotidok beépítését katalizálja. A másik a **3'→5' exonukleáz aktivitás**, ami lehetővé teszi a hibásan beépített nukleotid azonnali eltávolítását (lásd **13.11. ábra**).

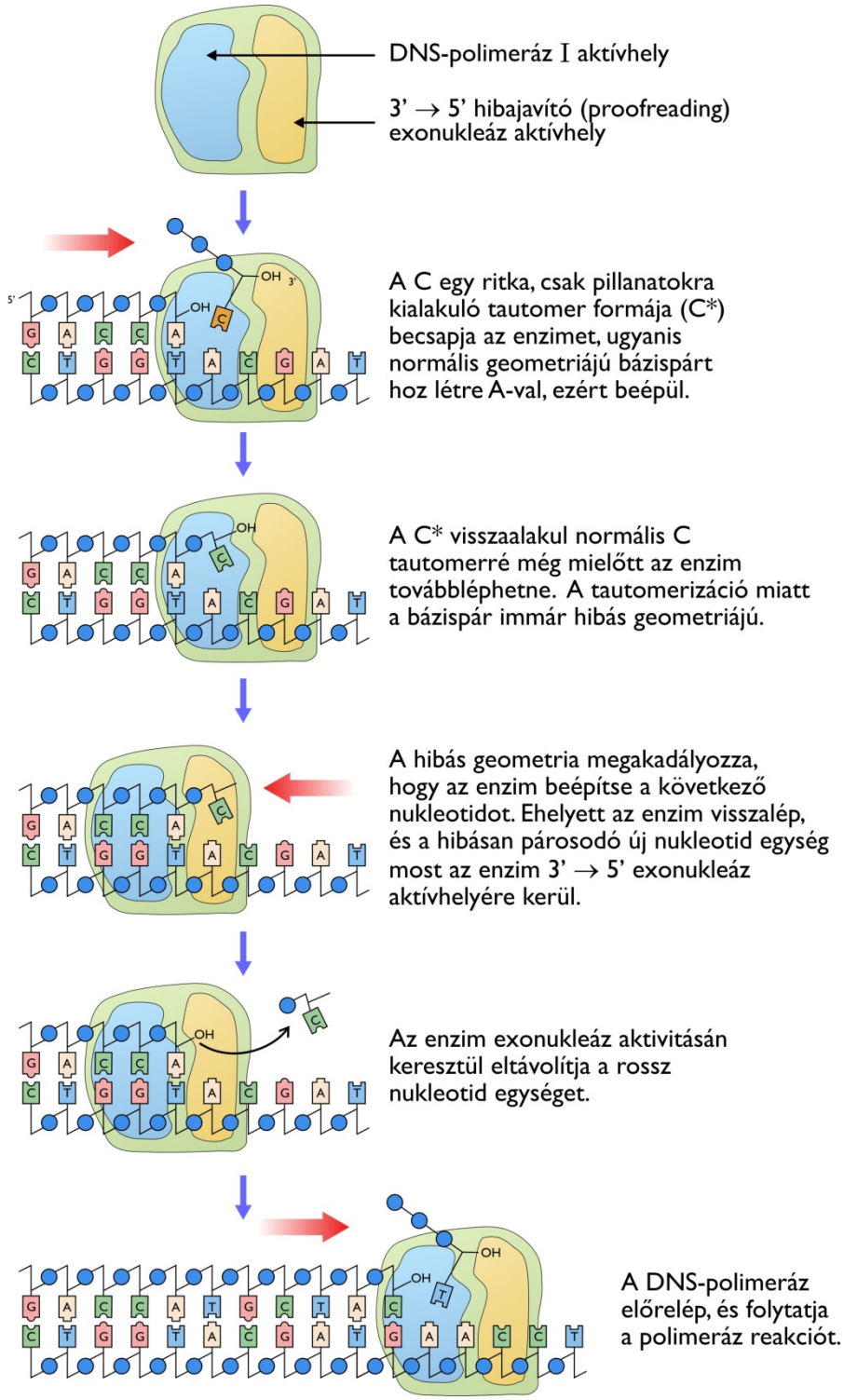
A 3'→5' exonukleáz aktivitást **hibajavító** vagy „**korrektor**" (***proofreading***) **funkció**nak is nevezzük, hiszen ez javítja az „elírást" a DNS szintézise nyomán. Ez a korrektor funkció nagyságrendekkel csökkenti az enzim hibagyakoriságát.

A **13.11. ábra** egy olyan esetet mutat be, amikor az enzim azért épít be a polimeráz aktivitásán keresztül egy hibás monomert, mert a monomer bázisa éppen egy ritka tautomer állapotban van, ami a normálistól eltérő hidrogénhidas kapcsolat mintázatot tesz lehetővé. Amennyiben a hibásan beépített monomer bázisa még az előtt visszanyeri stabilabb, normál tautomer állapotát hogy egy újabb monomer beépülne, úgy az enzim korrektor funkciója aktivizálódhat.

A DNS-polimeráz I harmadik aktivitása szintén egy exonukleáz aktivitás, amely azonban eltér a korrektor funkciótól. Ez az **5'→3' exonukleáz aktivitás**, ami egyrészt részt vesz egy a replikációtól független, másik típusú hibajavításban, másrészt az **RNS primerek eltávolítás**ában játszik szerepet.

Az 5'→3' exonukleáz aktivitást hordozó domén az enzimről eltávolítható. Így jön létre az ún. **Klenow fragmentum**, amelyet a mai napig előszeretettel használnak különféle *in vitro* kísérletekben.

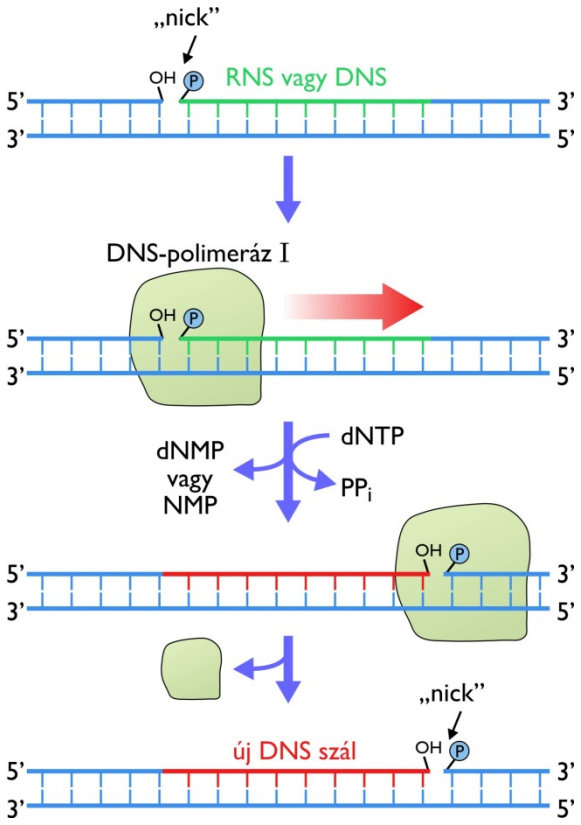
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.11. ábra: A DNS-polimeráz I 3'→5' exonukleáz aktivitása hibajavító (*proofreading*) aktivitása

A DNS-polimeráz I enzim **polimeráz és 5'→3' irányú exonukleáz aktivitás**ának kombinációja egy jellegzetes jelenséget eredményez, aminek angol neve: ***nick translation***, magyarul „bevágás-elmozdulás" vagy nick-transzláció (lásd **13.12. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.12. ábra: Az úgynevezett nick-transzláció sémája

„*Nick*”-nek a DNS vonatkozásában azt nevezzük, amikor a kettősszálú DNS egyik szálán az egyik foszfodiészter kötés elhasad, egy bevágás keletkezik, de a két DNS láncot stabilizáló másodlagos kötőerők miatt a két szálvég továbbra is egymás közelében marad.

A **DNS-polimeráz I** egy olyan DNS-függő DNS-polimeráz, amelynek 5’"3’ exonukleáz aktivitása egyaránt képes DNS, és RNS nukleotidok eltávolítására. Az 5’ végről eltávolított RNS illetve DNS

nukleotidokat az enzim NMP illetve dNMP formájában hasítja le, majd dNTP jelenlétében a polimeráz aktivitás ezeket új DNS nukleotidokkal helyettesíti. Ez a jelenség **felelős az RNS primerek eltávolításáért és DNS szakaszra cseréléséért**.

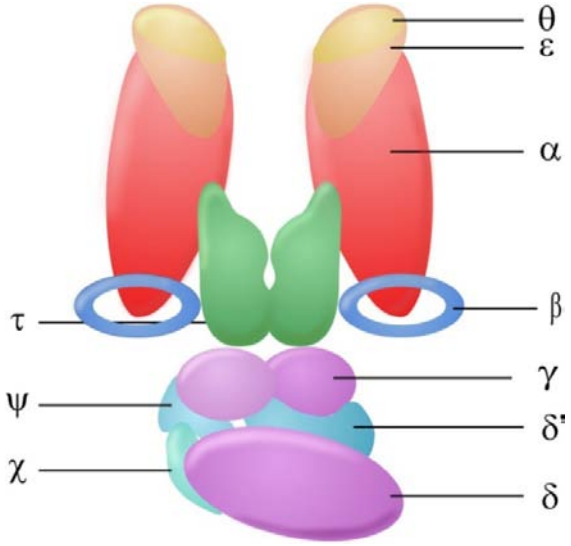
Ugyanakkor az is kiderült, hogy a **DNS-polimeráz I** enzim **nem** lehet **a replikáció fő enzime**. Enzimológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az enzim ehhez túl lassú, tehát időegység alatt kevés monomer beépítését katalizálja. A DNS-polimeráz I felfedezésekor a kóli genommérete már ismert volt, Cairns kísérlete nyomán kiderült, hogy a replikáció egyetlen pontból kiindulva két irányba halad, és az is ismert volt, hogy a replikáció mintegy 20 perc alatt végbemegy. A DNS-polimeráz I *in vitro* adatai alapján – hacsak a sejtben valami nem aktiválta volna – a replikáció nem mehetett volna ilyen gyorsan végbe. Ráadásul kiderült, hogy az enzim **kis processzivitás**ú is, ami azt jelenti, hogy egy huzamban csak kevés nukleotidot épít be, majd leválik a templátról. A végső bizonyítékot az adta, amikor Cairns 1969-ben izolált egy olyan kóli törzset, amelyben a DNS-polimeráz I polimeráz aktivitása nem volt kimutatható. A sejtben ennek ellenére normálisan zajlott a replikáció.

A DNS-polimeráz I deficiens kóli sejtben az enzim termelődött, csak éppen a polimeráz aktivitása volt egy aminosav csere miatt sérült. Az 5’"3’ exonukleáz aktivitása azonban megmaradt, így az RNS primerek normálisan eltávolításra kerültek, csak éppen a hiányzó DNS darabokat kellett más polimeráznak pótolnia.

Ugyanakkor figyelemreméltó volt, hogy a sejtben magasabb volt a mutációs ráta, különösen akkor, ha UV fénynek tették ki. Mint később kiderült, a DNS-polimeráz I aktivitás fontos az ultraibolya fény miatt kialakuló mutációk javításában.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Amint az 1970-ben kiderült, a replikáció **központi enzim**-komplexe a **DNS-polimeráz III** (lásd **13.13. ábra**). Tudománytörténeti érdekesség, hogy ezt az enzimet Arthur Kornberg egyik fia, Thomas Kornberg izolálta. Másik fia Roger Kornberg apja nyomdokán haladva szintén Nobel-díjas kutató lett, Ő az RNS-polimeráz működési mechanizmusának feltárásáért kapta a díjat.



13.13. ábra: A DNS-polimeráz III alegységszerkezete

A DNS-polimeráz III enzim egyes alegységeinek nevét és funkcióját a **13.1. táblázat** foglalja össze.

Mint azt a **13.13. ábra** illusztrálja a DNS-polimeráz III egy hatalmas fehérje komplex, amelyben t**öbb mint 10 különböző alegység** működik együtt. Ez az enzim mintegy százszor gyorsabban szintetizál, mint a fő hibajavító enzim, a DNS-polimeráz I. A DNS-polimeráz III **beépített hibajavító aktivitás**sal és **nagy processzivitás**sal rendelkezik. Mintegy félmillió nukleotidot épít be, mielőtt leválna a DNS-ről (a kóli genom kb. 4,6 millió nukleotid).

A kólibaktériumnak összesen öt DNS-polimeráza van. A többi három, köztük a DNS-polimeráz II különböző hibajavításokban vesz részt.

13.1. táblázat: A DNS-polimeráz III alegységszerkezete

Alegység	Holoenzimenkénti alegységszám	Alegység molekulatömege	Gén	Alegység funkciója	
α	2	132 000	*pol*C	polimeráz aktivitás	a holoenzim központi „magja”
ε	2	27 000	*dna*Q	3’ → 5’ korrektor exonukleáz	
θ	2	10 000	*hol*E	templátkötés stabilizálása	
τ	2	71 000	*dna*X	a dimer holoenzim mag létrehozása	
β	4	37 000	*dna*N	processzivitás-növelő DNS-kötő „kapocs”	
γ	2	52 000	*dna*X*	a DNS-kötő kapocs ráhelyezése az Okazaki fragmentumok templátjául szolgáló DNS szálra	
δ	1	35 000	*hol*A		
δ’	1	33 000	*hol*B		
χ	1	15 000	*hol*C		
ψ	1	12 000	*hol*D		

A DNS-polimeráz I; II és III tulajdonságait a **13.2. táblázat** foglalja össze.

13.2. táblázat: *E. coli* DNS-polierázok összehasonlítása

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

	DNS-polimeráz		
	I	II	III
a polimeráz aktivitást hordozó peptidlánc génje	*pol*A	*pol*B	*pol*C
alegységféleségek száma	1	≥ 4	≥ 10
natív molekulatömeg	103 000	88 000	830 000
3' → 5' „proofreading" exonukleáz aktivitás	van	van	van
5' → 3' exonukleáz aktivitás	van	nincs	nincs
5' → 3' polimerizáció sebessége (nukleotid/sec)	16–20	40	250–1000
processzivitás (beépített nukleotidok száma mielőtt a polimeráz leválik a templátról)	3–200	1500	≥ 500 000

13.8. A replikáció iniciációs fázisa

A **biopolimer**ek (DNS, RNS, polipeptid) monomerekből történő **szintézis**e **3 szakasz**ra osztható: **iniciáció** (lánckezdés), **elongáció** (lánchosszabbítás) és **termináció** (lánczárás). A DNS replikáció szabályozott lépése az iniciáció. A folyamat a kóli kromoszóma egy speciális szakaszán, az ***ori*C** részen indul (lásd **13.14. ábra**).

Az *ori*C régió 13 bázispáros illetve 9 bázispáros ismétlődő szekvenciái specifikus felismerő helyet jelentenek az origóhoz kötődő fehérjék számára. Ezek kötése a 9 bázispáros ismétlődésekhez a kettős lánc 13 bázispáros ismétlődő részeknél történő felnyílásához vezet. Az egyszálúvá vált részek mellett létrejönnek az első primerek. A replikáció során az origó 11 darab GATC szekvenciájú részletének adenin bázisa a templát DNS-en metilálódik, míg az új szál a következő iniciációig ezen a szakaszon metilálatlan marad.

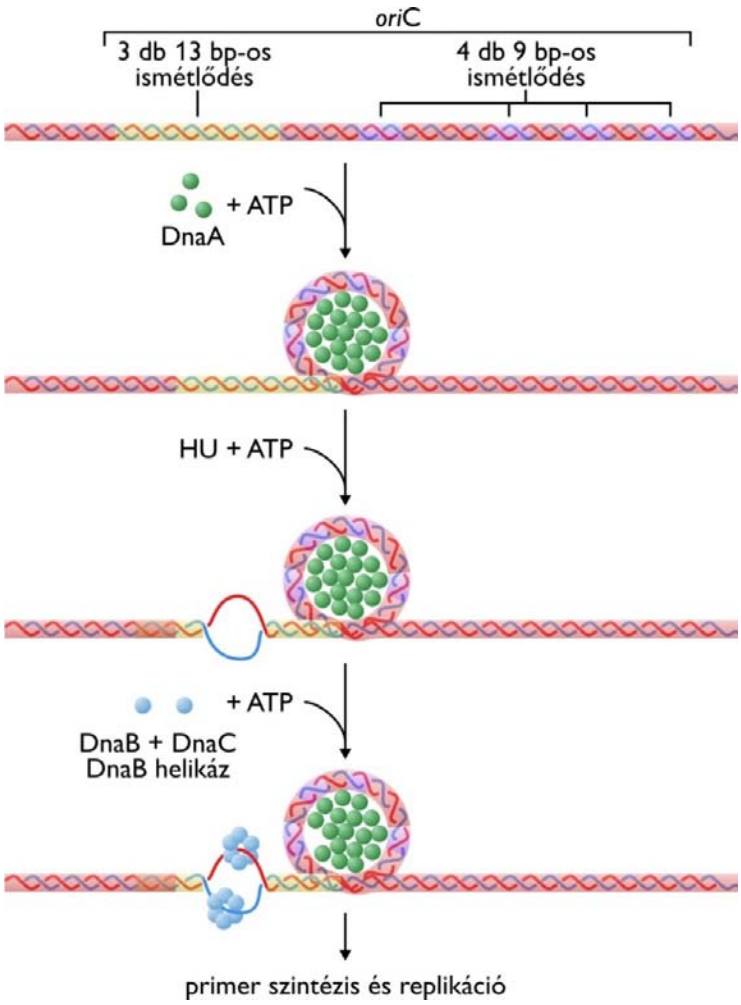
A **13.3. táblázat** foglalja össze azokat a fehérjéket, amelyek az iniciáció folyamatában részt vesznek.

13.3. táblázat: Az iniciáció fázisában résztvevő fehérjék

Az *E. coli* kromoszóma replikációjának iniciálásához szükséges fehérjék

Fehérje	Molekulatömeg (Da)	Alegység	Funkció
DnaA	52 000	1	felismeri az origót és egy részét kinyitja
DnaB (helikáz)	300 000	6	széttekeri a DNS két szálát
DnaC	29 000	1	a DnaB origóhoz kötését segíti
HU	19 000	2	hisztonszerű fehérje, segít a DNS hajlításában
DnaG (primáz)	60 000	1	RNS primereket szintetizál
ssDNS-kötő fehérje	75 600	4	stabilizálja az egyszálú DNS-t (ssDNS)
RNS-polimeráz	454 000	5	a DnaA aktivitását növeli
DNS-giráz (topoizomeráz II)	400 000	4	megszünteti a DNS szálak felnyílása során a szerkezetben keletkező belső feszültséget
Dam-metiláz	32 000	1	metilálja az *ori*C 11 darab GATC részletét

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.14. ábra: A kóli replikációjának iniciációs fázisa

13.9. A replikáció elongációs fázisa

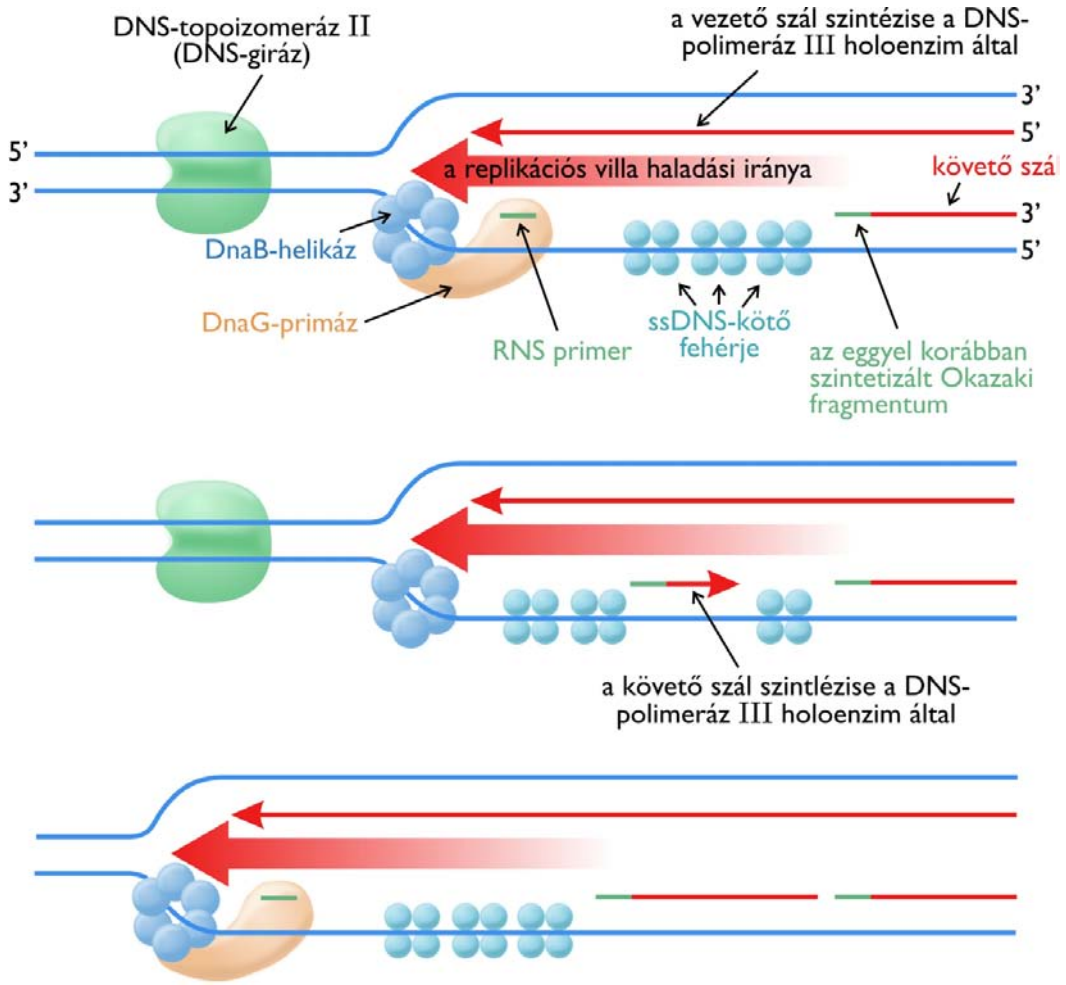
Az elongáció egyszerűsített sémáját a **13.15. ábra** mutatja.

Az elongáció során a két szál közötti Watson-Crick bázispárok megszűntetését és a **szálak kinyílásá**t a **DNS-helikáz** enzim katalizálja, miközben **ATP-t bont**. Az eközben keletkező szerkezeti feszültséget a DNS topoizomeráz II előzi meg azáltal, hogy negatív szuperhélixeket „pumpál" a még fel nem nyílt szülői DNS-be. Az **SSB** (*Single-Strand Binding protein*) **fehérje** egy egyszálú DNS-t kötő fehérje, amely **megakadályozza**, a helikáz hatására egyszálúvá vált **szülői szálak összezáródását**.

A vezető szál egy, még az origónál szintetizált primertől indulva folytonosan szintetizálódik a DNS-polimeráz III által az egyszálú DNS templát mellett. A másik szál mellett Okazaki-fragmentumok szintézise zajlik, amit – bár az egyszerűsített ábra ezt nem mutatja - a dimer polimeráz III enzimkomplex másik fele katalizál. A vezető és követő szálak szintézisének ütemét éppen az teszi egyenlővé, hogy ugyannak a DNS-polimeráz III holoenzimnek eltérő két fele szintetizálja őket.

A **DNS-polimeráz III holoenzim** szerkezete (lásd **13.13. ábra**) a replikációs villánál alakul ki. A replikációhoz ezen az összetett szerkezeten kívül még mintegy húsz egyéb fehérjére, zömükben enzimekre van szükség ahhoz, hogy a replikáció elinduljon, és nagy pontossággal végbemenjen. Ilyen fehérjék a helikázok, egyszálú DNS-t kötő fehérjék, topoizomerázok, primázok, ligázok, és így tovább, amelyek a holoenzimmel együtt a **replikaszómá**t (röviden repliszóma) alkotják.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.15. ábra: A replikáció elongációs fázisának történései sematikusan

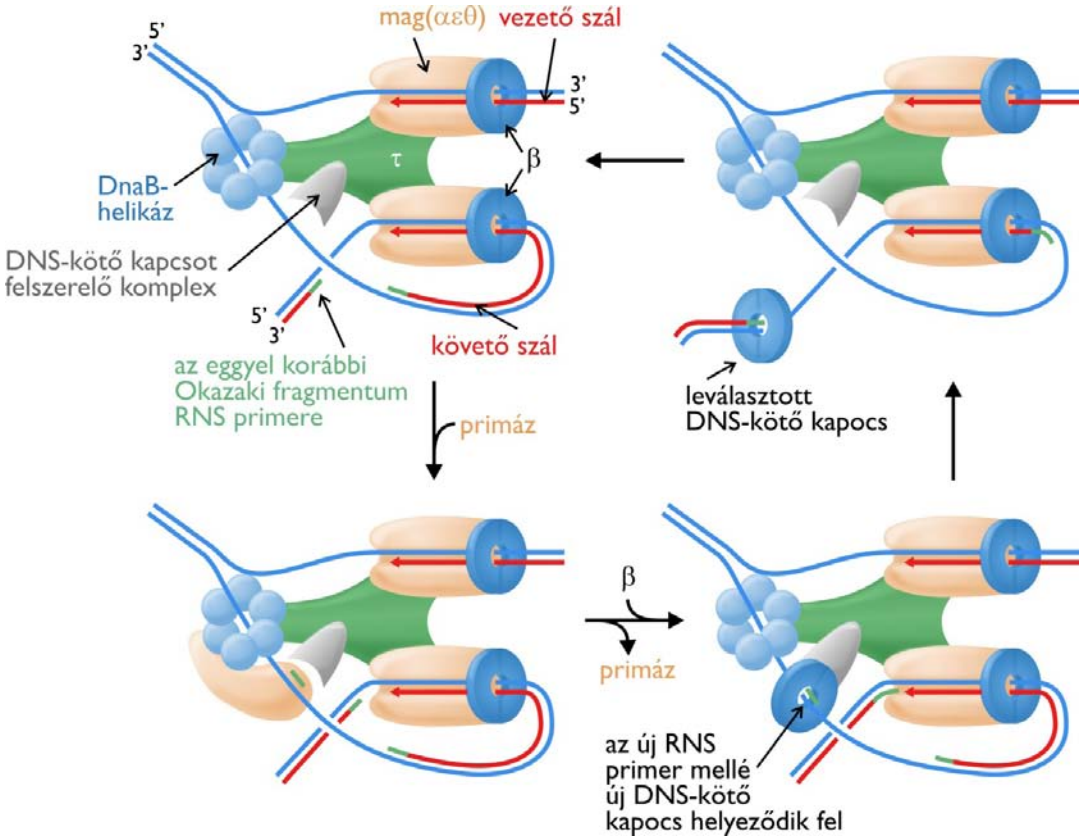
A **13.16. ábra** mutatja be a DNS-polimeráz III működését. A replikáció folyamatának megértését segíti a **7. animáció** is, amelyen egy kóli replikációs villa működésének részleteit látjuk közel valós időben.

Az enzimben **a két polimeráz egység azonos irányban áll**, párhuzamosak. Az egyik polimeráz egység a vezető szálat készíti, és annak templátját fogadja be. Mivel a másolandó két templát DNS szál egymással antiparallel, ezért a követő szálat készítő polimeráz egységbe a másik templát szálat fordított irányban kell befűzni. A vezető szál templátját praktikusan csak egyszer kell befűzni, a replikáció elején, hiszen az folyamatosan haladhat, és a β-alegységekből álló, gyűrű alakú **DNS-kapocs** (*clamp*) úgy működik, mint egy csúszóbilincs, és így hatalmas processzivitást tesz lehetővé . A polimeráz egyhuzamban nagyon hosszú DNS-t tud szintetizálni anélkül, hogy leválna a templátról, mert a bilincs a templáton tartja, anélkül, hogy akadályozná a templát mentén történő elmozdulást.

Amíg a vezető szálat készítő polimeráz egység mindig egy általa még „nem látott" templát szakasz felé halad, addig a követő szálat készítő polimeráz egység újra meg újra egy olyan templát szakasz felé halad, amelyet egy, eggyel korábbi templát befűzésnél már lemásolt. Minden egyes Okazaki-fragmentum befejezésekor, tehát amikor a követő szálat szintetizáló polimeráz egység elérte az általa korábban elkészített Okazaki-fragmentum 5'-végét, a templátot újra be kell fűzni a polimerázba. Ez a DNS-kapocs cseréjét igényli. A polimeráz legösszetettebb funkcionális egysége a **DNS-kapocs felhelyező egység** (*clamp loader*)**,** amely elősegíti a régi kapocs leválását, és felszereli az újat. A kapocs felhelyezése ATP-t igényel.

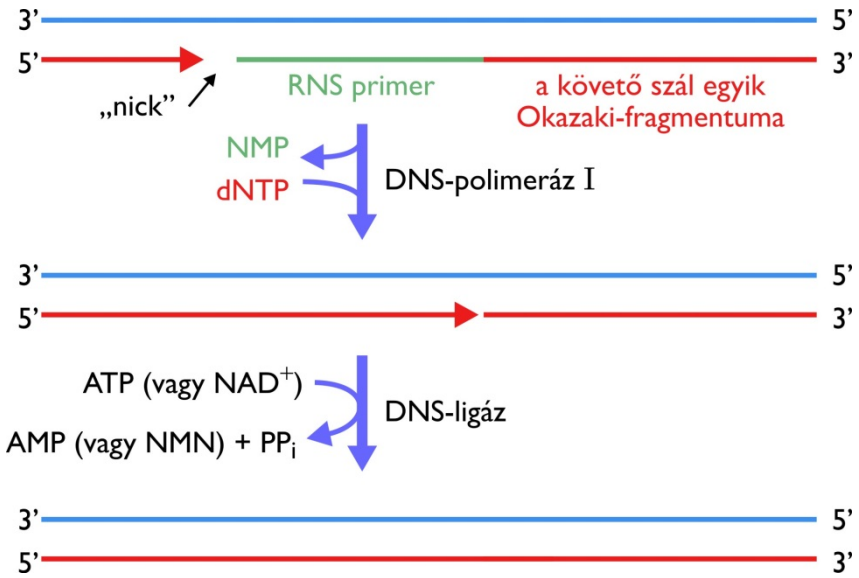
A DNS-polimerázok csak már meglévő 3'-OH véget képesek hosszabbítani (primert igényelnek), és többségük ellenőrzi, hogy a 3'-vég megfelelően bázispárosodik-e. A **primáz** egy **specifikus RNS-polimeráz**, ami nem igényel 3'-véget a szintézishez, de nem is biztosítja a másolat nagy hűségét. A primáz készíti el a vezető szál első primerét, illetve az Okazaki-fragmentumok 5'-végére kerülő primereket.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.16. ábra: A replikáció elongációs fázisának történései részletesebben

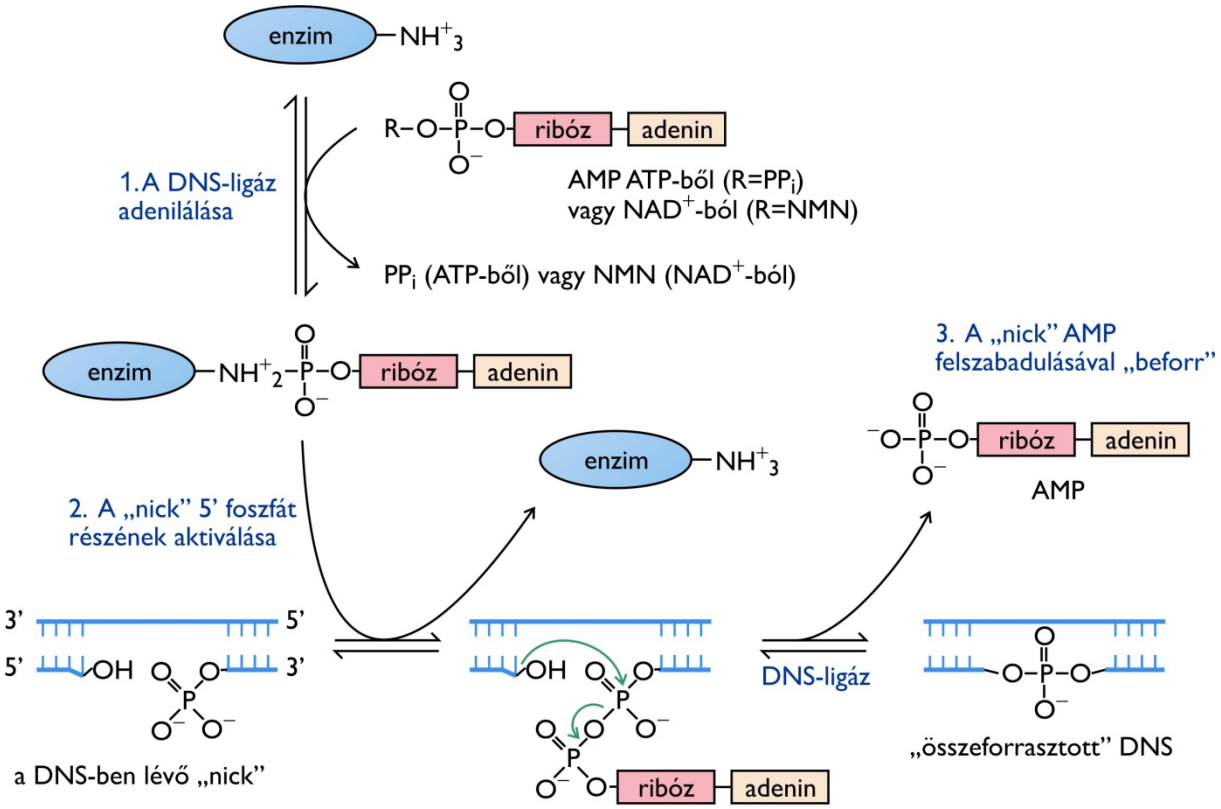
A primáz által szintetizált, alacsony másolati pontosságú RNS-primer azért nem jelent problémát az új szál minőségét illetően, mert a DNS-től kémiailag eltér. Az RNS-primer nem kerül be véglegesen a DNS szerkezetébe. A **primert a DNS-polimeráz I távolítja el** hasadás-áthelyezéssel (lásd **13.17. ábra**).



13.17. ábra: Az Okazaki fragmentumok RNS részének eltávolítása és a DNS szálak összekapcsolása

A **DNS-ligáz** enzim felismeri, és **összeköti a szabad 3'-OH és a szomszédos 5'-foszfát csoportot** amennyiben mindkettő DNS (és nem RNS) része. A nick transzláció egy ilyen, DNS-ligáz által elfogadott részlet kialakulásához vezet. A ligáz reakció **energiaigényes**, amihez vagy **ATP** (eukarióták, bakteriofágok) **vagyNAD**$^+$ hasadása szükséges (lásd **13.18. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.18. ábra: A DNS-ligáz enzim működése

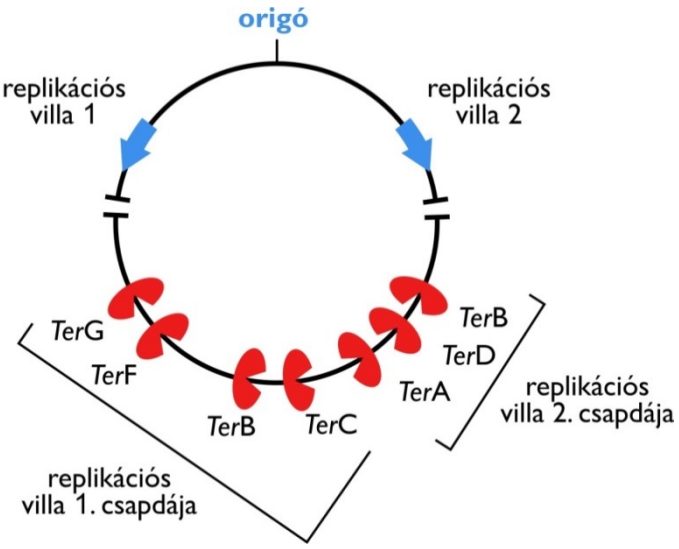
A reakció nagyenergiájú kötések átalakulásának sorozatán keresztül zajlik. Először az enzim egyik lizin aminocsoportja, majd a DNS 5’-foszfátja aktiválódik, végül a foszforsavanhidrid kötés bomlik.

13.10. A replikáció terminációs fázisa

A köralakú bakteriális kromoszóma origóval szemközti részén olyan **terminátor szekvenciák** vannak, melyek a „**Tus**” (*Terminális Utilization Substance*) **fehérje** szelektív **kötőhelyei** (lásd **13.19. ábra**).

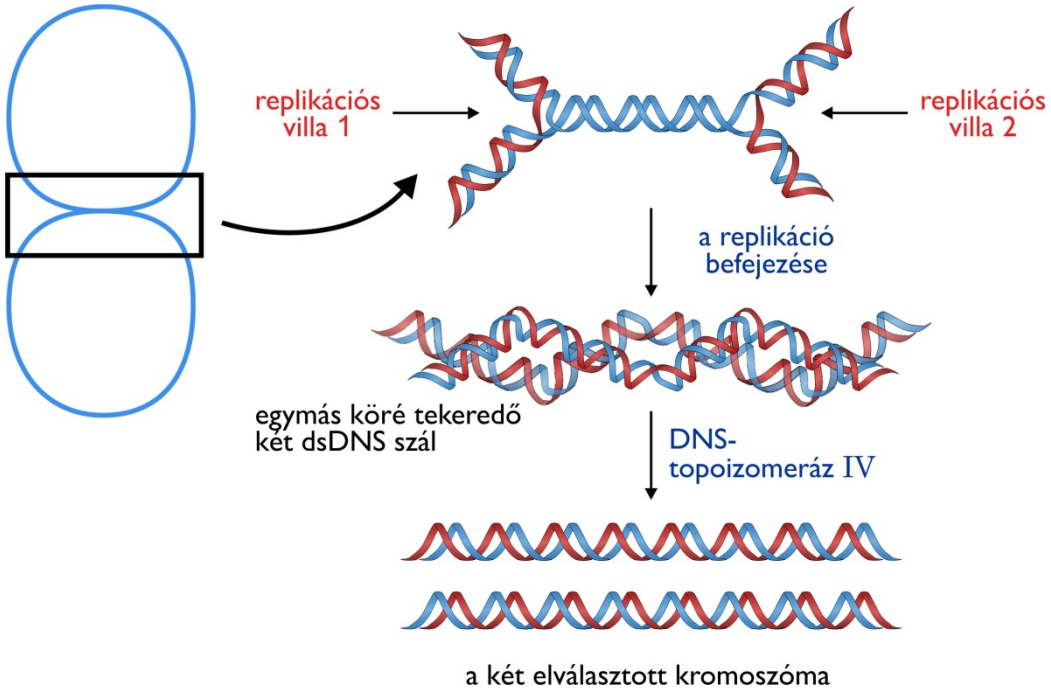
A terminátor szekvenciák nem szimmetrikusak. Két blokkban egymással ellentétes orientációban állnak. A szekvencia irányától függően a Tus fehérje is adott irányban kötődik. Az egyik irányból érkező replikációs villát a Tus fehérjék átengedik, míg a másik irányból érkezőt mintegy csapdaként nagymértékben lelassítják. Ezáltal a két villa a két Tus blokk közötti területen, tehát szabályozott helyen találkozik egymással.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.19. ábra: A replikáció terminációja kóliban

Mivel a szülői DNS szálak egymás köré tekeredtek, topoizomerázok nélkül a replikáció eredményeként létrejött két duplaszálú DNS annyiszor tekeredne egymás köré, ahány hélix menet volt a szülői DNS-ben. A replikáció közben a topoizomeráz II szünteti meg az egymás köré tekeredettség legnagyobb részét, míg a legvégén maradó összefonódást a topoizomeráz IV oldja fel (lásd **13.20. ábra**).



13.20. ábra: A két egymásköré tekeredő duplaszálú DNS-t a topoizomeráz IV enzim választja szét

13.11. A prokarióta és eukarióta replikáció összevetése

A prokarióta DNS replikációjánál bemutatott alapelvek (szemikonzervativitás, specifikus kezdőhelyek, szintézis kémiája, replikációs villa, Okazaki-fragmentumok, korrektor funkció, ligálás) az **eukariótá**kra is érvényesek, de vannak **jellegzetes eltérések** is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Míg a prokariótáknál optimális környezeti feltételek esetében a sejtosztódás, és emiatt a replikáció folyamatos, az eukariótáknál a DNS szintézis csak egy adott sejtciklus fázisban, az S fázisban indulhat el. Az eukarióták genomja általában sokkal, legalább tízszer, de inkább ezerszer nagyobb, mint a prokariótáké. Az eukarióta DNS nukleoszómás szerkezetbe pakolt, a **replikációs villa** (talán ezért is) mintegy tízszer **lassabb**an halad, mint a bakteriális.

Ebből látszik, hogy egyetlen origó nem lenne elég ahhoz, hogy az ismert ütemű sejtosztódással a replikáció lépést tartson. Mint kiderült, az élesztő 17 kromoszómájában mintegy 400, az **ember** 23 pár kromoszómáján összesen **több tízezer origó**ban indul el a replikáció.

Az eukarióták és a prokarióták genomja között a másolás szempontjából az egyik legfontosabb különbség az, hogy míg a prokarióta kromoszóma köralakú, az **eukarióta kromoszómák lineárisak**. Ez a látszólag apró különbség a lineáris DNS másolásában egy komoly **problémá**t okoz, aminek feloldása sok fejtörést okozott a kutatóknak.

A replikáció fent ismertetett mechanizmusa alapján ugyanis a lineáris kromoszóma minden másolás után rövidülne! Az újonnan szintetizálódó szál 5’-vége mindig rövidebb lenne, mint a szülői szálé!

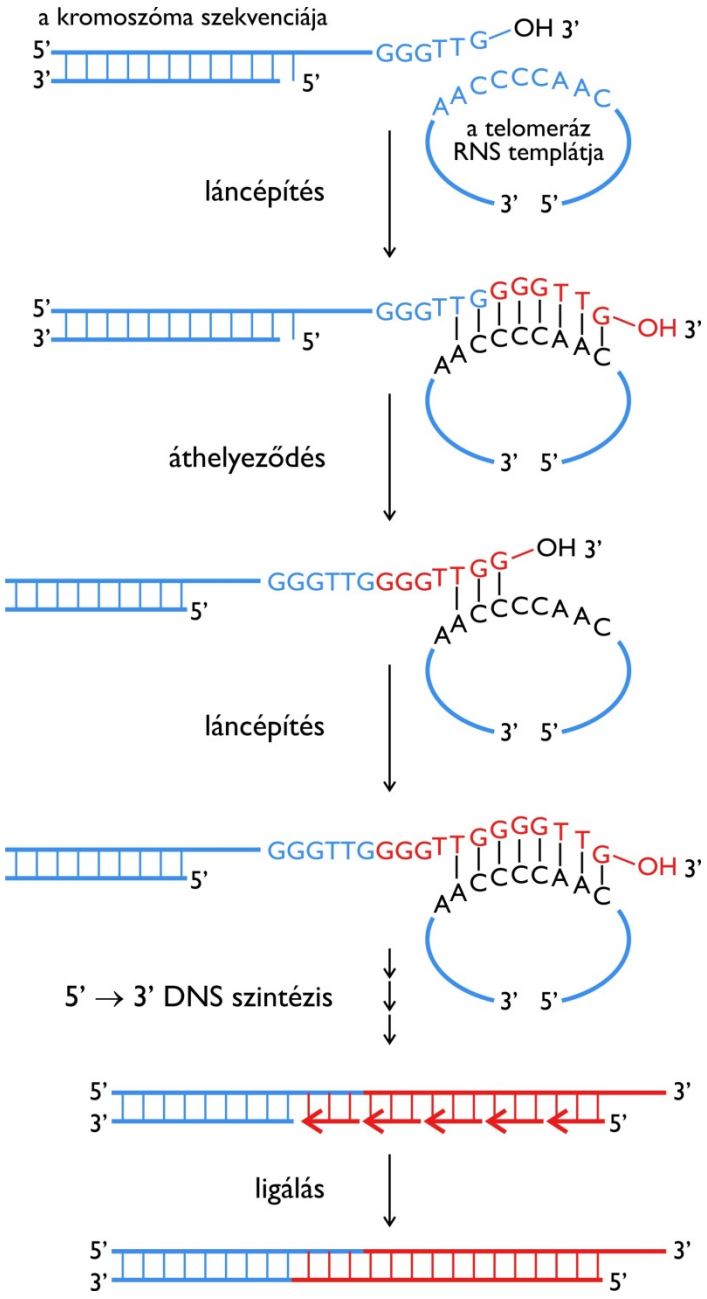
Nézzük meg, miért is van ez így. A templát szál ugyebár 3’→5’ irányban olvasódik le. Tegyük fel, hogy van olyan mechanizmus, melynek köszönhetően a primáz enzim a templát szál legvégső, 3’-végét is használja, tehát az első RNS primer a templát szál legvégső szakaszával lesz komplementer. Az RNS primer-t folytató DNS-polimeráz gond nélkül eljuthat a templát másik végéig. Csakhogy van egy komoly probléma. A primert el kell távolítani, és a hiányzó szakaszt nem lehet DNS-sel pótolni, mert nem lesz szabad 3’-OH csoport (vagyis primer) amit ehhez a DNS szintézishez fel lehetne használni. Ez a szál tehát menthetetlenül rövidebb lenne. A következő replikációban ez a szál templátként szolgál, így a mellé szintetizálódó szál is rövidebb lenne. Ez a probléma mindkét DNS szálat érinti. Minden ciklusban rövidül mindkét szál 5’-vége, és minden második ciklusban hozzárövidül ezekhez a komplementer szálak 3’-vége is.

A lineáris kromoszómák végeinek nevéről a felvázolt problémát „telomer-problémának” nevezték el. A megoldásról a **telomeráz enzim** gondoskodik (lásd **13.21. ábra**).

A telomeráz enzim egy fehérjéből és RNS-ből álló ribonukleoprotein. Az RNS rész egy „hordozható” RNS (!) templát, amit az enzim az eukarióta kromoszóma vége, tehát a telomer 3’ vége alá illeszti, és az RNS templát alapján meghosszabbítja azt. A **speciális RNS templát**ban az első, és az utolsó néhány bázis sorrendje azonos, ezért a templátot újra meg újra elcsúsztatva, a templátról újra meg újra tovább nyújtható a 3’-vég. A telomer végek ezáltal speciális, repetitív szekvenciát tartalmaznak, amely a telomeráz RNS temlátja alapján keletezett.

Az RNS templát alapján DNS-t szintetizáló **telomeráz egy** reverz transzkriptáz, vagyis **RNS-függő DNS-polimeráz**. A telomeráz által megnyújtott 3’ vég, mint templát alapján a sejt normál DNS-szintetizáló rendszere készít komplementer szakaszt. Annak felfedezéséért, hogy a telomeráz enzim hogyan védi meg a kromoszómákat a rövidüléstől, Elizabeth Blackburn, Carol Greider és Jack Szostak 2009-ben orvosi Nobel-díjat kaptak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.21. ábra: A telomeráz enzim működése

13.12. DNS hibajavítás

Ebben a fejezetben azt tárgyaljuk meg részletesebben, hogy miként kerülnek hibák, mutációk a DNS-be, és milyen mechanizmusokkal kerülnek ezek kijavításra.

Mielőtt azonban erre rátérnénk, tisztáznunk kell a **mutáció** pontos definícióját. A mutáció **a DNS szerkezetének olyan változása, ami a kódolt genetikai információ maradandó megváltozását okozza**. Az információ maradandó megváltozása alatt azt értjük, hogy a mutáció következtében a következő generációban megváltozik az utód DNS-ek szekvenciája. A kódolt genetikai információ alatt tehát nem pusztán az aminosavsorrendre vonatkozó kódolt információt értjük. Ennek értelmében például mutációnak minősül egy olyan báziscsere is, ami maradandóan megváltoztatja a DNS szekvenciáját, de egy adott kodont egy azonos jelentésű másik kodonra változtat, ezért nem okoz változást a kódolt fehérje szekvenciájában. Az ilyen mutációt „**csendes**” **mutáció**nak, angolul ***same-sense*** (azonos jelentésű) mutációnak hívják.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ugyanakkor viszont nem számítanak mutációnak azok a bázismódosítások, amelyek nem érintik a bázispárosodás specifitását. Számos olyan metiláció ismert, amely nem változtatja meg a bázis „párválasztását". Egy ilyen módosítás esetén a replikációban a metilált bázis és a nem metilált eredeti formája tökéletesen egyenértékű, ugyanaz a komplementer bázis épül be a velük szemben szintetizálódó új szálba. Az ilyen DNS módosítások tehát nem okoznak az DNS szekvenciájában maradandó változást. Ezek a módosítások ugyanakkor fontos szabályozó jelekként működnek a DNS-en, és speciális módon át is kerülhetnek az utódgenerációba, tehát végső soron öröklődhetnek. Ezeket a jeleket **epigenetikai jelek**nek hívjuk, amelyek epigenetikai módon öröklődhetnek (lásd röviden a **18.3.2.2. fejezet**ben.).

Mint látni fogjuk, **egyes esetekben a metiláció** azonban **mutációkat okoz**. Ebben a könyvben kifejezetten a báziscserés mutációkkal foglalkozunk, nem érintjük a nagyobb DNS régiókat érintő kromoszómatöréseket, inverziókat, áthelyeződéseket stb.

A mutációk közismerten komoly egészségügyi kockázatot jelentenek és az is közismert, hogy összefüggenek a rákos betegségek kialakulásával.

A többsejtűek sejtosztódása rendkívül összetett módon szabályozott folyamat, hiszen a többsejtű szervezet sejtjeinek együtt kell működniük. Az osztódást szabályozó faktorok **proto-onkogének** és anti-onkogének, más néven **tumor-szupresszor gének** mutációja elősegíti a rákos sejtátalakulást. A proto-onkogének olyan sejtosztódás szabályozásában résztvevő fehérjék génjei, amely gének mutációja esetén a fehérje aktivitása és/vagy mennyisége megnő, tehát egyfajta funkciónövekedés történik, és ez visz a rákos elváltozás irányába.

A tumor szupresszor gének, vagy más néven anti–onkogének olyan fehérjék génjei, amelyek negatív szabályzóként működnek. Az ilyen gének mutációja akkor sodorja a sejtet a rákos elváltozás irányába, ha az elváltozás a fehérje mennyiségének és / vagy funkcióképességének csökkenésével jár.

A funkcionális csoportosításban van egy harmadik gén típus is, amelynek mutációja különlegesen veszélyes. Számos fehérje fő funkciója a sejtben az, hogy általa a mutációk alacsonyabb frekvenciával jöjjenek létre, vagy ha létrejöttek, nagy arányban javítódjanak ki. Az ilyen fehérjék génjében bekövetkező mutáció egy pozitív visszacsatolást hoz létre. A mutációk elkerülését vagy kijavítását végző mechanizmusok sérülnek, ami miatt a mutációs gyakoriság megnő. Ez megnöveli annak az esélyét, hogy további proto-onkogénekben, anti-onkogénekben és DNS hiba-javításban szereplő génekben is mutációk keletkezzenek. Ez fokozza a rákos elváltozás kialakulásának valószínűségét.

A mutációt indukáló anyagok (**mutagének**; figyelem, ezek nem gének, hanem olyan vegyületek, amelyek fokozzák a mutációk kialakulásának veszélyét) vagy **ionizáló sugárzások** a fenti okok miatt növelik meg a rákos betegségek kockázatát. Az ilyen, nyilvánvalóan külső eredetű mutációkat **indukált mutáció**knak nevezzük. Ezek nagy szerepet játszottak a kísérletes genetikai tudományának kialakulásában.

Az indukált mutáción kívül azonban **spontán mutációk** is bekövetkeznek, amelyeket nemigen lehet elkerülni. Nézzük meg ezek típusait.

Mutációt (nagyon ritkán) okozhat a replikáció során a 3'→5' exonuleázon alapuló, korrektor típusú hibajavításon is átcsúszó másolási hiba. A replikációt követő spontán (tehát nem kívülről származó mutagén okozta) mutációk négy fő típusa, és kialakulásuk fő mechanizmusa a következő:

- A bázis oxidatív dezaminálódása
- A bázis lehasadása az N-glikozidos kötés hidrolízise révén
- A főleg UV sugárzás hatására kialakuló pirimidin dimerek
- Bázis alkilálás

Érdemes megjegyezni, hogy az indukált mutációk is ugyanezekkel a mechanizmusokkal következnek be. A mutagén anyagok zöme vagy bázis dezaminálódást, vagy bázis alkilálást (pl. metilálás) okoz.

A mutáció rendkívüli fontossága miatt már igen korán komoly igény támadt egy olyan tesztre, amellyel különböző anyagok mutagén hatását kvantitatívan ellenőrizni lehet. Az első, és a mai napig is alkalmazott egyszerű tesztet Bruce Ames dolgozta ki a hetvenes évek elején.

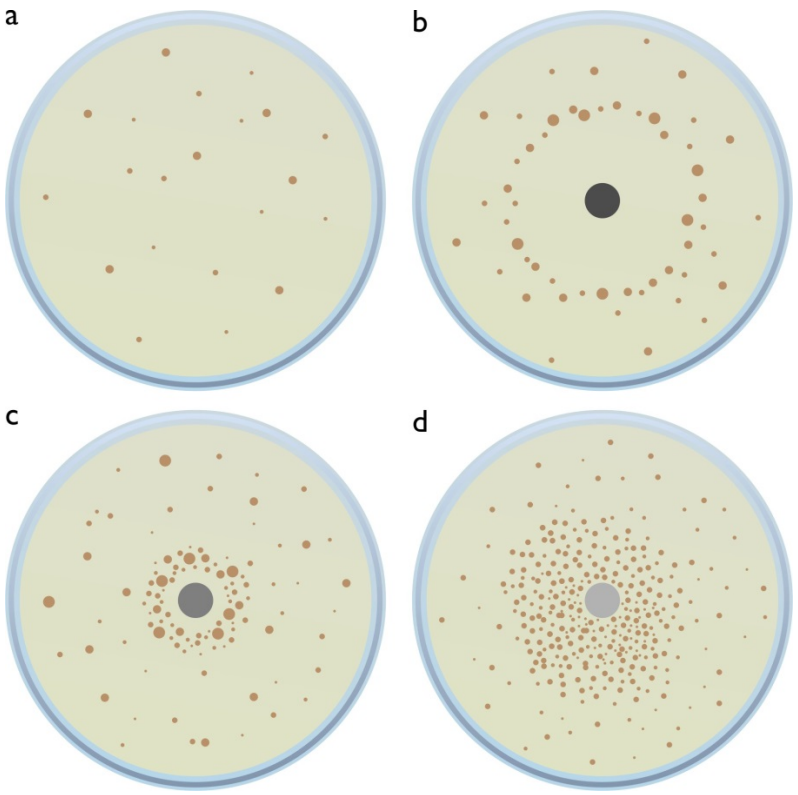
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

13.12.1. Az Ames-teszt

Az **Ames-teszt**ben olyan **baktérium törzs**eket alkalmaznak, amelyek hisztidin szintézisben szerepet játszó egyik enzime nem működik. Az enzim azért nem működik, mert az azt kódoló génben van egy tökéletesen ismert típusú hiba. A hiba jellegétől függően különböző törzsek léteznek. Van, amelyikben egy báziscsere miatt funkcióképtelen az enzim, van, amelyikben egy nukleotid egységgel kevesebb van a génben (deléciós mutáns), vagy éppen több (inszerciós mutáns).

Ezek a baktérium törzsek csak olyan táptalajon szaporodnak, amelyben van hisztidin. Az ilyen törzseket, amelyek csak az adott metabolit külső hozzáadása mellett növekszenek, **auxotróf**nak hívják.

A teszt során az adott törzs sejt-szuszpenzióját agar lemezre kenik szét (lásd **13.22. ábra**).



13.22. ábra: Az anyagok mutagén hatását vizsgáló Ames-teszt

A sejtek egymástól távol, random helyezkednek el a lemez felszínén. A lemezben bőségesen van tápanyag, de csak nagyon kevés hisztidint tartalmaz, éppen csak annyit, hogy az enzimmel nem rendelkező sejtek kis ideig életben maradjanak.

Amikor több százmillió sejtet kikennek egy ilyen agar lemezre, néhány sejt szaporodóképessé válik, mert a rendelkezésére álló idő alatt spontán módon olyan mutációt szenved, amely működőképessé alakítja vissza a hibás génjét. Ezek a baktériumok teljesen random módon eloszolva jelennek meg a lemezen, és egyfajta negatív kontroll hátteret jelentenek

A kísérlet során egy, a vizsgált anyaggal átitatott korongot helyeznek a táplemez közepére. A korong körül a vegyület koncentrációja egy gradiens mentén sugárirányban csökken. Ha az anyag **mutagén**, akkor jelenléte **megnöveli az adott gén visszamutálódásának gyakoriságát**.

Eközben természetesen számos más gén mutációját is lehetővé teszi.

Nagyon magas mutagén koncentráció toxikus a sejtekre, (lásd a koronghoz közeli üres sávot), mert egyszerre átlagosan több mint egy mutáció bekövetkeztét teszi lehetővé. Így azok a sejtek, amelyek hibás enzim-génje kijavítódott, és elvileg szaporodóképessé váltak, több más mutáció miatt elpusztulnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Van azonban egy optimális távolság, ahol a mutagén hatás már lényegesen megnöveli a hibás gén kijavítódásának gyakoriságát, de még nem olyan magas, hogy minden sejtnek egyszerre sok génje is mutációt szenvedne. A **13.22. ábra** az „a" csésze a negatív kontroll, a „b", „c" és „d" csészén ugyanaz az anyag szerepel csökkenő koncentrációban. Minél kisebb koncentrációban hatásos a vegyület, annál veszélyesebb mutagén. A rákkeltő anyagok nagy része pozitív az Ames-tesztben.

Egyes anyagok, amelyek a tesztben veszélyesnek mutatkoznak, valójában az emberi szervezet számára nem azok, mert a szervezetbe jutó anyagot a máj kémiailag módosítja, és a módosult anyag már nem mutagén. Ennek a fordítottja is ismert, egyes anyagok a tesztben nem mutagének, de a máj átalakítása során azzá válnak. Ezért az Ames-tesztet kiegészítették egy olyan eljárással, amely során a vizsgált vegyületet egy standardizált májkivonattal előkezelik, és ezek után végzik el vele a tesztet.

13.12.2. Mutáció típusok

13.12.2.1. Hibás bázispárok

A replikáció mechanizmusánál bemutattuk, hogy a DNS-polimerázok ellenőrzik, hogy a beépítendő monomer megfelelő számú hidrogénhíddal bázispárosodik-e a templáton vele szemben álló monomer egységgel, és azt is ellenőrzik, hogy eközben a B-DNS szerkezet megőrződik-e. A monomert csak akkor építik be, ha mindez teljesül. Ez a fajta ellenőrzés alapvetően kötési energia alapú. A megfelelő monomerrel alkotott komplex szabadentalpia szintje alacsonyabb, mint a nem megfelelő monomerrel alkotott komplexé. A két szabadentalpia szint különbsége a termodinamika törvénye szerint meghatároz egy arányt, egy egyensúlyi állandót. Ez az arány tízezer és százezer között van az egyhez, tehát nagyjából minden tízezer és százezer közötti helyesen beépített monomer után jön egy hibás beépülés. Ez a hiba elkerülhetetlen. Azok a DNS-polimerázok, amelyeknek nincs 3'→5' exonukleáz aktivitásuk, és ebből következően nem rendelkeznek korrektor típusú hibajavítással, ezzel a 10^{-4}-10^{-5} közötti hibagyakorisággal működnek.

A **korrektor funkcióval rendelkező DNS-polimerázok** esetében ugyanakkor nagyjából minden 1 milliárd helyesen beépített monomerre jut egy hibásan beépített, tehát a **hibagyakoriság 10^{-9}**. A korrektor funkció egy, az előzőekben említett hibaellenőrzéstől független másik ellenőrzés, ami ezek szerint minden tízezer-százezer hibásan beépített monomerből csak egyet hagy meg, a többit kivágja. Ennek a független folyamatnak is megvan a fenti termodinamikai háttere.

A két független ellenőrzés tehát két termodinamika által megszabott folyamat, a kettő eredője elképesztően jó hatásfokkal működik. Ez a hatásfok teszi lehetővé, hogy a genetikai információ szinte tökéletesen változatlan formában adódjon át a következő generációnak.

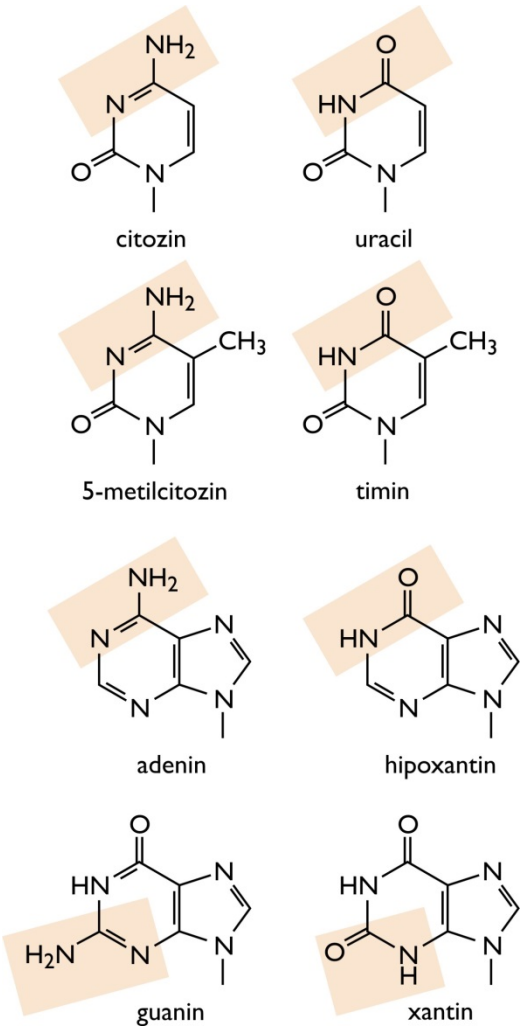
A termodinamika által diktált hibaarányon kívül azonban van egy kémiai oka is, hogy a másolás nem lehet tökéletes. Mint ismeretes, a DNS-alkotó bázisok különböző tautomer formákban lehetnek jelen. A legstabilabb, ezért legnagyobb arányban előforduló tautomer formák alkotják a Watson-Crick bázispárokat. Amikor a replikáció során a beépítendő monomer bázisa, vagy a soron következő templát egység bázisa éppen egy **ritka tautomer formá**ban van, akkor nem azzal a bázissal alkot geometriailag és energetikailag mindenben megfelelő párt, mint amivel a normál formája, hanem egy másik bázissal. Ilyen esetben a polimeráz minden ellenőrző funkcióján átmegy az egyébként hibás, csak az adott a pillanatban éppen tökéletesnek tűnő bázispár. Ha ez a **hibás bázispár** elegendő ideig stabil marad ahhoz, hogy a polimeráz még egy következő monomer egységet beépítsen, akkor a korrektor funkcióra sincs már lehetőség.

Az ilyen hibát, amikor két normális DNS-alkotó bázis között hibás pár alakul ki, egy komplex hibajavító mechanizmus korrigálja.

13.12.2.2. Bázis dezaminálás

A purin vagy pirimidin vázról lelógó $-NH_2$ csoportot tartalmazó DNS-alkotó bázisok (tehát a timin kivételével az összes) mind átalakulhatnak **oxidatív dezaminációval** (lásd **13.23. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



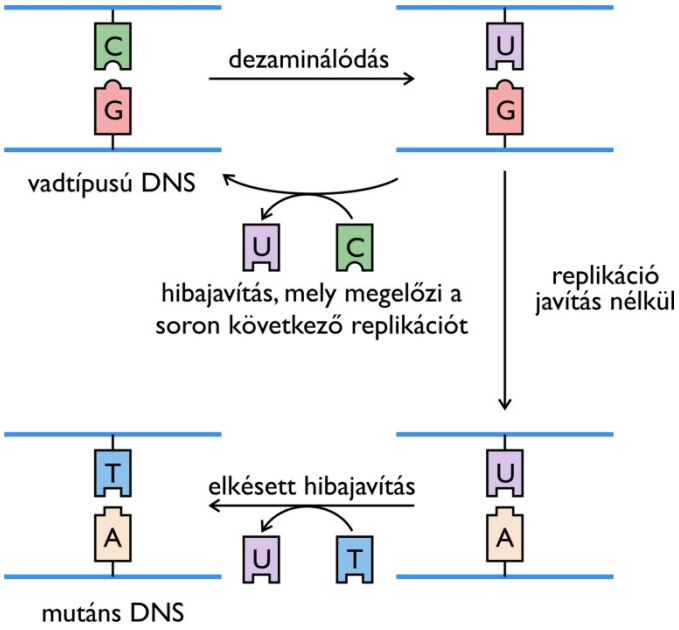
13.23. ábra: Aminocsoportot tartalmazó DNS-bázisok dezaminálódása

Az oxidatív dezaminációt **spontán is** végbemegy, de például a salétromossav, és az azt képző nátrium-nitrit és nátrium-nitrát mutagének, mert növelik a dezaminációt gyakoriságát. Mivel dezaminációt hatására a hidrogénhíd kötésben donor szerepet játszó amin helyett egy akceptor szerepet betöltő karbonil oxigén jelenik meg, a módosult bázis elveszti eredeti bázispár-képző tulajdonságát (lásd **13.23. ábra**). Ebből két fontos dolog is következik:

A hibás bázispár a DNS-ben szerkezet-torzulást okoz, amit a hibajavító mechanizmusok képesek detektálni.

A ki nem javított módosult bázis a soron következő replikációs lépésben mutációt okoz, hiszen vele szemben nem az eredeti formájával komplementer bázis, hanem valami más fog beépülni (lásd **13.24. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.24. ábra: A dezaminálódás hibás bázispárosodást okoz, javítás híján a replikáció mutáns DNS-t eredményez

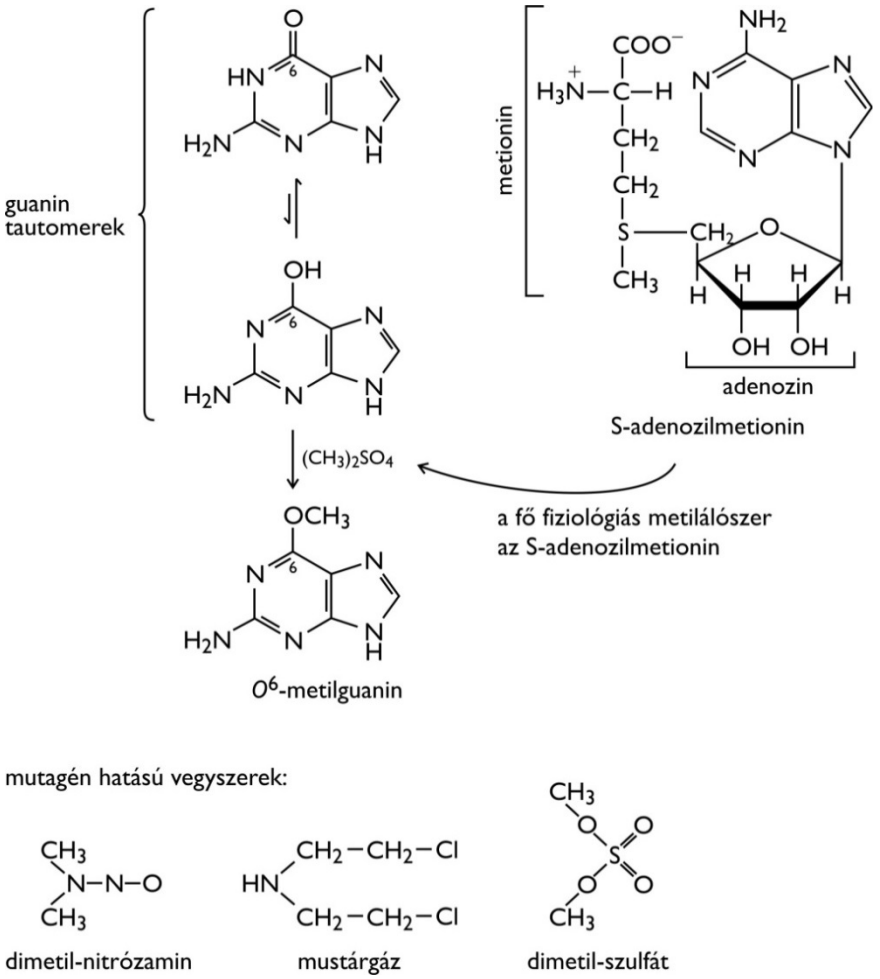
A citozin dezaminációja uracilt eredményez. Az uracil a metilcsoport nélkül azonos a timinnel. Bázispárosodás tekintetében megegyezik vele, ezért a transzkripció során a szintén bázispárosodás alapján szintetizálódó RNS-be mindig uracil kerül, amikor a DNS templátban adenin van. Javítás híján ezért a **következő replikáció**s lépésben az eredeti citozin helyén szereplő **uracillal szemben adenin épülne be az eredeti guanin helyett**, végleg megváltoztatva az utód DNS szekvenciáját. Ez lehet a fő **evolúciós előnye** annak, hogy a **DNS-ben nem uracil van, hanem timin**. Ha ugyanis az uracil DNS-alkotó bázis lenne, akkor a citozin dezaminálódása olyan hibás bázispárhoz vezetne, amelyben mindkét bázis normális DNS-alkotó elem lenne. Így nagyobb problémát jelentene annak eldöntése, hogy egy G:U párban melyik bázis a hibás, melyiket kell kicserélni. Ebben az esetben viszont ez nem kérdés, hibás bázispár esetén nyílván a nem DNS-alkotó bázist kell eltávolítani. (Mint azt hamarosan ismertetjük, mind a prokarióta, mind pedig az eukarióta sejtekben külön hibajavító mechanizmus biztosítja a nem DNS-alkotó uracil eltávolítását.)

Azzal, hogy uracil helyett timin van a DNS-ben, a citozin dezaminációból eredő probléma gyakorisága erősen csökkent, de nem szűnt meg. A citozinnak ugyanis van egy természetes módosulata, az 5'-metilcitozin. Ez a módosítás a citozin bázispárosodását nem befolyásolja, ugyanakkor **epigenetikai jelkén**t funkcionál. Az 5'-metilcitozin dezaminálódása hibás G:T bázispárt eredményez, amelyben mindkét bázis normális DNS-alkotó. Az ezt felismerő javítómechanizmus a T-t távolítja el, mert egy ilyen hibajavító mechanizmus átlagosan kevesebb hibát követ el, mint egy olyan, ami a G-t cserélné A-ra.

13.12.2.3. Bázis alkilálás

Az **O^6-metilguanin** egy ritka tautomer alak alkilálódásával keletkezik. A fő fiziológiás metilálószer az S-adenozilmetionin koenzim. Amint azt már korábban a replikáció során bekerülő hibáknál említettük, a ritka tautomer alak hibás bázispárt eredményez. A metiláció az O^6-metilguanin esetében stabilizálja a guanin ritka tautomer alakját, így az stabilan hibás bázispárosodást okozna, ha nem kerülne kijavításra. Az O^6-metilguanin bázispárosodás tekintetében az adeninhez hasonlít (lásd **13.25. ábra**).

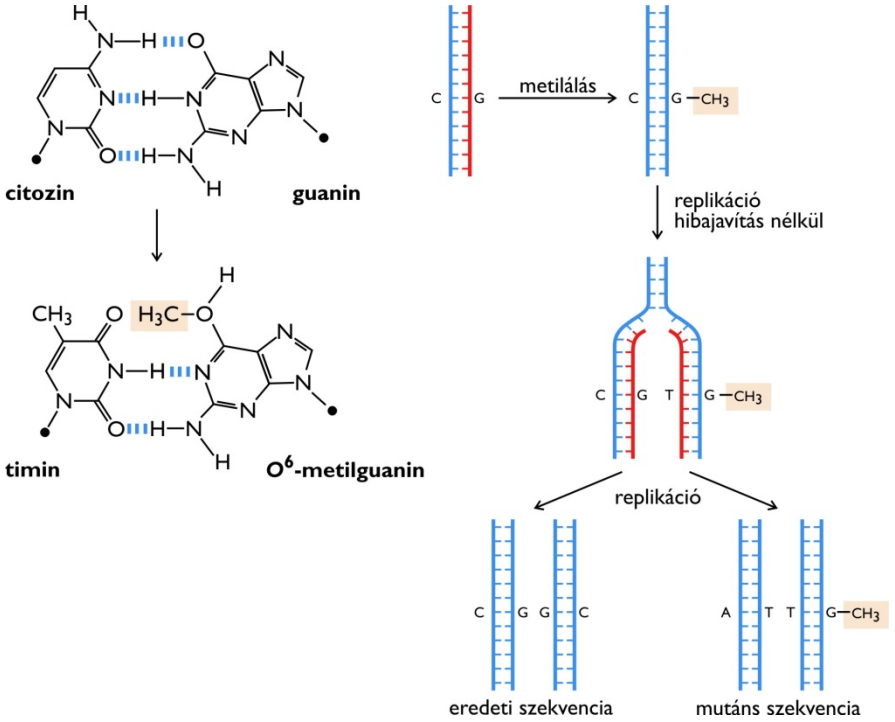
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.25. ábra: Az O^6-metilguanin bázispárosodás tekintetében az adeninhez hasonló

A replikáció során a templát szálban lévő O^6-metilguanint a polimeráz nem különbözteti meg az adenintől, ezért a komplementer szálba timin épül be, tehát egy báziscserés mutáció keletkezik (lásd **13.26. ábra**).

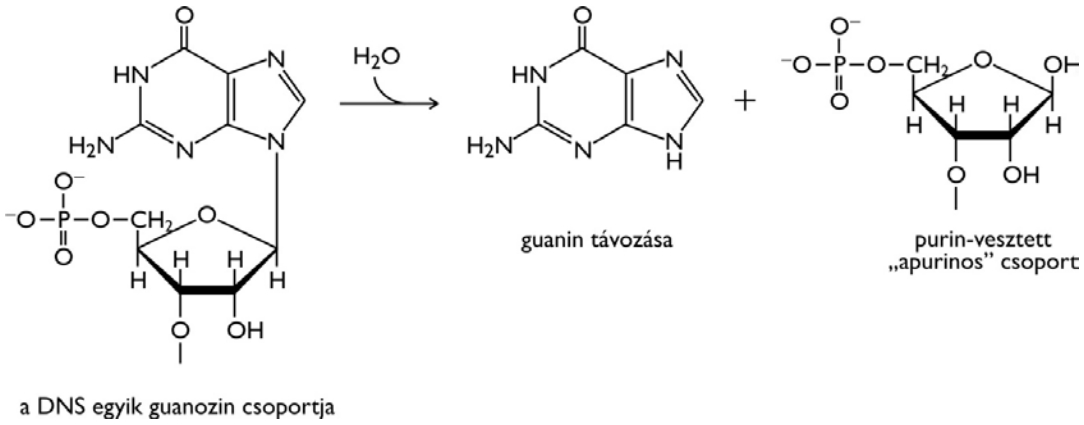
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.26. ábra: Az O^6-metilguanin a következő generációban G:C helyett A:T párt, tehát mutációt eredményez

13.12.2.4. Depurinálódás, depirimidinálódás

A dezaminálódás mellett a leggyakoribb DNS-t károsító kémiai reakció a bázist a cukorhoz kapcsoló **N-glikozidos kötés spontán hidrolízise** (lásd **13.27. ábra**).



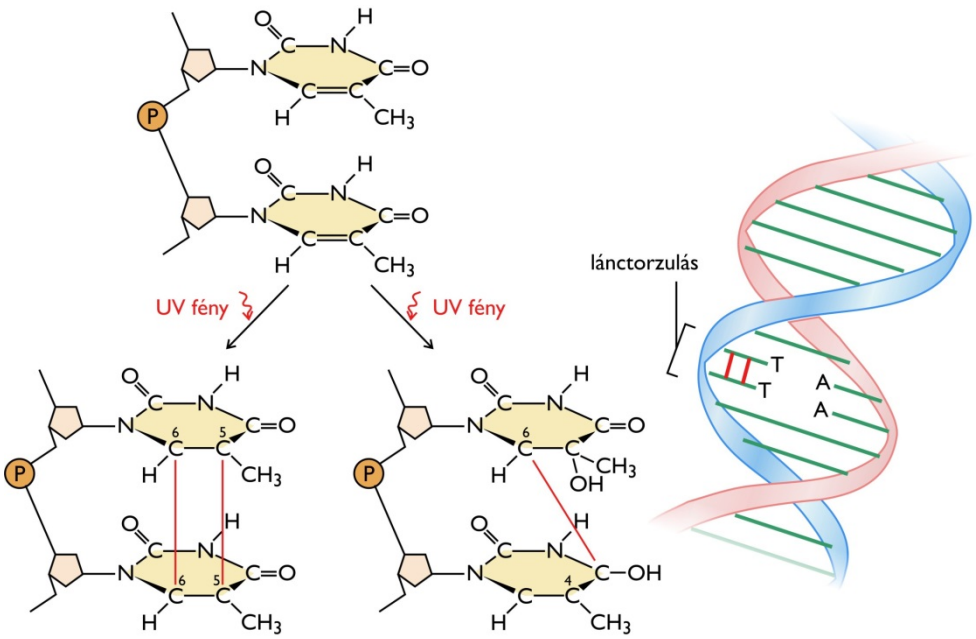
13.27. ábra: A bázis spontán hidrolízise az egyik leggyakoribb spontán DNS károsodás

Magas hőmérséklet, alacsony pH kedvez a folyamatnak. Becslések szerint az emberi kromoszómában naponta több ezer ilyen hiba keletkezik, és javítódik ki. (A javítás mechanizmusát lásd később). Ha nem kerülne kijavításra, a replikáció során, amikor a bázishiányos rész templátként funkcionál, a bázis nélküli pozícióval szembe bármi beépülhet, ami 75%-os mutációs valószínűséget jelent.

13.12.2.5. Pirimidin dimerek keletkezése

Ultraibolya fény hatására a láncban egymást követő pirimidin gyűrűk elektronszerkezete úgy gerjesztődhet, hogy közöttük kötésátrendeződéssel kovalens kötések alakulnak ki (lásd **13.28. ábra**). A **pirimidin dimerek** nagymértékű térszerkezeti torzulást hoznak létre a DNS-ben.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.28. ábra: A pirimidin dimerek kialakulása UV fény hatására

13.12.3. A fő DNS hibajavító mechanizmusok

A fő hibajavító-mechanizmusokat, az abban szereplő fehérjéket és a javított károsodás típusát a **13.4. táblázat** foglalja össze.

13.4. táblázat: DNS hibajavító mechanizmusok

Javítás típusa, enzimek, fehérjék	A károsodás típusa
bázispárosodás helyreállítása	hibás bázispárosodás
Dam-metiláz MutH, MutL, MutS fehérjék DNS-helikáz II SSB (ssDNS-kötő fehérje) DNS-polimeráz III exonukleáz I exonukleáz VII RecJ-nukleáz exonukleáz X DNS-ligáz	
báziseltávolító javítás	abnormális bázisok
DNS-glikozilázok AP-endonukleázok DNS-polimeráz I DNS-ligáz	(uracil, hipoxantin, xantin), alkilált bázisok, néhány élőlényben a pirimidin dimerek is így javítódnak
nukleotid-eltávolító javítás	nagy szerkezeti változást okozó mutáció
ABC-excinukleázok DNS-polimeráz I DNS-ligáz	(pl. pirimidin dimer)
közvetlen bázisjavítás	pirimidin dimerek, O^6-metilguanin
DNS-fotoliázok O^6-metilguanin-DNS metiltranszferáz	

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

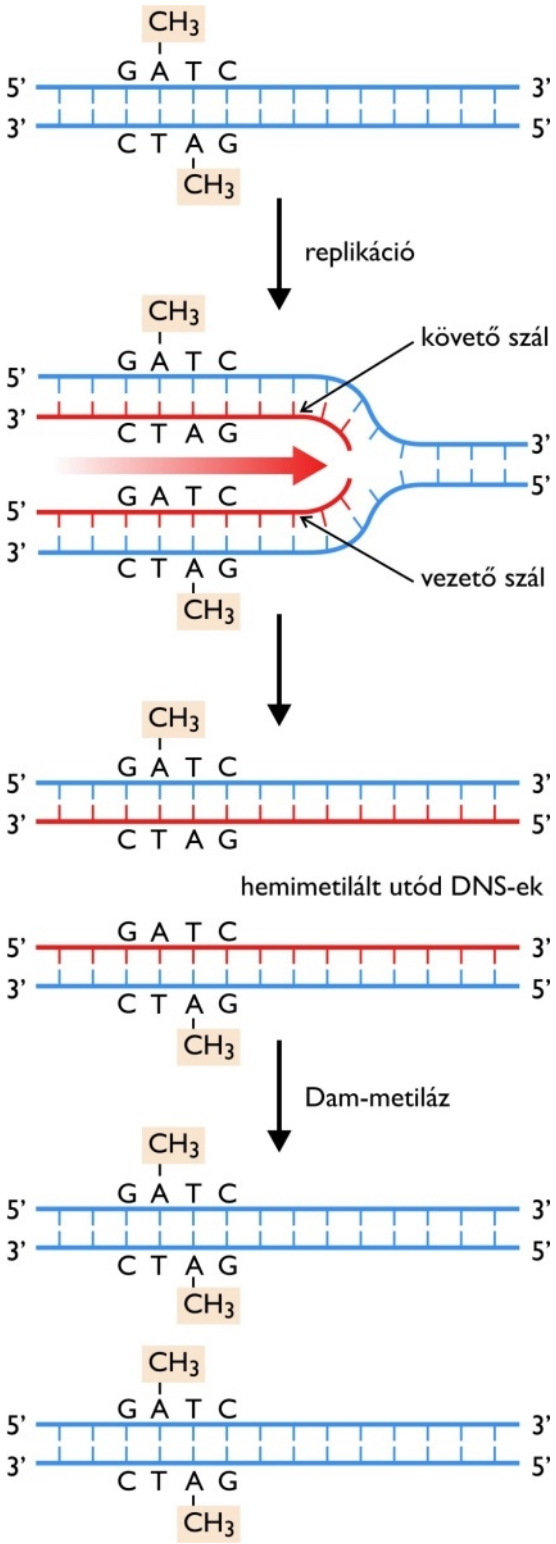
13.12.3.1. Hibás bázispárosodás kijavítása közvetlenül a replikáció után (*mismatch repair*)

Amint azt már érintettük, elkerülhetetlen, hogy – ugyan nagyon kis gyakorisággal, de – a replikáció során is bekövetkezzenek hibák. Ezeknek a hibáknak az eredménye egy olyan hibás bázispár, amelynek mindkét tagja normális DNS-alkotó bázis. A hibajavító mechanizmusok közös funkciója az, hogy visszaállítsák az eredeti állapotot. Belátható, hogy koncepcionálisan a legnehezebb feladata akkor van egy ilyen hibajavító rendszernek, ha mindkét bázis normális szereplője a DNS-nek. Ilyenkor antropomorf módon megfogalmazva azt kell eldönteni, hogy melyik bázis volt ott eredetileg, és melyik az, amelyik az eredetivel szemben hibásan épült be. Ez egyben azt is jelenti, hogy a rendszernek azt kell eldöntenie, hogy melyik szál a szülői szál, és melyik az újonnan szintetizált utódszál. **A bázist az utódszálon kell** ugyanis **kicserélni**.

A kólibaktériumban egy rendkívül elegáns rendszer látja el ezt a feladatot. A replikációt megelőzően a **Dam-metiláz módosítja a két szülői DNS szálat** a középpontosan szimmetrikus (palindrom) **GATC szekvenciák**nál. Az adenin metilálódik olyan módon, hogy az nem érinti a bázispárosodási képességét. Ez tehát az epigenetikai jelek (és öröklődés) egyik szép példája.

A replikáció után egy rövid ideig csak a régi, szülői szál metilált, az újonnan szintetizált utódszál még nem. A replikációt követő pár perc során (nem sokkal a következő replikáció előtt) az új szál is metilálttá válik. A kóli trükkje tehát az, hogy a replikációt követően specifikus szekvenciáknál metilálással megjelöli a DNS-ét (lásd **13.29. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

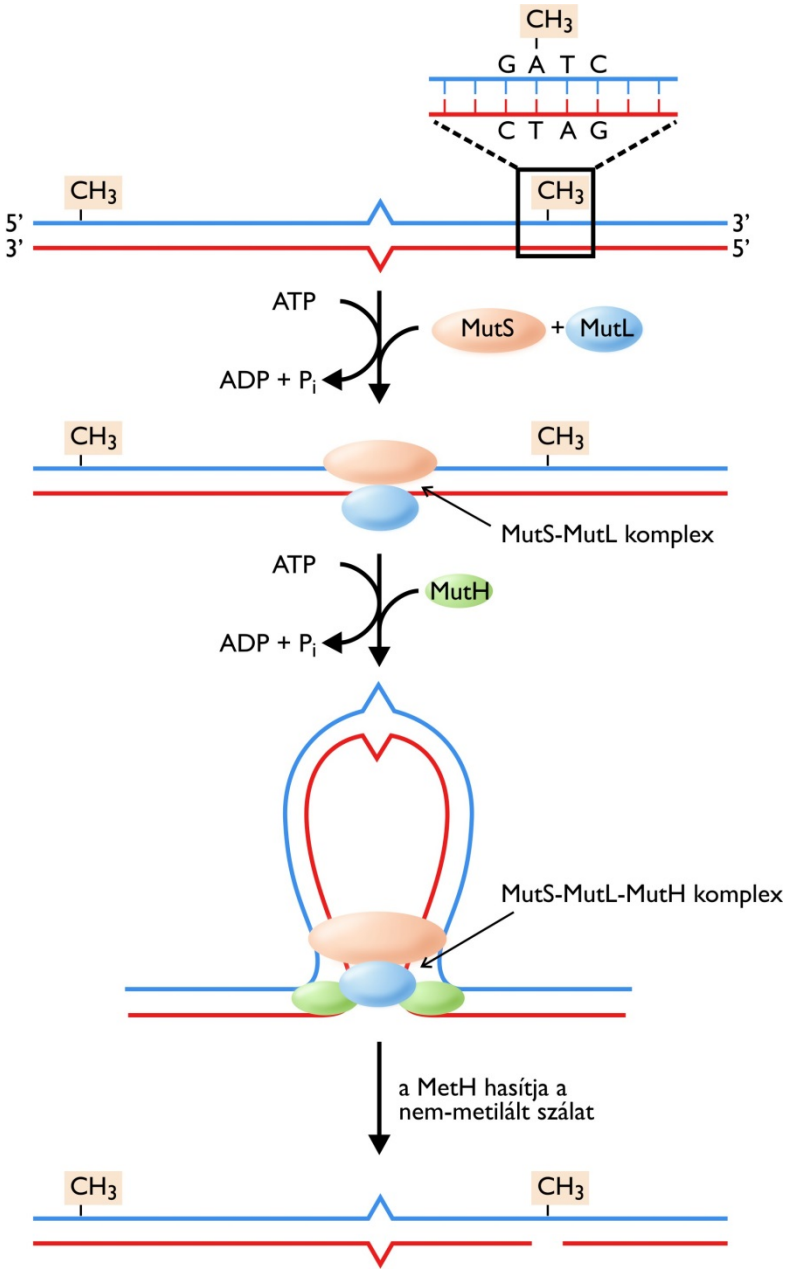


13.29. ábra: A Dam-metiláz működése

Abban a pár perces időszakban, amikor a metilációs jel még csak a szülői szálon van jelen, az újon nincs, a két szál a jel alapján megkülönböztethető. Ez teszi lehetővé, hogy hibás bázispárosodás detektálása esetén a sejt „eldöntse", melyik bázist kell megőrizni. Az a bázis őrződik meg, amelyik a szülői, metilált szálon van. Nem kis teljesítmény ennek meghatározása, ugyanis a bekövetkezett hiba és a metilálás helye egymástól nagyon messze is lehet. Nézzük meg, hogyan zajlik le ez a folyamat (lásd **13.30. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A hibás bázispárosodás a B-DNS szerkezet lokális torzulását eredményezi. Ezt a konformációváltozást specifikus fehérjék ismerik fel. Ezek a **MutS** és **MutL fehérjék**, amelyek a **hibás bázispár**t tartalmazó **szakaszhoz** kötnek. A MutS-MutL komplex a DNS-t egy ATP-t igénylő folyamatban mindkét oldalról húzva mintegy átfűzi magán. A **MutH** fehérje eközben **Dam-metilált szekvenciákat köt**. Amikor a MutS-MutL egy ilyen metilcsoporthoz kötött MutH fehérjével találkozik, az átfűzés abbamarad, a MutH és a MutL összekapcsolódnak. Ez a kötődés aktiválja a MutH eladdig gátolt endonukleáz aktivitását, és a MutH enzim elvágja a nem-metilált szálat.



13.30. ábra: A replikáció során keletkezett nem-normális bázispár metiláció-függő javítása

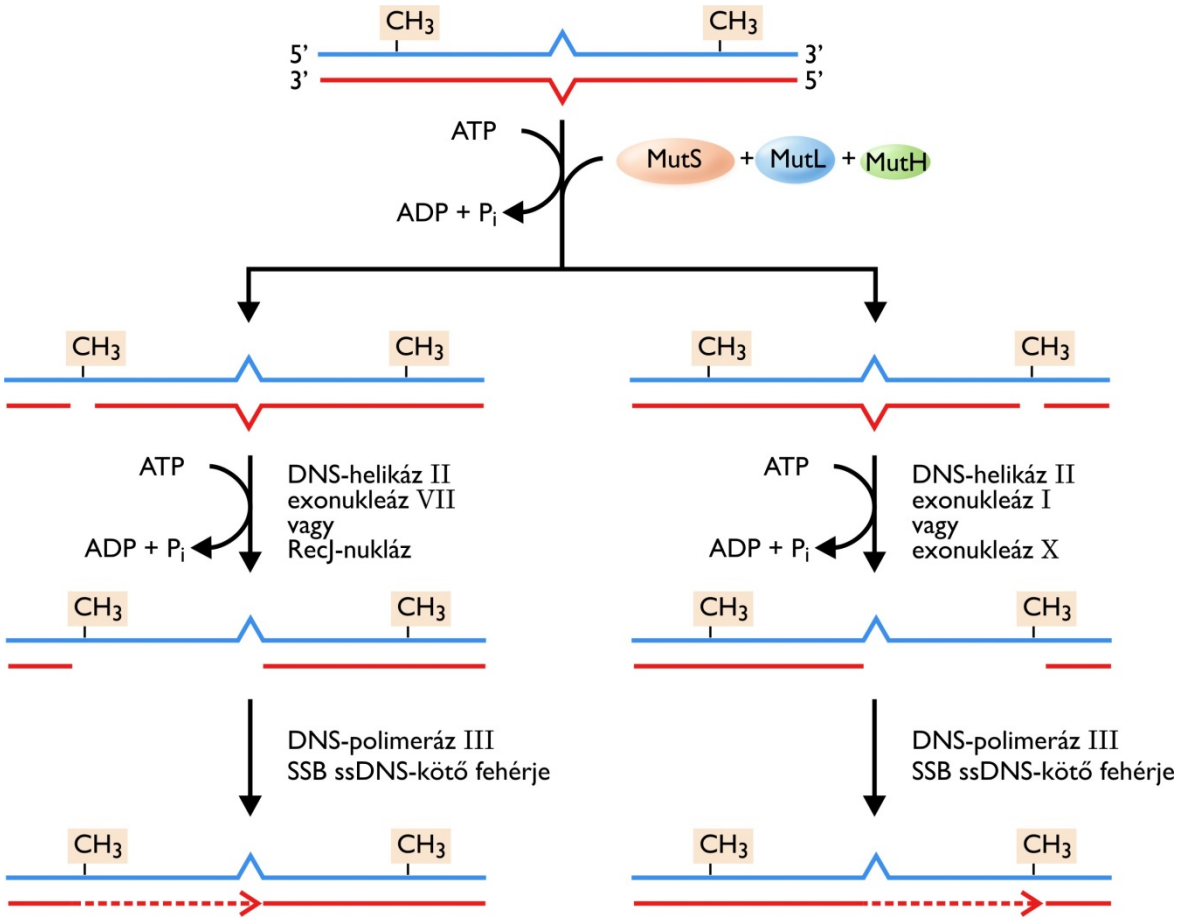
A szülői szál azonosításához használt metiláció akár 1000 bázispárnyi távolságra is lehet a hibás bázispártól. Kísérletek mutatják, hogy amennyiben már mindkét szál metilált, a rendszer csaknem inaktív. Ha egyik szál sem metilált, akkor véletlenszerűen vagy az egyik, vagy a másik bázis őrződik meg a hibás párból, ami 50%-ban mutációt eredményez.

A hibás bázispárnak és a MutH hasításnak egymáshoz viszonyított helyzetétől függően kétféle hibajavítási séma létezik (lásd **13.31. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ha a hasadás a hibához képest 5'-irányban van, akkor a hiba visszaemésztésen alapuló eltávolítása 5'→3' exonukleáz aktivitást igényel. Amennyiben a hasadás a hibához képest 3' irányban van, akkor a javításhoz 3'→5' exonukleáz aktivitásra van szükség. A hibás szálat mindkét esetben helikázok „hámozzák le" a templát szálról, az exonukleázok, amelyek egyenként távolítanak el monomereket az egyszálú DNS-ről, ezen a felfejtett DNS-en működnek. Mindkét esetben a DNS-polimeráz III pótolja a hiányzó DNS-t, összhangban azzal, hogy a replikáció során bekövetkező hiba javításáról van szó, amikor is aktív polimeráz III van jelen a sejtben.

Az itt ismertetett **hibás bázispárosodás javítási mechanizmus**t az angol nyelvű szakirodalom „***mismatch repair***"-nek hívja.



13.31. ábra: A DNS hiba és a metiláció relatív helyzete alapján kétféle metiláció-függő hibajavítási séma létezik

13.12.3.2. Bázis-eltávolító javítás *(base-excision repair)*

Amikor a DNS-ben egy normálisan elő nem forduló **módosult bázis** jelenik meg, olyankor nem kérdéses, hogy melyik szál hordozza a helyes információt. Ilyenkor nyilvánvaló, hogy a módosult bázist kell a vele szemben álló normális alapján az eredetire visszacserélni. A **bázis-eltávolító javítómechanizmus** angol elnevezése: ***base-excision repair***.

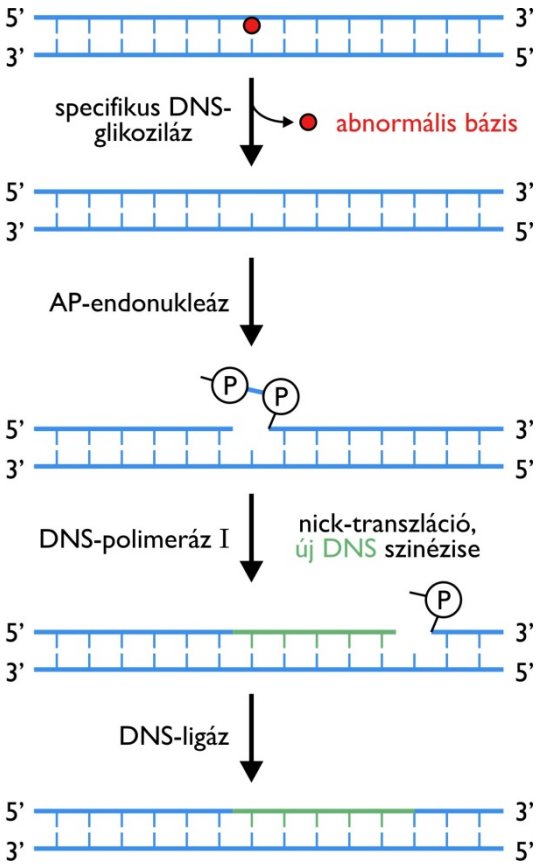
A DNS-ben normálisan elő nem forduló bázisokat specializált **DNS-glikozilázok ismerik fel, és vágják ki**. Tehát minden gyakran előforduló nem-normális bázisra van egy szelektív DNS-glikoziláz enzim, amelynek kötőhelye csak azt a bázist ismeri fel (lásd **13.32. ábra**).

A javítás az alábbi lépésekben zajlik: a) A hibás bázis eltávolítása az N-glikozidos kötés szelektív enzimatikus hasításával. Az eredmény egy apurinos, vagy apirimidines, úgynevezett „AP" hely. b) Az AP helyhez közel, attól 5' irányban egy erre a feladatra specializált AP endonukleáz elhasítja az egyik foszfodiészter kötést, egy „nick" keletkezik a DNS-ben c) A DNS-polimeráz I enzim 5'"3' exonukleáz valamint polimeráz aktivitásának

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

kombinálásával hasadás áthelyezést (nick translation) végez, és eközben visszaállítja a helyes bázispárosodást. d) Az áthelyeződött hasadást a DNS ligáz szünteti meg.

Vegyük észre, hogy a báziseltávolítás után keletkező AP-hely egy független, enzimkatalízis nélküli folyamatban is kialakul a bázisok N-glikozidos kötésének spontán hidrolízise révén. Valójában ez a **leggyakoribb mutáció** az emberi szervezetben. A spontán megjelenő AP-helyek javítása a c) és d) pontokban imént leírtak szerint megy végbe.



13.32. ábra: A bázis-eltávolító hibajavítás

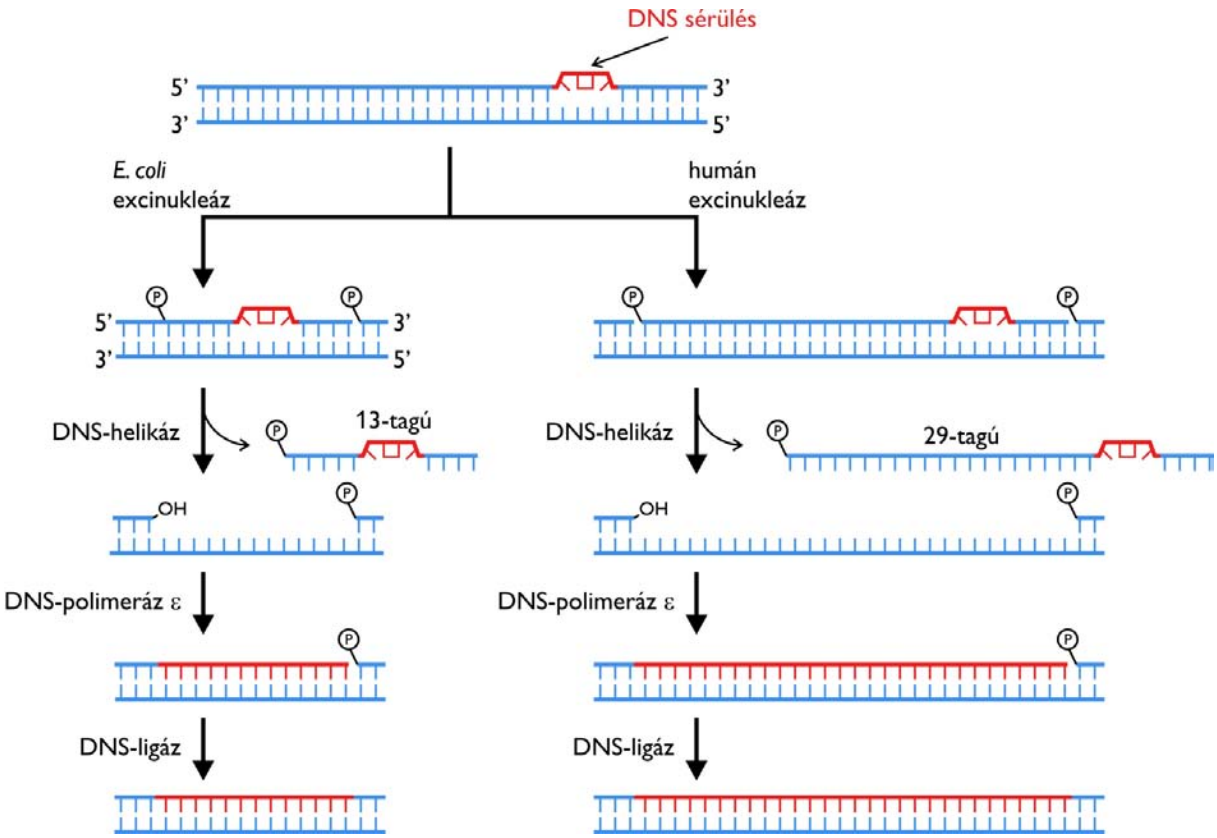
13.12.3.3. Nukleotid-eltávolító javítás

A fent bemutatott bázis-kivágó javítás második szakaszában a hiba környékén a DNS szál megemésztődött, és a szemközti komplementer szál, mint templát alapján újraszintetizálódott.

Vannak olyan DNS sérülések, melyeket nem lehet báziskivágáson keresztül kijavítani. Ilyenkor a hiba környékén lévő láncot kell kivágni. Ez a **nukleotid-eltávolító hibajavítás** (***nucleotide-excision repair)***. Ilyenkor a torzulás detektálása után a hiba környéki szálat egy sok-alegységes, **specifikus enzimrendszer** vágja el a sérülés mindkét oldalán. Kóli-ban ilyen az Uvr A, B, C tagokból álló, **ABC-excinukleáz komplex** (lásd **13.33. ábra**).

Az excinukleáznak azonosítania kell, hogy melyik szálon van a pirimidin dimer, és azt a szálat kell elvágnia a hiba két oldalán. Ezután a hibát tartalmazó szakaszt helikáz „hámozza le”, a hiányzó részt pedig DNS-polimeráz I pótolja, a szálakat ligáz kapcsolja össze.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



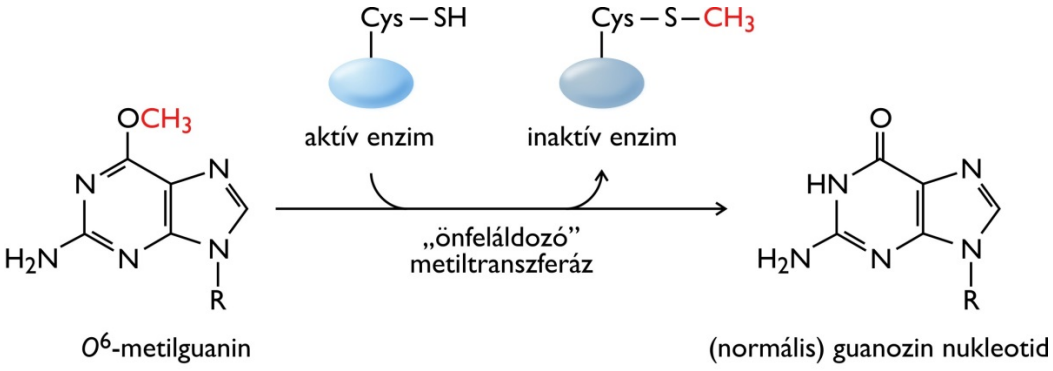
13.33. ábra: Nukleotid-eltávolító hibajavítás kólibaktériumban és emberben

13.12.3. 4. Közvetlen bázisjavítás

Az eddig bemutatott esetekben a hibajavító rendszer a hiba felismerése után annak környékével együtt eltávolította a hibás DNS szakaszt, majd kijavított változatban újra szintetizálta azt. Bizonyos bázissérülések azonban javíthatók a bázis eltávolítása nélkül is. Ezt közvetlen hibajavításnak (*direct repair*) hívjuk.

Ilyenkor egy enzimatikus folyamat keretében közvetlenül maga **a bázis javítódik** ki. A módosításhoz vezető kémiai reakcióval ellentétes irányú folyamat révén újra kialakul az eredeti bázis.

Az egyik ilyen hibajavító mechanizmus-csoport a mutációt okozó alkilálást, a példában bemutatott enzim a guanozin metiláltságát szünteti meg. Az enzim általánosan elterjedt az élővilágban (lásd **13.34. ábra**).



13.34. ábra: A guanin metiláltságát megszüntető közvetlen bázisjavítás

A metilált enzim serkenti saját génjének expresszióját, vagyis metiláló mutagének jelenlétében a hibajavító mechanizmus hatékonysága megnövekszik. A példában szereplő metil transzferáz egy „önfeláldozó" enzim, ugyanis miután a metil-csoportot saját ciszteinére helyezve eltávolította a DNS-ről, inaktívvá válik. Ez tehát egy meglehetősen

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

költséges módja a javításnak, hiszen egy teljes enzimmolekulát fel kell áldozni, amelynek létrehozása nagyon sok energiát igényelt. Az evolúció során mégis kialakult, és mivel előnyt biztosított, fennmaradt ez a módszer is. Ez is jelzi, milyen fontos a sejt számára a hibák kijavítása.

A pirimidin-dimerek javításának is van egy közvetlen módja, ami általánosan elterjed (lásd **13.35. ábra**).

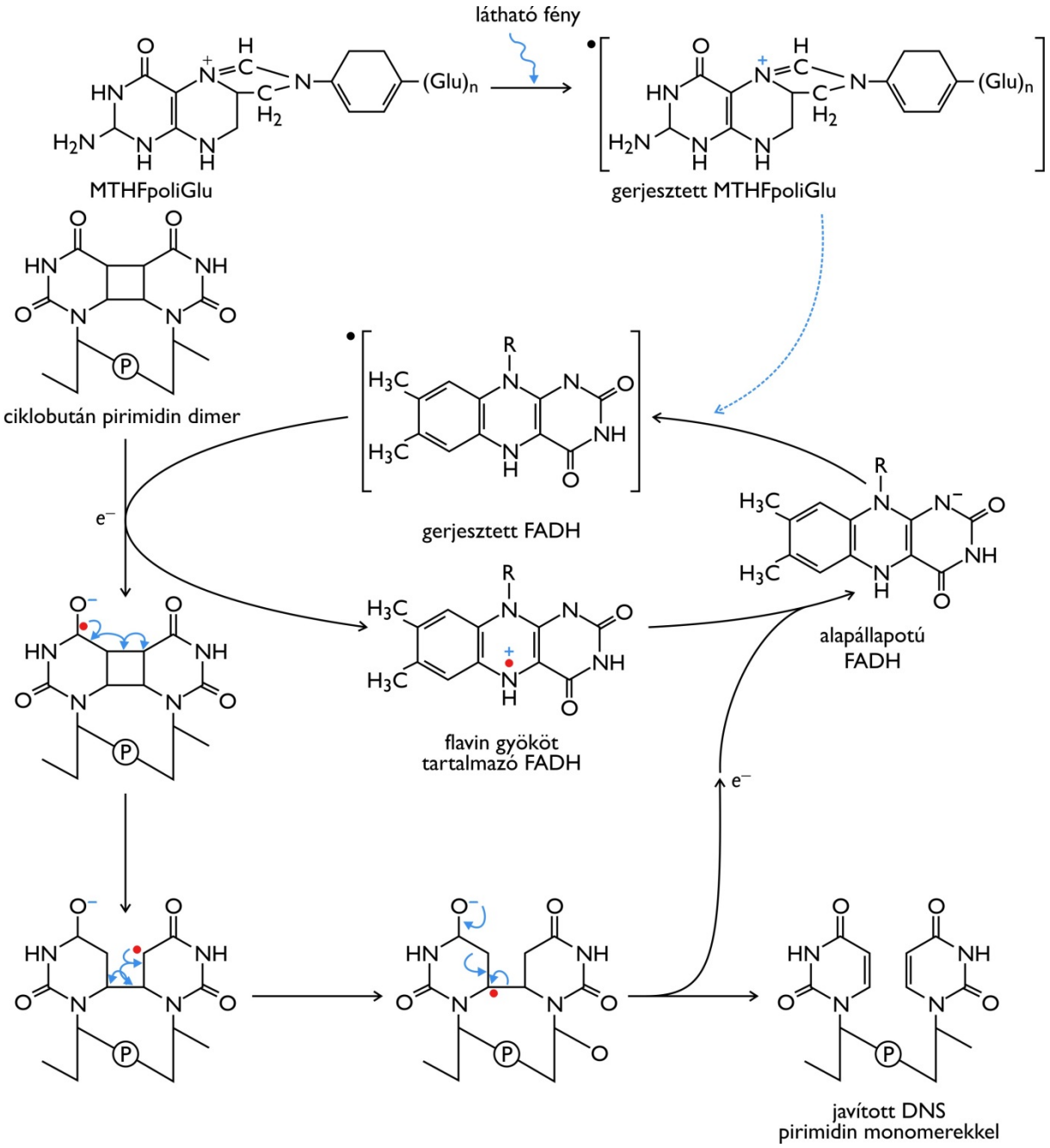
A 200-300 nm-es ultraibolya fény hatására létrejövő **pirimidin dimerek**et egy olyan enzimatikus apparátus javítja ki, amely 300-500 nm-es (tehát látható) hullámhossz tartományban aktiválódik.

A reakciót katalizáló enzim a **DNS-fotoliáz**, ami egy, az adott látható hullámhossz tartományban gerjeszthető koenzimmel működik. Ilyen koenzim pl. az MTHF-poli-Glu (MetenilTetraHidroFolsav származék). A gerjesztett koenzim átadja energiáját a fotoliáz enzim kovalensen kötött FADH koenzimének, ami ideiglenesen átad egy elektront a pirimidin-dimernek. Ez az elektron destabilizálja a pirimidin-dimert, ami az elektron visszaadása közben az eredeti pirimidin bázisokra bomlik. Emiatt a rendszer miatt javasolják az UV lámpázás utáni erős, látható fénnyel történő fényfürdőzést.A legújabb ismeretek szerint ugyanakkor a méhlepényes emlősökben, köztük az emberben nem működik fotoliáz-alapú hibajavítás. Ezekben az élőlényekben ezek a hibákat kizárólag a nukleotid-eltávolító mechanizmussal javítódnak. Fotoliázzal rokon fehérjék a méhlepényes emlősökben is vannak, de ezek feltehetően a napszakos ciklus szabályozásában játszanak szerepet.

A fentiekben megtárgyaltuk a centrális dogma első információ-áramlási útvonalának, a replikációnak a mechanizmusát. Ennek a folyamatnak a során az információ generációról generációra adódik át, ezért a másolásnak rendkívül pontosnak kell lennie. A már elkészült DNS-t is folyamatosan karban kell tartani, hogy az eredeti bázissorrend fennmaradjon.

A következő fejezetben a centrális dogma egy másik információ-áramlási útvonalára térünk át, a transzkripcióra.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



13.35. ábra A pirimidin dimerek megszüntetése közvetlen bázisjavítással

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

14. fejezet - Transzkripció (RNS szintézis)

(szerző: Pál Gábor)

Francis Crick „centrális dogmájának” egyik folyamatát, a replikációt már tárgyaltuk. Ha az élőlényt egy roppant összetett óriás gyárnak tekintenénk, akkor a hasonlatban a DNS egy, a gyáron belül tárolt hatalmas könyvtár lehetne, amely tartalmazná a gyár létrehozásához és üzemeltetéséhez szükséges összes információt. Ezt a könyvtárat hozza újra meg újra létre a replikáció, amikor az új könyvtár körül egy-egy új gyárat kell létrehozni.

A gyár létrehozása és üzemeltetése során különböző eszközöket kell létrehozni, amihez tervrajzra van szükség. A könyvtárból azonban nem lehet az eredeti tervrajzot kivinni, nagy baj lenne, ha az megsérülne. Ugyanakkor megengedett az egyes részek kimásolása. Ebben a hasonlatban a transzkripcióról úgy gondolkodhatunk, mint egy olyan folyamatról, amelyben egy-egy ilyen eszköz tervrajzát másoljuk ki a könyvtárból. Ezek a tervrajz másolatok azután sok azonos eszköz létrejöttéhez felhasználhatók, mielőtt tönkremennének, vagy kidobásra kerülnének.

A hasonlatban a tervrajz másolat természetesen az mRNS. Más tervrajz másolatokról kiderül majd, hogy azok már maguk is eszközök (lásd transzfer RNS, riboszómális RNS stb.).

A replikáció folyamatának feltárása tisztázta az örökletes tulajdonságok megőrzésének és utódokba való továbbításának elvét, de nem mutatta meg, hogy ezek a tulajdonságok hogyan fejeződnek ki.

A **DNS-ben tárolt információ kifejeződése**, más néven a **génexpresszió első lépés**eként a DNS-ben dezoxiribonukleotidok sorrendjeként tárolt **információ RNS molekulákba íródik át**.

Ez a folyamat a **transzkripció** (átírás). A név találó, mert valóban egyfajta átírásról van szó, ahol egyik betűtípusról áttérünk egy másikra. Az így keletkező RNS átiratban az információ továbbra is nukleotid bázisok lineáris sorrendjeként van jelen, bár itt a cukor dezoxiribóz helyett ribóz, és az egyik bázis, a timin helyett itt uracil szerepel.

Mint látni fogjuk, az RNS-ben tárolt információ fehérjébe fordítása sokkal összetettebb folyamat, ami joggal érdemelte ki a transzláció (fordítás) elnevezést, hiszen ebben a négybetűs nukleinsav nyelvről áttérünk egy húszbetűs fehérjenyelvre (lásd **14.1. ábra**).

A később tárgyalandó transzláció folyamatában számos RNS-féleség szerepel (mRNS, tRNS, rRNS). Ezek mind a transzkripció során keletkeznek a DNS-ben tárolt génjük alapján.

A **transzkripció** tehát nem csak az mRNS keletkezésének folyamatát jelenti, hanem az **összes RNS**-ét, a fent említetteken felül beleértve azokat az RNS molekulákat is, amik valamilyen – sokszor még nem kellően ismert – szabályozó szereppel bírnak.

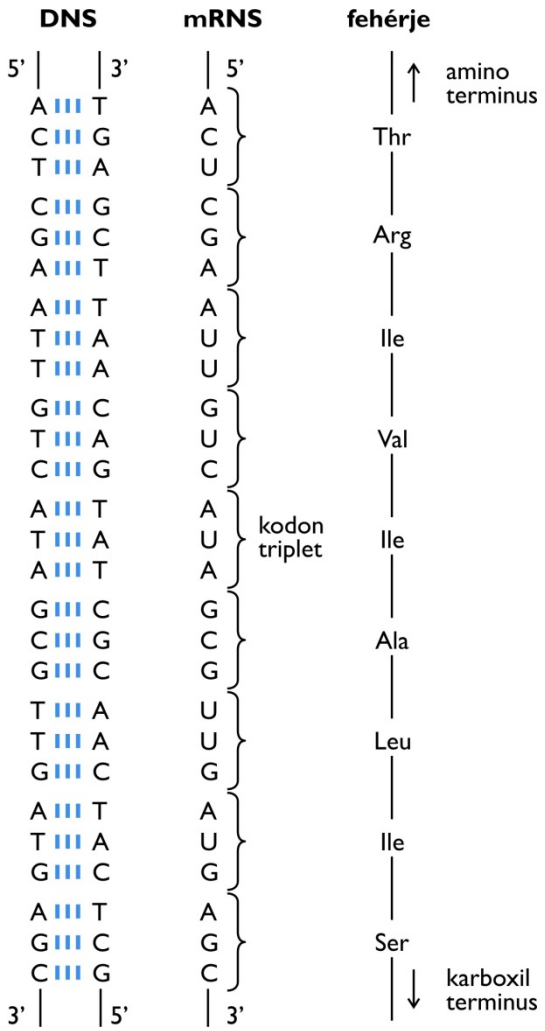
A fehérjéket kódoló DNS szakaszok, vagyis a fehérjegének esetében vezettek be egy nevezéktant, amit sajnos nem konzekvensen használ az irodalom.

Az mRNS-ek DNS templát alapján szintetizálódnak. Ennek megfelelően egy-egy gén esetében mindig van egy templát szál. **A templát szál komplementere lesz az mRNS** (lásd **14.1. ábra**). Ezáltal az mRNS és a templáttal szembeni komplementer DNS szál szekvenciája hasonló lesz. Emiatt **a templáttal** szembeni, azzal **komplementer szál**at szokták „**értelmes**” (*sense*) szálnak, míg **a templát** szálat „**értelmetlen**” (*nonsense*) **szál**nak nevezni.

Ezek a kifejezések adott esetben segíthetnek egyértelműen megnevezni, hogy egy gén esetén a DNS melyik száláról beszélünk. Csakhogy elterjedt egy másik elnevezéspár is, amely szerint az egyik szál a **kódoló**, a másik a **nemkódoló szál**. Nos, ez ügyben az irodalom már nem konzekvens, van aki a templát szálat nevezi kódolónak, hiszen az olvasódik le, más pedig az azzal komplementer szálat, mivel azon szerepel az „értelmes” szöveg.

Ebben a könyvben a kódoló-nemkódoló kifejezéspár használatától emiatt tartózkodunk.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.1. ábra: A DNS-ben, RNS-ben és polipeptidláncban tárolt információ viszonya. A DNS baloldali lánca az „értelmes” szál, a jobb oldali a templát vagy „értelmetlen” szál. Az aminosav egységeket mRNS bázishármasok (kodonok) kódolják,

Mivel a replikáció és a transzkripció egyaránt templát alapú nukleinsav szintézist jelent, ezért sok a hasonlóság a két folyamat között. Ugyanakkor a már említett eltérő funkciók miatt az eltérések is számosak. Vegyük sorra a hasonlóságokat és eltéréseket.

14.1. A transzkripció és a replikáció hasonló vonásai

Az első lényeges hasonlóság hogy **mindkét folyamat DNS templát alapján** zajlik. A másik jellegzetes hasonlóság, hogy a két folyamat alapvető **kémiai mechanizmus** is **azonos**, csak amíg a replikáció során a láncba beépülő monomerek dNTP típusú molekulákból származtak, a ribóz alapú RNS esetén a monomereket NTP vegyületek szolgáltatják. Ettől eltekintve a monomerek egyenkénti összekapcsolásának az elve is azonos: $\mathbf{(NMP)_n + NTP \rightarrow (NMP)_{n+1} + PP_i}$.

Az azonos sémából következően a folyamathoz szükséges energiát a transzkripció esetében is a „nagyenergiájú” (makroerg) nukleozid-trifoszfát szubsztrátok szolgáltatják (az egyikük az univerzális energiavaluta, az ATP) a beépülésük során bekövetkező átalakulásuk által.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A transzkripció esetében az RNS molekulák 5’→3’ irányban növekednek, vagyis a **szintézis iránya is megegyező** a két folyamatban. Végül, ahogy a replikáció, úgy a transzkripció is **három** elkülöníthető **fázis**ban: **iniciáció, elongáció, termináció** megy végbe.

Vannak azonban fontos **különbségek** is a két folyamat között. Míg a DNS szintézishez az azt katalizáló enzimnek primerre volt szükség, úgy az RNS lánc szintézisét katalizáló **RNS-polimerázok nem igényelnek primert**, az új RNS láncot az első nukleotid egységtől kezdve maguk hozzák létre. Ezzel a ténnyel már a replikáció során is találkoztunk, hiszen láttuk, hogy a replikáció során a DNS-szintézishez szükséges primert DNS-függő RNS-polimerázok hozzák létre.

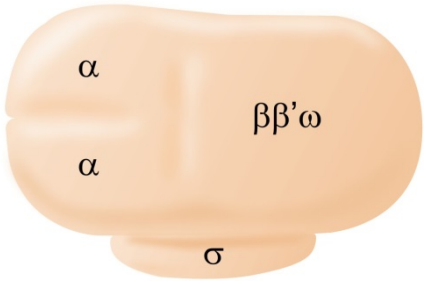
Egy másik fontos különbség, amit a hasonlatként említett könyvtár modellben már említettünk, hogy a transzkripció során a DNS-ben tárolt információnak általában csak egy része, például csak egy vagy néhány fehérjére vonatkozó információ másolódik ki egyszerre. Egy további különbség, hogy míg a replikáció során mind a két DNS szál egy időben templátként szolgál, addig egy-egy gén tekintetében az **átíródó RNS számára mindig csak az egyik szál a templát**.

14.2. A prokarióta RNS-polimeráz, a prokarióta transzkripció iniciációs fázisa

A prokarióta RNS-polimeráz alegység-összetételét a **14.1. táblázat**, sematikus felépítését pedig a **14.2. ábra** mutatja.

14.1. táblázat: A prokarióta RNS-polimeráz összetétele

Alegység	Méret	Szám	Funkció
α	36 500	2	UP régiókötése
β	151 000	1	aktívhely β’-vel közösen
β’	155 000	1	aktívhely β-val közösen
ω	11 000	1	ismeretlen
σ	70 000	1	promóter-felismerés



14.2. ábra: A prokarióta RNS-polimeráz sematikus felépítése

A **prokarióta RNS-polimeráz** egy **hat alegység**es fehérje. Az $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ felépítésű enzimben a két **α alegység** a **DNS-hez köt**ődik, a **ββ’ alegységek** együttesen alkotják az enzim **aktív „magj**át”, az ω alegység szerepe pedig egyelőre nem tisztázott.

A hat alegység közül a σ kivételt képez abban az értelemben, hogy **σ alegységéből** kólibaktériumban **7-féle** is létezik. Egy RNS-polimeráz molekula ezek közül egyszerre mindig csak egyet köt. A σ (szigma) alegységet más néven **σ-faktor**nak is nevezik. Kiderült, hogy az RNS-polimeráz elsősorban a **σ-faktor által ismeri fel a** DNS-nek azt a szakaszát, a **promótert**, ahova az RNS szintézis megkezdéséhez kötődnie kell. Úgy is mondhatjuk, hogy a σ alegység az RNS-polimeráz „szeme”.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az RNS szintézis kezdőpontját a DNS-en tehát a promóter jelöli ki. A promóter felismerésének az alapja egy olyan kölcsönhatás, amelyben egy fehérje (az RNS-polimeráz σ alegysége) a DNS szekvenciája alapján kötődik a DNS-hez.

A **promóter** egy **aszimmetrikus** (nem palindrom), duplaszálú DNS szakasz. Mivel aszimmetrikus, az RNS-polimeráz csak egy adott irányban képes hozzákötődni, tehát a promóter mintegy irányba állítja az enzimet. A polimeráz kötőhelyeként a promóter így nemcsak az RNS-lánc szintézisének kezdőpontját jelöli ki, de egyben **megszabja a lánc szintézisének az irányát** is, kijelölve azt is, hogy melyik DNS szál szolgál majd templát gyanánt a transzkripció során.

Vajon miért van ilyen sokféle σ-faktor a kólibaktériumban? Mint kiderült, az egyes **eltérő σ-faktorok eltérő promóter-típusok**hoz képesek kötődni (specificitási faktoroknak is hívják őket), és eltérő környezeti hatásokra termelődnek. Az eltérő élethelyzetekben termelődő σ-faktorok olyan gének transzkripcióját segítik elő, amely gének termékére éppen abban az élethelyzetben van szükség. Ezeknek a géneknek természetesen az adott σ-faktorral kompatibilis promóterük van.

A promóterek és σ-faktorok ilyen kölcsönös megfeleltetése egy elegáns alapszabályozást tesz lehetővé. Többek között ennek köszönhető, hogy nem íródik át egyszerre az összes gén, mindig csak azokról a génekről keletkezik RNS átirat, amelyekre éppen szükség van.

Az egyes σ-faktorok elnevezése a fehérje méretére utal. A **legtöbb gén promótere** olyan, amit a 70 kDa molekulatömegű **σ^{70} szigma faktor** ismer fel. Ezeket a géneket funkcionálisan az köti össze, hogy tipikusan akkor van szükség az általuk kódolt fehérjére, amikor a baktérium körülményei optimálisak. Ezeket a géneket a használati jellegük miatt „**háztartási**” (*housekeeping*) **gének**nek is nevezik.

Más σ faktorok például éhezés, túl magas hőmérséklet, vagy nitrogénhiányos környezet esetén termelődnek, és a σ^{70} faktorral versengve az RNS-polimerázért olyan gének átírását indítják el, amelyek az adott stressz-helyzetben hasznosak. A **σ^{32} faktor** például **magas hőmérséklet** esetén termelődik, és többek között a denaturált fehérjék feltekeredést segítő dajkafehérjék génjeinek átírását teszi lehetővé.

A σ faktorok természetesen csak egy elemi szintű szabályozást jelentenek, a gének jó része ezen felül egyéb, specifikusabb módon is szabályozódik (lásd **18.2. fejezet**).

Az egyéb szabályozásoktól egyelőre eltekintve a promóter és a megfelelő σ alegységgel ellátott **RNS-polimeráz kölcsönhatása** szabja meg a génátíródás általános intenzitását. Ennek kapcsán beszélünk **erős és gyenge promóterek**ről.

A promóterek pozícióit sorszámmal látják el. A **+1 pozíció** az **első RNS nukleotid beépítési helyé**t jelzi. Ettől a ponttól számítva a láncépítéssel, mint az információ folyásával megegyező irány, a „downstream” irány, míg az azzal ellentétes irány az „upstream” irány, mely utóbbi esetében az egyes pozíciók sorszámát negatív előjellel látják el. (Nulladik pozíciót tehát nem definiáltak).

Amikor olyan gének szekvenciáját hasonlították össze, amelyek átírását a σ^{70} faktorral ellátott RNS-polimeráz végzi, érdekes jellegzetességeket tártak fel (lásd **14.3. ábra**).

	UP „upstream” elem		–35 régió	távköz	–10 régió	távköz	RNS start
							+1
konszenzus szekvencia	NNAAA(AA–A / TT–T)TTTTNNAAAANNN	N	TTGACA	N_{17}	TATAAT	N_6	
*rrn*B P1	AGAAAATTATTTTAAATTTCCT	N	GTGTCA	N_{16}	TATAAT	N_8	A
trp			TTGACA	N_{17}	TTAACT	N_7	A
lac			TTTACA	N_{17}	TATGTT	N_6	A
recA			TTGATA	N_{16}	TATAAT	N_7	A
*ara*BAD			CTGACG	N_{18}	TACTGT	N_6	A

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

14.3. ábra: A σ^{70} faktorral ellátott RNS-polimeráz által felismert kóli promóterek sávos szerkezete

Színekkel kiemelve jól érzékeltethető, hogy az ilyen gének promóterei „sávos” szerkezetűek.

A +1 pozíciónak megfelelően egymás alá rendezett egyedi szekvenciák megmutatták, hogy a -10. nukleotid környéke **(-10-es promóter régió)**, más néven **Pribnow-box**), valamint a -35. nukleotid környéke (**-35-ös promóter régió**) nagyon hasonló minden olyan génnél, amelynek a promóterét a σ^{70} faktorral ellátott RNS-polimeráz ismeri fel.

A nagyon intenzíven átíródó gének esetén ezeken felül találtak még egy jellemző régiót, ami még „feljebb” található *upstream* (5’) irányban (**UP promóter elem**).

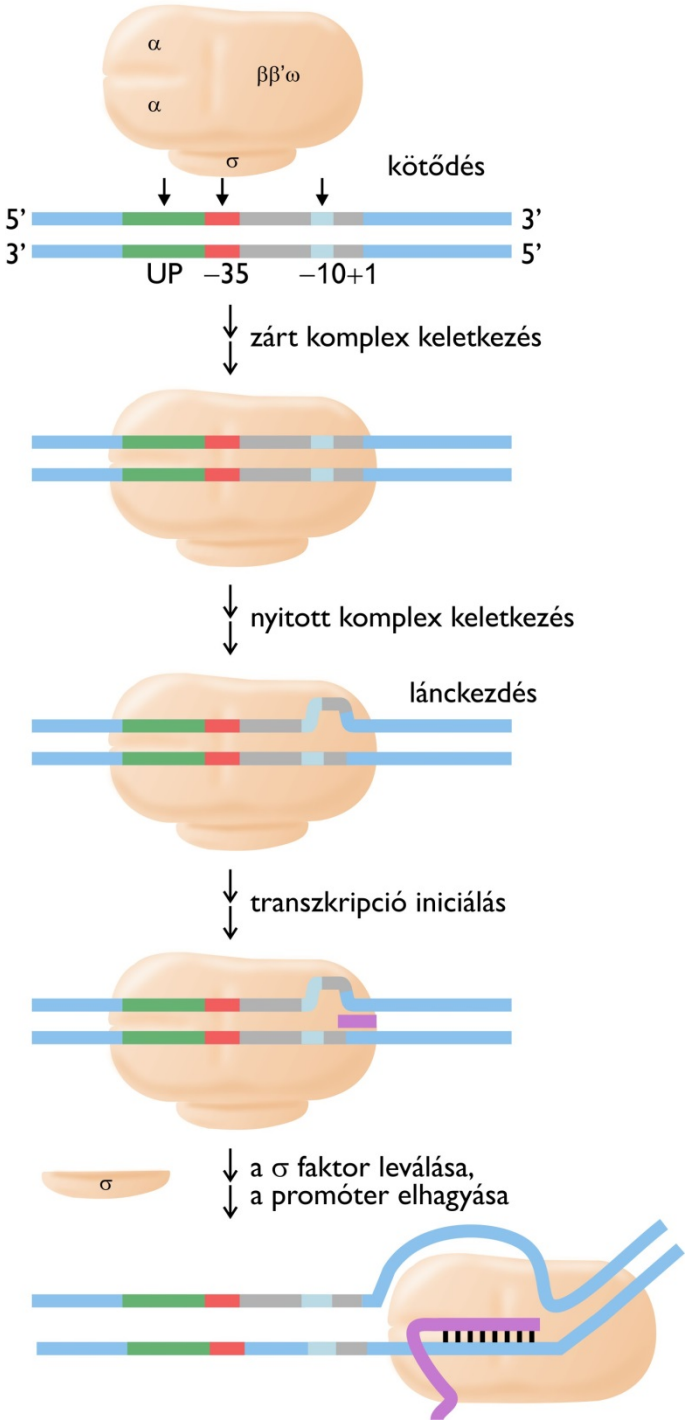
Ha egy adott szekvencia család esetében minden pozícióban felírjuk az adott családban az adott pozícióban leggyakrabban előforduló elemet, akkor megkapjuk a családra jellemző „**konszenzus szekvenciát**”. (Maga a konszenzus szekvencia nem feltétlenül jelenik meg egy adott konkrét családtagban.)

A promóterekkel kapcsolatos megfigyelés, hogy minél jobban hasonlít egy konkrét promóter szekvenciája a konszenzus szekvenciához, annál erősebb a promóter. A **14.3. ábrá**n szereplő egyik promóter például egy riboszómális RNS (rRNS) gén promótere. Az ilyen promóterek nagyon erős promóterek, és mint látható, az adott promóter szekvenciája valóban nagyon hasonlít a konszenzus szekvenciához.

A **14.4. ábra** azt is bemutatja, hogy mi magyarázza a promóter szekvencia sávos szerkezetét.

Ahogyan azt a **14.4. ábra** illusztrálja, a **-10-es** és a **-35-ös régiók** a **σ^{70} faktor** egyes részeivel lépnek **kölcsönhatás**ban, míg az „UP” régió az a alegységekhez kötődik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



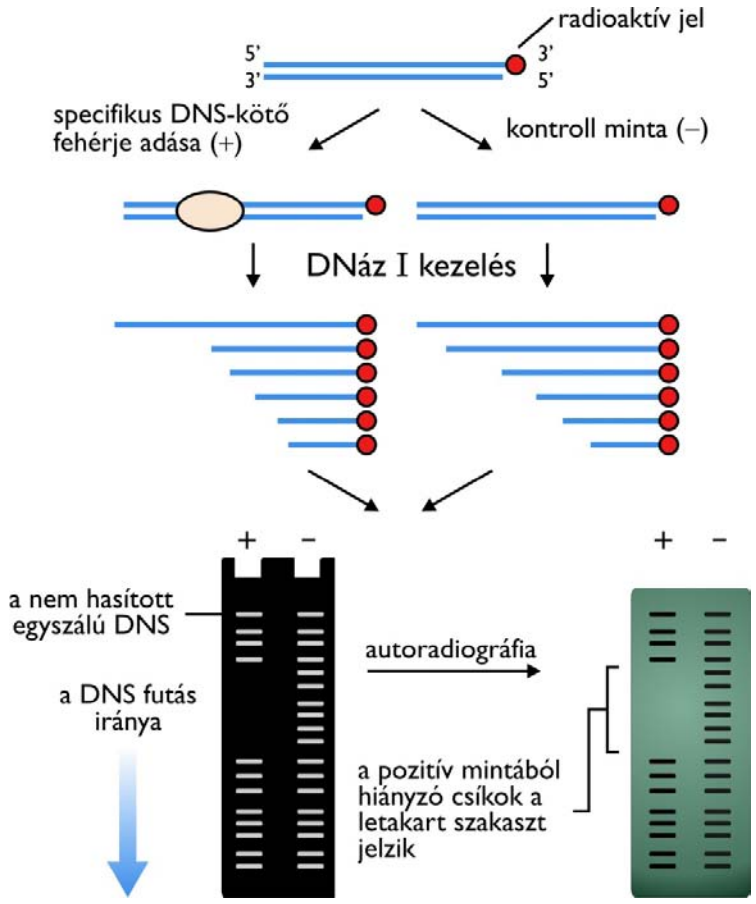
14.4. ábra: A prokarióta transzkripció iniciációs szakasza

De vajon hogyan lehetett meghatározni, hogy a promóternek mely részei kerülnek felismerésre az RNS-polimeráz által?

Ezt a „***footprinting***” („lábnyom analízis”) **eljárás** segítségével lehetett kideríteni az alábbiak szerint (lásd **14.5. ábra**).

A **footprinting** eljárás általános megközelítés szekvencia-specifikus **DNS-kötő (vagy RNS-kötő) fehérjék kötőhelyének feltérképezésére**. Az eljárás azon alapul, hogy a fehérje megvédi a hasadástól a nukleinsavon azt a részt, amit a kötődése révén letakar. A kísérletben egy homogén DNS oldattal indulunk, amely tehát egymással azonos szekvenciájú DNS darabokat tartalmaz. Ezek egyik végükön radioaktív jelet tartalmaznak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.5. ábra: A „footprinting" eljárással azonosítható, hogy a nukleinsav mely részéhez kötődnek a szekvencia-specifikus nukleinsav-kötő fehérjék

Az oldatot kettéosztjuk, az egyik fél a kezeletlen (-) kontroll lesz. A másikhoz DNS-kötő fehérjét keverünk. Ezután mindkét oldatot DNáz I enzimmel kezeljük. A DNáz-I enzim nagyjából véletlenszerűen, ezért egyenletes eloszlásban hasítja be az egyes DNS-eket.

A DNáz enzim / DNS arányt úgy állítjuk be, hogy DNS molekulánként átlagosan egyetlen hasadás történjen. A kezelés után a DNS darabokat izoláljuk, és denaturáljuk (a két szálat elválasztjuk egymástól). A mintát méret szerint elválasztjuk poliakrilamid gélelektroforézissel.

Csak a radioaktívan jelölt DNS-fragmentumokat detektáljuk. A kezelt mintából hiányzó csíkok azt a DNS szakaszt jelzik, amit a DNS-kötő fehérje letakart a DNáz-I-es emésztés alatt. A letakart szakasz mérete a gélelektroforézis alapján meghatározható.

Az RNS-polimeráz esetében a footprinting vizsgálat megállapította, hogy az enzim által lefedett két régió: a -10 és a -35 szakasz (amiket a σ^{70} alegység ismer fel), valamint az a alegységgel lefedett rész.

Ezek után tekintsük át az iniciáció fázisának történéseit. Az iniciáció maga is két fázisra bontható. Az egyik egy kétfázisú kötődés, a másik az elongáció megkezdéséhez szükséges konformációváltozás.

Első lépésben a σ-faktorral felszerelkezett RNS-polimeráz kötődik a σ-faktor típusának megfelelő promóterhez. A kötődés első terméke egy **RNS-polimeráz – zárt DNS komplex**. Ebben a komplexben a DNS két szála még nem válik el egymástól. Némi idő elteltével a kötődés hatására a DNS két lánca elválik, kialakul egy **RNS-polimeráz – nyitott DNS komplex**. Ebben a komplexben a DNS a promóter -10 régiójában nyílik fel, a felnyílás eléri a +3-as pozíciót, összesen mintegy **15 bázispár hosszan** nyílik szét a DNS. A nyitott komplexben a templát szál hozzáférhetővé válik a komplementer RNS szál szintézise számára.

A szorosabb értelemben vett iniciációs fázis is (legalább) két lépésből áll. A polimeráz konformációváltozáson megy át, a DNS jellegzetesen megtörik, a polimeráz beépíti az első néhány nukleotidot.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

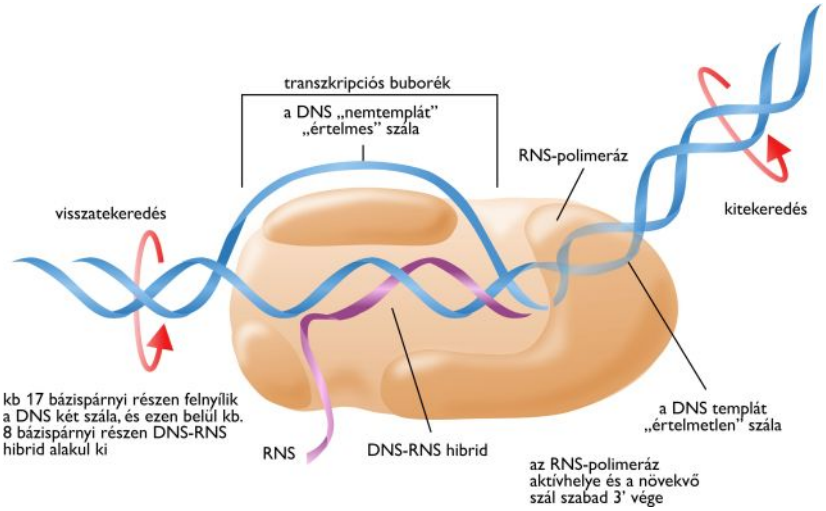
A második fázisban a polimeráz a szintézis folytatásával elhagyja a promóter területét, a **σ-faktor leválik**, ezzel az **elongációs fázis elkezdődhet**.

14.3. A transzkripció elongációs fázisa

Az elongáció során a leváló **σ-faktort** a **NusA** fehérje **helyettesíti**. Az elongáció mechanizmusának alapjait is a kóli RNS-polimeráz enzimének vizsgálata szolgáltatta, de az alapmechanizmus az eukarióta RNS-polimerázokra is érvényes.

Az elongáció során az RNS-polimeráz monomerenként lépdel a templát mentén (tehát az RNS-polimeráz egy motorfehérje), és Watson-Crick bázispárosodás alapján építi be a megfelelő monomer egységeket. Az elongációs fázisban működő komplexben mintegy **17 bázispárnyi** részen felnyílik a DNS két szála (ez a **transzkripciós buborék**), és ezen belül mintegy **8 bázispárnyi** részen **DNS−RNS hibrid** alakul ki.

A transzkripció során hasonló **topológiai problémák** merülnek fel, mint a replikációnál (lásd **14.6. ábra**).

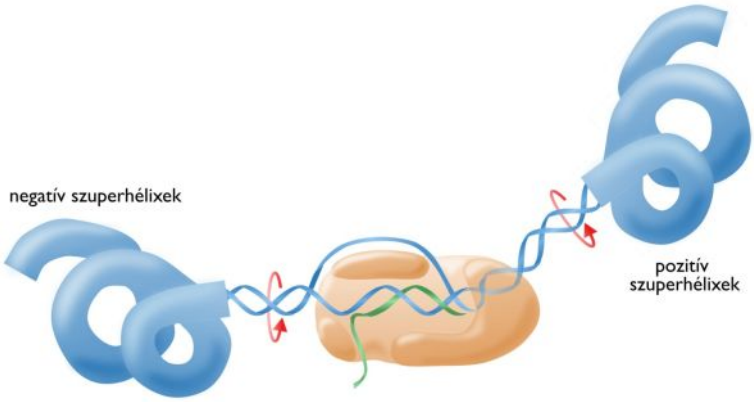


14.6. ábra: A transzkripció elongációs fázisa

Amennyiben az RNS-polimeráz a DNS spirált követve, pörögve haladna, akkor nem okozna feszültséget a DNS szerkezetében, de az így keletkező RNS szál a DNS szálak köré tekeredne. Igen hosszú időbe telne, amíg arról letekeredve szabaddá válna. Ennek a mechanizmusnak ellentmondtak azok az ismeretek, miszerint prokariótáknál a keletkező mRNS-hez még a szintézise befejeződése, és leválása előtt riboszómák kötődnek. Ez csak akkor lehet, ha az RNS nem a DNS köré tekeredve, hanem a DNS mellett egyenes állapotban, arról lelógva keletkezik.

Ez a megfigyelés viszont azt jelentette, hogy ebben az esetben a **DNS-nek kell tekerednie**, ami **topoizomerázok segítségé**t igényli. Ha az RNS-polimeráz nem pörögve, hanem egyenesen halad a DNS-en, akkor „downstream" irányban a DNS-ben menetsűrűség növekedést okozna, ami pozitív szuperhélixekhez vezetne (lásd **14.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.7. ábra: A transzkripciót kísérő topológiai problémák

Ehhez hasonló helyzetet már láttunk a replikáció során, ahol a DNS szálak szétnyílása okozna ilyen helyzetet. Ahogyan a replikáció esetében, úgy a transzkripció során sem keletkeznek végül pozitív szuperhélixek. Ezt a topoizomeráz II biztosítja azzal, hogy (ebben az esetben) a**z RNS-polimeráz előtt** haladva folyamatosan **negatív szuperhélixeket képez**. Ez lehetővé teszi az RNS-polimeráz egyenes vonalú haladását. A replikáció során a két DNS szál véglegesen elvált egymástól, és a kétféle szuperhélix kioltotta egymást. A transzkripció során azonban a két DNS szál újra összezárul, így a topoizomeráz-II által létrehozott negatív szuperhélixek megmaradnának, hatalmas szerkezeti feszültséget létrehozva a DNS-ben. A polimeráz tovahaladását követően ezeket a negatív szuperhélixeket meg kell szüntetni. Ezt e feladatot az **RNS-polimeráz mögött** működő **topoizomeráz I** enzim végzi el.

Az DNS replikáció során láthattuk, hogy léteznek kis processzivitású DNS-polimerázok is. A replikáció során a DNS két szálát stabilan szétválasztják különböző enzimek és segédfehérjék (DNS-helikáz, SSB fehérje). A DNS két szála annak ellenére is nyitva maradhat, hogy a DNS-polimeráz levált, így van rá mód, hogy egy DNS-polimeráz újra kötődjön, és folytatódhasson a megszakított szintézis.

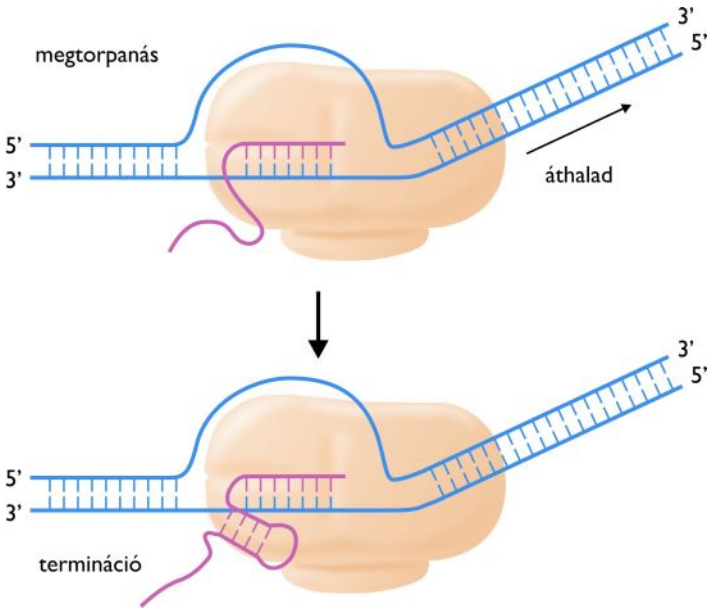
A transzkripció során erre nincs lehetőség. A transzkripció során a DNS két szálát a polimeráz csak ott nyitja fel, ahol kötődik hozzá. Amint az RNS-polimeráz leválik, a DNS két szála összezárul, és mintegy kitúrja magából a templát szálhoz ideiglenesen kötődő RNS szakaszt. A félbeszakadt transzkripció tehát csonka RNS termékhez vezetne. Az RNS-polimeráz amúgy is csak σ-alegységgel ellátva, és csak a promóterhez tud kötődni. Ebből két fontos dolog is következik: Az egyik, hogy az **RNS-polimerázok**nak **nagy processzivitás**sal kell rendelkezniük. A másik, hogy a **transzkripció befejezése szabályozott folyamat** kell, hogy legyen.

14.4. A transzkripció terminációs fázisa

A transzkripció végét jelző szignál a DNS szekvenciájába van kódolva, de a termelődő RNS termékben jelenik meg a szekvencia által diktált térszerkezeti jelként.

A gén végét prokariótáknál **kétféle terminációs szignál** jelezheti. Az egyik működéséhez egy fehérje faktor is kell. **Mindkét típus**ban olyan DNS-szekvencia íródik át a keletkező **RNS láncba**, amely egy **hajtű szerkezet**et alakít ki az RNS-ben egy palindrom szekvencia miatt (lásd **14.8. ábra**). Az RNS hajtű szerkezetében a lánc két része antiparallel lefutású, a hajtű szárában Watson-Crick bázispárok alakulnak ki.

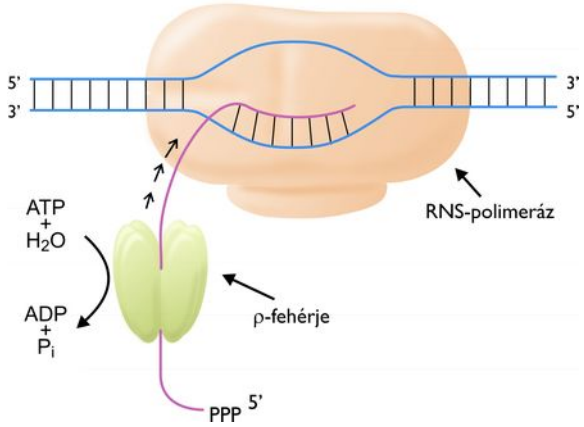
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.8. ábra: A prokarióta transzkripció terminációját a hajtűszerű szerkezetű RNS termék indukálja

Az **egyik** terminációs **típus**ban a kialakuló **RNS-hajtű a Rho (r) fehérje felismerő helye**. Amennyiben egy ilyen hajtű keletkezik az RNS-ben, és jelen van a Rho fehérje, akkor a Rho fehérje kötődése során az RNS-polimeráz leválik, a transzkripció befejeződik. Amennyiben nincs jelen a Rho, az RNS-polimeráz egy kis időre megtorpan, de egy idő után továbbhalad. A Rho fehérje egy ATP-igényes folyamatban halad a keletkező RNS-en (lásd **14.9. ábra**). Ha elérkezik az RNS-hajtűhöz, leállítja a szintézist.

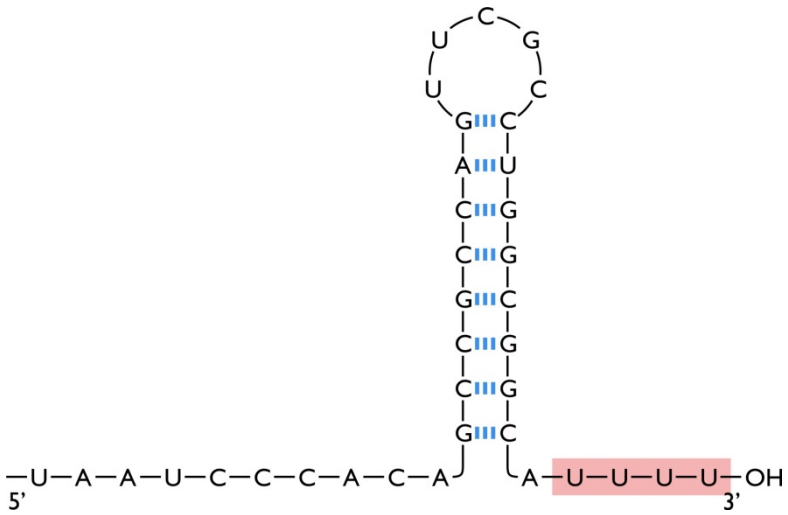
A **másik** terminációs szignál is hajtűt képez a szintetizálódó RNS szálban, de ennek működéséhez nem Rho fehérje kell (**Rho-független transzkripció termináció**), hanem az, hogy **a hajtűt kódoló DNS szakaszt követően a DNS-ben 3-4 adenozin egység következzen**, aminek megfelelően az RNS-be három-négy uridin egység épül be.



14.9. ábra: A prokarióta transzkripció egyik, Rho fehérjét igénylő mechanizmusa. A Rho fehérje ATP-igényes folyamatban 5'→3' irányban halad az RNS-en, és amikor felismeri a terminációs szignált, leállítja a transzkripciót

E nélkül a szakasz nélkül a hajtűképzés önmagában itt is csak megtorpanást okoz. Ha azonban a hajtű mögött az RNS-ben megtalálható legalább három U, akkor a gyenge A:U hibridizáció miatt a hajtű és az A:U szerkezet együtt már az enzim leválásához vezet, és ezáltal terminációt okoz (lásd **14.10. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

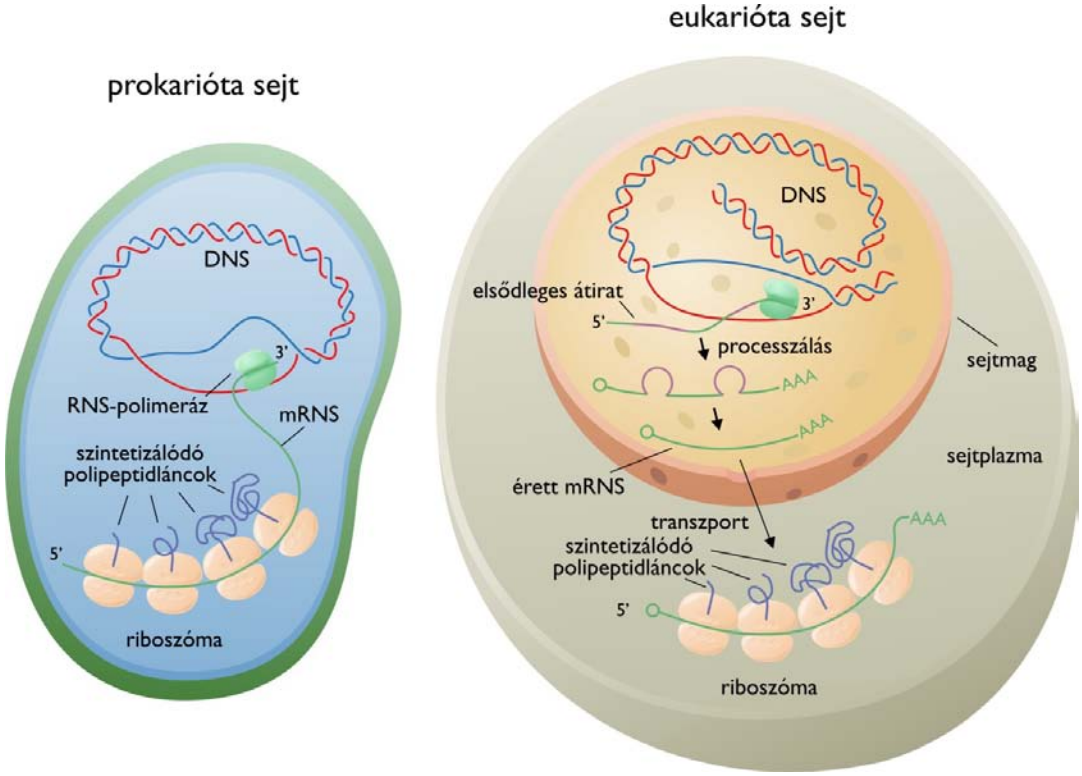


14.10. ábra: Egy Rho fehérje független terminációs szignál az RNS-ben

A termináció során az mRNS és a polimeráz leválnak a DNS-ről, és a DNS két szála újra összezárul.

14.5. A prokarióta és eukarióta transzkripció összevetése

A **prokariótákban** az éppen keletkező mRNS máris végleges formának számít, és azonnal részt is vesz a transzlációban (**a transzkripció és a transzláció kapcsolt**). Az **eukarióták** mRNS-e ezzel szemben egy elsődleges átirat, **pre-RNS** (hívják naszcens vagy heteronukleáris, hnRNS-nek is) formájában keletkezik a sejtmagban, és egy sor fontos átalakuláson, **processzálás**on megy keresztül, mielőtt érett mRNS-ként a sejtplazmába szállítódik (lásd később) (lásd **14.11. ábra**).



14.11. ábra: A prokarióta és eukarióta transzkripció összehasonlítása

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az eukariótákban legalább **háromféle RNS-polimeráz** működik (RNS-polimeráz I, II, III), külön a riboszómális rRNS, hírvivő mRNS és a szállító tRNS-ek számára. Ezek alaptulajdonságait a **14.2. táblázat** foglalja össze.

14.2. táblázat: Eukarióta RNS-polimerázok

Típus	Elhelyezkedés	Szintetizált termékek	α-amanitin hatása az enzimre
I	nukleólusz	18S, 5,8S és 28S rRNS	nem gátolja
II	nukleoplazma	mRNS előterméke, és kis magi RNS-ek	erősen gátolja
III	nukleoplazma	tRNS-ek és az 5S rRNS	magas koncentrációban gátolja

Arra, hogy egynél többféle RNS-polimeráz működik az eukarióta sejtekben a gyilkos galóca méreganyaga, az **α-amanitin** vizsgálata kapcsán derült fény. Ez a méreg alacsony koncentrációban leállította az mRNS-ek és a kis magi RNS-ek szintézisét, miközben az összes többi RNS tovább keletkezett. Ez jelezte, hogy legalább kétféle RNS-polimeráz működik a sejtben. Magasabb koncentrációban alkalmazva az α-amanitint az előző RNS-eken felül a transzfer RNS-ek és az 5S riboszómális RNS keletkezése is leállt, míg a riboszómális RNS keletkezése folytatódott. Ez jelezte, hogy legalább három eltérő RNS-polimeráz van a sejtben. Az egyik nagy affinitással (alacsony disszociációs állandóval) köti az α-amanitint, a másik alacsony affinitással köti, a harmadik nem köti. Ez a kísérlet ragyogó példa arra, hogyan lehet egy komplex rendszerben működő alrendszerek létét szelektív gátlószerekkel feltárni. Hasonló elven ismerték fel egyes hormonok esetében, hogy többféle rokon receptoron keresztül hatnak.

A **14.2. táblázat** alapján látható, a **legtöbb eukarióta gént az RNS-polimeráz II** enzim **írja át**. Mielőtt az RNS-polimeráz II működését részleteiben áttekintenénk, nagy általánosságban vizsgáljuk meg a prokarióta és az eukarióta mRNS-ek keletkezésének szabályozását, a kétféle szabályozás fő eltéréseit.

14.5.1. Fő különbségek a prokarióta és az eukarióta mRNS keletkezésének szabályozásában

A prokarióták egyetlen RNS-polimeráza a megfelelő σ-alegységgel ellátva tökéletesen aktív, képes a megfelelő promóterekhez kötődve elindítani, és elvégezni a transzkripció folyamatát.

Amint azt a Génexpresszió szabályozása fejezetben tárgyaljuk majd (lásd **18.2. fejezet**), a prokarióták esetében emiatt a legtöbb szabályozott gén promóteréhez valamilyen specifikus **represszor fehérje** kötődik, megakadályozva a transzkripciót, azaz a **gének kikapcsolt állapotban** vannak.

A **prokarióta mRNS-ek zömepolicisztronos**, ami azt jelenti, hogy az mRNS egyszerre több fehérje információját kódolja. Ezek a fehérjék rendszerint ugyanabban a folyamatban vesznek részt, tehát funkcionális egységet alkotnak. A prokarióta transzkripció szabályozása során tehát egy-egy represszor több fehérje keletkezésének egyidejű szabályozását végzi (lásd a **18.2. fejezet**ben ismertetett operon-modellt).

Ahhoz, hogy a σ-alegységgel ellátott RNS-polimeráz átírja a fehérjék génjét, meg kell szüntetni a represszió hatást. Mivel a prokarióta gének száma viszonylag alacsony, és mivel a prokarióta mRNS-ek zöme policisztronos, viszonylag kevés represszor fehérje elegendő ehhez a sémához.

Az eukarióták esetében éppen ellentétes a helyzet. Az **eukarióta mRNS-ek monocisztronosak**, tehát ahány fehérje termék van, annyi mRNS kell, hogy keletkezzen. Belátható, hogy egy ilyen rendszerben hatalmas számú represszor fehérjére lenne szükség. Ráadásul a többsejtű eukarióták működésének a szabályozása jóval összetettebb, 1-1 nem kellően represszált gén óriási problémákat okozhatna.

Ennek megfelelően az eukarióta transzkripció szabályozása alapvetően nem az „aktív enzim – sok represszor” sémán alapul. Az **eukarióta RNS-polimeráz önmagában** praktikusan **inaktív** (nem tud kötődni a promóterhez). A prokarióta σ-faktor helyett **általános transzkripciós faktor** (*general transciption factor*, GTF) **fehérjék** serege kell a preiniciációs komplex létrejöttéhez.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ugyanakkor még ez a hatalmas, a riboszóma méretét is meghaladó komplex is csak nagyon ritkán képes önmagában elindítani a transzkripciót. Az **alapszintű, „bazális" transzkripció szintje alacsony**. A megfelelő szintű transzkripcióhoz a preiniciációs komplexet aktiválni kell. Az **aktiválást fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül transzkripciós faktorok, aktivátorok** végzik.

A transzkripciós aktivátorok elsősorban egy hatalmas fehérje komplexen, a **Mediátoron** keresztül kommunikálnak az RNS-polimeráz II enzimmel. Ez a Mediátor-komplex közvetlenül kötődik a preiniciációs komplexhez, és közvetíti az aktivátorok (és represszorok) hatását.

Az eddig feltárt működési mechanizmusok már képesek magyarázatot adni arra, hogyan lehetséges, hogy egy többsejtű szervezet különböző sejtjeiben szövetspecifikus, illetve fejlődési fázis specifikus módon eltérő gének transzkripciója valósul meg annak ellenére, hogy minden sejt (leszámítva az immunrendszer egyes speciális sejtjeit) tökéletesen azonos genommal rendelkezik.

Ugyanakkor a részletek tekintetében még ma is rengeteg a nyitott kérdés, az eukarióta transzkripció pontos mechanizmusának, és szabályozásának feltárása a mai napig intenzíven kutatott terület.

14.6. Az eukarióta RNS-polimeráz II működése

Az eukarióta polimeráz II enzim szerkezetének és működésének feltárása legnagyobbrészt **Roger Kornberg** nevéhez fűződik. Roger Kornberg, Arthur Kornberg fia az eukarióta transzkripció mechanizmusának, a benne szereplő fehérjék, többek között a Mediátor komplex (lásd később) működésének feltárásáért 2006-ban kémiai Nobel-díjat kapott.

14.6.1. Az eukarióta RNS-polimeráz II és a preiniciációs komplex

Az eukarióták esetében a **transzkripció kezdőpont**jának környékén található szekvenciák analízise alapján csak két majdnem mindig jelen lévő elemet lehet kiemelni: a lánckezdés körüli néhány nukleotidnyi **iniciációs régiót** (**Inr**) és az attól „upstream" irányban **-30 körüli TATA-box** területet. A TATA-box elnevezés ennek a területnek a konszenzus szekvenciája (TATAAA) alapján történt. Valójában még ez a TATA-box sincs meg minden RNS-polimeráz II által átírt gén elején.

A **14.3. táblázat** foglalja össze az eukarióta RNS-polimeráz II enzim, valamint a preiniciációs komplex összetételét.

14.3. táblázat: Az eukarióta RNS-polimeráz II enzim és a preiniciációs komplex összetétele

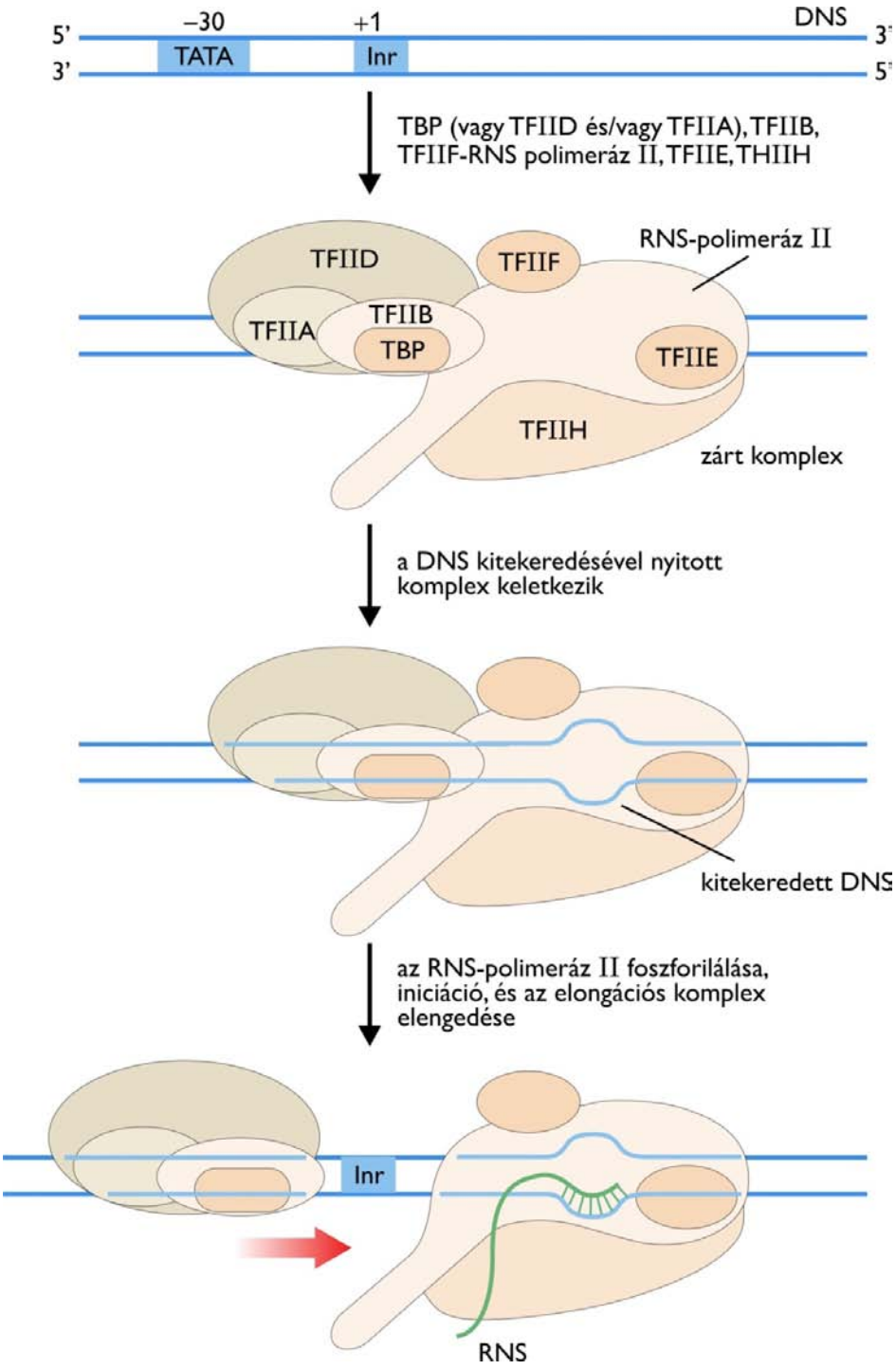
Transzkripciós faktor	Alegységek száma	Alegységek molekulatömege	Funkció
Iniciálás			
RNS polimeráz II	12	10 000-222 000	RNS szintézis katalízise
TBP (TATA kötő fehérje)	1	38 000	TATA szekvencia kötés
TFIIA	3	12 000, 19 000, 35 000	TBP és TFIIB kötés stabilizálása
TFIIB	1	35 000	TBP-hez köt és felkapcsolja az RNS pol-TFIIF-komplexet
TFIID	12	15 000-250 000	pozitív és negatív szabályzó fehérjék kötőhelye
TFIIE	2	34 000-57 000	ATPáz és helikáz, felkapcsolja a TFIIH-t
TFIIF	2	30 000-74 000	erősen köti az RNS polimerázt, gátolja annak nem-specifikus DNS-kötését
TFIIH	12	35 000-89 000	kitekeri a DNS-t a promóternél, foszforilálja at RNS polimerázt
Elongáció			
ELL	1	80 000	
P-TEFb	2	43 000-124 000	
SII (TFIIS)	1	38 000	
Elongin (SIII)	3	15 000, 18 000, 110 000	

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A preiniciációs komplexben résztvevő komponensek szerepének feltárását bonyolítja, hogy az *in vitro* és az *in vivo* kísérletek eredményei nincsenek mindig egymással összhangban.

In vitro kimutatható volt, hogy mi elegendő egy alap transzkripciós aktivitás eléréséhez, és az is kiderült, hogy az egyes fehérje komponenseket milyen sorrendben kell az oldatba vinni, hogy összeálljon a preiniciációs komplex. Ugyanakkor az *in vivo* összeszerelődés nem feltétlenül ezt a sorrendet követi, és *in vivo* gyakran olyan komponensek is elengedhetetlennek mutatkoztak, amelyek *in vitro* nem kellenek.

Nézzük meg ezek alapján, hogy a mai ismeretek szerint hogyan szerelődik össze az eukarióta RNS-polimeráz II enzimet tartalmazó preiniciációs komplex *in vitro* illetve *in vivo* (lásd **14.12. ábra**).



14.12. ábra: Az eukarióta transzkripció preiniciációs komplexének összeszerelődése

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

In vitro, és olyan DNS esetében, amelyen van TATA box, **először** a **TBP (*TATA-binding protein*) kötődik**. Ez a fehérje a kis árkon keresztül köti a DNS-t, és jelentős mértékben meghajlítja azt.

In vivo a TBP nem önmagában, hanem **komplexben** található a hozzá kötődő fehérjékkel (TBP *Associated Factors*, TAFs) együtt. Az *in vivo* komplex neve **TFIID**, amely tehát a TBP fehérjéit és a TAF fehérjéket tartalmazza. A TFIID a legnagyobb méretű általános transzkripciós faktor. *In vivo* adatok alapján először a TFIID (melynek egyik alegysége a TBP) kötődik a promóterhez a **TFIIA** fehérjével együtt. Ezek jelenléte különösen azoknál a promótereknél fontos, amelyek nem tartalmaznak TATA-box szakaszt. Ilyenkor a TATA-box DNS részét egyes TAF fehérjék helyettesítik. A TFIIA a TBP-hez kötődve erősíti a TBP TATA-box kötését. A TFIIA egyik *in vivo* szerepe az lehet, hogy megakadályozza egyes gátló fehérjék TBP-kötését. *In vitro* vizsgálatokban ez utóbbi funkció nem kell, ezért *in vitro* a TFIIA nem esszenciális.

A TBP (vagy TFIID és TFIIA) után a **TFIIB** kötődik. A TFIIB fő szerepe az, hogy szekvenciaspecifikus DNS felismerés révén megkeresse a transzkripció kezdőpontját a DNS-en. A TFIIB szerepe analóg a prokarióta RNS-polimeráz σ-alegységével.

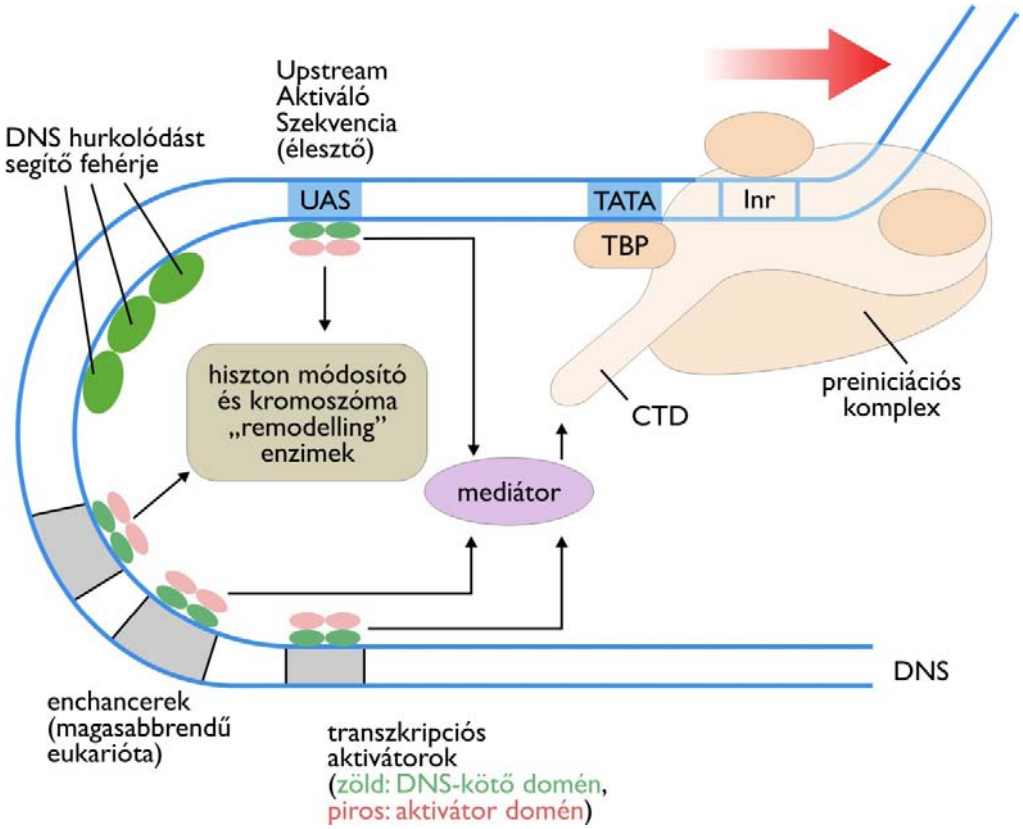
Az eddig összeszerelődött komplex részben a TFIIB révén irányítja a polimerázt megfelelő orientációban a DNS-hez. Az **RNS-polimeráz II a TFIIF általános transzkripciós faktorral komplexben** érkezik. A TFIIF erősen köti az RNS-polimerázt, és gátolja annak nem-specifikus DNS-kötését.

A legtöbb gén átírásához két további általános transzkripciós faktor jelenléte szükséges.

Ezek közül először a **TFIIE** kötődik, amely megteremti a **TFIIH** számára a kötőhelyet. A **TFIIH helikáz és kináz aktivitás**sal is rendelkezik. Egyrészt ATP bontása révén széttekeri a DNS két szálát a start hely környékén, másrészt protein-kináz aktivitásával specifikusan **foszforilálja az RNS-polimeráz II C-terminális doménjét (CTD)**. A **CTD foszforilálása** elengedhetetlen a transzkripció elindulásához.

Az RNS-polimeráz ebben a preiniciációs komplexben, kis aktivitással ugyan, de már el tudja kezdeni az RNS szintézist. Miközben elindul a DNS-en, a CTD részére a TFIIH egyre több foszfátcsoportot kapcsol. A **preiniciációs komplex szétesik**, a polimeráz az **elongációs fázisba léphet**.

A hatékony transzkripcióhoz a preiniciációs komplexet aktiválni kell (lásd **14.13. ábra**).



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

14.13. ábra: Az eukarióta preiniciációs komplex aktiválásának leegyszerűsített modellje

A promóteren kívül, attól akár hatalmas távolságban jelen lehetnek **enhanszer** (*enhancer*) **DNS szekvenciák** (élesztőben UAS: *upstream activating sequence*), amelyekhez specifikus transzkripciós aktivátor fehérjék kötődnek és a Mediátor komplexen keresztül aktiválják a transzkripciót. Miközben fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül az enhanszer fizikai közelségbe kerül a promóterrel, a köztük levő DNS szakasz hurkot kell, hogy képezzen. Ezt speciális DNS hajlító HMG fehérjék (HMG: *high mobility group*) segítik.

A legalább 31 alegységből álló **Mediátor-komplex** (tömege >1000 kDa) egyfajta integrációs központnak tekinthető. Ez a komplex fogadja és integrálja a preiniciációs komplex számára a negatív és pozitív jeleket.

A gén átírásának intenzitása végső soron ezeknek a kapcsolatoknak az integrált eredményén múlik. A Mediátor-komplexen keresztül kommunikáló transzkripciós aktivátorokon kívül az eukarióta DNS magasabbrendű szerkezetét is módosítani kell. A nukleoszómás szerkezetet ugyanis fel kell lazítani. Erre szolgálnak a hiszton módosító és remodelling enzimek (további részleteket lásd a **18.3. fejezet**ben).

Az eukarióta RNS-polimeráz I és -III enzimek preiniciációs komplexének kialakulása az RNS-polimeráz II esetében látottakhoz hasonlóan zajlik, de az egyes polimerázok esetében a komplexeket eltérő fehérjék alkotják.

Érdemes megjegyezni, hogy amint az RNS-polimeráz II létrehozta az RNS 5'-végét, elkezdődik az eukarióta mRNS-ekre jellemző „sapka" szintézise (lásd később). Amikor pedig a polimeráz CTD része foszforilálódik, akkor ide kötődnek azok a fehérjék, melyek az érett mRNS poliA végének kialakulásában vesznek részt.

Az eukarióta RNS-polimerázok is rendkívül nagy processzivitású enzimek, az elongációs fázis ezért ezek esetében is kevéssé szabályozott. Az eukarióta transzkripció terminációjának szabályozása egyelőre kevésbé ismert, mint a prokariótáké. A jelek szerint az RNS-polimeráz II esetében a folyamatban részt vesz az a komplex, amely az érett mRNS-ek poliA végét készíti el (lásd az eukarióta elsődleges átirat processzálásánál).

Az eukarióta preiniciációs komplex kialakulását és az RNS-polimeráz működését közel valós időben a **8. animáció** mutatja be.

Érdekességként megjegyezzük, hogy a legújabb ismeretek arra utalnak, hogy az eukarióta RNS-polimeráz II esetében működik egy, a DNS-polimerázok 3'→5' korrektor funkciójával analóg hibajavítás. Ennek hatékonysága messze elmarad a DNS-polimerázokétól, és mechanizmusának részletei sem ismertek.

14.7. Transzkripció gátlószerei

Mint láttuk, a transzkripció egy összetett folyamat, amelyet számos eltérő módon lehet gátolni. Igen tanulságos áttekinteni, hogy milyen lépéseknél gátolható ez a folyamat (lásd **14.14. ábra**).

Az egyik kézenfekvő megoldás az **RNS-polimeráz enzim gátlása**. A bakteriális RNS-polimerázok, valamint az egyes eukarióta RNS-polimerázok elegendő mértékben eltérnek egymástól ahhoz, hogy szelektív inhibitoraik létezzenek. Számos ilyen természetes inhibitort ismerünk.

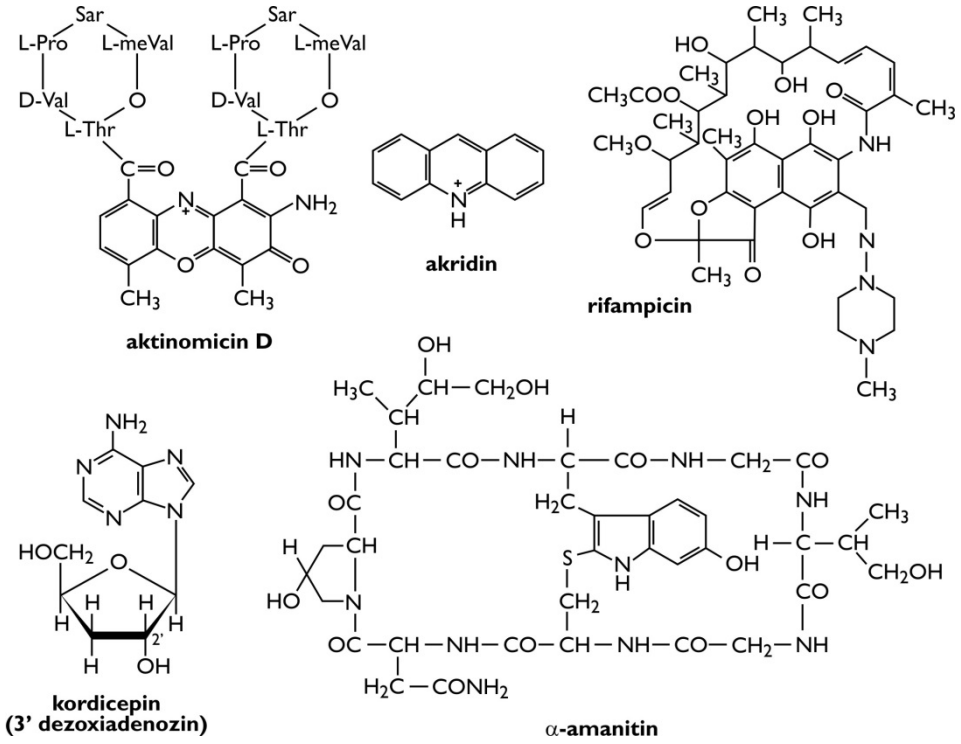
A **rifampicin** egy természetes vegyület szemiszintetikus analógja, amelyik a prokarióta RNS-polimerázokat gátolja, míg az eukarióta enzimeket nem. A rifampicint emiatt sikeresen alkalmazzák **antibiotikum**ként.

Az **a-amanitin** a gyilkos galóca mérge, és mint azt már említettük, az **eukarióta RNS-polimeráz II** enzimet alacsony koncentrációban, az RNS-polimeráz III enzimet pedig magasabb koncentrációban gátolja. Az a-amanitin révén derült fény arra, hogy eukariótáknál legalább 3 eltérő RNS-polimeráz működik.

Az enzim szelektív gátlásán kívül léteznek úgynevezett **mechanizmus alapú inhibitorok** is, melyekre egy különlegesen szép példa a **kordicepin** (3'-dezoxiadenozin). A kordicepin 5'-trifoszfát formáját az RNS-polimeráz normális szubsztrátként ismeri fel. A molekula nem az enzimet gátolja, hanem magát a folyamatot. Az enzim segítségével beépül az RNS láncba, de mivel hiányzik a 3'-OH csoportja, a soron következő nukleozid-trifoszfát már nem tud vele foszfodiészter kötést létrehozni, így a beépült kordicepin lánczáródást okoz. A szerkezetének ismeretében ez a hatás volt az egyik bizonyítéka annak, hogy az RNS lánc szintézise (a DNS-éhez hasonlóan) 5'→3' irányban zajlik. A DNS-szekvenálás Sanger-féle módszere ezzel analóg szerkezetű, dideoxi-nukleozid-trifoszfát vegyületeken alapul (lásd **19.5.1. fejezet**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A transzkripció gátlásának egy további módja a templátként használt DNS támadásán alapul. Így működik az akridin, és hozzá hasonlóan mindazok a vegyületek, amelyek a DNS két lánca közé ékelődve gátolják a két lánc szétválását. Ezek a szerek természetesen nem csak a transzkripciót, de a replikációt is gátolják minden élőlényben.



14.14. ábra: A transzkripció egyes jellegzetes gátlószerei

14.8. Az eukarióta gének mozaikos felépítése

A genetikai információ áramlásával kapcsolatos kutatások kezdetben elsősorban az egyszerűbb, prokarióta rendszerek működésére fókuszáltak. Az 1970-es évek elejére az alapok tekintetében minden tisztázódni látszott. Ismertté vált a replikáció, a transzkripció és a transzláció alapfolyamata, és megfejtették a genetikai kódot, amely segítségével a fehérjék szekvenciáját a megfelelő gén DNS szekvenciaként kódolja. Mindenki számára világos volt, hogy az mRNS a DNS-ben lévő gén tökéletes átirata.

Mindezek után hatalmas megrázkódtatást okozott annak felismerése, hogy az **eukarióta gének zöme** nem egyetlen folyamatos „szövegként”, hanem **darabokban hordozza a fehérjékre vonatkozó információt**. Az eukarióta gének „megszakított szerkezetűek” az „értelmes” szakaszokat adott esetben hatalmas méretű „értelmetlen” szakaszok választják el.

Ezt elsőként 1977-ben egymástól függetlenül két kutató, Richard Roberts és Phillip Sharp is felismerte. Mindketten a közönséges megfázásért felelős adenovírus működését vizsgálták. Az eukarióta sejteket fertőző vírusoknak az eukarióta gazdasejt molekuláris működéseit kell felhasználniuk, így logikus és sikeres kutatási irányzat volt ilyen vírusokat vizsgálni az eukarióta rendszerek megértése érdekében. A két kutató azt vette észre, hogy a vírus által kódolt mRNS-ek együttes mérete lényegesen kisebb, mint a vírus DNS genomja. Amikor az mRNS-t és a denaturált vírus DNS-t hibridizálták egymással, kiderült, hogy az RNS-DNS hibridek keletkezésekor nagyméretű DNS szakaszok kihurkolódnak, jelezve, hogy azok komplementer szekvenciája nincs jelen az mRNS-ben. Richard Roberts és Phillip Sharp ezekkel a kísérletekkel felfedezték az eukarióta gének mozaikos, intron-exon szerkezetét, amiért 1993-ban orvosi Nobel-díjat kaptak.

Az **mRNS-ből hiányzó**, csak a génben megtalálható **részek**et, és az ezeket kódoló DNS szakaszokat Walter Gilbert **intronoknak** (intragenikus részeknek), az **mRNS-be bekerülő szakaszok**at, illetve a DNS-ben az ezeket kódoló részeket pedig **exonok**nak nevezte el.

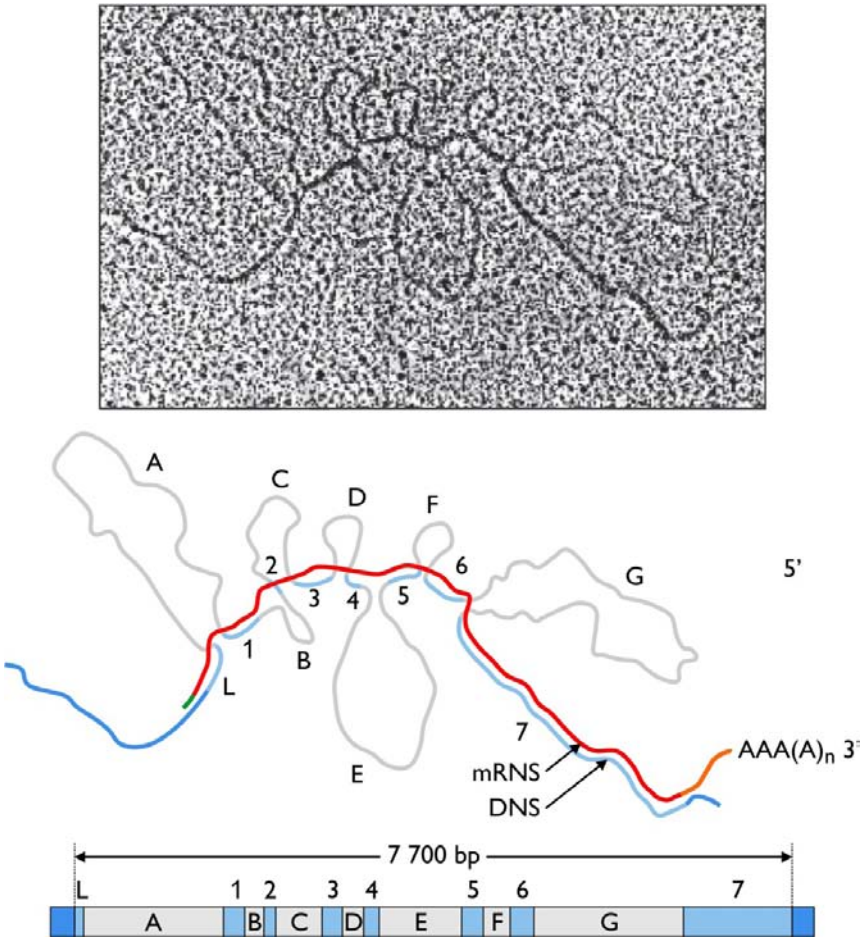
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Eleinte nem volt világos, milyen mechanizmus áll a háttérben. Kétféle elvi magyarázat létezett. Az egyik szerint a transzkripció során a DNS intron szakaszai kihurkolódnak, ezért nem kerülnek lemásolásra. A másik elképzelés szerint a teljes szekvencia másolásra kerül, majd az intronok kivágódnak az RNS-ből.

Ez utóbbi modell bizonyult helytállónak. A gén transzkripciója során még mind az exon, mind az intron átíródik, ezek információja tehát még maradéktalanul belekerül az éretlen mRNS-be, az elsődleges átiratba (pre-mRNS: *precursor mRNA*). Az érett mRNS azonban már csak az exonoknak megfelelő részeket tartalmazza, az intronok kivágásra kerülnek.

Annak a mechanizmusnak, amely az elsődleges átiratból kivágja az intronokat, miközben összekapcsolja az egymást követő exonokat, a „***splicing***” elnevezést adták. Ez az angol kifejezés lineáris struktúrák elvágását, majd egyes darabok újra összeillesztését jelenti, pontos magyar megfelelője sajnos nincsen.

A splicing tényét igazoló mRNS-DNS hibridizálást számtalan, nem virális eukarióta DNS esetében megismételték, és a jelenség általánosnak bizonyult. A **14.15. ábra** az ovalbumin génnel kapcsolatos kísérletek eredményeit illusztrálja.

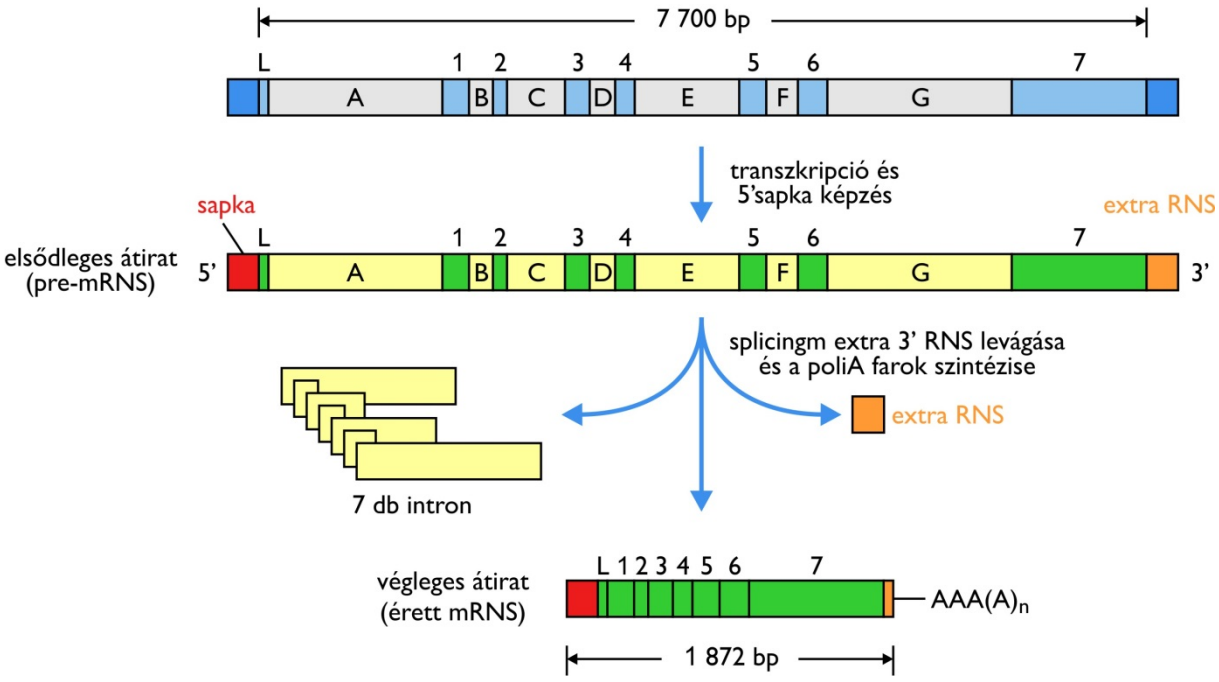


14.15. ábra: Hibridizációs technikákkal vizualizálható, hogy az érett ovalbumin mRNS nem tartalmazza a teljes ovalbumin gén információját

Az ovalbumin a tojás egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjéje, így jogosan feltételezték, hogy az ovalbumin mRNS is nagy mennyiségben izolálható. Az ovalbumin gén DNS-ének két szálát hődenaturálással elválasztották egymástól, és izolált, érett ovalbumin mRNS-t hibridizáltak hozzá. Az mRNS az exonoknak megfelelő részeken hibridizált a DNS-hez, míg a DNS intronoknak megfelelő része kihurkolódva láthatóvá vált. Az egymást követő DNS hurkok egymáshoz viszonyított mérete megegyezett a génben DNS-szekvenálással meghatározott egymást követő intronok egymáshoz viszonyított méretével.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

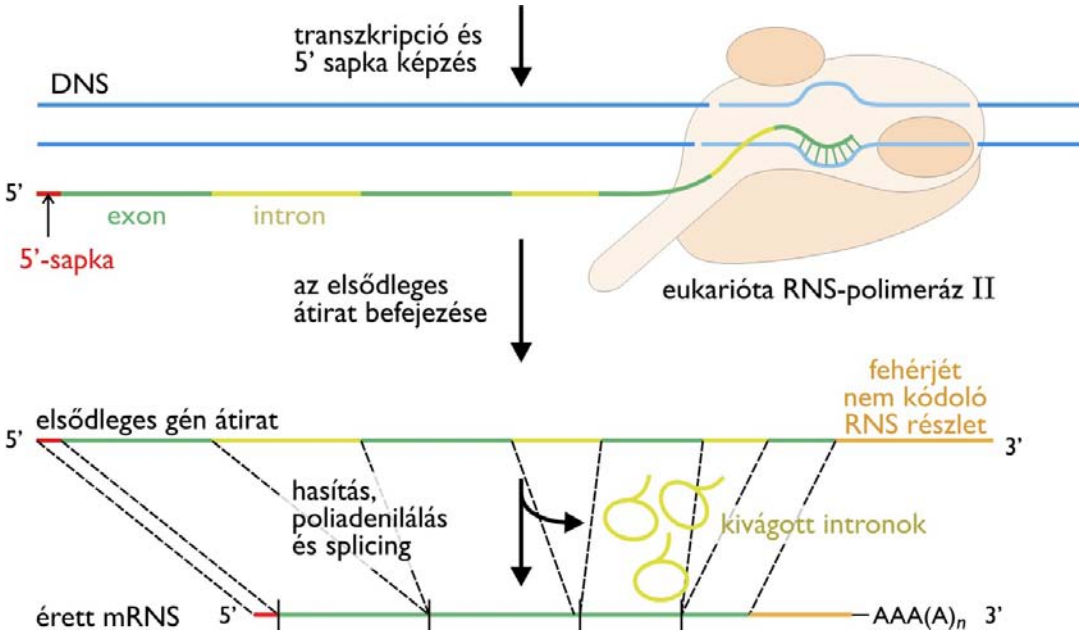
A**14.16. ábra** sematikusan ábrázolja, hogy milyen változásokon megy keresztül az ovalbumin gén elsődleges átirata, mire érett mRNS keletkezik belőle.



14.16. ábra: Az ovalbumin génről keletkező elsődleges átirat processzálása

A splicing nem az egyetlen változás, amelyen az elsődleges átirat átesik. Az **mRNS** ezen felül **a lánc mindkét végén** is erősen **módosul** más enzimek által katalizált folyamatokban. Ennek során olyan szekvencia részletekkel bővül, melyek nincsenek a DNS-ben kódolva. Az **5'-végen** egy speciális „**sapka**" (*cap*) véget kap, míg a **3'-végen** egy hosszú, ismétlődő adenozin nukleotid egységekből álló **poliA-farok** alakul ki (lásd **14.16. ábra** és **14.17. ábra**).

Az ilyen elsődleges átírást követő átalakításokat összefoglaló néven **processzálás**nak nevezzük. **A processzálásrészbenko-transzkripciós** (ilyen az 5'- sapka kialakulása) **részben poszttranszkripciós** (ilyen a poliA kialakítása) **folyamat,** mivel már az átirat készítése közben is zajlik, de az átirat elkészültét követően fejeződik be.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

14.17. ábra: Az RNS processzálás elemeinek bemutatása

14.9. Splicing mechanizmusok

Mint kiderült, az evolúció során **3 fő intron-eltávolítási mechanizmus** alakult ki. Ennek megfelelően 3 intron csoportot különítenek el.

14.9.1. Az I. és II. csoport, az önhasító intronok (*self-splicing*)

Az I. és II. típust az önmagukat eltávolító (***self-splicing***) intronok jelentik. Tehát ezekben az esetekben olyan RNS molekulákról van szó, amelyek **kivágják saját magukat egy nagyobb RNS molekulából**. Ezek az RNS-ek kémiai folyamatokat katalizálnak, tehát **ribozimek**, azaz RNS enzimek! Az önmagukat kivágó intronok példáján keresztül fedezte fel a világon először Thomas Cech 1982-ben, hogy RNS molekulák is lehetnek enzimek.

Thomas Cech az eukarióta csillós egysejtű, a *Tetrahymena* transzkripcióját vizsgálta. Nagy meglepetésére a 26S riboszómális RNS képes volt processzálódni minden egyéb fehérje, vagy más makromolekula komponens közreműködése nélkül. A kulcs kísérlet az volt, amikor a *Tetrahymena* 26S rRNS gén kérdéses szakaszát kódoló DNS-t kóli RNS-polimeráz segítségével *in vitro* írta át, majd a mintát fehérje mentesítette. A kérdéses RNS ebben az esetben is processzálódott. Thomas Cech 1989-ben Sidney Altmannal megosztva kémiai Nobel-díjat kapott. Mint később látni fogjuk, Sidney Altman 1983-ban szintén egy ribozimet fedezett fel a tRNS-eket processzáló RN-áz-P enzim keretében.

Az I. és II. csoport ritka, de evolúciós szempontból létük óriási jelentőségű, mert arra utal, hogy lehetett valaha egy **RNS-alapú élővilág** (*RNA world*), amelyben RNS-ek végezhették az információtárolást, és a katalízist is. Ma ezeket az alapfunkciókat két eltérő makromolekula csoport, a DNS és a fehérjék végzik.

A Thomas Cech által felfedezett önmagát kivágó intron az **I-es csoport**ba tartozott. Ezek az intronok **kofaktorként** egy **guanozin nukleotid**ot használnak a foszfodiészter kötés támadására. A stabil térszerkezetű intron egy specifikus kötőhellyel rendelkezik a nukleotid számára, a katalitikus helye pedig aktiválja a nukleotid 3'-OH csoportját, jobb nukleofil támadóvá téve azt.

Ez a nukleotid kofaktor foszfátészter-kötés csere keretében felbontja az 5'-exon és az intron közötti észterkötést. Ezt követően az intron aktiválja az 5'-exon felszabaduló 3'-OH csoportját, amely így nukleofil támadást intéz az intron és a 3'-exon közötti kötésen. Egy újabb foszfátészter csere következtében a két exon között foszfodiészter kötés alakul ki, miközben az intron felszabadul.

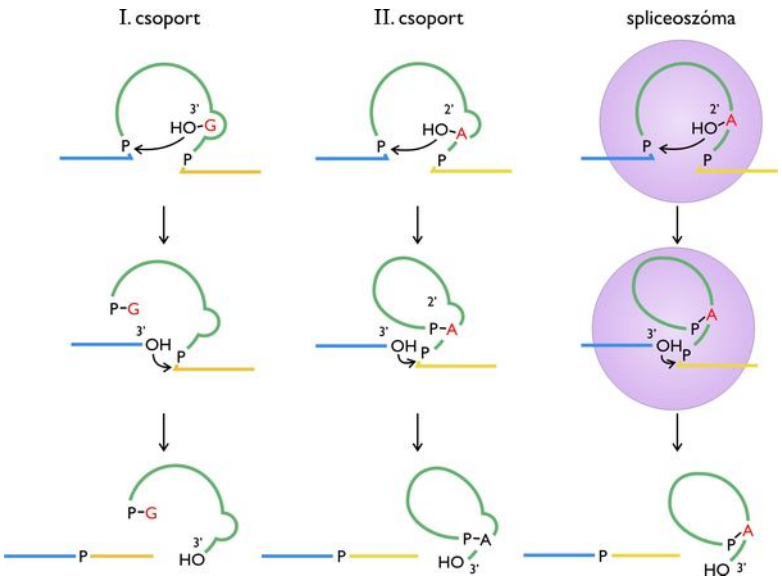
A **II. csoportot szintén önmagukat kivágó intronok** képezik. Ezek a működési mechanizmus tekintetében annyiban különböznek az I. csoporttól, hogy itt **nincs szükség** külső nukleotid **kofaktorra**. Az intron által aktivált hidroxilcsoportot az intron egyik meghatározott pozícióban lévő adenozin egységének 2'-OH csoportja szolgáltatja.

A lépések az előzőek szerint zajlanak, de mivel egy, a **láncba beépült**, és ott is maradó **adenozinon keresztül** hasad el az 5'-exon és az intron közötti kötés, az új foszfátészter kötés kialakulásakor ez az adenozin mindhárom hidroxilcsoportján keresztül észterkötésben lesz, és egy **lasszószerű képződmény** (*splicing lariat*) alakul ki. A reakció második lépése a már említettek szerint zajlik. A reakció mindkét intron csoport esetében két olyan lépésén keresztül zajlik, melyek során azonos szabadentalpia szintű foszfátészter-kötések alakulnak ki és szűnnek meg (transzészteráz aktivitás), ezért a **splicing nem igényel energiát**.

14.9.2. A III. csoport és a spliceoszómák

A **III. csoportot** olyan intronok képviselik, amelyek kivágódása a II. csoportnál látott, belső adenozinon és lasszóképzésen keresztüli sémát követi, de ezek az intronok nem rendelkeznek semmilyen katalitikus aktivitással. A III. típusú intronokat arra szakosodott, **RNS és fehérje molekulákból kialakuló ribonukleoprotein komplexek**, a **spliceoszómák** (kiejtve szplájszoszómák) vágják ki (lásd **14.18. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

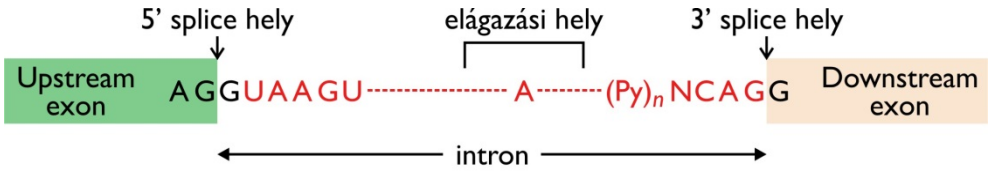


14.18. ábra: A három eltérő splicing mechanizmus

A spliceoszóma RNS és fehérjék szupramolekuláris komplexe, akárcsak a riboszóma. Míg a saját magukat kivágó intronok a mai élőlényekben ritkaságnak számítanak, a III. típusú intronok hatalmas arányban terjedhettek el, valószínűleg annak köszönhetően, hogy az evolúció során kialakult egy, az introntól elkülönült, intronkivágó egység. Ennek létrejöttével az intronok szekvenciájával kapcsolatban csak az a követelmény maradt meg, hogy abban a **spliceoszóma felismer**jen bizonyos **szekvencia elemeket**, amik alapján el tudja végezni az intron kivágását. Ezek a fontos szekvencia elemek az intron két oldalán, tehát **a két intron exon határnál**, valamint a lasszó szerkezetben az elágazási pontot jelentő adenozin környékén vannak (lásd **14.18. ábra**).

A **sejtmagban keletkező érett mRNS-ek** szinte mindegyike a **spliceoszóma** segítségével alakul ki. A **spliceoszóma** öt darab kisméretű ribonukleinsav fehérjékkel alkotott komplexe, másik neve **snRNP** (*small ribonucleoprotein particle*). Maga a spliceoszóma az intron köré szerveződve áll össze. A hasítások az önhasító intronokhoz hasonlóan itt sem energiaigényesek, de a spliceoszóma összeszerelődése igen.

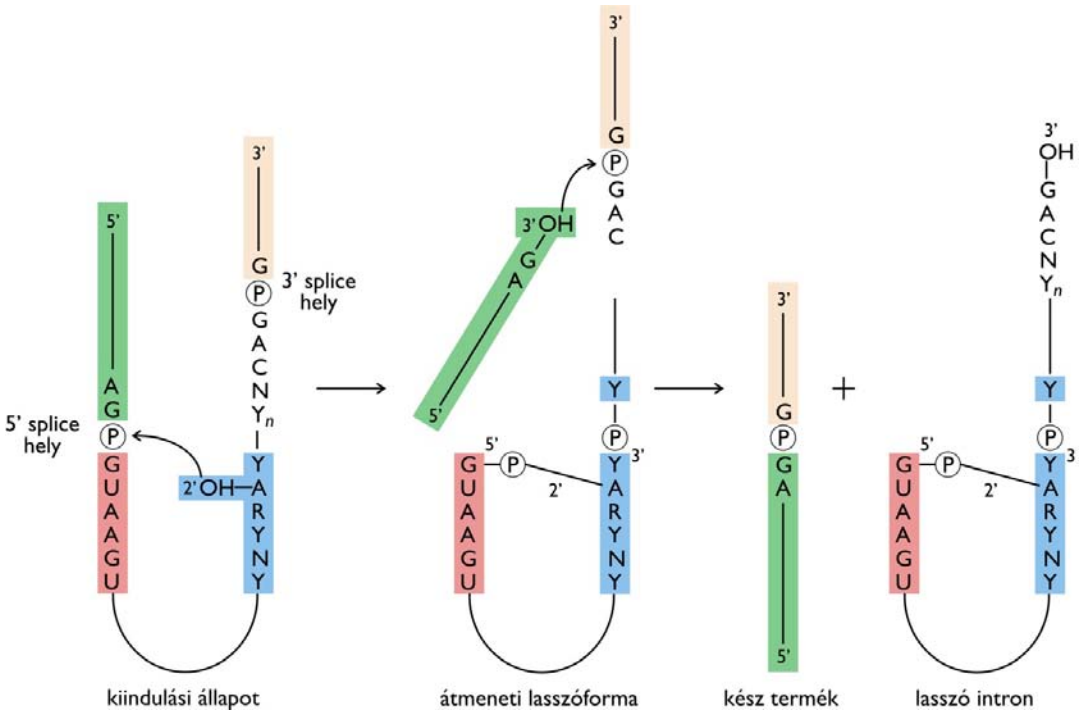
A lasszó elágazó szakaszának szerkezetét a **14.19. ábra** mutatja.



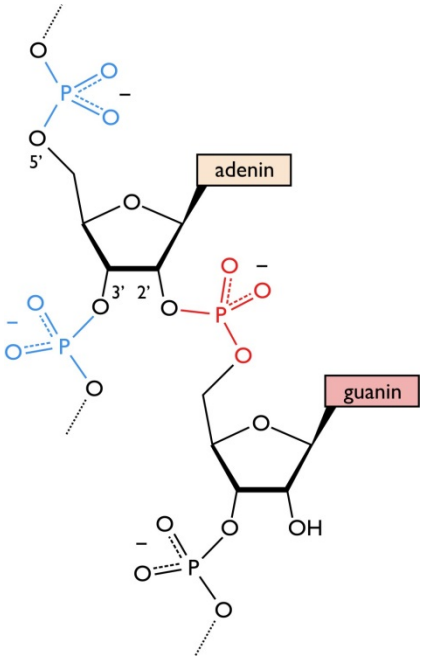
14.19. ábra: A III. típusú intron jellegzetes szekvencia elemei

A reakciót kicsit részletesebben, az egyes kémiai lépések sorrendjét is bemutatva a **14.20. ábra** szemlélteti, amely jelzi az elágazási hely körüli szekvencia jellegzetességeket is, míg a lasszó szerkezetét a **14.21. ábra** mutatja be: Végül a spliceoszóma által katalizált reakció modelljét a **14.22. ábra** illusztrálja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

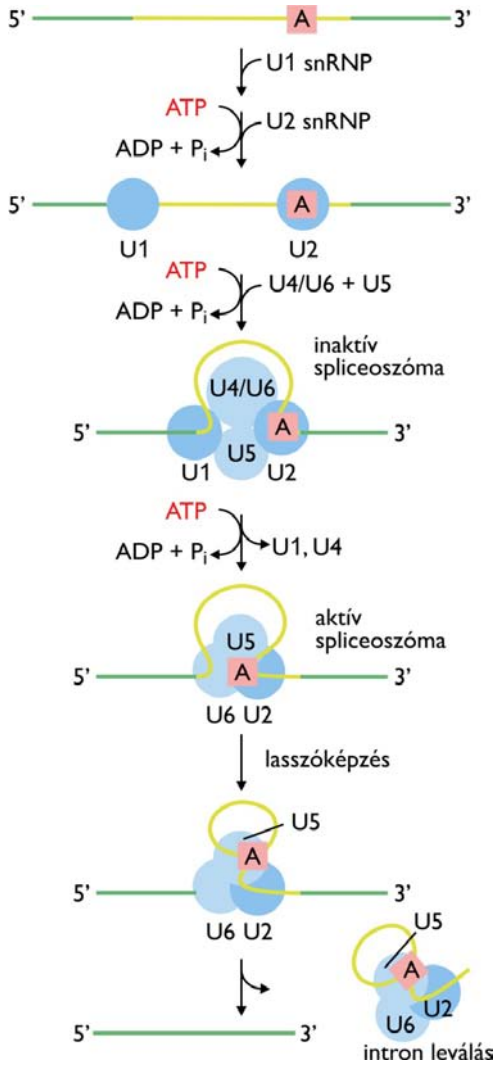


14.20. ábra: A III. típusú intron kivágása, a lasszóképzés



14.21. ábra: A lasszó kémiai szerkezete

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.22. ábra: A III. típusú intronok spliceoszóma alapú eltávolításának lépései

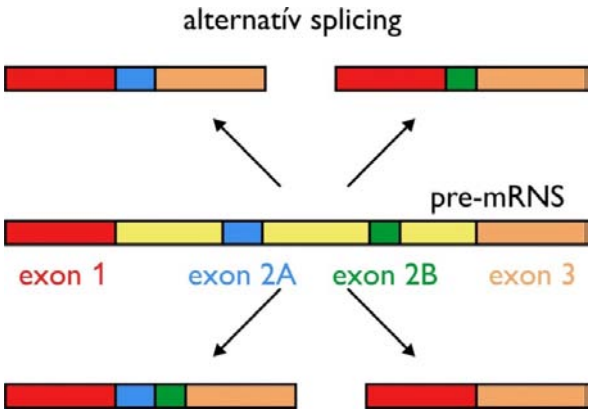
14.10. Az alternatív splicing

A darwini evolúciós modell szerint minden, az evolúció során rögzült funkcióval kapcsolatban feltételezhető, hogy az valahogyan elősegíti a funkcióval rendelkező faj túlélését, szaporodását, tehát adaptív előnyt biztosít. Az eukarióták mozaikos génszerkezete, és a splicing mechanizmusa első ránézésre egy rendkívül pazarló működést vázol, hiszen rengeteg energia fordítódik olyan molekularészek előállítására, amelyek később kivágásra és lebontásra kerülnek.

Már az első elméletek is felvetették ugyanakkor egy olyan mechanizmusnak a lehetőségét, ami hatalmas adaptív előnyökkel járhat. Ez az **alternatív splicing** lehetősége (lásd **14.23. ábra**).

Ugyanarról **a mozaikos génről** nemcsak egy, de akár **számos különböző érett mRNS keletkezhet** az egyes exonok kombinatorikus összeszerelődése révén. Az alternatív splicing kifejezésben érvényesül csak igazán annak az analógiának a szellemessége, amivel ezt az RNS processzálási folyamatot a filmvágáshoz hasonlították. Ugyanabból a film nyersanyagból a vágás képes nagyon sok, eltérő hangulatú jelenetet varázsolni annak ellenére, hogy a cselekménysor az egyes végeredményekben alapvetően azonos lehet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.23. ábra: Az alternatív splicing sémája

Mint kiderült, az alternatív splicing valóban létezik, és komoly szerepe van a magasabbrendű élőlényekben. Ennek következtében egy-egy gén valójában nemcsak egy, de nagyon sokféle fehérje-variáns kódolhat. Az intronokkal rendelkező eukarióta genomok esetében tehát a keletkező **géntermékek száma sokszorosa lehet a gének számának**. Az alternatív splicing is eredményezheti azt, hogy egy fehérje eltérő formában termelődjön a különböző szövetekben, vagy ugyanazon szövetben eltérő fejlődési fázisokban.

Egyelőre kevéssé értett, és intenzíven kutatott probléma, hogy pontosan miként szabályozódik az alternatív splicing folyamata, mi dönti el az adott szövetben az adott fejlődési szakaszban, hogy mely exonok kerüljenek az mRNS-be.

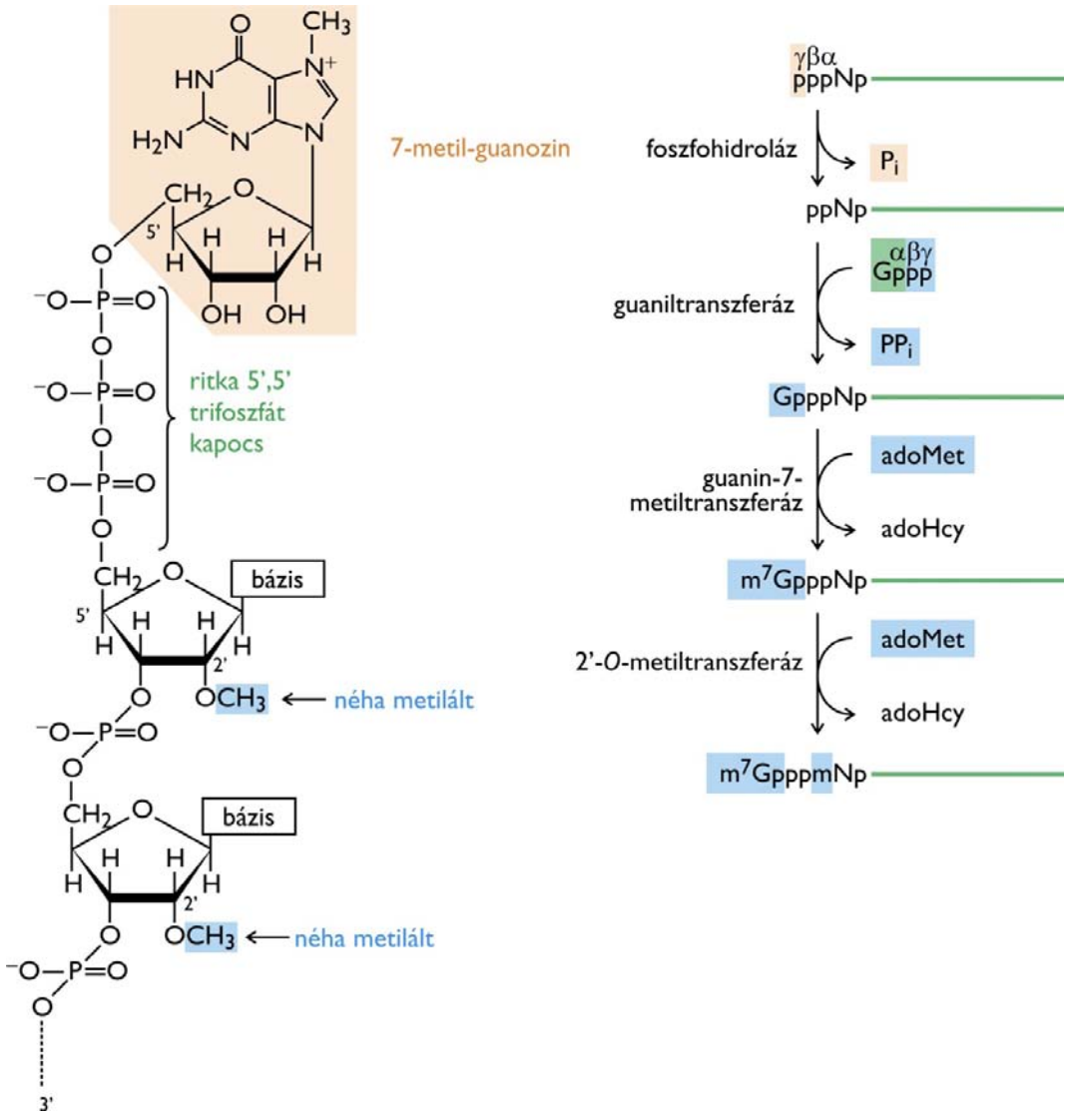
14.11. Az eukarióta mRNS 5’-végének processzálása

Az eukarióta mRNS 5’ vége, intenzív átalakítások eredményeként jön létre (lásd **14.24. ábra**).

Az **5’-sapka** kialakítása már a transzkripció iniciációs fázisában végbemegy. Első lépésben az elsődleges átirat 5’-trifoszfát végéről egy foszfátcsoport eltávolításra kerül. Ezt követően egy GTP guanil-transzferáz enzim egy GTP egységet kapcsol az 5’-végre pirofoszfát kilépése közben. Egy ritka molekuláris szerkezet jön létre, hiszen a beépített guanozin és az eredeti 5’-végi nukleozid között egy 5’-5’-trifoszfát alakul ki. Ezt követően az utólag felkerült guanozin az egyik nitrogénjén metilálódik, és a láncban azt követő két monomer ribózának 2’-hidroxilja is metilálódhat.

A sapka régiónak bizonyított szerepe van abban, hogy az érett mRNS a riboszómához kötődjön, és valószínűleg részleges védettséget nyújt exonukleázokkal szemben is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.24. ábra: Az eukarióta mRNS sapka végének kialakulása

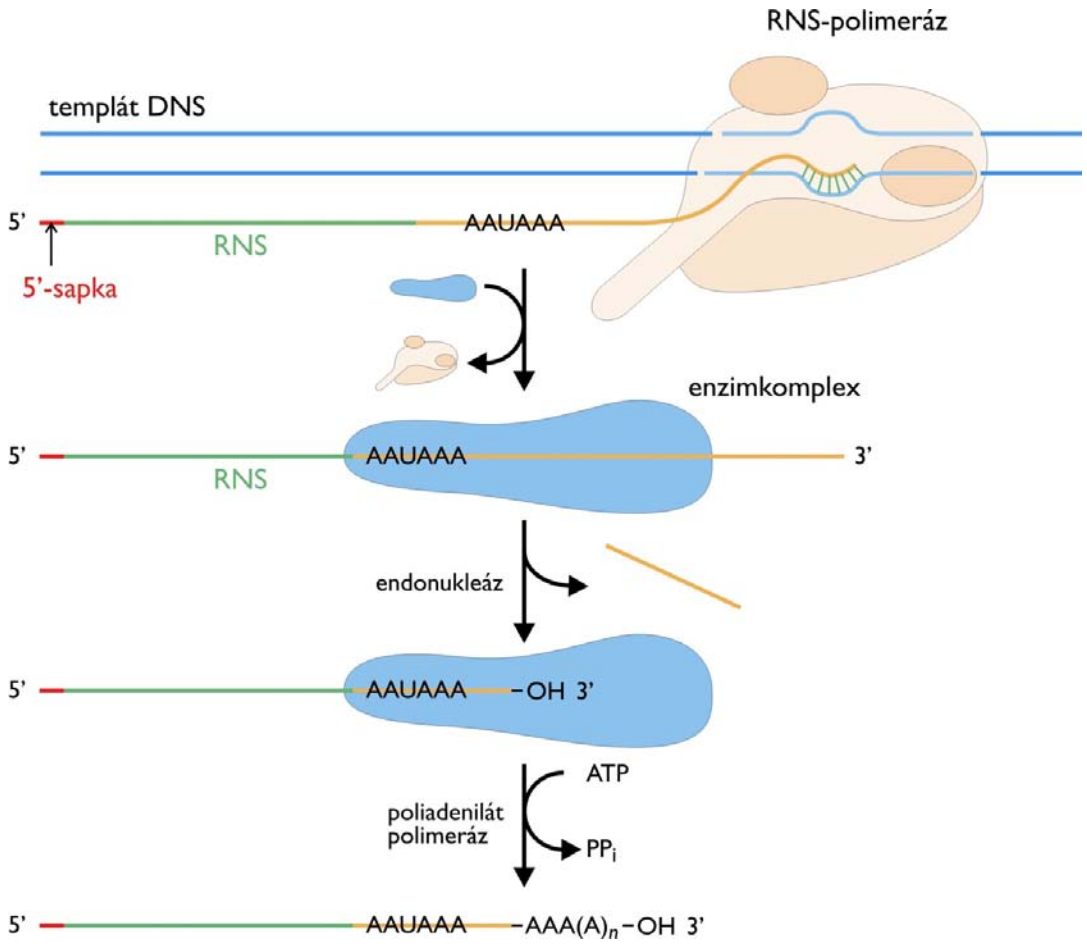
14.12. Az eukarióta mRNS 3' végének processzálása

Az eukarióta mRNS-ek közös jellemzője, hogy a 3' végükön számos adenozin csoport követi egymást, vagyis poliA végük van. A **poliA-farkat** egy összetett **enzim komplex alakítja ki** (lásd **14.25. ábra**).

A kialakítás **helyét az RNS szekvenciája alapján** ismeri fel a komplex. Az egyik **jel** egy konzervatív szekvencia, az **AAUAAA** részlet. Ehhez kötődve az enzim komplex egyik eleme, egy endonukleáz a jelhez képes downstream irányban hasítja az RNS láncot. A komplex egy másik enzim komponense, a **poliadenilát-polimeráz** ATP szubsztrátot használva „normális", de poliA szerkezetű RNS láncot hoz létre (**templát-független polimeráz**). A komplex bizonyára egy sor szűkebb értelemben vett szekvencia-specifikus elemet is tartalmaz, hiszen a poliA részlet hossza RNS-függő.

A poliA funkciói nem teljesen tisztázottak, de az azt létrehozó enzim komplex valószínűleg részt vesz a transzkripció terminációjában, míg maga a poliA az eukarióta RNS életidejére lehet hatással. A jelenlegi elképzelés szerint minél hosszabb a poliA részlet, annál lassabban bomlik le az RNS.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.25. ábra: Az eukarióta mRNS-ek poliA végének kialakítása

14.13. A riboszómális RNS-ek érése prokariótákban és eukariótákban

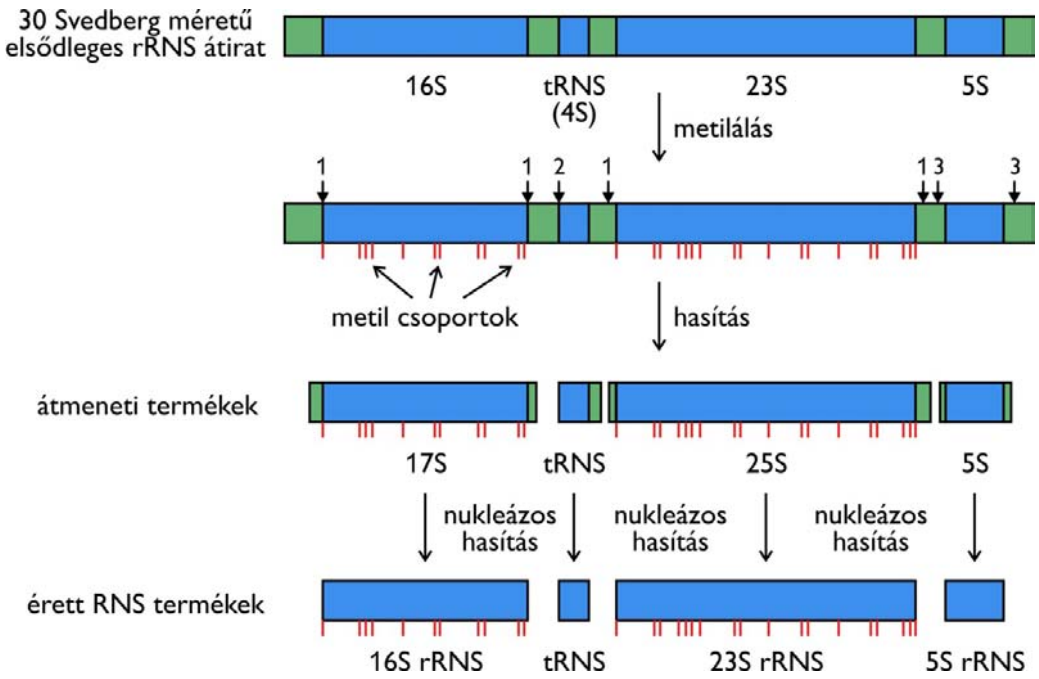
Az **rRNS**-ek és **tRNS**-ek mind prokariótákban, mind eukariótákban **nagymértékű processzálás**on mennek keresztül. Az itt szereplő lépések zöme egy nagy RNS átirat szekvencia specifikus feldarabolását jelenti, nem jár két szakasz összekapcsolásával, vagyis nem splicing történik.

Természetesen a mechanizmus is más, specifikus endonukleázok végzik a hasításokat.

Emellett egyes így keletkezett termékekből intronok is eltávoznak, tehát az esetek egy kisebb részében splicing is történhet. Ilyenkor a splicingban vagy önhasító intron szerepel, vagy a spliceoszóma végzi a kivágást és az exonok összeillesztését. A **14.26. ábra** egy prokarióta rRNS gén első átiratának, a 30S RNS-nek a processzálását mutatja be.

A **kólibaktérium**nak **7 kópia 30S RNS gén**je van. (A hatalmas molekulák, vagy molekula- komplexek méretét az ultracentrifugában történő ülepedés sebességén keresztül lehet meghatározni, ezzel kapcsolatos az „S”, a Svedberg-egység, lásd **6.2.3.1. fejezet**) Az intenzíven szaporodó baktériumnak ugyanis rendkívül nagy mennyiségű fehérjét kell szintetizálnia, amit csak akkor képes elegendően rövid idő alatt megtenni, ha nagyon nagy számban állít elő riboszómákat. A nagyszámú riboszómához természetesen hatalmas ütemben kell gyártani a riboszómális RNS-eket. A 7 kópia éppen ezt teszi lehetővé, hiszen így a baktérium genomján egy időben 7 helyen mehet végbe a transzkripció.

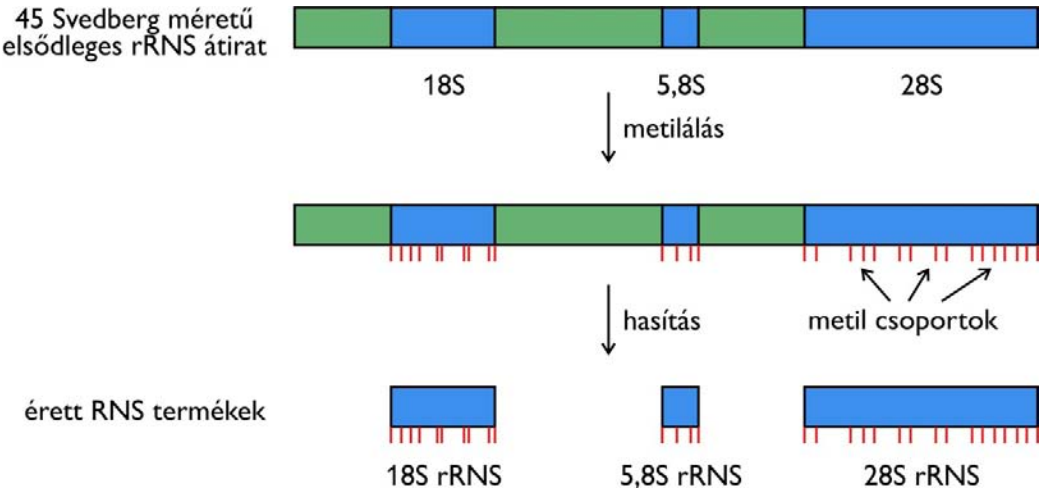
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.26. ábra: A prokarióta rRNS-ek érése

A 7 kópiáról ugyanazok az rRNS termékek keletkeznek, de az elválasztó szakaszok hossza eltérő. A **három rRNS** mellett az **egyik tRNS** is **itt kódolódik**. A folyamatban szekvencia-specifikus metilázok, valamint metiláltság és szekvencia specifikus endonukleázok szerepelnek.

Az **eukariótá**knál **4 eltérő rRNS** van, ezekből **3-nak közös elsődleges átirat**a van, amelyet az **RNS-polimeráz I enzim készíti el** (lásd **14.27. ábra**).



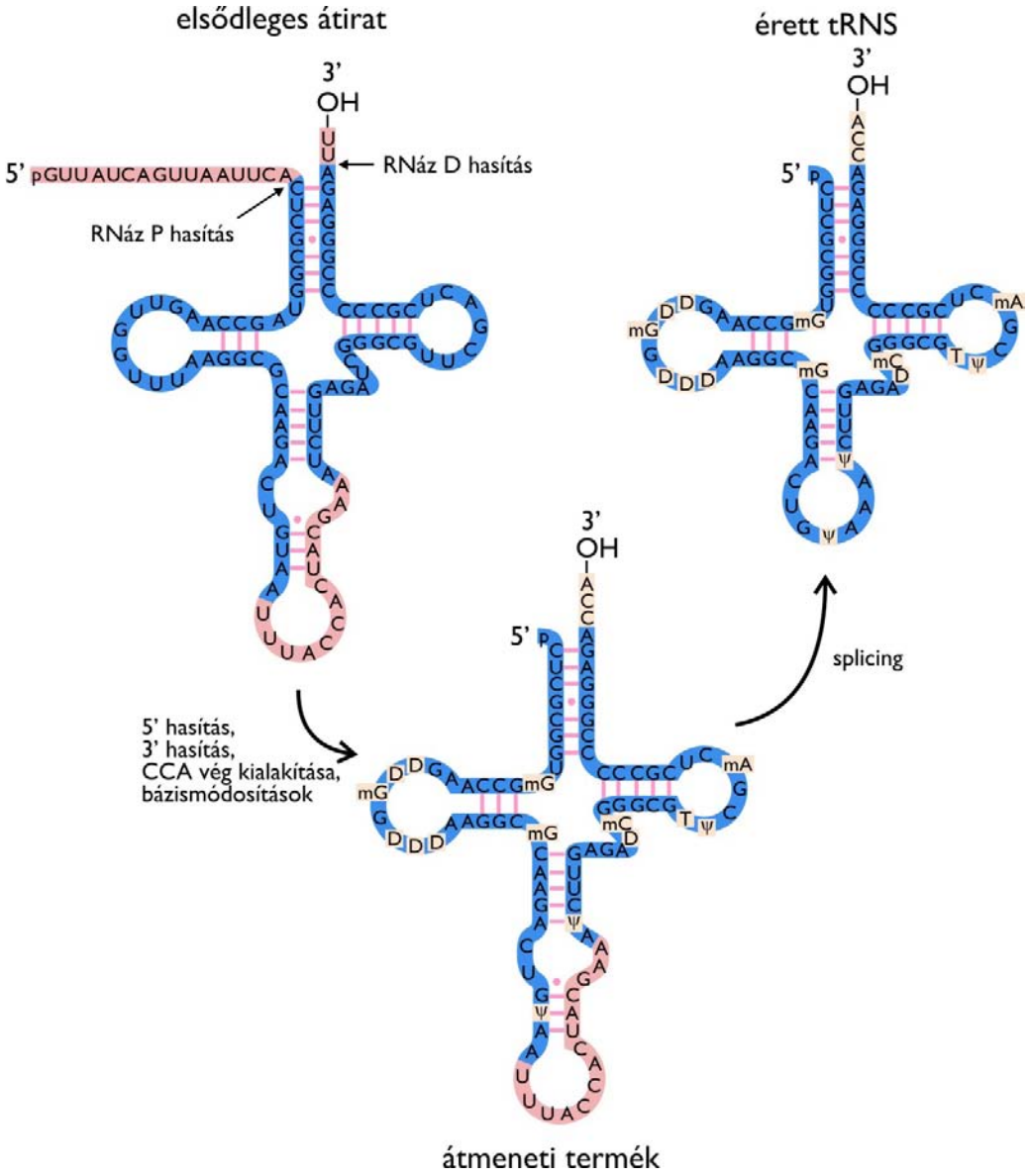
14.27. ábra: Az eukarióta rRNS-ek érése

A **processzálás** a sejtmagvacskában (**nukleólusz**) zajlik le, és kisméretű RNS-eket is tartalmazó RNS-fehérje komplexeket igényel. Ezek hasonlítanak a spliceoszómákhoz. A negyedik eukarióta rRNS az **5S rRNS**. Ez a **tRNS-ekkel együtt** olyan **elsődleges átiratból** keletkezik, amelyet az **RNS-polimeráz III** készít el.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

14.14. A tRNS-ek érése prokariótákban és eukariótákban

A prokarióta és az eukarióta transzfer RNS-ek érése annyira hasonló, hogy egyetlen közös ábrán illusztrálható (lásd **14.28. ábra**).



14.28. ábra: A tRNS-ek érése

A **14.28. ábra** egy eukarióta tRNS elsődleges processzálását mutatja be, de alapvetően ugyanígy zajlik a prokarióta folyamat is. A rózsaszínnel jelzett részletek kerülnek eltávolításra. Az RN-áz-D és RN-áz-P minden élőlényben előforduló nukleázok, amelyek RNS-t és fehérjét tartalmazó komplexek.

Az ***E. coli*** **RN-áz-P** a fehérjerész nélkül is aktív, vagyis ez a katalitikus RNS-ek (**ribozim**ek) egy újabb példája. Ezt ismerte fel és bizonyította Sidney Altman, aki 1989-ben Thomas Cech-vel megosztva orvosi Nobel-díjat kapott.

A processzálás során először az 5'-, majd a 3'-vég rövidül. Az eukarióta tRNS gének mindegyikéből, a prokarióták némelyikéből hiányzik az érett tRNS vég alapvető fontosságú CCA 3' végének (lásd transzlációnál) trinukleotidja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A hiányzó CCA részt egy speciális enzimrendszer pótolja. A bázisok jó része specifikus módon módosul, ami a jellegzetes tRNS térszerkezet kialakulásának elengedhetetlen feltétele. Intronok csak az eukarióta tRNS-ekben fordulnak elő.

Mindkét említett ribozim határozott térszerkezettel bír, ahogyan az egy enzimtől el is várható. A Thomas Cech által felfedezett önmagát kivágó intron egy határozott térszerkezetű RNS szintén határozott térszerkezetű eleme (lásd **14.29. ábra**).

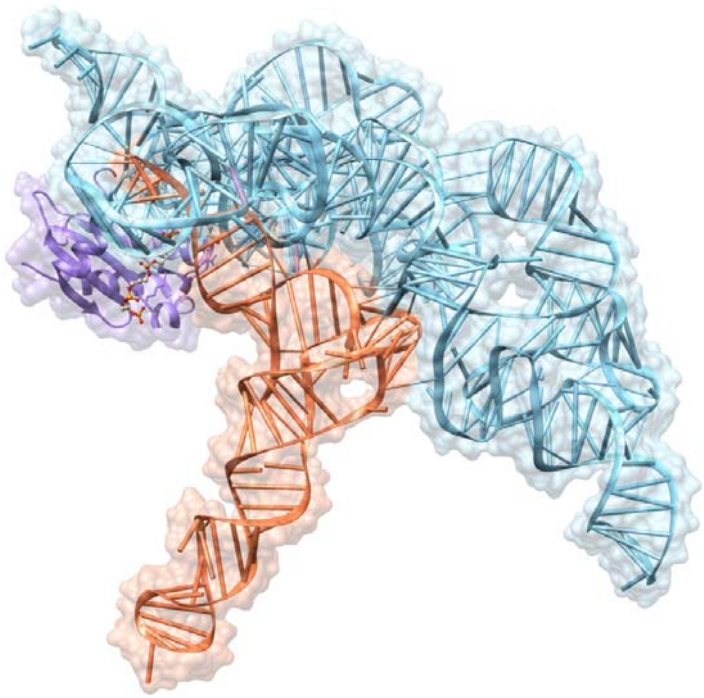


14.29. ábra: A *Tetrahymena* önmagát kivágó intronját tartalmazó RNS. Az intront aranyszín jelzi

Az egyes színek eltérő doméneket jeleznek. A határozott térszerkezetű RNS-ek esetében is használatos a domén elnevezés, ami csakúgy, mint a fehérjéknél, itt is önálló feltekeredésre képes láncrészt jelent.

A **14.30. ábra** egy RNáz P és egy éppen processzálódó tRNS komplexét mutatja be. Világoskék jelzi az RNáz P RNS részét, lila a kisméretű fehérjekomponens, aminek jelenléte kóli RNáz P esetében nem szükséges feltétele az enzimreakciónak. A narancssárga szín a tRNS-t jelzi.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



14.30. ábra: Az RNáz P és egy tRNS komplexe

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

15. fejezet - A genetikai kód feltörése

(szerző: Pál Gábor)

Francis Crick centrális dogmája szerint a fehérjékben lévő aminosavsorrendet a nukleinsavakban lévő nukleotid sorrend határozza meg. A **nukleinsava**kba írt szöveg nyelvezete **4 betű**ből áll, a **fehérjé**ben lévő szöveg pedig **20-betű**s. A kettő között kell, hogy legyen egy **kódolási eljárás**, egy szabályrendszer, ami szerint a nukleinsavakban szereplő szöveg lefordítható a fehérjékben szereplő szövegre. Ezt a **szabályrendszer**t nevezzük **genetikai kód**nak. Fontos tehát megértenünk, hogy a „kód” nem valamilyen fizikai entitás, például nem egy trinukleotid egység, hanem maga a szabályrendszer.

Ennek a szabályrendszernek a feltárása a biológiai kutatások körében az egyik legnagyobb intellektuális teljesítmény volt.

15.1. A genetikai kód megfejtését megalapozó ismeretek

Mint arról korábban szó volt, már a negyvenes években kiderült Avery és munkatársai nyomán, hogy az örökítő anyag a DNS, amit Hershey és Chase kísérlete 1952-ben megerősített. A negyvenes években Tatum és Beadle pedig már azt is demonstrálták, hogy egy-egy enzim előállítására vonatkozóan egy-egy gén hordozza az instrukciókat.

Watson és Crick 1953-ban megoldotta a DNS térszerkezeti modelljét, hipotézist állítottak fel a replikáció modelljére, amit Meselson és Stahl kísérlete 1957-ben igazolt.

Ugyanakkor semmilyen konkrét ismeret nem utalt arra, hogy mi viheti át az információt a DNS-ről a fehérjére.

Mielőtt a kód megfejtése irányába konkrét kísérleteket tehettek volna, számos előzetes eredménynek kellett megszületnie. Az első ilyen eredmény a fehérjék keletkezési helyének azonosítása volt.

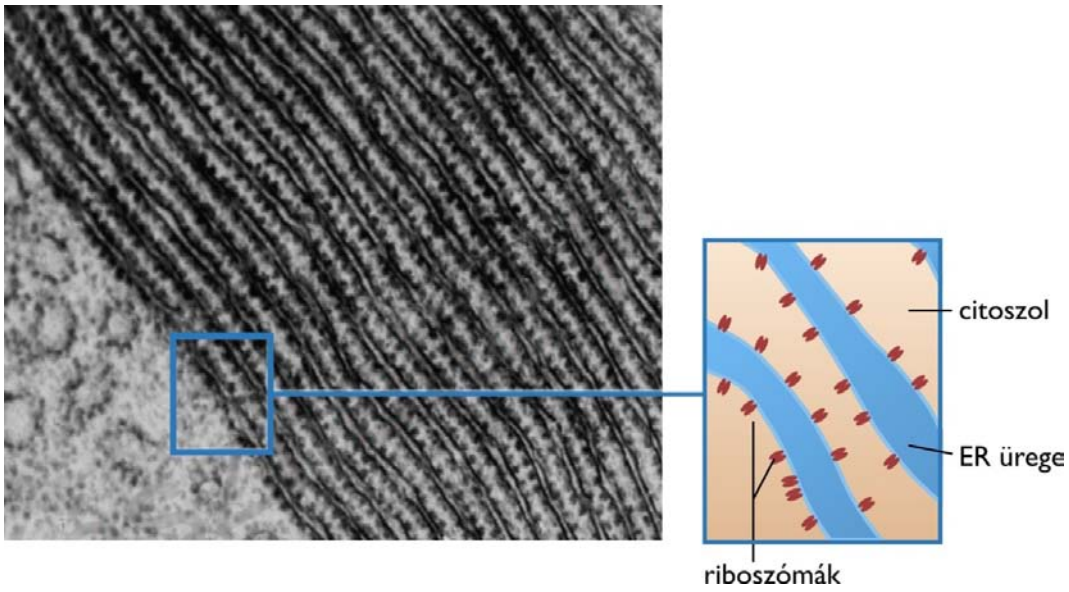
15.1.1. A fehérjeszintézis helyének azonosítása

Nyilvánvaló, hogy ahol a fehérjék keletkeznek, ott kell, hogy legyen helyileg az az instrukció is valamilyen molekuláris formájában, ami alapján az adott aminosavsorrendű fehérje létrejön.

A **riboszóma**kat **1955**-ben **George Palade** azonosította elektronmikroszkópos technikával mind szabadon a citoplazmában, mind pedig membránokhoz kötve. Festési technikákkal arra jutott, hogy a képződmények, (amelyeket csak 1958-ban neveztek el riboszómának), fehérjét és RNS-t egyaránt tartalmaznak. A sejtek szerkezeti és funkcionális felépítésének feltárásában elért meghatározó eredményeikért Albert Claude, Christian de Duve és George Palade 1974-ben megosztott orvosi Nobel-díjat kaptak. A munka keretében kidolgozták a sejtfrakcionálás eljárását, és elektronmikroszkópos valamint biokémiai vizsgálattal egy sor sejtalkotót azonosítottak.

Paul Zamecnik volt az, aki szintén 1955-ben a fehérjék szintézisének helyeként azonosította az ugyanabban az évben Palade által leírt riboszómákat (lásd **15.1. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



15.1. ábra: A durvafalú endoplazmás retikulum a riboszómákkal

Zamecnik kifejezetten biokémiai szemlélettel a fehérjeszintézis színhelyét igyekezett meghatározni. A fehérjék nukleinsavak általi kódolásának elméleti problémakörével nem foglalkozott. Ezért nem ismerte azokat a hipotéziseket sem, amelyeket Francis Crick és kutatótársai ugyanebben az időszakban alkottak.

Zamecnik radioaktív aminosavakat injektált patkányba, és májból izolált sejtfrakciókban követte, hol jelenik meg a radioaktív jel. Ha a jelölés és az izolálás között órák, vagy napok teltek el, minden sejtfrakció jelölődött. Ha csak percek teltek el, akkor a fehérjék kizárólag ribonukleoprotein-tartalmú frakciókban voltak jelen, a riboszómákhoz kötve. Zamecnik arra következtetett, hogy a fehérjék riboszómákon szintetizálódnak.

15.1.2. Az adapter RNS (tRNS) azonosítása

Az a tény, hogy az eukariótákban a DNS a sejtmagban van, a fehérjeszintézis helye viszont a citoplazma, szükségessé tette egy, vagy több információközvetítő molekula létét. Crick 1955-ben elméleti alapon felvetette egy információközvetítő nukleinsav, és egy adapter nukleinsav létének szükségességét ahhoz, hogy a DNS-ben tárolt információ alapján fehérjék szintetizálódjanak.

Crick „**adapter-hipotézisé**”-t is alátámasztotta, hogy világossá vált, az aminosavak nem kötődnek spontán sem DNS-hez, sem RNS-hez. Tehát ha lenne is egy információközvetítő molekula, ami a sejtmagból kiviszi a DNS információját a citoplazmába, egy további adapter molekulának is lennie kell, amely kapcsolatot teremt a négybetűs nukleinsav nyelv és a húszbetűs fehérje nyelv között. Crick úgy vélte, az adapter egy RNS lehet, amelynek egyik része specifikusan felismer egy adott aminosavat, míg a másik része specifikusan felismeri az adott aminosavhoz tartozó kódoló egységet a közvetítő nukleinsavon (lásd **15.2. ábra**).

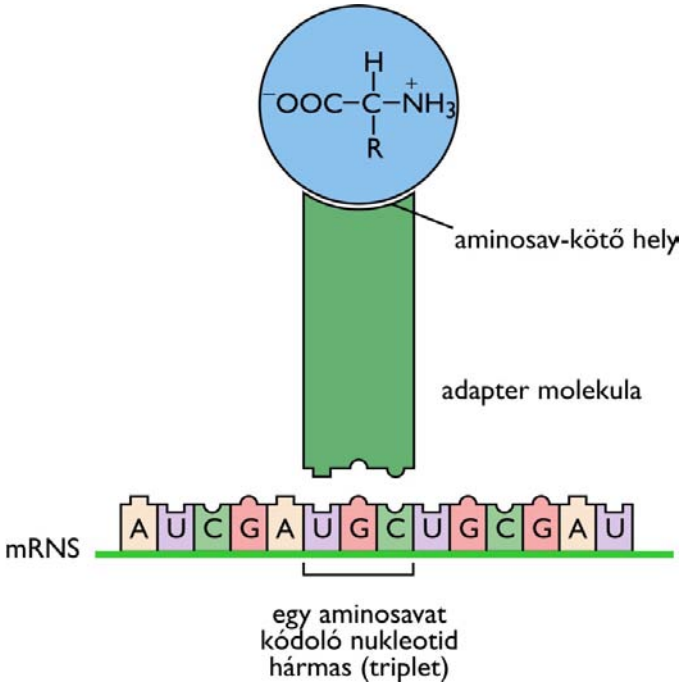
Arra azonban senki nem gondolt, hogy ezt a hipotetikus adaptert még abban az évben felfedezik. Ismét Zamecnik szolgáltatta az eredményt. Biokémiai ismeretei alapján tisztában volt azzal, hogy ahhoz, hogy a szabad aminosavak polipeptidlánccá kapcsolódjanak össze, energia kell, amit bizonyára ATP szolgáltat.

A további vizsgálatokhoz ezért Mahlon Hoagland-dal közösen kidolgozott egy májsejt kivonaton alapuló, sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszert. Ezt a rendszert használva **Hoagland** és **Zamecnik** aminosavakat inkubáltak ATP-vel és felfedezték, hogy az aminosavak ideiglenesen kovalens kötéssel AMP-hez kapcsolódnak, majd ennek a vegyületnek a bomlása során kovalens kötéssel RNS molekulához kapcsolódnak. Zamecnik és Hoagland tehát felfedezték a **tRNS-t**.

James Watson személyesen értesülve ezekről az eredményekről azonnal rájött, hogy az az RNS, amit Hoagland és Zamecnik felfedezett, megfelelhet Crick feltételezett adapter molekulájának. Crick az eredményről értesülve azt vetette fel, hogy óriási előrelépés lenne, ha egy kóli citoplazma alapú sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszert

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

is létre lehetne hozni. Zamecnik ezt 1960-ra meg is alkotta, és később ez a rendszer alapvető fontosságúnak bizonyult a genetikai kód megfejtésében.



15.2. ábra: A Francis Crick által megjósolt adapter molekula

Térjünk vissza a Crick által felvetett elméleti problémára. Az adapter molekula azonosításra került, de a később hírvivőnek elnevezett RNS-t még nem találták meg.

15.1.3. Az információt közvetítő, hírvivő RNS (mRNS) azonosítása

Tudománytörténeti érdekesség, hogy a riboszómák felfedezése Francis Crick-et egy később alapvetően hibásnak bizonyult hipotézisre vezette. Miután kiderült, hogy a riboszómákban nagy mennyiségben van jelen RNS, Crick az RNS genomú növényi vírusok alapján feltételezte, hogy a riboszómák esetében is kódoló szerepe van ennek az RNS-nek.

Megalkotott egy elméletet, amely szerint minden riboszóma egy-egy fehérjegén RNS másolatát hordozza, tehát a riboszómákban lévő RNS lenne maga az információ közvetítő RNS. Ez a hipotézis hamar megdőlt, amikor kiderült, hogy a riboszómák rendkívül homogének. Ráadásul a bennük lévő RNS bázisösszetétele még olyan távoli fajok esetében is nagyon hasonló, mely fajok DNS-ének bázisösszetétele nagyon eltérő. Az is világossá vált, hogy a bakteriális RNS frakció, amiről kiderült, hogy legnagyobb arányban riboszómális RNS-t tartalmaz, bázisösszetétele nem hasonlít a bakteriális DNS bázisösszetételére.

A hírvivő RNS-t elsőként Elliot Volkin és Lazarus Astrachan azonosították 1956-ban. T2 fággal fertőztek kóli sejteket. A sejtekben a fertőzést követően szinte leáll a saját fehérjék szintézise, a kóli sejt T2-gyárrá válik, és szinte csak a fág fehérjéit termeli. Volkin és Astrachan radioaktív uracilt adtak a sejteknek a fág-fertőzéssel egyidőben, és megfigyelték, hogy a fertőzést követően szinte azonnal nagy mennyiségű RNS szintetizálódik a coli sejtben. Ennek az RNS-nek a bázisösszetételét analitikai módszerekkel meghatározták, és kimutatták, hogy az sem a kóli egyéb RNS-einek bázisösszetételével, sem a kóli DNS-ének bázisösszetételével nem mutat rokonságot, ugyanakkor nagyon hasonlít a T2 fág egyszálú DNS-ének bázisösszetételére. Ezt az RNS-t DNS-szerű RNS-nek nevezték el. Azt is kimutatták, hogy ez az RNS rendkívül rövid idő alatt lebomlik a sejtben.

Volkin és Astrachan eredményei széles körben elterjedtek. Ennek ellenére a tudományos közvélemény **Sidney Brenner**, **Jacob Monod** és **Matthew Meselson** eredményének ismerte el az **mRNS felfedezés**ét. Való igaz, hogy

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Volkin és Astrachan korábbi kísérleteire támaszkodva, azokat továbbfejlesztve, Brenner, Monod és Meselson egy kifinomultabb kísérletsorozatot publikáltak 1961-ben.

Baktériumokat tenyésztettek ^{15}N és ^{13}C tartalmú tápoldatban. A baktériumok riboszómái így „nehéz” riboszómák lettek. A sejteket ezek után izolálták, radioaktív uracilt adtak nekik, T4 fággal fertőzték, és mindeközben normál ^{14}N és ^{12}C tartalmú tápoldatba vitték. Rövid idő után cézium kloridos egyensúlyi sűrűséggradiens centrifugával izolálták a riboszómákat.

Nem találták jelét új, tehát „normál sűrűségű” riboszómáknak, viszont a régi bakteriális riboszómákhoz ideiglenesen hozzákötődve megtalálták az újonnan keletkezett RNS radioaktív jelét.

Ezt a radioaktív RNS-t izolálták, és kimutatták, hogy az hibridizál (Watson-Crick bázispárosodáson keresztül kötődik) az egyszálú fág genomhoz, de nem kötődik a kóli genomhoz.

Az új vírusfehérjék gyártására vonatkozó információt tehát nem a riboszómális RNS hordozta (abból nem keletkezett új készlet), hanem egy másfajta RNS, amit elneveztek hírvivő (messenger) RNS-nek, röviden mRNS-nek.

15.1.4. A genetikai kód triplet voltának felismerése

Ezek után már világos koncepció állt rendelkezésre a „kódtörők” számára. Adott a DNS-ről másolódó mRNS, ez viszi a hírt az rRNS tartalmú riboszómákra. Ugyanide szállítják a tRNS molekulák, mint adapterek az aminosavakat. Az információ és az adapterek segítségével a riboszóma katalizálja az aminosavak összeépülését fehérjévé.

Pár fontos elméleti kérdés azonban még tisztázásra várt. Például az, hogy az **mRNS-en hány nukleotid egység határoz meg egy aminosava**t. Ezt Francis **Crick** és Sydney **Brenne**r fejtették meg **1961**-ben.

Egy adott fágnak különböző variánsait állították elő. Ezekben a variánsokban rendre ugyanaz a gén hordozott mutációt, de mindegyik típusban a gén más pontján következett be a mutáció. Ráadásul speciális kémiai mutagenezis eljárásokat alkalmaztak, amelyekkel az egyik eljárás szerint elsősorban inszerciót, vagyis egy extra nukleotid beépülését érték el, míg egy másikkal deléciót, vagyis egy nukleotid kiesését.

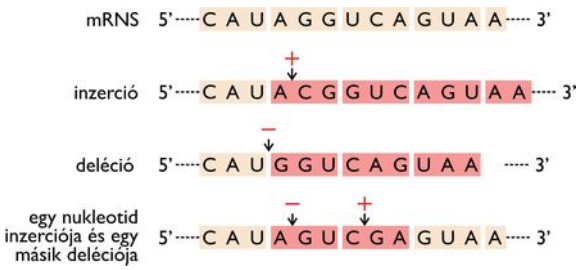
A fágokkal kapcsolatban kiderült, hogy amennyiben két eltérő mutánst juttattak be ugyanabba a kóli sejtbe, megesett, hogy a fágok genomja rekombinálódott. Ennek során egyes homológ génszakaszok kicserélődtek egymással, tehát megjelenhetett a sejtben a vadtípusú fág, és egy dupla mutáns fág.

A kísérletek eredményeként kiderült, hogy amikor delécios mutánst inszercióssal rekombináltak, akkor az esetek egy részében génen belüli komplementáció történt: a dupla-mutáns vadtípusú tulajdonságú lett. (A komplementáció, mint genetikai kifejezés ebben a konkrét esetben azt jelenti, hogy a kettős mutáns az eredeti fenotípust mutatja, tehát a második mutáció eltörli az első hatását. A két mutáció mintegy egymást kiegészítve, komplementálva, kialakítja az eredeti állapotot.) Ha azonban két deléciót kombináltak egymással, akkor ilyen eredményt soha nem kaptak, és ugyanez volt igaz arra az esetre is, ha két inszerciót kombináltak egymással. Ezek sem mutattak vadtípusú eredményt.

Három inszerciós együttes fertőzése ugyanakkor néha vadtípusúhoz hasonló triplamutánst eredményezett, és ugyanezt kapták, amikor három delécios fággal fertőztek.

Mindebből Crick és Brenner a genetikai kóddal kapcsolatban az alábbiakra következtettek: a **kódban szerepel egy kezdőpont**, ami kijelöli, hogy honnan kell kiolvasni a nukleinsavból az információt. Ebből a pontból elindulva a kiolvasás szisztematikus rendben, sorban halad. A kódolási eljárásban nincs fizikai központozás, ami önmagában kijelölné az olvasási keretet, tehát a **kódolás**i eljárás **vesszőmentes**. A meghatározott kezdőpont, a szisztematikus haladás és a központozás hiánya miatt egy inszerció vagy egy deléció eltolja a leolvasási keretet (*frame-shift* mutáció). A tripla delécios illetve a tripla inszerciós mutánsok esete alapján arra jutottak, hogy a **kódolás**i eljárás három nukleotid egységeken, tehát **tripleteken alapul** (lásd **15.3. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



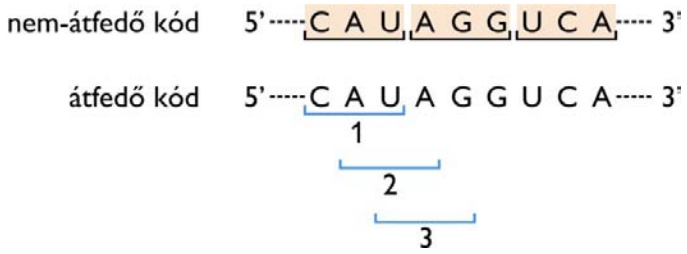
15.3. ábra: Az inszerció, illetve a deléció eltolja a leolvasási keretet

A **15.3. ábra** jól illusztrálja, hogy amennyiben egy inszerció, vagy deléció történik, úgy azt követően a leolvasási keret eltolódása miatt teljesen más információ olvasódik le, mint eredetileg. Ha azonban egymáshoz közel következik be egy inszerció és egy deléció, akkor csak a mutációk közvetlen közelében változik meg a leolvasandó információ, azt követően megmarad az eredeti rend. Amennyiben határozott jelek mutatnák a kódolt szövegekben a kódoló egységek határát (központozás), úgy egy inszerció vagy deléció csak egyetlen egységet érintene.

Arra egyébként már korábban **George Gamow** fizikus is felhívta a figyelmet, hogy a 20-féle aminosav 4-féle DNS nukleotidon alapuló egyszerű kódolásához legalább 3 nukleotid egység kell, hiszen két egység csak 4^2=16, eltérő jelsort jelent. Mivel a 3 egység viszont már 4^3=64 eltérő jelsort jelent, **a kód** „**degenerált**” (másképpen kifejezve **redundáns**), egy aminosavra átlagosan több mint 3 triplet jut.

15.1.5. A kód nem átfedő

Részben elméleti megfontolások, részben korábbi ismeretek alapján kijelenthető volt, hogy **a kód nem átfedő**. Ez szabatosan megfogalmazva azt jelenti, hogy minden nukleotid egység csak egyetlen aminosav meghatározásában vesz részt. Az átfedő kódolás (lásd **15.4. ábra**) ugyan háromszor tömörebb információtárolást tenne lehetővé, de több szempontból is rugalmatlan lenne.



15.4. ábra: A kódolási eljárás nem átfedő

Átfedő kódolásnál az egyes tripletek részben meghatároznák egymást. Például ha egyenkénti elcsúszással olvasódnának le, akkor az első tripletet követő második triplet első két pozíciója már adott lenne, tehát csak négyféle triplet következhetne. A fehérjék aminosavsorrendjével kapcsolatban azonban már ismert volt, hogy bármilyen aminosavat bármilyen másik követhet a fehérjében. Másrészt ez a kódolási eljárás azért is előnytelen lenne, mert egyetlen mutáció így három egymást követő tripletet érintene, tehát három egymást követő aminosav is megváltozna.

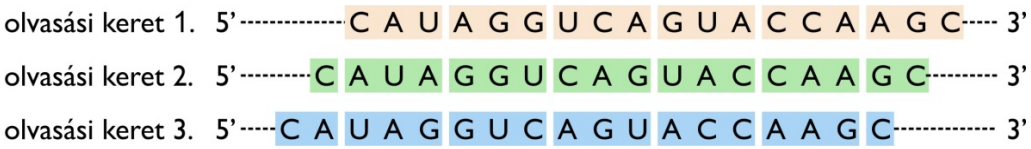
Ekkorra már Linus Pauling sarlósejtes anémiával kapcsolatos 1949-ben közölt eredménye alapján ismert volt, hogy azt az egyik hemoglobin láncban bekövetkező egyetlen aminosav cseréje okozza.

A kód tehát tripletekből áll, elválasztójeleket nem tartalmaz és átfedésmentesen olvasódik le.

15.1.6. Egyetlen érvényes leolvasási keret van

Az átfedés-mentes, tripletenkénti leolvasás elvileg nem zárná ki, hogy egy adott irányt tekintve három leolvasási keretben is értelmezhető legyen ugyanannak a nukleinsavnak a szekvenciája. Ez azt jelentené, hogy minden gén egyszerre három fehérje szekvenciáját kódolná. Ez az elvi lehetőség is egy tömörítést jelentene, hiszen egységnyi DNS mennyiségre háromszor annyi kódolt fehérje jutna, mint egyetlen érvényes leolvasási keret esetében (lásd **15.5. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



15.5. ábra: Egy DNS szálról lefordított mRNS szekvenciája elvileg 3 leolvasási keretben is lefordítható lenne

Azonban ez az eljárás is rugalmatlan lenne. Egyetlen pontmutáció egyszerre három fehérjét is érintene. Másrészt ekkora már a mioglobin és a hemoglobin térszerkezete kapcsán ismert volt, hogy a fehérjék komplex felépítésűek, 1961-ben pedig Anfinsen bizonyította, hogy a fehérje szekvenciája határozza meg a térszerkezetét és funkcióját.

A három, egyenkénti elcsúsztatással generált leolvasási keretben az egyes fehérjék szekvenciája olyan nagymértékben függene egymástól, hogy nem lenne elegendő szabadság a rendszerben ahhoz, hogy három egymástól független stabil térszerkezet jöhessen létre.

A **három lehetséges leolvasási keret közül** tehát **csak egy** lehet **érvényes**. Ez azt is jelenti, hogy kell, hogy legyen egy kezdő start triplet. Az is nyilvánvaló volt, hogy záró tripletnek, tehát stop jelnek is lennie kell.

15.2. A genetikai kód feltöréséhez vezető kísérletek

Az előzetes ismeretek, és a kódolási eljárásokkal kapcsolatos, elméletileg megalapozott feltételezések nyomán megindulhattak a kód feltöréséhez vezető konkrét kísérletek. Az alábbiakban ezeket vesszük sorra.

15.2.1. Az első tripletek jelentésének feltárása mesterséges homopolimer RNS-ekkel

Az első áttörést **1961**-ben **Marshall Nirenberg és Heinrich Matthaei** érték el *in vitro* előállított **homopolimer RNS**, mint mesterséges mRNS segítségével. A kísérletben Paul Zamecnik kóli kivonaton alapuló *in vitro* fehérjeszintézis eljárását fejlesztették tovább, és egy olyan enzimet használtak, amit 1955-ben **Severo Ochoa** izolált. Ochoa korábban kimutatta, hogy ezzel az enzimmel *in vitro* lineáris RNS-eket lehet előállítani. Mivel úgy tűnt, Ochoa felfedezte a sejt fő RNS-szintetizáló enzimét, 1959-ben megosztott orvosi Nobel-díjat kapott. (A másik díjazott Arthur Kornberg volt, aki a DNS-polimeráz I felfedezéséért, valamint a DNS szintézis kémiai alapjainak kidolgozásáért kapta a díjat.) Hamarosan kiderült, hogy az Ochoa által felfedezett enzimnek nincs köze a genetikai információhoz, hiszen ez az enzim mindennemű templát nélkül is katalizálta az RNS létrejöttét az alábbi séma szerint: $(NMP)_n + NDP \leftrightarrow (NMP)_{n+1} + P_i$.

(Vegyük észre, hogy az enzim NDP-t használ. Ma már tudjuk, hogy az enzim *in vivo* funkciója a fordított irányú reakció katalizálása, tehát RNS-ek degradálása nukleozid difoszfátokká.)

Ugyanakkor ez az enzim hatalmas áttöréshez vezetett a genetikai kód megfejtése terén. Nirenberg és Matthaei először poli-U szerkezetű mesterséges RNS-t inkubáltak olyan kóli extraktummal, amit előzetesen DN-ázzal kezeltek, hogy megszüntessék a kóli saját mRNS-einek utánpótlását. Ismerve, hogy az mRNS-ek rövidéletűek, a kóli saját mRNS készlete így nem jelentett gondot. A kóli kivonatot GTP-vel és ATP-vel is kiegészítették, valamint kívülről adtak be nagy koncentrációban aminosavakat.

A kísérlet során 20 reakcióedényt használtak. Mind a 20 edényben jelen volt mind a 20 aminosav, de mindegyik edényben csak az egyik fajta aminosav volt radioaktívan jelölt, edényenként mindig más és más.

A mesterséges **poli-(U)** mRNS radioaktív **poli-fenilalanin** peptidet eredményezett. Ezáltal megfejtették az **első triplet**et. Az UUU RNS nukleotid **triplet, más néven kodon**, fenilalanin aminosavat kódol!

Analóg kísérletekben a poli-(A) poli-lizint, a poli-(C) poli-prolint eredményezett. A poli-(G) négyláncú tetraplex szerkezetet képez, ezért nem működik. Három kodont tehát megfejtettek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

15.2.2. A random nukleotid keveréses módszer

Ochoa és Nirenberg csoportja között valódi verseny alakult ki a tripletek és a kódolt aminosavak egymáshoz rendeléséért. Mindkét csoport alkalmazta a **random nukleotid keverés módszer**ét. Meghatározott arányban adva az NDP nukleotidokat a polinukleotid-foszforiláznak random szekvenciájú RNS-ek jöttek létre. Az egyes tripletek aránya a kezdeti nukleotidok arányától függött. (A templát-független polinukleotid-foszforiláz random szekvenciájú RNS láncokat szintetizál.)

Például 5 egység ADP és 1 egység CDP olyan polimereket ad, melyekben átlagosan ötször annyi AMP egység van, mint CMP egység. Az egyes lehetséges tripletek aránya ez alapján számolható. Az AAA tripletből van a polimerben a legtöbb. Vegyük ennek valamilyen (nem %-ban értelmezett) mennyiség-egységét 100-nak. Az AAC, ACA, CAA tripletekből ehhez képest egyenként ötödannyi lesz, tehát mindegyikből külön-külön 20 egység. Az ACC, CAC, CCA tripletekből az előzőekhez képest is ötödannyi, vagyis 4-4 egység, végül a CCC tripletből ugyanilyen logika szerint 0,8 egység a várt „mennyiség”.

A kóli sejtmentes fehérjeszintézis rendszerben ilyen random polimer RNS alkalmazása után a radioaktív peptidek keverékében az egyes aminosavakat azonosították, és azok arányát megmérték. A kapott aminosav beépülési arányokat összevetették a tripletek arányával, és ezek alapján rekonstruálták, hogy az egyes aminosavakhoz hányféle, és milyen nukleotid összetételű tripletek tartozhatnak (lásd **15.1. táblázat**).

15.1. táblázat

Aminosav	A mért beépülési arányok (Lys=100)	A kodonok valószínűsített bázisösszetétele a kapott arányok alapján	A vélt kodon összetétel alapján várt arányok (Lys=100)
aszparagin	24	A_2C	20
glutamin	24	A_2C	20
hisztidin	6	AC_2	4
lizin	100	AAA	100
prolin	7	AC_2, CCC	4,8
treonin	26	A_2C, AC_2	24

Az már ismert volt, hogy az AAA triplet lizint jelent. Feltéve (és ez igaz volt), hogy a lizinhez nem tartozik citozin-tartalmú triplet, a lizin beépülésének mértékét az AAA kodon gyakorisághoz illeszkedve 100 egységnek vették. A lizinen kívül még 5-féle aminosav épült peptidbe. A prolin esetében ismert volt, hogy a CCC az egyik kodonja. A tapasztalt aminosav beépülési arányokat a legjobban a **15.1. táblázat**ban szereplő kodon összetételek magyarázták.

A pontos triplet szekvencia ugyan nem volt megállapítható, de a nukleotid összetétel igen. Például egyértelműen kiderült, hogy a hisztidint ebben a keverékben AC_2 összetételű triplet kódolja, de azt nem tudjuk, hogy ez CAC, CCA, vagy ACC. Az is látszik, hogy három aminosavhoz (His, Pro, Thr) is fel kellett tételezni AC_2 összetételű tripleteket. 1964-re szinte az összes aminosavra meghatározták a kódoló triplet összetételét, de még mindig nagyon kevés konkrét kodont sikerült megfejteni.

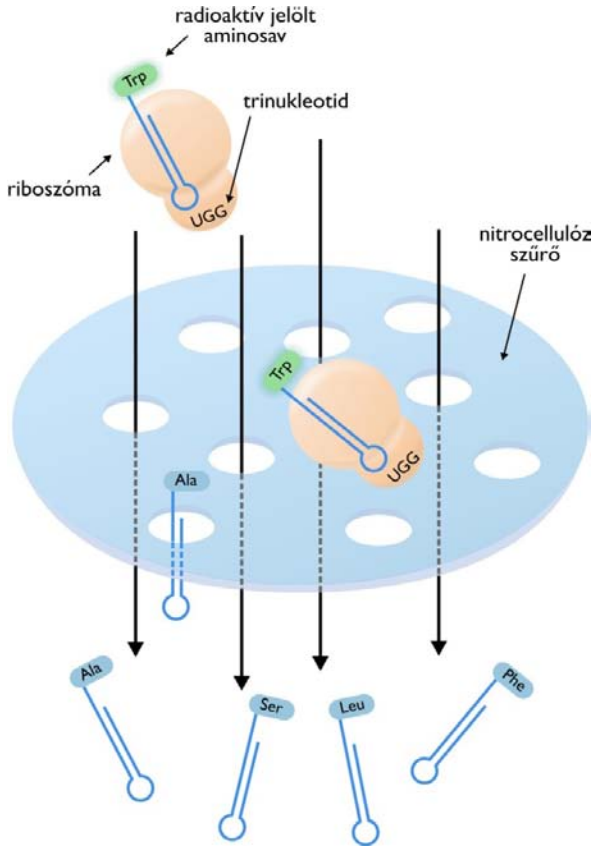
15.2.3. Szintetikus trinukleotid módszer: a Nirenberg-Leder kísérlet

A következő áttörést ismét **Nirenberg** ötlete hozta, amikor 1963-ban kiderült, hogy a riboszóma stabil komplexet képez az aminosavat hordozó tRNS-sel mRNS jelenlétében. Nirenberg eltűnődött azon, hogy vajon mi lehet egy ilyen kísérletben a legkisebb még használható mRNS, vajon egyetlen triplet elegendő-e. Nos, hamar kiderült, hogy a válasz, igen. Hatalmas elánnal új ötletek nyomán elkezdtek **mesterséges tripleteket** készíteni az akkoriban már beszerezhető 16-féle dinukleotidokból. Ehhez enzimeket használtak.

A módszer rendkívül elegáns ötlete a következő volt: az aminosavat szállító tRNS és a triplet, mint „mesterséges mRNS” átmegy egy megfelelő méretű pórusokat tartalmazó nitrocellulóz szűrőn, a hatalmas riboszóma azonban nem. Az aminosavat hordozó tRNS mRNS nélkül nem kötődik a riboszómához, de mRNS, vagy azt helyettesítő

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

specifikus trinukleotidok jelenlétében igen, és ebben az esetben a riboszómához kötődve fennakad a szűrőn (lásd **15.6. ábra**).



15.6. ábra: Nirenberg és Leder szintetikus trinukleotid módszere

Nirenberg és Leder ezzel a módszerrel az esetek többségében meg tudta állapítani, hogy az egyes trinukleotidokhoz mely aminosavak tartoznak. A kísérlet során radioaktív aminosavakat hordozó tRNS-eket használtak. Azt korábban Zamecnik már megoldotta, hogy az ilyen aminoacil-tRNS molekulákat hogyan lehet izolálni. A kísérlet kiértékelésénél azt kellett meghatározni, hogy egy adott triplet esetében melyik aminosav okozza a legnagyobb radioaktív jelet a szűrőn. Elsőként a három már ismert, általuk korábban meghatározott tripleteket vizsgálták meg, az eredményt a **15.2. táblázat** mutatja. (A táblázatban radioaktivitási adatokon alapuló, a filterre került aminosav mennyiségek szerepelnek mikromólban.)

15.2. táblázat

	Riboszómához kötött ^{14}C-jelölt aminacil-tRNS		
Trinukleotid	Phe-tRNS^{Phe}	Lys-tRNS^{Lys}	Pro-tRNS^{Pro}
UUU	4,6	0	0
AAA	0	7,7	0
CCC	0	0	3,1

Minden trinukleotidot megvizsgáltak mind a 20 aminosav esetében. Ezzel a módszerrel a 64 lehetséges triplet közül 50 esetében meghatározták, hogy milyen aminosavat kódolnak.

A nagyon gyengén kötődő tripletek, illetve a stop kodonok esetére azonban más eljárás kellett.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

15.2.4. Khorana repetitív ismétlődéseket tartalmazó szintetikus RNS módszere

Khorana olyan kémiai eljárást dolgozott ki, amivel kisebb, **ismert szekvenciájú oligonukleotidok**at tudott összeépíteni. Ezáltal olyan szintetikus RNS-eket készített, amelyekben 2, 3, vagy 4 bázisnyi szekvencia ismétlődött.

A kétbázisos ismétlődés tripletek alternatív váltakozását jelenti. Például a CA ismétlésekből CACACACACA... keletkezik, amelyben a CAC és ACA tripletek váltogatják egymást. Ez a kóli kivonat alapú *in vitro* fehérjeszintetizáló rendszerben Thr-His-Thr-His szekvenciájú polipeptideket eredményezett.

Nirenberg és Ochoa összetételre vonatkozó kísérleteivel összevetve (AC_2 His-t ad) látható, hogy a CAC a His, míg az ACA a Thr kódoló tripletje.

A hárombázisos ismétlődés háromféle egyenként homogén összetételű polipeptidet adhat. Például az ACCACCACCACC szekvenciájú RNS háromféle polipeptidet eredményezett, poli-treonint, poli-hisztidint és poli-prolint.

A négybázisos ismétlődés akárhol kezdődik a leolvasása, lényegében egyféle polipeptidet ad, amiben négyféle aminosav szabályosan ismétlődik (lásd **15.3. táblázat**).

Az aminosavat nem kódoló stop tripletek meghatározása is ezzel a módszerrel történt. Három nukleotidos ismétlődéseknél egyes esetekben az egyik leolvasási keret stop kodonok egymásutánját jelentette, így háromféle helyett csak kétféle poli-aminosav keletkezett.

A négy nukleotidos ismétlődésnél pedig di-és tripeptidek keletkeztek, vagyis az aminosavakat kódoló tripletek között jelentek meg a stop-jelek.

A fent ismertetett megközelítésekkel **1966-ra megfejtették az összes triplet jelentését**. Kiderül, hogy az elméleti várakozásoknak megfelelően van egy specifikus kezdő triplet. Ennek fényében meglepő volt, hogy az *in vitro* kísérletek e nélkül is eredményre vezettek. Mint később kiderült, a normálisnál jóval magasabb Mg^{2+} koncentráció miatt a riboszóma kezdő kodon hiányában is el tudta kezdeni a szintézist.

A genetikai kód megfejtésében elért eredményeiért Nirenberg és Khorana 1968-ban orvosi Nobel-díjat kaptak. A harmadik díjazott Robert Holley volt, aki 1964-re megfejtette az alanint hordozó tRNS teljes nukleotid sorrendjét.

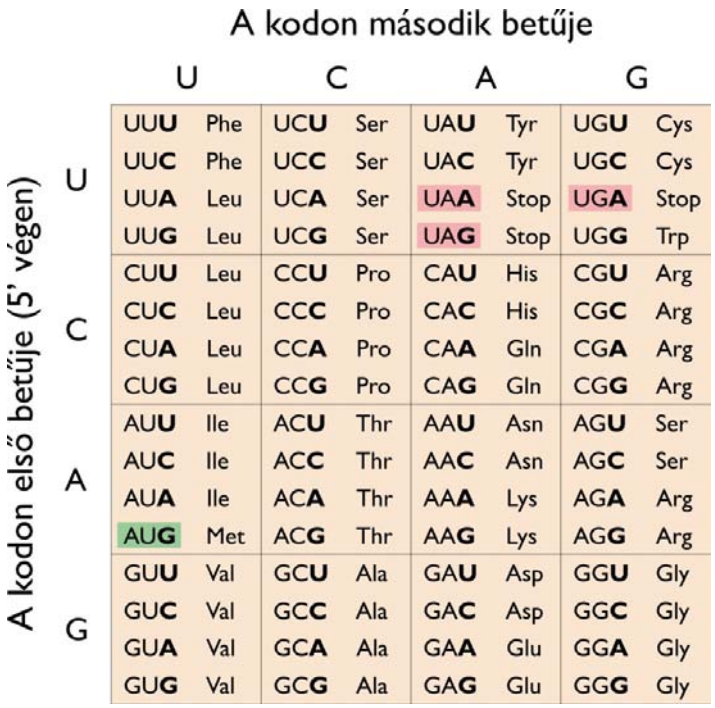
15.3. táblázat

Polinukleotid	Polinukleotid termék
Trinukleotid ismétlések	
$(UUC)_n$	$(Phe)_m\ (Ser)_m\ (Leu)_n$
$(AAG)_n$	$(Lys)_m\ (Arg)_m\ (Glu)_n$
$(UUG)_n$	$(Leu)_m\ (Cys)_m\ (Val)_n$
$(CCA)_n$	$(Pro)_m\ (His)_m\ (Thr)_n$
$(GUA)_n$	$(Val)_m\ (Ser)_m$ (lánczáródás)
$(UAC)_n$	$(Tyr)_m\ (Thr)_m\ (Leu)_n$
$(AUC)_n$	$(Ile)_m\ (Ser)_m\ (His)_n$
$(GUA)_n$	$(Asp)_m\ (Met)_m$ (lánczáródás)
Tetranukleotid ismétlések	
$(UAUC)_n$	$(Tyr–Leu–Ser–Ile)_n$
$(UUAC)_n$	$(Leu–Leu–Thr–Tyr)_n$
$(GUAA)_n$	di- és tripeptidek
$(AUAG)_n$	di- és tripeptidek

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

15.3. A genetikai kódszótár szabályos szerkezete

Miután az összes triplet jelentése azonosításra került, rendezett formában össze lehetett állítani az úgynevezett **genetikai kódszótár**t. Ennek mára egyezményesé vált formáját a **15.7. ábra** illusztrálja.



15.7. ábra: A genetikai kódszótár legelterjedtebb ábrázolási módja

Az **mRNS-ről lefordításra kerülő tripletek**et Sydney Brenner nevezte el az ötvenes évek végén **kodonok**nak, és később Nirenberg is átvette ezt a mára hivatalossá vált elnevezést. A genetikai kódszótárban 5'→3' irányban felírt RNS kodonok vannak aminosavakhoz rendelve. Amikor Robert Holley 1964-ben megfejtette az első tRNS szekvenciát, ami az élesztő alanint hordozó tRNS-ének szekvenciája volt, azonnal felhívta Nirenberg figyelmét arra, hogy a szekvenciában azonosította azt a bázishármast, az antikodont, ami antiparallel elrendezésben bázispárosodásra képes a Nirenberg által megfejtett alanin kodonokkal.

Francis Crick adapter hipotézise tehát a bázishármasokon keresztüli kiolvasás tekintetében is igazolódott.

A kódszótárban az egyes kodonok az alábbi logika szerint vannak egyetlen nagy négyzetbe rendezve. Az első két kodon pozíció alapján a nagy négyzet 4 x 4 = 16 kisebb négyzetre van felosztva. A négyzetek az első kodon pozíció szerint sorokba vannak rendezve, felülről lefelé U,C,A,G sorrendben. Az első sort alkotó négy négyzetben tehát csupa olyan kodon van, amelynek 5' pozíciójában a bázis uracil, a másodikban citozin, a harmadikban adenin, a negyedikben guanin.

A négyzetek a második kodon pozíció alapján szintén U,C,A,G sorrendben oszlopokba vannak rendezve. Az első oszlopban tehát olyan négyzetek vannak, amelyekben a kodonok második pozíciójában uracil szerepel.

A 16 kis négyzet mindegyikébe 4 kodon jut, amelyek a harmadik pozícióban szereplő bázis alapján egymás alá rendeződnek.

A kódszótárt szemlélve azonnal szembeötlő, hogy az egyszerű matematikai eljárás szerint mátrixba rendezett kodonokhoz tartozó **aminosavak elrendeződése nem véletlenszerű**. Ennek egyrészt molekulaszerkezeti, másrészt evolúciós magyarázata van. A molekulaszerkezeti ok a **kodon-antikodon kapcsolat** sajátosságait jelenti, míg az evolúciós ok az ilyen elrendeződés adaptív jellegével magyarázható. Mindkettőt részletesebben is kifejtjük.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

15.3.1. A kodon-aminosav hozzárendelés szabályossága

A kódszótár alapján látható, hogy az XYU és XYC kodonok mindig ugyanazt az aminosavat kódolják. Ha tehát két kodon bázis sorrendje csak a harmadik pozícióban tér el egymástól, és a harmadik pozícióban mindkettő pirimidin bázist tartalmaz, akkor ez a két kodon ugyanazt az aminosavat jelenti.

Analóg módon, de két kivétellel, ez az XYA és XYG kodonokra is igaz. Tehát ha két kodon bázissorrendje csak a harmadik pozícióban tér el egymástól, és ebben a pozícióban mindkettő purin bázist tartalmaz, akkor a két kodon ugyanazt az aminosavat jelenti, kivéve az AU(G/A), Met/Ile és az UG(G/A), Trp/Stop esetet.

Ismert tény, hogy a DNS-ben bekövetkező báziscserés mutációk nem azonos gyakoriságúak. Sokkal gyakoribb, hogy egy pirimidin a másik pirimidinre cserélődjön, mint hogy purinra, illetve hogy egy purin a másik purinra cserélődjön, minthogy pirimidinre. A tranzíció (primidin csere pirimidinre, ill. purin purinra) sokkal gyakoribb, mint a transzverzió (pirimidin csere purinra vagy purin pirimidinre).

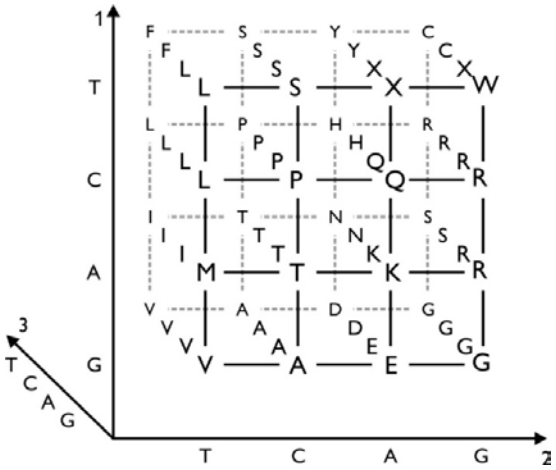
Vegyük észre, hogy amikor a DNS-ben egy olyan pozícióban történik egy T→C, vagy C→T csere, amelyik az mRNS kodon 3. pozícióját érinti, akkor az nem okoz aminosav cserét a fehérjében, vagyis csendes mutáció lesz. Az említett két kivétellel igaz ez a 3. kodont érintő A→G és G→A mutációkra is. Ha véletlenszerűen lettek volna rögzítve a kodon-aminosav párok, akkor sokkal nagyobb gyakorisággal okozna egy ilyen pontmutáció aminosav cserét.

A 16 kis négyzet közül 8 olyan van, amelyben csak egyféle aminosav szerepel. Ezek esetében a 3. kodon pozícióban bármilyen báziscsere történhet a DNS-ben, az csendes mutáció lesz. A maradék 8 négyzet esetében a négyzeten belül legfeljebb 2 aminosav van, amelyek kémiai karaktere az esetek többségében hasonló (pl. Asp/Glu; Leu/Phe, His/Gln). Tehát a 3. kodon pozíciót érintő mutáció vagy nem okoz aminosav cserét, vagy a csere egy hasonló kémiai karakterű aminosavra történik. A kódszótárban szereplő rendezett aminosav kiosztás tehát az aminosavak kémiai karaktere szerint is mutat egyfajta szabályosságot.

Erre egy további példa, hogy azok az aminosavak is többnyire hasonlítanak egymáshoz kémiailag, amelyek kodonja csak az első kodon pozícióban tér el egymástól. Ezt a kódszótár térbeli ábrázolásán könnyebb felismerni (lásd **15.8. ábra**), ahol a függőleges irányban lévő aminosavak tartoznak ilyen értelemben össze.

A csak az első kodon pozíciójukban eltérő aminosavak az alábbi csoportokat alkotják: (F,L,I,V) és (L,M,V), amelyek apolárosak; (S,P,T,A), amelyek kisméretűek, (Y,H,N,D) és (Q,K,E) amelyek polárosak. Csak a negyedik csoportban (C,R,S,G) illetve (W,R,G) nincs közös tulajdonsága a benne szereplő aminosavaknak.

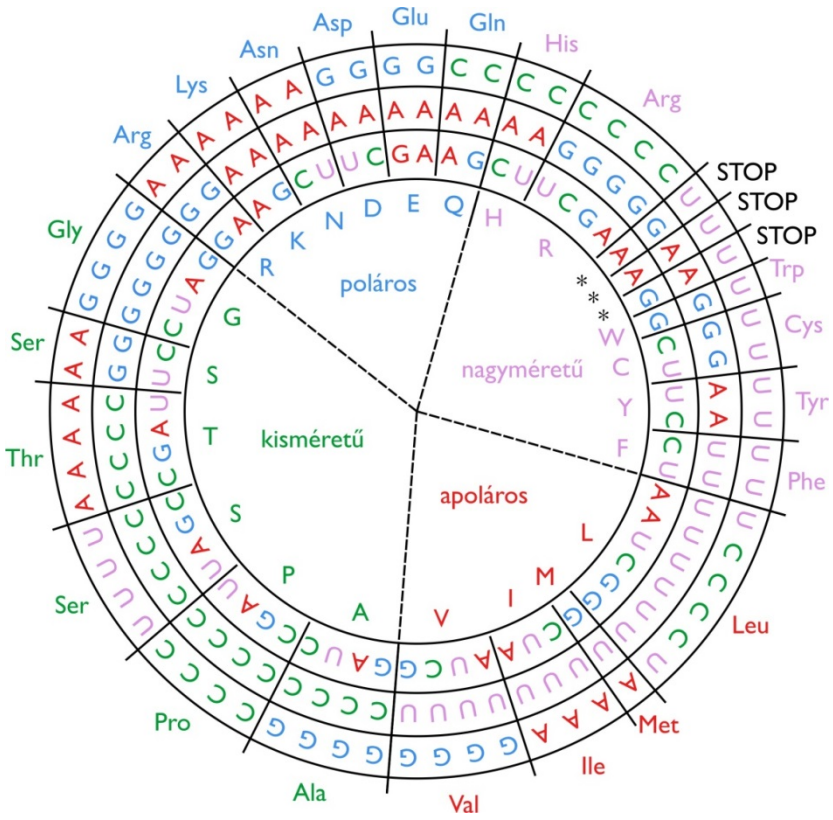
Csak a második kodon pozíciót érintő báziscserék esetében nem fedezhető fel ilyen határozott trend.



15.8. ábra: A kódszótár térben ábrázolva

Egy, a hagyományostól eltérő kodon elrendezéssel látványosan illusztrálható, hogy azok a kodonok, amelyek egyetlen báziscserével egymásba alakíthatók, a random kiosztáshoz képest jóval nagyobb arányban azonos, vagy hasonló fizikokémiai karakterű aminosavat jelentenek (lásd **15.9. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



15.9. ábra: A kódszótárban az egyes kodonok nem random módon vannak aminosavakhoz rendelve, a hasonló szekvenciájú kodonok többnyire hasonló tulajdonságú aminosavat kódolnak

A **genetikai kód** tehát úgy evolválódott, hogy **minimalizálja a pontmutációk hatását.**

15.3.2. Degenerált kód és lötyögő kodon-antikodon kapcsolat

A genetikai kóddal kapcsolatos legelső elméleti megfontolások is világossá tették, hogy 20 aminosav kódolásához legalább 3 nukleinsav egység kell. A tripletek viszont 4 x 4 x 4 = 64 kombinációt tesznek lehetővé a 20 aminosav számára. Az elméleti alapú kódfejtők ma már nehezen érthető okból azon ügyködtek, hogy hogyan lehet olyan egy-egy értelmű kódolási/kiolvasási szabályt alkotni, amelyben a 64 kodonból csak 20 lesz értelmes, míg 44 nem jelent aminosavat.

Ahogyan azt a genetikai kódszótár is mutatja, a valóságban **61 aminosavat jelentő kodon és 3 stop kodon** van. Értelmes kodonból tehát több mint háromszor annyi van, mint aminosavból.

Ahogy ezt fentebb már említettük, a **genetikai kód** tehát matematikai kifejezéssel élve **degenerált**.

Fontos ugyanakkor kiemelni, a genetikai kód **ugyanakkor egyértelmű is**, azaz minden kodonhoz csak egyetlen aminosav tartozik (kivéve a stop kodonokat, melyekhez egy sem).

Az egyes aminosavakhoz tartozó kodonok számát a **15.4. táblázat** foglalja össze.

15.4. táblázat: Az egyes aminosavakhoz tartozó kodonok száma

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

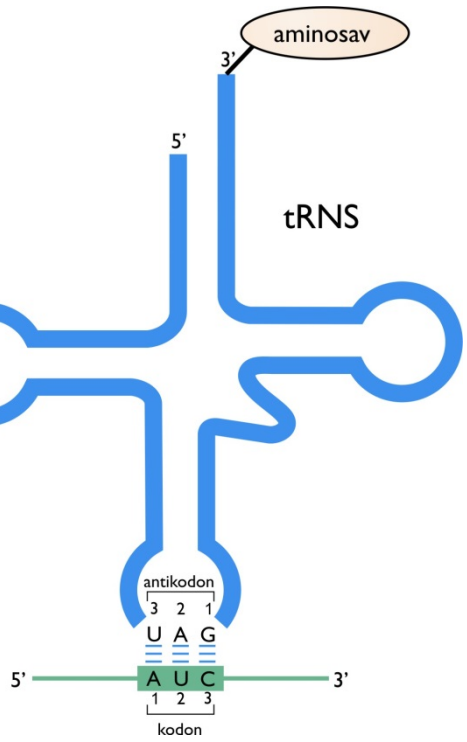
Aminosav	Kodonok száma	Aminosav	Kodonok száma
Ala	4	Leu	6
Arg	6	Lys	2
Asn	2	Met	1
Asp	2	Phe	2
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Ser	6
Glu	2	Thr	4
Gly	4	Trp	1
His	2	Tyr	2
Ile	3	Val	4

Tehát 9 aminosavnak 2 kodonja van, 5-nek 4, 3-nak 6, 2-nek 1, és 1-nek 3. A 6 kodonnal bíró aminosavakat leszámítva, amikor egy aminosavat több kodon határoz meg, akkor a kodonok közötti különbség a harmadik nukleotid pozícióban van. Hat azonos jelentésű kodon esetében a különbség természetesen egynél több pozíciót kell, hogy érintsen.

Mint említettük, a nem véletlenszerű kodon-aminosav kiosztás részben molekulaszerkezeti okokra vezethető vissza. Ez az ok a kodon-antikodon kapcsolatban keresendő.

Az **mRNS-en lévő kodon a tRNS-en lévő antikodonnal lép kapcsolatba**. A komplexben a két nukleinsav lánc **antiparallel elrendeződésű**.

Első ránézésre a legegyszerűbb dekódolási rendszer az lenne, ha a 61 kodont 61 antikodon olvasná ki, és mindhárom kodon pozícióban Watson-Crick bázispárok jönnének létre (lásd **15.10. ábra**).



15.10. ábra: A tRNS vázlatos szerkezete (lóhere alak)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ekkor a 61 értelmes kodonnak megfelelően 61-féle antikodon, vagyis legalább ennyiféle tRNS kellene. Csakhogy hamar kiderült, hogy a kólibaktériumban vagy az élesztőben ennél jóval kevesebb tRNS van.

Ebből azonnal következett, hogy a kiolvasás alapja nem lehet mindhárom pozíció tekintetében tökéletes Watson-Crick bázispárosodás. Amikor Robert Holley1964-ben azonosította az élesztő alanin-tRNS-ében az antikodont, érdekes tényre hívta fel a figyelmet. Arra, hogy az antikodon 3. és 2. pozíciója (C illetve G) hagyományos Watson-Crick bázispárt tud képezni az alanin kodonok 1. és 2. pozíciójával (G illetve C), míg az antikodon első, tehát 5' pozíciójában egy módosult bázis, inozin van.

A fenti ismeretek alapján Francis **Crick 1966**-ban közölte a „**lötyögő** (*wobbling*) **kodon-antikodon kapcsolat"** hipotézisét. Ebben feltételezte, hogy az első két kodon pozíció minden esetben hagyományos Watson-Crick bázispárt képez, míg a 3. pozícióban az ott lévő bázistól függően eltérő megoldások lehetnek, amelyek miatt 61-nél kevesebb antikodon is elég lehet a 61 kodon egyértelmű kiolvasásához.

A **kodon harmadik pozícióját** érintő lötyögő kapcsolatban **megengedett bázispárosodások**at a **15.11. ábra** foglalja össze.

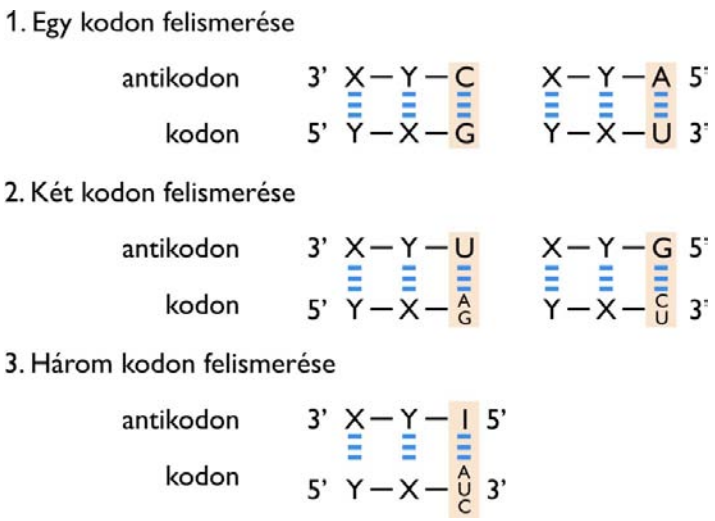
Tehát ha az antikodon első pozíciójában C van, az csak G-t, ha A van, akkor az csak U-t ismer fel a kodonon.

Ha az antikodon első pozíciójában U van, az A-t és G-t, ha G van, akkor az C-t és U-t ismer fel. (Ez utóbbi magyarázza, miért lehetnek univerzálisan azonos jelentésűek az XYC és XYU kodonok).

Végül, ha az antikodon első pozíciójában I (inozin) van, akkor az U-t, C-t és A-t ismer fel.

Összefoglalva: az **első két kodon pozíció mindig tökéletes bázispárosodás**ban van. Az első antikodon pozíció határozza meg, hogy hányféle bázis lehet a harmadik kodon pozícióban, tehát hányféle kodont ismer fel az antikodon.

Ebből következik, hogy ha egy aminosavnak több kodonja van, akkor azok, amelyek az első két kodon pozícióban különböznek, mindenképpen különböző tRNS-t igényelnek (3 ilyen aminosav van, a Leu, a Ser, és az Arg).



15.11. ábra: Megengedett bázispárosodások

A kódszótár és a lötyögés szabályi alapján kiszámolható, hogy 32 tRNS elegendő lehet a 61 értelmes kodon lefordításához.

A **lötyögő kodon-antikodon** kapcsolat legalább két okból **előnyösebb**, mint ha mindhárom pozícióban Watson-Crick bázispárok lennének. Az egyik, hogy ezáltal jóval **kevesebb fajta tRNS**-t kell a sejtnek kódolni, és előállítani. A másik, hogy amennyiben mindhárom pozícióban Watson-Crick bázispárosodás lenne, úgy nagyon nagy stabilitási különbségek lennének az egyes kodon-antikodon párok között, ami negatívan befolyásolhatná a transzláció sebességét (a túl erős párok túl lassan válnának szét).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A harmadik kodon pozíció természetesen hozzájárul a specifitáshoz, de lötyögése kiegyenlítheti az egyes kodon-antikodon kapcsolatok affinitását. A túl erős kapcsolatokat gyengítve, gyorsíthatja a disszociációt, így növelve a transzláció sebességét.

A lötyögés ellenére a kodon-antikodon kapcsolat egyértelmű abban az értelemben, hogy minden kodont csak egyféle, annak megfelelő aminosavat szállító tRNS ismer fel.

15.4. A genetikai kód majdnem tökéletesen univerzális

Az első vizsgálatok arra utaltak, hogy a **genetikai kód univerzális**, azaz az egyes kodonok minden élőlényben ugyanazt az aminosavat jelentik. Ez a feltételezés rendkívül ésszerű volt, hiszen ha egy élőlényben már érvényben van egy adott genetikai kód, akkor annak megváltozása rendkívül negatív következményekkel járna. A genetikai kód technikailag legegyszerűbben úgy tudna megváltozni, ha egy tRNS génjében történne mutáció, és ennek következtében az adott tRNS az eredetitől eltérő kodont ismerne fel, vagy az eredetitől eltérő aminosavat hordozna. Ez azzal a következménnyel járna, hogy az összes olyan fehérje aminosavsorrendje megváltozna, amely fehérje mRNS-ében az adott tRNS számára felismerhető kodonok vannak. A fehérjék nagy mérete miatt belátható, hogy a fehérjék nagy részének megváltozna az aminosavsorrendje.

Mindez arra utalt, hogy a genetikai kód nem változhat meg. Az univerzalitása pedig azt mutatta, hogy a most létező élőlényekben működő genetikai kód már az összes élőlény közös ősében is ebben a formában volt jelen.

Ma már tudjuk, hogy a fenti logikus feltételezések ellenére néhány ritka **kivétel** is akad, amelyek **elsősorban a mitokondrium**okat érintik (lásd **15.5. táblázat**).

15.5. táblázat: A standard kódszótártól való eltérések

	Eddig felismert eltérések a kodonok jelentésében a mitokondriumok esetén				
Aminosav	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
Standard kodon jelentés	STOP	Ile	Arg	Leu	Arg
Vertebrata	Trp	Met	STOP	+	+
Drosophila melanogaster	Trp	Met	Ser	+	+
Saccharomyces cerevisiae	Trp	Met	+	Thr	+
Torulopsis glabrata	Trp	Met	+	Thr	?
Schizosaccharomyces pombe	Trp	+	+	+	+
Fonalas gombák	Trp	+	+	+	+
Trypanosoma spp.	Trp	+	+	+	+
Magasabbrendű növények	+	+	+	+	Trp
Chlamydomonas reinhardtii	?	+	+	+	?

Az első kivételt 1979-ben fedezték fel. Kiderült, hogy az emberi mitokondriumban néhány kodonnak más a jelentése, mint a standard kódszótárban.

A mitokondriumnak saját tRNS készlete van. Egyes tRNS antikodonok megváltozása tette lehetővé a kód variációt. A mitokondrium genomok nagyon kevés (10-20) fehérjét kódolnak, fehérjéik többsége a gazdasejt sejtmagjában kódolódik, ezért a mitokondriális tRNS-ek mutációja kevés fehérjét érintett.

Újabban egyéb, nem mitokondriális eltéréseket is találtak például **egyes archaeák**ban, ahol a 22. aminosavnak is nevezett pirrolizin beépítésére az egyik stop kodon (UAG) szolgál. Azok az UAG kodonok, amelyek nem stop jelként, hanem pirrolizin beépülésre szolgálnak, speciális szekvenciális környezetben vannak, ami által egy speciális

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

tRNS segítségével szelektíven felismerésre kerülnek. Az aminosav készlet bővítéséhez tehát egy speciális tRNS-nek, és egy külön enzimnek is ki kellett fejlődnie az evolúció során, amely a pirrolizint a tRNS-hez kapcsolja. Ezen kívül vannak eltérések a genetikai kódszótárban egyes protistáknál (pl. *Tetrachymena*) is.

A **genetikai kód**dal kapcsolatos legfőbb **szabályok** tehát a következők. A genetikai kód **triplet alapú, vesszőmentes, nem átfedő, degenerált, egyértelmű és közel tökéletesen univerzális**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

16. fejezet - Transzláció (fehérjeszintézis)

(szerző: Pál Gábor)

A genetikai információs útvonal (lásd **13.1. fejezet**) utolsó, fehérjeszintézishez vezető lépése a transzláció, amely során a lineáris, mRNS-en kódolt, 4-féle betűből álló információ alapján 20-féle aminosavból álló lineáris polipeptidlánc képződik.

(A latin eredetű transzláció kifejezés fordítást jelent, jelezve, hogy egy négybetűs nukleinsav nyelv húszbetűs aminosav nyelvre fordítódik.)

A transzláció a legbonyolultabb ismert bioszintetikus folyamat. Eukariótáknál ~70-féle riboszómális protein, 20-féle aminosav aktiváló enzim, ~12-féle egyéb enzim illetve szabályzó fehérje, ~40-féle tRNS és 4-féle rRNS vesz benne részt. A transzláció a legösszetettebb szupramolekuláris komplexen, a riboszómán zajlik, és az összes, felépítő folyamatra fordított kémiai energiának mintegy 90%-a fehérjeszintézisre fordítódik. Egy tipikus baktérium sejtben ~20,000 riboszóma, ~100,000 fehérjefaktor ~200,000 tRNS vesz részt, ami ~35% az összes szárazanyag tömegnek

16.1. A fehérjeszintézis és az mRNS-leolvasás iránya

16.1.1. A fehérje az N-terminálistól a C-terminális felé szintetizálódik

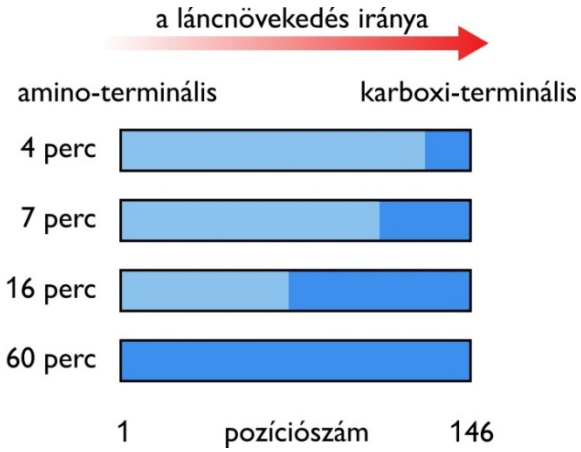
A **fehérjeszintézis irányá**t egy rendkívül szellemes kísérletben még azelőtt sikerült tisztázni, mielőtt az aminosavak összeépítésének pontos mechanizmusát feltárták volna. A kérdés egyszerű volt. Milyen irányban épülnek össze az aminosavak a fehérje szintézisekor? Maga a kérdés is egy rejtett, és megalapozatlan állítást tartalmaz, azt, hogy a folyamatnak van iránya. Elméleti alapon ugyanis számos lehetőség felmerült. Ezek közül az egyik valóban a szekvenciális felépülés, ami történhetne az N-től a C-terminális felé, fordítva, vagy esetleg vegyesen. A másik lehetőség, hogy a fehérje nem folyamatosan, aminosavanként épül fel, hanem előbb kis peptidek keletkeznek, majd ezek kerülnek összekapcsolásra. Annak eldöntése, hogy melyik modell a helyes, **Howard Dintzis** nevéhez fűződik.

Dintzis 1961-ben végrehajtott kísérletéhez egy olyan fehérjeszintetizáló rendszerre volt szükség, amely praktikusan csak egyfajta fehérjét állít elő. Természetes forrásként a vörösvértestek elő alakját, a retikulocitákat használta. Ezek a sejtek szinte csak hemoglobint szintetizálnak.

Dintzis a retikulocitáknak radioaktívan jelölt leucint adott, amely beépült a fehérjékbe. Kiderült, szobahőmérsékleten a beépülési folyamat túl gyors volt ahhoz, hogy követhesse, ezért a kísérletben a sejteket tartalmazó mintát 15ºC-ra hűtötte. Így már tudta időben követni a beépülést. A leucin adását követően különböző időtartamokban mintát vett, és izolálta a kész hemoglobin molekulákat. A csonka polipeptidek a riboszómákhoz voltak kötve. A riboszómákat ultracentrifugálással ki tudta ülepíteni, és velük együtt kiülepedtek a csonka fehérjék is. A teljes mértékben elkészült hemoglobinok a felülúszóban voltak.

A hemoglobinok α- és β-láncát külön vizsgálta. Elvégezte a láncoknak az „ujjlenyomat” analízisét. Ehhez tripszinnel hasította a láncokat, és a fragmentumokat egy kromatográfiát és elektroforézist kombináló kétdimenziós elválasztási módszerrel szeparálta. Ezekről a fragmentumokról korábban már kiderítették, hogy az eredeti polipeptidláncon hol helyezkednek el. A következőt állapította meg (lásd **16.1. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.1. ábra: Dintzis igazolta, hogy a fehérjeszintézis az N-terminális felől a C-terminális felé halad

Négy perc után radioaktivitás csak a C-terminális végi fragmentumban volt kimutatható. Az idő növelésével a radioaktivitás a C-terminális felől az N-terminális felé húzódik. Bár a jelölődés a C-től az N-terminális felé terjed, a kísérlet logikájából következően ez a láncépítés tekintetében éppen fordított irányt jelent.

Dintzis, csak a már elkészült, teljes hemoglobinokat vizsgálta. Amikor kevesebb időt hagyott a szintézisre, mint amennyi egy teljes lánc elkészítéséhez kell, csak olyan láncok kerülhettek radioaktív formában a felülúszóba, amelyek szintézise folyamatban volt, amikor a radioaktív leucin beadásra került. Ezekben a fehérjékben a jel beadásáig már elkészült rész nem hordozhatott radioaktív jelet, csak az a rész, amelyik a jel beadása után keletkezett. Az, hogy a jelölés először a C-terminálison jelent meg, majd előre húzódott, tehát azt jelentette, hogy **a polipeptidlánc szintézise az N-terminálistól a C-terminális felé** halad.

16.1.2. Az mRNS 5'→ 3'-irányban olvasódik le

Láttuk, hogy a poli-A szintetikus RNS kóli citoplazma kivonatban poli-lizin polipeptidet eredményez, tehát ha az RNS szekvenciája: 5’-AAAAAA…AAAAAA-3’, akkor a keletkezett polipeptid szekvenciája: NH2-Lys-Lys-…-Lys-Lys-COOH.

Miután kiderült, hogy a fehérjék a N-terminálistól a C-terminális irányába szintetizálódnak, valamint megfejtésre került a genetikai kód, a klasszikus kísérletet alapul véve megvizsgálták, milyen polipeptid keletkezik egy olyan RNS alapján, amely poli-A szerkezetű, kivéve a 3’ végét, ahol egyetlen C van: 5’-AAAAAA…AAAAAC-3’.

Kiderült, hogy egy ilyen RNS alapján olyan polipeptid keletkezik, amely csupa lizinből áll, kivéve a C-terminálisát, ahol aszparagin van: NH2-Lys-Lys-....-Lys-Asn-COOH

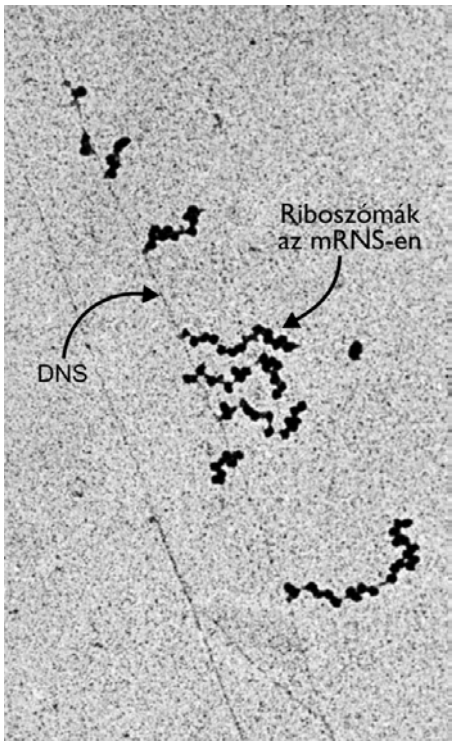
Mivel tudjuk, hogy az AAC triplet Asn-t kódol, és azt is, hogy a polipeptidlánc N-terminális felől szintetizálódik, egyértelmű, hogy az **mRNS az 5’ vég felől olvasódik le**. Ezt a tényt elektronmikroszkópos képek is igazolták (lásd **16.2. ábra**).

A kólibaktérium esetében kimutatták, hogy a még teljes hosszában el sem készült, éppen keletkező mRNS-re azonnal riboszómák kapcsolódnak.

A riboszómák csak akkor tudják azonnal „olvasni” az 5’→3’ irányban keletkező mRNS nukleinsav „szövegét”, ha ezt a „szöveget” 5'→3' irányban kell kiolvasni és lefordítani.

Azzal, hogy az mRNS keletkezésének iránya megegyezik a leolvasás irányával, a prokarióták sokkal gyorsabban képesek hasznosítani az mRNS-eket annál, mintha a leolvasás elkezdésével meg kellene várni, amíg az mRNS teljes hosszában létrejön. Eukariótáknál ez az előny nem jelentkezik, hiszen ott az RNS-nek még processzálódnia kell, és ki kell jutnia a sejtmagból.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.2. ábra: Prokariótákban a még el sem készült mRNS-en lévő információt a riboszómák azonnal elkezdik leolvasni

16.2. A fehérjeszintézis első fő szakasza, az aminosavak aktiválása és tRNS-hez kötése

A transzlációban szereplő rendszereknek két fontos feladatot kell megoldaniuk. Az egyik az, hogy az **aminosavak polipeptiddé kapcsolódás**át, ami egy önmagában **endergonik**us, tehát spontán végbe nem menő folyamat**, kapcsolt reakciók segítségével exergonikus**sá, spontán végbemenővé tegyék.

A másik feladat annak biztosítása, hogy az aminosavak összekapcsolódása az **mRNS-ben tárolt információ alapján** történjen meg.

A két feladat közös megoldásaként minden egyes **aminosav specifikus tRNS-hez kapcsolódik észterkötéssel a karboxil-terminálison keresztül**. A termodinamikai értelemben instabil észterkötés jelenti az **aktivált állapot**ot, hiszen az észterkötés bomlása, és ezzel egyidejűleg a stabilabb peptidkötés kialakulása összességében exergonikus folyamat.

A **tRNS, mint adapter molekula** olvassa ki az mRNS-en lévő információt. A specifikus aminosav-tRNS kapcsolat garantálja, hogy a polipeptid az mRNS-ben rejlő információ alapján keletkezzen.

Az aminosavak és a megfelelő tRNS-ek közötti észterkötés kialakítása a citoplazmában zajlik. A folyamat **ATP-igényes**, és **aminoacil-tRNS-szintetáz enzimek** katalizálják.

A 20-féle aminosavnak megfelelően minden élőlényben **20-féle** aminoacil-tRNS-szintetáz működik. Tehát minden aminosavhoz egyetlen specifikus tRNS szintetáz tartozik. Ez felismeri a neki megfelelő aminosavat, és egyúttal az adott aminosavhoz tartozó tRNS-eket.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy az aminoacil-tRNS-szintetázok „léptetik életbe” a genetikai kódot!

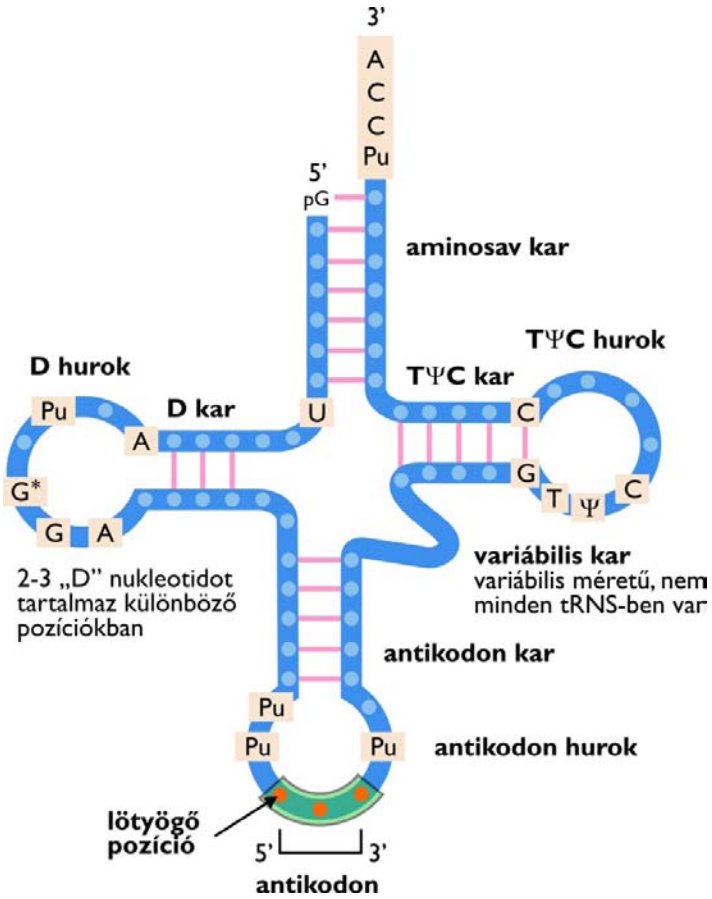
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

16.2.1. A tRNS-ek közös tulajdonságai, és másodlagos szerkezete

Amikor **Robert Holley 1964**-ben megfejtette az **első tRNS**, az élesztő alaninnak megfelelő tRNS-ének ($tRNS^{Ala}$) a nukleotid sorrendjét, a **szekvenciá**ban különös szabályszerűséget vett észre. Egyes szekvencia részleteket antiparallel elrendezve olyan bázisok kerültek egymással szembe, amelyek között Watson-Crick bázispárok alakulhattak ki. Amikor úgy rajzolta fel a szekvenciát, hogy az összes ilyen szakasz megtalálja a párját, megkapta a ma már közismert lóherealakot.

A nukleinsavak esetében a kizárólag a Watson-Crick bázispárosodások által diktált szerkezetet másodlagos szerkezeti szintnek hívjuk. A tRNS lóhere alakja tehát az elsődleges szerkezet alapján jósolt másodlagos szerkezetnek felel meg.

Az azóta megismert nagyszámú tRNS szekvencia alapján kiderült, hogy vannak olyan jellegzetességek, amelyek minden tRNS molekulára jellemzőek. A **16.3. ábra** a tRNS „lóhere alakján" kívül ezeket is ismerteti.



16.3. ábra: A tRNS-ek másodlagos szerkezete és közös elemei

Minden tRNS-nek legalább 4 „karja" van. A karokat az antiparallel elrendeződésű, egymással Watson-Crick bázispárokat képező láncrészek hozzák létre. Ezek közül az egyik az 5'- és a 3'-terminális szakaszok összekapcsolódásával alakul ki. Mivel a **3'-vég** minden tRNS esetében egy **CCA szekvenciá**t hordoz, és ezen keresztül kapcsolódik a szállított aminosav, ezért ezt a kart **aminosav kar**nak hívják.

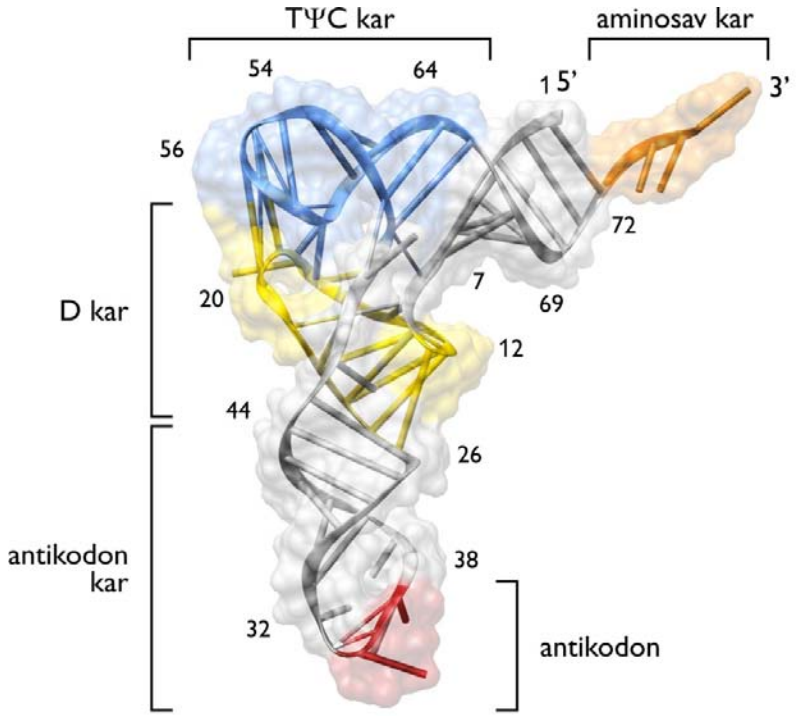
A másik három kar hurokban végződik, nevüket (D-kar, TΨC-kar és antikodon-kar) a hurok nevéről kapják. A **D-hurok** 2-3 pozícióban speciális módosult bázist, dihidrouridint (ennek a rövidítése „D") tartalmaz. A **TΨC-hurok** arról kapta a nevét, hogy minden tRNS-ben tartalmaz egymás után két módosult bázist, egy ribotimint és egy pszeudouridint, amit egy konzervált citozin követ. Az **antikodon hurok** természetesen az antikodont hordozza, ami **antiparallel elrendeződés**ben kapcsolatot teremt az **mRNS**-en lévő **kodonnal**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Egyes aminosavakhoz tartozó tRNS-ek egy ötödik, fajonként eltérő méretű kart is tartalmaznak, ennek neve **variábilis kar**.

Bár a tRNS lóhere ábrázolása széles körben elterjedt, könnyen felismerhető, 1974-ben kiderült, hogy a molekula térszerkezete ettől lényegesen eltér (lásd **16.4. ábra**).

Nagyjából egyidőben több kutatócsoport is megoldotta röntgendiffrakciós eljárással a tRNS térszerkezetét. Kiderült, hogy a molekula **térben** nagyjából **L-alak**ot ölt. Figyelemreméltó, hogy az adapter funkció két kritikus eleme, vagyis az aminosav-kar és az antikodon hurok a molekula két kiálló részén, egymástól a lehető legtávolabb vannak. Ezek a molekularészek nem vesznek részt molekulán belüli kölcsönhatásokban. Ugyanakkor mindkét rész kiválóan hozzáférhető molekulák közötti kölcsönhatás számára.



16.4. ábra: A tRNS térszerkezete

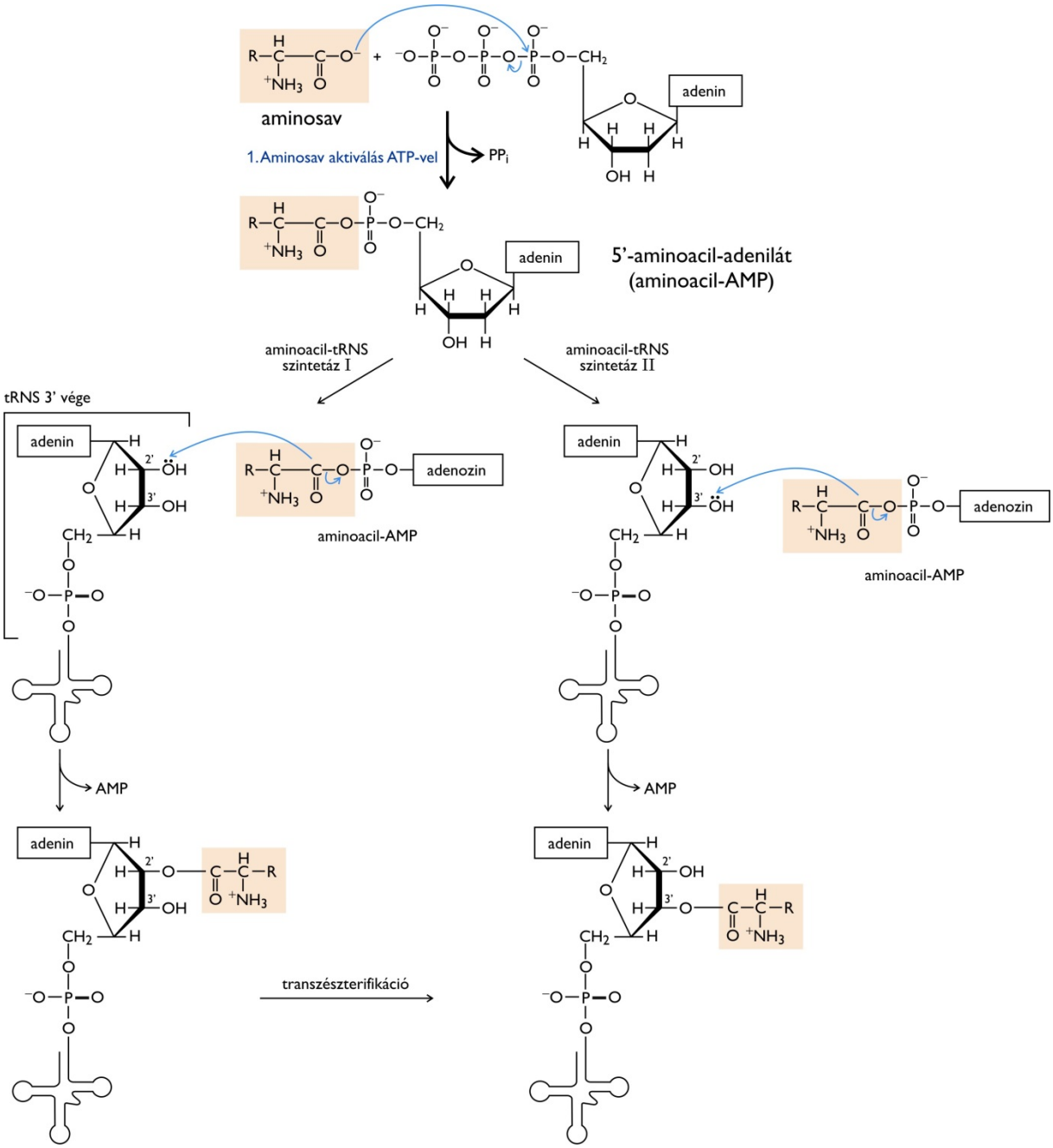
A lóhere ábrán szereplő **karok helikális szerkezet**be rendeződnek. A nem helikális szerkezetű részen lévő bázisok és ribóz 2'-OH csoportok is zömmel hidrogénhidas kapcsolatban vannak más csoportokkal. Az ezen a területen lévő bázispár kapcsolatok többsége nem követi a Watson-Crick szabályt, amelyet elsősorban a hosszabb helikális struktúrák követelnek meg.

A tRNS-ekre közösen jellemző **speciális módosult bázisok** (pl. dihidrouridin, pszeudouridin) a standardtól eltérő bázispárosodást tesznek lehetővé, és fontos szerepet játszanak a térszerkezet stabilizálásában. Az L-alak elsősorban annak az eredménye, hogy a D-kar és a TΨC-kar között részben ilyen csoportokon keresztül alakulnak ki kölcsönhatások.

16.2.2. Az aminosav aktiválás lépései

Az aminosavat specifikus **aminoacil-tRNS-szintetáz enzim** ismeri fel és köti meg, ami az aminosav karboxil csoportját ATP segítségével aktiválja. Ez **adenilálás**sal (más néven adenoribozilálás) történik, amelynek végeredménye egy vegyes savanhidrid. Az **aktivált AMP**-aminosav az **enzimhez kötve** marad. A reakció sémája tehát: **aminosav + ATP = aminosav-AMP + PPi** (lásd **16.5. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.5. ábra: A két aminoacil-tRNS-szintetáz osztály két, kissé eltérő módon hozza létre az amino-acil tRNS-t

Korábban már említettük, hogy az aminosav-AMP köztiterméket először Hoagland és Zamecnik izolálta.

A folyamat második szakaszában az aminoacil-tRNS-szintetáz enzim specifikusan felismeri, és köti az **aminosav**nak megfelelő tRNS molekulát. A **felismerés** egyik eleme **általában**, de nem feltétlenül az **antikodon hurok,** de **más** specifikus tRNS **elemek** is fontosak.

Az enzim katalizálja a tRNS „feltöltését” a megkötött aminosavval az alábbi séma szerint:

aminosav-AMP + tRNS = aminosav-tRNS + AMP.

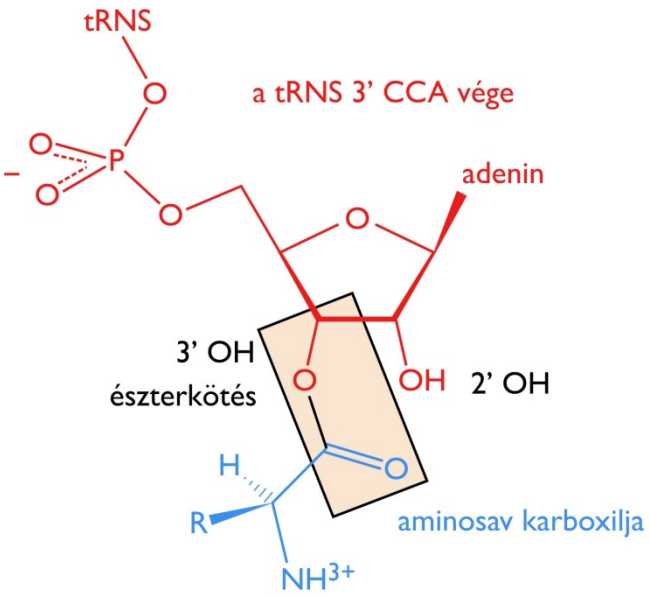
Az ATP-vel meghajtott aminosav aktiválás a kapcsolt reakciók szép példája! Az aminosav és a tRNS között az észterkötés magától nem jönne létre, az a reakció önmagában endergonikus lenne. Az ATP részvétele és exergonikus átalakulása AMP és PPi termékekre exergonikussá teszi a két részreakció összegét. Emlékeztetünk rá, hogy a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

pirofoszfát hidrolízise tovább fokozza a reakció szabadentalpia csökkenését, gyakorlatilag egyirányúvá téve a szintézist. A reakció részleteit a **16.5. ábra** mutatja be.

Mint kiderült, az **aminoacil-tRNS-szintetáz**oknak **két** evolúciósan elkülönülő **csoport**ja létezik. A 20-féle aminosavból tízet az I. osztályba, a másik tízet a II. osztályba tartozó enzimek töltik tRNS-re. A két osztály jellegzetesen eltér egymástól térszerkezet és katalitikus mechanizmus tekintetében. Amíg az I. osztály enzimei először a tRNS CCA végén lévő ribóz 2' hidroxiljára kapcsolják fel az aminosavat, majd az átkerül a 3' hidroxilra, addig a II. osztály enzimei rögtön a 3' hidroxilra helyezik az aminosavat.

A reakció végeredményeként kialakuló észterkötést, és annak molekuláris környezetét a **16.6. ábra** mutatja.



16.6. ábra: Az aminoacil-tRNS CCA végén lévő észterkötése

Az észterkötésben lévő aminosav továbbra is aktivált állapotban van. Az aminosavtól, és ezen keresztül az enzimtől függően az aminosavval töltött tRNS olykor nem válik le azonnal az enzimről, hanem **minőségi ellenőrzés** alá kerül. Ha nem a megfelelő aminosav került felkapcsolásra, az enzim elbontja az észter kötést.

Mielőtt megnéznénk ennek részleteit, felvetődik a kérdés, hogy miért szükséges ez a hibajavítás. A **16.1. táblázat** azt mutatja be, hogy a fehérje méretétől, és az aminosav beépítés hibaarányától függően milyen arányban keletkezhetnek hibamentes fehérjék.

16.1. táblázat

Hibás aminosav beépítésének gyakorisága beépítési lépésenként	Hibamentes aminosav sorrendű fehérje szintetizálásának valószínűsége Az aminosav csoportok száma a láncban		
	100	300	1000
10^{-2}	0,336	0,049	0,000
10^{-3}	0,905	0,741	0,368
10^{-4}	0,990	0,970	0,905
10^{-5}	0,999	0,997	0,990

Ahhoz, hogy nagy, pl. 1000 aminosavas fehérjék esetében is a szintetizált fehérjék 99%-a hibátlan szekvenciájú legyen, tehát 1 százalék alatt maradjanak azok, amelyek aminosavsorrendje nem felel meg a genetikai információ

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

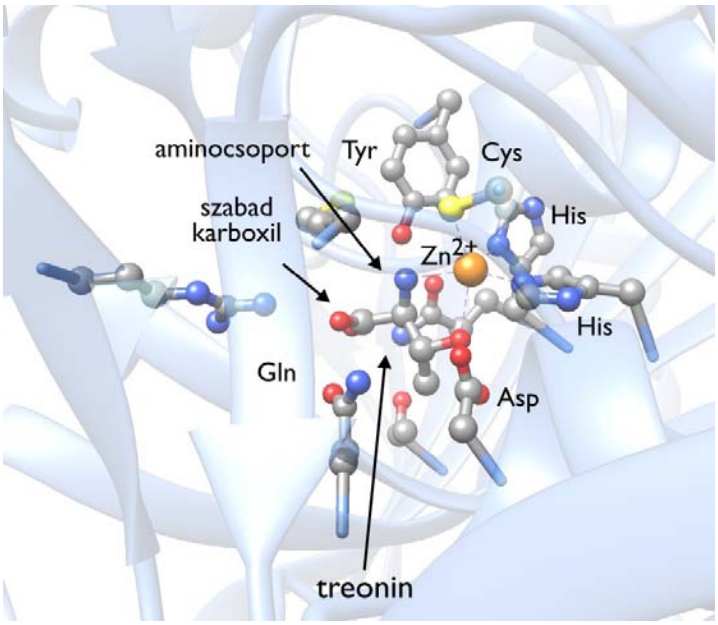
által diktáltnak, a hibás aminosav beépítésének gyakorisága nem lehet nagyobb, mint 1:100000, azaz egy a százezerhez.

A nagy megbízhatóságú kodon-antikodon kapcsolat mellett az alacsony hibaszázalék elengedhetetlen feltétele, hogy az aminoacil-tRNS-szintetázok legfeljebb minden százezredik katalízis során helyezzenek nem megfelelő aminosavat a tRNS-re.

Ezt a specifikus szubsztrát kötőhely önmagában lehetővé teszi azoknak az aminosavaknak az esetében, amelyek fizikokémiai értelemben kellően nagymértékben eltérnek a többi 19 aminosavtól. Ilyenkor a megfelelő aminosav kötéséhez és a nem megfelelő aminosavak kötéséhez tartozó affinitások kellően nagymértékben eltérnek. A kétféle affinitás különbsége, mint $\Delta\Delta G$ a termodinamika törvényei szerint meghatároz egy egyensúlyi állandót, egy arányt a megfelelő és nem megfelelő komplexek tekintetében, és ez az arány meghaladja a 10000:1 arányt.

Vannak azonban olyan aminosavak, amelyek esetében ez nem teljesül. A treonin például csak egyetlen extra metilcsoportban tér el a szerintől. A treonil-tRNS szintetáz kötőzsebe emiatt nagyjából 100 katalizált reakcióból 1 esetében szerin aminosavat helyez fel a normálisan treonint szállító tRNS-re.

A 16.7. ábra illusztrálja, hogyan képez komplexet a treonil-tRNS szintetáz a treoninnal.

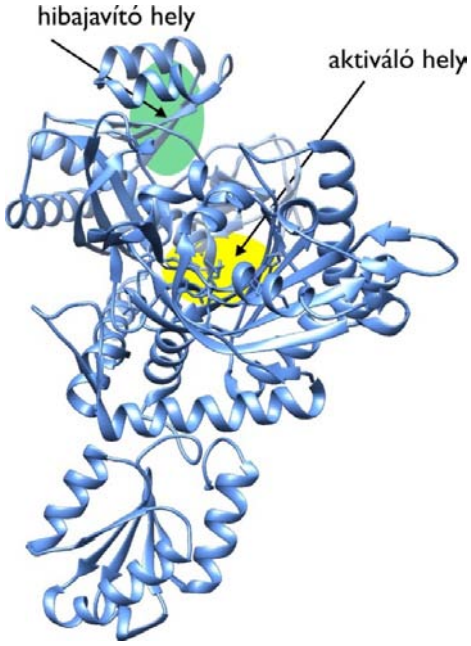


16.7. ábra: A treonil tRNS-szintetáz szubsztrátkötésének molekuláris részletei

Az enzim egy hisztidinek és cisztein által koordinált cink ionon keresztül stabilizálja a treonin aminocsoportját (ami minden aminosavban szerepel), és β-szénatomhoz kapcsolódó hidroxilját, ami csak a treoninban és a szerinben van. Ezt a hidroxilt egy aszpartát-csoport is stabilizálja hidrogénhíd kötéssel. A treonin β-szénatomhoz kapcsolódó metilcsoportját egy azzal komplementer hidrofób zseb fogadja be. A metilcsoport hiányában a szerin ~100-szor gyengébben kötődik. Ahhoz, hogy a hiba mégse 1% legyen, hanem jóval kisebb érték, egy, a szubsztrátkötő zseb specifitásától független mechanizmus is szükséges.

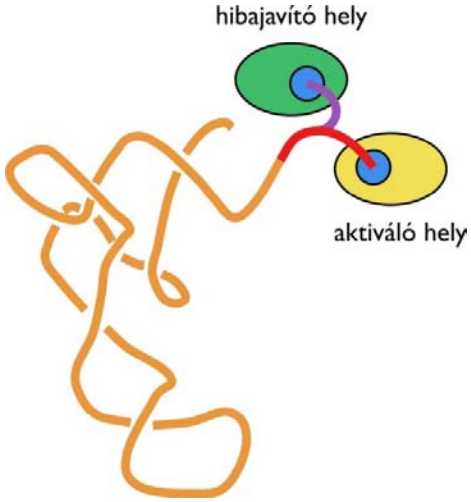
Az enzimnek van egy, a szintézist végző helytől elkülönülő **hibajavító hely**e is, ami a szerin esetében észleli a metilcsoport hiányát, és **elbontja az aminoacil-tRNS észterkötését**. A hidrolízist végző katalitikus centrum olyan kötőhellyel rendelkezik, amelyik nem befogadja be a metilcsoporttal rendelkező treonint, míg a szeril-csoport befogadásához optimális a szerkezete. A 16.8. ábra illusztrálja a két aktív helyet.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.8. ábra: A treonil tRNS-szintetáz enzim aktiváló- és hibajavító-helye (PDB: 1QF6)

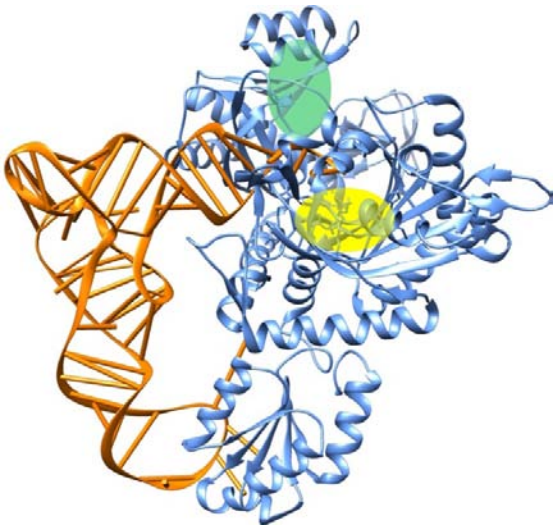
Látható, hogy a két hely egymástól meglehetősen távol helyezkedik el. Az aminosav két hely közötti ingázását az teszi lehetővé, hogy a tRNS 3'-vége elegendően flexibilis. Ezt a **16.9. ábra** illusztrálja.



16.9. ábra: Az aktiváló- és hibajavító-hely közötti ingázást a tRNS flexibilis karja teszi lehetővé

A komplex röntgendiffrakciós vizsgálatokból származó valós térszerkezeté a **16.10. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

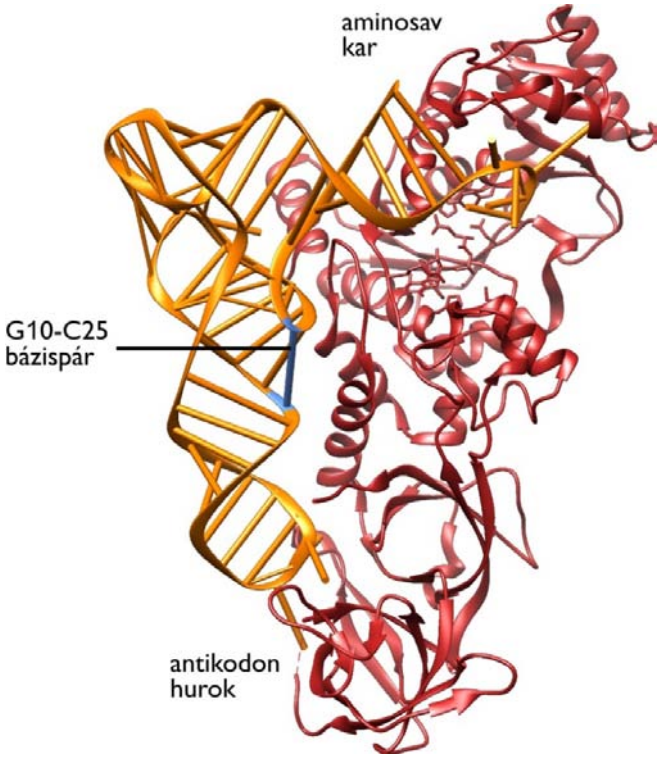


16.10. ábra: a treonil-tRNS és a treonil-tRNS-szintetáz komplexének térszerkezete (PDB: 1QF6)

16.2.3. A tRNS specifikus felismerése a szintetáz által

Az egyes aminoacil-tRNS-szintetázok különböző módokon ismerik fel a nekik megfelelő tRNS-t. A treonil-tRNS szintetáz például az antikodon hurkot és az aminosav-kart ismeri fel a $tRNS^{Thr}$-en (lásd **16.10. ábra**). Amikor a $tRNS^{Met}$ megfelelő részleteit ezekkel a $tRNS^{Thr}$ szakaszokkal helyettesítették, akkor a treonil-tRNS szintetáz a $tRNS^{Met}$-et is felismerte, és treoninnal töltötte fel. A $tRNS^{Thr}$-nek ezáltal azonosították az úgynevezett identitás elemeit, azokat az elemeit, amiket a neki megfelelő tRNS szintetáz felismer.

A glutaminil-tRNS szintetáz ugyanakkor az antikodon hurkon és az aminosav karon kívül egy harmadik elemet is felismer. Ez a tRNS „derekánál” lévő G10-C25 bázispár (lásd **16.11. ábra**).



16.11. ábra: A glutaminil-tRNS és a glutaminil-tRNS szintetáz komplexének szerkezete (PDB: 1QRT)

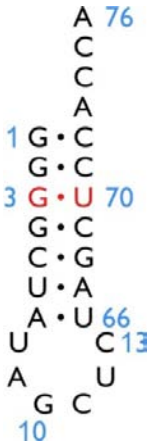
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ezekből a példákból azt hihetnénk, hogy minden aminoacil-tRNS-szintetáz az antikodon hurkon keresztül ismeri fel a neki megfelelő tRNS-eket. Ez egyfelől elméleti alapon sem valószínű, másfelől már a kutatások elején találtak ellenpéldát. Az elméleti megfontolás a következő.

Három olyan aminosav is van (Arg, Leu, Ser), amelyeknek 6 kodonjuk van. A 6 kodonból 4 csak a 3. kodon pozícióban tér el egymástól. Ezeket ki lehet olvasni 2 egymástól csak kissé eltérő antikodonnal. A másik két kodon azonban jelentősen eltér az előbbi négytől. Ezek kiolvasásához az előzőtől jelentősen eltérő antikodon kell. Az a szubsztrát zseb, amelyik az egyik antikodon szettet specifikusan meg tuja kötni, nem kötheti meg a másik szettet. Elvileg persze lehetne két eltérő kötőhelye az enzimnek, de nem ez a megoldás.

A lényeg, hogy az azonos aminosavakat szállító tRNS-eken legyen olyan közös specifikus elem, ami csak ezekre a tRNS-ekre jellemző, a többiben nem fordul elő. A megfelelő aminosav-tRNS szintetáz ezt a specifikus elemet ismeri fel szelektíven. Ez a specifikus elem a tRNS-ek egy részénél lehet éppenséggel az antikodon hurok, másoknál (lásd pl. Arg, Leu, Ser), ez eleve nem lehetséges.

Arra, hogy a szintetáz nem feltétlenül az antikodont ismeri fel, már az elsők között megismert tRNS-ek egyike is meglepő példával szolgált (lásd **16.12. ábra**).



16.12. ábra: A kóli alanil-tRNS szintetáza a tRNS^{Ala} szerkezetében egyetlen G3-U70 bázispárt ismer fel, ezért egy mesterséges mikro-RNS-t is feltölt alaninnal

A kóli alanil-tRNS szintetáza a tRNS^{Ala} egy apró egyedi részletét ismer fel, de az antikodon hurokhoz egyáltalán nem köt. Az enzim egy nem Watson-Crick bázispárt ismer fel a tRNS^{Ala} aminosav karján. A G3-U70 bázispár csak a tRNS^{Ala} szerkezetében fordul elő, a többi tRNS-ben nem. Az alanil-tRNS szintetáz számára egy szintetikus RNS is megfelel mint szubsztrát, ha tartalmazza a tRNS^{Ala}-ra jellemző aminosav kar részletet (lásd **16.12. ábra**). Az enzim ezt a tRNS-re alig emlékeztető molekulát alaninnal tölti fel.

16.3. A fehérjeszintézis riboszómális szakasza

16.3.1. A riboszómák térbeli és funkcionális felépítése

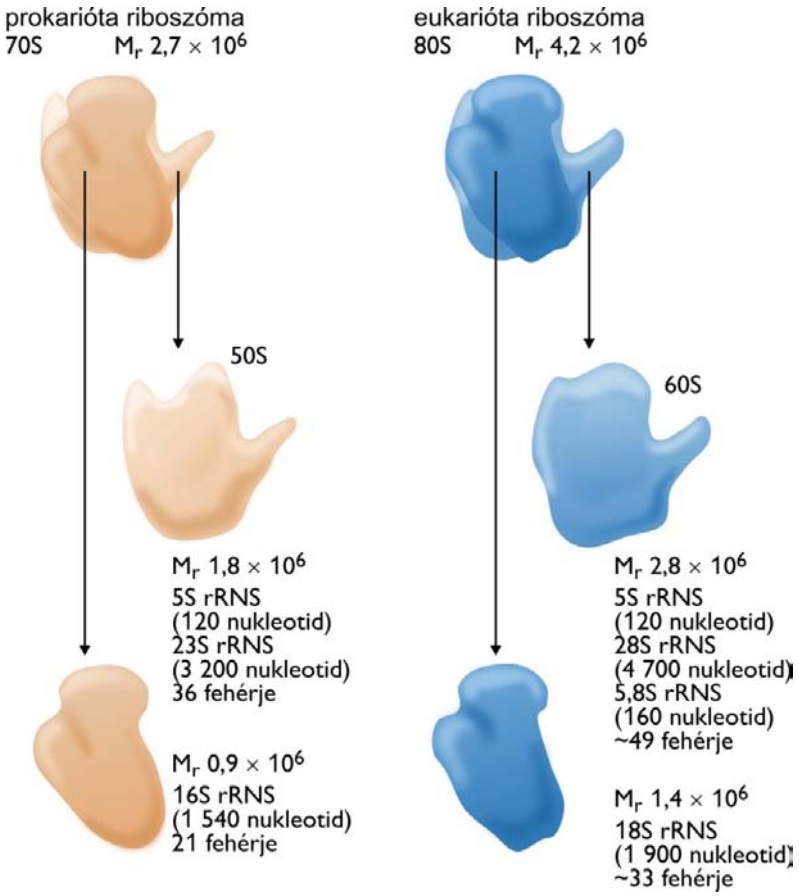
A tRNS-ek által szállított, aktivált állapotú aminosavakból történő fehérjeszintézis összetett szupramolekuláris gépeken, a **riboszómák**on zajlik. Itt kerül leolvasásra az mRNS-en kódolt információ, és itt zajlik ez alapján a lineáris polipeptid aminosav egységenkénti felépítése.

A riboszómák szupramolekuláris, **önszerveződő** képződmények. Riboszómális RNS-ek (**rRNS) és fehérjék** alkotják. A riboszómák ezekből az alkotóelemeikből spontán összeszerelődnek.

Mind a prokarióta, mind az eukarióta riboszómák **két alegység**ből állnak. Az egyes alegységeket méretükkel arányos szedimentációs együtthatójuk (Svedberg, lásd **6.2.3.1. fejezet**) alapján jelölik (lásd **16.13. ábra**).

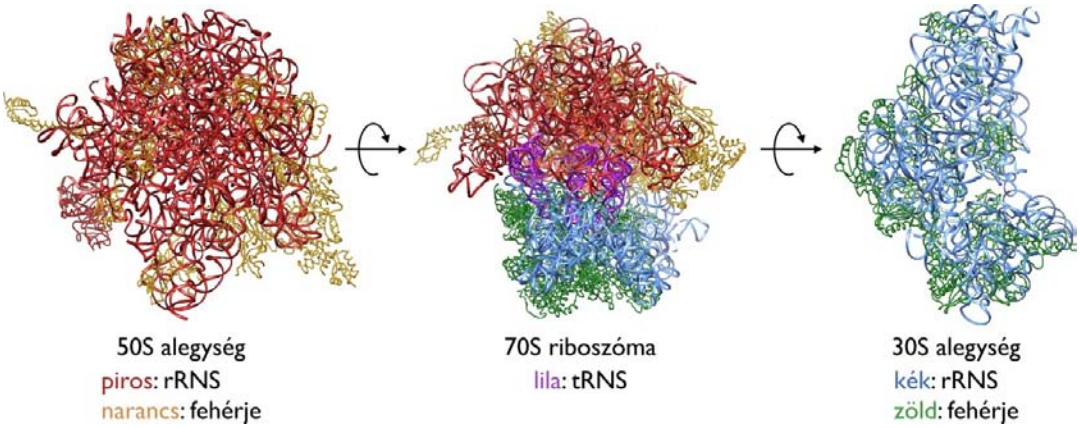
A **prokarióta riboszóma** mérete **70S**, a **kis alegység 30S** a **nagy 50S** méretű. Az **eukarióta riboszóma 80S** méretű, az egyes **alegységek** szedimentációs együtthatója **40S** illetve **60S**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.13. ábra: A prokarióta és az eukarióta riboszómák alapfelépítése

A riboszómákban a ribonukleinsav mennyisége dominál (lásd **16.14. ábra**), és mint kiderült, funkcionálisan is ezek játsszák a főszerepet – a riboszóma valójában egy óriási fehérjegép, amely a peptidkötés katalízise szempontjából, mint látni fogjuk, egy ribozim.



16.14. ábra: Egy prokarióta riboszóma röntgendiffrakciós szerkezete (PDB: 1FJG)

A prokarióta **riboszóma** röntgenkrisztallográfiás **szerkezet**ének megfejtéséért Venkatraman **Ramakrishnan**, Thomas A. **Steitz** és Ada E. **Yonath** 2009-ben kémiai Nobel-díjat kapott. A riboszóma a legnagyobb objektum, aminek eddig megoldották az atomi részletességű térszerkezetét. Ez önmagában is hatalmas tudományos teljesítmény. A tudományos értéket azonban az adja, hogy a szerkezet által a korábbinál sokkal megalapozottabb modellt lehetett alkotni a fehérjeszintézis mechanizmusáért. A Nobel-díj olyan tudományos teljesítményért jár, amely elméleti jelentőségén felül az emberiség javát is szolgálja. A sok esetben életmentő antibiotikumok jelentős része a bakteriális

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

riboszómát gátolja. A szerkezetek alapján választ lehet adni egy sor antibiotikum hatásmechanizmusára, sőt arra is, hogy miként válnak ezek ellen rezisztenssé a kórokozók.

A **16.14. ábrán** középen oldalnézetben szerepel a bakteriális riboszóma. A nagy alegység felül, a kis alegység alul helyezkedik el. Az ábra baloldalán a nagy, a jobboldalán a kis alegység látható. Mindkét alegység esetén arra a felszínre tekinthetünk rá, amelyik mentén a két alegység összekapcsolódik.

Jól látható, hogy a riboszóma mindkét alegysége esetében az RNS mennyisége lényegesen meghaladja a fehérje mennyiségét. A szétszedett állapotot mutató képen az is látszik, hogy a két alegység közötti területen, ahol a folyamatok döntő többsége lezajlik, szinte csak RNS található.

A riboszómális RNS-ek hatalmas méretű nukleinsavak, amelyeknek határozott térszerkezetük van, amelyen belül önálló feltekeredésre képes domének definiálhatók.

A **kis alegység** fő funkciója az **mRNS dekódolása**, míg a **peptidkötés kialakulásá**nak katalízise a **nagy alegység** területén zajlik.

Az mRNS a kisebbik riboszóma alegységhez kötődik. Ez prokariótáknál egy, az mRNS-en található speciális szekvencián keresztül történik (lásd **16.15. ábra**).



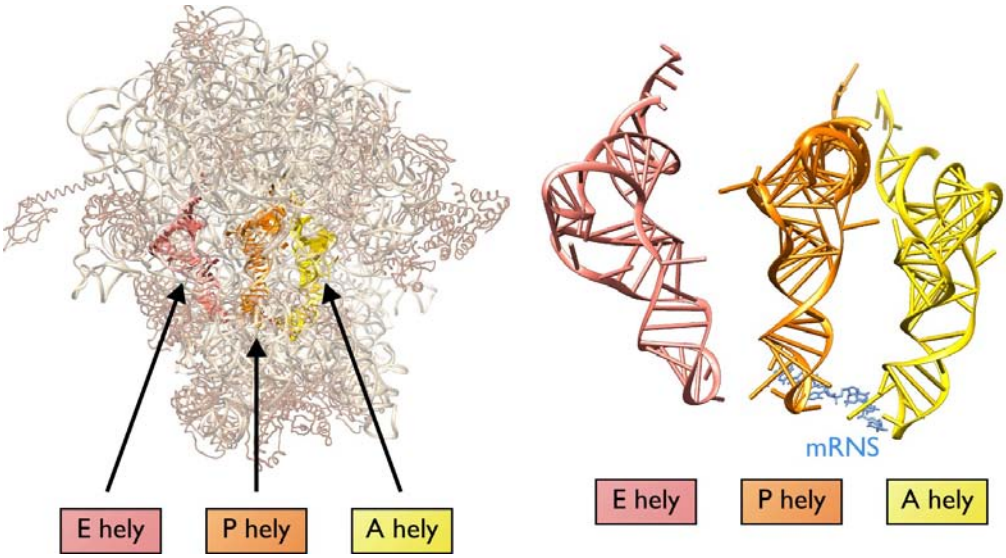
16.15. ábra: A prokarióta mRNS riboszómális felismerésének alapja a Shine-Dalgarno szekvencia

Számos kóli gén, vagy kóliban működő bakteriofág gén mRNS termékének a start kodontól 5' (*upstream*) irányba eső része jellegzetes, purinban gazdag szakasszal rendelkezik. Ez az a szakasz, amin keresztül az mRNS specifikus bázispárosodással a 16S rRNS-hez kötődik. John Shine és Lynn Dalgarno nyomán ezt a szakaszt (és az azt kódoló DNS szakaszt) **Shine-Dalgarno szekvenciá**nak nevezik (másik elnevezése RBS: *ribosome binding site*).

A riboszómán **három** funkcionálisan eltérő **tRNS-kötőhely** van: „**E**" (*exit*), „**P**" (**peptidil-tRNS**) és „**A**" (**aminosav-tRNS**) (lásd **16.16. ábra**). A három hely kialakításában mind az 50S, mind a 30S alegység részt vesz.

A Shine-Dalgarno szekvencia a 16S RNS-hez kötődve úgy pozícionálja az mRNS-t, hogy annak start kodonja éppen a megfelelő, úgynevezett P-helyre kerüljön a riboszómán.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.16. ábra: A tRNS-ek számára három kötőhely van a riboszómán, elnevezésük E, P és A.

A P- és az A-helyeken lévő tRNS kodon-antikodon kapcsolatban van az mRNS-sel, az „E" helyen lévő tRNS, amelyik éppen távozóban van, már nem alakít ki ilyen kapcsolatot.

Ahogy a DNS és RNS szintézisénél, úgy a polipeptidlánc szintézisénél is **három szakasz**t különítünk el. Az **iniciáció**t, az **elongáció**t és a **termináció**t.

Miután a prokarióta transzláció szakaszait részletesen bemutattuk, az eukarióta fehérjeszintézis kapcsán csak a különbségeket taglaljuk.

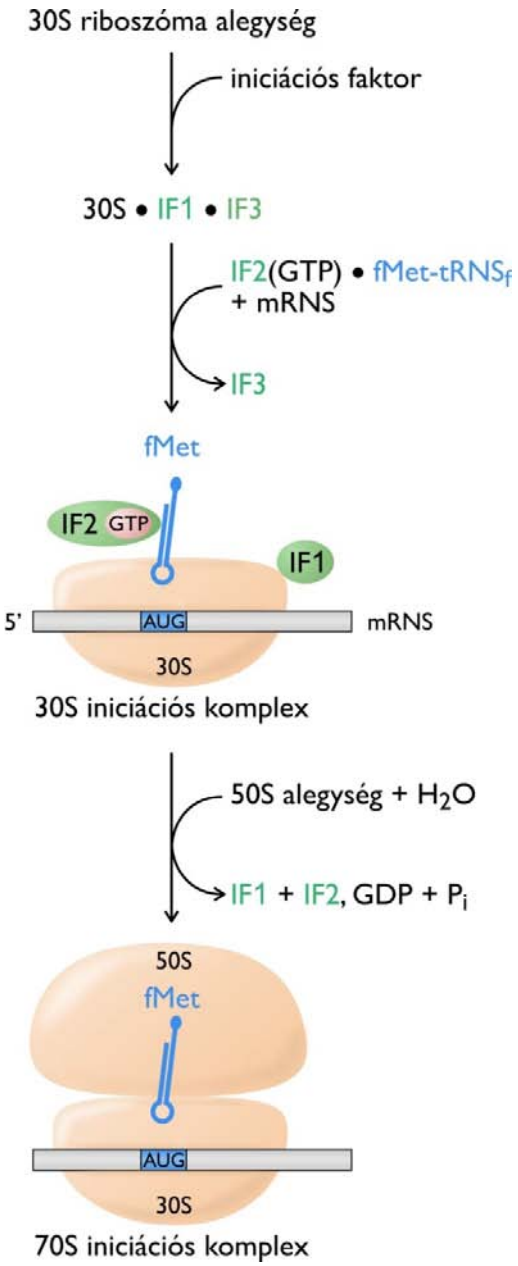
16.3.2. A transzláció lánckezdése (iniciáció)

Az iniciáció egyes lépéseit a **16.17. ábra** illusztrálja.

Az iniciációs szakasz elején a riboszóma két alegysége még nem alkot egymással komplexet. A kis riboszómális alegységhez speciális **iniciációs fehérjék**, az **IF1** és az **IF3** kötődnek. Az IF1 elősegíti az mRNS kötődését, miközben blokkolja a riboszóma A-helyét, megakadályozva, hogy oda aminoacil-tRNS érkezhessen. Az IF3 megakadályozza a nagy alegység kötődését.

A **kis alegységhez mRNS** kötődik, az **AUG start kodona P hely alatt** helyezkedik el. Egy **GTP-t kötő** iniciációs faktor, az **IF2** szállítja az **első aminosav-tRNS**-t, ami speciális, **formilált metionin**nal van töltve.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.17. ábra: A prokarióta fehérjeszintézis iniciációs szakasza

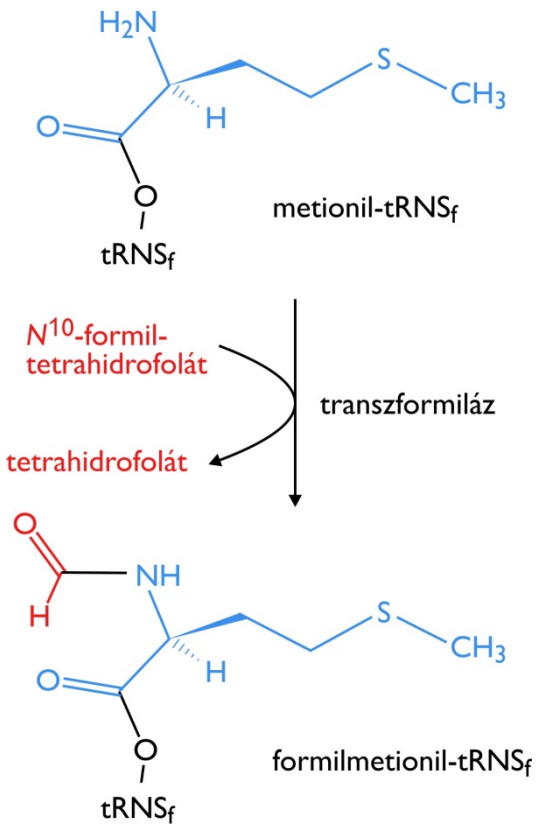
A formil-metionin szállításához külön tRNS (tRNS^{fMet}) van a kóli sejtben, de ezt a tRNS-t ugyanaz a szintetáz tölti fel, mint amelyik a láncközi tRNS^{Met}-t. A metionil-tRNS^{fMet}–et a speciális tRNS-en keresztül egy enzim szelektíven felismeri, és a metionin aminocsoportját formil csoporttal látja el (lásd **16.18. ábra**).

A formilálásnak az elongációs szakaszban lesz jelentősége, ezért a funkcióját ott ismertetjük.

Az fMet-tRNS^{fMet} az IF2 iniciációs faktorhoz kötve szállítódik a riboszómához, és azzal együtt kapcsolódik a P-helyhez. Az IF2 az oldattól elzárva tartja a fMet-tRNS^{fMet} hidrolízisre érzékeny észter kötését. Az IF2 által szállított **fMet-tRNS^{fMet}** az egyetlen olyan aminoacil-tRNS, amelyik a transzláció során a **P-helyre** léphet be. Az összes többi aminoacil-tRNS-t más faktor szállítja, és ezek az A helyre lépnek majd be az elongációs szakaszban.

Az fMet-tRNS^{fMet} antikodonja az mRNS-en az AUG start kodonhoz kötődik. Az IF2 egy GTP-áz aktivitással rendelkező fehérje, amely a fMet-tRNS^{fMet} szállítása során GTP-kötött állapotban van.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.18. ábra: A prokarióta kezdő metionil-tRNS formilálása

Ebben az állapotban, amikor a 30S alegységhez már kapcsolódott az mRNS, és az IF2-fMet-tRNS^{fMet} komplex, a riboszóma 50S alegysége is kötődik. Az 50S alegység kötődése során az IF2 hidrolizálja a hozzá kötött GTP-t GDP-re és inorganikus foszfátra. A termékek leválása során az IF2 konformációja megváltozik, aminek következtében az IF2 leválik a riboszómáról az IF1 és IF3 fehérjékkel együtt. A GTP-GDP átalakulás energetikailag egyenértékű egy ATP-ADP átalakulással. A folyamatot kísérő nagy negatív szabadentalpia változás az IF2 konformációváltozására fordítódik, és egyirányúvá teszi a folyamatsort.

Ennek eredményeként létrejön az **iniciációs komplex**, amit az alábbi specifikus kölcsönhatások stabilizálnak: az mRNS -16S rRNS kapcsolat, az mRNS AUG kodon - fMet-tRNS^{fMet} antikodon kapcsolat, és az fMet-tRNS^{fMet} és a riboszóma P helye közötti kapcsolat.

Az iniciációs komplex készen áll arra, hogy belépjen az elongációs fázisba.

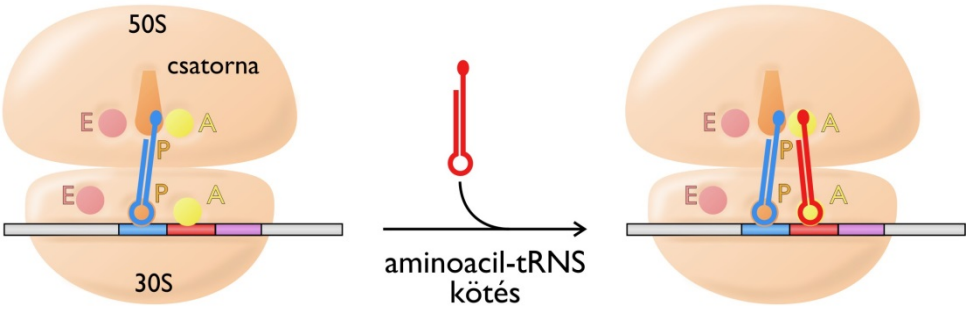
16.3.3. Lánchosszabbítás (elongáció)

16.3.3.1. Az EF-Tu szerepe

Az elongáció során a polipeptidlánc aminosav egységenként hosszabbodik. Egy-egy aminosav csoport beépítése önmagában egy többlépéses folyamat. Ez a többlépéses folyamat ismétlődik újra meg újra annyiszor, ahány aminosav egységet be kell építeni.

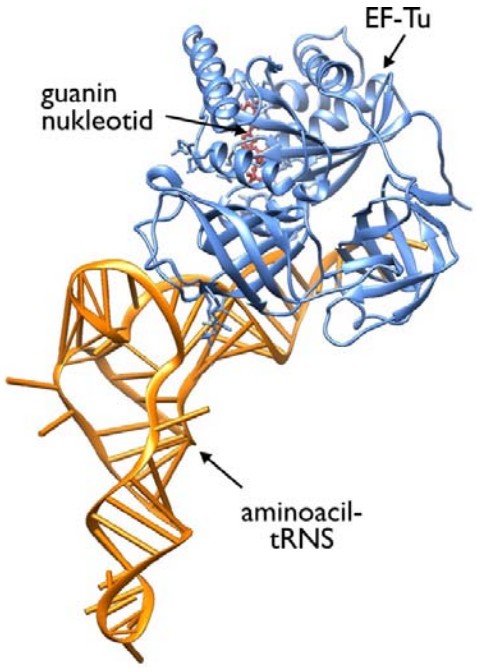
Az első lépés elején az fMet-tRNS^{fMet} a P-helyen van, az A-hely szabad. Ide érkezik a polipeptidlánc második aminosavát szállító tRNS (lásd **16.19. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.19. ábra: Az elongáció első lépése, egy aminoacil-tRNS belépése az A helyre

Az elongáció során az **aminoacil-tRNS-eket** egy **elongációs faktor**, az **EF-Tu** (*transfer unit*) **szállítja** a riboszómához (lásd **16.20. ábra**).



16.20. ábra: Az EF-Tu szállítja az aminoacil-tRNS molekulákat (PDB: 1B23)

Az EF-Tu hasonlít az IF2-re, de a két fehérjének átfedés-mentes ligandum-kötő specifitása és ezáltal átfedés-mentes funkciója van.

Az EF-Tu az összes aminoacil-tRNS-t felismeri, kivéve az iniciációban résztvevő fMet-tRNS^{fMet}-et, míg az IF2 csak ez utóbbit ismeri fel, az összes többit nem. Az IF2-hez hasonlóan az EF-Tu is védi az általa szállított aminoacil-tRNS hidrolízisre érzékeny észterkötését, és az EF-Tu is egy GTP-áz, ami az IF2-vel analóg módon működik.

Az EF-Tu az A helyre irányítja az aminoacil-tRNS-t. Azt, hogy a kodon-antikodon párosodás megfelelő-e, a riboszóma egyes RNS komponensei ellenőrzik.

16.3.3.2. A kodon-antikodon kapcsolat ellenőrzése

A riboszóma röntgendiffrakciós szerkezete alapján sikerült feltárni, hogy milyen mechanizmus segít a **kodonok hibamentes kiolvasás**át. A riboszóma az **A-helyen „ellenőrzi" a megfelelő kodon-antikodonkapcsolat létrejöttét**, miközben akadályozza az olyan tRNS-ek bekötését, amelyek nem megfelelő kodon-antikodon kapcsolatot létesítenek. Ez a különbségtétel olyan hatékony, hogy csak mintegy 100 ezer aminosav beépítésre esik egyetlen hiba.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A helyes kodon-antikodon kapcsolat kötéserőssége ugyan nagyobb, mint a hibásé, de az affinitások különbségéből fakadó, a termodinamika törvényei által diktált arány messze nem eredményezne ilyen alacsony hibarátát.

A megfelelő kodon-antikodon kapcsolat egyrészt megfelelő geometriát eredményez, másrészt azt is jelenti, hogy bizonyos egymásnak megfelelő kémiai csoportok párban jelennek meg. A szerkezet alapján kiderült, hogy nem csak a kodon és az antikodon ismerik fel egymást. A riboszóma bizonyos RNS bázisai és aminosav-csoportjai „letapogatják", hogy a geometria megfelelő-e, és hidrogénhidak kialakítása révén ellenőrzik, hogy a helyes kémiai csoport-párok megvannak-e. Ez a letapogatás rendkívül szelektív az első és második kodon pozícióban, ahol mindig tökéletes Watson-Crick bázispárnak kell kialakulnia, és kevésbé szigorú a harmadik pozícióban, ahol a szabály is lazább. A **riboszóm**a tehát ily módon **stabilizálja a helyes kapcsolatokat, és destabilizálja a hibásakat**.

A röntgenszerkezetek azt is demonstrálták, hogy amikor a letapogatás megfelelő kapcsolatot jelez, akkor az A kötőhely konformációja egy nyitottabb állapotból zártabbá válik. Ez a konformációváltozás a felelős azért, hogy az EF-Tu GTP-áz aktivitása működésbe lépjen.

Amint az EF-Tu hidrolizálta a GTP-t és GDP-kötött állapotba került, konformációváltozáson megy keresztül, és leválik a riboszómáról. Az EF-Tu faktor regenerálását az EF-Ts faktor segíti elő, amely az EF-Tu-GDP komplexhez kötődve gyorsítja a GDP leválását. A szabaddá váló EF-Tu újra GTP-t köt, miáltal készen áll egy újabb aminoacil-tRNS megkötésére és szállítására.

A GTP-GDP átalakulást kísérő negatív szabadenergia változás részben az EF-Tu konformációváltozására fordítódik, részben pedig irreverzibilissé, tehát egyirányúvá teszi a folyamatot.

16.3.3.3. A peptidkötés kialakulása

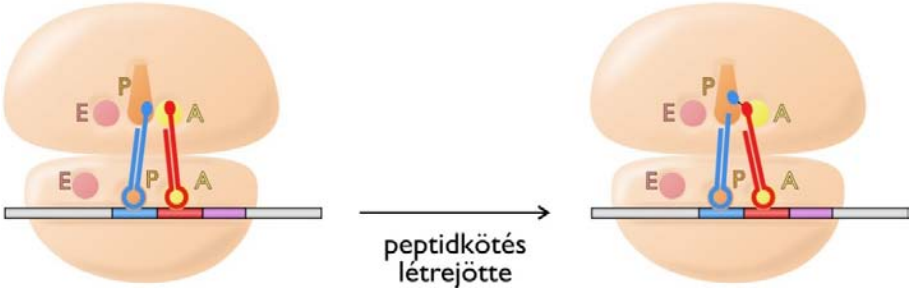
Amikor a riboszóma megfelelő kapcsolatokat tud létrehozni a kodon-antikodon párral, tehát amikor ez a pár megfelelőnek minősül, az A-hely záródik. Ez nem csak az EF-Tu-t aktiválja, de a peptidil-transzfer centrumot is.

A **peptidil-transzfer centrum**ban alakul ki a peptidkötés . A 80-as évek elejéig egységes volt az a nézet, hogy ezt a katalízist a riboszóma fehérjekomponensei végzik, hiszen addig csak fehérjealapú enzimeket ismertek. Amikor 1982-ben Thomas Cech felfedezte az első RNS-alapú enzimet, majd 1983-ban Sidney Altman felfedezett egy másikat, kiderült, hogy az RNS-ek nem csak információtárolásra képesek, de enzimek is lehetnek. Azonnal felmerült, hogy a riboszóma esetében vajon RNS-nek tulajdonítható-e a peptidil transzfer katalízise.

A folyamat során az **észterkötést támadó aminocsoportot protonelvonással aktiválni kell**. A különböző funkcionális állapotokba rögzített riboszómák térszerkezete alapján nagy meglepetésre kiderült, hogy az aminocsoportot **a 3'-OH csoportján észteresített tRNS ugyanazon ribózának 2'-OH csoportja aktivál**ja. Tehát maga a szubsztrát katalizálja a reakciót (*substrate assisted catalysis*)! Abban, hogy ezt megtehesse, szerepe van egy olyan hidrogénhíd kötés hálózatnak, amelyet zömmel riboszómális RNS csoportok és vízmolekulák alakítanak ki. Újabban arra is fény derült, hogy a P- és A-helyeken lévő tRNS-ek aminosavat hordozó karját riboszómális fehérjék stabilizálják.

A térszerkezetek tehát egy olyan modellt támogatnak, ahol a peptidkötés létrehozásában háromféle molekulatípus is részt vesz: riboszómális fehérjék, tRNS, és riboszómális RNS csoportok.

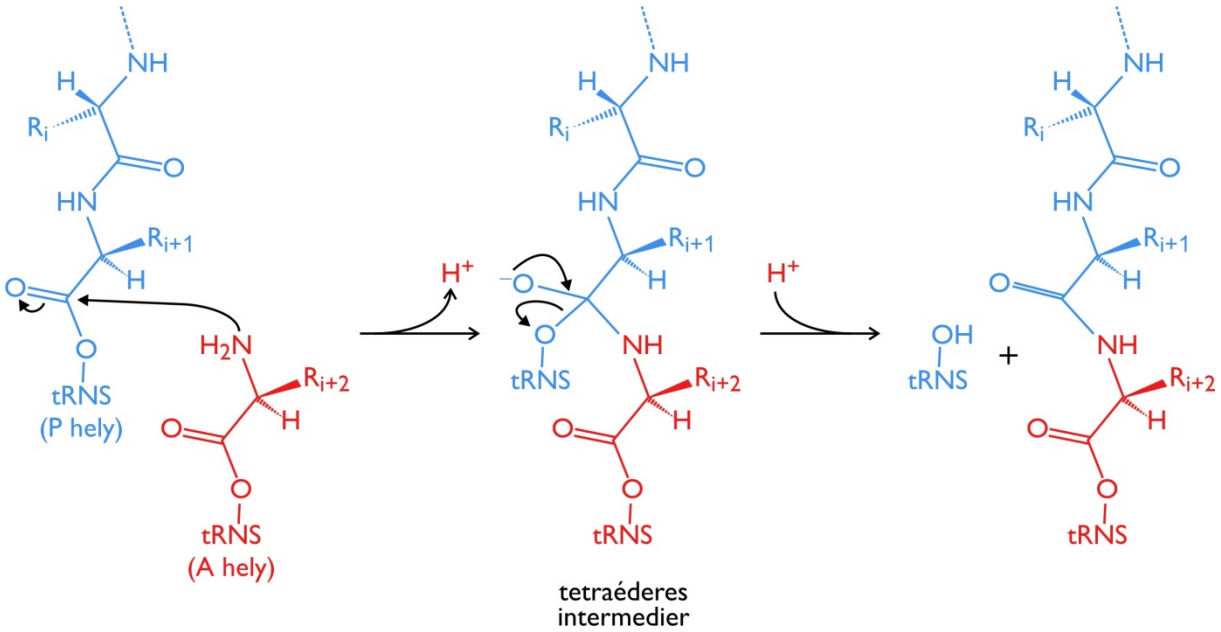
A folyamatot a **16.21. ábra** mutatja. Fontos kiemelni, hogy **a peptidkötés létrejöttével a növekvő lánc (az első lépésnél a dipeptid) a riboszóma nagy alegységén a P-helyről átkerül az A-helyre**.



16.21. ábra: Az elongáció második lépése, a peptidkötés kialakulása

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A kémiai részleteket a **16.22. ábra** illusztrálja, jelezve, hogy a reakció első lépéseként a nukleofil támadó aminocsoportot általános báziskatalízis révén aktiválni kell.



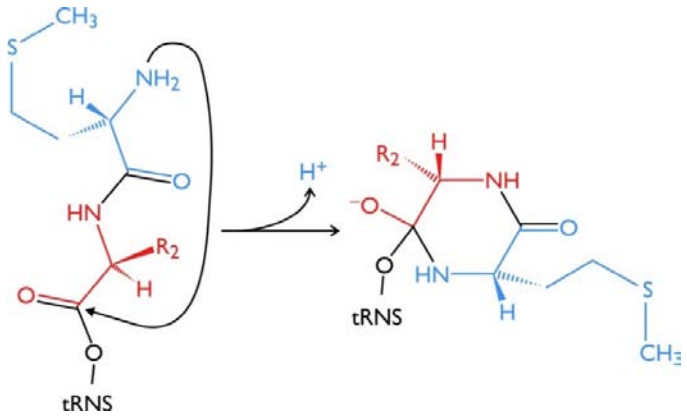
16.22. ábra: A peptidil-transzfer molekuláris lépései

A távozó csoport felszabadulásához a tetraéderes intermediert protonálni kell.

Az első peptidkötés létrejöttekor **gondot okozna, ha a dipeptidet hordozó tRNS észterkötését támadhatná az N-terminális aminosav aminocsoportja** gyűrűzáródás keretében (lásd **16.23. ábra**).

Az első aminosav **formilálása** ezt a **mellékreakciót akadályozza meg.**

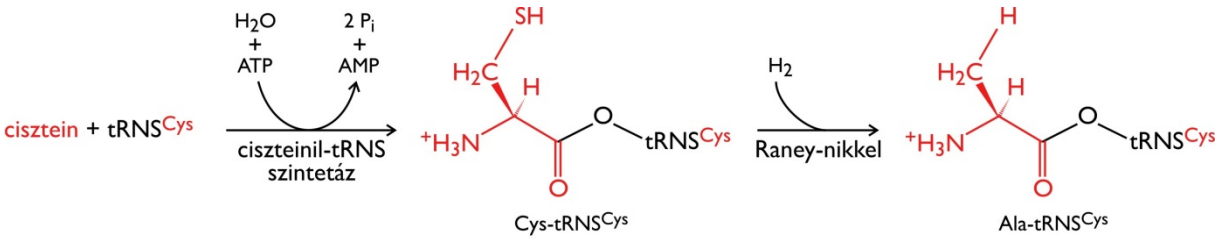
Mint láttuk, a riboszóma ellenőrzi a kodon-antikodon kapcsolat megfelelőségét. Felmerült az a kérdés is, hogy vajon a riboszóma ellenőrzi-e a tRNS-aminosav megfelelőségét is. Ennek ellenőrzése természetesen egy hihetetlenül komplex mechanizmust feltételezne, hiszen egyetlen – igaz hatalmas – komplexnek kéne ellenőrizni húsz aminosav és legalább 32 tRNS kapcsolatának minőségét, de az elvi lehetőség fennállt.



16.23. ábra: Formilcsoport hiányában az első aminosav aminocsoportja támadhatná a második aminosav és a tRNS közötti észterkötést

Azt, hogy ez a mechanizmus létezik-e, a következő módon tesztelték (lásd **16.24. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



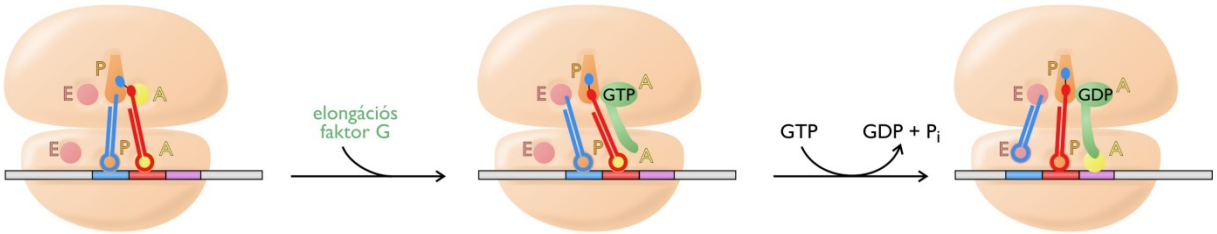
16.24. ábra: Amioacil-tRNS-ek aminosavának kémiai módosításával kiderítették, hogy a riboszóma nem ellenőrzi a tRNS-aminosav kapcsolat megfelelőségét

In vitro folyamatban a megfelelő komponensek (aminosav, tRNS, ATP, az adott aminosavra szelektív enzim) segítségével Cys-tRNS^{Cys} aminoacil-tRNS-t állítottak elő. Ezután egy kémiai reakcióval a ciszteinil csoportot alanil csoporttá alakították. Ezáltal egy hibás aminosav-tRNS párosítást hoztak létre. Különböző kísérletekben megvizsgálták, hogy a riboszóma elfogadja-e ezt a hibás szubsztrátot. A vizsgálatok egybehangzó eredménye az volt, hogy a riboszóma a ciszteinnek megfelelő helyekre építi be az alanint, mégpedig ugyanolyan hatásfokkal, mintha a tRNS ciszteint hordozna.

A **riboszóma** tehát **nem ellenőrzi az aminosav-tRNS** (vagy aminosav-antikodon, illetve aminosav-kodon) **kapcsolat megfelelőségét**. A riboszómán **kizárólag a kodon-antikodon kapcsolat kerül ellenőrzésre**.

16.3.3.4. Az mRNS elmozdulása a riboszómán, a transzlokáció

Egy újabb **elongációs faktor**, az **EF-G** felelős az mRNS és a riboszóma egymáshoz képesti elmozdulásáért, a **transzlokáció**ért (lásd **16.25. ábra**).



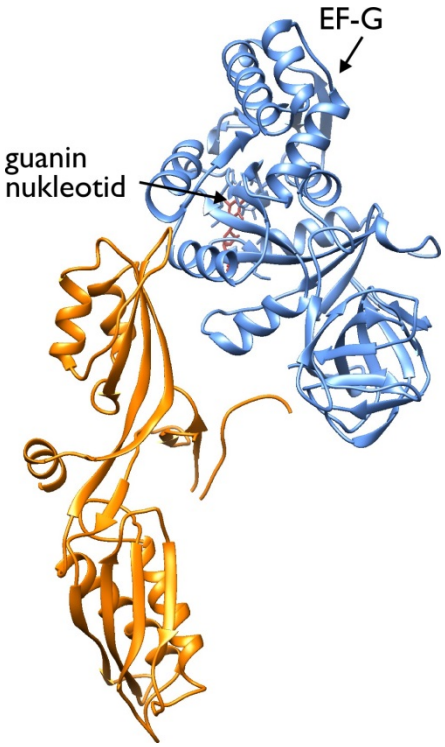
16.25. ábra: Az elongáció harmadik lépése, a transzlokáció

A transzlokáció során **három nukleotid egységnyit mozdul el az mRNS**. Az **EF-G** is **GTP-áz** aktivitású fehérje. A transzlokációhoz szükséges energiát GTP EF-G általi hidrolízise szolgáltatja. Az üressé vált tRNS a P-helyről az **E-helyre** lép, az addig az **A-helyen lévő** pedig átlép a **P-helyre**. A megüresedő A-hely készen áll újabb, az alatta megjelenő kodonnak megfelelő aminoacil-tRNS fogadására. A GTP hidrolízise eredményeként az EF-G konformációja megváltozik. Ennek során „arrébb tolja" a P-helyen lévő peptidil-tRNS RNS részét s az antikodon-kodon kölcsönhatáson keresztül a hozzá kapcsolódó mRNS-t is.

Az EF-G működése nyomán átmeneti, úgynevezett hibrid állapotok alakulnak ki. Az EF-G bekötődésekor még csak a két egymás mellett lévő tRNS felső része mozdul el, az a rész, amelyik a riboszóma nagy alegységéhez kötődik (lásd **16.25. ábra**). Amelyik eddig az A-helyen volt az a P-helyre kerül, amelyik a P-helyen volt, az emiatt az E-helyre kerül. Az alsó részek azonban nem mozdulnak, ezért kialakul egy-egy P/A illetve E/P hibrid állapot. Amikor azonban az EF-G hidrolizálja a GTP-t, és ezáltal konformációt változtat, a tRNS-ek alsó része is egy regiszterrel odébb mozdul, a hozzájuk kapcsolódó mRNS-sel együtt. Tehát kialakul a tiszta E és P állapot, és amint az EF-G leválik, az A-hely felszabadul az új aminoacil-tRNS fogadására (lásd **16.25. ábra**).

Amikor sikerült megfejteni az EF-G térszerkezetét (lásd **16.26. ábra**), kiderült, hogy az rendkívüli módon **hasonlít** egy **EF-Tu-hoz kapcsolt aminoacil-tRNS**-re (lásd **16.20. ábra**).

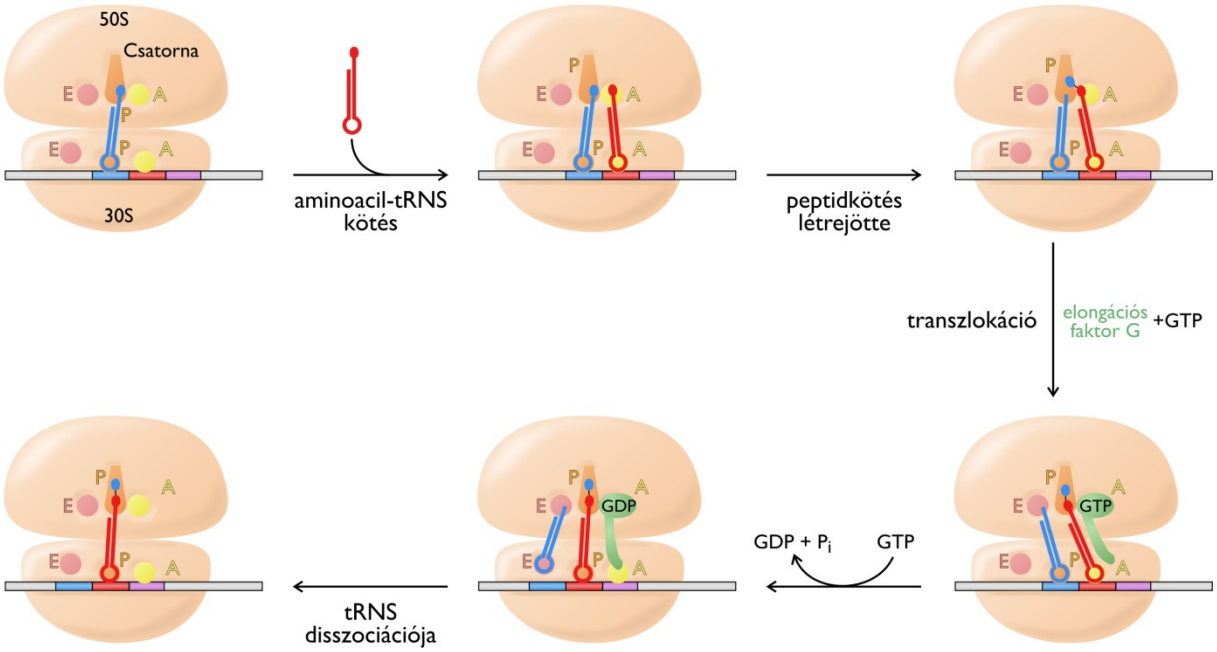
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



16.26. ábra: Az EF-G térszerkezete hasonlít egy aminoacil-tRNS-EF-Tu komplex térszerkezetére (PDB: 1DAR)

Ez az úgynevezett **molekuláris mimikri** szép példája. Az EF-G fehérjének versenyeznie kell az EF-Tu és az aminoacil-tRNS által alkotott komplex-szel az A-helyért. Az A-hely mind a tRNS-t, mind az EF-Tu-t köti. Csak egy olyan fehérje tud eredményesen versengeni, amelyik mind a két kapcsolattal verseng. Az EF-G 2 doménje, köztük a GTP-áz domén, homológ az EF-Tu-val, ezért is lehet a két fehérje hasonló, de az EF-G tRNS-t imitáló része, amely 3 doménből áll, eltérő eredetű.

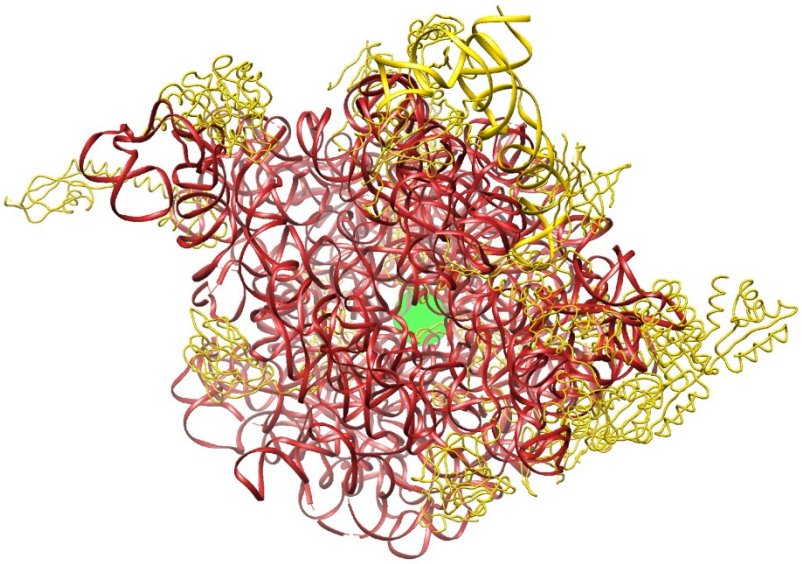
A teljes ciklust a **16.27. ábra** foglalja össze. Ez a ciklus ismétlődik minden egyes aminosav beépítésekor.



16.27. ábra: A fehérjeszintézis elongációs szakaszában egymást követő lépések összefoglaló bemutatása

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

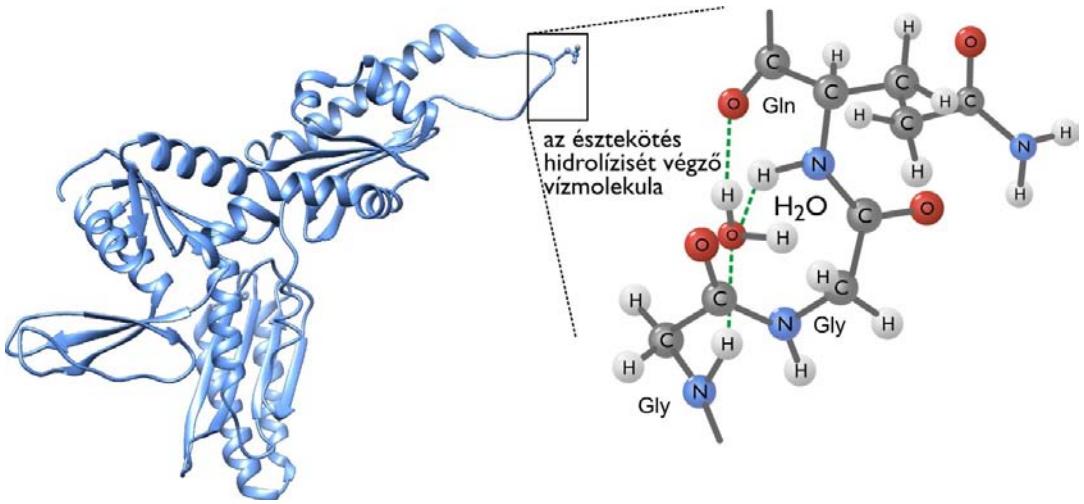
A keletkező polipeptidlánc egy hosszú csatornán, mint egyfajta kürtőn („szülőcsatornán”) keresztül távozik a riboszómáról (lásd **16.28. ábra**). A kürtő helyét az ábrán zöld kör jelzi.



16.28. ábra: A keletkező polipeptidlánc egy kürtőn távozik

16.3.4. Lánczárás (termináció)

Amikor az A-hely alatt stop kodon jelenik meg, az elongáció nem folytatódhat, hiszen nem érkezhet olyan EF-Tu aminoacil-tRNS komplex, ami megfelelő antikodont biztosítana a stop kodon ellenében. Ehelyett speciális fehérje, ***release* factor** (elengedő faktor), RF érkezik, amely az EF-G fehérjéhez hasonlóan **aminosav-tRNS-t imitál**, de tRNS helyett vízmolekulát szállít a peptidil-transzfer helyre (lásd **16.29. ábra**).



16.29. ábra: Egy Release faktor (RF) térszerkezete, a faktor vízmolekulát szállít

Az RF1 az UAA és UAG, az RF2 az UAA és UGA stop kodonokat ismer fel. Az **RF1** és **RF2** fehérjék „trójai faló” módján működnek. **Aminosav helyett vízmolekulát szállítanak**, és segítségükkel a peptidil-transzferáz hely hidrolizálja P-helyen lévő peptidil-tRNS észter kötését. A polipeptid így eltávozhat.

A hátramaradó tRNS és az **RF1 vagy RF2 távozásá**t is elő kell segíteni. Ez az **RF3** fehérje feladata, amely az előző RF fehérjékkel ellentétben egy **GTP-áz**. Az említett komponensek eltávolításához tehát GTP hidrolízis szolgáltatja az energiát.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Utolsó lépésként a **két riboszómális alegység disszociál**. Ezt a riboszóma reciklizáló faktor (RRF) és a már megismert EF-G együttesen idézik elő. A két alegység szétválása után az mRNS is leválhat, és a rendszer kész egy újabb iniciációs fázisra.

16.4. Az eukarióta transzláció néhány jellegzetessége

Az **eukarióták transzlációj**a a citoplazmában játszódik le. A citoplazmába már csak processzált mRNS-ek kerülnek, amelyeknek van 5'-sapka és 3'-poliA részük.

Az eukarióta fehérjeszintézis **főleg az iniciációs fázisban tér el** a prokarióta folyamattól. **Többféle iniciációs faktor** van, az egyik, az eIF4-E felismeri az mRNS 5'-sapka szekvenciáját. Az eukarióta iniciációs komplexben van egy poli-A kötő fehérje is. A legújabb ismeretek szerint a legtöbb eukarióta mRNS két módosított vége az eIF4 és a poli-A kötő fehérjéken keresztül cirkularizálódik, s ilyen formában kötődik a riboszómához.

Az eukarióta mRNS-en **nincs Shine-Dalgarno szekvencia**, ami a P-helyre pozícionálna egy AUG kezdő kodont. Ugyanakkor felfedezője, Marylin Kozak nyomán van egy úgynevezett konszenzus **Kozak-szekvencia**, ami funkcionálisan hasonló szerepet tölt be. Ez nem az mRNS riboszómához kötéséhez szükséges, hiszen az a sapka részen keresztül történik, hanem **a megfelelő start kodont teszi azonosíthatóvá**. A Kozak-szekvenciának ugyanis része a kezdő AUG kodon, tehát annak szekvencia környezete segít azonosítani a riboszóma számára, hogy melyik AUG kodont használja.

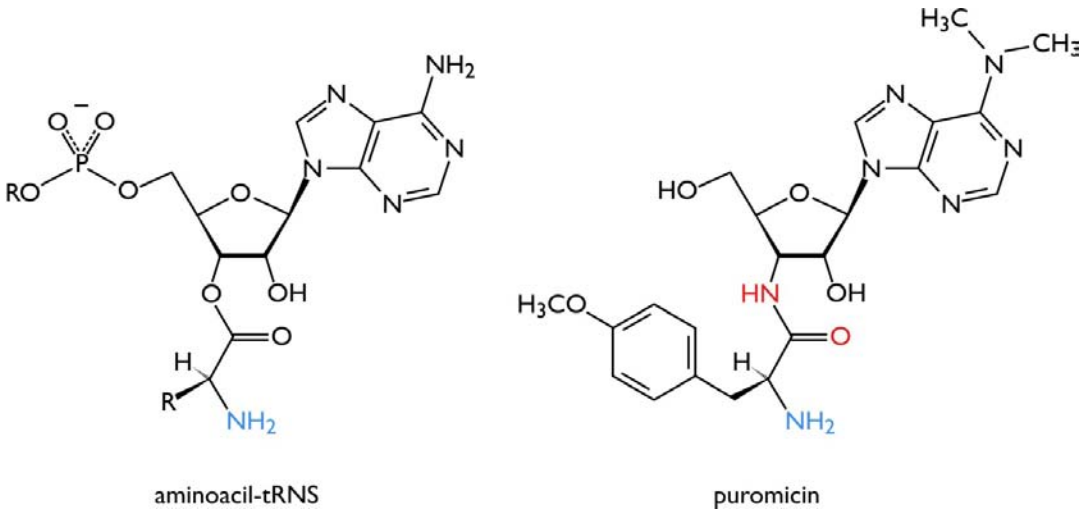
Az eukarióták **iniciátor tRNS**-e standard, **nem formilált metionin**t hordoz.

Az eukarióta transzláció lépéseinek közel valós idejű molekuláris grafikai ábrázolását a **9. animáció** mutatja be.

16.5. Transzláció gátlószerek

Az **antibiotikumok jó része** a bakteriális **fehérjeszintézis gátlás**án keresztül fejti ki hatását. A riboszóma számos olyan funkcióval bír, amely támadható. Egyes antibiotikumok a két alegység egymáshoz képesti elmozdulását gátolják, mások a peptidil-transzfert, vannak olyanok is, amelyek azt a kürtőt tömik el, amelyen a polipeptidláncnak kéne távoznia, és így tovább.

A **puromicin** egy érdekes, mechanizmus alapú inhibitor, ami egy aminoacil-tRNS-t imitál (lásd **16.30. ábra**). Kismolekulaként elongációs faktor nélkül is képes az **A-helyre köt**ődni.



16.30. ábra: A puromicin egy aminoacil-tRNS-t imitál, de észterkötés helyett amidkötést tartalmaz

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

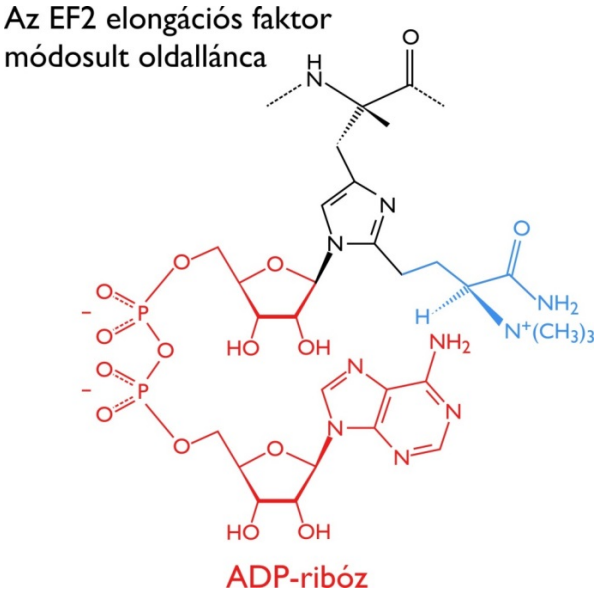
A puromicin, a tRNS CAA végének utolsó adenozin egységét imitálja, olyan, mintha ahhoz egy metilált fenilalanin lenne kapcsolva. Ugyanakkor egy normális aminoacil-tRNS-sel ellentétben, itt nem észterkötés van a molekulában, hanem egy stabil amid kötés.

Amikor a peptidil-transzfer segítségével a puromicin átveszi az addig keletkezett peptidet az NH_2-csoportjára, az eredmény egy C-terminális puromicin lesz. Csakhogy ez a láncvég nem folytatható, mert nincs meg benne az az észterkötés, amit a soron következő aminoacil-tRNS aminocsoportja eredményesen támadhatna. A puromicin emiatt **láncterminációt okoz**.

A torokgyík kórokozója fehérjeszintézis gátláson keresztül fejti ki hatását. A *Corynebacterium difteriae* egyes törzsei **diftéria-toxin**t termelnek. Ennek a toxinnak egyetlen mikrogrammja (!) halálos lehet a baktériummal szemben nem immunizált egyén számára. Sejtenként egyetlen molekula toxin elég a sejt pusztulásához!

Az eukarióta elongációs faktor, EF2-t a bakteriális EF-Tu homológja. Az EF2 poszttranszlációs modifikáció eredményeként hordoz egy speciális módosított hisztidin oldalláncot, ami elengedhetetlen a funkciójához. **A toxin egy enzim**, ami a megtámadott sejtbe jutva a sejt NAD koenzim készletét felhasználva **ADP-ribozilálja az EF2 módosított hisztidinjét** (lásd **16.31. ábra**).

Ezáltal egyetlen enzimmolekula is képes leállítani a sejt fehérjeszintézisét.



16.31. ábra: A diftéria-toxin egy módosult hisztidil-csoporton ADP-ribozilálja az EF2 elongációs faktort.

16.6. A fehérjeszintézis energiamérlege

Minden egyes aminosav **aktiválás**a egy ATP→AMP átalakulással jár. Ez a sejt számára **aminosavanként 2 ATP**-nyi energia felhasználását jelenti, mert az AMP→ATP regenerálás két ATP-nyi energiát igényel.

Az **iniciációs komplex** képzéséhez 1 ATP-nyi energia kell (**1 GTP**) amit fehérjénként csak egyszer kell szolgáltatni. Az **elongáció** során a szállításhoz az **EF-Tu aminosavanként 1 ATP**-nyi energiát használ fel. Az elongáció során az **EF-G** által katalizált transzlokáció is **1 ATP**-nyi energiát fogyaszt aminosavanként. (Ne felejtsük, az IF2, az EF-Tu, az EF-G és az RF3 faktorok valójában GTP-t használnak fel, de minden egyes így keletkező GDP regenerálásához egy-egy ATP-t kell felhasználni). Végül a **termináció**hoz is **1 ATP**-nyi energia kell.

Egy kisméretű 100 aminosavas fehérje aminosavakból való szintéziséhez tehát:

1+100 x (2+1+1)+1 = 402, tehát kerekítve 400 ATP kell.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

17. fejezet - A fehérjeműködés szabályozása

(szerző: Nyitray László)

A fehérjék szerkezetét (lásd **4**. és **5. fejezet**) és működését (lásd **7.** és **8. fejezet**) már részletesen tárgyaltuk, s ott is felhívtuk a figyelmet rá, hogy a hallatlanul nagy komplexitással rendelkező élő rendszerekben a fehérje molekulák csak szigorúan szabályozott módon tölthetik be szerepüket. Ebben a fejezetben a fehérjeműködés szabályozási elveit és a különböző szabályozási típusokat foglaljuk össze.

A biológiai szabályozás (reguláció) az organizáció minden szintjén érvényesül. A biokémia elsősorban a **molekuláris szintű szabályozás**sal foglalkozik, amely döntően **fehérjék szabályozásán keresztül** valósul meg. Lehet szabályozni a **fehérjék mennyiségét** a keletkezésükön és lebontásukon keresztül, valamint a már elkészült **fehérjék működését**. A fehérjék keletkezésének szabályozásáról, a génexpresszió szabályozása kapcsán a következő, **18. fejezet**ben lesz szó – amely természetesen szintén fehérjék működésén keresztül valósul meg. (A Bevezetés a biokémiába jegyzet keretében nem tárgyalunk egyéb sejtbiológia szintű szabályozásokat (pl. a szignáltranszdukciót, azaz a külső jelekre adott sejtválasz szabályozását, a sejtciklus szabályozását), s nem lesz szó a fiziológia tárgykörébe tartozó molekuláris szintű szabályozásokról sem (pl. a neuroendokrin vagy az immunrendszer szabályozása).)

A fehérjeműködés speciális szabályozásának tekinthető, ha egy-egy feladat elvégzésére minőségileg különböző fehérjék jönnek létre. Az azonos működésű, de különböző térbeli és időbeli lokalizációjú és eltérő szabályozású fehérjék/enzimek az **izoformák/izoenzimek** (lásd **17.5**). Nagyon fontos kiemelni, hogy az enzimek és más funkciójú fehérjék szabályozására ugyanazok az elvek érvényesek. A **regulációs fehérjék** funkciója maga a szabályozás (ilyenek pl. a transzkripciós faktorok és a jelátvitelben résztvevő fehérjék/enzimek). A **szabályozás** lehet **reverzibilis vagy irreverzibilis**, illetve **aktiválás vagy gátlás**. A reverzibilis kategóriába az **allosztérikus szabályozás** (lásd **17.2**) és a **reverzibilis kovalens szabályozás** (lásd **17.3**) tartozik. A reverzibilis kovalens szabályozásnál egy funkcionális csoport (pl. foszforil-, acetil-) kapcsolódik a fehérjére egy enzim segítségével, s egy másik enzim távolítja azt el. Az **irreverzibilis szabályozás** (lásd **17.3**) leggyakoribb esete a polipeptidlánc elhasadása (pl. **zimogén aktiválás**).

Az enzimkinetikát bemutató **9. fejezet**ben tárgyaltuk a nem allosztérikus **enzimgátlások**at (kompetitív, nem-kompetitív és vegyes típusok), amelyeknek bár fontos fiziológiás példái is ismertek (pl. proteáz-inhibitor fehérjék), de elsősorban azért kell ismernünk őket, mivel a gyógyszerek és mérgek többsége ilyen módon hat (bár vannak allosztérikusan hatók is!), valamint széles körben használjuk őket az enzimek működésének *in vitro* vizsgálatához.

17.1. A fehérjeműködés lényege

A **7.1. fejezet**ben már szó volt a fehérjék működésének általános vonásairól. Mivel az élet molekuláris szintű szabályozását a fehérjék működésének felderítésével érthetjük meg, ezért, didaktikai szempontból is, újból elővesszük ezeket a működésbeli alapelveket.

Ha egy mondatban akarjuk megfogalmazni a **fehérjeműködés lényegé**t, amely a nagy többségükre érvényes, akkor ez a **ligandumkötés kiváltotta konformációváltozás**. (Bár közhelynek is tűnhet ez az állítás, mivel régóta tudatában van a tudomány annak, hogy „távhatás” a kémia világában nincs, fizikailag érintkezniük kell a molekuláknak, hogy kémiai reakció következhessen be – s nincs ez másképp a biokémia, a makromolekulák világában sem. Az élő rendszer komponenseinek kölcsönhatása határozza meg a rendszer működését – ezt az elvet kell szem előtt tartanunk, erre utal a fenti elvi megállapítás is.)

A biokémiában **ligandum**nak nevezünk minden olyan kismolekulát, iont, vagy akár makromolekulát, amelyek specifikusan kötődnek a fehérjékhez. A fehérjék az élő rendszerben szinte soha nem magányosan működnek, hanem kommunikálnak a többi biomolekulával - s az **információcsere kölcsönhatásokon keresztül** valósul meg. Igaz ez természetesen az enzimekre is, hiszen a szubsztrát kötődése nagyon sokszor konformációváltozást okoz (lásd például az indukált illeszkedés a **8. fejezet**ben) s ez a változás elengedhetetlen a katalitikus funkcióhoz.

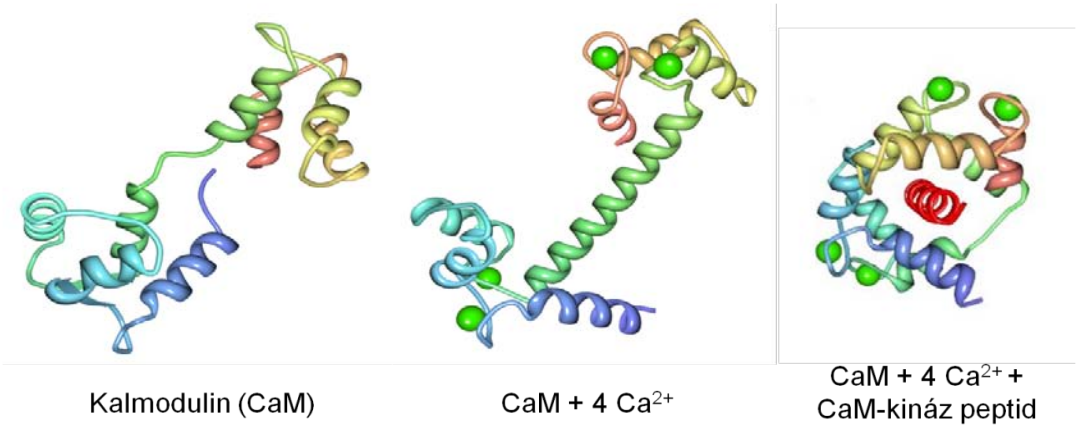
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A fenti megállapodás alól látszólag kivételt képeznek azok a fehérjék, amelyeknek nincs jó meghatározott 3-dimenziós szerkezete. Az utóbbi évtized fontos felismerése, hogy meglepően sok fehérje tartozik ebbe a szakirodalomban az **IDP**-nek (**eredendően rendezetlen fehérje**: *intrinsically disordered protein*) vagy IUP-nek (szerkezetnélküli fehérje: *intrinsically unstructured protein*) rövidített szerkezeti kategóriába. Azonban a szerkezetnélküli fehérjék is kölcsönhatásba lépnek más fehérjékkel, s ekkor vagy az interakcióban résztvevő láncrészlet vagy akár az egész fehérje jól definiált szerkezetet vehet fel.

A **ligandum** a fehérje **kötőhely**ével lép kölcsönhatásba (az enzimek esetén a szubsztrát is egy ligandum, ami a szubsztrátkötőhellyel lép kölcsönhatásba, lásd a **8. fejezet**ben). A fehérjék szelektálnak a környezetükben levő sok ezer molekula közül, biológiai jelentősége csak a specifikus (fajlagos) kölcsönhatásoknak lesz. A molekuláris felismerés alapja, hogy a kötőhely térben, töltésmintázatát, hidrofób és hidrofil jellegét tekintve komplementer a ligandummal. A **molekuláris felismerés** is tehát ugyanolyan gyenge **másodlagos kötések**en keresztül valósul meg, mint amilyen kölcsönhatások szerepet játszanak a fehérje térszerkezet kialakításában (hidrofób effektus, van der Waals kölcsönhatás, hidrogén-híd, sókötés; lásd **5.5. fejezet**). Fontos emlékeztetnünk rá, hogy a termodinamikai stabilitáshoz hozzájáruló **hidrofób effektus** entrópikus hatás (lásd $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

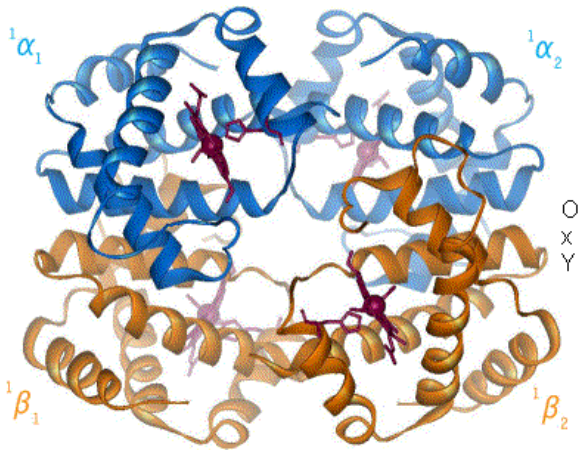
Fontos megemlítenünk újból azt a tényt is, hogy **a fehérjék térszerkezete csak kis termodinamikai stabilitással rendelkezik**. Egy átlagos méretű globuláris fehérje natív szerkezetének stabilitása ($\Delta G = G_n - G_d \approx$ -40 kJ/mol**)**. Ebből a tényből az is következik, hogy a fehérjék flexibilisek, a **szerkezetük dinamik**us (utalunk pl. a mioglobin oxigénkötését elősegítő atomi rezgésekre, amit a fehérje „légzésének” nevezünk; lásd a **7.3. fejezet**ben). **A térszerkezet flexibilitása előfeltétele a fehérjék működésének**, hiszen ahogy azt kifejtettük, az alakváltozás a fehérjék gyakorlatilag egyetlen kommunikációs lehetősége. Ennek megfelelően a fehérjeműködés szabályozása is a térszerkezet és/vagy a térszerkezet dinamikájának megváltozásán keresztül történik, mint azt a további alfejezetekben majd bemutatjuk.

A ligandumkötés kiváltotta konformációváltozásra példaként a kalmodulin Ca^{2+}- és célfehérje kötését (**17.1. ábra**), valamint a hemoglobin oxigénkötését mutatjuk be, az utóbbit a dezoxi-Hb és az oxi-Hb térszerkezetéről készült animáció segítségével (lásd **17.2. ábra**).



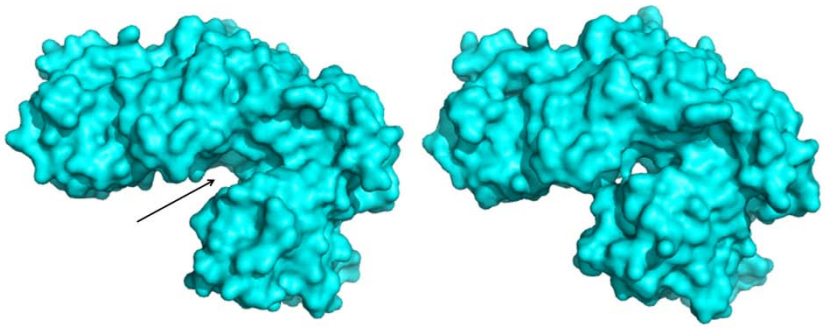
17.1. ábra: A kalmodulin konformációváltozása ligandumkötés hatására. Apo (ligandum nélküli) kalmodulin (bal), Ca^{2+}-kötött (középső), és egy célfehérje, a Ca^{2+}-kalmodulin-függő kináz kötőpeptidével alkotott komplex (jobb). A szalagmodellel ábrázolt polipeptidlánc α-hélixei különböző színűek. A Ca^{2+}-ok zöldek, a CaM-kináz peptid piros (PDB: 1DMO, 1CLL, 1CKK).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.2. ábra: A hemoglobin térszerkezetváltozása oxigénkötés hatására. Az animáció a dezoxi-Hb (*deoxy*) és az oxi-Hb (*oxy*) szalagmodelljeit hasonlítja össze. (*forrás: Wikipedia Commons; szerző: User:BerserkerBen*)

Az enzimek működése a fehérje és a szubsztrát kölcsönhatásán alapszik. Mint azt a **8. fejezet**ben már kifejtettük, az enzimműködés során sokszor a szubsztrátkötés hatására a kötőhely mintegy bezárulhat a ligandum körül, ezzel is hozzájárulva a **katalitikus hatékonyság**hoz. Ez a jelenség az ún. **indukált-illeszkedés** (*induced fit*; David Koshland, 1958), amelynek klasszikus példája a hexokináz enzim szubsztrátkötése, amelyet a **17.3. ábra** szemléltet (a hexokináz a glikolízis első enzime, glükózra és más hexóz szubsztrátokra az ATP-ből foszforilcsoportot helyez át).



17.3. ábra: Az indukált-illeszkedés modell egy példája. A hexokináz enzim szerkezete szubsztrát nélkül (bal; a nyíl a kötőzsebet mutatja) és glükóz jelenlétében, ahol a zseb bezárult (jobb; a glükóz nem látszik) (PDB: 1HKG és 1GLK).

A fehérjeszerkezet dinamikájából következik, hogy a fehérje kölcsönhatások jelentős részében a ligandum nem egyformán kötődik az egymástól kissé eltérő konformációjú állapotokhoz, mintegy válogat ezek közül. Ennek leírására vezették be az ún. **konformáció-szelekció** (*conformation-selection*) **modell**t (elsők között magyar kutatók, Straub F. Brunó és Szabolcsi Gertrúd vetették fel ezt a kölcsönhatási mechanizmust 1964-ben).

A fehérjék a kémiai reakciók felgyorsításán kívül képesek különböző energiaátalakításokra is. Speciális energiátvitel, ún. **energiatranszdukció** történik a motorfehérjék működése során, melyek az ATP kémiai energiáját mechanikai munkává alakítják. A fehérjeevolúció egyik csúcsteljesítménye a forgómotorként működő ATP-szintáz fehérje komplex, amely az oxidatív foszforiláció során a sejtek működéséhez nélkülözhetetlen „energiavalutát”, az ATP-t állítja elő nagy mennyiségben. Szintén energiatranszdukció történik a molekuláris pumpák közreműködésével, amelyek ugyancsak az ATP „makroerg” kötéseiben tárolt kémiai energiát aktív transzportra, tehát ozmotikus munkára fordítják (lásd **20.5. fejezet**).

Ebben a fejezetben a fehérjék aktivitásának szabályozásáról lesz szó, amely szintén a fehérjék konformációjának megváltozásán alapszik, és a fenti gondolatmenetet követve **információs transzdukció**nak tekinthető. Ebben az esetben a ligandum kötési energiája konformációváltozáso(ko)n keresztül információvá „alakul”, azaz információt közvetít. A szabályozó fehérjék egyik csoportja mintegy bináris **molekuláris kapcsoló**ként működik, „bekapcsolt”

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

és „kikapcsolt” szerkezeti állapotban lehet: a bekapcsolt, például ligandum kötött állapotban képes kötődni a szabályozandó célfehérjéhez, míg a kikapcsolt állapotban, az apo-formában nem. A **17.1. ábrán** bemutatott **kalmodulin** is egy molekuláris kapcsoló, ahol a Ca^{2+}-kötött forma a „bekapcsolt” állapot, kötődni képes a célfehérjéihez. Szintén molekuláris kapcsolók az ún. G-fehérjék, amelyek a molekuláris jeltovábbítás, a szignál transzdukció fontos szabályozó fehérjéi (lásd például a **11.22. ábra**), amelyek GTP-kötött formában kötődnek a célfehérjéikhez, míg GDP-kötött formában nem (lásd például az adrenalin hatásmechanizmusát a **17.3.3. fejezet**ben).

17.2. Allosztérikus fehérjék/enzimek

Allosztérikus fehérjék több ligandum kötőhelyet tartalmaznak, s az egyik ligandum befolyásolja a másik kötődését. **Azonos ligandumok** esetén az allosztéria speciális esetéről, **kooperativitás**ról beszélünk (pl. hemoglobin O_2-kötése). Erről a szabályozási módról a hemoglobinnal foglalkozó fejezetben már röviden volt szó (lásd **7.6. fejezet**). Az allosztéria görög eredetű szó, az *allos* jelentése „más”, a *stereos* jelentése „alak”.

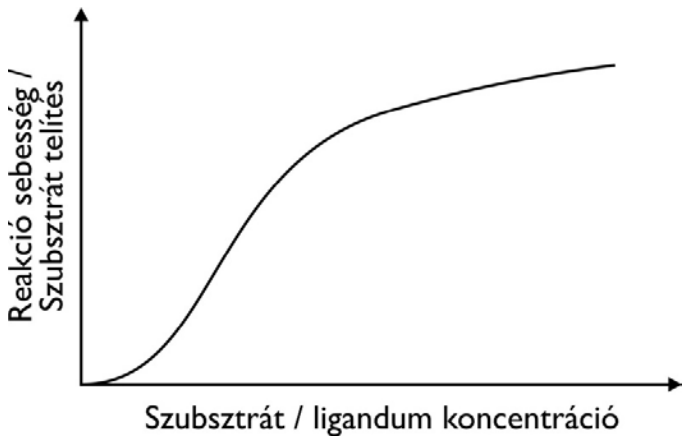
17.2.1. Az allosztérikus fehérjék általános tulajdonságai

Az allosztérikus fehérjék esetében a molekuláris szabályozás (információtovábbítás) a következő séma alapján valósul meg:

Információt hordozó „jel” kötődése → konformációváltozás → biológiai válasz (enzimaktivitás csökkenés/növekedés, kötőpartner affinitás csökkenés/növekedés)

A jelhordozót **allosztérikus effektornak** (vagy modulátornak) nevezzük, ami lehet kismolekula, makromolekula vagy ion. A **pozitív effektorok** aktivátorok, a **negatív effektorok** inhibitorok. A fehérje fő ligandumával megegyező szabályozó jelek **homotróp effektor**ok (**kooperativitás**), minden más szabályozó molekula vagy ion **heterotróp effektor.**

Ha egy fehérje ligandumtelítési vagy enzim esetében szubsztráttelítési görbéje nem derékszögű hiperbola, hanem szigmoid alakú, akkor lehetséges, hogy az allosztéria jelenségével állunk szemben (lásd **17.4. ábra**).



17.4. ábra: Allosztériára utaló szigmoid alakú ligandum telítési görbe

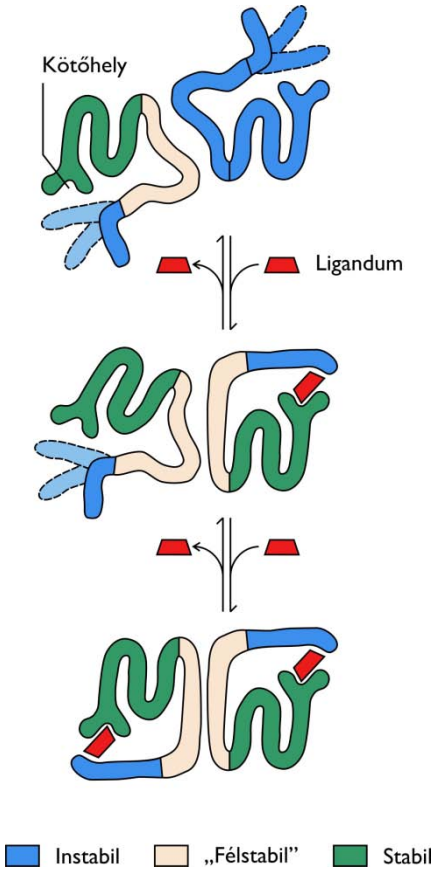
Amennyiben a kísérlet során csak a „főligandumot” illetve a szubsztrátot adjuk hozzá növekvő koncentrációban a fehérjénkhez, akkor a jelenség kooperativitásra utal (lásd a hemoglobin oxigénkötése), amennyiben valamilyen további ligandum is jelen van a kémcsőben, akkor az utóbbi heterotróp allosztérikus effektor lehet (lásd a Hb oxigénkötése BPG jelenlétében).

Az **allosztérikus fehérjék** általában **negyedleges szerkezet**űek (pl. a hemoglobin négy alegységből áll, míg az egy polipeptidláncból felépülő mioglobin nem allosztérikus fehérje) vagy a harmadlagos szerkezetük **több domén**t tartalmaz. Negyedleges szerkezetű allosztérikus enzimeknél sokszor a **katalitikus funkció** és a **reguláció különböző alegység**hez köthető (pl. aszpartát-transzkarbamoiláz enzim, lásd **17.2.2**)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az allosztérikus fehérjéknek minimum két konformációs állapota van, amelyeket rövidíthetünk T és R betűvel. A **T** (*tense* vagy *taut*: feszült) **állapot**ban a szerkezet általában merevebb, aminek a következménye az lesz, hogy kevésbé (kisebb affinitással) kötődik a ligandum a fehérjéhez. Az **R** (*relaxed*: relaxált) **állapot**ban a fehérje flexibilisebb, a kötőhelyéhez könnyebben hozzáfér (nagyobb affinitással kötődik) a ligandum.

Az allosztériát leíró legegyszerűbb működési modellben az allosztérikus effektorok a két állapot közötti egyensúlyt tolják el, a pozitív effektor az R, a negatív effektor a T irányba. Az allosztérikus szabályozás megvalósulhat kizárólag a fehérje szerkezeti dinamikájának megváltozásán keresztül is, mint ahogy azt a **17.5. ábra** szemlélteti.

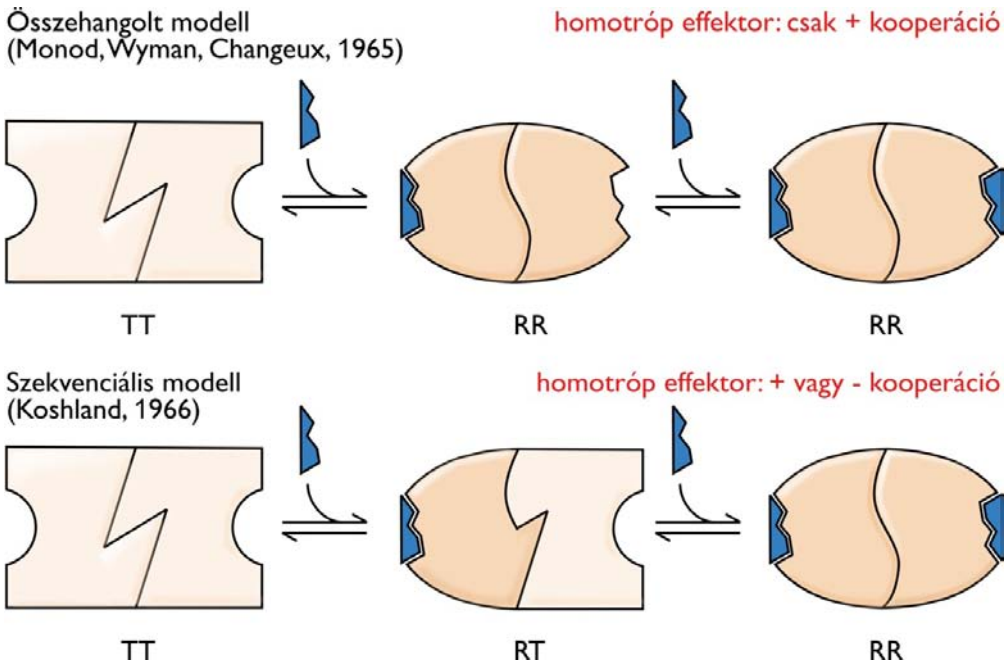


17.5. ábra: Kooperativitás (allosztéria) a fehérje szerkezeti dinamikájának megváltoztatásán keresztül.
Ligandum nélkül mobilisabb/ flexibilisebb régiók; ligandumkötés stabilizál (itt pozitív kooperativitás).

Az allosztéria és a kooperativitás kvantitatív leírására **két modell** született (lásd **17.6. ábra** és **7.8. fejezet**).

Az **összehangolt** (*concerted*; más néven szimmetrikus) **modellt** Jacques Monod, Jeffries Wyman és Jean-Pierre Changeux 1965-ben írták le. A modell szerint az **allosztérikus fehérje alegység**ei funkcionálisan ekvivalensek és **vagy a T vagy az R konformációs állapot**ban vannak. A ligandum mindkét állapothoz köt, de az R-hez nagyobb affinitással. Ha köt a ligandum az egyik alegységben levő kötőhelyéhez, mindegyik alegységben eltolódik a konformációs egyensúly az R állapot felé. E modell szerint **a kooperativitás** két homotróp kötőhely között **csak pozitív lehet**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.6. ábra: Az allosztéria/kooperativitás két modelljének összehasonlítása. T és R az allosztérikus fehérje alegységeinek konformációs állapota. S: szubsztrát vagy ligandum

Egy évvel később született meg az általánosabb, David Koshland által kidolgozott **szekvenciális** (*sequential*) **modell**, ahol az első ligandum kötése olyan konformációváltozást okoz, ami a többi kötőhelyre is kiterjed. Ebben a modellben **több átmeneti állapotot is felvehet az allosztérikus fehérje,** azonkívül **pozitív és negatív kooperativitás is** elképzelhető a homotróp effektorok között.

A két modell egymást nem zárja ki, az együttműködő modell valójában a szekvenciális modell egy „mindent-vagy-semmit" alesetének tekinthető.

17.2.2. Példa egy allosztérikus enzimre: aszpartáz-transzkarbamoiláz

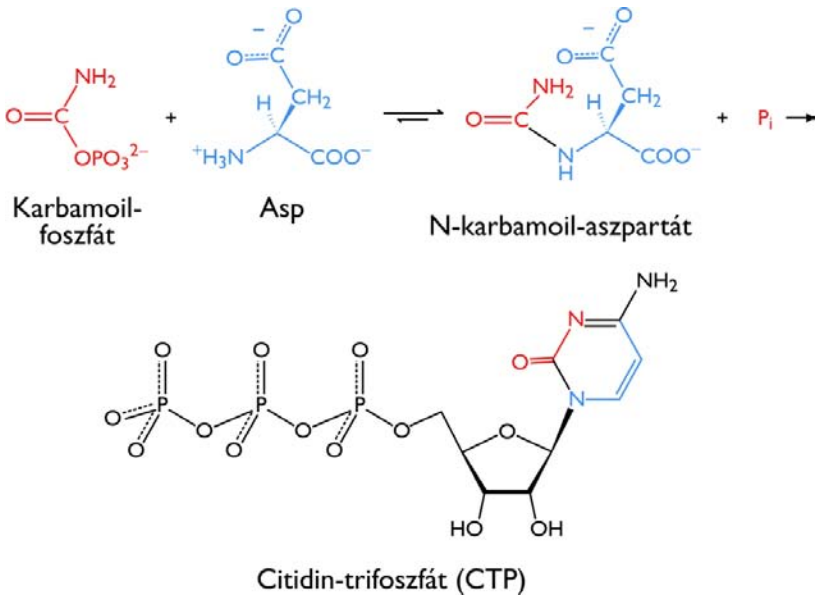
Az anyagcsere során egy kiindulási anyagból sokszor több lépésen keresztül alakul ki a végtermék, a katabolikus és az anabolikus folyamatokra is jellemzőek az **anyagcsere útvonalak**, ahol egy enzimreakció terméke a következő enzim szubsztrátja lesz (lásd **20.2. fejezet**).

Az anyagcsere útvonalak enzimei között mindig találunk legalább egyet, mely **allosztérikus szabályozás** alatt áll. Ez jellemzően a reakcióút első enzimeinek egyike, hiszen az útvonal elején a leggazdaságosabb a szabályozás. A szabályozott enzim általában a reakcióút úgynevezett **elkötelezett (*committed)* lépés**ét katalizálja. Ha ez a reakció lezajlik, akkor általában már az összes további reakciólépés is megtörténik és a kiindulási szubsztrátból létrejön a végtermék. A szabályozott enzim gyakran irreverzibilis reakciót katalizál (azaz a reakció szabadentalpia csökkenése nagy, pl. ATP átalakulásához kapcsolt reakciók).

A végtermék gyakran a reakcióút szabályozott enzimére negatív allosztérikus effektorként hat vissza – ez a **végtermék gátlás** (*feedback inhibition*). Különböző reakció utak végtermékei is hathatnak egymás keletkezésére allosztérikus módon, ezáltal egy komplex szabályozási hálózat alakul ki, amely az anyagcsere homeosztázisának egyik fő molekuláris szabályozási mechanizmusát jelenti. A szabályozott metabolikus enzimek nem csak allosztérikus, de sokszor reverzibilis kovalens szabályozás alatt is állnak (lásd **17.3.1**).

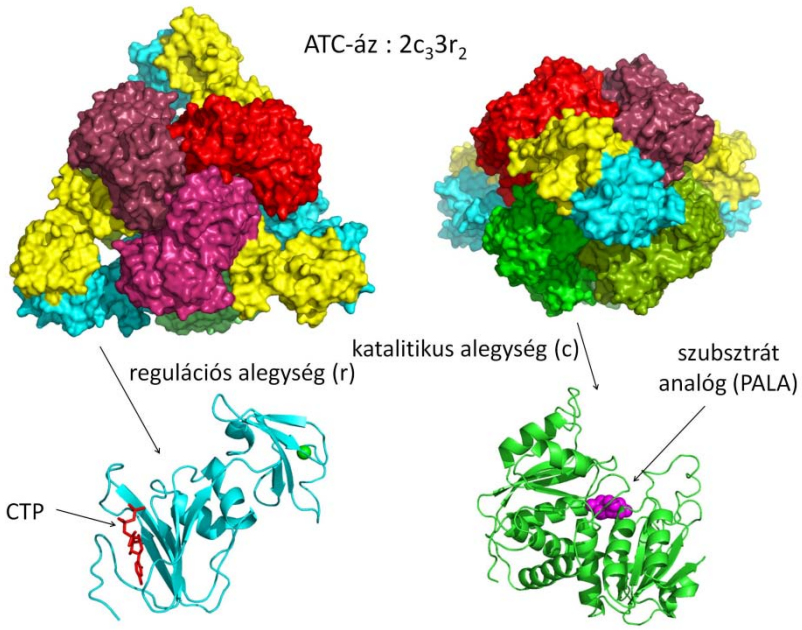
Az allosztérikusan szabályozott enzimek közül példaként a pirimidin nukleotidok szintézisének elkötelezett lépését katalizáló **aszpartát-transzkarbamoiláz (ATC-áz)** szabályozását mutatjuk be (lásd **17.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.7. ábra: A pirimidin nukleotid anyagcsereút elkötelezett lépése. A reakciót az aszpartát-transzkabamoiláz (ATC-áz) enzim katalizálja. További lépéseken keresztül a végtermék, a CTP allosztérikusan gátolja az ATC-ázt.

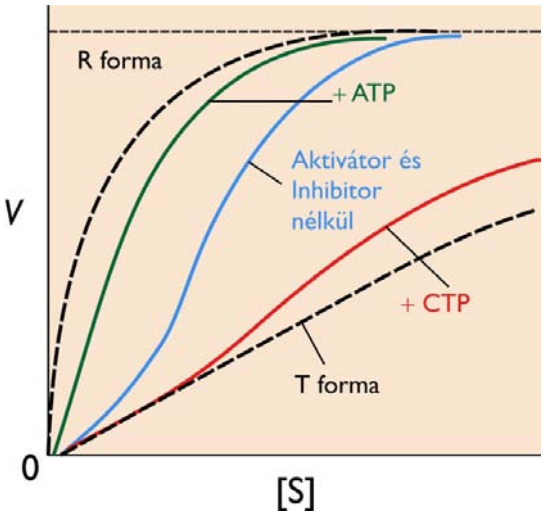
Az *E. coli*-ból származó enzim ~300 kDa molekulatömegű, **12 alegység**ből álló fehérje. A negyedleges szerkezet: c_6r_6 (2xc3 + 3xr2). A„c”a 6 katalitikus alegységet (34 kDa) jelöli, amelyek két, egymással kölcsönhatásban levő trimert alkotnak, míg az „r” a 6 regulációs alegységet jelöli (17 kDa), amelyek a trimerekhez oldalról dimerekként kapcsolódnak (lásd **17.8. ábra**)



17.8. ábra: Az ATC-áz enzim térszerkezete. A 2x3 katalitikus alegység színei piros és zöld árnyalatúak. A 3x2 regulációs alegység világoskék és sárga. A teljes szerkezetet két orientációban mutatjuk be felszíni ábrázolással.
Külön kiemeltünk egy-egy katalitikus és regulációs alegységet szalagábrázolással, valamint az allosztérikus gátlószer CTP-t (piros) és a katalitikus alegységhez kötődő szubsztrát analógot (PALA; lila) (PDB: 1RAI és 8ATC)

Az ATC-áz enzimreakció kezdeti sebessége nem követi a Michaelis-Menten kinetikát, nem hiperbola, hanem szigmoid alakú, azaz **kooperativitás**t mutat (lásd **17.9. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

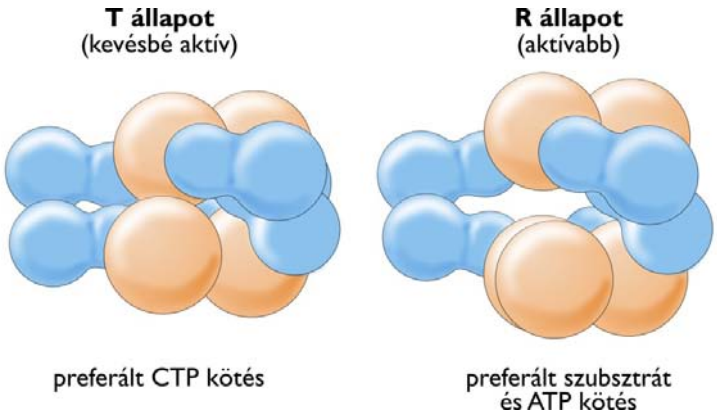


17.9. ábra: Az ATC-áz allosztérikus enzim szubsztrát telítési görbéje. Az ATP pozitív, a CTP negatív allosztérikus effektor.

Szubsztrát nélkül a fehérje preferáltan a T állapotban van, míg a szubsztrátot az R állapotban köti nagyobb affinitással. A szubsztrát kötődése az egyik alegységhez a többi alegységben a T→R irányba tolja el a konformációs egyensúlyt (lásd **17.10. ábra**). A **kooperativitás szerkezeti alapja** a katalitikus **alegység interakciós felszínek közötti konformációváltozás**, amit a szubsztrátkötés következtében a katalitikus alegység két doménjének záródása (indukált illeszkedés) idéz elő.

Az enzimet a pirimidin szintézis reakció végterméke, a citidin-trifoszfát (**CTP**) **allosztérikusan gátolj**a. A CTP a regulációs alegységhez kötődik és az enzimfehérje konformációs egyensúlyát a T állapot felé tolja el (azaz a T állapothoz köt preferáltan). Ezzel szemben az **ATP** (a purin bioszintézis egyik végterméke, a sejt magas energiafeltöltöttségének jele) az ATC-áz enzim **pozitív allosztérikus effektor**a.

Ez logikus szabályozási lépés, hiszen egyrészt a sejt a legtöbb nukleotidot DNS szintézisre használja, a DNS molekulában a Chargaff-szabályok alapján a purin és pirimidin nukleotidok aránya megegyezik, következésképpen a sejtnek célszerű ugyanolyan mennyiségben előállítania őket. Ezen kívül a magas energiaszint a replikáción kívül a transzkripcióhoz is kell, amihez szintén szükség van pirimidin nukleotidokra. Az ATP a regulációs alegységhez köt, preferáltan az enzim R konformációs állapotához (másképpen fogalmazva a konformációs egyensúlyt az R állapot felé tolja el) (lásd **17.10. ábra**).



17.10. ábra: Az ATC-áz T és R konformációs állapota. A CTP, mint negatív allosztérikus effektor, az egyensúlyt a T állapot felé, míg a szubsztrát (pozitív kooperativitás) és az ATP az R állapot felé tolja el.

Az enzimek világában természetesen nem csak a metabolikus útvonalak elkötelezett lépését katalizáló enzimfehérjékre jellemző az allosztérikus szabályozás. A motorfehérjéknél a polimer „sínt” (ami mentén a motor mozog) felépítő fehérjék, az aktin illetve a tubulin allosztérikus effektorként fokozzák a miozin illetve a kinezin és a dinein motorokfehérje ATP-áz aktivitását. A jelátvitelben (szignál transzdukció) szerepet játszó enzimeknél

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

a másodlagos hírvivők allosztérikus aktivátorként „bekapcsolnak” protein-kináz enzimeket (a cAMP a protein-kináz A, a Ca^{2+} a protein-kináz C enzimeket; lásd **17.3. fejezet**).

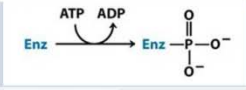
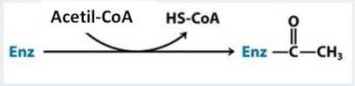
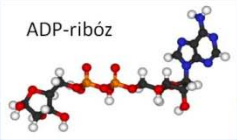
17.3. Reverzibilis kovalens szabályozása

A fehérjék aktivitásának **gyors, lokális szabályozás**át teszi lehetővé az **allosztérikus reguláció**, hiszen az effektor molekulák kötődését mindössze a koncentrációjuk befolyásolja. Ezzel szemben a **kovalens módosításon alapuló szabályozás hosszabb távon** befolyásolhatja az adott fehérje aktivitását, mivel a módosítás létrehozásához illetve az eltávolításához is egy-egy enzimre van szükség. Ma már mintegy 500 aminosav módosítást ismerünk, amelyek között vannak irreverzibilis és reverzibilis módosítások is (fontos emlékeztetnünk rá, hogy ezen változások mindegyike poszttranszlációs módosítás).

A módosítások többségében valamely donor molekuláról kerül egy **funkciós csoport** a fehérjére. Ismerünk olyan kovalens módosításokat is, ahol egy teljes fehérje kerül rá a szabályozandó fehérjére (ubiquitinálás, sumoilálás).

A fontosabb reverzibilis kovalens módosításokat a **17.1. táblázat** mutatja be, feltüntetve a módosított aminosavat, a donor molekulát és a módosítás kémiai szerkezetét is.

17.1. táblázat: A reverzibilis kovalens módosítások főbb típusai

Kovalens módosítás	Enzim	Aminosav oldallánc	Donor molekula	Szerkezet
foszforiláció-defoszforiláció	protein kináz/ protein foszfatáz	Ser/Thr, Tyr, (His)	ATP	
acetiláció/ dezacetiláció	protein acetiláz/ dezacetiláz	Lys, α-amino	Acetil-CoA	
metiláció/ demetiláció	protein metiláz/ demetiláz	Glu	S-adenozil-Met	
ADP- és poli-ADP-riboziláció	ADP-riboziltranszferáz, PARP	Arg, (Gln, Cys)	NAD^+	
ubiquitinálás, sumoilálás	E1, E2, E3 (ubiquitin-ligáz)	Lys, α-amino	ubiquitin (8,5 kD), SUMO (12 kD	

A **reverzibilis acetiláció**ra példa a hiszton fehérjék módosítása, amelynek fontos szerepe van az eukarióta transzkripció szabályozásában (lásd **18.3.2.2. fejezet**). A funkcionális csoport az acetil-koenzim-A molekuláról származik, a reakciót katalizáló enzimek a **hiszton-acetiltranszferázok** (HAT). Az acetil-csoport Lys oldalláncra kerül. A csoport eltávolítását a **hiszton-dezacetilázok** végzik. Fontos észrevennünk, hogy a módosított aminosav elveszíti a pozitív töltését (de negatív töltése sem lesz).

A fehérje **metiláció**ról (pl. a hiszton fehérjék, de az aktin és a miozin is metilálódnak poszttranszlációsan) sokáig úgy gondolták, hogy irreverzibilis szabályozás, de ma már tudjuk, hogy léteznek protein-demetiláz enzimek is, amelyek el tudják távolítani ezt a csoportot, ezáltal szerepet tölthetnek be például a génexpresszió szabályozásában.

Az **ADP-riboziláció**nál a NAD „kétharmada” kerül a fehérje pl. Arg oldalláncára. Sokszor nem csak egy funkciós csoport kerül a fehérjére, hanem ún. poli-ADP-riboziláció történik, amelyet a **PARP** (poli-ADP-ribóz polimeráz) enzimek katalizálnak. Ez a módosítás igen fontos szerepet tölt be a DNS hibajavításban, gyulladásos folyamatokban, az apoptózis szabályozásában.

Az **ubiquitinálás** az intracelluláris célzott fehérjedegradáció egyik legfontosabb szignálja, amikor egy fehérjére rákerül egy vagy több ubiquitin **izopeptid kötés**sel. Ezek a megjelölt fehérjék a proteaszómában lebomlanak. (Az ubiquitin-függő fehérjedegradációs útvonal felderítéséért a magyar származású Avram Hershko, Aaron Chachanover és Irwine Rose társaságában 2004-ben Nobel-díjat kapott.) A reverzibilis ubiquitinálás (és a rokon SUMO fehérje

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

által közvetített **sumoilálás**) többek között a transzkripció, a DNS hibajavítás, az apoptózis szabályozásában játszik szerepet.

A fehérjék aminosav oldalláncainak poszttranszlációs kovalens módosításai közül a fehérjeműködés szabályozása szempontjából a legelterjedtebb a **reverzibilis fehérje foszforiláció**. Becslések szerint az eukarióta fehérjék legalább egyharmadára rákerülhet egy vagy több foszfátcsoport, amely meg tudja változtatni a fehérje térszerkezetét vagy a térszerkezet dinamikáját, s ezáltal szabályozza az aktivitását.

17.3.1. Reverzibilis foszforiláció

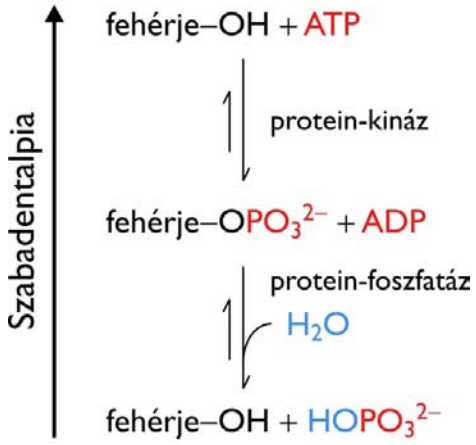
A reverzibilis fehérjefoszforiláció jelentőségére az első bizonyítékokat a glikogén szintézis kulcsenzimét, a glikogén-foszforilázt szabályozó foszoriláz kináz működésének felderítése szolgáltatta a 1960-as évek közepén (Edmond Fischert és Edwin Krebset 1992-ben Nobel-díjjal jutalmazták ezekért az eredményekért). Ma már tudjuk, hogy ez a **kovalens szabályozás**i mód nagyon elterjedt az élő rendszerekben, kiemelten az eukarióták világában, s a nem-kovalens allosztérikus szabályozás mellett a leggyakoribb molekuláris szabályozó mechanizmus.

A reverzibilis szabályozás **foszorilcsoport donor**ja minden esetben az **ATP**, amelynek a g-foszforilcsoportja transzferálódik a reakció során a fehérjék **Ser, Thr, Tyr** vagy ritkábban **His oldallánc**ára. A reakciót katalizáló enzimek neve: **protein-kináz, a defoszforiláló enzimeké** pedig **protein-foszfatáz.**

A foszforiláció során az ATP által szolgáltatott kb. -30 kJ/mol szabadentalpia (standard körülmények között, lásd **3.4.5. fejezet**) körülbelül fele „megőrződik” a létrejött foszfoproteinben (a hidroxilcsoportot tartalmazó oldalláncokkal észterkötést alakít ki a foszfát, aminek a hidrolízise kb. -15 kJ/mol szabadentalpia csökkenéssel jár). A „fél ATP-nyi” -15 kJ/mol szabadentalpia változás ugyanakkor elegendő ahhoz, hogy a reakciót gyakorlatilag irreverzibilissé tegye.

Emlékezzünk rá, az egyensúlyi állandó egy nagyságrenddel történő eltolása 5,69 kJ/mol szabadentalpia változással jár ($DG = – RT \ln K_{eq}$; lásd **3.2. táblázat** és **3.29. egyenlet**), azaz a foszforiláció irányába három nagyságrenddel el van tolva a reakció. Ebből a tényből az is következik, mint arról már feljebb is írtunk, hogy a **foszfátcsoport eltávolítás**át egy másik enzimnek egy másik reakcióval, nevezetesen **defoszforiláció**val (**hidrolízis**) kell elvégeznie. A szabályozás reverzibilitást biztosító lépését a fent említett **protein-foszfatáz** enzimek katalizálják (lásd **17.11. ábra**). Fontos megértenünk, hogy itt nem a foszforiláció (vagy éppen defoszforiláció) kémiai reakciója a reverzibilis, hanem a foszfátcsoport jelenlétén illetve hiányán alapuló szabályozás, amelyet két egymással ellentétes irányú, önmagában irreverzibilis, enzimkatalizált kémiai reakció kombinálása tesz lehetővé.

Miért hatékony szabályozási lehetőség a reverzibilis foszforiláció? Nem meglepő, hogy itt is a szabályozott fehérje konformációváltozását eredményezi az oldallánc(ok)ra rákerült foszfátcsoport. A neutrális pH-n két negatív töltéssel bíró csoport a módosítatlan fehérje felszínén töltéseket semlegesíthet, vagy új töltéseket hozhat létre, amelyek konformációváltozást eredményezhetnek. A foszfátcsoport több új H-híd kölcsönhatást is ki tud alakítani a módosított fehérje aminosav oldalláncaival.



17.11. ábra: A protein foszforiláció és defoszforiláció. Ábrázoltuk a protein-kináz illetve protein-foszfatáz enzimek által katalizált reakció szabadentalpia változását is.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ez a szabályozás elsősorban az intracelluláris fehérjéket/enzimeket érinti, s az allosztériához képest általában hosszabb idejű (másodpercektől akár órákig, napokig fennálló) aktivitásváltozást (aktiválás, gátlás) tesz lehetővé, amelynek a bekapcsolási/kikapcsolási kinetikáját illetve időtartamát a reverzibilis módosításban résztvevő két enzim további szabályozásával lehet finomhangolni.

A foszforiláción keresztül egy nagyon kis szabályozó jel könnyen felerősíthető (amplifikálható) **protein-kináz kaszkádok** segítségével. Ilyen, egymást foszforiláló és ezáltal „bekapcsoló"protein-kinázok szabályoznak például több fontos jeltovábbító (szignál transzdukciós) útvonalat a sejtben. Jellemző példa erre a sejtproliferációt szabályozó MAP-kináz (mitogén-aktiválta protein-kinázok) jeltovábbító útvonal.

17.3.2. Protein-kináz családok

A reverzibilis fehérje foszforiláció jelentőségét mi sem bizonyíthatja jobban, minthogy pl. a saját genomunkban ~600 gén (az összes gén több mint 3%-a) protein-kináz enzimet kódol. Ezeket alapvetően két fő kategóriába soroljuk, attól függően, hogy az ATP-ről a foszforilcsoportot milyen oldalláncra viszik át.

A népesebb csoport az ún. **Ser/Thr-kinázok**, amelyek az alifás hidroxil oldalláncra helyezik a foszfátot. Ezek az enzimek a sejtanyagcsere szabályozásán kívül többek között a jelátviteli folyamatok és a sejtosztódás szabályozásában is fontos szerepet töltenek be. A másik csoport a **Tyr-kinázok**, amelyek a Tyr aromás fenilcsoportján alakítanak ki foszfátésztert. Ezek a szabályozó enzimek tipikusan a jelátviteli útvonalakban játszanak szerepet (pl. a receptorok egyik külön osztálya, az ún. receptor tirozin-kinázok tartoznak ebbe a csoportba, mint pl. az EGF-receptor vagy a növekedési hormon receptora).

A protein-kinázok a szubsztrátjuk szerint lehetnek ún. **dedikált kinázok**, melyek specifikusan csak egy vagy néhány fehérjét tudnak foszforilálni. Példa a miozin könnyű lánc-kináz (MLCK) enzim, amely a simaizom kontrakciót „bekapcsoló" regulációs enzim, s nevének megfelelően a miozin motorfehérje egyik kisméretű alegységét foszforilálja. A másik csoportjuk **széles célfehérje spektrum**mal rendelkezik, azaz sokféle fehérjét/enzimet tud szabályozni. Mi alapján „tudja" az enzim, hogy melyik fehérjét kell szabályoznia? A szubsztrátspecificitás természetesen itt is, mint minden fehérje-fehérje, enzim-szubsztrát kölcsönhatás során (molekuláris felismerés) térbeli és elektrosztatikus komplementaritás alapján történik. Ebbe a csoportba tartozik az alábbiakban részletesen ismertetett protein-kináz A (más néven cAMP-függő protein-kináz).

Azt a szekvenciát (pontosabban szekvenciákat), ami beleillik a kináz enzim aktív helyébe, **konszenzus szekvenciá**nak nevezzük. A **17.2. táblázat**ban mutatunk be néhány fontos protein-kinázt, a konszenzus szekvenciákat és a kinázt allosztérikusan szabályozó modulátorokat is feltüntetve.

17.2. táblázat: Protein-kináz enzimek

Típus	Target szekvencia (konszenzus)	Aktivátor (allosztérikus)
protein-kináz A	-XR(R/K)X(S/T)Z-	cAMP
MLC-kináz (miozin könnyű lánc...)	-KKRXXSXZZ- (Z: hidrofób as.)	Ca^{2+}-CaM
Ca^{2+}-CaM kináz I	-ZXRXX(S/T)XXXZ-	Ca^{2+}-CaM
protein-kináz C	-(R/K)(R/K)X(S/T)Z(R/K)-	Ca^{2+}, diacilglicerol
MAP-kináz (mitogén-aktivált...)	-PXX(S/T)P-	MAPK-kináz
tirozin-kináz (src)		foszfo-Tyr
receptor Tyr-kináz (EGFR)	-EEEEYFELV-	EGF, PDGF

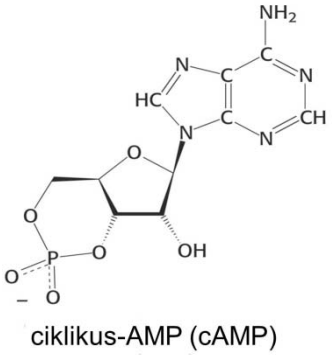
Fontos tulajdonsága a protein-kinázoknak, hogy ők is szabályozott fehérjék. Már említettük a protein-kináz kaszkádokat, de még általánosabb az allosztérikus szabályozás. Az allosztérikus effektor nevét sokszor a protein-kináz neve (vagy alternatív neve) is tartalmazza, mint például a Ca^{2+}-CaM-kináz esetében, amelyet a kalciumionok által szabályozott kalmodulin allosztérikus kötődése „kapcsol be".

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

17.3.3. A cAMP-függő protein-kináz (protein-kináz A) működése

Az állatok tipikus stresszválaszának (angol kifejezéssel: *fight-or-flight*) molekuláris hátterében központi szerepet tölt be a **cAMP-függő protein-kináz** (más néven **protein-kináz A**, **PKA**). Az **adrenalin**, a „stresszhormon" kötődik a sejtfelszíni **adrenalin receptor**hoz (ami egy G-fehérje kapcsolt receptor, GPCR, lásd **11.5.2.1. fejezet**), ami olyan konformációváltozást eredményez a membránfehérje intracelluláris doménjében, hogy egy **heterotrimer G-fehérje** fog kötődni az aktivált receptorhoz. (A receptor aktiváció molekuláris részleteinek feltárásért ítélték oda a 2012. évi kémiai Nobel-díjat Robert Lefkowitz-nak és Brian Kobilkának.).

A heterotrimer G-fehérjéhez kötött GDP GTP-re cserélődik, és szétesik egy $G_{\alpha s}$ és egy heterodimer $G_{\beta\gamma}$ alegységre. A GTP-kötött, ezért „bekapcsolt" állapotú $G_{\alpha s}$ aktivál egy membránkötött enzimet, az **adenilát-kináz**t. Ez utóbbi enzim ATP-ből **cAMP**-t (lásd **17.12. ábra**) szintetizál, ami aktiválja a kulcsenzim PKA-t.

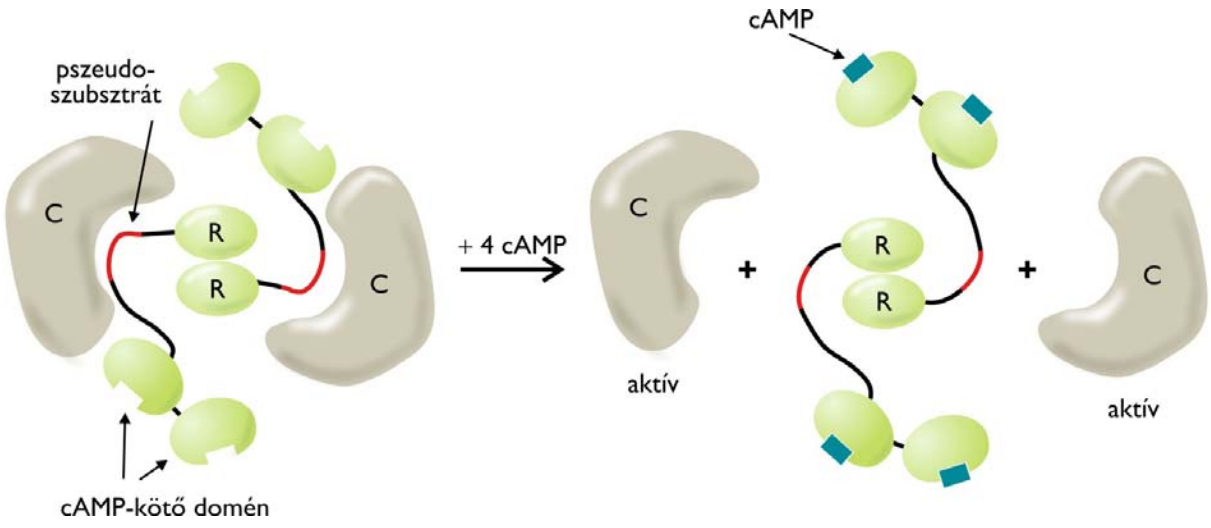


17.12. ábra: A 3'-5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP) szerkezeti képlete

Végül az aktivált PKA számos célfehérjét foszforilálva, sejttípus függően kiváltja a stresszválaszt (a szignál transzdukciós folyamat molekuláris részleteiről az emelt szintű biokémia oktatás keretében esik majd szó).

Ebben az alfejezetben a PKA működését ismertetjük. A PKA tanulságos példa arra is, hogy a fehérjeszabályzás során hogyan működik együtt az allosztérikus és a reverzibilis foszforiláción alapuló szabályozás, ugyanis a **cAMP a PKA allosztérikus pozitív modulátora.**

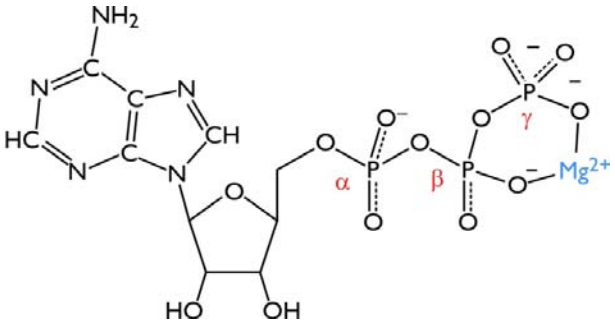
A PKA **alegységszerkezete** $\mathbf{R_2C_2}$, azaz két regulációs és két katalitikus alegységből áll. Inaktív állapotban a regulációs alegység egy-egy ún. **pszeudoszubsztrát** régiója kötődik a katalitikus alegységek aktívhelyéhez, s ezáltal az enzimet kikapcsolt állapotban tartja (lásd **17.13. ábra**). Hogyan működik a pszeudoszubsztrát?



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

17.13. ábra: A protein-kináz A enzim működésének vázlata. A bal oldali inaktív állapotot az aktív helyhez kötődő pszeudoszubsztrát okozza (intrasztérikus gátlás). Az allosztérikus effektor cAMP kötődése aktiválja az enzimet úgy, hogy a katalitikus és regulációs alegységek disszociálnak (jobb oldal).

Ennek megértéséhez először nézzük meg mi a **PKA célfehérjék konszenzus szekvenciá**ja: R(R/K)X(S/T)Z. Ezek alapján olyan szekvenciát ismeri fel a PKA szubsztrátként, amelynek az első aminosava Arg, a második pozitív töltésű (ezt jelzi a konszenzusszekvenciák egybetűs írásmódja szerint az R vagy K), a harmadik aminosav bármi lehet (ezt jelzi az X), a negyedik Ser vagy Thr, végül az ötödik aminosav hidrofób karakterű (ezt jelzi a *Z*). Tehát az enzim szubsztrátkötő zsebébe egy öt aminosavból álló peptidszakasz illik bele, s a negyedik pozícióban lévő Ser vagy Thr hidroxiljára kerül az aktív helyen lévő ATP-ről a terminális foszfátcsoport. Fontos emlékeztetnünk rá, hogy az ATP (mint minden más ATP-t kötő enzimnél) Mg^{2+}-komplex formájában (lásd **17.14. ábra**) kötődik a fehérjéhez. Ennek oka többek-között, hogy a magnézium jelenlétében az ATP hasítandó P-O kötése erősebben polarizálódik, ezért könnyebben lezajlik a reakció.



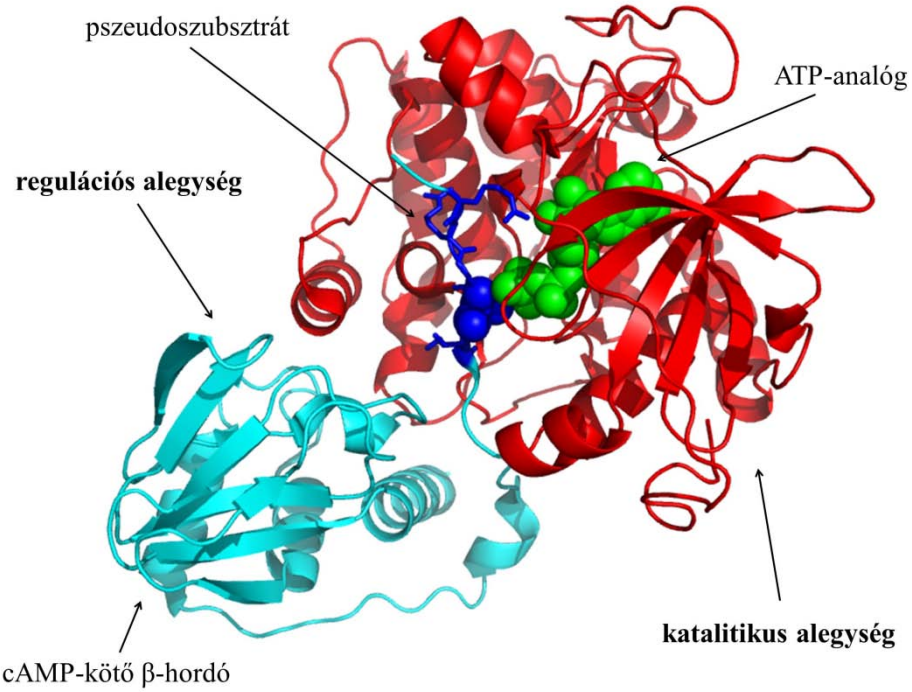
17.14. ábra: Mg^{2+}-ATP komplex

A regulációs alegység N-terminális régiójában található az Arg-Arg-Gly-**Ala**-Ile pszeudoszubsztrát szekvencia Ebben a konszenzus szekvenciában levő Ser vagy Thr aminosavat Ala helyettesíti. Mivel ennek az aminosavnak nincs hidroxil oldallánca (amire az ATP-ből a foszforilcsoport átkerülhetne), viszont a többi aminosavmaradék és a szubsztrátkötő zseb között kialakulnak a specifitást biztosító másodlagos kölcsönhatások, érthetővé válik, hogy miért „álszubsztrát” ez a szekvencia.

A **katalitikus alegységekhez 2-2 cAMPköt**, amely kölcsönhatás olyan konformációváltozásokat indukál az alegységek kölcsönhatási felszínén (a pszeudoszubsztrát és a katalitikus alegység között), ami végső soron a kétféle alegység disszociációjához vezet. A katalitikus alegységekben a szubsztrákötő zseb így hozzáférhetővé válik a célfehérje számára, a PKA aktív állapotba kerül. A pszeudoszubsztráton alapuló, sok más fehérjére is jellemző szabályozási típust **intrasztérikus gátlás**nak nevezzük

Az inaktív PKA enzim szerkezetét, kiemelve a pszeudoszubsztrát szekvenciát a **17.15. ábra** szemlélteti.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

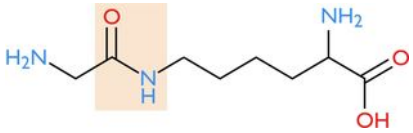


17.15. ábra: A PKA enzim szerkezete inaktív állapotban. A katalitikus alegység piros, a regulációs alegység világoskék színű. Az utóbbi N-terminális régiója, a pszeudoszubsztrát szekvencia kék. Az aktív helyen lévő ATP-analóg térkitöltő ábrázolással zöld. (PDB: 3FHI)

17.4. Irreverzibilis kovalens szabályozása

Az irreverzibilis kovalens szabályozás során a fehérje „véglegesen” módosított állapotba kerül, ami a már sokszor említett módon, konformációváltozás révén változtatja meg az adott fehérje aktivitását. A leggyakoribb ilyen típusú módosítás a polipeptidlánc poszttranszlációs, **limitált proteolitikus hasítása**. Ez a szabályozás jellemzően egy inaktív fehérjét illetve enzimet (proenzim vagy zimogén) alakít aktív állapotúvá.

Ezen kívül ilyen szabályozó, fehérjelebontási jel a polipeptidlánc utólagos **ubiquitinálása** és **poli-ubiquitinálás**a. Az ATP-függő, három lépésben (három enzim közreműködésével) lejátszódó folyamat során **izopeptidkötés** jön létre a 76 aminosavból álló ubiquitin C-terminális glicinjének α-karboxilcsoportja és leggyakrabban a módosítandó fehérje egy lizin oldalláncának e-aminocsoportja között (lásd **17.16. ábra**). Az így módosított fehérjék az eukarióta sejtek **proteaszómá**jában lebomlásra kerülnek.



17.16. ábra: Izopeptid kötés egy Gly α-karboxilcsoport és egy Lys e-aminocsoport között.

Végül megemlítjük az ún. **lipidhorgonyok** fehérjékre kerülését (lásd még **11.5.2 fejezet**). Ilyen módon kerül például számos jelátviteli folyamatokban szerepet játszó fehérjére a sejtmembránhoz történő lokalizációjukat biztosító lipidcsoport. Két példát mutatunk be. **Mirisztoil-csoport** (C14:0 telített zsírsav) kerül egy transzferáz enzim segítségével, amidkötéssel pl. a kis G-fehérje, a **Ras** N-terminális Gly α-aminocsoportjára. A **farnezilálás** során pedig egy izopréncsoport kerülhet fehérjékre, mint például az **Src** protein-kinázra.

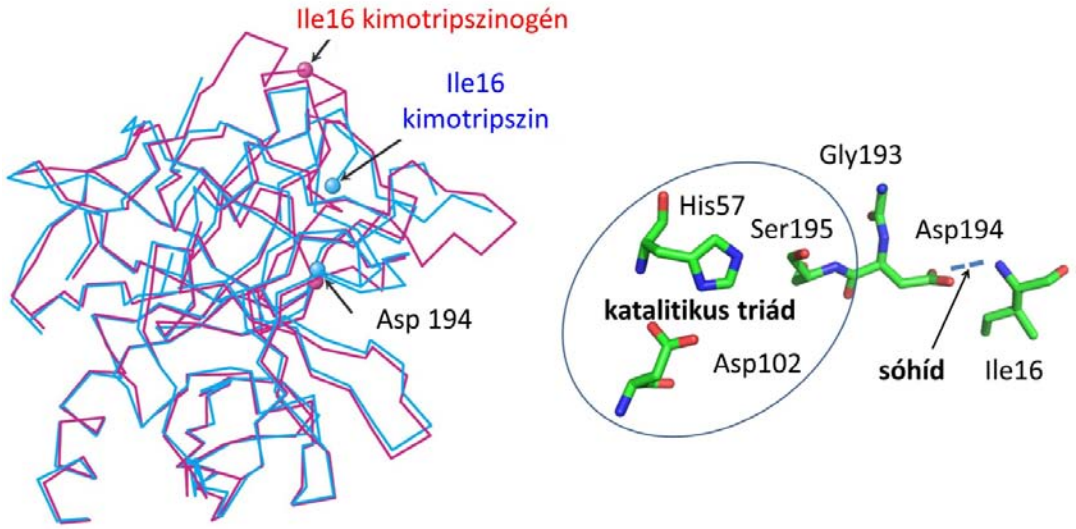
(A Ras egy kis GTP-áz fehérje ami fontos protoonkogén, és többek között a sejtproliferációs jelátviteli útvonalakban játszik szerepet, míg onkogén mutánsai a humán tumorok közel egyharmadában megtalálhatók. Az Src a sejtszaporodást szabályozó ún. szolubilis tirozin-specifikus protein-kináz, szintén protoonkogén fehérje).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

17.4.1. Fehérjék aktiválása proteolitikus hasítással

Nagyon gyakran előfordul, hogy elsősorban az extracelluláris térben működő fehérjék és enzimek inaktív formában szintetizálódnak, s egy vagy néhány peptidkötés hasítása után válnak aktívvá. A legismertebb ilyen példa a **hidrolitikus enzimek**, elsősorban az emésztőenzimek, zimogén formában történő szintézise után a **zimogén aktiválás**. Erre példa a kimotripszinogén aktiválódása aktív kimotripszinné (lásd **17.17. ábra**).

A **kimotripszinogén** 245 aminosav hosszú polipeptidláncát a tripszin aktiválja úgy, hogy a zimogénen belül elhasítja az Arg15-Ile16 közötti peptidkötést. (Egy második lépésben a létrejött és már aktív p-kimotripszin még két kötést hasít, s két kis peptid távozik is az enzimből, miközben kialakul a három láncból álló aktív α-kimotripszin.) A zimogénben az enzim **aktívcentrum**a szerkezetileg **torzult**, ezért inaktív. Az Arg15-Ile16 közötti **peptidkötés hasítása** egy **új N-terminális** megjelenését eredményezi, ezzel megjelenik egy protonált, tehát **pozitív töltésű α-aminocsoport**. Ez **sóhidat** hoz létre a 194-es Asp negatív oldalláncával, s ennek az elektrosztatikus vonzásnak a következtében a katalitikus triád (Ser195, His57 és Asp102) oldalláncai a katalízishez szükséges pozícióba kerülnek. A katalízis mechanizmusát a **8.5.3. fejezet**ben ismertettük, az itt bemutatott **17.17. ábra** a zimogén átalakulás hatására bekövetkező konformációváltozást és a kimotripszin aktív centrumát mutatja, kiemelve az újonnan létrejött sóhidat.



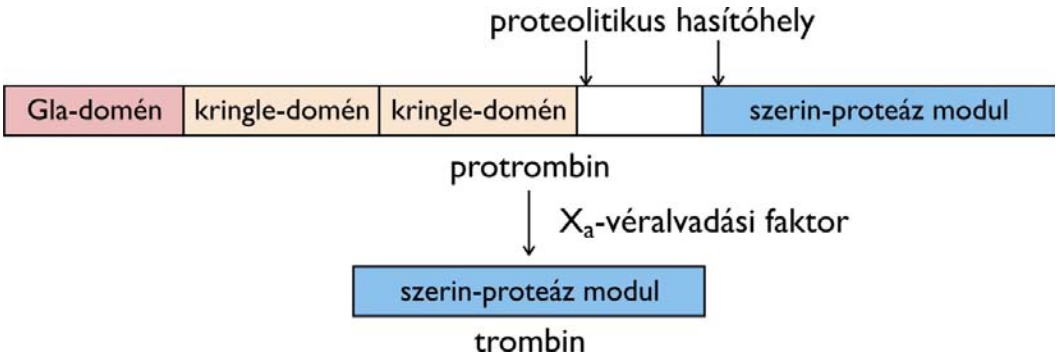
17.17. ábra: A kimotripszinogén és a kimotripszin szerkezetének összehasonlítása (bal) és a kimotripszin aktív helye (jobb). Kiemeltük a zimogén aktivációban kritikus sóhídat (Asp194 és az Ile16 α-aminocsoport között).

Az irreverzibilis szabályozásra további példák az ún. **proteolitikus kaszkádok**, ahol az egyes zimogén komponensek lépésenként egymást aktiválják proteolízissel. Ilyen proteolitikus kaszkádok vezetnek a **véralvadáshoz** és a veleszületett immunvédekezéshez tartozó a **komplementrendszer** aktiváláshoz**.**

A véralvadási kaszkádot itt nem részletezzük, csak az utolsó zimogén aktiválási lépést említjük, nevezetesen a **protrombin-trombin átalakulás**t. A trombin katalizálja, szintén limitált proteolízissel a fibrinogén-fibrin átalakulást, ami a véralvadás utolsó előtti „végrehajtási" lépése (az utolsó lépés a kialakuló fibrilláris fibrin szálak kovalens izopeptid keresztkötésekkel történő stabilizálása, a szintén zimogén aktiválással funkcióképessé váló transzglutamináz enzim által).

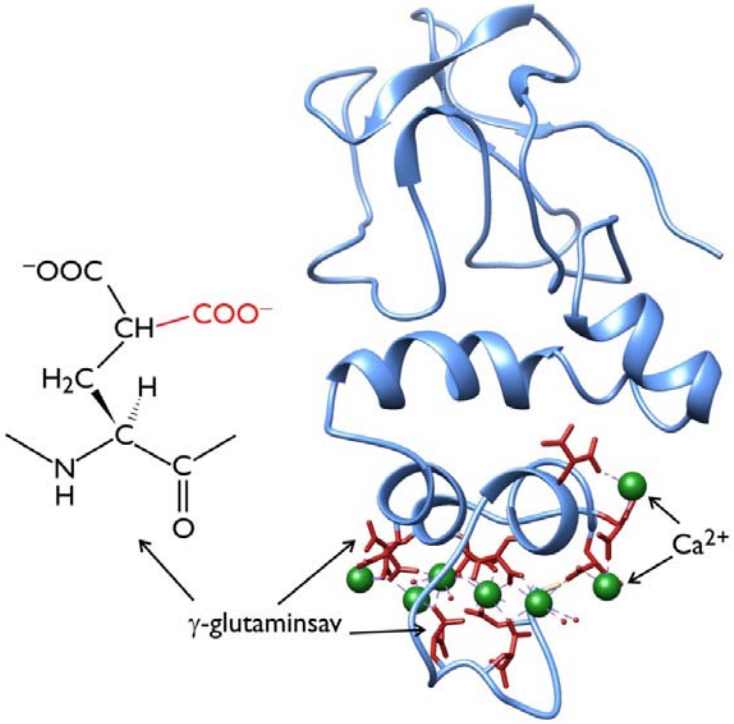
A protrombin tipikus **moduláris fehérje** (lásd **17.18. ábra**). A modul egy fehérjeevolúciós egység, amely egy-egy funkció elvégzésére képes génrégió független evolúciójával – az „exon-keveréssel" (*exon shuffling*) – jöhet létre. Szerkezeti értelemben egy fehérjemodul egy vagy több doménből is állhat (utóbbira példa a sok extracelluláris fehérjében, így a véralvadási kaszkád és a komplement aktiváció egyes komponenseiben megtalálható **szerin-proteáz modul**, ami két szerkezeti doménből áll, lásd **8.14. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



17.18. ábra: A protrombin szerkezeti sémája és proteolitikus hasítása trombinná. A Gla-domén g-Glu aminosavakat tartalmaz, a kringle-domén fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesz részt.

A protrombin N-terminálisán egy **Gla-domén** található, amely poszttranszlációsan kialakuló g-glutaminsavakat tartalmaz (az oldalláncában két karboxilcsoport van; lásd **17.19. ábra**). Ezt a domént két, tipikusan fehérje-fehérje, domén-domén kölcsönhatásokban résztvevő ún. **kringle-domén** (topológiája alapján egy dán perec után elnevezve) követi, végül a C-terminális végen található a **szerin-proteáz modul.** A proteáz egység aktivitását a Gla- és a kringle-domének a protombinban gátolják, másrészről viszont elősegítik a protrombint aktiváló X_a-véralvadási faktor kötődését. A protrombin aktiváció során két peptidkötés hasad (lásd **17.18. ábra**), s ennek eredményeként szabadul fel a katalitikus régió a gátlás alól.



17.19. ábra: A protrombin Gla-domén térszerkezete és a Gla (g-Glu aminosav). Ca^{2+}: zöld, a g-Glu aminosavak: piros (PDB: 2PF2)

A trombin, egy tipikus szerin-proteáz, amely azonos módon működik a korábban ismertetett kimotripszinnel (lásd **8.5.3. fejezet**). Szubsztrátspecifitása ugyan hasonlít a tripszinéhez, de jóval szűkebb, mivel az Arg utáni peptidkötést szinte csak Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser szekvenciát megkötve, hasítja.

A g-glutaminsav szintézisét egy **K-vitamin-függő enzim** katalizálja. Ennek a poszttraszlációs úton keletkező aminosav oldalláncnak az a jelentősége, hogy az egy karboxilcsoporthoz képest jóval erősebb fémion kelátor, ezért az érfal sérülésekor felszabaduló Ca^{2+}-ot koordinációs kötéssel megköti (lásd **17.19. ábra**), ezzel a sérülés helyéhez „csalogatja” a protrombint, s a zimogén aktiváció ott fog megtörténni, ahol a véralvadásra szükség van.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Érdekességként megjegyezzük, hogy az oldallánc karboxilálását végző enzimet **gátol**ja a kumarin származék **dikumarol** és a **warfarin** (4-hidroxikumarin), amelyek antikoaguláns (véralvadásgátló) szerek. Magas koncentrációban az ilyen szerek belső vérzéseket okoznak, az utóbbit, ezt kihasználva patkányméregként is használják.

Végül megemlítünk néhány egyéb példát az irreverzibilis proteolízissel történő **proprotein/proenzim (zimogén) aktiválás**ra: A **komplementrendszer proteolitikus kaszkádj**át már említettük. A **prohormonok** is limitált proteolízissel aktiválódnak (pl. proinzulin-inzulin átalakulás). A leggyakoribb kötőszöveti fehérje, a kollagén **prokollagén**ként szintetizálódik, s irreverzibilis proteolízis után jönnek csak létre a kollagén fibrillumok. Az egyedfejlődés során szükség lehet a kollagén elbontására (lásd például az ebihal farokszövetének lebomlása), amit a kollagenáz enzim katalizál, de csak miután a zimogén **prokollagenáz** limitált proteolízissel aktiválódott. A programozott sejthalál, az apoptózis egyik „ítéletvégrehajtója" a kaszpáz enzimcsalád, amelynek inaktív zimogénjei **a prokaszpázok.**

(A kaszpázok angol nevében - *caspase* - a kezdő „c"betű onnan ered, hogy a cisztein- proteázok közé tartoznak, az „asp" pedig a szubsztrátspecificitásukat jelzi, mivel Asp oldallánc után hasítják a peptidkötéseket. E proteázcsaládban a szerin-proteázokéhoz hasonló katalitikus apparátus végzi, de Ser, His, Asp triád helyett itt egy Cys, His diád alkotja a katalitikus centrumot.)

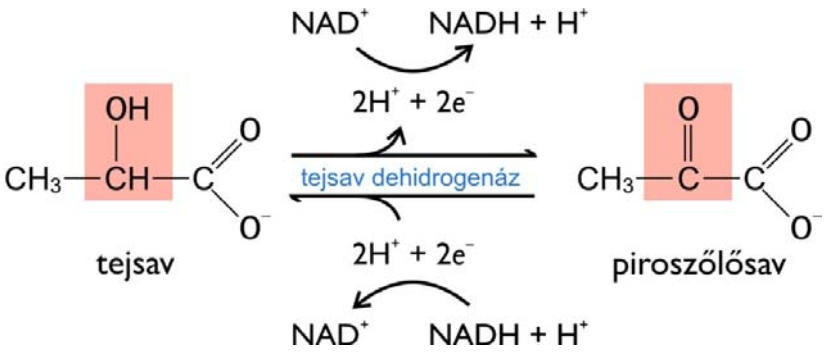
17.5. Fehérje izoformák, izoenzimek

Az **izoenzimek** (izozimek) vagy más típusú fehérjék esetén **izoformák** elsődleges szekvenciájukban különböznek, de ugyanazt a reakciót katalizálják, illetve ugyanazzal a funkcióval rendelkeznek. Mi lehet a szerepük? Az izoenzimek vagy izozimek gyakran különböző kinetikai paraméterekkel rendelkeznek (lásd alább az LDH esetét). Az izozimek kissé eltérő kinetikai paraméterei és eltérő szabályozásuk több esetben például az anyagcsere egyes útvonalainak „finombeállítását" teszi lehetővé. Nem katalitikus funkció esetén az izoformák részben különböző ligandumokkal kerülhetnek kölcsönhatásba (más fehérje partner, más DNS-kötő szekvencia stb.), de itt is az eltérő szabályozásnak lehet a legfontosabb biológiai szerepe.

A különböző izoformák/izoenzimek egy része **génduplikációval**, más részük viszont egyetlen génről **alternatív splicing**-gal keletkezik. Az előbbire példa az izomszövetben expresszálódó, a miofibrillumok vékony filamentumait felépítő α-aktin és a minden eukarióta sejtben expresszálódó, a sejtváz részét képező mikrofilamentumokat felépítő β-aktin. Az alternatív splicing-gal keletkező izoformákra példa a tropomiozin: az emlősök 4 tropomiozin génjéről >40-féle mRNS és ezáltal polipeptidlánc keletkezik. Bár ezek az izoformák az egyedfejlődés során szabályozott módon keletkeznek, pontos szerepüket ma még nem ismerjük (azon túl, hogy az aktin filamentumokhoz kötődve stabilizálják őket és befolyásolják a további fehérje-fehérje kölcsönhatásaikat).

Ha az enzim vagy fehérje negyedleges szerkezettel bír és a különböző alegységek szabadon kombinálódnak akár homo-, akár- és heterooligomereként, akkor kombinatorikus módon további izoenzimek, izoformák keletkezhetnek. Erre példa a tropomiozin (amely két láncból álló *coiled-coil* szerkezetű fibrilláris fehérje) és a **tejsav-dehidrogenáz** (LDH: laktát-dehidrogenáz) **izoenzimek**.

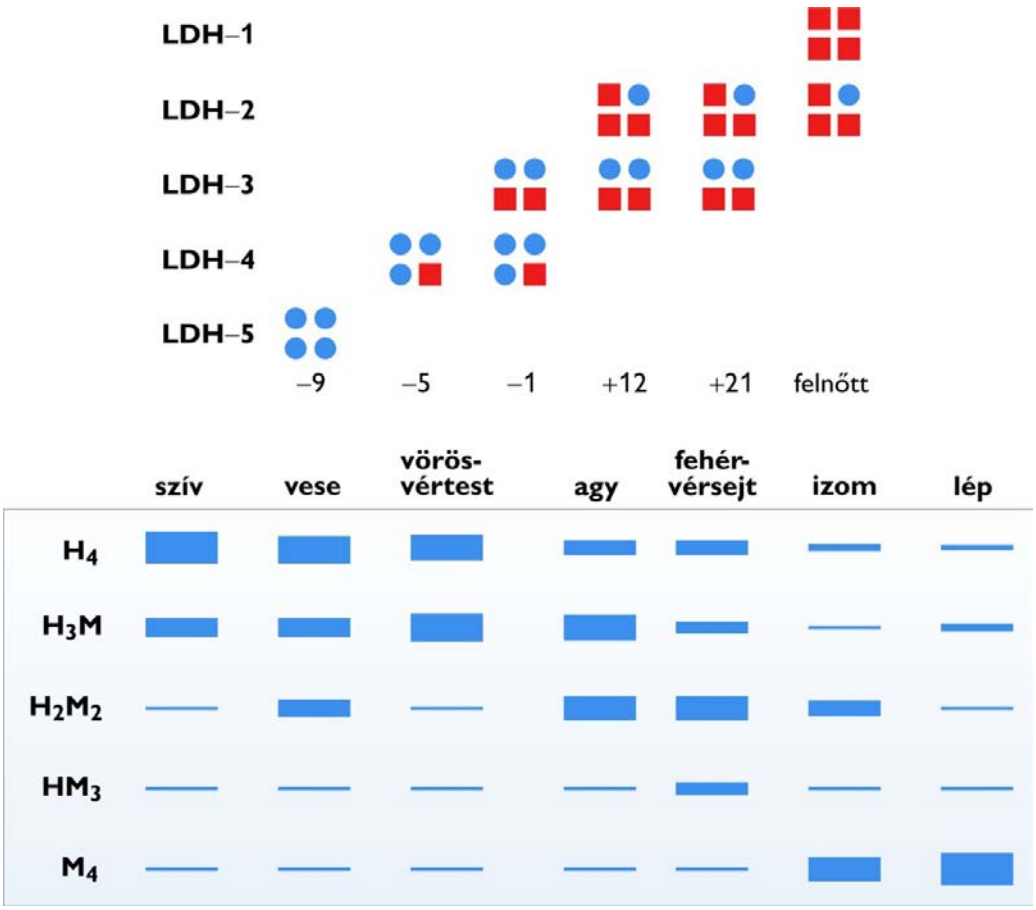
Az LDH az emlősökben a glikolízis végtermékét, a piroszőlősavat, anaerob körülmények között (például az izmokban elegendő oxigén hiányában), tejsavvá redukálja, lásd **17.20. ábra**). A reakciónak nagy jelentősége van a katabolizmus szempontjából, mivel a redukált NADH-t visszaoxidálja NAD-dá, ami nélkül a glikolízis leállna.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

17.20. ábra: A tejsav-dehidrogenáz enzim által katalizált reakció

A humán genomban **két gén** kódol **LDH** polipeptidláncot. A két lánc szekvenciája 75%-ban azonos. Ezek **szabadon kombinálódva** állnak össze a **tetrame**r szerkezetű LDH enzimmé. A kétféle láncból így **két**féle **homotetramer** és **három**féle **heterotetramer** keletkezhet, amelyek jellegzetes szöveti expressziós mintázatot követnek. A „H" (*heart*) típusú izoenzim a szívizomsejtekben van jelen nagy mennyiségben, míg a „M" (*muscle*) típusú az izomszövetben expresszálódik legnagyobb mennyiségben. A többi szervben az ötféle izoenzim jellegzetes eloszlási arányban jelenik meg (lásd **17.21. ábra**).



17.21. ábra: Tejsav-dehidrogenáz izoenzimek natív poliakrilamid gélelektroforézissel történő szeparálás után (sematikusan). A kétféle polipeptidlánc (H és M) szabad kombinálódásával ötféle tetramer izoenzim jöhet létre.

A H_4-nak nagyobb a szubsztrátaffinitása, mint az M_4 típusnak, s abban is különböznek, hogy az előbbit a nagy koncentrációjú piroszőlősav allosztérikusan gátolja, míg az utóbbi formát nem. A többi izoenzimnek köztes tulajdonságai vannak. A kinetikai paraméterek alapján a szívizomra jellemző izoenzim tipikusan az aerob sejtlégzésre van „finomhangolva", a vázizomra jellemző forma viszont optimálisan működik az izomban előforduló relatíve anaerob körülmények között is. Érdemes megemlíteni, hogy az LDH izoenzimek megjelenése a vérben diagnosztikus jelentőségű: például a H_4 forma megemelkedése szívinfarktust jelez.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

18. fejezet - A génexpresszió szabályozása

(szerző: Nyitray László)

A gének kifejeződése, azaz a **génexpresszió** két, egymás után következő folyamat, a **transzkripció** és a **transzláció** (lásd **14.** fejezet és **16. fejezet**ek) során valósul meg. Ezek az eukariótákban térben és időben is elkülönülnek. A génexpresszió végtermékei az életfolyamatok „rabszolgái", a fehérjék, amelyek képesek a DNS-ben tárolt információ alapján az élő rendszerek működéséhez szükséges legtöbb feladat ellátására. Ezek a feladatok időben, soksejtű szervezetek esetében térben is változnak, következésképpen nem feltétlenül mindig ugyanazokra a fehérjéknek kell kifejeződniük és működniük a sejtekben.

Ha egy adott pillanatban megnézzük egy sejtben előforduló fehérjéket, a proteomot jóval kevesebb fajtát találunk, mint az adott élőlény összes fehérjéje (ugyanez igaz a transzkriptomra, az összes átíródó RNS molekulára is). Ráadásul nem ugyanazokat a fehérjéket azonosíthatjuk, mondjuk egy baktériumsejtből, amikor dús táptalajon tenyésztjük vagy már jó ideje „éheztetjük". Ha összehasonlítjuk egy emlős különböző sejttípusaiban kifejeződő géneket, szintén megdöbbentő különbségeket figyelhetünk meg, minőségi és mennyiségi szempontból is (lásd **18.1. táblázat**).

A molekuláris biológia egyik alapkérdése, hogy milyen szabályozó mechanizmusokon keresztül valósul meg, hogy a fehérjék térben és időben szabályozott módon termelődnek, mi a **differenciált génexpresszió** molekuláris háttere. Ebben a tankönyvben a génexpresszió szabályozásának molekuláris alapelveivel, a fehérjéken (transzkripciós faktorok) keresztül megvalósuló szabályozási folyamatokkal foglalkozunk. (A már elkészült fehérjék szintjén megvalósuló szabályozási stratégiákat az előző fejezetben tárgyaltuk.) A továbbiakban génkifejeződés általános elveit, majd külön-külön a pro- és eukarióta génexpresszió szabályozás sajátságait vesszük sorra.

18.1. táblázat: A legnagyobb mennyiségben expresszálódó gének három sejttípusban*

Hasnyálmirigy	%	Máj	%	Embionális őssejt	%
prokarboxipeptidáz A1	7,6	albumin	3,5	glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPD)	0,7
tripszinogén 2	5,5	apolipoprotein A-I	2,8	transzlációs EF-1α1	0,6
kimotripszinogén	4,4	apolipoprotein C-I	2,5	α-tubulin	0,5
tripszin(ogén) 1	3,7	apolipoprotein C-III	1,5	transzformáció-szabályozott tumor protein (TCTP)	0,5
elasztáz IIIB	2,4	ATP-áz 6/8	1,5	ciklofilin-A	0,4
proteáz E	1,2	citokróm-oxidáz 3	1,1	kofilin	0,4
lipáz	1,9	citokróm-oxidáz 2	1,1	nukleofozmin (NPM1)	0,4
prokarboxipeptidáz B	1,7	α_1-antitripszin	1,0	konnexin-43 (GJA1)	0,4
amiláz	1,7	citokróm-oxidáz 1	0,9	foszfoglicerát-mutáz	0,2
epesó-aktivált lipáz	1,4	apolipoprotein E	0,9	transzlációs EF-1β2	0,2

*A sejtekből izolált teljes mRNS %-ában. Forrás: *Science* (1995) 270,484; *BBRC* (2000) 269,110; *Stem Cells* (2004) 22, 51.

18.1. A génexpresszió szabályozás általános elvei

A génexpresszió végterméke a fehérje, amelynek milyenségét és mennyiségét is szabályozni lehet, s az élő rendszerek mindkét lehetőséggel „élnek".

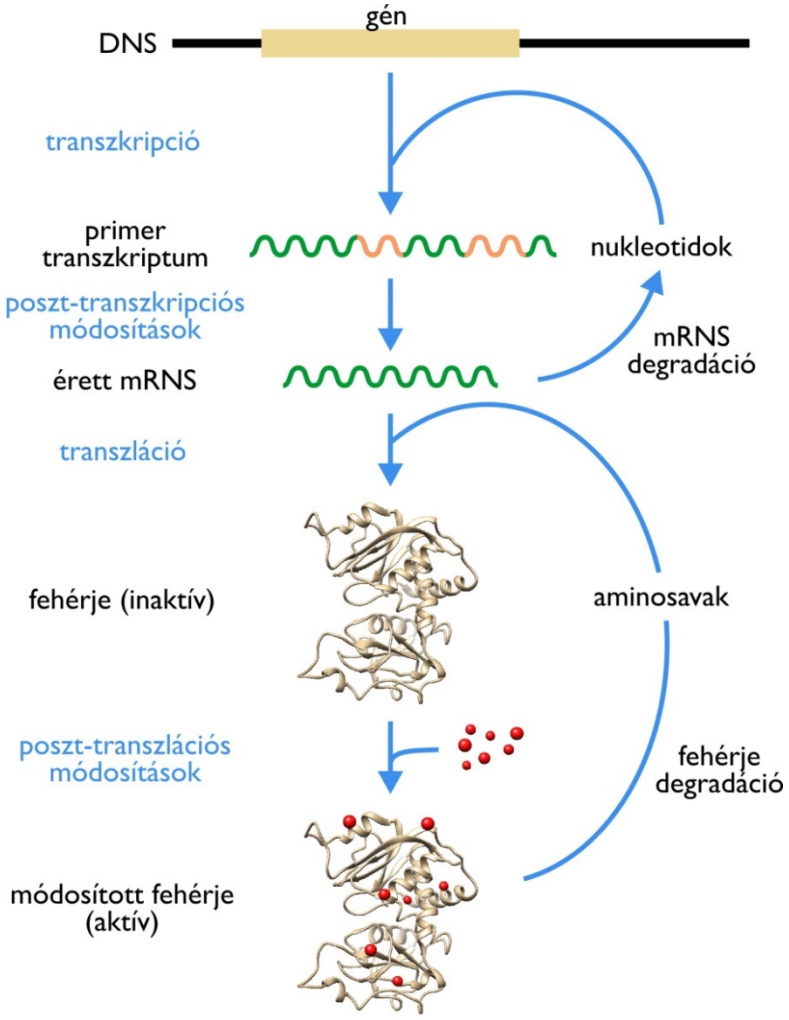
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Szabályozási szempontból az előbbire példa a különböző izoformák/izoenzimek expressziója (lásd **17.5. fejezet**) valamint az összes, a szintén az előző fejezetben tárgyalt poszttranszlációs fehérjeszabályozási mechanizmus, valamint az ebben az e-könyvben nem tárgyalt protein „targeting”, a fehérjék megfelelő kompartmentbe való juttatása is. A fehérjék mennyiségét (koncentrációját) pedig az előállításuk és a lebontásuk szintjén lehet szabályozni (lásd **18.1. ábra**).

A fehérjék szabályozott lebontásával ebben a fejezetben nem foglalkozunk (lásd például a proteaszómán keresztül történő szabályozott lebomlás, amit röviden bemutattunk a **17.4. fejezet**ben). A fehérjék előállításának szabályozása viszont a génexpresszió mindkét szintjén megvalósulhat. Alapvetően azt mondhatjuk, hogy a szabályozás **gyakrabba**n a transzkripció során (**transzkripciós kontroll**), **ritkábba**n a transzláció szintjén (**transzlációs kontroll**) valósul meg. Ez szabályozáselméleti alapon érthető is, hiszen a transzkripció is energiaigényes folyamat, gazdaságosabb már az mRNS szintézisét „kikapcsolni” (vagy nem „bekapcsolni”), ha az adott géntermékre nincs szükség (emlékezzünk, ugyanez az elv érvényesül az anyagcsere utak szabályozásánál is, lásd **17.2.2. fejezet**).

Lehet szabályozni a génexpresszió szintjét, legalábbis az eukarióta sejteknél, poszttranszkripció szinten is (**poszttranszkripciós kontroll**). Az egyik példa a korábban bemutatott alternatív splicing (lásd **14.10. fejezet**) folyamata, a másik lehetőség pedig a nem olyan régen felismert **RNS interferencia** jelensége, amelynek során a citoplazmában a már érett mRNS-ek, mielőtt transzláció történik róluk, degradálódhatnak.

Természetesen nem minden gén expressziója áll szabályozás alatt. Vannak ún. **háztartási** (*housekeeping*; más néven **konstitutív) gén**ek, amelyek fehérjetermékére minden sejtnek mindig szüksége van. Ide tartoznak például az alapanyagcsere, például a glikolízis enzimei, az eukariótákban pedig a sejtváz részét képező aktin vagy a szabályozott fehérjelebontásban szerepet játszó ubiquitin fehérje (a neve is erre utal: „mindenütt előforduló”).



18.1. ábra: A fehérjék sejten belüli koncentrációját befolyásoló folyamatok

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A génexpresszió, mint minden más szabályozás lehet pozitív és negatív, aktiváció és gátlás. Az RNS-szintézist befolyásoló regulációs fehérjéket általánosan **transzkripciós faktorok**nak (TF) nevezzük. Definíció szerint a TF-ek specifikus **DNS-kötő fehérjék**.

A transzkripció **negatív szabályoz**ása (**represszió**) inkább a prokarióta génekre jellemző. A transzkripciót gátló szabályozó fehérjéket **represszor proteinek**nek hívjuk. A **pozitív szabályozás**t (**indukció** vagy **aktiváció)** végző TF-ek pedig az **aktivátor proteinek**. Az aktiváció inkább az eukarióta génexpresszió szabályozására jellemző. A molekuláris genetika **cisz-elem**eknek nevezi a DNS-en található, a transzkripciót befolyásoló, fehérjék által felismerhető konszenzus szekvenciákat (ilyen például a promóter), míg **transz-elem**nek a génexpressziót szabályozó, de nem a DNS-molekulán található elemeket, amelyek alapvetően a TF-ek (azaz fehérjék, amelyeket természetesen gének kódolnak, de azok expresszióját más transz-faktorok szabályozhatják).

A transzkripció szabályozásában résztvevő fehérjék másik csoportjába a **transzkripciós kofaktorok** (korepresszor, koaktivátor) tartoznak. Definíció szerint nekik nincs DNS-kötő doménjük, hanem a TF-ekhez kötődve fejtik ki szabályozó szerepüket (példa rájuk a később tárgyalandó Mediátor-komplex).

A génexpresszió szabályozásának megértése szempontjából az első nagy áttörés 1960-ban történt, amikor a Francois Jacob és Jacques Monod *E. coli*-val végzett genetikai kísérleteik alapján megalkották az **operon modell**t. (Érdekességként megemlítjük, hogy a működési modell „logikájának” a kitalálásához döntő mértékben hozzájárult Szilárd Leó, a nukleáris magreakció gondolatát is először megsejtő magyar atomfizikus.). Mielőtt az operonok működését molekuláris szinten bemutatjuk, fontos hangsúlyoznunk, hogy ez a szabályozási elv, illetve az **operon**, mint **szabályozási egység**, mint később kiderült, csak a prokariótákra igaz általánosan (bár megjegyzendő, hogy egyszerűbb eukarióta szervezetekben is leírtak operonokat), a sokkal komplexebb eukarióta génexpresszió szabályozási elvei ettől eltérnek, s minden részletében még ma sem feltártak.

Elöljáróban annyit érdemes megjegyezni, hogy a **prokarióta gének** „alapból” **bekapcsolt állapotban** vannak, s az operonokra a génrepresszió a jellemző szabályozás. Ezzel ellentétben az **eukarióta gének** „alapból” (elsősorban a DNS nukleoszómákba és magasabb szintű kompakt szerkezetekbe történő szerveződése miatt) **kikapcsolt állapotban** vannak, ezért a szabályozásban sokkal nagyobb teret kap a génaktiváció.

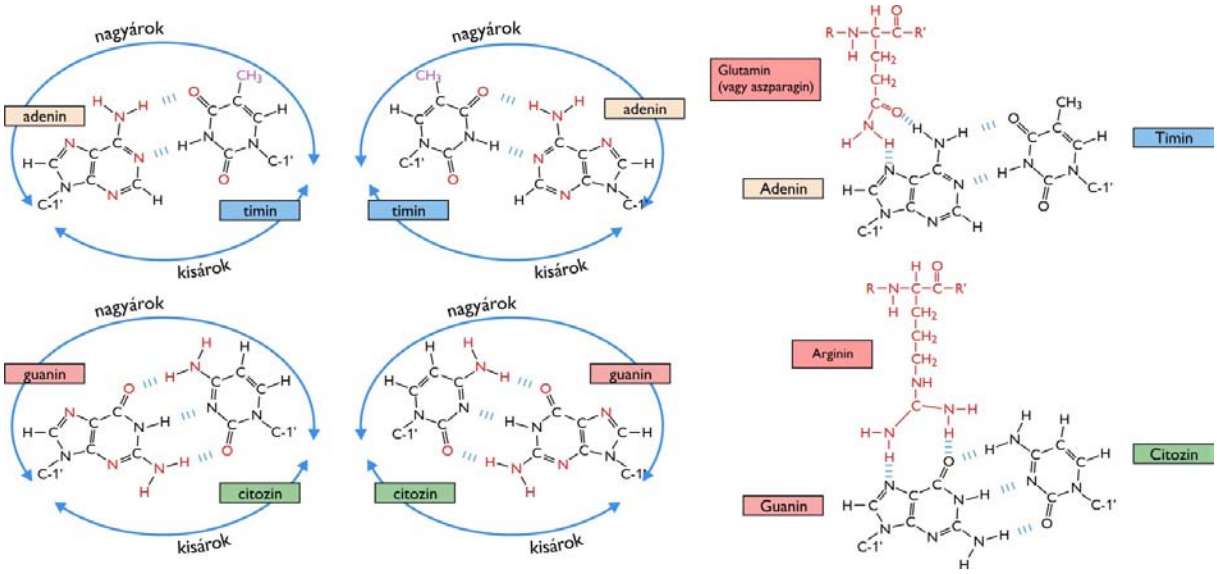
Fontos még kiemelnünk az olvasó számára, hogy a továbbiak egyszerűbb megértése érdekében lapozzon vissza a transzkripció részleteit tárgyaló **14. fejezet**re, s újból olvassa át a promóterek felépítésére és elsősorban a transzkripció iniciációjára vonatkozó alfejezeteket.

18.1.1. A transzkripciós faktorok DNS-felismerése

A DNS molekulán található szabályozó elemek megtalálását, azaz a specifikus **DNS-szekvenciák felismerésé**t a transzkripciós faktorok (és a többi DNS-kötő fehérje) kitűnően megoldják, hiszen a specifikus helyekhez 10^4-10^6-szor nagyobb affinitással kötődnek, mint nem-specifikus szekvenciákhoz. Teszik ezt annak ellenére, hogy a DNS gerincén nem, csak a bázispárok külső oldalán vannak olyan csoportok, amelyekhez a fehérjék fajlagosan kapcsolódhatnak. A DNS szekvenciák felismerésében is ugyanazok a gyenge kölcsönhatások vesznek részt, mint minden más fehérje kölcsönhatásban: hidrogénhidak, van der Waals kölcsönhatások, hidrofób hatások. Az utóbbira példa a timin metilcsoportjának felismerése. A bázispárok potenciális felismerőhelyeit, s a fehérje oldaláról a DNS-kötésben leggyakrabban szereplő három oldallánc kölcsönhatásait a **18.2. ábra** szemlélteti.

A B-DNS kettőshélix szerkezeten belül a **nagyárok** mentén jóval több **potenciális H-híd donor és akceptor csoport** található, melyek szerepet játszhatnak a specifikus kölcsönhatás kialakításában. Ezeket egészíti ki a könnyen felismerhető metilcsoport a timint tartalmazó bázispár külső oldalán. Nem meglepő, hogy mint majd látni fogjuk, a legtöbb TF a DNS nagyárkát ismeri fel (bár egy két példa van a kisárokhoz kötődő DNS-felismerő fehérjére is, mint azt a TBP, a TATA-box elemhez kötő, a preiniciációs komplex kialakulását elindító fehérje példázza, lásd **14.6.1**. **fejezet** és **18.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.2. ábra: A DNS-fehérje kölcsönhatások szerkezeti háttere. Az ábra bal oldalán a fehérjékkel kölcsönhatásba lépő bázispár csoportokat tüntettük fel (piros: potenciális H-híd donor vagy akceptor; lila: apoláros kölcsönhatás). A jobb oldalon a DNS felismerésben leggyakrabban szereplő két aminosav oldallánc kölcsönhatásait ábrázoltuk.

A specifikus DNS-felismerő fehérje felszínén a bázispárokkal **Asn, Gln, Glu, Lys** és **Arg** oldalláncok alakítanak ki **H-hidak**at. A kialakuló kölcsönhatások nagyon egyediek, nem sikerült eddig olyan „kódot" azonosítani a fehérje oldaláról, ami alapján az adott fehérje által specifikusan felismerhető DNS-szekvenciák megjósolhatók lennének. A DNS-felismeréshez elegendő egy viszonylag kisméretű fehérjedomén (40-90 aminosav). Sok esetben ez olyan kicsi méret, hogy a DNS-kötő doménnek önmagában nem is lesz stabil térszerkezete, csak ha például egy fémion stabilizálja azt (lásd később a cink-ujj domén esetében).

A transzkripciós faktorokra és kofaktorra jellemző, hogy viszonylag sok rendezetlen térszerkezetű régiót tartalmaznak. Mai ismereteink szerint úgy tűnik, hogy az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék (IDP: *intrinsically disordered proteins)* főleg a molekuláris szabályozási folyamatokban (mint amilyen a transzkripció szabályozása is) előnyösebbek, mint a határozott térszerkezettel rendelkezők.

A specifikus DNS-kötőhely megtalálása kapcsán fontos kiemelnünk, hogy a DNS-kötő fehérjék többségének felszínén nettó pozitív töltésű régió található (más szóval sokuk bázikus fehérje, lásd például a hisztonokat), amely már messziről vonzódik a DNS gerinc negatív töltésfelhőjéhez (az ionos kölcsönhatás viszonylag nagy távolságból is érvényesül, lásd **2.4.2.2. fejezet**). Miután elérte azt, **egydimenziós diffúzió**val, nagy sebességgel „végigcsúszik" a DNS mentén, mindaddig, amíg nem talál fajlagosan felismerhető szekvenciát. Háromdimenziós diffúzióval megtalálni egy néhány bázispár hosszúságú szekvenciát egy 10^8 bázispárból álló DNS molekula mentén megoldhatatlan feladat lenne a fehérjék számára.

A **DNS felismerőhely** sok esetben szimmetrikus vagy **részben szimmetrikus** szekvencia (a teljesen szimmetrikus, azaz a komplementer láncon visszafelé olvasva azonos szekvenciákat **palindrom**nak hívjuk; ilyen 4-8 bp hosszúságú szekvenciákat ismernek fel a géntechnológiában használatos restrikciós endonukleáz enzimek, lásd **19.2.1. fejezet**). Ezeket a szekvenciákat **fordítottan ismétlődő** (*inverted repeat*) szekvenciának is nevezik (a lac-operátor szekvenciát, a lac-promóterrel együtt a **18.3. ábra** mutatja be).



18.3. ábra: A lac-operon promóterének és fő operátor régiójának szekvenciája. (kék: részleges palindrom szekvencia a szaggatott vonal szimmetriatengely körül)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Mi a jelentősége ennek a szimmetriának? Amennyiben a DNS motívumot (a cisz-elem) felismerő szabályozó fehérje homodimer, akkor egy-egy alegység a két komplementer láncon azonos szekvenciát ismer fel, ezáltal erősebb és specifikusabb kölcsönhatás alakul ki a két molekula között. Nem véletlen, hogy a transzkripciós faktorok és a restrikciós endonukleázok nagy többsége homodimer (vagy homotetramer, mint a lac-represszor) fehérje. Emlékeztetünk rá, hogy a negyedleges szerkezetű fehérjék és a DNS két szála is forgási szimmetriával rendelkezik, így egymással térben komplementer komplexek tudnak kialakulni.

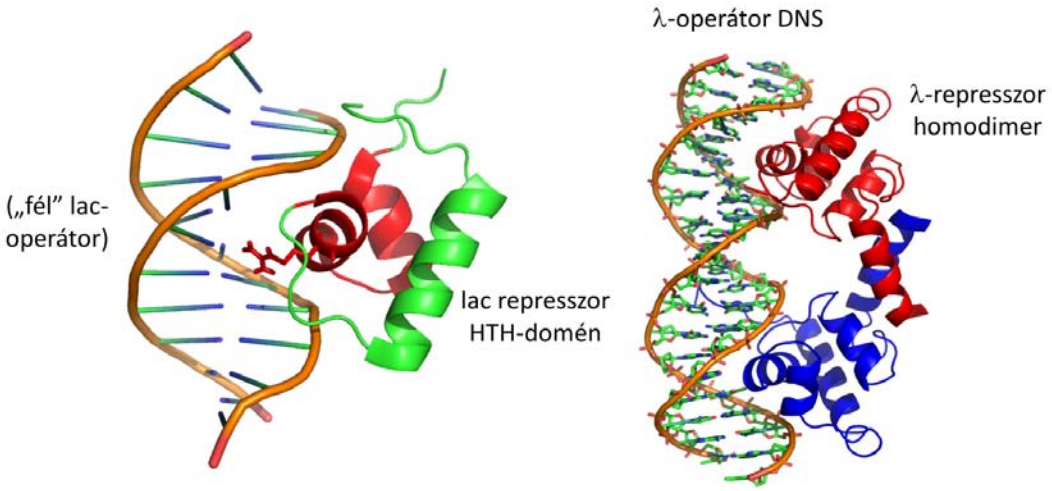
A következőkben felsoroljuk a legfontosabb DNS-felismerő és a DNS-kötésben szerepet játszó doméneket.

18.1.1.1. A hélix-kanyar-hélix domén (motívum)

A bakteriális transzkripciós faktorok között **hélix-kanyar-hélix** (HTH: *helix-turn-helix*) a leggyakoribb DNS-felismerő motívum. Mintegy 20 aminosavból álló motívumból (amely egy ~40 aminosavból álló szerkezeti domén része) a második a **DNS-felismerő** α-hélix, amely pontosan beleillik a B-DNS nagyárkába (lásd **18.4. ábra**). Az ábrán is kiemelt Arg oldallánc egy G-C bázispárral alakít ki hidrogénhidas kapcsolatot (lásd **18.2. ábra**).

Az első α-hélix a DNS-gerinccel lép nem-spcifikus kölcsönhatásba. A HTH-motívumot tartalmazó legtöbb transzkripciós faktor **homodimer fehérje** (kivétel a homotetramer **lac-represszor**, amelynek a **18.4. ábra** csak az egyik HTH-doménjét, valamint a szimmetrikus kötőrégióját, a lac-operátor felét mutatja be).

A **18.4. ábra** a homodimer **λ-represszor** és az operátor DNS komplexének szerkezetét is bemutatjuk.



18.4. ábra: HTH (hélix-kanyar-hélix) DNS-kötő domének. A lac-represszor HTH és az operátor DNS komplexe (bal; PDB: 1LCC) és a dimer λ-represszor és az operátor DNS komplexének térszerkezete (jobb; 1LMB).

A λ-represszor a *cI* gén terméke, amely a kólit fertőző λ-fág lizogén életútja során represszált állapotban tartja a lítikus életúthoz szükséges géneket (lásd **19.2.4.2. fejezet**). A két HTH-domén DNS-felismerő hélixe 34 Å távolságra van egymástól, ami pontosan megegyezik a DNS hélix menetemelkedésével, azaz a két egymást követő nagyárok távolságával.

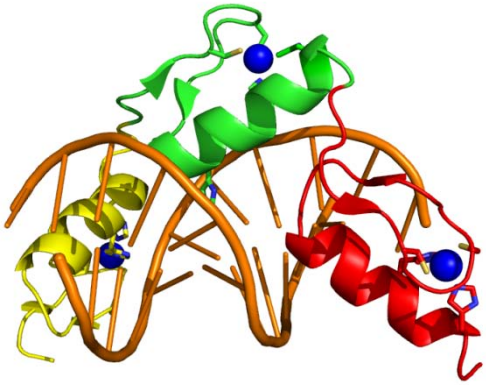
Szintén HTH motívum található a később ismertetett **Trp-represszor**ban (lásd **18.2.2**) és a **CRP/CAP fehérjé**ben is (lásd **18.2.1**).

18.1.1.2. Cink-ujj domén

A **cink-ujj** egy 30 aminosavból álló, kisméretű szerkezeti domén, melyben a **béta-béta-alfa** szupermásodlagos szerkezeti elemet egy Zn^{2+} stabilizál (de a DNS-sel nem lép kölcsönhatásba). Az iont 4 Cys vagy 2 Cys és 2 His aminosav oldallánc koordinálja. Egy-egy cink-ujj viszonylag gyengén tud kötődni a DNS-hez (az α-hélixen keresztül), ezért egy fehérjén (polipeptidláncon) belül **általában több cink-ujj** követi egymást olyan távolságra, hogy az egymást követő (esetleg távolabbi) nagyárkokkal tudjanak kölcsönhatást kialakítani (van olyan transzkripciós faktor, amiben 37 cink-ujj domén található).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A cink-ujj domén elsősorban eukarióta TF-ekben fordul elő. Nem csak TF-ek tartalmaznak cink-ujj doméneket, hanem számos más fehérje is. A **18.5. ábra** bemutatott **EGR1** egy emlős transzkripciós faktor (három cink-ujjal), mely szerepet játszhat az idegrendszer plaszticitásában és tumor szupresszor is lehet.

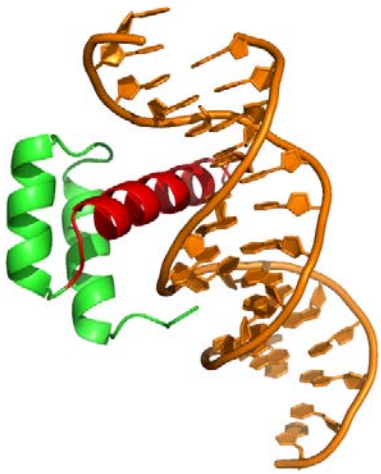


18.5. ábra: Egy cink-ujj DNS-kötő domén térszerkezete. (EGR1 transzkripciós faktor, PDB: 1AAY)

18.1.1.3. Homeodomén

A **homeodomén** kizárólag eukarióta transzkripciós faktorokban előforduló, a HTH motívumhoz hasonló ~60 aminosavból álló szerkezeti elem (lásd **18.6. ábra**).

Három α-hélix építi fel, melyek közül a DNS-felismerő hélix itt is a nagyárokba köt. A homeodomént tartalmazó TF-ek az állatok egyedfejlődése során a testmintázat kialakításában résztvevő géneket aktiválnak. Ez utóbbiakat ***homeobox*** (hox) **gének**nek hívják, s közéjük tartoznak a *Drosophila***ultrabitorax** és **antennapedia** gének ill. fehérjék, melyek a szárnyak és a lábak helyét és számát határozzák meg. A **18.6. ábra** az ultrabitorax homeodomén és az általa felismert DNS motívum komplexének szerkezetét mutatja be.

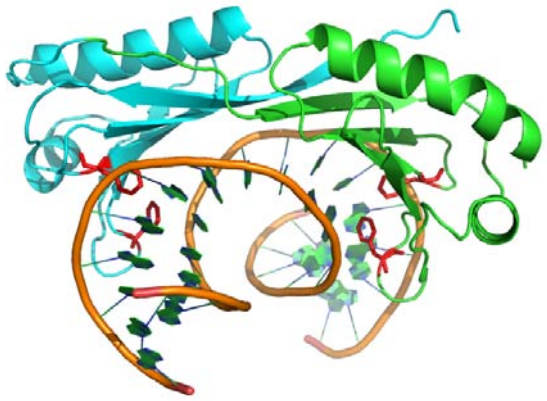


18.6. ábra: Egy DNS-kötő homeodomén térszerkezete. (Ultrabitorax transzkripciós faktor; PDB: 1B8I)

Végül utolsónak bemutatjuk az alfejezet elején már említett **TBP (TATA-box kötő fehérje) DNS felismerésé**t, mivel az eddig ismertetett típusokkal szemben ez a fehérje az eukarióta promóterek egy részében megtalálható TATA-boxot (konszenzus szekvencia: TATAAAA) a **kisárok** felől ismeri fel. A nyereg-alakú fehérje egy **konkáv β-lemez**es szerkezettel kötődik, csak részben szimmetrikusan a DNS-hez. A kötés hatására a DNS meghajlik, ami kissé ki is tekeri a kettőshélixet. A kölcsönhatás részben hidrofób jellegű, amihez a fehérje oldaláról 4 fenilalanin járul hozzá (lásd **18.7. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

(Fehérjeevolúciós érdekességként megemlítjük, hogy bár a TBP is, mint a DNS-kötő fehérjék többsége mindkét lánchoz kötődik, de nem dimer, hanem a polipeptidlánc két fele homológ egymással, s a két domén köt a részben szimmetrikus kötőhelyhez. A TBP génje is génduplikációval jött létre, mint például a hemoglobin a- és β-lánca, de csak a kódoló régió kettőződött meg, nem az egész gén promóterrel együtt.)



18.7. ábra: A TBP (TATA-box kötő fehérje) térszerkezete (PDB: 1CDW)

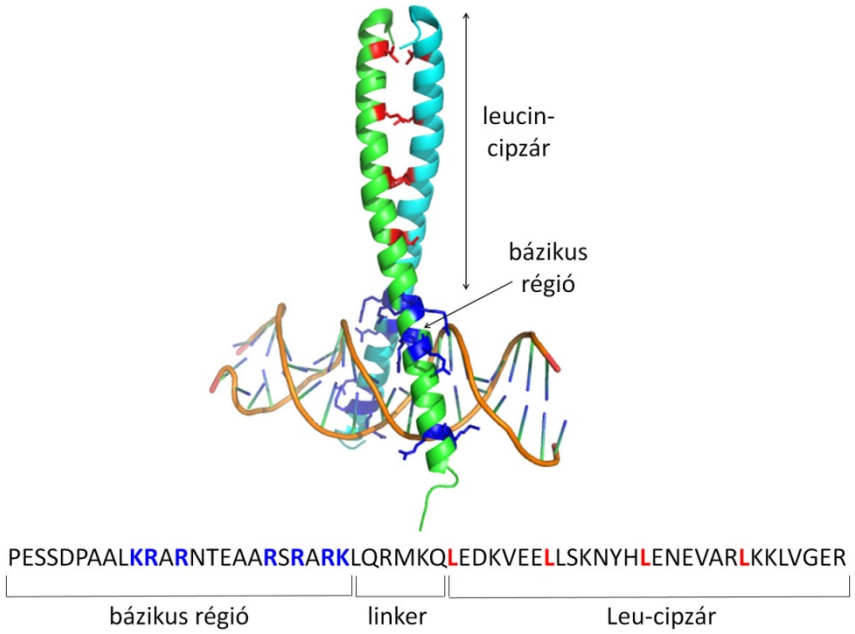
18.1.1.4. Fehérje-fehérje kölcsönhatást biztosító domének transzkripciós faktorokban

A transzkripciós faktorok, mint arról már írtunk, gyakran dimereket képeznek. Az **alegységek közötti kölcsönhatás**t tipikus fehérjeszerkezeti elemek közvetítik. Ebbe a kategóriába tartozik a **leucin-cipzár** (lásd **18.8. ábra**) és a **bázikus hélix-hurok-hélix** (lásd **18.9. ábra**) szerkezeti elemek.

A **leucin-cipzár** egy rövid ***coiled-coil*** szerkezeti motívum, amelyről a fibrilláris fehérjék (a keratin) kapcsán a **4.5.1. fejezet**ben már volt szó. A leucin-cipzár a nevét onnan kapta, hogy a szekvencián belül minden hetedik pozícióban leucin van, ezáltal szabályos „hidrofób varrat” jön létre két párhuzamosan futó, egymás köré balmenetesen tekeredő jobbmenetes α-hélix között. A ~30 aminosavból álló motívumot egy **bázikus** aminosavakban (Lys, Arg) gazdag **régió** követi, amely a **DNS nagyárkával** alakít ki **kölcsönhatás**t.

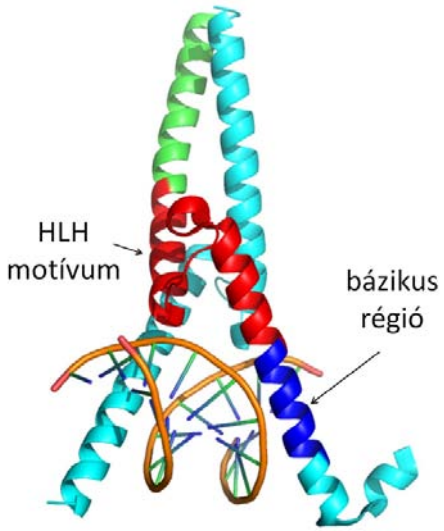
A **bázikus leucin-cipzár**t tartalmazó TF-ek érdekessége (s ez igaz több más dimerizálódó TF fehérjecsaládra is), hogy nem csak **homo-**, hanem **heterodimerek**et is ki tudnak alakítani, s ezzel mintegy kombinatorikus módon fokozzák a szabályozható gének számát (a kétféle homodimer és a heterodimer más DNS szekvenciát ismernek fel – emlékezzünk, a DNS-en található TF kötőhelyek általában csak részlegesen szimmetrikusak, ami megengedi ezt a változatosságot). Példaként az élesztő **GCN4** transzkripciós faktort és a protoonkogén **AP1** heterodimer és a két alegységéből összeálló **Fos** és **Jun** homodimer leucin-cipzár fehérjéket említjük meg. A **18.8. ábra** a GCN leucin-cipzár szekvenciáját és térszerkezetét mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.8. ábra: Egy kétláncú bázikus leucin-cipzár DNS-kötő domén és dimerizációs szerkezeti motívum. (A GCN4 élesztő transzkripciós faktorból; PDB: 1YSA)

A **bázikus hélix-hurok-hélix** (bHTH) **dimerizációs domén** szintén eukarióta transzkripciós faktorokban fordul elő. A ~50 aminosavból álló motívum részben a dimerizációért, részben a DNS-kötésért felelős. Az N- illetve C-terminális hélix egy bázikus DNS-kötő régióban illetve egy amfipatikus α-hélix régióban folytatódik (lásd **18.9. ábra**). Tipikus példái a **Myc** és a **Max** homo- és heterodimer, protoonkogén TF-ek.

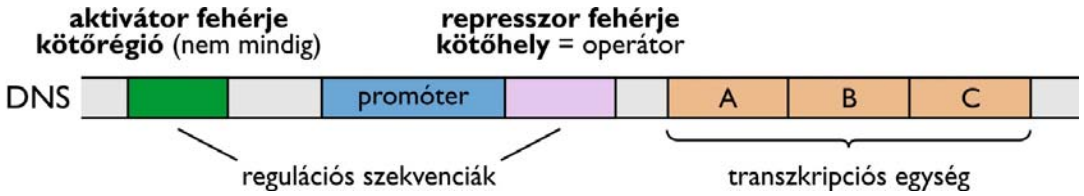


18.9. ábra: Egy bázikus hélix-hurok-hélix DNS-kötő és dimerizációs szerkezeti motívum. (A humán Max transzkripciós faktorból; PDB:1HLO)

18.2. Prokarióta génexpresszió szabályozás

Már említettük, hogy a bakteriális gének jó része közös szabályozás alatt álló egységekbe, **operon**okba szerveződik. Koordináltan szabályozódnak például egy anyagcsere útvonal enzimei (lásd Trp-operon), egy tápanyag hasznosításához szükséges fehérjéket (lásd laktóz-operon) vagy a riboszómális proteineket kódoló gének. Egy operon vázlatos felépítését a **18.10. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.10. ábra: A bakteriális operonok általános szerkezete

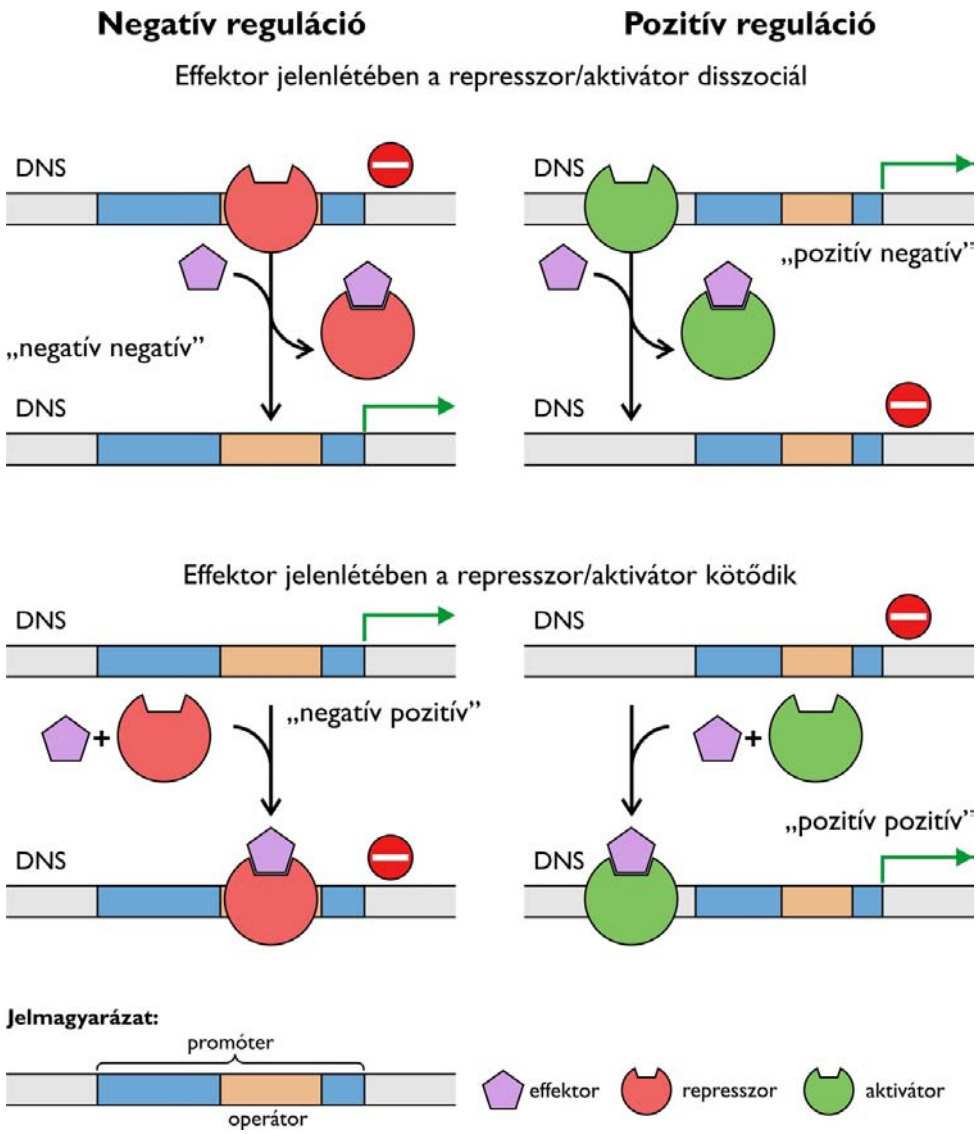
Az operon egy **transzkripciós egység.** Fehérjekódoló szakaszáról **policisztronos mRNS** íródik át, azaz egy promóterhez több (2-6, maximum 20) ún. „szerkezeti gén" tartozik. A közös szabályozást az **operátor régió** teszi lehetővé, ami a **represszor fehérje kötőhelye** (tehát DNS motívum!). Az operátor régió a promótertől *downstream* irányban, vele sokszor átfedésben helyezkedik el. Ez alapján a transzkripció gátlását egyszerűen magyarázhatjuk – az operátorhoz kötődő represszor egyrészt megakadályozza (vagy legalábbis nehezebbé teszi) az RNS-polimeráz kötődését, másrészt fizikailag gátolja a transzkripció iniciációját (nem engedi, hogy az RNS-polimeráz lokálisan kitekerje a DNS-t). A prokariótákra, mint azt már említettük, az alaphelyzetben „bekapcsolt" gének jellemzőek, ezért a szabályozó fehérjék nagyobb hányada represszor, kisebb hányada aktivátor. Az aktivátor fehérje kötőhelye általában a promótertől *upstream* irányban helyezkedik el.

A negatív szabályozás (és a pozitív is) kétféleképpen működhet. Az egyik lehetőség, hogy a represszor fehérje önmagában gátol, de ha jelen van egy effektor molekula (az ún. **induktor)**, akkor annak kötődésére a represszor „elengedi" az operátort, disszociál róla, s az operon felszabadul a gátlás alól (lásd **18.11. ábra**). Ezt a szabályozást nevezhetjük „**negatív-negatív" reguláció**nak (mivel a negatív szabályozást, a represszor kötődését egy szignál negatív módon befolyásolja, kikapcsolja; erre példa a lac-operon, lásd **18.2.1**). A másik lehetőség, hogy a represszor csak egy effektor jelenlétében képes kötődni az operátorhoz, és gátolni a transzkripciót. Ezt hívjuk „**negatív-pozitív" szabályozás**nak (pl. a Trp-operon, lásd **18.2.2**).

A pozitív szabályozás is, a fenti gondolatmenetet követve, kétféle lehet. A „**pozitív-pozitív" szabályozás** esetén egy molekuláris jel (ligandum, effektor) kötődése esetén tud csak az aktivátor a DNS-sel kölcsönhatásba lépni, s aktiválni a transzkripció iniciációt (példa a CRP/CAP aktivátor a lac-operonnál, lásd **18.2.1**). A „**pozitív-negatív"** szabályozás viszont azt jelenti, hogy az aktivátor az effektor molekula kötésének hatására disszociál, és ezáltal a transzkripció aktivációja megszűnik (visszaesik az alapszintre).

Vegyük észre, hogy a szabályozó molekulák „molekuláris jelek", **allosztérikus modulátorai** a represszor és aktivátor fehérjéknek: kötőhelyük nem esik egybe a TF-ek DNS-kötőhelyével (lásd **18.14. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.11. ábra: A prokarióta operonok negatív (repressziós) és pozitív (aktiváció) szabályozási sémája. A represszor és az aktivátor kötődését egy allosztérikus effektor kismolekula szabályozza. Ha a represszorhoz az effektor (itt induktor lesz a neve) kötődik, a transzkripció „kikapcsolt" állapota megszűnik (balra fenn; ez „negatív-negatív" szabályozás, amire példa a lac-represszor). Fordított is lehet a helyzet, amikor a represszor csak az effektor jelenlétében kötődik az operátorhoz (balra lenn; ez „negatív-pozitív" szabályozás, például a triptofán-represszor működése). Az aktivátor is lehet, hogy csak az allosztérikus effektor jelenlétében kötődik a DNS-hez (jobbra lenn; ez „pozitív-pozitív" szabályozás, például a CAP/CRP aktivátor működése), végül a negyedik lehetőség (jobbra fenn) ritkább, amikor az aktivátor az effektor jelenlétében nem kötődik a DNS-hez.

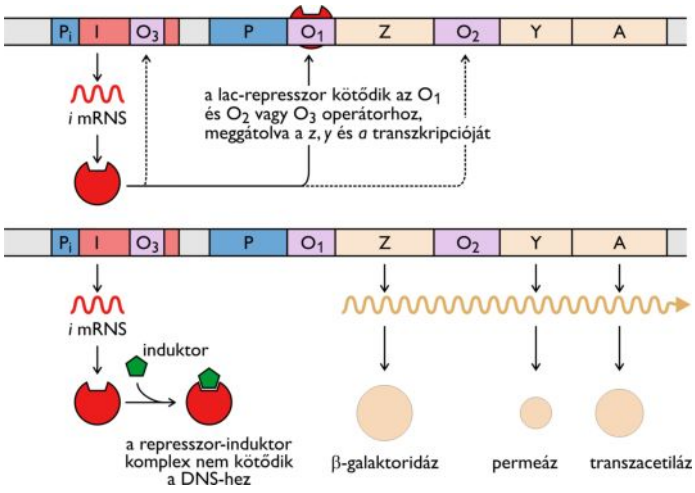
18.2.1. A lac-operon működése

A kólibaktérium fő tápanyaga a glükóz, azonban annak hiányában más szénforrásból, így többek között tejcukorból is tud energiát nyerni. A **tejcukor** (laktóz, lásd **10.2. fejezet**) **hasznosítás**ához azonban szükséges legalább két olyan fehérje, amelynek génjei a glikolitikus enzimektől eltérően nem fejeződnek ki állandóan. Ez a két fehérje a diszacharid hidrolízisét végző enzim, a **β-galaktozidáz** (génje a *lacZ*) és a tejcukor felvételét végző **galaktozid-permeáz** (más néven laktóz-permeáz, egy facilitált transzportot végző integráns membránfehérje, lásd **11.5.2.2. fejezet** ; génje a *lacY*). A laktóz hasznosítást koordináltan szabályozó **laktóz-operon** (röviden **lac-operon**) tartalmaz egy harmadik „szerkezeti gént" is (*lacA*), ami egy transzacetiláz enzimet kódol, ami nem esszenciális a laktóz hasznosításhoz (a pontos szerepét nem ismerjük, talán a permeáz által szállított cukorszármazékok detoxifikálását végzi).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

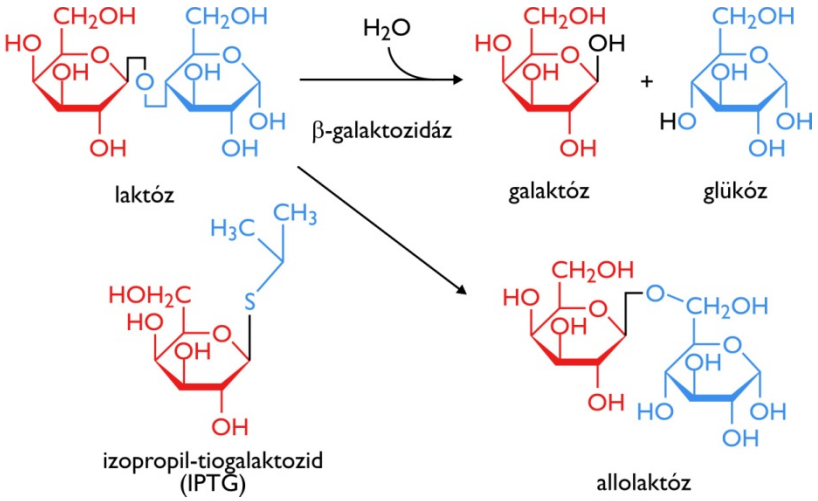
(A „szerkezeti gén” a genetikában használt, a biokémiában kissé zavaró kifejezés – arra utal, hogy nem szabályozó génről van szó, mint amilyen a represszort kódoló *lacI* gén.)

Jacob és Monod itt nem részletezett kísérletei kiderítették, hogy a ***lacI* gén** terméke, a **lac-represszor** fehérje gátolja a három szerkezeti gén átírását, mivel **kötődik a lac-operátor régióhoz** (lásd **18.12. ábra**). A *lacI* gén közvetlenül a lac-operon előtt (tőle *upstream* irányban) helyezkedik el, de nem része az operonnak, mivel a lac-represszor fehérje saját promóterről íródik át. Amennyiben megjelenik a kólibaktérium tápközegében a tejcukor, abból valamennyi bekerül a sejtbe, mivel néhány kópia laktóz-permeáz átíródik a represszió alatt álló lac-operonról is. A sejten belül a szintén néhány példányban jelen levő β-galaktozidáz enzim a laktózt allolaktózzá alakítja.



18.12. ábra: A laktóz-operon működési vázlata. A lac-represszor fehérje fő kötőhelye az o_1 operátor régió, de kötődik a másik két operátor egyikéhez is. Ennek részleteit a főszövegben magyarázzuk el (lásd 18.2.1.1**.**).

Az **allolaktóz**ban a galaktóz a(1→6) kötéssel kapcsolódik a glükózhoz (lásd **18.13. ábra**); a reakciót az enzim ún. „minor” transzglikozilációs aktivitása katalizálja. Fontos megjegyeznünk, hogy a negatív szabályozás nem teljes, mindig történik valamennyi „szivárgás” a represszált génekről, aminek a példánkban biológiai jelentősége is van (azaz a szabályozás gyengeségéből erényt kovácsolt az evolúció).



18.13. ábra: Az induktor szerepet betöltő allolaktóz szintézise. Feltüntettünk egy nem-metabolizálódó laktóz analógot, az IPTG-t is, amit rekombináns fehérjék előállításánál a géntechnológiában használnak.

Az **allolaktóz induktorként kötődik a lac-represszorhoz**, allosztérikusan befolyásolja a konformációját, aminek az eredményeképpen **a represszor disszociál** az operátorról, az **RNS-polimeráz kötődik** a promóterhez és a **lac-operon génjei átíródnak**. A most már sok példányban megjelenő laktóz-permeáz felveszi a környezetből a tejcukrot, a β-galaktozidáz pedig hidrolizálja azt. Amint lecsökken a tejcukor szintje, lecsökken az induktor

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

koncentrációja is, az allolaktóz disszociál a lac-represszorról, az visszaköt az operátorhoz, s ezzel helyreáll az eredeti gátolt állapot, a szabályozó kör bezárult.

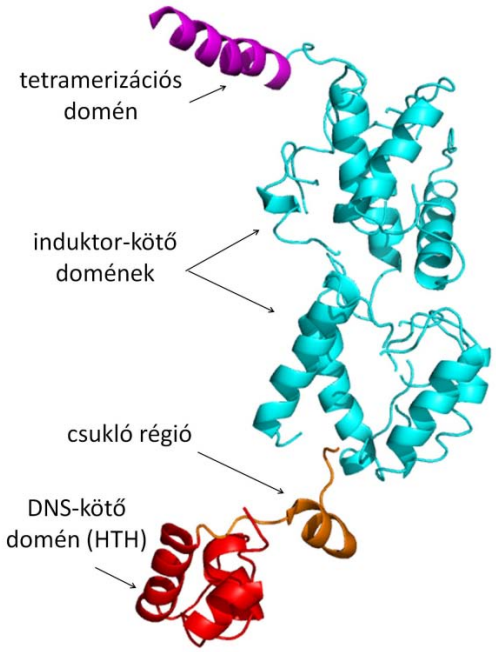
Fontos itt előrevetítenünk, hogy a lac-operon gátlás alól való felszabadulása **csak akkor** eredményez jelentős mRNS szintézist, **ha** a baktérium környezetében **nincs glükóz**. A glükóz hiánya ugyanis pozitív jelként aktiválja a lac-operont, s csak ekkor indul meg a laktóz hasznosítása. A **lac-operon** tehát kettős, **negatív és pozitív szabályozás** alatt áll. A pozitív szabályozás részleteit a **18.2.1.2. fejezet**ben ismertetjük.

Az allolaktóz szintézisét bemutató **18.13. ábrán** feltüntettünk egy ún. **nem-metabolizálódó induktort**, az izopropil-tiogalaktozidot (**IPTG**), amit a géntechnológia használ nagy mennyiségben fehérjék szabályozott előállítására rekombináns DNS konstrukciók segítségével (lásd **19.7. fejezet**).

18.2.1.1. A lac-represszor működése

A **lac-represszor** 37 kDa méretű monomerekből álló **homotetramer** fehérje. Három fő szerkezeti egységből épül fel (lásd **18.14. ábra**): 1) az N-terminális **tetramerizációsdomén**ből (ez egy amfipatikus α-hélix, s a négy alegység ezen láncrészlete négyláncú *coiled-coil* szerkezetté áll össze); 2) az **induktor-kötő régió**ból (ami valójában két szerkezeti doménből áll, s az allolaktóz vagy az IPTG a két domén közé ékelődik be; lásd **18.16. ábra**); 3) a **HTH-típusú DNS-kötő domén**ből.

A lac-represszor igen nagy affinitással ($K_d = 10^{-13}$ M) kötődik az operátor régióhoz, ami azt is jelenti, hogy a baktériumsejtben már néhány represszor molekula elegendő az operátor régió lekötésére. A kötés asszociációs sebességi állandója $\approx 10^{10}\ M^{-1}s^{-1}$, amely érték azt jelzi, hogy ez a fehérje is, a már említett egydimenziós „csúszással" találja meg a specifikus kötőhelyét.

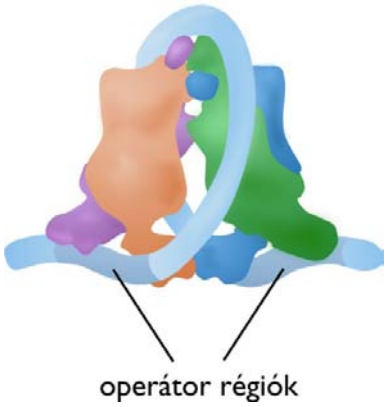


18.14. ábra: A lac-represszor egy alegységének szerkezeti doménjei (PDB: 1LBG)

A **lac-operon** érdekessége, hogy a lac-represszor nem csak a promóterrel átfedő „főoperátorhoz" (**o_1**), hanem kisebb affinitással két másik régióhoz is kötődhet (**o_2 és o_3**; lásd **18.12. ábra**). Az o_2 a *lacZ* kódoló régiójának a közepén (+410-es pozíció körül az RNS starthelytől számítva), míg az o_3 a -90-es pozíció közelében található, a *lacI* kódoló régióján belül. Mi lehet a szerepe a két extra operátornak?

Fokozzák a represszió mértékét: a lac-represszor csak az o_1 operátorhoz kötve körülbelül egy századára csökkenti a lac-promóterről az átírást, viszont a tetramer egyszerre két promóterhez történő kötődése mintegy ezerszeres gátlást okoz. Mai tudásunk szerint **a lac-represszor egyszerre két operátorhoz (o_1 és o_2 vagy o_3) kötődik**, miközben a két operátor közötti DNS régió kihurkolódik, s körülveszi a tetramert, ezzel is erősebbé téve a kötődést (lásd **18.15. ábra**).

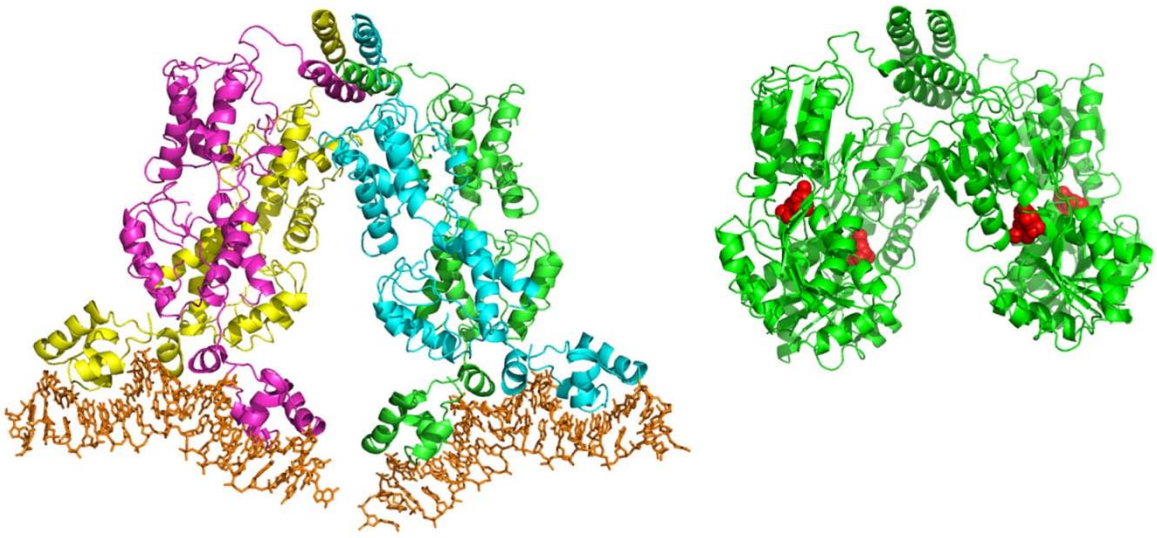
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.15. ábra: A lac-represszor tetramer két operátor régióhoz kötődik, amelyek között a DNS kihurkolódik

Nézzük meg, milyen hatással van az **induktor kötődés**e a represszor szerkezetére (lásd **18.16. ábra**). A ligandum-kötő doménben olyan konformációváltoztás következik be, ami megváltoztatja a tetrameren belül a két DNS-kötő domén helyzetét és a stabilitását is. Ennek a végső következménye az lesz, hogy a **represszor disszociál az operátorról**.

A **18.16. ábra** bal oldalán fő operátorszekvencia jelenlétében kristályosított lac-represszor szerkezetét ábrázoltuk (jól látszik a négyláncú tetramerizációs hélix-köteg, valamint a két-két HTH-domén, amint a két operátor szimmetrikus komplementer láncaihoz kötődnek). Az ábra jobb oldalán a represszor-IPTG komplex kristályszerkezetét mutatjuk be. A ligandum-kötő és a tetramerizációs doménben csak kis különbségek látszanak, de a DNS-kötő domén „eltűnt". Valójában a domének belső flexibilitása megnövekedett, ezért a kristályban „nem látszanak", nem lehetett őket modellezni. Ez a szerkezeti bizonyítéka, hogy a ligandum-kötött represszor nem tud kötődni az operátor DNS-hez.



18.16. ábra: A tetramer lac-represszor térszerkezete induktor nélkül (bal) és induktor jelenlétében (jobb). A bal oldali térszerkezet a két DNS-operátor régiót is tartalmazza, amihez a két-két HTH-doménen keresztül kötődik a represszor (a tetramer fehérje négy alegységét különböző színnel jelöltük). A jobb oldali kristályszerkezeti modellben HTH-domének nem látszanak, mivel az induktor-kötődés (IPTG: piros) hatására ez a domén mozgékonnyá vált. (PDB: 1LBG, 1LBH)

18.2.1.2. A lac-operon pozitív szabályozása

Jeleztük az előző alfejezetben, hogy lac-operon valós működése az eddig bemutatott képnél bonyolultabb, ugyanis **pozitív szabályozás** alatt **is** áll. Glükóz jelenlétében nem volna gazdaságos, ha a körülményesebben hasznosítható

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

laktózt vagy más, a környezetben jelen levő cukrot „fogyasztana” a baktériumsejt. Ezért glükóz és laktóz jelenlétében hiába szűnik meg a lac-represszor gátlása a már ismertetett mechanizmussal, a lac-promóterről és más cukrok hasznosításához szükséges géneket kódoló operonokról (pl. arabinóz-operon) a transzkripció csak „félgőzzel” folyik. Ezt a jelenséget **katabolit repressziónak** hívjuk. (Az elnevezés ne tévesszen meg bennünket, mivel nem a génexpresszió gátlására utal a név, hiszen a katabolizmushoz szükséges operonokról történik expresszió, de csekélyebb mértékben.)

Mi lehet a jelenség hátterében? A válasz a promóter szekvenciájában rejlik (lásd **18.2. táblázat**). A **lac-promóter**en belül ugyanis a -10-es és -35-ös régiója is eltér az erős transzkripciót biztosító konszenzus szekvenciától, következésképpen az RNS-polimeráz s-alegysége a lac-promóterhez **gyengébb**en köt, mint a konszenzus szekvenciát tartalmazó promóterekhez. Ezen segít az operon pozitív szabályozása.

18.2. táblázat: A lac-promóter összehasonlítása az *E. coli* konszenzus promóter szekvenciájával

Promóter	–35-ös régió	–10-es régió	Transzkripció
lac-operon	TTTACA	TATGTT	gyengébb
E. coli konszenzus	TTGACA	TATAAT	erős

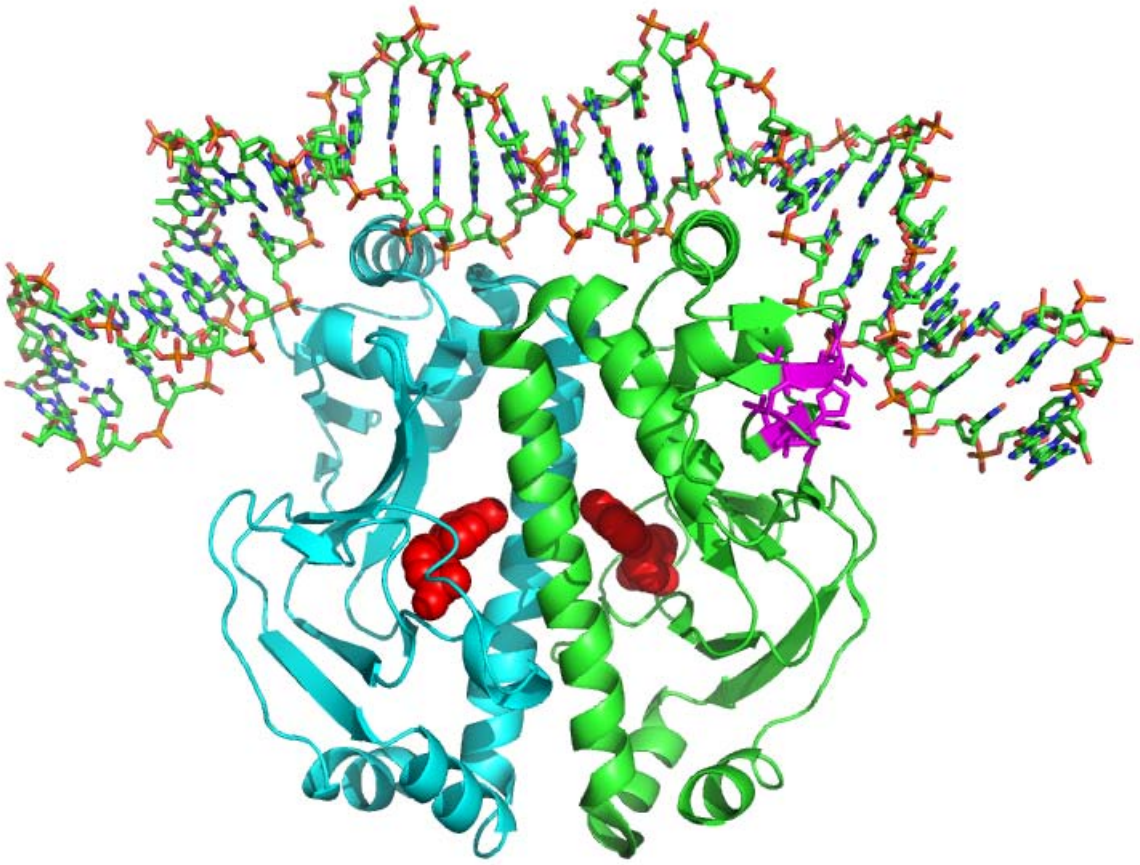
Glükóz jelenlétében a cAMP szintézis gátlódik illetve a cAMP sejtből történő eltávolítása (efflux) fokozódik. Amint a környezetből a glükóz eltűnik, a sejten belül a cAMP koncentráció növekszik. (A **cAMP**-t a bakétriumok „**éhségszignálj**ának” is nevezik. Az eukariótákban betöltött másodlagos hírvivő szerepéről szó volt a **17.3.3. fejezet**ben.) A cAMP allosztérikus effektorként kötődik a **CRP/CAP** (*cAMP receptor protein / catabolite gene activator protein*) **aktivátor fehérjé**hez. A CRP/CAP egy homodimer fehérje, két HTH-domént tartalmaz, s a cAMP-vel komplexben köt a lac-promóter aktivátor kötőhelyéhez, ami a -60-as pozíció körül helyezkedik el és az operátorhoz hasonlóan részleges fordított ismétlődő szekvenciát tartalmaz (lásd **18.17. ábra**).



18.17. ábra: A lac-operon aktivátor-kötő régiója, amihez a CRP/CAP fehérje kötődik

Az **CRP/CAP-cAMP kötődés**ének hatására a DNS kissé meghajlik, ami megkönnyíti az aktivátorral közvetlenül kapcsolódó RNS-polimeráz számára a transzkripciós buborék kialakítását. A **18.18. ábra** jól látszik a meghajló DNS, valamint az RNS-polimerázzal kölcsönhatásba lépő molekulafelszín. A közvetlen fizikai kapcsolat erősebbé és hatékonyabbá teszi az RNS-polimeráz promóterkötését, ezáltal a lac-operon génjeinek **transzkripció**ját mintegy **ötvenszeresére fokoz**za.

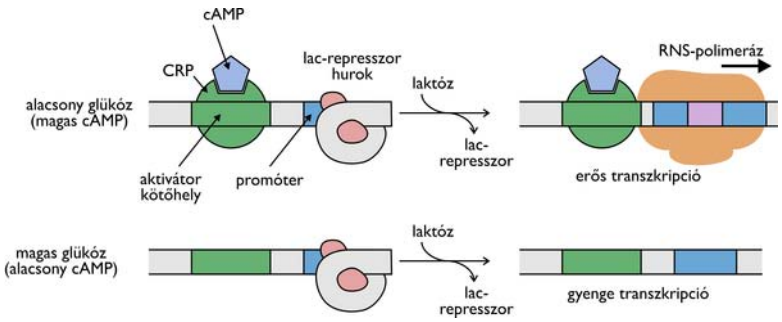
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.18. ábra: A CRP/CAP fehérje kötődése a lac-operon aktivátor kötőhelyéhez. A homodimer CRP/CAp két lánca világoskék és zöld, az allosztérikus effektor cAMP golyóábrázolással piros. A fehérjén lila szín jelöli az RNS-polimerázzal kölcsönhatásba lépő felszínt. (PDB: 1RUN)

A lac-operon pozitív szabályozásának összefoglaló sémáját, a **18.19. ábra** mutatja be.

Az *E. coli* genomban sok CRP/CAP kötőhelyet lehetett azonosítani, azaz az aktivátor egyszerre számos operon működését tudja fokozni. A koordináltan működő operonokat **regulon**nak nevezi a szakirodalom.



18.19. ábra: A lac-operon pozitív szabályozásának sémája. A CRP/CAP fehérje csak az allosztérikus modulátor cAMP („éhségszignál”) jelenlétében kötődik az aktivátor régióhoz.

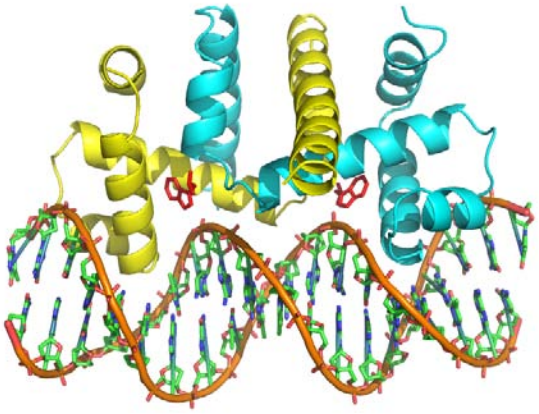
18.2.2. A Trp-operon és az attenuáció

Az *E. coli* mind a húsz fehérjealkotó aminosav szintézisére képes. A bioszintetikus utakat végző enzimeket kódoló gének operonokba szerveződnek. Ha egy aminosavból elegendő áll a sejt rendelékezésére, az adott operont specifikus represszora gátlás alatt tartja; amikor fogytán az aminosav, a gátlás alól az operont fel kell szabadítani. Ezek a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

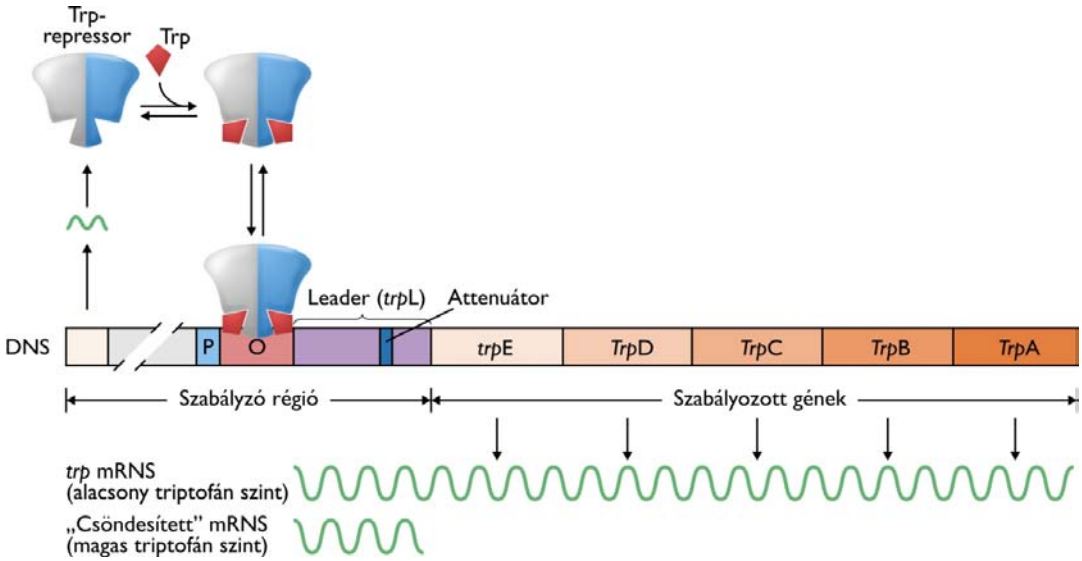
bioszintetikus utakat szabályozó operonok általában „**negatív-pozitív" szabályozás** alatt állnak, azaz a végtermék, az adott aminosav szabályozza allosztérikusan az operon represszorát, ami csak a jelenlétében (pozitív szignál) kötődik az operátor régióhoz.

A fenti sémát követi a **Trp-operon** is amely öt, a triptofán szintéziséhez szükséges enzimet kódoló gén expresszióját szabályozza. A **Trp-represszor** 107 aminosavból álló homodimer, HTH-doménen keresztül kötődik az operátor régiójához, de csak akkor, ha alegységenként egy triptofán kötődik hozzá (lásd **18.20. ábra**). A represszió ~70-szeres gátlást biztosít, azaz a gátolatlan átírás 1/70-ed részére, másfél százalékára csökken a represszált gének expressziója.



18.20. ábra: A Trp-represszor fehérje DNS-kötő HTH-doménje és az operátor DNS komplexe (PDB: 1TRO)

Azonban a szabályozás itt nem ér véget, ugyanis erre a kizárólag transzkripciós szabályozásra ráépül egy további negatív, de a transzkripció és a transzláció kapcsoltságán alapuló szabályozási mechanizmus, az **attenuáció** (csillapítás). Ezzel a **második szintű negatív szabályozás**sal a transzkripció a „bekapcsolt" érték 700-ad részére csökken. A kettős szabályozás sémáját a **18.21. ábra** szemlélteti.



18.21. ábra: A Trp-operont az attenuátor régió negatívan szabályozza

Az attenuációért a promótertől 3'-irányban, az átírt mRNS elején, a 162 nukleotidból álló az ún. **vezető(*leader*) szekvenciá**ban található **attenuátor régió** felelős (lásd **18.22. ábra**). A vezető szekvencia eleje egy 13 aminosavból álló **vezetőpeptid**et kódol, benne két Trp kodonnal. A szekvencia három olyan régióval folytatódik, amelyek közül a középső (3-as) a 2. és 4. szekvenciával (de egyszerre természetesen csak az egyikkel) láncon belüli bázispárosodással kétszálú hajtű régiókat (*hairpin loop*) tud kialakítani. Ezek a 2:3-as hurok illetve 3:4-es hurok.

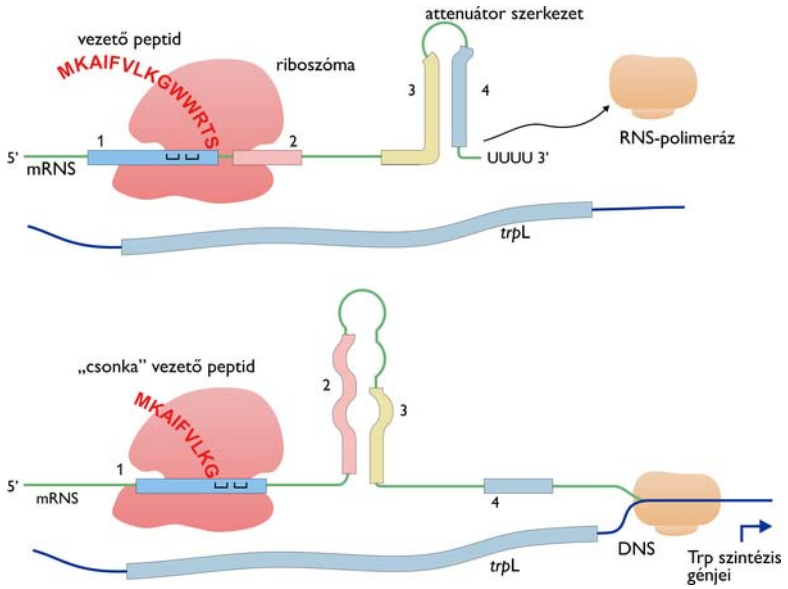
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ha elegendő Trp van a sejtben, a transzkripció kezdete után a megjelenő mRNS 5’ régiójához azonnal hozzáköt egy riboszóma, s a vezetőpeptidet kódoló RNS szakasz gyorsan leolvasásra kerül, mint azt a **18.22. ábra** szemlélteti.

A riboszóma tehát fizikailag elfedi a 2-es régiót, miközben a 3-es és 4-es régió létrejön a transzkripció során. Ennek az lesz a következménye, hogy nem a 2:3-as hurok, hanem a **3:4-es hurok** alakul ki. Ez utóbbi viszont egy tipikus **transzkripciós terminációs jel** (Rho-protein független termináció, lásd **14.4. fejezet**), ami leállítja a transzkripciót, mivel az RNS-polimeráz disszociál a templátról.

Ha a sejten belüli Trp-szint lecsökken, a riboszóma ugyan elkezdi a vezetőpeptid szintézisét, de a Trp kodonokonál elakad, mivel nincs triptofánnal felöltött tRNS a továbblépéshez. Ebben az esetben a 2. régió nem fedődik el, és a stabilabb 2:3-as mRNS hurok alakul ki, tehát nem jön létre a transzkripciós terminációs jel („antiterminációˮ). Az RNS-polimeráz ezáltal továbbhaladhat és átírhatja a Trp szintézishez szükséges enzimek génjeit is (lásd **18.22. ábra**).

A legtöbb bioszintetikus aminosav-operon szabályozásában részt vesz az attenuáció. Hatékonyságát jelzi, hogy a His-operonban nincs szükség represszor fehérjére, ez a „csillapításiˮ mechanizmus egyedül is ki tudja kapcsolni a transzkripciót.



18.22. ábra: Attenuáció mechanizmusának sematikus ábrázolása. Elegendő Trp aminosav jelenlétében a vezető peptid átíródik a mRNS 5’-régiójáról, miközben az mRNS-en, még a „szerkezeti géneketˮ kódoló régió előtt kialakuló attenuátor struktúra transzkripció terminációt okoz. Ha nincs elegendő Trp, akkor a transzkripcióval egyidőben folyó transzláció a vezető peptidet kódoló RNS Trp kodonjainál elakad (nincs Trp-tRNS a sejtben), az attenuátor hajtűkanyar helyett egy terminációt nem okozó mRNS hajtűkanyar alakul ki, a Trp szintézis génjei átíródnak.

18.3. Eukarióta génexpresszió szabályozás

18.3.1. A komplex genom komplex szabályozást igényel

A prokarióta genomoknál **nagyságrendekkel nagyobb és komplexebb** eukarióta **genom** nyilvánvalóan komplexebb génexpresszió szabályozást igényel (lásd még **14.5.1. fejezet**). A méretbeni különbségek kapcsán emlékeztetünk rá, hogy egy tipikus baktérium, az *E. coli* egyetlen cirkuláris DNS molekulája 4,6 Mbp méretű, míg például az emberi genom 23 haploid lineáris kromoszómája összességében három nagyságrenddel több információt hordoz (3,2 Gbp). A komplexitást növeli a többsejtű szervezetek **differenciálódás- és sejtspecifikus génexpresszió**jának igénye. Már elöljáróban jeleztük, hogy az eukarióta génexpresszió szabályozás alapvetően különbözik a prokariótákétól, s hallatlanul bonyolult, egymással összefüggő, s még ma sem teljesen feltárt molekuláris mechanizmusok jellemzőek rá.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az eukarióta génexpresszió komplexitását fokozza, és szabályozáselméleti szempontból új lehetőségeket nyit meg, hogy a **transzkripció és a transzláció térben és időben elválik** egymástól.

A következő alapvető különbség a bakteriális génexpresszió szabályozással összevetve, hogy amint az előző fejezetben láttuk, a prokarióta gének **alaphelyzetben** „bekapcsoltak", míg **az eukarióta gének „kikapcsoltak"**. Ennek az egyik oka, hogy a bakteriális RNS-polimeráz önmaga hozzáfér a génekhez, a specificitási faktora (s-alegység) segítségével kötődik a promóterhez és meg tudja kezdeni a transzkripció iniciációját (lásd **14.2. fejezet**). Ezzel ellentétben erre az eukarióta RNS-polimerázok nem képesek, csak ha a promóteren már kialakult az **általános (bazális) transzkripciós faktorok** segítségével a **preiniciációs komplex** (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, and TFIIH és a PolII; lásd **14.5. fejezet**). Másképpen fogalmazva, az eukarióta RNS-polimerázok nem ismerik fel a promóterüket, közvetlenül a DNS-hez nem tudnak kötődni. Megjegyezzük még, hogy az archeák génjeinek transzkripcióját is megelőzi a preiniciációs komplex létrejötte.

Az eukarióta génekre tehát messze nagyobb mértékben jellemző a génaktiválás, mint a génrepresszió. Ennek alapvető oka (ami összefügg az előbbi bekezdésben említett RNS-polimeráz „problémával" is), az **eukarióta DNS nukleoszóma és kromatin szerveződése**. A nukleoszóma, mint szupramolekuláris komplex szerkezetét korábban már bemutattuk (lásd **12.3.5. fejezet**).

Amikor a géneket tartalmazó DNS nukleoszómás szerkezetben van, a gének nehezen hozzáférhetőek a transzkripciós gépezet számára, gyakorlatilag inaktív állapotban vannak. Az eukarióta gének bekapcsolásának egyik alapmechanizmusa ezért a **kromatin remodellálás (*remodeling*)** folyamata (lásd **18.3.2.**), ami végső soron úgy rendezi át a nukleoszómás struktúrát, hogy a génekhez hozzáférjenek az általános transzkripciós faktorok.

Az eukarióta **transzkripciós faktorok moduláris felépítés**űek. Ugyan a prokarióta TF-eknek is külön DNS- és ligandum-kötő doménjük van, de az eukariótákban a DNS-kötés és a transzaktiváció (a transzkripció aktiválása) is külön szerkezeti doménhez (vagy alegységhez) rendelhető. Allosztérikus szabályozást lehetővé tevő regulációs doménből (alegységekből) több is lehet egy eukarióta TF-en. A transzkripciós faktorok működésük során nagy komplexeket alakítanak ki (sztöchiometrikus szupramolekuláris komplexeket, mint pl. a Mediátor komplex, vagy tranziensen kialakuló komplexeket, amelyek fehérjeösszetétele időben és térben változik).

A szabályozási alapelvek következő fontos eleme, a **kombinatorikus és szinergisztikus szerveződés**. A kombinatorikus szerveződés azt jelenti, hogy egy-egy eukarióta génnek jó pár (minimum öt) regulációs helye van (promóter elemeken kívül), ahova különböző transzkripciós faktorok köthetnek. Ezen kívül egy-egy TF sok gén regulációs elemeihez kötődhet. Szintén a kombinatorikus építkezés valósul meg a már tárgyalt heterodimereket is kialakítani tudó TF-ekben (pl. Fos/Jun heterodimer) (**lásd 18.1.1.4.**). A szinergizmus jelensége a kialakuló transzkripciós regulációs komplexek együttes jelenlétének fokozott hatékonyságára utal (a külön-külön ható szabályozó fehérjékkel szemben, amire a prokarióta transzkripció szabályozása volt a példa).

Utolsónak említjük a szintén csak eukariótákra jellemző, a **génektől** (promóter elemek, ún. közeli szabályozó elemek + kódoló régió) **távol eső DNS szabályozó elemek**et (*enhancer, silencer*), amelyek úgy működnek, hogy a preiniciációs komplexszel transzkripciós kofaktorok kötik fizikailag össze (lásd Mediátor komplex), miközben a köztes DNS régió kihurkolódik.

18.3.2. Kromatin átrendeződés, remodellálás (*remodeling*)

Az eukarióta kromatin „kinézete" alapján a sejtbiológusok megkülönböztetnek a génexpresszió szempontjából teljesen inaktív **heterokromatint** és a nukleoszóma szerkezet alapján „lazább", aktív génexpresszióra képes **eukromatin**t. A génexpresszió szabályozása, a gének „bekapcsolása" az eukromatinban mehet végbe. A fő kérdés az, hogy milyen molekuláris mechanizmusok teszik aktívvá az eukromatint, mit jelent a **kromatin átrendeződés (*remodeling*)**. Először tekintsük át röviden, hogy milyen kísérleti bizonyítékaink vannak a kromatin szerkezetének génexpresszióban betöltött szerepére.

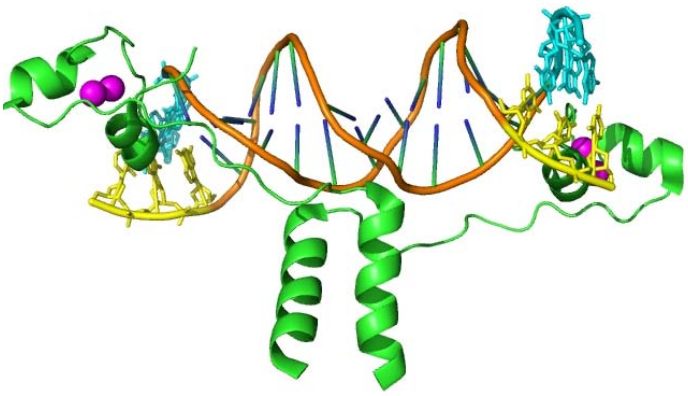
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.3.2.1. A kromatin szerkezet génexpresszióban betöltött szerepének bizonyítékai

Az erősen kompakt (kondenzált szerkezetű) DNS kevéssé érzékeny a dezoxiribonukleáz-I (DN-áz I) enzimmel történő hasításra (lásd **14.2. fejezet**). Kiderült, hogy aktív gének környékén a **DN-áz** több helyen vágja el a DNS-t. Ezeken az ún. DN-áz hiperszenzitív helyeken kevesebb nukleoszóma figyelhető meg, és azoknak is más a szerkezete. A **hiperszenzitív helyek** megjelenése sejt- és fejlődésfüggő: 20 órás csirke embriókban az vörösvérsejtek globin génjei nem érzékenyek a DN-áz kezelésre. Ellenben 35 óra után, amikor a hemoglobin megjelenik a sejtekben, ugyanezek a régiók DN-áz hiperszenzitívekké válnak. (Ezt a módszert már bemutattuk a **14.2. fejezet**ben az RNS-polimeráz kötőhelyének azonosítása kapcsán.)

Egy másik szép bizonyíték az élesztő galaktóz hasznosításában szerepet játszó géneket szabályozó **GAL4transzkripciós faktor specifikus DNS kötés**ére vonatkozik. A GAL4 a $CGG(N)_{11}CCG$ szekvenciát ismeri fel (amelyhez homodimerként, egy-egy cink-ujj doménnel köt, lásd **18.23. ábra**), amelyből az élesztő 12 Mbp méretű genomjában 4000 található. Egy ún. **kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérlet** segítségével kimutatták, hogy a GAL4 csak 10 ilyen szekvenciához kötődik, a többi a kromatin szerkezet gátló hatása miatt nem hozzáférhető sem a transzkripciós faktor, sem a transzkripciós gépezet számára.

A kísérlet során először a GAL4 fehérjét kovalensen hozzákötötték a DNS-hez, miután a sejtekből kromatint izoláltak (csak ott alakult ki keresztkötés, ahol már a mintában a GAL4 kapcsolódott a DNS-hez). A DNS-t ezután kis darabokra hasogatták (micrococcus nukleáz enzimmel), majd GAL4-specifikus antitestet adtak az emésztményhez, s az antitest-GAL4-DNS-fragmentum komplexet affinitás kromatográfiával tisztították, végül a benne lévő DNS szekvenciát meghatározták.



18.23. ábra: A GAL4 transzkripciós faktor atipikus cink-kötő doménekkel kötődik a DNS szabályozó régióihoz (PDB: 1D66)

18.3.2.2. A hisztonok poszttranszlációs módosításának szerepe („hiszton-kód”)

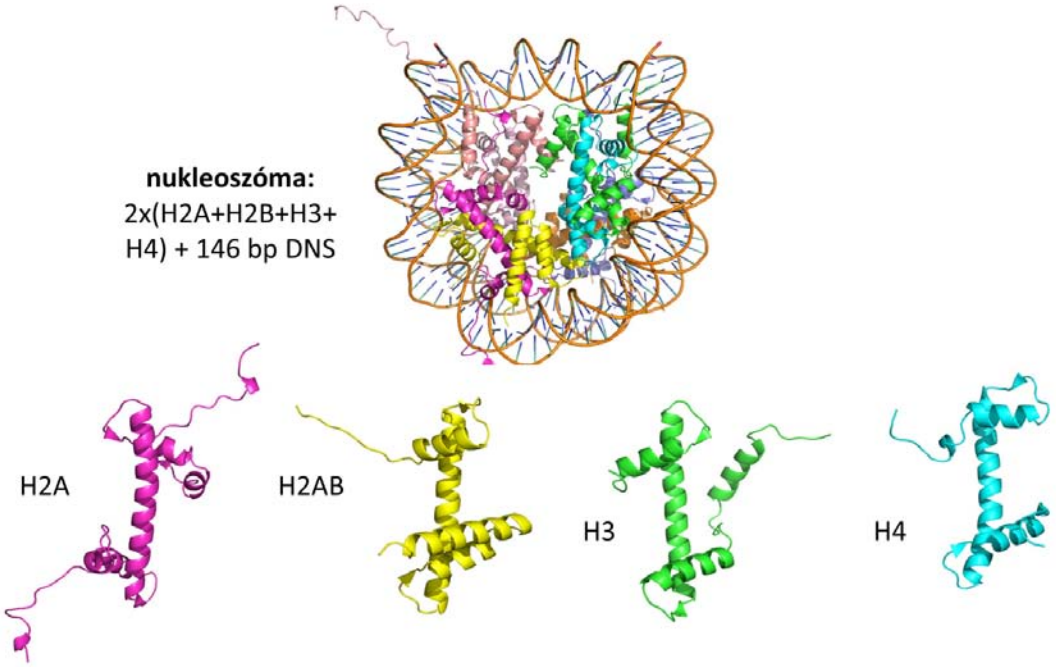
Egyértelmű, hogy az aktív kromatin szerkezet kevésbé kondenzált, mint a heterokromatin. Ennek a hátterében mai tudásunk szerint elsősorban a nukleoszóma fehérjekomponenseinek poszttranszlációs (és részben a DNS posztreplikációs) kovalens módosulásai állnak.

Sokszor a nukleoszómák összetétele sem ugyanolyan az eukromatinban, mint a transzkripció szempontjából kevésbé aktív kromatinban (a H3 és a H2A hisztonokat a H3.3 és a H2AZ izoformák helyettesíthetik). De mitől lazul fel a kromatinszerkezet?

Először nézzük meg újból, hogy néz ki a **nukleoszóma** szerkezete (két-két **H2A, H2B, H3 és H4 hiszton** oktamere, amely köré balmenetes szuperhélixként 146 bázispár DNS tekeredik), s milyen a szerkezete a hisztonoknak (lásd **18.24. ábra**).

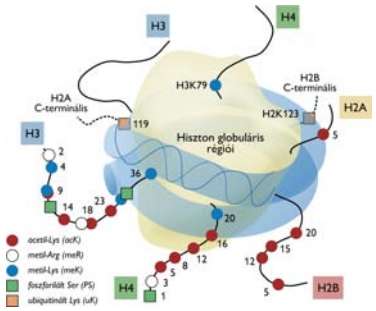
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A mondandónk szempontjából az fontos, hogy ezek a szerkezeti homológiát mutató, kisméretű globuláris bázikus fehérjék random szerkezetű farokrészekből és egy a-helikális központi doménből állnak. A nukleoszóma oktamer hiszton-magjának létrejöttében, és a DNS kötésben elsősorban az a-helikális központi domének vesznek részt, míg az **N-terminális** (és részben a C-terminális) **farokrészek** flexibilis módon kinyúlnak a nukleoszóma magjából. A terminális farokrészek oldalláncaira kerülnek reverzibilis kovalens szabályozással, **poszttranszlációs módosítás**sal funkcionális csoportok (lásd **17.3. fejezet**).



18.24. ábra: A nukleoszóma (fent) és az egyes hiszton komponensek térszerkezete (lenn) (PDB: 1AOI)

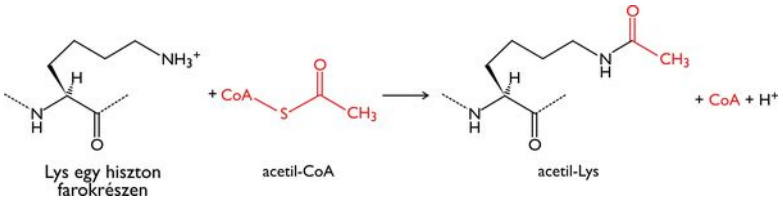
A Lys és Arg oldalláncok **metilálódnak,** a Lys **acetilálódik**, a Ser és Thr oldalláncok **foszforilálódnak**. Az előbbi két csoport **ubiquitinálódhat** és **sumoilálódhat** is (lásd **18.25. ábra**). (A SUMO – *small ubiquitin-like modulator* – az ubiquitinhez hasonló szerepű kis fehérje.)



18.25. ábra: A „hiszton-kód" molekuláris háttere. A nukleoszóma „mag" hisztonok N-terminális láncvégeinek az ábrán jelzett aminosav pozícióira acetil-, metil-, és foszforilcsoportok, valamint ubiquitin (és SUMO) fehérje kerülhet poszttranszlációs módosulással. A módosulások szabályozzák a nukleoszómához kötődő DNS régió génjeinek expresszióját.

A metilációt **hiszton-metiltranszferázok** (HMT) végzik. A H3 N-terminális metilált lizinek (Lys4 és Ly36) kötőhelyül szolgálnak egy **hiszton-acetiláz** enzim (HAT) számára, amely lizinek e-aminocsoportját acetilálja (lásd **18.26. ábra** és **18.27. ábra**).

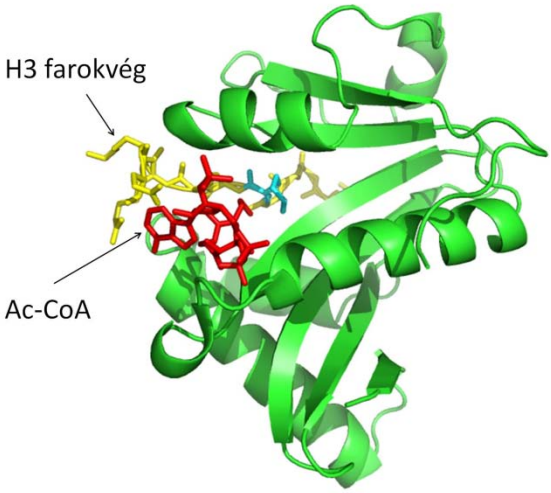
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.26. ábra: A hiszton-acetiltranszferáz enzim által katalizált reakció

Egy HAT térszerkezete, egy hiszton peptid és az Ac-CoA szubsztrát jelenlétében látható a **18.27. ábrán**. Vegyük észre, hogy az **acetiláció hatására** a hiszton (és a nukleoszóma) felszínén egy pozitív töltés megszűnik, aminek következtében – a hiszton DNS-kötése (amihez jelentősen hozzájárul a negatív DNS gerinc és a pozitív hiszton felszín közötti elektrosztatikus vonzóerő) drasztikusan lecsökken, végső soron **a kromatin fellazul**, a transzkripciós masinéria átírhatja az így már hozzáférhető, „bekapcsolt” gén(eke)t.

A **hiszton-dezacetiláz** (HDAC) enzimek eltávolítják a hisztonokról és transzkripciós faktorokról az acetilcsoportot, ezáltal a géneket visszajuttatják **inaktív állapot**ba. A gének „kikapcsolását”, represszálását további módosítások, többek között Lys és Arg oldalláncok metilálása fokozhatja (például a H3 Lys9 gyakran metilált a heterokromatin régióban). (Megjegyzendő, hogy a bázikus oldalláncok metilálása érdekes módon csak bizonyos géneket gátol, míg másokat aktivál.)

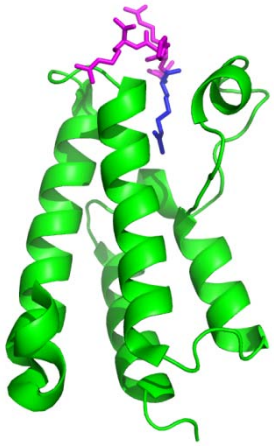


18.27. ábra: Egy hiszton-acetiltranszferáz enzim térszerkezete. Ábrázoltuk az enzim szubsztrátjait, az acetil-koenzim A-t és a H3 hiszton N-terminális láncvégét (a Lys, amire az acetilcsoport kerül, világoskék) (PDB: 1QSN).

A létrejött **acetil-Lys** csoportoknak még egy fontos szerepük van, nevezetesen hozzájárulnak egy új **kölcsönhatási felszín** kialakításához, aminek a hatására a hisztonokhoz kötődhetnek a ~110 aminosavból álló ún. **bromodomén**t tartalmazó transzkripciós faktorok és egyéb szabályozó fehérjék. Egy bromodomén térszerkezetét acetil-Lys-t tartalmazó peptiddel együtt a **18.28. ábra** mutatja.

Bromodomén található például a bazális transzkripciós faktorok közül a promóterhez először kötő **TFIID** komplexben (ennek a komplexnek a része a TBP is, lásd **14.6.1. fejezet**), aminek a segítségével olyan további transzkripció aktivátorokat tud a promóterhez toborozni, amelyeket a HAT enzimek előzőleg acetiláltak. Szintén bromodoménen keresztül kapcsolódik az aktiválandó kromatinrégióhoz - az acetilált hisztonokhoz - az átrendeződést végző **remodelláló komplex** (lásd **18.3.2.3**).

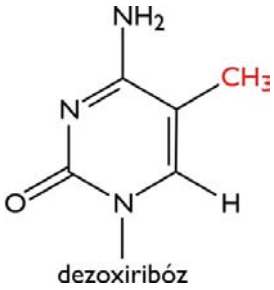
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.28. ábra: Egy bromodomén térszerkezete. A kötőpartner fehérje egy rövid peptidszakaszával komplexben kristályosították a bromodomént (a peptid lila, az acetil-lizin sötétkék) (PDB: 1E6I).

Az ismertetett változatos kovalens módosítások olyan mintázatot eredményeznek, amely egyrészt kifinomult génexpresszió szabályozást tesz lehetővé, másrészt ez a módosítási mintázat öröklődhet is a sejtgenerációk során. Ezt az információt nevezték el a kutatók „hiszton-kódnak” (amit ma még teljes egészében nem értünk). A **hiszton-kód** is része lehet az ún. **epigenetikai öröklés**nek, ami olyan generációról generációra terjedő információt jelent, ami nem a DNS nukleotidok sorrendjében kódolt.

Az **epigenetikai információ** másik fontos molekuláris alapja a **DNS** posztreplikációs **metilációja**. Eukariótákban elsősorban a citozin 5-ös szénatomja metilálódik (lásd **18.29. ábra**).



18.29. ábra: 5-metil-citozin

Az emlős genomok CpG szekvenciáinak ~70%-a metilált. Általában (bár nem kizárólagosan) a metiláció a gének **aktivitás**ának **csökkenés**éhez vezet (másképpen fogalmazva, nehezíti a génaktivációt). Példa erre a β-globin gén, ami az aktívan expresszáló sejtekben erősen hipometilált, azaz alulmetilált. A metilcsoport a citozinról a DNS kettőshélix nagyárkába nyúlik be (legtöbbször), ami megnehezítheti egyes génexpressziót aktiváló transzkripciós faktorok kötődését.

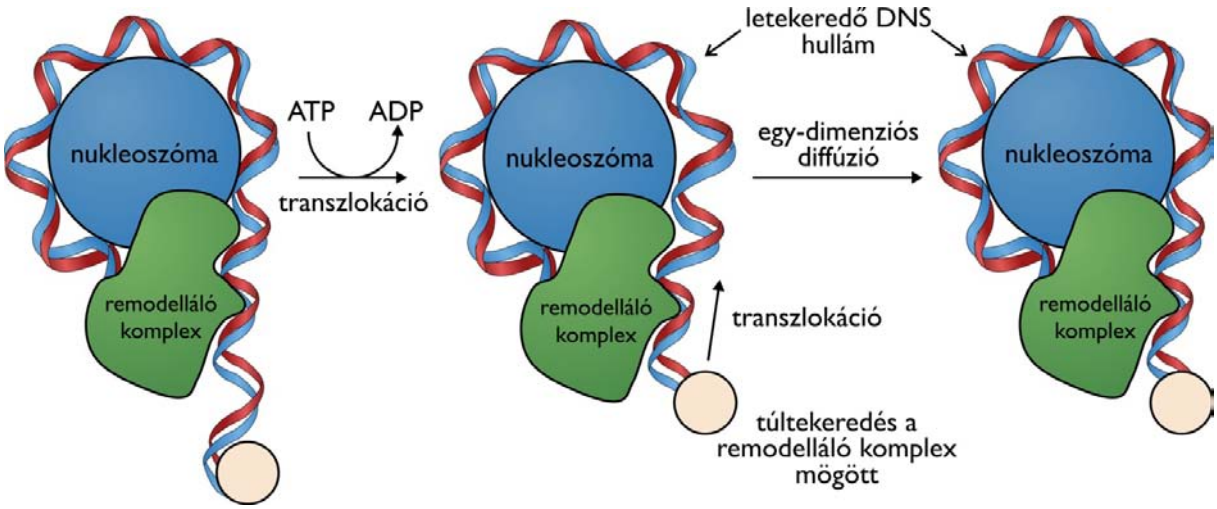
Az emlős genomokban ún. CpG szigeteket lehet azonosítani, ami aktív géneket jelez, mivel a nem génközeli CpG szekvenciákban a citozin könnyen dezaminálódik (lásd **13.12.2.2. fejezet**).

18.3.2.3. A remodelláló komplex működése

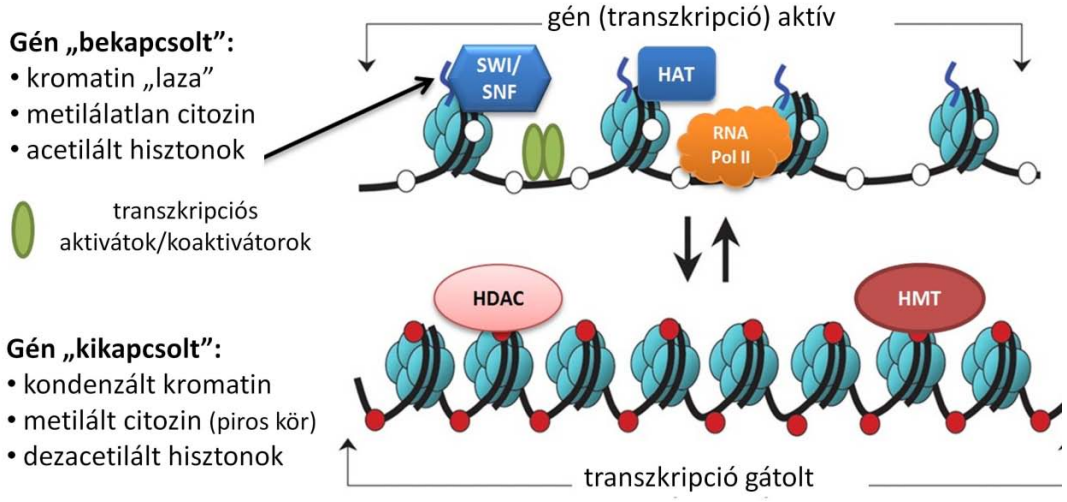
Miután a HAT enzimek fellazították a kromatint, bekapcsolódhatnak a kromatin aktív átrendezésébe a **remodelláló (*remodeling*) komplexek**, amelyek ATP energiájának felhasználásával (**ATP-áz aktivitás**) ténylegesen elmozdítják a hiszton mag köré tekeredett DNS szálakat. Öt ismert családjuk van, amelyek közül három bizonyosan részt vesz a kromatin mechanikai átrendezésén keresztül az eukarióta génexpresszió szabályozásában. Az SWI/SNF és az ISWI/NURF családot említjük meg. A számos alegységből álló motorkomplexek pontos működését nem ismerjük, jelenleg is intenzíven kutatják őket.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A kromatin áthelyeződés egy lehetséges modelljét a **18.30. ábra**, míg remodelláláson keresztül történő transzkripció szabályozás általános sémáját a **18.31. ábra** szemlélteti.



18.30. ábra: A remodelláló komplex működésének hipotetikus modellje. A komplex ATP-t felhasználva a nukleoszómát körülvevő DNS kettős szálat „túlcsavarja” (negatív szuperhélix), aminek következtében a hiszton-DNS kölcsönhatás meggyengül, és a relaxálódó DNS letekeredési hulláma elmozdítja a DNS-t a hiszton maghoz képest.



18.31. ábra: A kromatin remodellálás sémája. A gén aktiválásához szükség van a kromatin átrendeződésére (SWI/SNF remodelláló komplex), a hisztonok acetilálására (HAT), a transzkripciós aktivátorok és koaktivátorok kötődésére és esetenként a DNS-en belül citozinek metilálására. (*forrás: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Luong_LD_SA_F2.jpg; Creative Commons licensz*)

18.3.3. Eukarióta transzkripciós faktorok, kofaktorok, komplexek

Az eukarióta transzkripciós faktorok (aktivátorok, represszorok) **moduláris felépítés**űek, általában DNS-kötő, ligandum-kötő (más szóval regulációs-) és transzaktivációs-doménből állnak (lásd **18.32. ábra**). Ezeket a doméneket géntechnológiai módszerekkel szabadon lehet cserélgetni (*domain swapping*), ezáltal kísérleti célra új tulajdonságokkal rendelkező transzkripciós faktorokat előállítani.

A **DNS-kötő domén**jük (DBD) lehet hélix-kanyar-hélix (HTH), homeodomén, Zn-ujj, bázikus leucin-cipzár (bZIP) (lásd **18.1.1.**). Nagy többségük homodimer, részleges palindrom szekvenciát ismernek fel. Sokszor hetero- és

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

homodimer formában tudják kombinatorikus módon növelni a szabályozott gének számát illetve a szabályozás „finomhangolását”.



18.32. ábra: Eukarióta transzkripciós faktorok moduláris felépítés. DBD: DNS-kötő domén; LBD: ligandum-kötő (vagy regulációs) domén; TAD: transzaktivációs domén. A funkcionális modulok sorrendje változhat.

A **transzaktivációs domén**jük (**TAD**) is sokféle lehet. A szekvencia legjellemzőbb aminosavai alapján csoportosítjuk őket. A GAL4 élesztő TF-ben savas, a GCN4-ben hidrofób, az Sp1-ben Gln-gazdag, a CTF1-ben Pro-gazdag a TAD. A legkisebb méretű transzaktivációért felelős motívumcsalád mindössze 9 aminosavból áll (például az NF-κB transzkripciós faktorban).

A **TAD** vagy közvetlenül az **RNS-polimeráz II enzimhez** vagy a **preiniciációs komplex** valamelyik komponenséhez **kötődi**k. Sokszor a TAD-on keresztül a transzkripciós aktivátor számos további szabályozó fehérjével képes kölcsönhatásra lépni, ezzel mintegy „toborozó” feladatot lát el. Az utóbbi fehérjék mintegy hidat képezhetnek a TF és az RNS-polimeráz II között. Ezek a fehérjék már a transzkripciós kofaktorok közé tartoznak (mivel közvetlenül nem kötődnek a DNS-hez; lásd **18.3.3.1**).

Egy-egy TF az esetek nagy részében számos gén expresszióját tudja befolyásolni (általában aktiválni). Ne felejtsük el, hogy a TF-ek nem háztartási gének, az ő expressziójuk is szabályozott, általában valamilyen külső vagy belső jel hatására expresszálódnak. Az utolsónak említett **NF-κB** (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) például az állatokat érő valamilyen sérülés vagy stressz hatására expresszálódik, s a nevének megfelelően az immunválaszban szereplő géneket aktivál. Hibás működése rákos, gyulladásos és autoimmun betegségekkel is kapcsolatba hozható.

Az eukarióta TF-ek **DNS-kötőhelye** jellemzően, bár nem mindig, részlegesen palindrom szekvenciából áll. Egy példát említve, az Sp1 transzkripciós aktivátor kötőhelyének konszenzus szekvenciája:

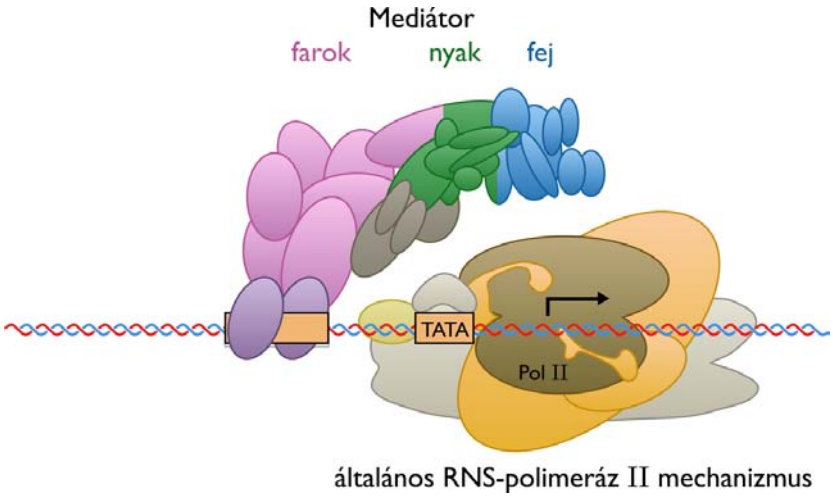
5' (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (*GC-box*-nak is nevezik).

18.3.3.1. Transzkripciós kofaktorok: Mediátor komplex

A transzkripciós aktivátorok (ritkábban represszorok) és a transzkripciós gépezet (preiniciációs komplex, benne az RNS-polimerázzal) közötti kapcsolatot az esetek nagy többségében fehérje komplexek biztosítják. Ezen transzkripciós kofaktorok (koaktivátorok) közül a legismertebb a jelenleg is intenzíven kutatott **Mediátor komplex**. A komplexet (az RNS-polimeráz II működésének felderítéséért 2006-ban Nobel-díjban részesült) Roger Kornberg 1994-ben fedezte fel élesztőben. Azóta kiderült, hogy az eukarióták körében általánosan elterjedt, konzervatív szerkezetű és funkciójú fehérje komplex.

A Mediátor 25-30 fehérjeláncból álló nagy fehérje komplex (>1,5 MDa), szerkezetét atomi felbontásban még csak részlegesen ismerjük. A preiniciációs komplex kialakításában és a szabályozott transzkripcióban is fontos szerepet játszik. Nevének megfelelően az alapvető szerepe, hogy közvetítő szerepe van a DNS elemekhez kötődő transzkripciós faktorok és a promóteren kialakuló transzkripciós komplex között. A bazális transzkripciós komplexen a legfontosabb **kölcsönhatás**t az **RNS-polimeráz II C-terminális farokrész**ével (CTD) alakítja ki (emlékeztetünk rá, ennek a szerkezeti elemnek a foszforilációja szükséges a transzkripció iniciációból az elongációs fázisba történő átmenethez, lásd **14.6.1. fejezet**). A komplex szerkezetét és kapcsolatát a preiniciációs komplexszel vázlatosan a **18.33. ábra** mutatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.33. ábra: A koaktivátor szerepet betöltő Mediátor-komplex vázlatos szerkezete (az atomi felbontású szerkezetét még nem ismerjük)

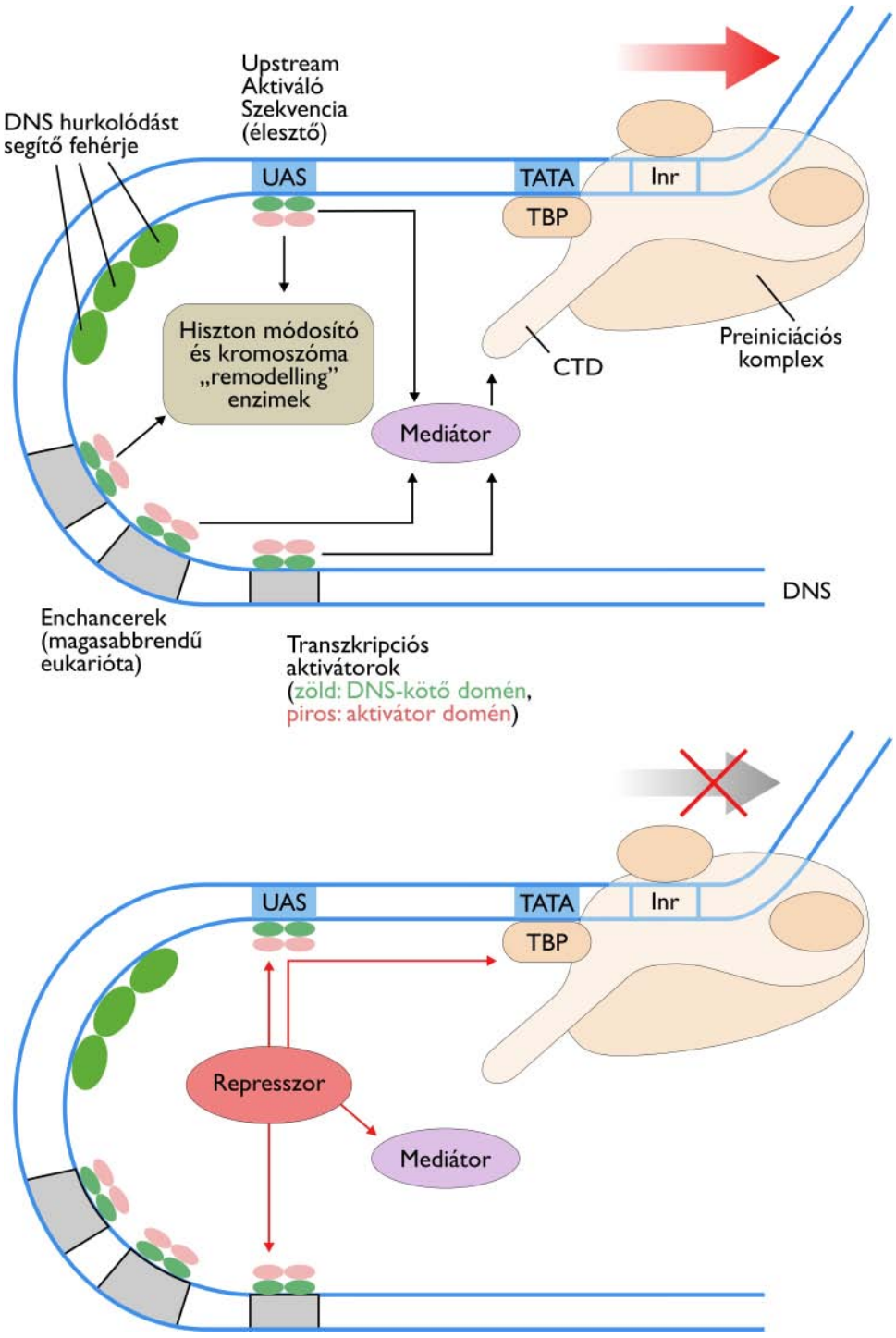
18.3.3.2. A promótertől távoli DNS szabályozó elemek: *enhancer, silencer*

A transzkripciós faktorok kötőhelye sokszor nagy távolságban (több kilobázis) van a szabályozott gén promóterétől. Ezeket a **DNS-elemek**et, ha a jelenlétük fokozza az adott gén átírását **enhanszern**ek (***enhancer***: fokozó, növelő), ha viszont - ritkábban - csökkenti, akkor ***silencer***-nek (csendesítő) nevezzük. A promóterhez viszonyított helyzetük nem rögzített, attól 5'- és 3'-irányban is elhelyezkedhetnek, sokszor akár a gének kódoló régióján belül is. (Az élesztő géneknél a szakirodalom az UAS, (*upstream activator sequences*) elnevezést használja a promótertől távoli szabályozó elemekre.)

Hogyan tudják a nagy elsődleges szekvencia távolság ellenére ezek a DNS elemek a promóterek működését befolyásolni? A válasz a korábban leírtakból következik: az enhanszer elemhez kötődik egy **transzkripciós aktivátor** fehérje, s a promóter régióval, az ott kialakuló preiniciációs komplex-szel a **Mediátor komplex** hoz létre fizikai kapcsolatot. A két cisz-elem között egy **DNS hurok** alakul ki. A kihurkolódást segítik egyes nem-hiszton kromatinkötő fehérjék, amelyek a **HMGprotein** (*high mobility group*) elnevezést kapták.

Az eukarióta gének szabályozásának legfontosabb komponenseit a **18.34. ábra** és a **10. animáció** szemlélteti. A transzkripció beindulásához legalább az alábbi fehérjék szükségesek: 1) **bazális transzkripciós faktorok**, 2) **kromatin módosító enzimek és remodelláló komplexek**, 3) a promóterhez közeli és távoli DNS szabályozó elemekhez (**enhanszer**) kötődő **aktivátorok** és/vagy **represszorok**, 4) transzkripciós **kofaktorok**, **Mediátor komplex** és további aktivátor vagy represszor kofaktorok.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.34. ábra: Az eukarióta transzkripció szabályozási sémái (fent aktiváció, lent represszió). Az ábra bemutatja, hogy a promótertől távoli szabályozó helyek (enhanszerek) a DNS kihurkolódásával a Mediátoron keresztül hogyan befolyásolják a transzkripciót. A Mediátor általában az RNS-polimeráz C-terminális farokrészéhez (CTD) kötődik.

18.3.4. Szteroid hormonok hatásmechanizmusa

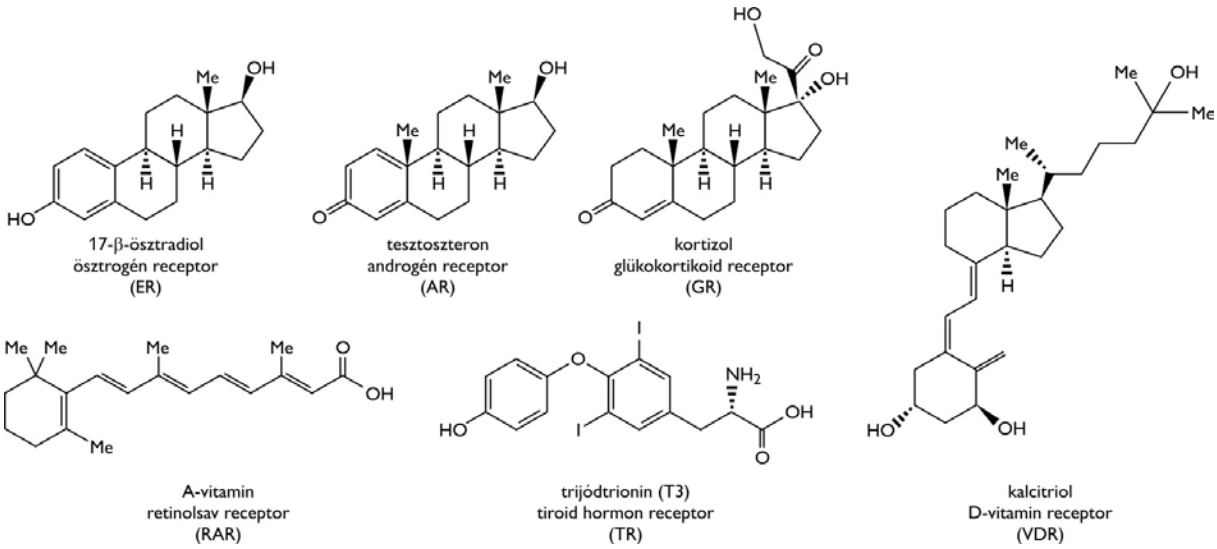
A környezetből érkező jelekre bekövetkező sejtválasz igen gyakran génexpressziót igényel, azaz a jeltovábbítási (szignál transzdukciós) mechanizmusok a gének aktiválását vagy gátlását is eredményezhetik. A szignál transzdukciós folyamatok részleteiről ebben az e-könyvben nem lesz szó, de azt tudnunk kell, hogy a külső jelek gyakorlatilag minden esetben valamilyen receptorfehérjén keresztül „közlik az információt" a sejttel. A receptorok nagyobb hányada membránfehérje (lásd **11.5. fejezet**), de van egy intracelluláris receptorcsalád is, az ún. **nukleáris**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

receptorok, amelyek a **szteroid** valamint a **tiroid** és **retinoidhormonok**ra adott sejtválasz kiváltásának fő végrehajtói.

A receptorcsalád (emberben ~50 gén kódolja őket) neve utal arra, hogy ezek a szabályozó fehérjék ligandum-kötött formában a sejtmagon belül **transzkripciós faktor**ként közvetlenül tudnak géneket be- és kikapcsolni (általában aktiválni).

A ligandumaik lipofil molekulák (néhánynak a szerkezeti képletét, és specifikus receptoruk nevét a **18.35. ábra** mutatja be), tehát átdiffundálnak a sejtmembránon és vagy a citoszolban vagy a sejtmagban kötődnek a receptorukhoz, majd a ligandum-kötés kiváltotta konformációváltozás következtében felismerik a szabályozandó géneket és kötődnek hozzájuk. A sejtmagi receptorok DNS-kötőhelyét **hormon válaszelemnek** (HRE: *hormone response element*) nevezik.

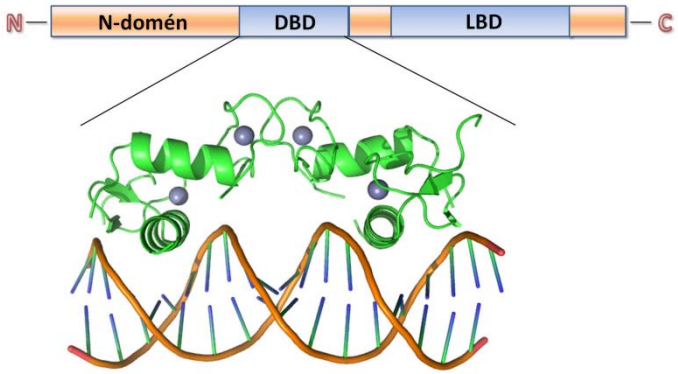


18.35. ábra: Nukleáris receptorokhoz kötődő, transzkripciós faktorokon keresztül ható szabályozó lipidek.
A feltüntetett szteroidok, trijódtrionin, D- és A-vitamin a nevük után feltüntetett nukleáris receptorhoz köt.

Általában homo-, ritkábban heterodimerek, s a transzkripciós faktorokról eddig ismertetett tények nagyrészt igazak rájuk is. Az N-terminális doménjük (AF: aktivációs funkció) variábilis; a transzaktivációban vesz részt, valamint a transzkripciós kofaktorok részben ide kötődnek. A **DBD cink-ujj** típusú, viszonylag kisméretű, konzervált szerkezetű domén. Az ösztrogén receptor HRE szekvenciája:

5'-**AGGTCA**NNN**TGACCT**-3' (részleges palindrom).

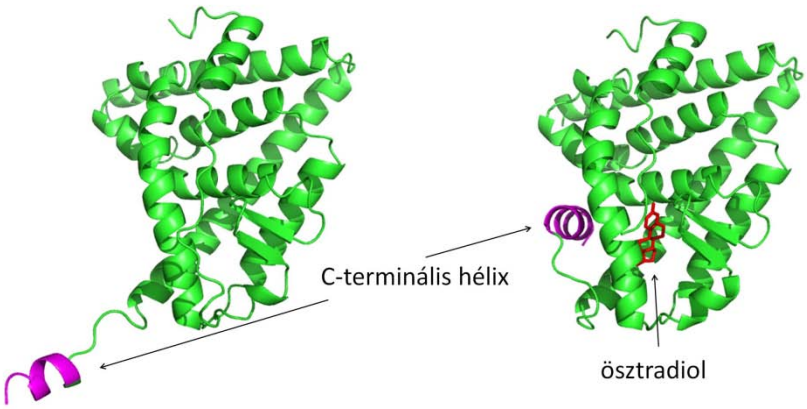
A két cink-ujj a szomszédos nagyárokhoz köt (lásd **18.36. ábra**). A többi nukleáris receptor is 6-6 nukleotidot ismer fel, de néhol az összekötő DNS szakasz hiányzik.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

18.36. ábra: Az ösztrogén receptor transzkripciós faktor kötődése az ösztrogén válaszelemhez. A transzkripciós faktor cink-ujj doméneken keresztül kötődik a DNS-hez (a cinkionok szürkék) (PDB: 1HCQ).

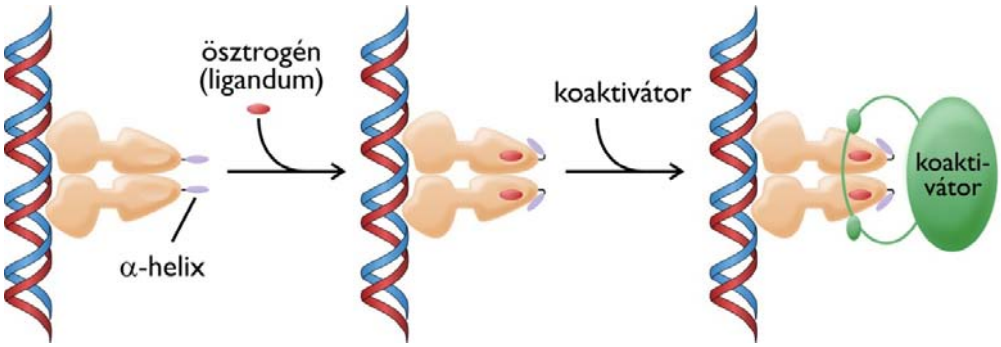
Az LBD a legváltozatosabb szerkezetű (a D-vitamin-kötő receptorban mindössze 25 aminosavból, míg a mineralokortikoid receptorban több mint 600 aminosavból áll), s a kismolekula ligandumokon kívül koaktivátorokat is köt. Az ösztrogén receptor LBD-je a-helikális harmadlagos szerkezetű (három rétegből álló, ún. a-helikális szendvicset alkot). A **18.37. ábra** jól látszik a **ligandum (ösztradiol) okozta konformációváltozás** (csak egy alegységet ábrázoltunk).



18.37. ábra: Az ösztrogén-receptor ligandum-kötő doménje (LBD) ösztrogén apo formában (bal) és az ösztrogén ligandum jelenlétében (jobb). A ligandum-kötés (az ösztrogén piros) hatására a C-terminális hélix (lila) pozíciója jelentősen változik (PDB: 1A52 és 1ERE)

A ligandum nélkül a globuláris fehérjéből kinyúló C-terminális α-hélix ösztradiol jelenlétében visszahajlik egy felszíni mélyedésbe. A változás következtében hozzáférhetővé válik egy kötőfelszín, amelyhez a **p160 koaktivátor fehérjék** (pl. SRC-1) kötődnek. Érdekes módon az ösztrogén-receptor a hormon kötődése nélkül is felismeri az ösztrogén válaszelemet, de génaktivációra csak a ligandum jelenlétében képes, miután kötődött hozzá egy koaktivátor (lásd **18.38. ábra**).

Az ösztrogén válaszelem sok gén promóterénél megtalálható, amiből az is következik, hogy az ösztrogén hatása sejttípus függő (ez természetesen igaz az eukarióta transzkripciós faktorok zömére).



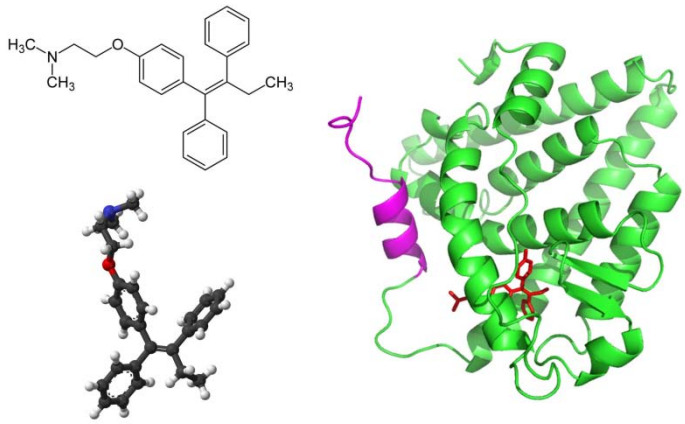
18.38. ábra: Az ösztrogén-receptorral a koaktivátor fehérje csak az ösztrogén kötődése után tud kölcsönhatásba lépni, s ezzel fokozni a szabályozott gén aktivitását

Az emlőszövet sejtjeinek rákos elváltozása sok esetben ösztrogén-függő (a mellrákok 70%-a ilyen; az aktivált receptor sejtproliferációt fokozó géneket aktivál). Ezeket a betegeket az ösztrogénnel kompetáló, **antagonista gyógyszer**rel, a **tamoxifen**nel lehet kezelni. A hatásmechanizmust megértheti a **18.39. ábra** alapján.

A gyógyszer kötődése (az ösztrogén helyére) megváltoztatja a C-terminális hélix pozícióját, amely így „elállja az útját” a koaktivátornak. (Érdekességként megjegyezzük, hogy a génexpresszió szabályozás komplexitását jelzi,

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

hogy a tamoxifen az endometrium sejtekben viszont agonista hatású, azaz fokozza az ösztrogén hatását – amiből az is következik, hogy csak mellrák esetén van pozitív hatása.)



18.39. ábra: A tamoxifen mellrák gyógyszer és kötődése az ösztrogén-receptorhoz. A gyógyszermolekula (piros) kompetitív gátlószerként megakadályozza az ösztrogén kötődését, így a receptor génaktivátor hatása gátlódik (a koaktivátor nem tud kötődni) (PDB: 3ERT).

18.4. Génexpresszió szabályozás a transzláció szintjén

A **poszttranszkripciós szintű**, még a sejtmagban zajló génexpresszió **szabályozás**ra példa az **alternatív splicing** folyamata (lásd **14.10. fejezet**), amiről itt csak annyit jegyzünk meg, hogy nagyban hozzájárul ahhoz, hogy egy sejtben (vagy organizmusban) expresszálódó fehérjék száma jóval meghaladja a gének számát. Becslések szerint a primer RNS-ek ~90%-a alternatív módon processzálódik, s a transzkripciós egységek több mint feléről bizonyosan többféle polipeptidlánc keletkezik a transzláció során. A sejtmagból kijutott **érett mRNS** további **szabályozás** alatt áll. Az alábbiakban két **példá**t mutatunk be arra, hogyan akadályozhatják meg (vagy fokozhatják) regulációs mechanizmusok a keletkező fehérjék mennyiségét a transzláció szintjén.

Az állatok **vasion-homeosztázisá**ban szerepet játszó **gének expressziójá**nak gátlása és fokozása az egyik példánk. A másik példa egy olyan szabályozási mechanizmus, amit csak az 1990-es években ismertek fel a kutatók, s a génexpresszió szabályozásban betöltött jelentőségét még ma sem ismerjük teljes mélységében – ez az **RNS interferencia**, amely során az érett **mRNS-ek** szabályozott módon **degradálódnak**. Ez utóbbi szabályozó mechanizmus jelentőségét tovább fokozza, hogy a jelenséget kihasználva „géncsendesítés” (*gene knockdown*) néven egy igen hatékony géntechnológiai kutatási eszköz került a molekuláris biológusok kezébe (lásd **19.9.2. fejezet**).

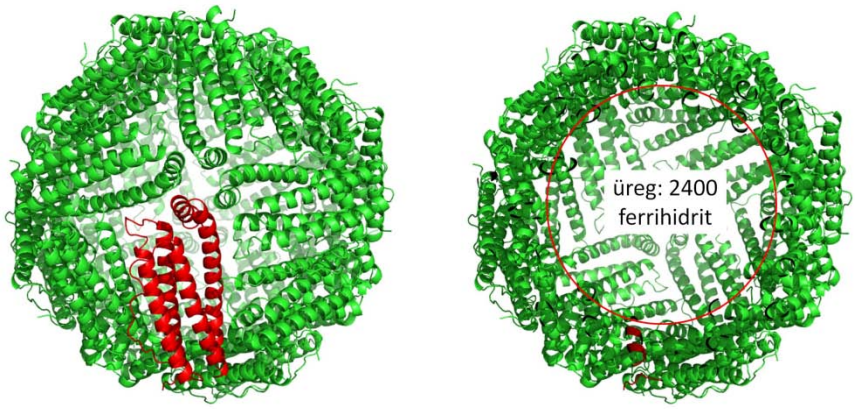
18.4.1. Az állatok vasion anyagcseréjében szerepet játszó mRNS-ek szabályozása

A vas esszenciális nyomelem, gondoljunk csak a hemoproteinek több fejezetben is tárgyalt szerepére. Azonban a túl sok vasion a sejtekben redox-reakciókon keresztül szabadgyökök képződéséhez vezet, amelyek nagy károkat okozhatnak. Következésképpen a **vas homeosztázis**ban szerepet játszó **fehérjékmennyiségé**t a sejt szabályozza, méghozzá a **transzláció szintjén**.

A vas metabolizmus kulcsfehérjéi a vérben a vasionok szállítását végző **transzferrin**, a sejtbejutást biztosító **transzferrin receptor** és a **ferritin**, egy igen hatékony tárolófehérje. A 24 azonos alegységből felépülő ferritin (450 kDa) 2400 darab ferrihidrit ($Fe_5HO_8x4H_2O$) molekulát képes tárolni (lásd **18.40. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A sejt vasion szintje a **ferritin és a transzferrin-receptor szintézisét reciprok módon szabályozza**. Ha nincs elég vasion, a receptor mennyisége növekszik, a ferritiné csökken. Magas Fe^{2+} koncentráció esetén fordított a helyzet.

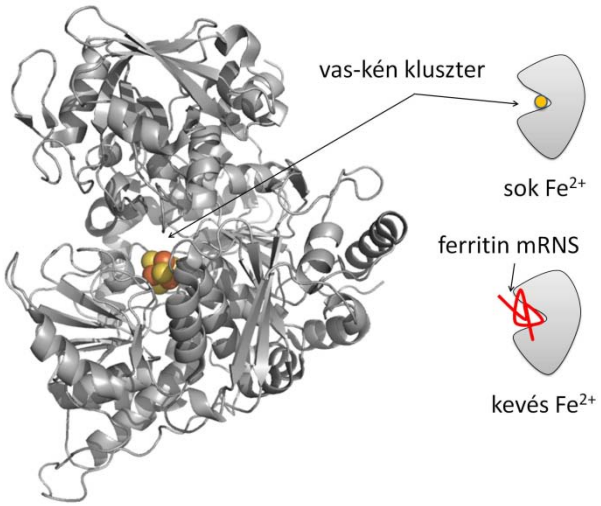


18.40. ábra: A ferritin térszerkezete. A 24 polipeptidlánc egyikét kiemeltük (piros). Az ábra jobb oldalán a szerkezet tetejét levágtuk, így látszik az az üreg (piros körben), amiben a vasionok tárolódnak (PDB: 1IES)

A szabályozást az **mRNS** molekulák 3'- illetve 5'-**UTR régiójában** kialakuló **hajtűkanyarokon**, és azt specifikusan felismerő regulációs fehérjéken alapszik.

A **ferritin 5'-UTR**-jében van egy **vasion-válaszelem** (*iron response element*), egy hajtűkanyar, amihez a 90 kDa méretű **IRP** (*IRE binding protein*) kötődik, és ezáltal fizikailag **gátolja a riboszómák kötődését**. Ha a Fe^{2+} koncentráció megemelkedik, a vasionok kötődni fognak a IRP-hez vas-kén centrumok (4Fe-4S) formájában. Mivel a két kötőhely átfed egymással, a ferritin mRNS felszabadul a gátlás alól és a fehérje szintézise beindul (lásd **18.41. ábra**).

(Megemlítjük, hogy a vas-kén centrumot tartalmazó fehérjékben a vasion nem hem kofaktorhoz, hanem vagy szervetlen kénatomokhoz vagy Cys oldallánchoz kötődik, s tölt be többek között elektronszállító szerepet, mint például a redukáló fehérje ferredoxinban vagy a mitokondriális elektrontranszportlánc utolsó komponensében, a citokróm-oxidáz komplexben.)

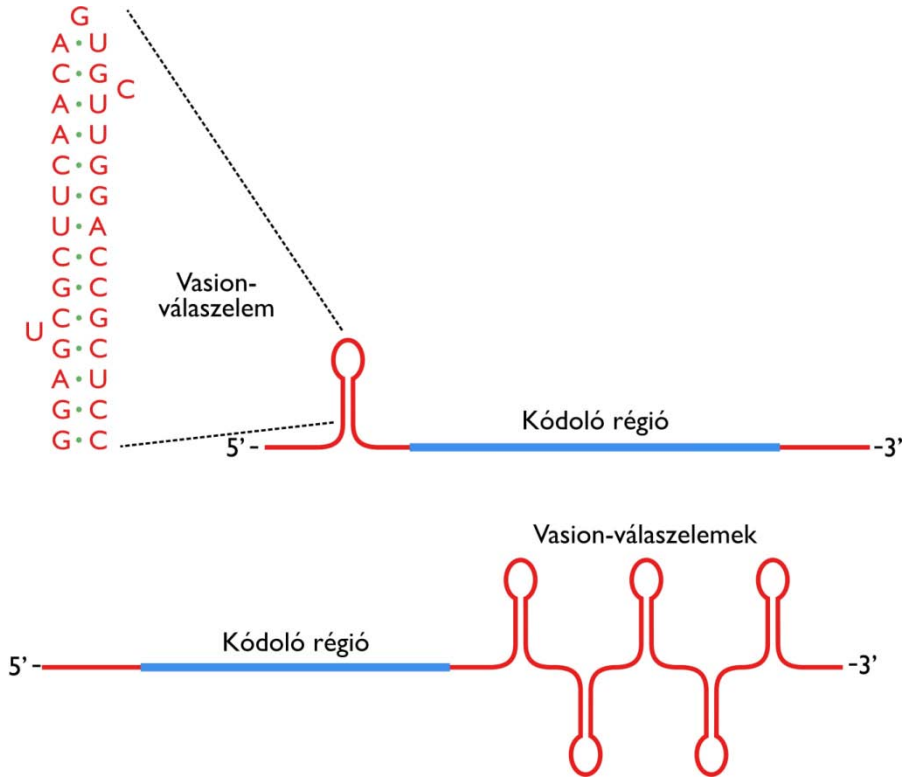


18.41. ábra: Az IRP fehérje térszerkezete. Kiemeltük a vas-kén centrumot (sárga és narancs golyók), valamint vázlatosan mutatja az ábra azt is, hogy miként tudják a vasionok kiszorítani a ferritin mRNS-t (PDB: 1C96)

A **transzferrin-receptor mRNS 3'-UTR**-je öt **IRE**-t tartalmaz (lásd **18.42. ábra**). **Alacsony Fe^{2+}**koncentrációnál az **IRP** ide is **kötődik**, azonban ez a kölcsönhatás az **mRNS stabilitását fokozza**, ezért több receptor fehérje szintetizálódik. Amint megemelkedett a vasion szintje, a transzferrin receptor mRNS-e gyorsan degradálódik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Érdemes megjegyezni, hogy a hem bioszintézisében szerepet játszó génekről átíródott mRNS-ek is tartalmaznak IRE-ket.



18.42. ábra: A ferritin és a transzferrin-receptor mRNS-ében található vasion-válaszelemek (hajtűkanyarok)

Érdekes fehérjeevolúciós rokonságra derült fény, miután az IRP génjét klónozták és meghatározták a szekvenciáját. Kiderült, hogy 30%-ban azonos a citrát-ciklus egyik enzimével, az akonitázzal (ez is vas-kén centrumot tartalmaz) – ebből az ősi enzimből „faragott" az evolúció vasérzékelő fehérjét.

18.5. Szabályozott mRNS lebomlás: RNS interferencia

Utoljára maradt a mindössze másfél évtizede felfedezett transzlációs szintű szabályozási mód, az **RNS interferencia (RNSi)** bemutatása.

A jelenség felfedezéséért 2006-ban Andrew **Fire** és Craig **Mello** Nobel-díjat kapott. A két kutató modellorganizmusként a *Caenorhabditis elegans* nevű fonálférget használta. A kutatók kimutatták az 1990-es évek végén, hogy az állat testébe injektált **kétszálú RNS** az adott gén funkcióvesztéses mutációjához hasonló fenotípust eredményezett. (Az egyszálú minták esetén alig volt kimutatható hatás.) A kétszálú RNS tehát „**interferált**" a **gén működésével**. Fire és Mello más géneket „megcélozva" is megismételte a kísérletet, így kimutatták, hogy a jelenség általános, továbbá **specifikus** a megcélzott génre. Mivel az RNS interferenciához igen kis mennyiségű kétszálú RNS is elég volt, feltételezték, hogy valamilyen katalitikus komponens is szerepet játszik a jelenség mögötti molekuláris mechanizmusban.

A jelenséget egyébként először poszttranszkripciós géncsendesítés (PTGS) néven növényekben írták le a 90-es évek elején, de mára világossá vált, hogy az eukariótáknál általánosan elterjedt szabályozási mechanizmusról van szó, mely mögött a sejtekben szintetizálódó **mRNS molekulákat lebontó enzimatikus mechanizmus** áll. Ez az enzimrendszer számos fontos funkcióval rendelkezik, így például védelmet nyújt a vírusokkal, vagy a transzpozonokkal (mobil genetikai elemek) szemben, de elengedhetetlen számos gén működésének szabályozásához is. A legújabb kutatások szerint egyes esetekben az RNSi nem csak mRNS degradáción, hanem a közvetlenül a transzláció és a transzkripció gátláson keresztül is szabályozhatja a génexpressziót.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Napjainkra az RNS interferencia a génműködés tanulmányozásának fontos eszközévé is vált, sőt várható, hogy a jövőben a humán gyógyászatban is szerepet kap.

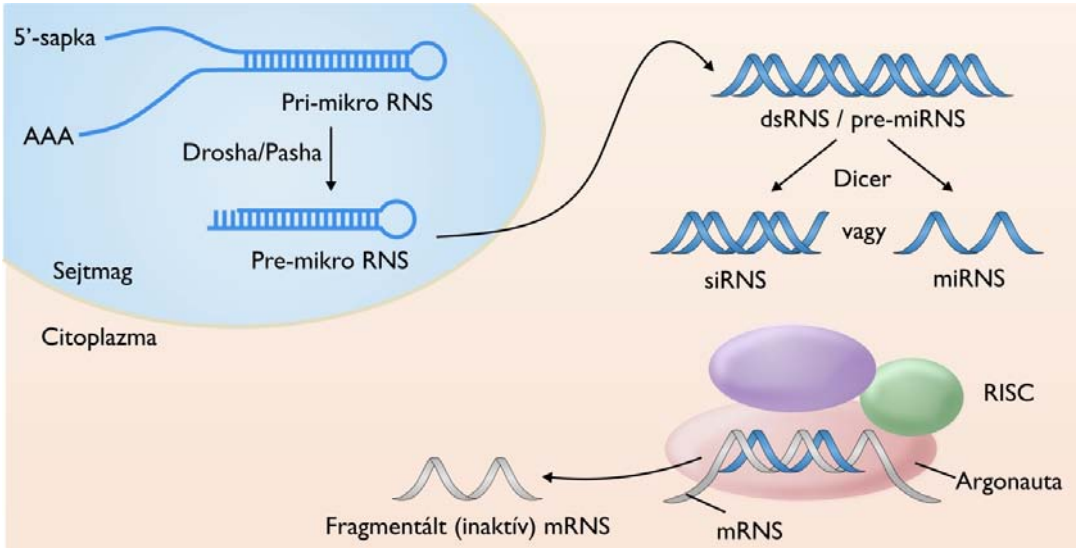
RNS interferenciát kétféle kis RNS válthat ki, kissé eltérő útvonalon. Az általában **exogén** eredetű kétszálú RNS prekurzorokból keletkező **kis interferáló RNS**-ek (**siRNS**; *small interfering RNA*) a vírusfertőzések, transzpozonok (ugráló gének) elleni védelem részét képezik. Ilyen kétszálú siRNS molekulákkal lehet (akár közvetlenül, akár rekombináns DNS-konstrukciók segítségével a sejtbe juttatva őket) az egyes gének szerepét vizsgálni a **géncsendesítés**nek (*gene silencing*, *geneknockdown*) nevezett géntechnológiai **módszerrel** (lásd **19.9.2. fejezet)**.

A másik kis RNS **endogén génekről** keletkező, egyszálú **mikro-RNS (miRNS).** A humán genom ~1000 mikro-RNS gént tartalmaz, s mai becslések szerint ezek az összes gén ~60%-ának expresszióját szabályozhatják. Elsősorban transzlációs represszión keresztül hatnak, de például a növényi miRNS-ek transzkripciós faktorként is működhetnek. Ki kell emelnünk, hogy újabban a miRNS-eket számos betegség, így tumorok kialakulásával is kapcsolatba hozták.

A miRNS gének vagy fehérjét kódoló gének intronjain belül vagy gének között (intragénikus régiókban) helyezkednek el, többségüket az RNS-polimeráz II írja át. A primer transzkriptumról (**pri-miRNS**) az 5'-sapka és a poliA-farok egy endonukleáz komplex (**Drosha/Pasha**) segítségével még a sejtmagon belül lehasad, majd a **pre-miRNS** a citoplazmába kerül (lásd **18.43. ábra**).

A további molekuláris történések során először a pre-miRNS-t és az exogén eredetű kétszálú RNS-t is a **Dicer** nevű enzim **endonukleáz** aktivitással hasítja. A hasítás eredményeképpen **20-25** (leggyakrabban **21) nukleotid**ból álló kétszálú **siRNS**-ek keletkeznek, amelyeket Watson-Crick bázispárok tartanak össze, úgy hogy, a végeken két 3'-túlnyúló nukleotid marad. A pre-miRNS-ből a Dicer egyszálú **miRNS-t** állít elő.

A siRNS és a miRNS is végül beépül a **RISC** (*RNA-induced silencing complex*) **komplexbe**, ahol bázispárosodik a komplementer mRNS szállal. A komplex **Argonauta** nevű komponense az mRNS szálat több helyen elhasítja (lásd **18.43. ábra**).

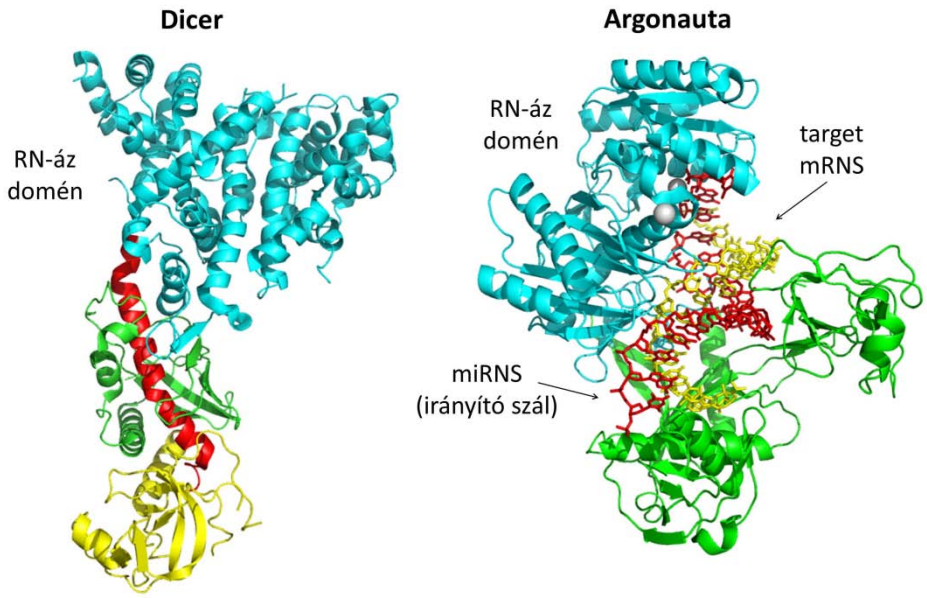


18.43. ábra: Az RNS interferencia két útvonalának vázlatos sémája. Az exogén kettős-szálú RNS (dsRNS)-t és a génekről átírt, a sejtmagban részben processzálódó pre-mikro-RNS-t is a Dicer endonukleáz processzálja tovább a citoplazmában. A kétszálú siRNS és az egyszálú miRNS is a RISC enzim komplexre kerül, ahol a vele komplementer mRNS szálakkal bázispárosodik és fragmentálódik. A RISC endonukleáz komponense az Argonauta fehérje.

A miRNS és a célszekvencia között csak részleges a bázispárosodás, ezért egy miRNS több mRNS transzlációját is represszálhatja. Ezzel szemben az siRNS irányító (*guide*) szála csak teljes komplementaritás esetén kötődik cél mRNS-hez, ezért ezen az útvonalon csak egyféle mRNS degradálódik. Ezért lehetséges a géncsendesítéssel (*knockdown*) egyenként vizsgálni a géntermékek hatását sejtkultúrákban és *in vivo* modell organizmusokban is (*C. elegans, Drosophila, Arabidopsis*).

A Dicer és az Argonauta fehérjék kristályszerkezetét a **18.44. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



18.44. ábra: A Dicer és az Argonauta endonukleázok doménszerkezete. Az Argonautához kötődő miRNS és a vele komplementer mRNS kettőshélixet alkot (PDB: 2FFL és 3HK2)

Mindkét enzim rendelkezik endonukleáz doménnel (az ábrán világoskék színnel kiemelve), ahol RNS foszfodiészter kötések hasadnak. Az **Argonauta** protein a **RISC komplex kulcs komponense**: RNS-kötő fehérjék, a felszínükön ismerik fel egymást a cél mRNS és az siRNS. Ezen kívül endonukleáz aktivitásuk van, tehát az mRNS hasítását is végzik. A két RNS lánc kettőshélix konformációban van az enzim felszínén, amely az A-DNS formához hasonlít. Az Argonauta katalitikus aktivitáshoz két Mg^{2+}-ionra is szükség van.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19. fejezet - A géntechnológia alapjai

(szerző: Nyitray László)

A „klasszikus” biokémia korában a makromolekulák között is óriásnak számító DNS izolálása és vizsgálata a fehérjéknél ismertetett módszerek (lásd 6**. fejezet**) segítségével csak korlátozottan volt lehetséges, a génekben rejlő információt, a nukleotidok sorrendjét sem lehetett meghatározni. Az utóbbit a 1970-es évek második felére megszülető géntechnológia tette lehetővé. Az újonnan kifejlesztett módszerek - és nem túlzás ez a kifejezés - forradalmasították a molekuláris biológiai kutatásokat.

De mit is jelent a **géntechnológia** (amit neveznek „génsebészetnek” vagy kissé pejoratív kifejezéssel „génmanipulációnak” is)? Elsősorban a **rekombináns DNS technikák**at értjük alatta, azt a lehetőséget, hogy egyrészt speciális enzimek segítségével DNS molekulákat lehet „szabni-varrni”, másrészt specifikus DNS szekvenciákat lehet olyan mennyiségben előállítani, amiből meghatározható az elsődleges szekvencia (DNS-szekvenálás) és amelyet a fejezetben ismertetett számos más módszerhet fel lehet használni.

A „szabás-varrás” eredménye a rekombináns DNS, amelyben több különböző eredetű DNS szakasz „kombinálódik”, s amelyet a **molekuláris klónozásnak** nevezett eljárással szaporítottak fel. Ezekkel az alapmódszerekkel és néhány további géntechnológiai alkalmazással ismerkedünk meg ebben a fejezetben. Felhívjuk az olvasó figyelmét, hogy erről a témakörről sokkal részletesebb információkhoz juthat egy, az ELTE Biokémiai Tanszék szerzőgárdája által írt, a világhálón szintén elérhető elektronikus tankönyvből („Géntechnológia és fehérjemérnökség”).

19.1. A géntechnológia célja és módszerei

A **rekombináns DNS technikák** segítségével az alább felsorolt kísérleteket lehet elvégezni.

· Egy specifikus DNS-szakasz (pl. egy gén) felszaporítása. Erre két lehetőség van: a gazdasejtet igénylő **molekuláris klónozá**s (*in vivo* módszer) és az *in vitro* kivitelezhető **polimeráz láncreakció**.

· A klónozott DNS információtartalmát meg lehet határozni. Ez a DNS-t felépítő nukleotidok sorrendjének megállapítása, tehát a **DNS-szekvenálás**a. Korábban már írtunk róla, hogy a fehérjék aminosavsorrendjét manapság egyszerűbb az őket kódoló gének szekvenálásával meghatározni. A DNS-szekvenálás segítségével ma már teljes genomok információtartalmát is ki lehet nyerni (**genom projektek**).

· **Rekombináns fehérjék**et lehet előállítani, azaz valamilyen gazda élőlényben kifejeztetni (expresszálni) a vizsgálandó fehérje génjét egy rekombináns DNS konstrukcióról. A rekombináns fehérjét aztán ugyanazokkal a módszerekkel lehet vizsgálni, amiket **6. fejezet**ben megismertünk. Fontos tudnunk, hogy a rekombináns fehérje szekvenciája pontosan megegyezhet a természetes forrásból izolált fehérjével, tehát a rekombináns DNS-sel ellentétben itt nem különböző eredetű polipeptidlánc szakaszok kapcsolódnak össze.

· *In vitro* **irányított mutagenezis**sel megváltoztatható a gének információtartalma (szekvenciája), azért, hogy egyrészt a módosított gének segítségével megértsük a működésüket, másrészt akár megváltozott tulajdonságú fehérjéket hozzunk létre. Azok a kísérletek, amelyek során (akár alap-, akár alkalmazott kutatási céllel) egy megváltoztatott szekvenciájú génről helyspecifikus változásokat tartalmazó rekombináns fehérjéket állítanak elő, a **fehérjemérnökség** (*protein engineering*) tárgykörébe tartozik.

· A géneket és az mRNS átiratokat is specifikusan tönkre lehet tenni egyes élőlényekben. A géneket a „**génkiütés”-**nek (KO: *knock out*), az mRNS-eket a „**géncsendesítés”-**nek (*gene knock down*) nevezett módszerrel lehet inaktiválni.

· Géneket lehet egyenként bejuttatni bármilyen élőlénybe, s az így előállított **transzgenikus** állatokat, növényeket, mikrobákat (ezek **GMO-k**: genetikailag módosított organizmusok) kutatási célra felhasználni vagy valamilyen alkalmazott tudományág szolgálatába állítani, illetve a gyakorlatban is alkalmazni – gondoljunk csak a vitákra és parlamenti határozatokra a GMO-növények európai és hazai termesztéséről.

· A legambiciózusabb géntechnológiai alkalmazás hibás humán gének, genetikai betegségek kijavítását célozza meg (**génterápia**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.2. Rekombináns DNS előállítása és felszaporítása: molekuláris klónozás

Specifikus **DNS** szekvenciák felszaporítása (**amplifikáció**ja) alapvetően kétféle módon történhet, vagy valamilyen gazdaszervezetben történő **molekuláris klónozással**, vagy az adott DNS szakaszok ***in vitro* amplifikáció**jával, amire az ún. **polimeráz láncreakció** (*polymerase chain reaction*, **PCR**) szolgál. Utóbbi bemutatására a **19.4. fejezet**ben kerül sor.

A **rekombináns DNS-konstrukciók** a klónozni kívánt DNS-szakasz (inszert) és a választott gazdaszervezetben történő felszaporításhoz szükséges vektor (hordozó) DNS összekapcsolásával jönnek létre. Tehát:

rekombináns DNS = vektor DNS + inszert DNS

A molekuláris klónozás nem más, mint egy specifikus inszertet tartalmazó rekombináns DNS felszaporítása megfelelő gazdasejtben (pl. *Escherichia coli*). Ezeknek a sejteknek a klónjaiból (bakteriális kolóniák) izolálják a rekombináns DNS-t, ami a molekuláris klón lesz.

(A „klónozás” szó egymással azonos, közös eredetű kópiák létrehozását jelenti. Eredeti jelentése a biológiában: egyetlen sejt vagy organizmus (aszexuális) elszaporítása olyan módon, hogy genetikailag azonos sejtek illetve élőlények homogén populációi jöjjenek létre.)

A klónozás sémájának és lépéseinek részletezése előtt ismerkedjünk meg a „génsebészet” legfontosabb enzimeivel, a restrikciós endonukleázokkal.

19.2.1. Restrikciós endonukleázok, a rekombináns DNS előállítás legfontosabb eszközei

A tudomány nagy szerencséje, hogy a baktériumokban működik egy idegen DNS-ek ellen kialakult védekező mechanizmus, az ún. **restrikció-modifikáció**, amelyet bakteriofágok gazdasejt-specifitása alapján fedezett fel **Werner Arber** a hatvanas években.

Megfigyelte, hogy az *E. coli* K12 törzsben felszaporított bakteriofágok alacsony hatásfokkal fertőznek egy másik törzset, az *E. coli* B-t, és ugyanez történik megfordítva is. Ha viszont megtörténik a keresztfertőzés, az újonnan termelt fágok már jól szaporodnak az új gazdasejtben, és alacsony hatásfokkal fertőzik az eredeti gazdasejtet, amiben korábban jól szaporodtak. A rendszernek **két eleme** van, egy **restrikciós endonukleáz** és egy annak megfelelő módosító **DNS-metiláz enzim**.

A restrikciós endonukleáz felismer egy specifikus, 4-8 bázisnyi DNS szekvenciát és hasítja a DNS mindkét szálát. A módosító metiláz ugyanebben a szekvenciában metilál egy adenint (az aminocsoporton), vagy egy citozint (az 5. szénen vagy az aminocsoporton). Az így módosított szekvenciát már a restrikciós endonukleáz nem tudja elhasítani. A két enzim együttesen van jelen a sejtben, és jelenlétük törzs-specifikus. A rendszer működésének lényege: a baktérium genomiális DNS-e metilált, tehát hasítással szemben védve van. A replikációkor újonnan szintetizált nem-metilált szál a régi metilálttal párt alkotva szintén védve van.

A fágból származó DNS, feltéve hogy más baktérium törzsből érkezik, nincs metilálva ugyanezeknél a specifikus szekvenciáknál (máshol viszont lehet, hogy igen), ezért nagy valószínűséggel elhasítja a gazdasejt restrikciós endonukleáza. Kis valószínűséggel ugyan, de előfordul, hogy a metiláz találja meg előbb ezeket a szekvenciákat, és még a hasítás előtt módosítja a megfelelő bázisokat. Ezek a fágok az új gazdasejtben védve lesznek, és replikálódhatnak. A keletkező új fágok DNS-e már az új gazdasejtre jellemző metilázzal lesz védve, ezért elveszíti a védelmet a korábbi gazdasejt restrikciós endonukleázával szemben.

Az első restrikciós endonukleázt **Hamilton Smith** és **Daniel Nathans** izolálták az 1960-as évek végén. Mára ~3000 restrikciós enzimet fedeztek fel, melyek több mint 250 különböző szekvenciát ismernek fel.

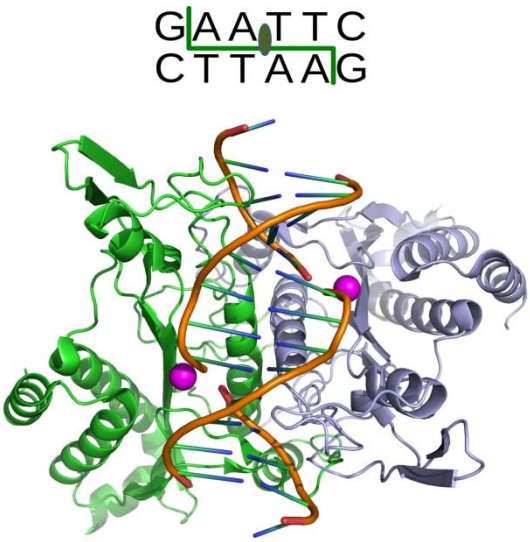
A **restrikciós endonukleázok neve** az enzimet termelő mikroba nemzettségének első betűjéből és a fajnév első két betűjéből áll, amit a törzs vagy szerotípus nevéből eredő betű követ, majd egy római szám, ami azt jelzi, hogy

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

az adott törzsből hányadiknak izolálták az adott enzimet. Például a BamHI enzim a *Bacillus* nemzetség *amyloliquefaciens* faj H törzsének első izolátuma, az EcoRI az *Escherichia* nemzetség *coli* faj R törzsének első, míg az EcoRV az ötödik izolátuma.

A **restrikciós endonukleázok** (röviden **restrikciós enzimek**) dimer fehérjék, a kétszálú DNS molekulák foszfodiészter kötéseit hidrolizáló enzimek. Az enzimek többsége középpontosan szimmetrikus **palindrom szekvenciát ismer fel**. Ha a DNS két szálának elhasítása egymással szemközti foszfodiészter-kötéseknél történik, ún. **tompa végek** (*blunt end*) keletkeznek. Ha azonban egymáshoz képest elcsúsztatva, néhány bázissal távolabb van a felismerőhely a szimmetriatengelytől, úgy **ragadós végek** (*sticky end*) jönnek létre.

A **19.1. ábra** az egyik leggyakrabban használt restrikciós endonukleáz, a ragadós végeket eredményező **EcoRI felismerőhely**ét és a homodimer enzim térszerkezetét mutatja be. A **GAATTC** palindrom szekvenciát felismerő enzim a guanozin és adenozin nukleotidok között hasítja el a cukorfoszfát gerincet (egyszerű felírással: G/AATTC), ezáltal **5‘-túlnyúló ragadós vég**ek jönnek létre.



19.1. ábra: Az EcoRI restrikciós endonukleáz felismerőhelye és térszerkezete. A dimer enzim szimmetrikusan kötődik a palindrom felismerőhelyhez, ezáltal mindkét szálon ugyanazt a kötést tudja elhasítani. Ez a szimmetria jól látszik az aktív hely működéséhez szükséges magnéziumionok (lila) pozícióján (PDB: 1ERI).

A **19.1. táblázat**ban néhány ragadós illetve tompavéget kialakító enzimet és felismerőhelyüket tüntettük fel.

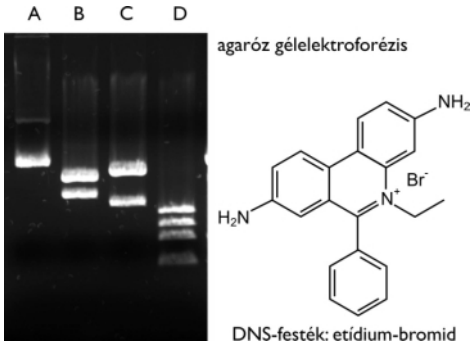
19.1. táblázat: Néhány restrikciós endonukleáz és felismerőhelyük

Enzim	Vég	Felismerőhely
EcoRI	ragadós	5’ G/AATTC 3’ 3’ CTTAA/G 5’
BamHI	ragadós	5’ G/GATCC 3’ 3’ CCTAG/G 5’
DraI	tompa	5’ TTT/AAA 3’ 3’ AAA/TTT 5’
HaeIII	tompa	5’ GG/CC 3’ 3’ CC/GG 5’
HhaI	ragadós	5’ GCG/C 3’ 3’ C/GCG 5’
XhoI	ragadós	5’ C/TCGAC 3’ 3’ GAGC/TC 5’

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A restrikciós emésztéssel előállított DNS fragmentumokat gélelektroforézissel lehet szeparálni és a méretüket is meghatározni. Mivel még a DNS fragmentumok is jóval nagyobbak a fehérjemolekuláknál (gondoljunk bele, egy mindössze 1 kbp-ból álló relatíve kicsi DNS darab molekulatömege 1000 x 350 x 2 (350 Da a nukleotidok átlagos mérete), azaz 700 kDa, ami nagyobb, mint például a nagy fehérjének számító izom miozin molekulatömege), ezért a poliakrilamid helyett nagyobb „lyukméretű" térhálós polimert kellett találni. Ez a természetes eredetű agaróz (lásd **10.3. fejezet**), s ennek megfelelően a DNS fragmentumokat **agaróz gélelektroforézis**sel szeparálják. A kétszálú lineáris DNS fragmentumok vándorlási sebessége fordítottan arányos a bázispárok (pontosabban a nukleotidok) számának logaritmusával. A DNS-t a gélben egy fluoreszkáló festék, az **etídium-bromid** segítségével lehet láthatóvá tenni (lásd **19.2. ábra**).

Ismert méretű DNS-ek segítségével ismeretlen DNS darabok mérete meghatározható. Különböző restrikciós enzimek külön-külön illetve együttes használatával ezek hasítási pozícióinak egymáshoz képesti elrendeződése felderíthető. Ez az úgynevezett **restrikciós térképezés**. Egy ilyen restrikciós analízis eredményét mutatja a **19.2. ábra.**

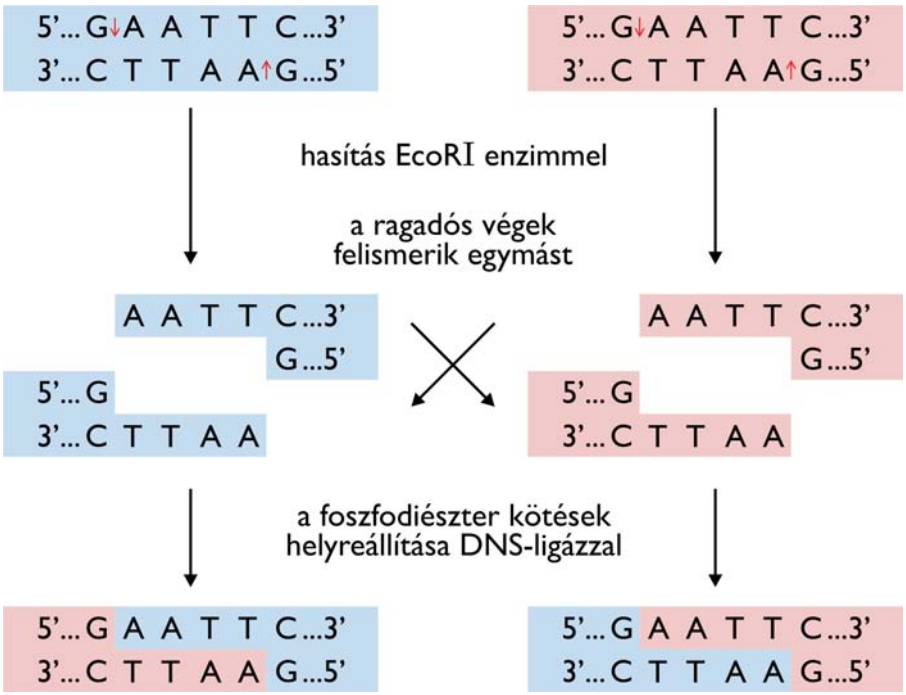


19.2. ábra: DNS fragmentumok agaróz elektroforézissel elválasztva és a DNS festék etídium-bromid szerkezete

19.2.2. Rekombináns DNS *in vitro* előállítása

A restrikciós enzimekkel létrehozott ragadós végek Watson-Crick bázispárosodással könnyen felismerik egymást. Különböző eredetű DNS-eket azonos enzimmel hasítva olyan DNS darabok jönnek létre, melyek könnyen egymáshoz illeszthetők. A **DNS-ligáz** enzim (ATP-t vagy NAD-ot energiaforrásként felhasználva) képes ezeket a darabokat foszfodiészter kötések révén összekapcsolni. A DNS-ligáz tehát ***in vitro* rekombináció**val **hibrid** (vagy más néven **kiméra**) **molekulá**kat, azaz **rekombináns DNS**-t hozhat létre**,** mint azt a **19.3. ábra** szemlélteti. (Természetesen az eredetileg szétvágott DNS fragmentumok is felismerhetik egymás – ebben az esetben az eredeti DNS-t is kapjuk vissza a ligálás végén.)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



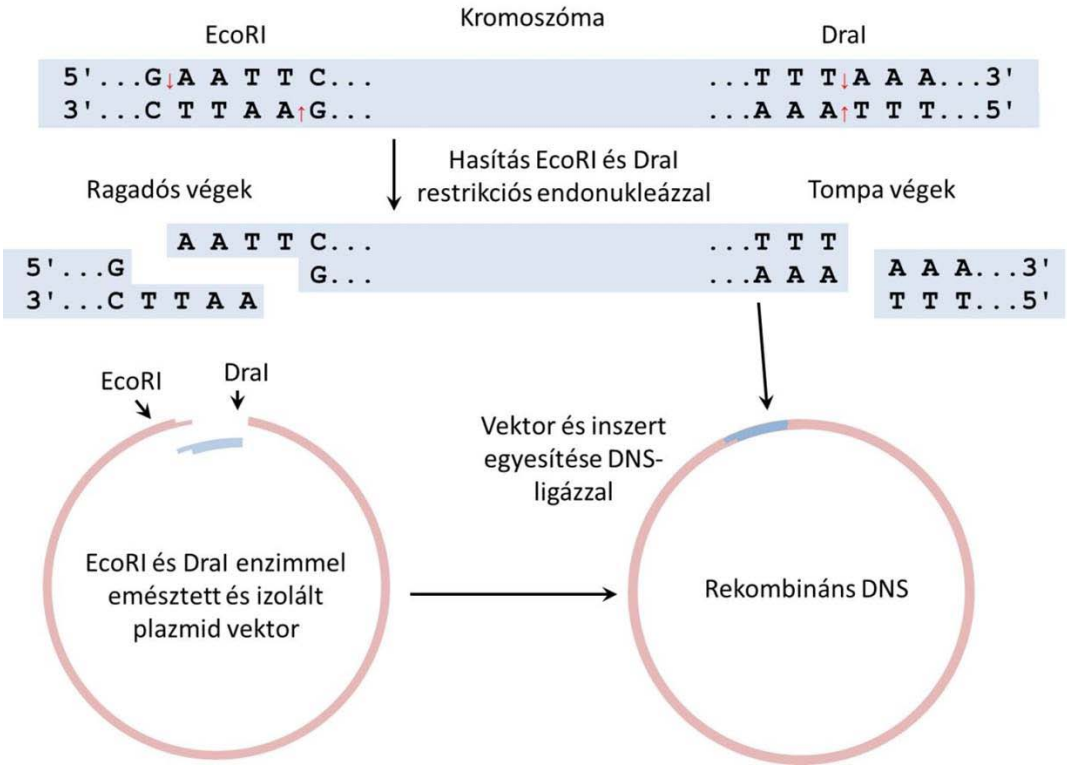
19.3. ábra: ***In vitro*** **rekombináció.** Két különböző eredetű DNS hasítása EcoRI restrikciós endonukleázzal. A létrejövő DNS fragmentumok egymást felismerő ragadós végekkel rendelkeznek. Összekapcsolásuk DNS-ligáz segítségével történik. Amennyiben a két különböző eredetű DNS-vég kapcsolódik össze, *in vitro* rekombináció történik.

A molekuláris klónozás *in vitro* szakaszában jön létre a rekombináns DNS. A **hordozó DNS leggyakrabban** egy **cirkuláris plazmid vektor** (a klónozó vektorokat a **19.2.4. alfejezet**ben mutatjuk be), míg a vizsgálandó DNS lehet egy eukarióta kromoszóma DNS egy fragmentuma. Példaként egy olyan klónozási stratégiát mutatunk be, ahol az inszertet a kromoszómális DNS-ből **két különböző restrikciós enzim**mel hasították ki. Ha a vektort és a klónozandó DNS-t ugyanazon két restrikciós enzimmel linearizálják (a cirkuláris DNS molekulából lineáris DNS fragmentumok keletkeznek), és a tisztított hasítási termékeket összekeverik, a DNS-ligáz a kémcsőben lezajló reakció során gyakorlatilag csak ezt a kétféle eredetű DNS-t képes egymáshoz kapcsolni, ezáltal **rekombináns DNS** jön létre, mint azt a **19.4. ábra** mutatja.

A folyamat molekuláris grafikai ábrázolását, kiemelve egy restrikciós enzim, az EcoRI és a DNS-ligáz működését, a **11. animáció** mutatja be.

A kromoszómális (genomiális) DNS-t hasítva egy-egy enzimre nézve megbecsülhető a keletkező DNS fragmentumok várható átlagos mérete. Ez az enzim felismerőhelyének hosszától függ. A fragmentumok átlagos mérete 4^n, ahol „n” a felismerőhely bázispár-száma. Egy hatos felismerőhelynél $4^6 = 4096$ az átlagos fragmentumok méret.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.4. ábra: Rekombináns DNS létrehozása irányított klónozással. A plazmid vektort és a kromoszómális DNS-t is ugyanazzal a kétféle restrikciós enzimmel hasítjuk. Az egyik végén "ragadós" (EcoRI), a másik végén "tompa" végű (DraI) DNS molekulákat a DNS-ligáz kovalens összekapcsolja, ezzel létrejön a rekombináns DNS.

19.2.3. A molekuláris klónozás lépései

A DNS klónozás *in vivo* szakasza a rekombináns DNS gazdasejtbe juttatása és felszaporítása. A DNS sejtekbe juttatására többek között a **bakteriális transzformáció** jelenségét lehet kihasználni (lásd **12.2.1. fejezet)**.

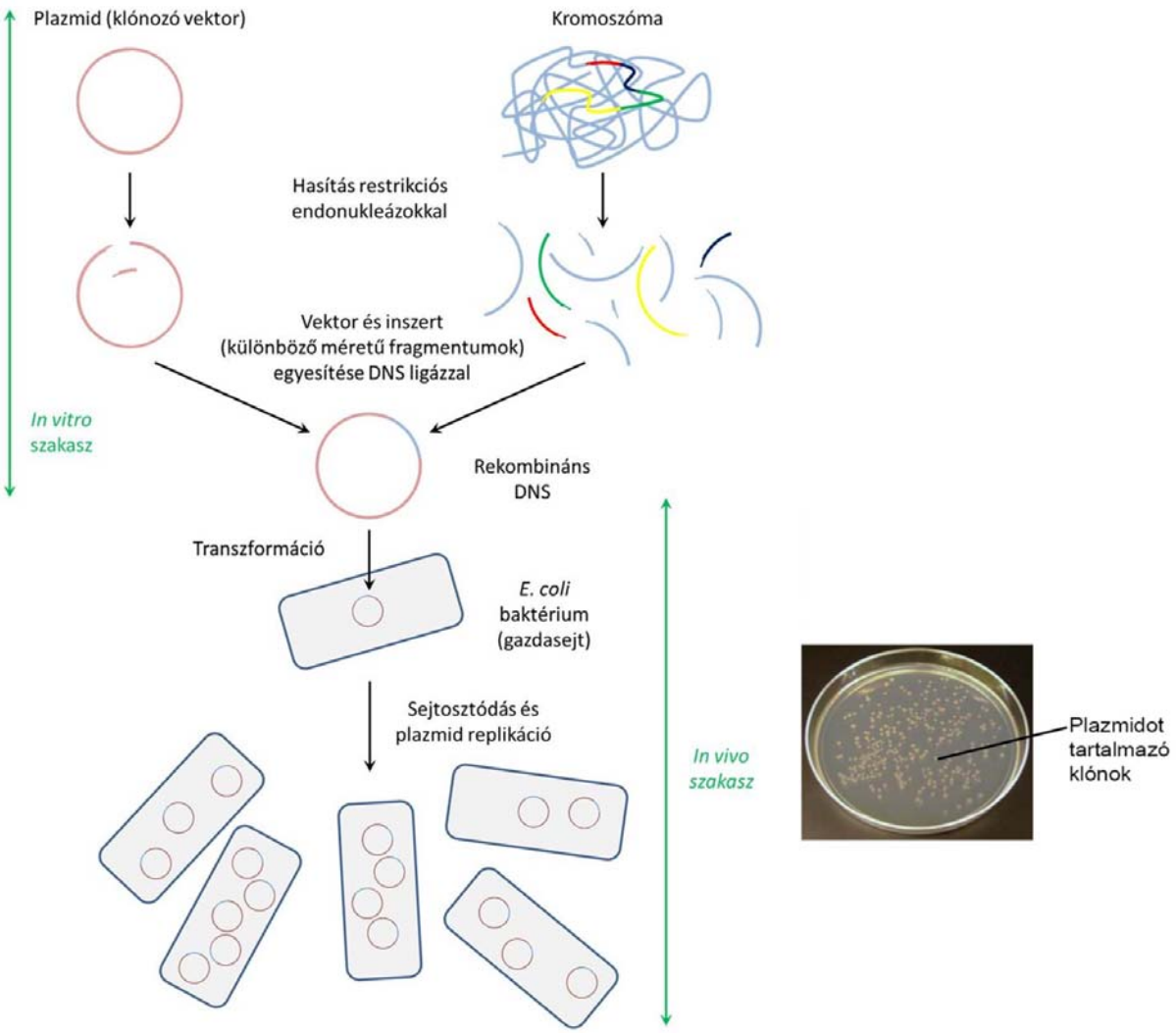
A transzformálás során a sejtek plazmamembránját a DNS számára átjárhatóvá teszik kémiai módszerekkel (ún. **kompetens sejtek**et állítunk elő), és a sejtet együtt inkubálják a plazmiddal. A sejtek egy kis hányada ilyenkor plazmidot vesz fel. Egy nagyobb hatékonyságú eljárás az **elektroporálás**, amikor a DNS-t rövid idejű, nagyfeszültségű elektromos impulzussal juttatják a sejtbe (a nagy térerő hatására, csak az impulzus idejére pórusok nyílnak a sejtmembránon, amiken átdiffundál a DNS).

Egy baktérium sejt általában csak egyetlen rekombináns DNS-t vesz fel. Mivel a transzformáció hatásfoka alacsony, szükség van valamilyen **szelekció**s eljárása. A vektor tartalmaz egy antibiotikum elleni védelmet biztosító gént (**antibiotikum rezisztencia gén**), amely megfelelően választott körülmények között szelektív túlélést tesz lehetővé a rekombináns DNS-t hordozó sejtek számára.

A transzformálás után a sejteket olyan, antibiotikumot tartalmazó, **szelektáló táptalaj**ra helyezik, ahol csak a rekombináns DNS-t (és így az adott antibiotikumra rezisztenciát biztosító gént) tartalmazó sejtek képesek szaporodni. Minden sejtből egy **kolónia** keletkezik (amely genetikailag azonos sejtekből, **klón**okból áll). Egy-egy kolónián belül azonos rekombináns DNS-t tartalmazó sejtek vannak. A folyamat sémáját a **19.5. ábra** mutatja be. Az ábra jobb oldalán baktériumkolóniákat (rekombináns DNS klónokat) látunk egy Petri-csészében lévő agar lemezen.

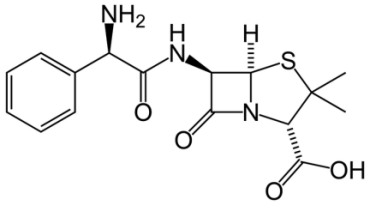
A bakteriális klónokat folyadékkultúrában tovább lehet szaporítani és a sejtekből a rekombináns DNS-t, azaz a molekuláris klónokat egyszerű eljárással izolálni lehet. Néhány milliliter, baktériumokkal telített tápfolyadékból akár több 10 mg rekombináns DNS is előállítható, amely elegendő mennyiség a DNS-szekvenáláshoz és további vizsgálatokhoz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.5. ábra: A molekuláris klónozás elvi vázlata. A rekombináns DNS-t transzformációval juttatjuk az *E. coli* gazdasejtbe, ahol az a baktériumsejt kromoszómájától (amit nem ábrázoltunk) függetlenül replikálódik és több kópiában lesz jelen az utódsejtekben, ezzel is hozzájárulva a DNS klón felszaporításához (amplifikáció). A különböző inszerteket tartalmazó baktériumok egyedi klónok. A kromoszóma egészét darabokban tartalmazó *E.coli* klónok összessége a genomiális könyvtár (ld. 19.2.5.1).

A szelekcióhoz leggyakrabban használt **antibiotikum** a penicillin származék **ampicillin**, egy béta-laktám vegyület (lásd **19.6. ábra**), amely kötődik és ún. öngyilkos szubsztrátként gátolja a sejtfal peptidoglikán szintézisben szerepet játszó transzpeptidáz enzimet, és ezáltal gátolja a baktérium növekedését (lásd **10.4.1. fejezet**). Az ampicillin elleni **rezisztenciá**t a **béta-laktamáz enzim** biztosítja, amely képes elhasítani a béta-laktámgyűrűt, ezáltal hatástalanítja a molekulát.



19.6. ábra: Az ampicillin szerkezeti képlete

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Alább felsorolunk néhány további, a transzformáció során szelekcióra használt antibiotikumot és rezisztencia génjeiket:

A kloramfenikol bakteriosztatikus képességének molekuláris háttere, hogy a riboszóma komplex 50S alegységéhez köt, így gátolja a fehérjeszintézist. A **kloramfenikol rezisztencia gén** egy **kloramfenikol-acetiltranszferáz** enzimet kódol, amely úgy képes inaktiválni az antibiotikumot, hogy egy acetilcsoportot helyez rá. Egy másik fehérjeszintézis gátló antibiotikum a **tetraciklin**, egy poliketid típusú természetes antibiotikum. Az aminoacil-tRNS mRNS-riboszóma komplexhez való kötődését gátolja a 30S alegységhez kötődve. A **tetraciklin rezisztenciá**t egy 40 kDa-os **membránfehérje biztosítja,** amely aktív módon **kipumpálja az antibiotikumot** a sejtből. A **kanamicin** és a vele rokon **neomicin** szintén a prokarióta riboszóma 30S alegységéhez köt, és ott transzlációs hibát indukál, amellyel gátolja a fehérjék átíródását. Mindkét antibiotikum aminoglikozid típusú szer, **inaktivál**ásukat egy **acetil-transzferáz enzim** végzi.

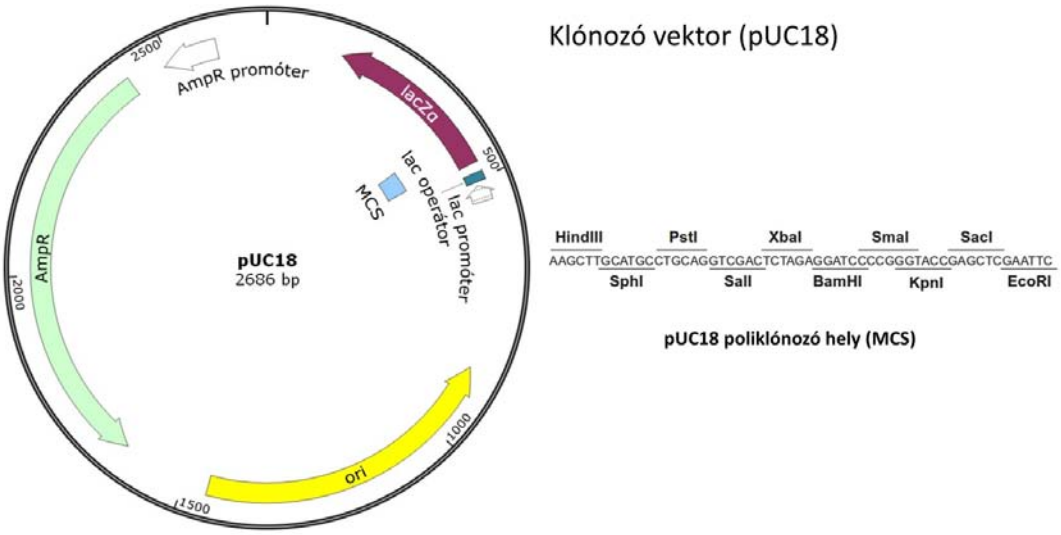
19.2.4. A vektor DNS-ek típusai

A **vektorok** az egyes gazda szervezetek DNS információjának módosításához használt általános géntechnológiai eszközök, **a klónozandó DNS** (az inszert) **hordozómolekulái**.

A vektorokat felhasználásuk alapján két nagy csoportra oszthatjuk. Az első csoportba a **klónozó vektorok** tartoznak, melyeket specifikus DNS információ tárolására, sokszorosítására használhatunk fel. Milyen tulajdonságokkal kell rendelkezni egy DNS molekulának, hogy vektor céljára használhassuk?

A vektor DNS-nek a gazdaszervezetben önálló replikációra kell képesnek lennie (**replikon**). Lehetőleg legyen kis mérete (2-10 kbp), s több **kópiában** replikálódjon. Minden vektornak e**gyedi restrikciós helyek**kel, ún. klónozó helyekkel kell rendelkeznie. Legtöbbször ezek **multiklónozó (poliklónozó) hely**ek (**MCS**: *Multiple Cloning Site*), amelyek a vektorban csak egyszer előforduló, egymás mellett elhelyezkedő különböző restrikciós endonukleáz felismerő helyek. Végül a vektornak kell tartalmazni legalább egy **szelekciós marker gént,** amely célra általánosan **antibiotikum rezisztencia géneket** használnak.

Egy már géntechnológiai úton létrehozott klónozó vektor (a 2,7 kbp méretű plazmid, a pUC18) egyszerűsített **vektor térkép**ét a **19.7. ábra** mutatja be.



19.7. ábra: Egy klónozó vektor térképe és multiklónozó helye. Mivel a plazmid vektorok cirkuláris DNS-ek, a vektor térkép egy kör, amin feltüntetik a DNS-ben található géneket, szabályozó elemeket (ori: replikációs origó, promóter) valamint a klónozóhelyeket. Amp^R: ampicillin rezisztencia gén; MCS: multiklónozó hely.

Az ***ori*** az önálló replikációt biztosító **replikációs origó**t jelöli. Ez nem egyezik meg az *E. coli* kromoszóma replikációs origójával (lásd **13.4. fejezet**), aminek a fontos következménye az lesz, hogy a vektor DNS a kromoszóma DNS-től függetlenül replikálódik, s több példányban is jelen lehet a baktériumsejtben. Az *ampR* az ampicillin

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

antibiotikum elleni rezisztencia gént, a szelekciós markergént jelöli. Az MCS-t az *E. coli* lac-operon lacZ génjének 5'-régiójába illesztették be. Ennek a jelentőségét később magyarázzuk el.

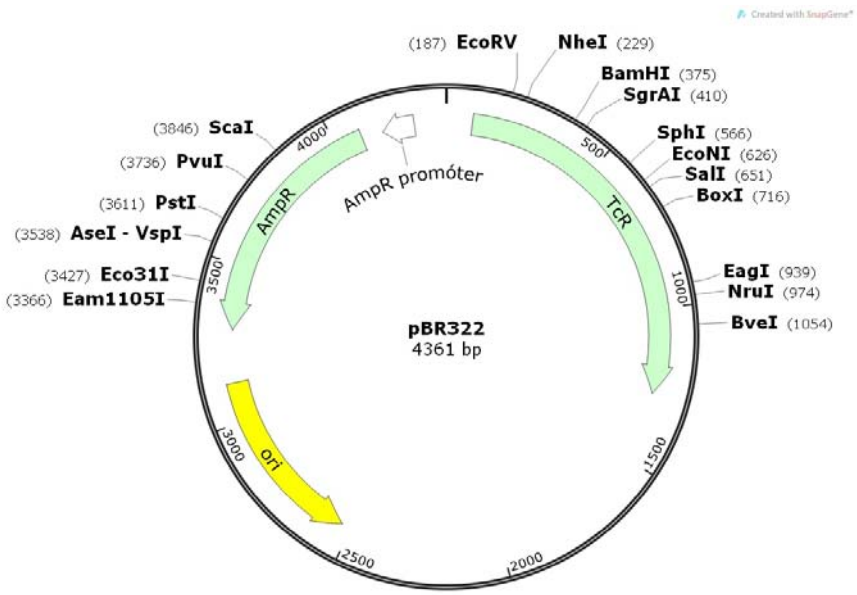
A vektorok másik nagy csoportjába az **expressziós vektorok** tartoznak. Ezek a DNS konstrukciók olyan szabályzó elemeket tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik, hogy a bennük tárolt DNS információ (az inszert) képes legyen fehérjeként kifejeződni, expresszálódni. Az expressziós vektoroknak tartalmazniuk kell a **klónozó hely előtt egy promóter régió**t, ahonnan a transzkripció elindulhat. A promóter milyensége határozza meg az expresszált fehérje mennyiségét, de az is kulcsfontosságú a gyakorlatban, hogy a transzkripció szabályozható legyen, - ennek segítségével a kívánalmaknak megfelelően lehet elindítani a rekombináns fehérje termelését. Az egyik legismertebb és leginkább alkalmazott **szabályzó mechanizmus az *E. coli* lac operon** elemeire épül (lásd **18.2.1. fejezet**).

A vektor DNS eredete alapján megkülönböztetünk **plazmid** és **bakteriofág** (bakteriális vírus) **alapú vektorok**at, az előbbi kettő kombinálásával létrehozott típusokat (pl. **fágmid**) és **mesterséges kromoszómák**at. Az expressziós vektorokra a **19.7. fejezet**ben térünk vissza.

19.2.4.1. Plazmid vektorok

A **plazmid**ok számos baktériumfajban (és néhány egyszerű eukariótában, mint az élesztők) megtalálható, **extrakromoszómális**, kétszálú, gyűrűbe záródó (**cirkuláris**) **DNS**-molekulák. Eredeti formájukban méretük 1 és 200 kbp között van. Gyakran tartalmaznak olyan géneket, amelyek a gazdasejt számára valamilyen szelekciós előnyt biztosító enzimeket kódolnak. Ilyen előny lehet antibiotikumok elleni rezisztencia; más esetekben éppen antibiotikumok, esetleg különböző toxinok szintézise. Egyes restrikciós-modifikációs rendszerek enzimei szintén plazmidon kódoltak.

Az első klónozó vektor a **pBR322** nevű plazmid még nem tartalmazott igazi poliklónozó helyet. Tartalmazott azonban két különböző antibiotikum elleni rezisztenciagént (AmpR: ampicillin rezisztencia és TcR: tetraciklin rezisztencia), és számos egyedi restrikciós endonukleáz hasítóhelyet tartalmaz, elsősorban a rezisztenciagéneken belül. Ha az idegen DNS-t ilyen hely belsejébe építjük be, a rezisztencia megszűnik. Ezt a tényt lehetett szelekcióra kihasználni. A vektor ma már ritkán használják, de tudománytörténeti jelentősége miatt a térképét a **19.8. ábrán** bemutatjuk.



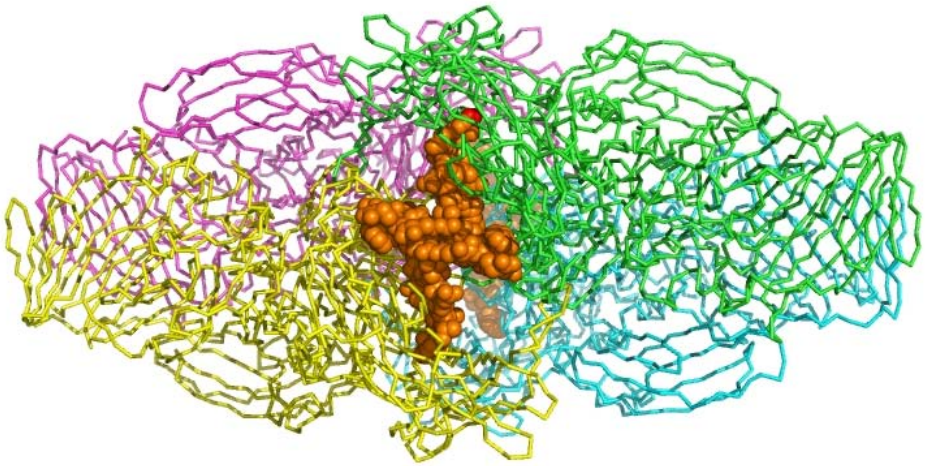
19.8. ábra: A pBR322 vektor térképe. A vektor méretén túl az egyedi restrikciós felismerőhelyeket tüntettük fel.

A plazmid vektorok a legáltalánosabb klónozó vektorok. A **ma használatos típusok**nál (mint a **19.7. ábra** bemutatott **pUC család** tagjai) mindig **poliklónozó helyet** használnak, amely akár tucatnyi egyedi restrikciós enzim felismerőhelyét tartalmazza. Ezen kívül sok vektort alkalmassá tettek egy **másodlagos szelekció**ra, ami arra alkalmas, hogy a transzformációval a sejtekbe került üres plazmid vektort tartalmazó sejtkolóniáktól meg tudjuk

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

különböztetni a rekombináns DNS-konstrukciót felvett sejtklónokat. Ez az ún. **kék-fehér szelekció**. A látványos módszert röviden bemutatjuk.

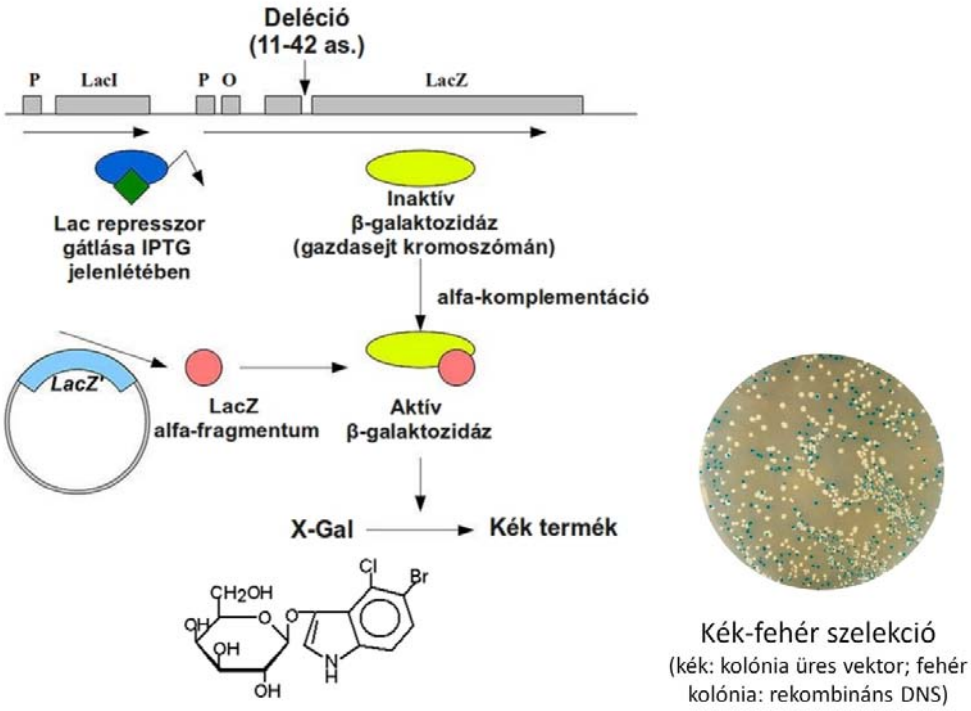
A szelekció molekuláris alapja a **β-galaktozidáz enzim** működésében rejlik és az ún. **α-komplementáció**n alapszik. A β-galaktozidáz homotetramer szerkezetű fehérje (lásd **19.9. ábra**), és csak ebben a formában aktív. Ha a polipeptidláncokról eltávolítunk egy rövid N-terminális peptidet, (α-peptid), melyet az ábrán narancs színnel jelöltünk, akkor a fennmaradó nagyméretű ω-fragmentumok nem tudják felvenni a homotetramer szerkezet, és az enzim inaktív lesz. Ha azonban az α-peptidet hozzáadjuk a ω-fragmentumhoz, vagyis azt mintegy kiegészítjük az α-fragmentummal, (amit genetikai kifejezéssel α-komplementációnak hívunk), spontán kialakul az aktív enzimszerkezet.



19.9. ábra: A β-galaktozidáz enzim térszerkezete. A homotetramer enzim négy láncát más-más színnel jelöltük. Az α-komplementációért felelős α-peptidszakaszt narancsszínű golyókkal emeltük ki (PDB: 3MUY).

A szelekció során az enzimnek ezt a spontán, fragmentumaiból történő összeszerelődési képességét használjuk ki oly módon, hogy az α-peptidet (α-fragmentumot) a plazmid kódolja, míg az ω-fragmentumot a gazdasejt genomja. Mivel a cél az inszert beépülésének a vizsgálata, a vektorban a **multiklónozó hely (MCS) az α-fragmentumot kódoló szakaszba van beépítve.** Vagyis **sikeres klónozás** esetén az α-fragmentumot kódoló szakasz „elromlik”, és az **α-fragmentum nem fejeződik ki**. Ebben az esetben tehát az IPTG-vel való indukció eredményeként az inszert által kódolt fehérje fog expresszálódni, és a **telepek fehérek** lesznek. Az **üres vektor**t tartalmazó baktériumok IPTG indukció hatására az enzim mindkét fragmentumát szintetizálják, ami azt eredményezi, hogy egy kromogén szubsztrát, az 5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktozid (**X-gal**) jelenlétében **kék színű baktérium telepek** keletkeznek. (lásd **19.10. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.10. ábra: A „kék-fehér" szelekció molekuláris háttere. Az ábra felső része egy olyan lac-operon vázlatos szerkezetét mutatja, amiből a lacZ génben deléció van, a β-galaktozidáz a-peptidje (a 11.-től a 42. aminosavig) nem íródik át. A β-galaktozidáz ω-fragmentuma (sárga) IPTG jelenlétében a gazdasejtben termelődik, de inaktív marad, míg a vektorban kódolt α-peptid (piros) ki nem egészíti, és aktívvá nem teszi (a két fragmentum másodlagos kötésekkel kapcsolódik egymáshoz, s így is kialakul az aktivitás szükséges konformáció). Ez az α-komplementáció jelensége. Az aktív enzim az X-gal nevű szubsztrátot bontja, kék csapadék keletkezik, ami kék színűvé teszi a telepeket is. Ha az inszerció sikeres, akkor az α-fragmentum nem termelődik (a kódoló régióját valószínűleg tönkreteszi az inszert), így a kolónia fehér színű marad.

A plazmid vektorok **nem alkalmasak 10 kbp-nál nagyobb inszertek stabil fenntartására**. A beépült DNS a plazmidból gyakran kivágódik, és az így kisebbé váló plazmid gyorsabban szaporodik. Az eukarióta genomok óriásiak, az emberi pl. kb. 3,2 milliárd bázispárnyi információt hordoz (mivel 23 különböző kromoszómánk van, egy-egy kromoszóma DNS mérete 100 millió bp körül van). Minél nagyobb DNS darabokat sikerül egy-egy vektorban fenntartani, annál kevesebb klón képes reprezentálni a teljes ún. **genomiális könyvtár**at (a könyvtárakat a **19.2.5. fejezet**ben mutatjuk be). Egy 10 kilobázis / klón kapacitású plazmid könyvtár esetén kb. 1,5 millió klón reprezentálná a teljes emberi genomot! (Ha egy Petri-csészén 1000 klón fér el, akkor 1500 Petri csésze kellene!)

A fenti ok és a plazmid alapú vektorok alacsony transzformálási hatékonysága vezettek arra, hogy a bakteriofág genomjából kiindulva újabb típusú vektorokat állítottak elő.

19.2.4.2. Bakteriofág alapú vektorok

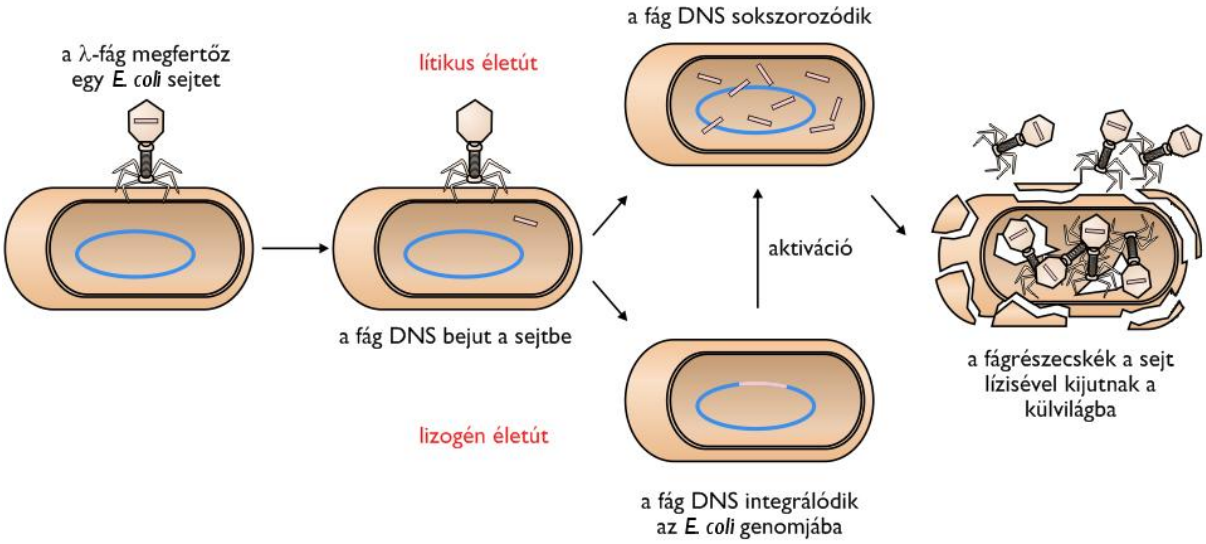
A **bakteriofág alapú vektorok** előnye a plazmidokkal szemben, hogy egyrészt fertőző tulajdonságuk révén sokkal **hatékonyabban** képesek az idegen **DNS-ta gazdasejtbe bejuttatni**, másrészt **nagyobb méretű inszertet** tudnak befogadni, mint a plazmid alapú vektorok.

A tipikus bakteriofág egy külső, fehérjéből álló kapszidból (a virion burka), és a benne lévő örökítőanyagból áll. A genomjukat alkothatja RNS és DNS is, egy- és kétszálú formában egyaránt. A géntechnológiában a vektor előállítása céljából elsősorban az ikozaéderes **λ-fág**ot és a fonalas szerkezetű **M13 fágcsaládot** vonták be.

A lambda (λ) fág tipikus fág struktúrát mutat, rendelkezik fej, más néven kapszid régióval, amelyben lineáris **kettős szálú DNS örökítőanyag** található, valamint farok régióval, amin keresztül a DNS bejuthat a gazdasejtbe. A vírus genomja ~48500 bp-ból áll és közel 60 gént kódol, amelyek biztosítják a fág szaporodásához és becsomagolásához

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szükséges enzimeket, azok szabályzó fehérjéit, valamint burokfehérjéket. A vírus lineáris genomja képes cirkularizálódni a gazdasejten belül, ezt a DNS szálak végén található két **ragadó *cos* régió** biztosítja. Az λ-fág kétféle életciklust mutat. **A lítikus életciklus** során a vírus örökítőanyaga miután bejutott a gazdasejtbe, ott többször replikálódik, majd a fej és farok struktúrát képző fehérjék expresszióját követően új vírusrészecskék képződnek, amik a gazdasejt elpusztulása után további sejteket fertőznek. Ezzel ellentétben a **lizogén életciklus**ba akkor lép a fág, amikor az örökítőanyaga beépül az *E. coli* kromoszómájába, azzal együtt replikálódik. A sejt osztódásával tovább öröklődő, látens fágot **profág**nak nevezzük (lásd **19.11. ábra**).

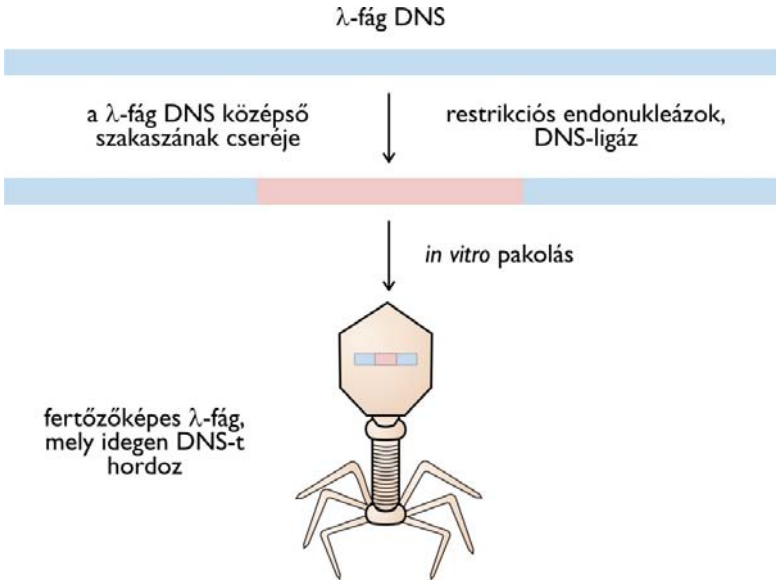


19.11. ábra: A λ-fág két életútja. A lizogén életúthoz szükséges gének nélkül lítikus módon tud szaporodni a vírus, ezért ezek a gének helyettesíthetők idegen DNS-sel.

A **λ-fág**-alapú vektorok közül leginkább az ún. **helyettesítővektorok**at használják. A lineáris DNS-en belül található egy "kitöltő" (*stuffer*) szekvencia (amely régió a vírus lítikus életciklusához nem esszenciális géneket tartalmaz), amit elsőként ki kell vágni a vektorból és annak helyére tudják beépíteni az idegen génszakaszt. A λ-fág helyettesítő vektorokban az **inszert maximális mérete 23 kbp**, és főleg **genomiális könyvtárak** előállítására használják. Egy helyettesítő λ-fág vektor konstrukciót mutat be a **19.12. ábra.**

A lambda-fág DNS két végén olyan szakaszok vannak, melyeket a fágfehérjék felismernek, és képesek a DNS-t fágrészecskébe pakolni. Ez sejtmentes közegben *in vitro* is végbemegy. Az „***in vitro* pakolás**” során minden olyan DNS fág virionba kerül, melynek két végén jelen van a szükséges lambda fág szekvencia (a *cos* régió). Az *in vitro* létrehozott fág részecskék sokkal nagyobb hatékonysággal viszik be a DNS-t a kóli sejtbe, mint a transzformálás a plazmidokat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.12. ábra: Egy ún. helyettesítő λ-fág vektor konstrukció elkészítésének vázlata

A fág vektorok esetében a klónokat **tarfoltok**, más néven **plakkok** (*plaque*) reprezentálják. Amikor a kólisejteket fágok fertőzik, minden egyes sejtbe legfeljebb egy fág virion kerül be. Megfelelően alacsony fág/baktériumsejt arány esetén a sejtek többsége nem fertőződik. Ilyen körülmények között a sejteket nagy koncentrációban szilárd táptalajra kenve kolóniák helyett az egyes kolóniákból összefüggő **sejtpázsit**ot kapunk. Azokból a sejtekből, melyek a kikenéskor fággal fertőzöttek voltak, a fágok kiszabadulnak, és a környező sejteket pusztítani fogják. Ezért a fággal fertőzött sejtek helyén illetve körülöttük tarfoltok keletkeznek. Egy-egy ilyen tarfolt más-más klónból származó fágok tömegét tartalmazza. A tarfoltokból a fágok izolálhatók, és ezekkel újabb kóli sejtek fertőzhetők. Ezáltal egyedi klónoknak megfelelő l-fág DNS izolálható, és ezzel együtt természetesen a beépült idegen DNS klón is izolálható.

A DNS-szekvenáláshoz és egyéb *in vitro* DNS szintézisen alapuló technikákhoz sokszor egyszálú DNS templátra van szükség. Az **M13 fágon alapuló** klónozó **vektorok** nagy előnye az, hogy segítségükkel egyszerű eljárással **egyszálú** formában izolálható a **rekombináns DNS**.

Az M13 a fonalas fágok közé tartozik, genomja az *E. coli* sejtben kétszálú DNS formájában replikálódik, és a sejtből ezt a formát kinyerve az plazmidként kezelhető, tehát restrikciós endonukleázokkal és ligázzal abba idegen DNS építhető. A sejtből kiszabaduló fágokban azonban a genom (és ezzel együtt a beépített idegen DNS) már egyszálú DNS formában van jelen, ami templátként szolgál, tehát ehhez szintetikus oligonukleotid hibridizálható, és *in vitro* körülmények között új DNS szál szintetizálható. Az M13 alapú vektorok további előnye, hogy beépíthető **inszerteknek** gyakorlatilag **nincs felső méréthatára**.

Manapság olyan géntechnológiai módszerekhez, ahol egyszálú templátra van szükség, elsősorban ún. **fágmid vektorok**at használnak. A fágmidok a plazmidok és a fágok tulajdonságait ötvözik és a következő alfejezetben mutatjuk be őket.

19.2.4.3. Fágmidok

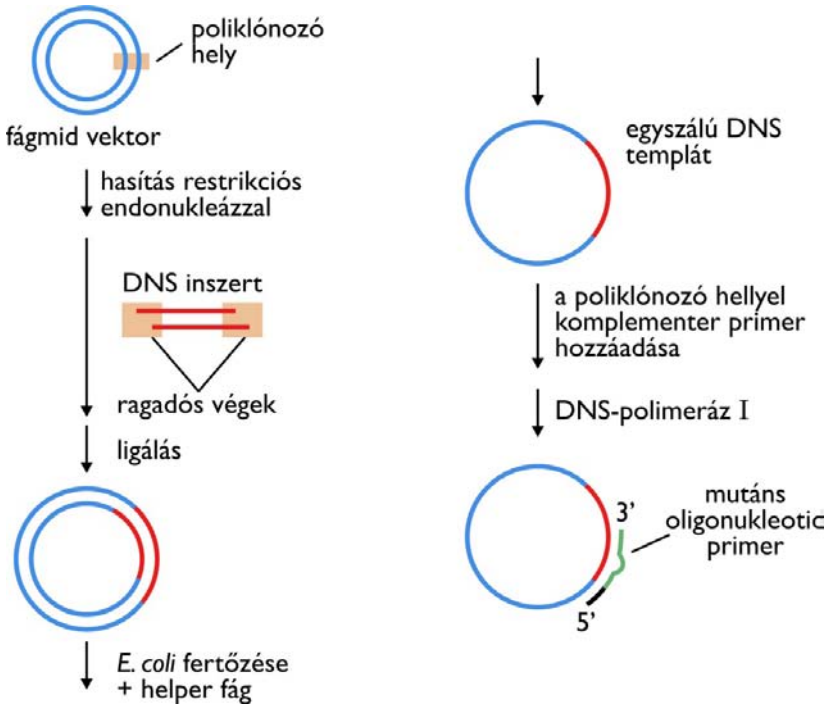
A fonalas fágok szaporodási mechanizmusára épülnek a „kettős természetű” **fágmid vektorok**. A fágmid név a fonalas (bakterio)**fág és plazmid kombinációjá**ra utalt. Ebből adódóan jellemzői az előbbi kettő tulajdonságainak keveréke.

Egyrészről tartalmaznak egy **plazmid replikációs origó**t, másrészről megtalálható bennük az M13 rokon f1 fágból származó **f1 origó** is. Ez utóbbi biztosítja (az M13 fág origóval megegyező módon) azt, hogy a fágmidról **egyszálú DNS** is átíródjon, majd az virionba pakolódva, a későbbi gazda organizmusba átvihető legyen. A fágrészecskébe csomagoláshoz szükség van ún. **segítő (*helper*) fág**ra is, amely az egyszálú DNS replikációját biztosítja és a virionba való pakoláshoz szükséges géneket kódolja. A fágmidok, a fonalas fágokhoz hasonlóan nem lítikusak, tehát

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

kiszabadulásukkor nem ölik meg (nem lizál) a gazdasejt, hanem a sejtet folyamatosan új vírusrészecskék kiválasztására készteti.

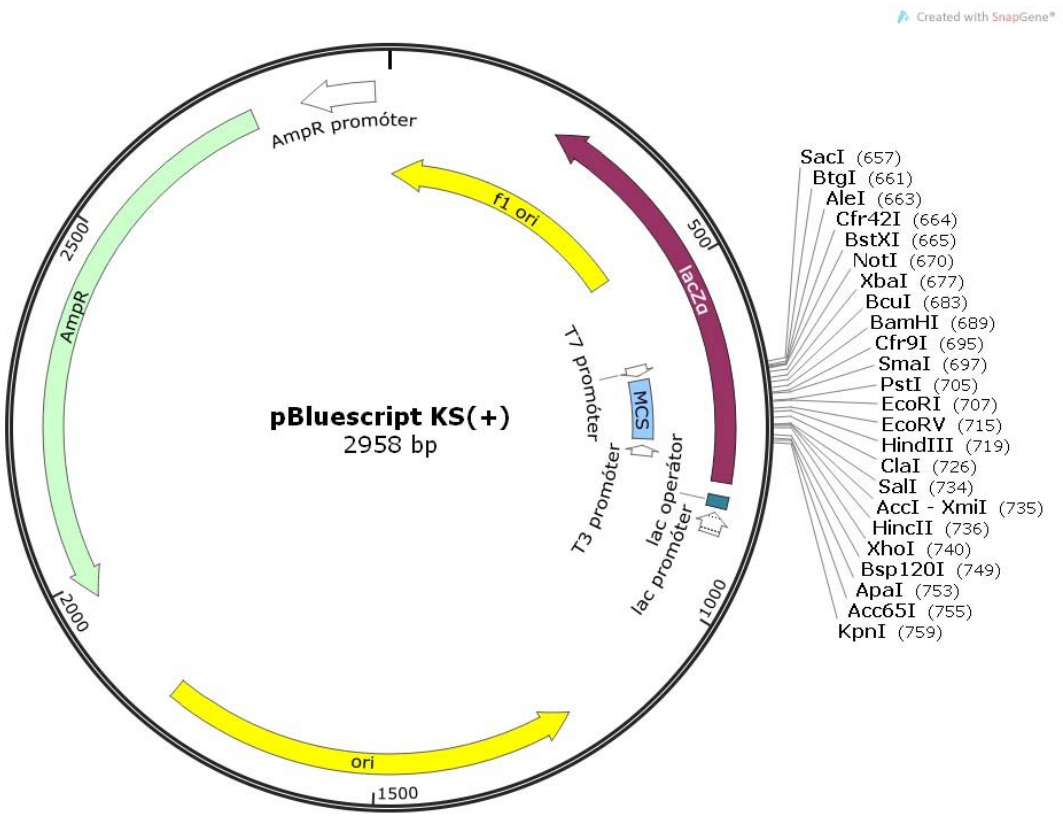
A fágmidokat a gyakorlatban általános klónozó vektorként használják, illetve olyan célra, ahol egyszálú templátra van szükség: **szekvenálásra** (lásd **19.5**) és **irányított mutagenezishez** (lásd **19.6**) (ma már inkább csak az utóbbi célra). A **19.13. ábra** egy fágmidba történő klónozás sémáját és az egyszálú templát DNS-t, amivel a bemutatott kísérletben helyspecifikus mutagenezist végeznek (lásd **19.6.**).



19.13. ábra: Klónozási séma fágmid vektorral és egyszálú templát DNS előállítása helyspecifikus mutagenezishez (ld. 19.6. fejezet)

Az egyik legismertebb klónozó fágmid a **pBlueScript vektor** (lásd **19.14. ábra**), amely a pUC vektorcsaládra (lásd **19.7. ábra**) nagyon hasonlít, de tartalmaz egy **f1 replikációs origót is**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



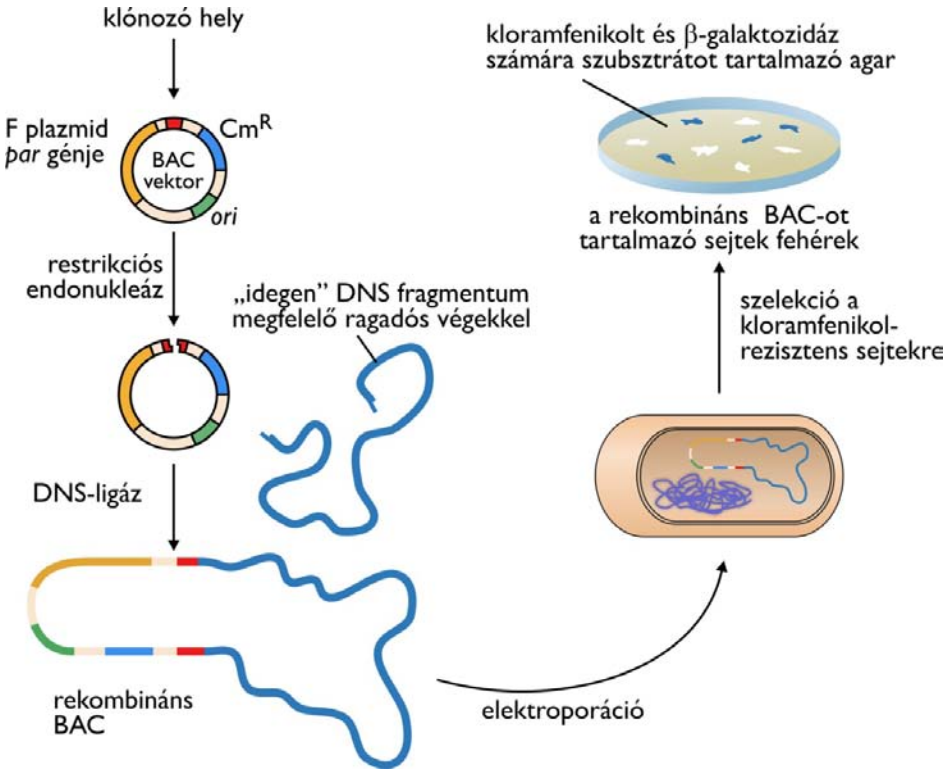
19.14. ábra: A Bluescript fágmid vektor térképe

19.2.4.4. Mesterséges kromoszómák

A lambda vektorokhoz képest is sokkal nagyobb, **300 kbp méretű inszert**eket lehet **bakteriális mesterséges kromoszómá**kba (BAC: *Bacterial Artificial Chromosomes*) építeni. Ezek olyan speciális, a természetes **F-plazmid**ról származó **origót** és egyéb szabályzó elemeket tartalmaznak, ami miatt a nagyméretű cirkuláris vektor DNS csak **egy-két példány**ban lesz jelen a sejtben, és a sejttel tökéletesen szinkronizáltan osztódik. Ez a tulajdonság nagyméretű rekombináns DNS-ek esetében hasznosabb, mint a nagy kópiaszám, ugyanis így kisebb valószínűséggel történik homológ rekombináció, a konstrukció stabilabb marad a felszaporítás során. A BAC-ba **300 kbp** méretű **inszertek** építhetők be.

A teljes emberi genomot néhány 10 ezer ilyen vektor-tartalmú klón lefedi, ami már kivitelezhető nagyságrendet jelent. Az elsődleges szelekciót ennél a vektortípusnál is antibiotikum rezisztencia biztosítja. Az idegen DNS beépülését (rekombináns DNS) itt is ki lehet mutatni a β-galaktozidáz enzim α-komplementációja, a „kék-fehér” szelekció alapján. A BAC klónok előállításának sémáját a **19.15. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.15. ábra: Bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) klónozási célra

Létrehoztak eukarióta eredetű mesterséges kromoszómát is, ami a sörélesztő gomba, a *Saccharomyces cerevisiae* genom tulajdonságait örökölte meg. **Élesztő mesterséges kromoszómá**kat (YAC: *Yeast Artificial Chromosome*) használtak eleinte a Humán Genom Program során is, mivel ezek akár több **megabázispár nagyságú inszert**eket is képesek tárolni, így az emberi genom teljes lefedéséhez elegendő kb. 10000 élesztő klón. Később azonban a YAC klónok instabilitása miatt teljesen elhagyták ezek használatát. A BAC-kal szemben a YAC nem cirkuláris, hanem **lineáris** felépítésű. Rendelkezik az eukariótákra jellemző **centromer és telomer régiók**kal is, amelyek megakadályozzák a vektor letörését és más DNS darabbal való kapcsolódását. A YAC tartalmaz minden olyan szakaszt, amely a kromoszóma replikációjához és az utódsejtbe kerüléshez szükséges. Ezeken a szakaszokon kívül a YAC vektorokban van a gazdasejtben működőképes replikációs origó és szelekciós markergén is. A YAC vektor hátránya a másik két mesterséges kromoszómával szemben, hogy mivel eukarióta gazdasejtben tartják fenn, így a természetes rekombinációs folyamatoknak jobban ki van téve (instabil), ezen kívül a konstrukció létrehozásakor gyakrabban alakulnak ki konkatamer inszertek. (A konkatemer kifejezés jelentése: egy inszert egymás mögé több kópiában épül be a vektorba.)

Végül meg kell említenünk a **humán mesterséges kromoszómá**kat (**HAC**: *Human Artificial Chromosome*) is, mint a legkomplexebb vektor típust, amely ígéretes eszköz a génterápia számára (lásd **19.8.3**), mint „génszállító" molekula. Méretük 1-10 Mbp között lehet, és a HAC-ba beépíthető inszertnek potenciálisan nincs mérethatára.

19.2.5. Rekombináns DNS könyvtárak

A rekombináns DNS technológiák nemcsak egyedi gének és fehérjék vizsgálatára alkalmas rendszerek létrehozására használhatóak. Ugyanezek a technikák alkalmasak **rekombináns DNS könyvtárak** létrehozására is. Ezek a könyvtárak hatalmas mennyiségű DNS-ben kódolt információt tartalmazhatnak. A könyvtár létrehozása során először a klónozni kívánt DNS megfelelő méretű fragmentumait állítják elő, majd ezeket a fragmentumokat klónozzák a választott vektorba.

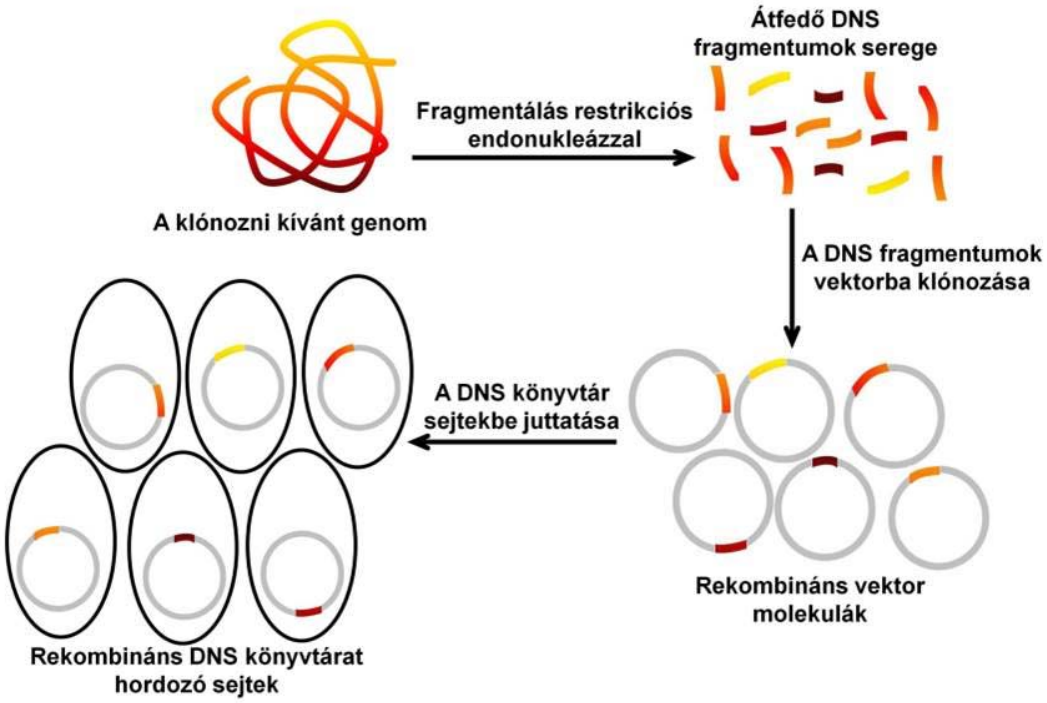
A DNS forrása alapján kétféle génkönyvtárat lehet létrehozni. A **genomiális könyvtár**ak klónjainak összessége egy adott élőlény **teljes genom**ját, vagy annak egy-egy jól körülhatárolt részét, például egy kromoszómát tartalmazzák. A **cDNS (*complementary* DNS) könyvtárak** egy adott sejttípusban egy adott pillanatban **kifejeződő** fehérjéket kódoló érett **mRNS-ek szekvenciái**t tartalmazzák, de **DNS formában**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A rekombináns DNS könyvtárból a vizsgálni kívánt gént tartalmazó klónt vagy klónokat különböző, később részletezett technikák segítségével ki lehet választani, és a többi klóntól el lehet különíteni. Ez az eljárás a **könyvtárak szűrése (**angol eredetű kifejezéssel **szkrínelés)**. Ezáltal a vizsgálatokat tiszta klónokon lehet elvégezni. Az egész DNS könyvtár vagy az egyes kiválasztott klónok a megfelelő gazda rendszerben szaporíthatóak, azaz a DNS könyvtár bizonyos értelemben állandó forrása a specifikus klónoknak is.

19.2.5.1. Genomiális DNS könyvtárak

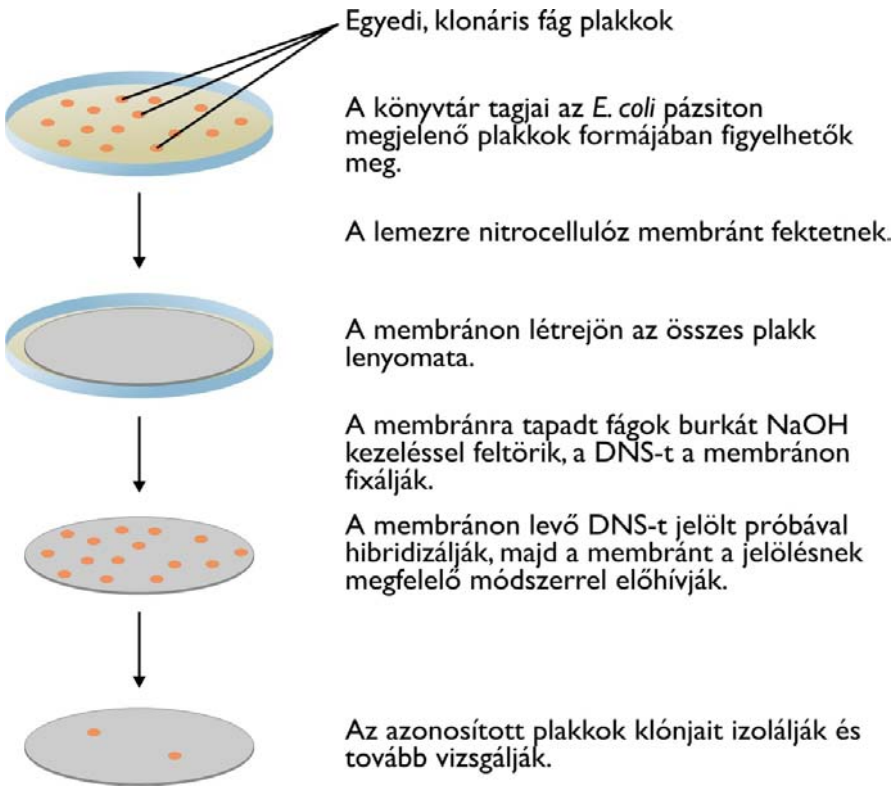
A genomból származó DNS molekulák feldarabolása és DNS fragmentumok vektorba építése az eddig bemutatott módszerekkel történik (lásd **19.16. ábra**).



19.16. ábra: Genomiális könyvtár elkészítési sémája

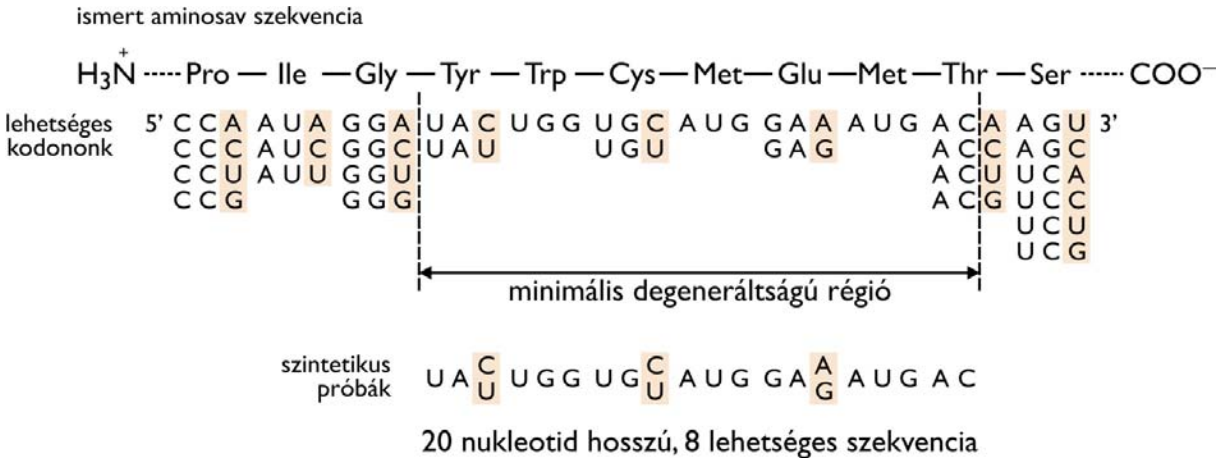
A könyvtár elkészítéséhez használt vektor típusát a genom mérete és befogadni képes inszert mérete dönti el. A genomiális könyvtárakhoz korábban főleg lambda vektorokat használtak, manapság a genom programoknál leginkább a bakteriális mesterséges kromoszómákat részesítik előnyben hordozó DNS-ként. A bennünket érdeklő klón megtalálása az esetenként százezres nagyságrendű rekombináns DNS közül nem tűnik egyszerű feladatnak. Szerencsére a DNS reverzibilis hibridizációs képességén (lásd **12.3.4. fejezet**) és a komplementaritás elvén alapuló hibridizációs technikák (lásd **19.3**) segítenek nekünk. A lambda-fág könyvtárak **szűrés**ére alkalmas módszer, a **plakk-hibridizáció** sémája a **19.17. ábrán** tekinthető meg. A hibridizációhoz használt „**próba**”, a keresett DNS szekvenciával komplementer egyszálú szintetikus oligonukleotid, amit előzetesen megjelölnek radioaktív vagy fluoreszcens módon.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.17. ábra: Az úgynevezett plakk-hibridizációval lehet egyedi klónokat azonosítani egy génkönyvtárban

Hogyan lehet megtalálni a könyvtárban olyan géneket, aminek nem ismerik a szekvenciáját? Ha az adott gén által kódolt fehérje legalább részleges fehérjeszekvenciája ismert, akkor a genetikai kód ismeretében, visszafelé átfordítható az aminosavak sorrendje kodonok sorrendjére. Egy aminosavszekvenciát a kódszótár degeneráltsága miatt ugyan többféle oligonukleotid szekvencia kódolhat, de ez nem probléma, mert **redundáns oligonukleotid keverék**et is könnyen elő lehet álltani **szintetikusan módon**, s ezek használhatók próbaként a könyvtár szkrínelésére (lásd **19.18. ábra**).



19.18. ábra: Aminosav szekvencia alapján a bemutatott módon lehet szintetikus nukleinsav próbát készíteni

19.2.5.2. cDNS könyvtárak

A cDNS könyvtárak készítésének célja és az elkészítésük módja alapvetően más, mint a genomiális könyvtárak esetében. A **cDNS könyvtárak** a könyvtárkészítés során használt **sejttípusban kifejeződő** fehérjék érett **mRNS szekvenciái**ról **reverz transzkripcióval** készült **komplementer DNS-t** tartalmazzák. Ez utóbbiak neve cDNS, azaz komplementer DNS (*complementary DNA*).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

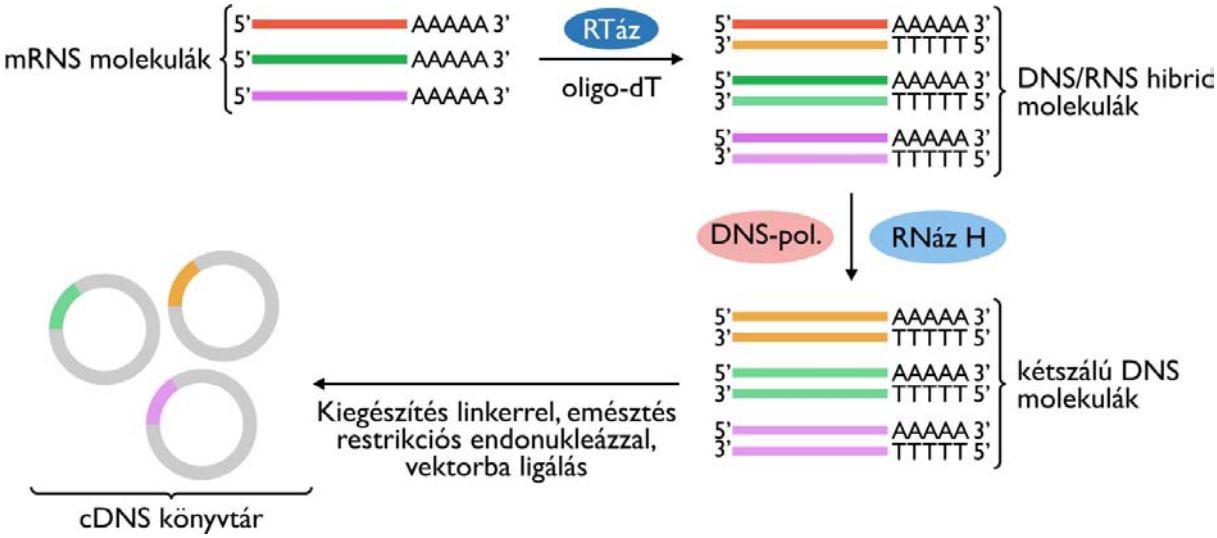
Míg **egy fajból** csak **egyfél genomiális könyvtár,** viszont nagyon sokféle **cDNS könyvtár** készíthető. Gondoljunk bele, minden sejttípus más és más géneket expresszál, azon kívül egy soksejtű szervezet a fejlődése során, különböző fiziológiás körülmények között, egészséges és kóros állapotban is különböző mRNS készlettel rendelkezik – ezért egy élőlényből számtalan különféle cDNS könyvtár állítható elő.

A cDNS könyvtár készítésének első, az eddigiektől eltérő lépése a **reverz transzkripció**. Ha eukarióta cDNS könyvtár létrehozása a cél, először az sejtekből kivont teljes RNS mintából izolálni kell a csak néhány százalékot képviselő mRNS-t. Egy igen hatékony elválasztási mód az eukarióta mRNS-ekre általánosan jellemző 3'-végi poli-A farok kihasználása – egy lépésben affinitás kromatográfiával (lásd **6.3.4. fejezet**), egy poli-T oligonukleotiddal módosított kromatográfiás tölteten lehet szeperálni az mRNS molekulákat. (Jegyezzük meg, hogy RNS-ekkel nehéz a laboratóriumban dolgozni, mert igen könnyen degradálódik a preparátum a mindenütt jelen levő és szinte tönkretehetetlen ribonukleáz enzimek miatt. Inaktiválásukra speciális, itt nem ismertetett eljárásokat dolgoztak ki.)

A cDNS könyvtárak elkészítésének egy sémáját a **19.19. ábra** mutatja be. A **reverz transzkriptáz** (RT-áz), a retrovírusok enzime, egy **RNS-függő DNS-polimeráz**, tehát szüksége van egy indító primerre. A cDNS szintézisnél, amennyiben eukarióta mRNS-sel dolgoznak, ez oligodezoxitimidin (oligo-dT). Az RT-áz egy RNS/DNS hibrid molekulát szintetizál, amiről egy ribonukleáz (RN-áz-H) és egy DNS-polimeráz segítségével készülnek el a cDNS molekulák, amiket restrikciós helyeket tartalmazó ún. linkereknek a végekre történő ligálása után lehet beépíteni a megfelelő vektorba.

A cDNS könyvtárakhoz általában expressziós vektort használnak, azaz a sejtekben az inszertek egy promóterről átíródnak. Ezt a tényt lehet kihasználni a cDNS könyvtárak ún. **expressziós szűrés**ére. Ennek során az *in situ*, a sejtekben termelődő fehérjéket specifikus antitestek segítségével mutatják ki.

Az izolált cDNS szekvenciákból jelölt próbák készíthetők. A próbák segítségével vizsgálható az adott gén expressziójának szintje különböző szövetekben, vagy az expresszió megváltozása patológiás állapotban vagy különböző kezelések, beavatkozások hatására. Ezeket a vizsgálatokat valamilyen **hibridizációs módszer**rel végezik, amelyeket a következő fejezetben ismertetünk.



19.19. ábra: cDNS könyvtár előállításának vázlatos sémája

19.3. Hibridizációs technikák

A géntechnológiában a **hibridizációs technikák**kal valamilyen ismeretlen biológiai mintából vagy egy génkönyvtárból lehet kimutatni egy adott DNS vagy RNS szakaszt. A hibridizációs technikáknak köszönhetően nincs feltétlenül szükség szekvenálásra, ha a cél a például a genomban egy mutációt azonosítása. A könyvtárak szűrése kapcsán már említettünk egy hibridizációs eljárást, s arról is írtunk, hogy a hibridizáció **a DNS két szálának komplementaritásán** és **reverzibilis denaturációján-renaturációján alapszik**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

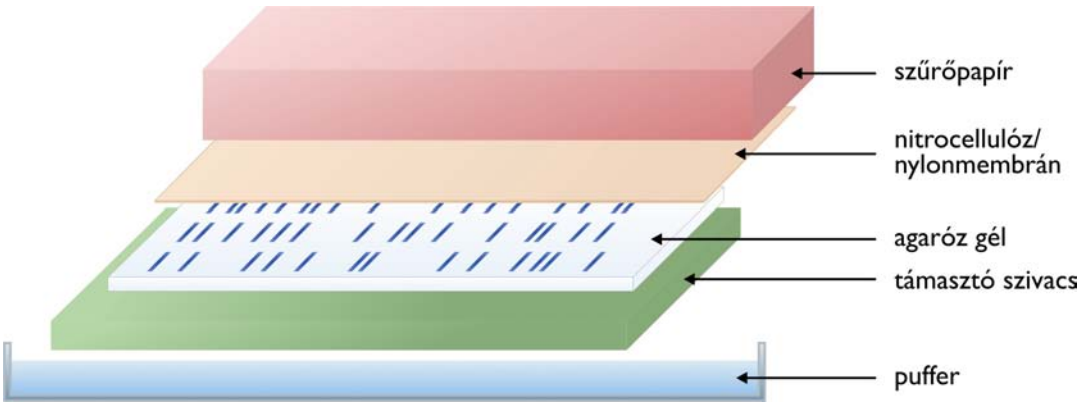
A hibridizáció során a vizsgált minta a **templát**, ehhez tapad hozzá a Watson-Crick bázispárosodási szabályoknak megfelelő komplementer **próba**. A minta lehet DNS vagy RNS, a próba elvileg bármilyen jelölt nukleinsav, amit ha oligonukleotid méretű, akkor szintetikusan, **automatizált szilárdfázisú oligonukleotid szintézis**sel (szintetizátorban) állítanak elő. A jelenlegi technológiával maximum kb. 100 nukleotid hosszúságú, tetszőleges szekvenciájú DNS állítható elő. Ezeket nem csak kereső próbaként használják, hanem *in vitro* DNS szintézishez „primer"-ként olyan módszereknél, mint a DNS-szekvenálás, irányított mutagenezis és a polimeráz láncreakció (lásd **19.4.**).

Amennyiben a minta DNS fragmentumokat tartalmaz, akkor a hibridizációt **Southern-lenyomat (*blot*) módszer**rel, ha a minta RNS, akkor viszont **Northern-lenyomat** módszerrel végzik. Szólunk a fejezetben röviden a **DNS-chip** technológiáról is, ami egyszerre nagyszámú minta vizsgálatát teszi lehetővé. Ebben a könyvben nem ismertetjük a fehérjék kimutatására szolgáló Western-blot módszert, amellyel specifikus fehérjéket antitestekkel lehet kimutatni, miután a poliakrilamid gélben szétválasztott mintát blottolással immobilizálták.

19.3.1. A Southern- és Northern-blot technika és az RFLP módszer

A Southern-blot (magyarul lenyomat) technika **speciális DNS szakaszok kimutatásá**ra szolgál egy komplex DNS mintában. (Nevét a felfedezőjéről, Edwin Southernről kapta, aki 1975-ben kidolgozta a módszert.) A módszerrel például egy adott gén jelenlétét lehet vizsgálni különböző fajok teljes genomjában. Ezzel a technikával a gén mérete vagy szerkezetbeli megváltozása is kimutatható. A „lenyomatra" azért van szükség, mivel a gélből a DNS diffúzióval az oldatba kerülne a hibridizálás során, másrészt a gél törékeny és nehezen kezelhető.

Először az emésztett DNS mintát agaróz gélelektroforézissel szétválasztják, majd egy **nitrocellulóz- vagy nylonmembrán**ra „blottolják", azaz diffúzióval a gélből a lenyomatra kerülnek a DNS molekulák és ott immobilizálódnak (lásd **19.20. ábra**). A lenyomaton *in situ* denaturálják a DNS-t, majd hibridizálják egy radioaktív vagy fluoreszcens módon jelölt próbával. (Manapság már szinte kizárólag a veszélytelen fluoreszcens jelöléseket használják a géntechnológiában).

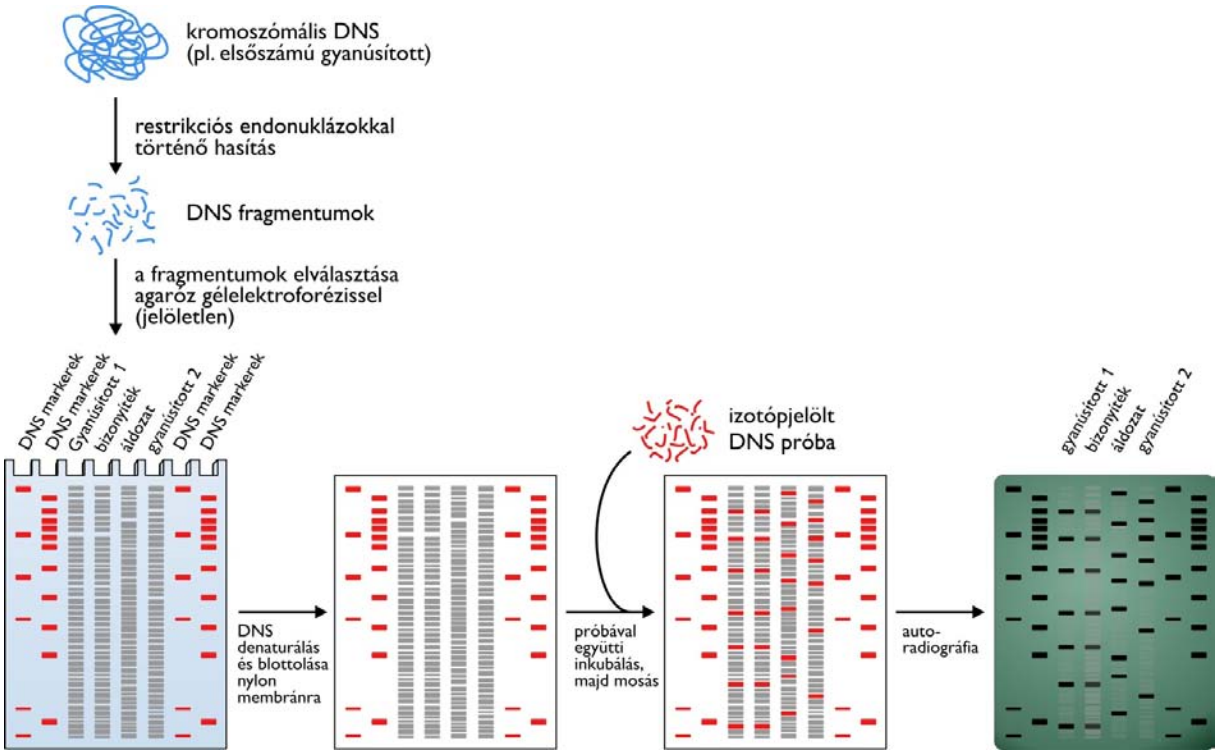


19.20. ábra: A Southern-lenyomat módszer

Southern-blot technika segítségével analizálják az **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*: **restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus**) módszer alkalmazása során kapott DNS fragmentumokat is (lásd **19.21. ábra**).

Az RFLP módszer segítségével homológ DNS molekulák variációit (pl. SNP: *single nucleotide polymorphism*, kiejtve „sznip") lehet detektálni. A **19.21. ábrán** egy bűntény elkövetőjének Southern-blot módszerrel előállított RFLP mintázat alapján történő azonosítását mutatjuk be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.21. ábra: Restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) kimutatása Southern-blot módszerrel. A példában egy bűntény elkövetőjét az RFLP mintázat egyedisége alapján lehetett azonosítani.

Az eljárás során teljes genomból indulnak ki, melyet restrikciós endonukleázokkal kezelnek. A hasítás után kapott DNS fragmentumok száma az enzim által felismert szekvenciák számától, mérete pedig ezek távolságától függ. A restrikciós fragmentumokat ezt követően gélelektroforézissel szeparálják, és **Southern-blot hibridizációval detektálják**. RFLP abban az esetben jelenik meg, ha a vizsgált DNS szálon található inszerció, deléció vagy SNP egy meglévő restrikciós helyet tönkretesz vagy egy újat hoz létre. Ilyenkor gélelektroforézissel eltérő hosszúságú DNS fragmentumokat kapnak. Az RFLP analízis volt az első **DNS „ujjlenyomat**ot" feltérképező, széles körűen elterjedt technika (***DNA profiling,* DNS tipizálás**), amelyet bevezettek az igazságügyi orvostani és a bírósági gyakorlatba is. Az RFLP technika nagyon fontos eszköz volt a genomok fizikai térképezésében, különböző mutációk kimutatásában. Ezzel a módszerrel különböző betegségek, vagy az azokra való hajlam is kimutatható.

A Southern-blottal rokon technika a **Northern-blot**, csak ebben az esetben DNS helyett **RNS molekulákat analizálunk**. Ez az eljárás jóval nagyobb elővigyázatosságot igényel, mivel az RNS rendkívül bomlékony (lásd fentebb). Segítségével megállapítható egy adott sejt pillanatnyi génexpressziós állapota és annak változása például differenciálódás során vagy patológiás esetekben.

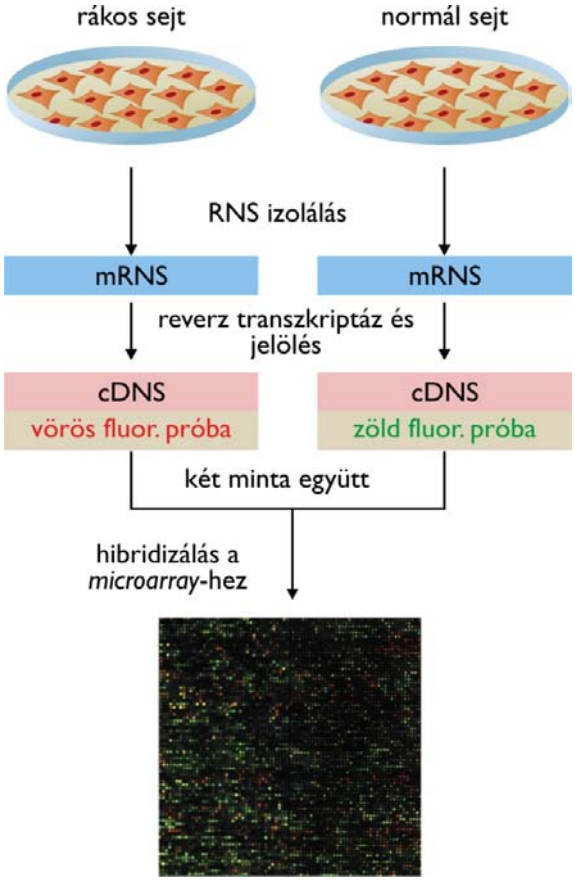
A Southern- és Northern-blot módszer helyett ma már egy sokkal több minta egyidejű analízisére alkalmas hibridizációs módszer is a kutatók rendelkezésére áll – a következő fejezetben bemutatott DNS-chip technika.

19.3.2. DNS-chip (*microarray*) technika

A hibridizációs technikák legújabb változata a **DNS-chip** vagy ***microarray***. Egy kisméretű (1-2 cm^2) **szilárd hordozó** (pl. szilikon, üveg) felületére szabályos elrendezésben **több 10000,** eltérő szekvenciájú **DNS próbá**t rögzítenek. A próbák 20-5000 nukleotid hosszúságúak, génekre vagy cDNS-ekre specifikus oligonukleotidok vagy *in vitro* szintetizált DNS-fragmentumok. Az eljárás lényege, hogy mikroszkóp segítségével detektálják azokat a próbákat a chipen, amelyekkel komplementer DNS vagy RNS jelen van a mintában. Ennél a módszernél a **mintá**t kell **fluoreszcens** módon **jel**ölni. Vegyük észre, hogy a klasszikus hibridizációs módszerekhez képest a chip technológiánál megfordult a próba és a minta viszonya: itt a próbát, míg az előző módszereknél a mintát immobilizálják (blottolással).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A DNS *microarray* módszert széleskörűen alkalmazzák a funkcionális genomikában; génexpressziós változásokat, valamint az SNP-ktől kezdve a teljes genomot átfogó genetikai különbségeket lehet a módszerrel analizálni. Egy **expressziós összehasonlító vizsgálat** sémáját a **19.22. ábra** mutatja be. Normál illetve rákos sejtekből izolált mRNS-ekről két eltérő színű fluoreszcens jelöléssel cDNS-eket szintetizálnak. A DNS-chipen a humán génekre specifikus próbák találhatók. Elegendő 12 nukleotid hosszúságú szekvenciákat használni, mivel ezek a kombinatorika törvényeit ismerve már bizonyosan specifikusak lesznek a humán genomméretét figyelembe véve (4^{12} = 16,8 x 10^9, míg a genomméret: 3,2 x 10^9). A két mintát összekeverés után hozzáadjuk egy DNS-chiphez, amelyen a humán génekre specifikus próbák találhatók. Az előhívás után a csak egyik vagy másik mintában expresszálódó mRNS-ről készült cDNS a jelölési színnel látszik, míg a mindkét mintában jelenlevő cDNS a két szín keverékeként (piros és zöld mintajelölés esetén sárga) detektálható, ráadásul kvantitatív módon. A vizsgálatból kiderül, hogy az adott rákos mintában milyen gének fejeződnek ki nagyobb mértékben mint az egészséges sejtekben.



19.22. ábra: DNS-chip alkalmazása differenciális génexpresszió vizsgálatra.

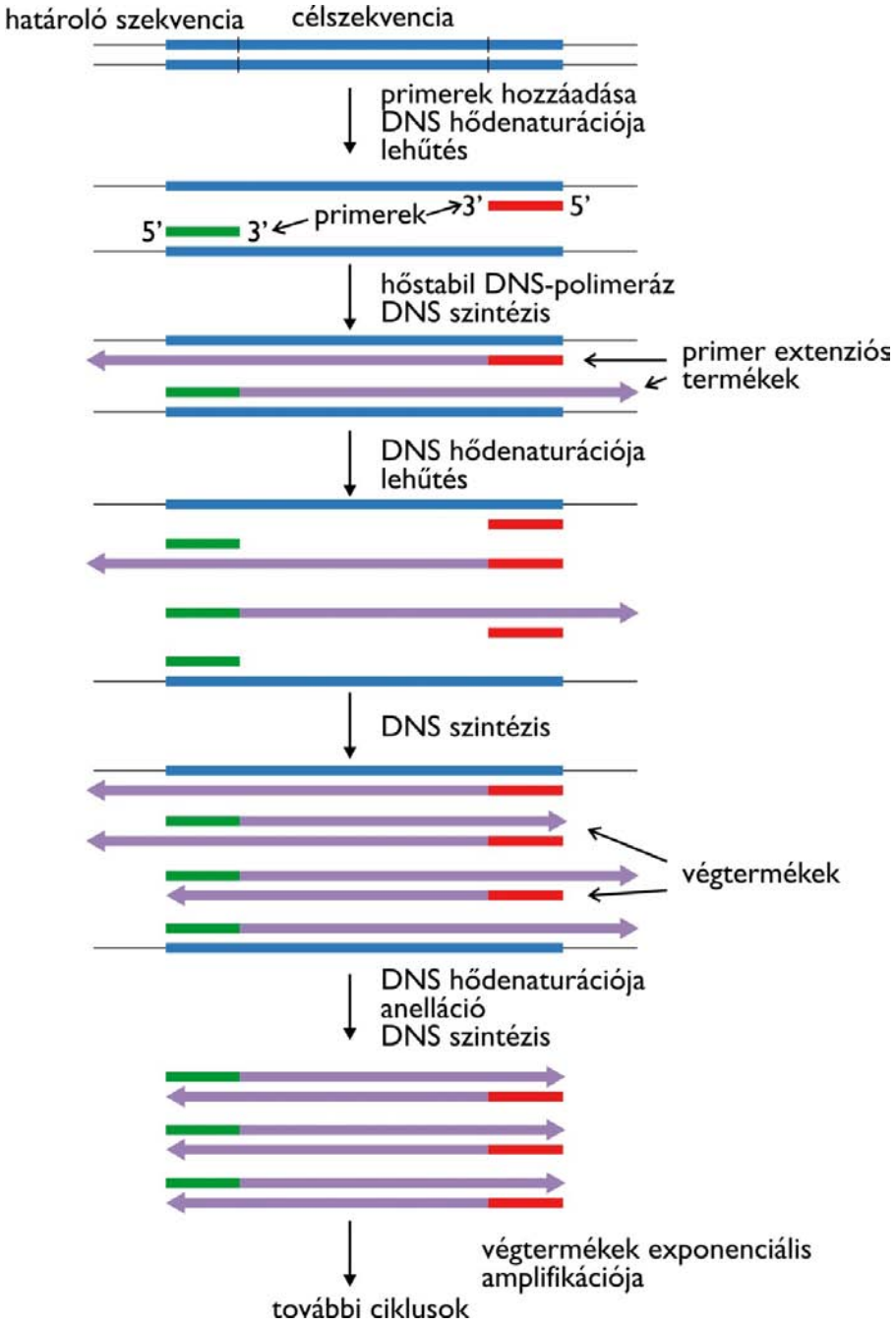
19.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A **polimeráz láncreakció** (**PCR**: *polymerase chain reaction*) segítségével egyetlen vagy kisszámú DNS-molekula meghatározott szakasza (célszekvencia) amplifikálható *in vitro* enzimatikus reakció révén, gazdaszervezet igénybevétele nélkül. A reakció során amplifikált DNS-szakasz mérete jellemzően a 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik.

A PCR-t **Kary Mullis 1983**-ban fedezte fel, és mivel ez a technológia forradalmasította a molekuláris biológia szinte minden eljárását, Nobel díjat kapott érte (1993-ban). Az eljárás lényege: ha tökéletesen ismert egy adott DNS szekvencia, akkor a szekvencia alapján egy *in vitro* DNS szintézisen alapuló, ciklikusan ismétlődő módszerrel „ki lehet erősíteni" az adott szekvenciájú DNS szakaszt. **Két szintetikus oligonukleotid**ot használnak, melyek az amplifikálandó DNS komplementer szálaihoz hibridizálnak úgy, hogy 3' végeik egymás felé néznek. Ezek az oligonukleotidok **primer**ként szolgálnak a DNS szintézis során.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

A PCR-t három, ciklusosan ismétlődő lépésben hajtják végre. Először a templát DNS-t tartalmazó mintát 90ºC fölé melegítve a két DNS szál elválik (**denaturációs fázis**), majd az oldatot lehűtve kb. 50ºC-ra a nagy koncentrációban alkalmazott primerek mindkét szálhoz hibridizálnak (**anellálási fázis**). A harmadik lépésben a mintát 72ºC-ra felmelegítve, ezen a hőmérsékleten nagy felesleg dNTP jelenlétében egy **DNS-polimeráz** mindkét szálra megszintetizálja az új, komplementer DNS szálat (**polimerizációs vagy elongációs fázis**). A reakcióban olyan DNS-polimerázt (pl. **Taq-polimeráz**) használnak, mely hőforrásokban élő baktériumból (pl. *Thermus aquaticus*) származik, és hőmérsékleti optimuma 72ºC-on van, sőt, 90ºC-on sem denaturálódik. Végül a mintát újból 90ºC-ra melegítik, ahol a két kétszálú DNS négy szálra esik szét, és a ciklus kezdődik elölről. A három hőmérséklet, 90-50-72ºC ciklikus váltogatásával egy olyan **DNS-termék szaporodik exponenciális ütem**ben, melynek két végét az alkalmazott primerek jelölik ki. 25 ciklus után kb. egymilliószor annyi adott szekvenciájú DNS molekula keletkezik, mint amennyi a templátban volt! A végtermék neve az **amplikon** (bár megjegyzendő, hogy a szakirodalomban néha a PCR-hez használt kiindulási DNS-t is amplikonnak nevezik). A módszer hallatlanul érzékeny, mivel a kiindulási mintában elegendő egyetlen DNS molekula, az amplifikáció akkor is megtörténik. Az eljárás sémáját a **19.23. ábra** és a **12. animáció** mutatja be.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.23. ábra: A polimeráz láncreakció sémája

A **PCR termék** szigorúan vett értelemben **nem molekuláris klón**, hiszen nem sejtklónokból származik. Ennél fontosabb tény, hogy az amplifikáció során csak az alkalmazott DNS-polimeráz saját hibajavító (korrektor) aktivitása képes a DNS szintézis másolási hűségét növelni, a sejtekben erre a célra szakosodott hibajavító enzimek hiányoznak. Tovább rontja a helyzetet, hogy a leggyakrabban használt Taq-polimeráznak hiányzik a korrektor hibajavító aktivitása, ezért átlagban 10000 beépített nukleotidonként hibázik. (Megjegyezzük, hogy használhatunk a PCR-hez hibajavító aktivitással rendelkező hőstabil enzimet is, ilyen pl. a Pfu-polimeráz.) Összehasonlításképpen, egy emlős genom replikációjakor a hibavalószínűség $1/10^9$ nagyságrendű. A fentiek miatt sokszor a PCR terméket beépítik egy vektorba, s valódi molekuláris klónt (hívják angolul *hard copy*-nak is) készítenek belőle, mielőtt további géntechnológiai célra használnák.

A PCR alkalmazása igen sokrétű, mind az alap, mind az alkalmazott molekuláris biológiai kutatásokban.

Az **amplikon** könnyen **klónozható**, mivel a PCR oligók 5'-végére restrikciós hasítóhelyeket lehet beépíthetni (a primereknek elég, ha a 3'-régiójuk komplementer a templát szállal). A **DNS-szekvenálása** és **mutagenezis**e is történhet **PCR-rel**.

A templát amplifikáció fluoreszcens jelekkel történő **valósidejű** követésével **kvantitatív PCR**-t lehet végezni, aminek a segítségével például az mRNS templát mennyiségét, és ezen keresztül a génexpresszió mértékét is meg lehet határozni (reverz transzkripció és PCR kombinálásával).

Mivel nyomnyi mennyiségű DNS is amplifikálható, ezért pl. **fosszíliákból származó DNS**-t is ki lehet erősíteni (és szekvenálni) például múmiákból, jégbefagyott mammutokból, borostyánba zárt rovarokból stb., ami evolúciós és genetikai kutatásokhoz ad óriási segítséget (ez az „**ős-PCR**" vagy **archeológiai PCR**, hiszen alkalmas mintákat lehet kinyerni régészeti lelőhelyekről származó csontokból is).

Az „ős-PCR" egyik csúcsteljesítménye, hogy a neandervölgyi embertől származó csontmintákból kinyert töredezett DNS-ből PCR-rel annyit sikerült felszaporítani, hogy az ún. új-generációs szekvenálási módszerekkel (lásd **19.5**) a teljes *Homo neanderthalensis* genomot meg tudták szekvenálni.

Az **igazságügyi orvostanban** ma már PCR-rel végzik azokat a vizsgálatokat, melyek eredményeként egyénre jellemző „**DNS ujjlenyomat**" készül (a módszer felváltotta az RFLP technikát). A módszer lényege, hogy megfelelően választott primer párokkal az emberi genomból olyan szakaszokat erősítenek ki, melyek mérete a bennük levő repetitív elemek számától függ. Az elemek száma egyénenként eltérő, és mint allél öröklődik. Sok génterület együttes kierősítésével és gélelektroforézisével egyénre jellemző DNS fragmentum mintázat kapható. A módszert alkalmazzák áldozatok azonosítására (pl. az 1918-ban meggyilkolt orosz cári család maradványait is így azonosították), illetve elkövetők azonosítására vagy kizárására. A fragmentum mintázat Mendel törvényei szerint öröklődik, vagyis rokonsági kapcsolatokat is kimutatható, ezért alkalmazzák pl. apasági perekben, vagy fosszíliák rokonsági kapcsolatainak megfejtésében is.

A PCR nyomnyi mennyiségben jelenlevő, betegséget okozó **vírusok** vagy **mikrobák kimutatásá**ra is használható. Számos speciális alkalmazása létezik környezeti minták mikrobáinak analízisére **(metagenomika)**, igaz, hogy itt is előtérbe kerültek új generációs szekvenálási módszerek (lásd **19.5.3**).

19.5. DNS-szekvenálás

Egy rekombináns DNS akkor használható további géntechnológiai eljárásokhoz, ha már ismert az információtartalma, azaz szekvenálták. Definíció szerint a **DNS-szekvenálás** az a folyamat, melynek során meghatározzák a DNS molekula nukleotidsorrendjét**.**

Napjainkban a DNS-szekvenálás a molekuláris biológia egyik legmeghatározóbb eszközévé vált. A modern szekvenáló technikákkal már számos élőlény teljes genomját, köztük az emberét is sikeresen meghatározták (különböző élőlények genomméretét, amelyeket már szekvenáltak, lásd a **1.3. táblázat**ban).

Az 1970-es évektől kezdve két módszert fejlesztettek ki, amelyek közül **a Sanger-féle láncterminációs (enzimatikus) módszer** szinte egyeduralkodóvá vált (lásd **19.5.1**). A fluoreszcens detektálás megjelenésével és automatizálásával könnyebbé és gyorsabbá vált a DNS-szekvenálás (lásd **19.5.2**). Végül az ezredfordulón jelentek

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

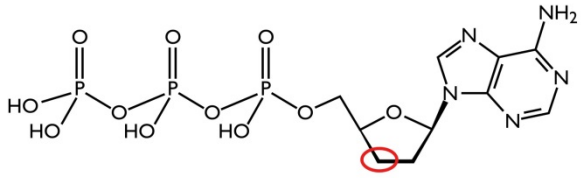
meg a teljesen más mechanizmuson alapuló, még nagyobb hatékonyságú és olcsóbb ún. **új-generációs szekvenáló módszerek** (*next-generation sequencing)*, amelyek az információszerzés mennyiségét tekintve újabb forradalmi változást indítottak el a molekuláris biológiában (lásd **19.5.3**). Jelenleg ez utóbbi módszereket és az automata láncterminációs szekvenálást párhuzamosan használja a géntechnológia. A fejezetben ezeket a módszereket tekintjük át.

19.5.1. A Sanger-féle láncterminációs (didezoxi-) szekvenálás

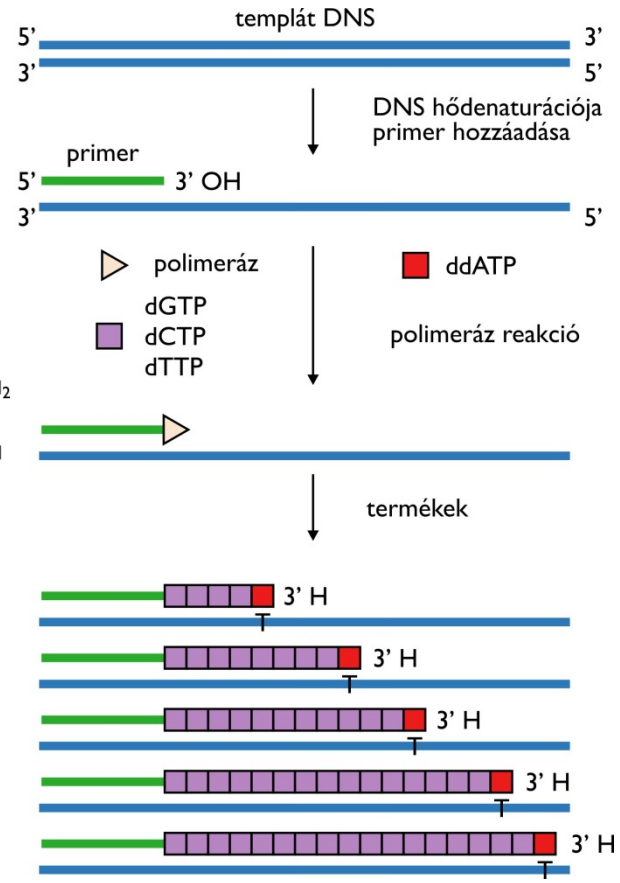
Frederick Sanger 1977-re dolgozta ki azt a szekvenálási elvet, ami a **lánctermináció**s- vagy **didezoxi-szekvenálás** elnevezést kapta. Sanger a szekvenálást forradalmasító módszeréért megkapta a fehérjeszekvenálás kidolgozásáért 1958-ban odaítélt első Nobel-díja után a másodikat is, 1980-ban.

Az eljárás során a szekvenálni kívánt kettősszálú DNS-t magas hőmérsékleten denaturálják, majd a szétváló szálak közül a leolvasni kívánt **templát szál**hoz (a leolvasandó szekvenciától 5'-irányban) komplementer, rövid egyszálú DNS-szálat, primert (**szekvenáló oligonukleotid**ot) párosítanak. Ezután négy párhuzamos szekvenáló reakciót állítanak össze. Minden reakcióelegybe kerül templát DNS és szekvenáló primer, valamilyen DNS-polimeráz enzim és azonos mennyiségben négyféle **dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP)**. A négy párhuzamos reakció mindegyikéhez egyféle **didezoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP)** molekulát kevernek. A ddNTP-k cukorrészének – szemben a dNTP-molekulákkal – 3'-szénatomjához az -OH csoport helyett -H atom kapcsolódik (lásd **19.24. ábra**).

Példaként vegyük azt a reakciót, mely ddATP-t tartalmaz. A polimeráz enzim a primer 3'-végétől indulva megkezdi a komplementer DNS-szál szintézisét, felhasználva egyaránt a dNTP és ddATP-molekulákat. A leolvasni kívánt DNS-szakaszban található timin bázisokkal szemben a szintetizálódó új szálba dATP vagy ddATP épülhet be (a két nukleotid koncentrációjának arányától függő valószínűségekkel). Amennyiben dATP épül be, a szálszintézis folytatódik; viszont ha ddATP épül be, az új szál szintézise leáll a reaktív 3'-OH-csoport hiánya miatt. Ez a **lánctermináció**, amit a **19.24. ábra** szemléltet.



ddATP: 2', 3'-didezoxi-ATP



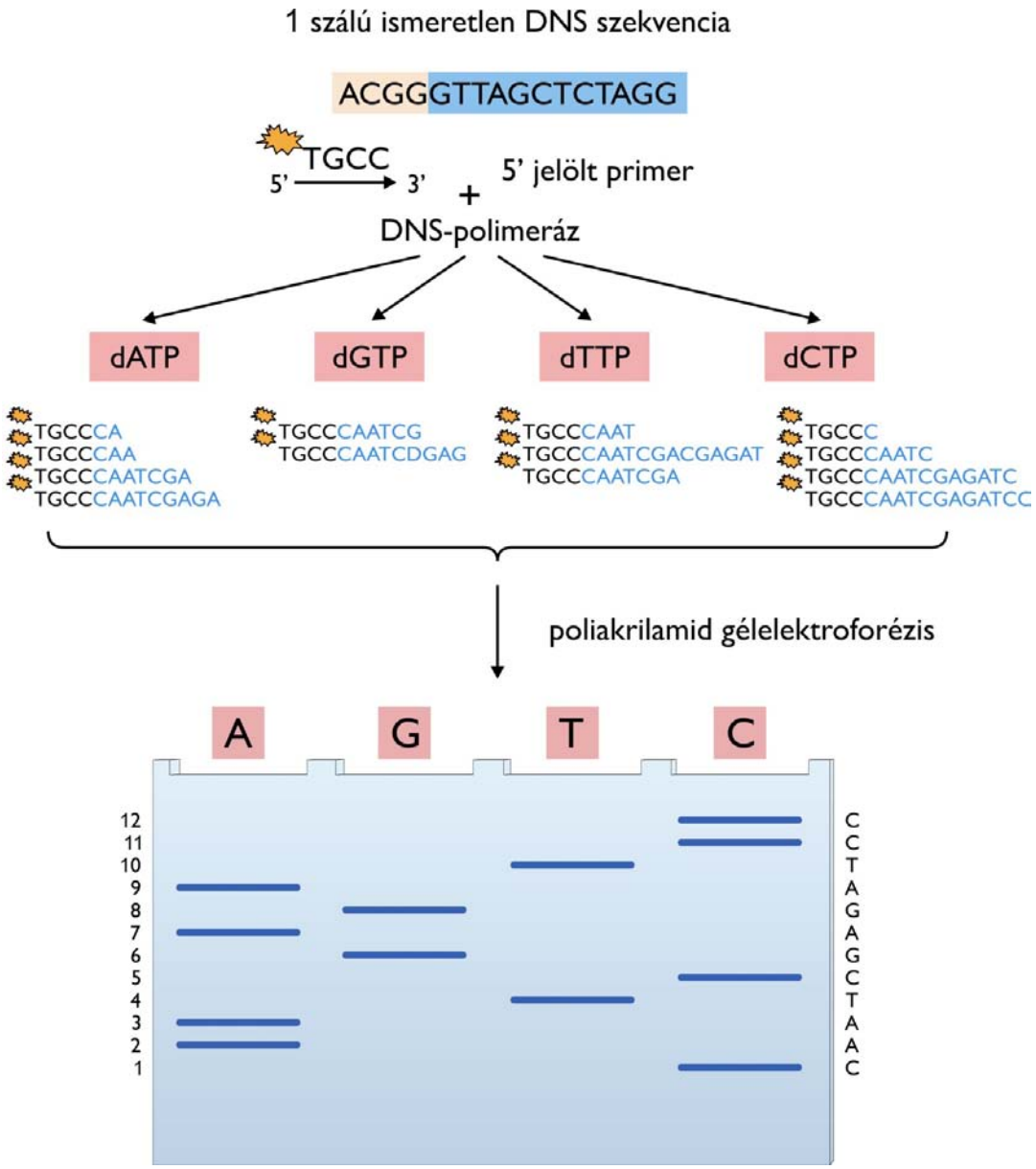
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.24. ábra: Egy didezoxi-nukletid (ddATP) szerkezete és a lánctermináció sémája

A reakció során tehát különböző hosszúságú új DNS-szakaszok keletkeznek, melyek hossza tükrözi a timin bázisok távolságát a primer 5' végétől. A ddGTP-vel, ddCTP-vel illetve ddTTP-vel végzett párhuzamos reakciók esetében a szintetizált szálak hossza rendre a citozin, guanin és adenin bázisok pozíciójától függ.

A DNS-láncok méret szerinti **elválasztás**a eredetileg **poliakrilamid gélen** történt: A négy különböző szekvenáló reakció során keletkező új DNS-láncok méreteinek ismeretében a templát DNS-szál bázissorrendjét le lehet olvaasni (ez **a szekvenáló létra**). Fontos tudnunk, hogy a lánctermináció szekvenálás során **max. 1000 nukleotid hosszúságú láncok** keletkeznek, s ezeket lehet felbontani ezzel a módszerrel (az agaróz gélektroforézis nagyobb méretű DNS fragmentumok szétválasztására szolgál, ezért kell itt poliakrilamid géleket használni). A szekvenáló létra előhívása α-^{32}P-dATP vagy α-^{35}S izotóppal jelölt (az α-foszfát-csoport egyik oxigénjét lehet kénre cserélni) dCTP beépülése után autoradiográfiával történik.

A szekvenáló létra létrejöttének sémáját a **19.25. ábra** és a **13. animáció** mutatja be.



19.25. ábra: A Sanger-féle lánctermináció szekvenálás sémája, a szekvenáló létra kialakulása

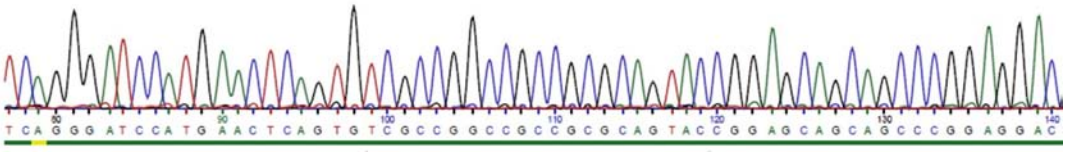
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.5.2. Automata fluoreszcens szekvenálás

Az **automata fluoreszcens szekvenálás** kidolgozása és a szekvenátorok megjelenése (a technika kidolgozása Leroy Hood nevéhez fűződik) tette lehetővé a genom projektek megszületését, mivel nagymértékben felgyorsította a Sanger-féle szekvenáló reakciók kivitelezését.

További újítás volt, hogy a reakció „fokozása” érdekében egy PCR készülékben zajlik a láncszintézis, ezáltal kevesebb templáttal lehet indítani a reakciót, illetve több jelölt új DNS fragmentum keletkezik, így a detektálás is könnyebbé válik. Az automata fluoreszcens szekvenálás során radioaktív jelölések helyett kizárólag fluoreszcens festéket alkalmaznak. A **fluorofór**t vagy a ddNTP-kre vagy a szekvenáló primerekre lehet bevinni.

A módszer egyszerűségét az adja, hogy négy reakcióelegy helyett elegendő eggyel dolgozni, köszönhetően a négyféle fluoreszcens festékkel jelölt didezoxi-nukleotidoknak. A jelölt DNS fragmentumokat **kapilláris gélelektroforézis**sel választják szét. Ennél az elektroforetikus eljárásnál egy 50-70 cm hosszú, 50-100 µm belső átmérővel rendelkező kapillárisban található a térhálós gélmátrix. A futtatni kívánt mintát a kapillárisba töltik, majd a kapilláris végeire elektromos feszültséget kapcsolnak, így a DNS az anód felé fog vándorolni. A vándorlás közben érvényesül a gélmátrix szűrőhatása, így a kisméretű molekulák haladnak a leggyorsabban. A kapilláris anód felőli végén folyamatosan történik a négyféle dideoxinukleotidhoz kötött fluoreszcencia-jel detektálása, amelyet számítógép rögzít. A folyamatos detektálás eredménye egy **kromatogram** (másnéven szekvenogram) lesz, melyen időben láthatjuk, hogy adott időpillanatban mely fluorofór haladt át a detektor előtt, így meghatározhatjuk a templát DNS szekvenciáját. Négy szín reprezentálja a különböző nukleotidokat: piros = T, zöld = A, sárga = G, kék = C. Egy automata szekvenálás eredményét a **19.26. ábra** mutatja.



19.26. ábra: Automata láncterminációs szekvenálás eredménye (szekvenáló kromatogram)

Szekvenátortól függően egyszerre akár 96 mintát is tudnak analizálni kapilláris géllel, és egy futással körülbelül **900-1000 nukleotid**ig lehet leolvasni a szekvenciát.

Elvárás minden DNS szekvenáló projekt esetében, függetlenül a módszertől, hogy **mindkét DNS szálat szekvenálni kell**, mivel így, ha a két független információ a komplementaritásnak megfelelő lesz, biztosak lehetünk benne, hogy a templát valós szekvenciáját olvastuk le.

19.5.3. Új-generációs szekvenálás

Az elmúlt évek során megjelentek az úgynevezett **új-generációs szekvenálás**i technikák (*next-generation sequencing)*, amelyek nagy előrelépést jelentettek a szekvenálás területén azáltal, hogy lehetővé teszik egy kísérletben akár 10^5-10^6 különböző DNS-minta párhuzamos és gyors, automatizált leolvasását (**nagy áteresztőképességű, HTP**: *high-throughput* **módszer**). Ezen eljárások során nincs szükség a DNS-láncok időigényes, méret szerinti elválasztására. Szintén enzimatikus módszerekről van szó, de már nem csak az új szál szintézisén alapulnak (a részletekre ebben a könyvben nem térünk ki). Hátrányuk, hogy valamivel több hibát ejtenek, mint a Sanger-módszer, és egy reakció során viszonylag rövid (néhány 100 bázis) DNS-darabot lehet csak szekvenálni.

Elsősorban a funkcionális és a környezeti genomika (metagenomika, azaz mikrobiális genomok elválasztását nélküli együttes analízise környezeti mintákból), valamint a transzkriptomok vizsgálata területén alkalmazzák őket. Fontos megjegyezni, hogy ezek a módszerek nem csak **DNS-szekvenálás**ára, hanem **mRNS**, **kis RNS-ek** és az ún. kromatin immunoprecipitációval előállított génexpresszió szabályozásban résztvevő DNS régiók szekvenálására is alkalmasak.

A második generációs szekvenátorok gyártása és fejlesztése különálló iparággá nőtte ki magát. Számos biotechnológiai cég kínál egymástól eltérő módszereken alapuló szekvenátorokat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.6. Irányított *in vitro* mutagenezis

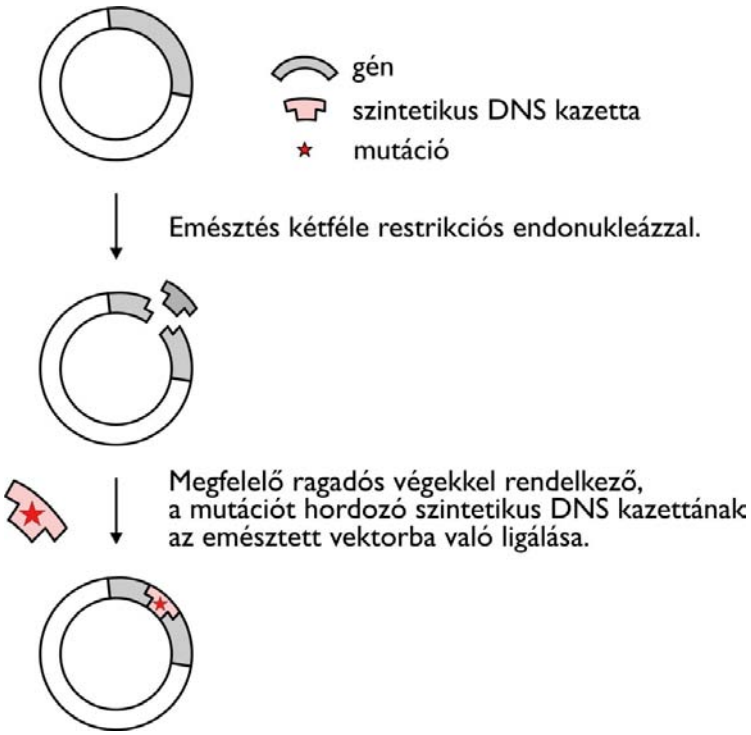
Géntechnológiai módszerekkel lehetőség nyílt arra is, hogy a DNS-szakaszok információtartalmát tervezetten, irányítottan megváltoztassuk. A változtatás folyamatát **irányított (hely-specifikus) mutagenezis**nek nevezzük. Ezzel beköszöntött a „**reverz genetika**” korszaka. Ettől kezdve nem kell a véletlen mutációkra hagyatkozni, amelyek segítségével – miután azonosítottuk a mutáns gént – az elromlott gén funkciójára következtethetünk, hanem fordított sorrendben, először kitaláljuk, hogy melyik gén funkciójára vagyunk kíváncsiak, majd azt célzottan megváltoztatjuk.

E változtatásokat leggyakrabban a gének szabályozó szakaszain vagy a gének kódoló régióján végzik, s a cél a gének vagy az általa kódolt RNS molekulák illetve fehérjék működésének vizsgálata. Az irányított mutagenezis segítségével tetszőleges mutációkat vihetünk be rekombináns fehérjék génjébe, bármilyen aminosavat bármilyen másikra cserélhetünk (szubsztitució), kihagyhatunk (deléció) vagy betoldhatunk (inzerció) előre megtervezett módon (**racionális fehérjemérnökség)**. A mutációk hatásának vizsgálatával megérthetjük azt, hogy ezek a fehérjék hogyan működnek. Ez az egyik legelterjedtebb módszer annak vizsgálatára, hogy egyes aminosav oldalláncok milyen szerepet játszanak adott fehérje térszerkezetének stabilizálásában, egy enzimatikus reakció hatásmechanizmusában, egy kölcsönhatás kialakításában és így tovább (ezek a kísérletek tehát a fehérjék szerkezet-funkció összefüggéseinek feltárására irányulnak).

A mutációk révén megváltozott tulajdonságú fehérjék hozhatók létre, melyek valamilyen szempontból előnyösebbek lehetnek, mint az eredeti forma. Említsünk meg egy „fehérjemérnöki” módon előállított fehérje példát. A mosóporokban használt fehérjebontó enzim, a szubtilizin egy bakteriális proteináz. Az enzimben van egy metionin, melynek oxidációja tönkreteszi a működését. A mutáns enzim, melyben a metionin helyett alanin vagy szerin van, ellenáll az oxidációnak, ezért fehérítőszerekkel együtt is használható.

A rekombináns DNS-en történő változtatások közül deléciót restrikciós enzimek (és DNS-ligáz) alkalmazásával lehet egyszerűen létrehozni. A másik két mutációs lehetőség, az inszerciós illetve a szubsztitúció is könnyen végrehajtható az ún. **kazetta mutagenezis** segítségével (lásd **19.27. ábra**).

A mutálandó DNS fragmentumot egy dupla szálú plazmid tartalmazza. Két restrikciós endonukleáz emésztésével hasítjuk ki a mutálandó DNS szakasz környezetét, majd a megfelelő ragadós véggel rendelkező, **mutációt tartalmazó szintetikus oligonukleotidok**kal elkészített DNS kazettát T4 DNS-ligáz segítségével a plazmidba ligáljuk és *E. coli* baktériumba transzformáljuk.



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.27. ábra: A kazetta mutagenezis sémája

Hely-specifikus mutációk bevitelére egy ennél általánosabb módszert dolgozott ki **Michael Smith 1978-ban** (amiért 1993-ban Nobel-díjat kapott, megosztva Kary Mullis-szel a PCR felfedezőjével), amihez **egyszálú templát DNS**-re, **mutációt tartalmazó oligonukleotid primer**re és **DNS-polimeráz**ra van szüksége.

Smith egyszálú templátot állított elő M13-alapú rekombináns DNS-ről, amihez olyan oligonukleotid primert adott, amely mutációt tartalmazott. A hibridizáció megtörténik akkor is, ha a templát és a szintetikus oligonukleotid között nem 100%-os a komplementaritás (azaz ha van „*mismatch*”), s a DNS-polimeráz is primerként tudja használni a mutáns oligonukleotidot, feltéve, hogy a 3’-végen legalább 8-10 nukleotid Watson-Crick bázispárosodással kapcsolódik a templáthoz. A DNS-polimeráz megszintetizálja az új szálat úgy, hogy gyakorlatilag körbeírja az egyszálú templát rekombináns DNS-t (lásd a **19.28. ábra** első lépéseit).

Viszont van még egy probléma, nevezetesen, hogy egy olyan DNS-t keletkezett, aminek az egyik szála vad-típusú (az eredeti szekvencia), a másik mutáns (ez egy **heteroduplex DNS**). Kérdés, hogyan lehet ezek után előnyt biztosítani az újonnan készült mutáns szálnak a templát, vadtípusú szállal szemben? Számos módszert kidolgoztak az elmúlt évtizedekben, amelyek mind az eredeti **templát szál szelektív lebontásá**n alapszanak. Közülük a ma már klasszikusnak számító **Kunkel-módszer**t mutatjuk be.

19.6.1. Hely-specifikus mutagenezis Kunkel-módszerrel

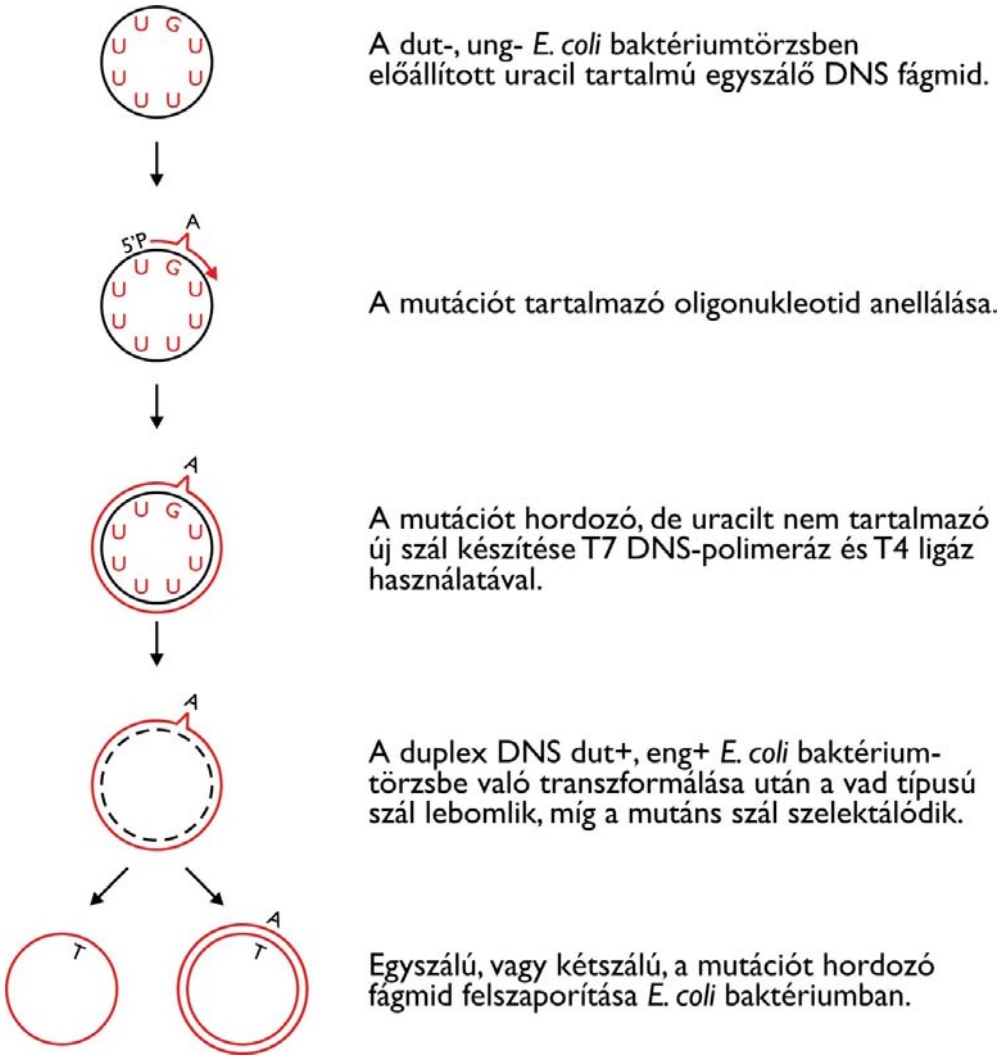
A **helyspecifikus mutagenezis** ugyan egyik legrégebbi, de néhány területen még a ma is használatos módszerét Thomas **Kunkel 1985**-ben közölte. A módszer a következő lépésekből áll (lásd **19.28. ábra**).

Az inszertet tartalmazó M13-alapú vagy **fágmid konstrukcióról egyszálú DNS**-t hoznak létre, ami a mutagenezis során **templát**ként fog szolgálni. Ezek a konstrukciók *E. coli* sejtekben képesek kétszálú DNS plazmidként szaporodni (ez a **replikatív forma**, lásd **19.2.4.3**), egy *helper* fág hatására azonban egyszálú DNS másolatok jönnek létre. A második lépésben a fentebb ismertetett módon mutáns oligonukleotid primer és DNS-polimeráz használatával heteroduplex DNS-t hoznak létre, amit *E. coli* sejtekbe transzformálnak.

A sejten belül a mutáns szál **szelekciój**ának az **alapja**, hogy a templátként szolgáló **vad-típusú egyszálú fágmid** timin helyett nagyrészt **uracilt tartalmaz**. Ezt úgy érik el, hogy az egyszálú DNS templátot olyan ***E. coli* törzs**ben szaporítják, amiben **hibás adUTP-áz és uracil-N-glikozidáz gén** (dut$^-$-, ung$^-$- törzs, lásd **19.28. ábra**).

A két enzim azért felelős, hogy egyrészt a sejtben a bioszintetikus utakon keletkező, de a nukleinsavak szintéziséhez nem szükséges dUTP-t eltávolítsa (dUTP-áz), másrészt a DNS-be véletlenül beépült vagy mutációval keletkezett uracilt egy hibajavító mechanizmus első lépéseként (lásd **13.12.3.2. fejezet**) eltávolítsa (uracil-N-glikozidáz). A két enzim hiányában **uracil is beépül a DNS-be**, s végső soron a rekombináns vírusrészecskékben található egyszálú rekombináns DNS is uracil tartalmú lesz.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.28. ábra: A Kunkel-féle helyspecifikus mutagenezis módszer

A mutációt tartalmazó második szál T7 DNS-polimerázzal történő *in vitro* elkészítéséhez dUTP-t nem használnak fel, ezért az újonnan szintetizált szál uracilt nem tartalmaz. A következő lépésben a vad típusú, uracilt tartalmazó, és a **mutáns,** uracilt nem tartalmazó heteroduplex **DNS-t normál *E. coli* törzsbe transzformálják**, amiben az uracil-N-glikoziláz enzim hatására a vad-típusú DNS lebomlik, s szelektáltan csak a mutáns szálról készülnek replikatív formák, amiket izolálni lehet, mint hely-specifikus mutáns rekombináns DNS-t. Természetesen a mutáció meglétét szekvenálással ellenőrizni kell.

19.7. Rekombináns fehérjék előállítása

A rekombináns DNS technológia egyik legfontosabb vívmánya, hogy a kutatások tárgyát képező fehérjéket nagy mennyiségben, viszonylag egyszerűen lehet előállítani géntechnológiai úton. A vektorokat bemutató alfejezetben volt róla szó, hogy ehhez **expressziós vektorok**at kell használni, amely segítségével az inszertek kódolta szekvencia kifejezhető.

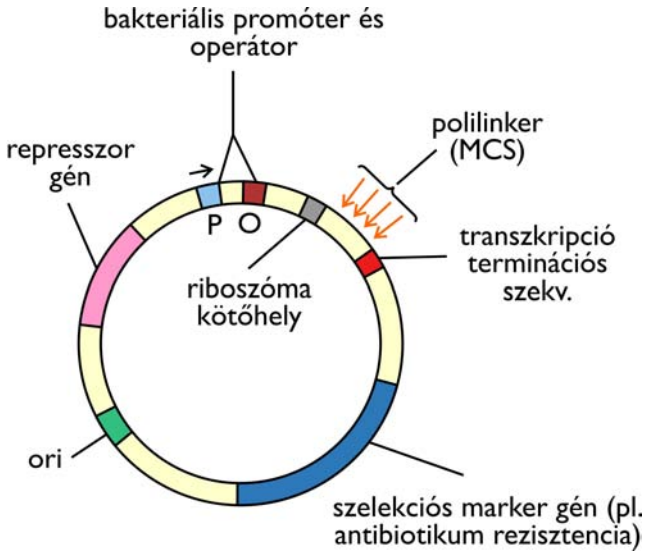
Az expressziós vektoron olyan DNS elemeknek kell lenniük, amelyeket felismer a gazdasejt transzkripciós és fehérjeszintetizáló apparátusa. Bakteriális gazdasejt esetén ezek a transzkripcióhoz szükséges bakteriális **promóter** és **transzkripciós terminátor** szakasz, iiletve a transzlációhoz szükséges, az mRNS riboszómához való kötődését biztosító **Shine-Dalgarno-szekvencia** (RBS: *ribosome binding site*). A genetikai kód univerzális volta miatt intron-mentes eukarióta cDNS-ek is expresszálhatók baktériumban. A rekombináns DNS-ről keletkezett fehérjét (akkor is, ha a szekvenciája megegyezik az eredeti a természetes forrásból kivont fehérje szekvenciájával) **rekombináns fehérjé**nek nevezzük.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A **gazdasejt** nem csak **baktérium** lehet, hanem eukarióta **élesztő** (pl. *S. cerevisiae)* vagy más eukarióta sejtvonal vagy akár **transzgenikus állat és növény** is. Ezek a gazdasejtek is képesek **heterológ expresszió**ra, vagyis arra, hogy nem a saját, hanem más fajból származó fehérjéket termeljenek. Mindegyik rendszernek vannak előnyei és hátrányai, valamint megvannak a saját expressziós vektorai. Hozzátesszük még, hogy léteznek ***in vitro* expressziós rendszerek** is, ahol sejtmentes rendszerben, de sejtkivonatokból származó riboszómák segítségével lehet rekombináns fehérjéket előállítani, bár az *in vivo* módszereknél kisebb mennyiségben (sőt, ezek a rendszerek időben megelőzték a heterológ rendszereket, lásd a genetikai kód feltörésénél használt kóli sejtkivonatot).

19.7.1. Prokarióta expressziós rendszerek

Egy tipikus prokarióta expressziós vektor térképét és a lényeges DNS elemeket az **19.29. ábra** mutatja be.



19.29. ábra: Egy expressziós vektor térképe

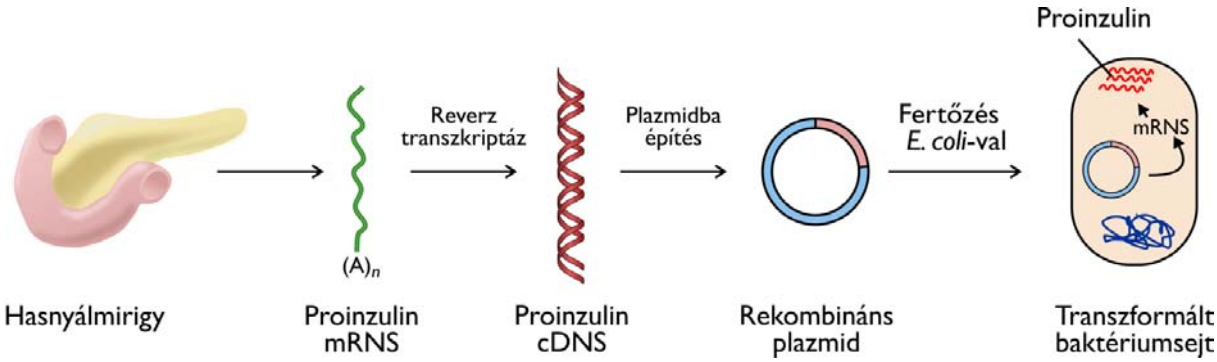
A legtöbb DNS-elemről a korábbiakban már volt szó. A legfontosabb a **promóter**, hiszen ez fogja eldönteni a transzkripció mennyiségét (gondoljunk rá, hogy az esetek többségében a fehérjét „túltermeltetni" (*overexpression*) akarjuk, vagyis olyan nagy mennyiségben előállítani, amit még a gazdasejt elvisel. Ez a legjobb expressziós rendszereknél akár a teljes fehérjemennyiség 50%-a is lehet. Korábban gyakran használták a **laktóz** operon **promóter**ét is, de a legnépszerűbb vektorokban egy, a T7 bakteriofágok által használt promóter található. A **T7 promótert** kizárólag a T7 fág RNS-polimeráz enzime ismeri fel, a kóli saját RNS-polimeráza nem, ezért amíg a sejt nem termel T7 RNS-polimerázt, a gén nem expresszálódik. Azt számos különböző módon lehet biztosítani, hogy a gazdasejtben jelen legyen a T7 RNS-polimeráz génje, mégpedig indukálható formában.

A promóter mellett az expressziós vektorok további **szabályozó elemek**et is tartalmaznak. Az **19.29. ábra** szerepel egy **operátor** régió, ami leggyakrabban a laktóz operonból származik. A szabályozott expresszióval, a rekombináns fehérje expresszióját akkor lehet bekapcsolni a szintetikus és **nem-metabolizálódó induktor**, az IPTG hozzáadásával, amikor a gazdasejtet már nagy mennyiségben felszaporodott. Ezzel ki lehet védeni az idegen fehérje esetleges toxikus hatását. Vegyük észre, hogy a bemutatott expressziós vektor térképén a **lac-represszor gén** is szerepel, tehát extra mennyiségben termelődik a sejtben a represszor fehérje, s ezáltal gátolni tudja nem csak a bakteriális kromoszóma lac-operonját, hanem a több kópiában jelen levő expressziós vektor transzkripcióját is, a lac-oporátorokhoz kötődve.

A legelső, gyógyászati célra használható **rekombináns humán** fehérjét *E. coli* sejtekben állították elő. Ez a rekombináns **inzulin** volt (lásd **19.30. ábra**), amelyet a Genentech géntechnológiai cég 1978-ban állított elő, majd egy nagy gyógyszeripari cég Humulin néven hozott gyógyszerként forgalomba 1982-ben. Korábban a cukorbetegek sertés inzulint kaptak a humán inzulin pótlására, ami egyeseknél immunreakciót váltott ki.

Genetikailag módosított baktériumokkal terápiás célra használható sok másfehérjét is előállítanak, így például véralvadási faktorokat, vagy növekedési hormonokat.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.30. ábra: Rekombináns humán inzulin előállítása *E. coli* sejtekben

19.7.2. Rekombináns fehérjék előállításának további lehetőségei

Ahogy említettük, rekombináns fehérjét **eukarióta expressziós rendszer**ben, sejtkultúrában, de transzgenikus élőlényekben (lásd a következő alfejezet) is elő lehet állítani. Mikor használnak az olcsón és egyszerűen tenyészthető baktériumsejtek helyett komplikáltabb és drágább expressziós rendszereket?

Ennek számos oka lehet. Amennyiben a cél a fehérje túltermeltetése, nem biztos, hogy egy emlős fehérje a prokarióta sejtben natív formában fog termelődni – lehet, hogy a feltekeredése nem lesz megfelelő (például a baktériumból hiányzó eukarióta dajkafehérjék hiányában), vagy nem készülnek el azok a poszttranszlációs módosulások (például glikoziláció), amelyek az eukarióta fehérje működéséhez szükségesek.

Gazdasejtnek szóba jöhetnek **élesztő, rovar és emlőssejtek**. A **rovarsejt**-specifikus **bakulovírus vektorok** segítségével igen hatékony fehérjetermelő rendszereket hoztak létre. Nemcsak sejteket, hanem molylepkék lárváit is lehet velük fertőzni, s a bábokból, mint fehérjegyárból lehet kinyerni a rekombináns fehérjéket.

Miben különböznek az **eukarióta expressziós vektorok** a prokariótákétól? Először is a klónozás mindig baktériumban történik, tehát olyan vektorokat használnak, amelyek **tartalmaznak bakteriális replikont** is. Az inszert expressziójához szükséges promóternek természetesen eukarióta eredetűnek kell lennie. Túltermeltetésre kiválóan alkalmasak az **erős vírus promóterek** (leggyakrabban citomegalovírus promótert használnak). A vektorok tartalmazhatnak további szabályozó elemeket, így például **enhanszer elem**et is.

Egy másik kísérleti ok, amiért eukarióta rendszert választanak gazdának az, hogy a **rekombináns fehérjét** a **saját környezetében** akarják **tanulmányozn**i. További, már említett előny, hogy a fehérje esetleges poszttranszlációs módosulásai a prokariótában nem, vagy nem megfelelően mennek végbe.

Amennyiben sejten belül akarják tanulmányozni egy fehérje működését, nagy segítséget nyújt, ha a vizsgált fehérjét ún. **fúziós fehérje**ként GFP-vel összekapcsolva expresszáltatják.

A **GFP (*Green Fluorescence Protein*)** egy zöld színben fluoreszkáló fehérje, „molekuláris lámpásként” használható. Ez az eredetileg egy, a Csendes-óceánban élő medúzából (*Aequoria victoria*) származó 27 kDa tömegű fehérje, amelynek felfedezéséért és a géntechnológiába történő bevonásáért három kutató, Osamu **Shimomura**, Martin **Chalfie** és Roger **Tsien** 2008-ban Nobel-díjat kapott. A GFP a feltekeredése után a levegő oxigénjének hatására olyan kovalens módosuláson megy keresztül, ami egy intramolekuláris, kizárólag a polipeptidlánc **három aminosavmaradékából kialakuló fluorofór**t hoz létre. Ez kék színű fénnyel gerjesztve zöld fényt emittál. A zöld béta-hordó szerkezetű fehérje (lásd **19.31. ábra**) nagyon stabil, s majdnem minden fehérjével fúziós formában összekapcsolva is megőrzi fluoreszcenciáját.

A **fúziós fehérje** a rekombináns DNS szintjén valósul meg úgy, hogy a GFP kódoló régiója és a vizsgált fehérje kódoló régiója **egy transzlációs egység**et alkot. A fúziós konstrukciót úgy alakítják ki, hogy az N-terminális fehérje kódoló régiójának végéről a stop kodont eltávolítják, s azonos leolvasási keretben a fúziós partner start kodonjával kapcsolják össze. Így egy közös nyitott leolvasási keret (ORF: *open reading frame*) alakul ki, amiről egy fúziós (más néven kiméra) fehérje keletkezik. A két fehérje kódoló régiója közé sokszor egy flexibilis linkert kódoló

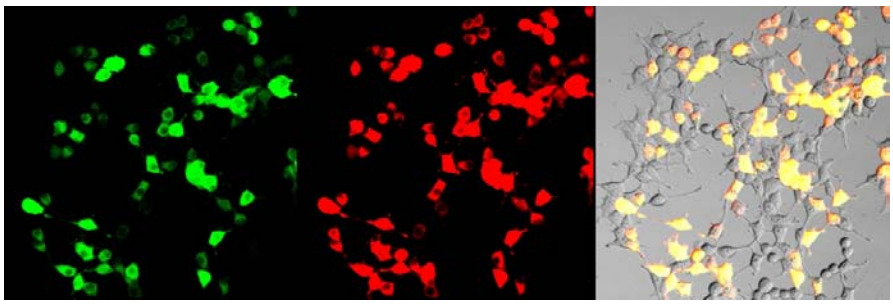
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szakaszt építenek be, ami lehetővé teszi, hogy a riboszómán történő szintézis után a két lánc önállóan tekeredjen fel és mindkettő funkcióképes legyen az adott gazdasejtben.



19.31. ábra: A GFP (zöld fluoreszcens fehérje) térszerkezete. A három aminosavból autokatalízissel kialakuló fluorofórt zöld golyókkal jelöltük (PDB: 1EMA)

Léteznek olyan vektorok is, amelyek a **GFP** hely-specifikus mutagenezissel előállított, **különböző színű variánsait** (pl. **YFP: sárga**, **CFP: ciánkék színű**), illetve a GFP-vel nem rokon, más színű fluoreszcens fehérjét (pl. **DsRed: vörös**) kódolják fúziós címkeként. Ezek a fúziós címkék más-más hullámhosszú fénnyel gerjeszthetők, és máshol van az emissziójuk. Segítségükkel akár két különböző színnel jelölt fehérje együttes expressziója (koexpressziója) és a sejten belüli lokalizációja, akár kölcsönhatásuk (kolokalizáció) könnyen nyomon követhető. Egy ilyen kísérlet eredményét (egy zöld- és egy vörös-fúziós fehérje kolokalizációja, ami a képen sárga színnel jelenik meg) mutatja be a **19.32. ábra.**



19.32. ábra: Két, különböző fluoreszcens festékkel megjelölt fehérje sejten belüli kolokalizációja. A bal oldali és a középső ábrán a két fehérjét külön-külön transzfektálták egy emlős sejtvonalba. A jobb oldali ábrán koexpressziót végeztek, s a két szín „keveréke” a két fehérje együttes lokalizációjára utal.

19.8. Transzgenikus élőlények és génterápia

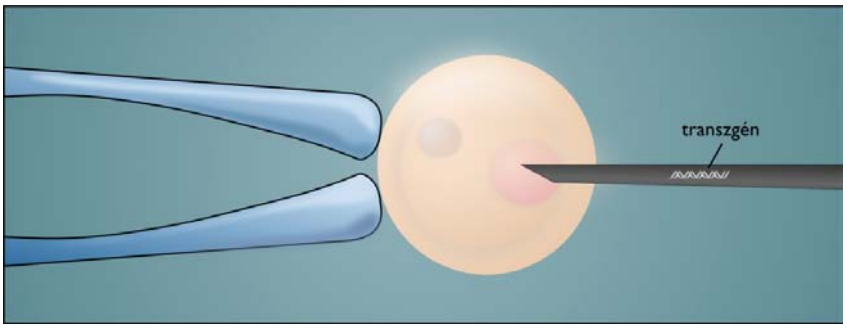
A **genetikailag módosított élőlények (GMO**: *Genetically Modified Organism*) magukba foglalják az összes olyan szervezetet, melyek genetikai anyagát módosították valamely géntechnológiai módszerrel. A **transzgenikus élőlény** pedig egy olyan **GMO, melybe egy másik szervezetből izolált gént juttatunk be**, amit eredetileg az nem tartalmazott. Az így „kívülről” bejuttatott, exogén eredetű transzgén öröklődik az utódokban, ha az a csíravonalba került be.

19.8.1. Transzgenikus állatok

Transzgenikus állatok előállítása többféle módszerrel történhet. Emlősök frissen megtermékenyített petesejtjébe, a még nem fuzionált hímivarsejt pronukleuszba (ami nagyobb, mint a petesejt nukleusza) **mikorinjektálás**sal be

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

lehet juttatni néhány pikoliter DNS-t (lásd **19.33. ábra**), és az véletlenszerűen beépülhet a genomba. Egerek petesejtjével elvégezve a kísérletet, a sejtek kb. 2%-ában az új gén beépül valamelyik kromoszómába. Néhány osztódás után a transzgént tartalmazó korai embriót egy álvemhes nőstény méhébe ültetik, amelyből szerencsés esetben transzgenikus állat születik. A transzgén beépülését a fiatal egér levágott farokvégéből izolált DNS-sel végzett Southern-lenyomat kísérlettel ellenőrzik.



19.33. ábra: Megtermékenyített petesejt mikroinjektálása (balra támasztó pipetta, jobbra kapilláris, a transzgén DNS oldattal; a DNS-t a hím pronukleuszba injektálják)

Az **első transzgenikus állat**ot Brinster és Palmiter 1982-ben állították elő, amikor is egy **egér megtermékenyített petesejtjének pronukleuszába** mikroinjektálással **patkány növekedési hormon** (GH) transzgént juttattak. A híres egér ikerpár a *Nature* folyóirat címlapjára is rákerült (lásd **19.34. ábra**). 1985-re nyúl, bárány illetve sertés megtermékenyített petesejtjébe is sikerült mikroinjektálással transzgént bevinni.

Megjegyzendő, hogy a patkány GH transzgént tartalmazó egér nem azért lett nagyobb, mert a patkány GH az állat méretét szabja meg, hanem az ún. **dózishatás** miatt, azaz több patkány transzgén épült be véletlenszerűen az egér genomba. A transzgént a **nehézfémekkel szabályozott metallotionein gén promóter**e mögé építették be a rekombináns DNS konstrukcióba.



19.34. ábra: A patkány növekedési hormon transzgént tartalmazó egér (bal) és vad típusú testvére (jobb) a Nature folyóirat címlapján *(Vol. 300,1982. december 16 ; a Nature Publishing Group engedélyével)*

A módszer tehát lehetőséget teremtett arra, hogy bármilyen gént bejuttassanak az állatok genomjába úgy, hogy az minden szövetben és sejtben jelen legyen. Az így módosított organizmusban a gént szabályozó régiók megfelelő megválasztásával lehetséges indukált, vagy konstitutív fehérjeexpressziót létrehozni, akár szövet-, vagy sejtspecifikus módon.

Számos **rekombináns fehérjét** termelnek **emlőmirigy specifikus promóterrel** rendelkező génkonstrukciókkal **transzgenikusemlősben** (kecskében, juhban, sertésben). Az így termelt α-antitripszin (az emfizéma, tüdőtágulás gyógyszere lehet), antitrombin-III (véralvadási gyógyszer) és a szöveti plazminogén aktivátor (TPA; többek között szívinfarktus után közvetlenül a vérrögök feloldására szolgáló gyógyszerfehérje) gyógyszerként történő alkalmazását már engedélyezték vagy engedélyezés alatt állnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

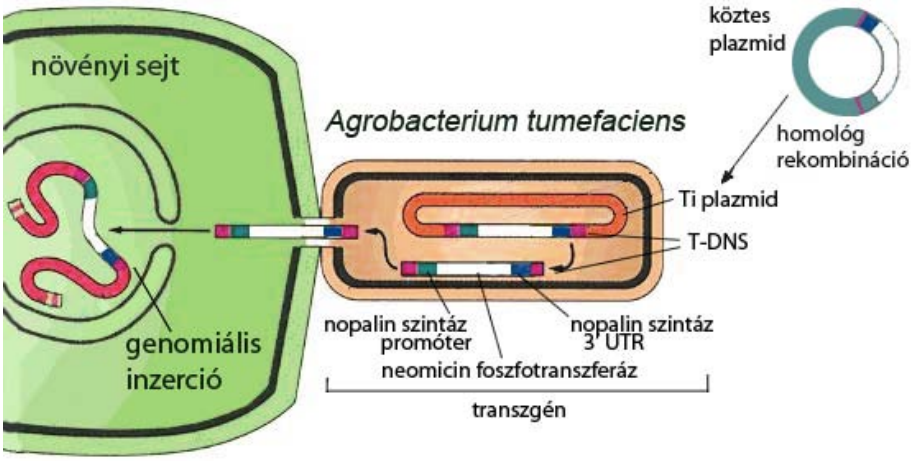
19.8.2. Transzgenikus növények

A transzgenikus növények előállítására is többféle módszer áll a rendelkezésünkre. A legrégebben ismert, és ma is az egyik leggyakrabban használt eljárás egy különleges növényi parazita, az ***Agrobacterium tumefaciens*** tumor indukáló (**Ti**) **plazmid**ját használja. Ez a baktérium többféle **kétszikű növény** gyökerén élősködik, s képes a plazmid egy darabját (**T-DNA**; tumor-okozó DNS) egy, a bakteriális konjugációhoz hasonló folyamattal a gazdanövény sejtjeibe bejuttatni (lásd **19.35. ábra**).

A transzgént egy ún. köztes vektorba klónozzák (a Ti plazmid ~200 kbp méretű, ezért közvetlenül nem lehet klónozásra használni), amiről aztán *E. coli* sejtekben homológ rekombinációval kerül át a Ti plazmid-alapú vektorba, a daganatképző és a baktériumot ellátó tápanyagok szintéziséért felelős gének helyére. (Ez utóbbiak közé tartozik a nopalin-szintáz, aminek a promótere eukarióta típusú – mivel a természetes plazmiddal kerül át a növénybe és ott is aktív –, ezért mögé kerül a transzgén.)

A konstrukciót *Agrobacterium* sejtekbe transzformálják, majd a baktériumokkal megfertőznek megsebzett leveleket. A baktérium Ti plazmidjából a növényi sejtekbe konjugációval bekerült **rekombináns T-DNS,** mely tartalmazza a transzgént is, a **növényi sejtek genomjába** véletlenszerűen beépül**.** A megfelelő plazmiddal transzformált növényi sejtek antibiotikum jelenléte mellett szelektálhatóak (a **19.35. ábrán** bemutatott kísérletben neomicinnel szelektálnak, mivel a T-DNS-be a transzgén mellett neomicin-foszfotranszferáz gén van).

A transzgént felvett sejtekből **a transzgenikus növényt regenerációval** állítják elő (a növények jó részét szomatikus sejtekből is regenerálni lehet növényi hormonok, auxinok jelenlétében).



19.35. ábra: *Agrobacterium*-közvetített génátvitel növényi sejtbe. A transzgenikus növények előállításának egyik típusa az *Agrobacterium tumefaciens* talajbaktériummal történő fertőzés, mely segítségével a növényi genomba beépülő T-DNS-ről történik a transzgén átírása.

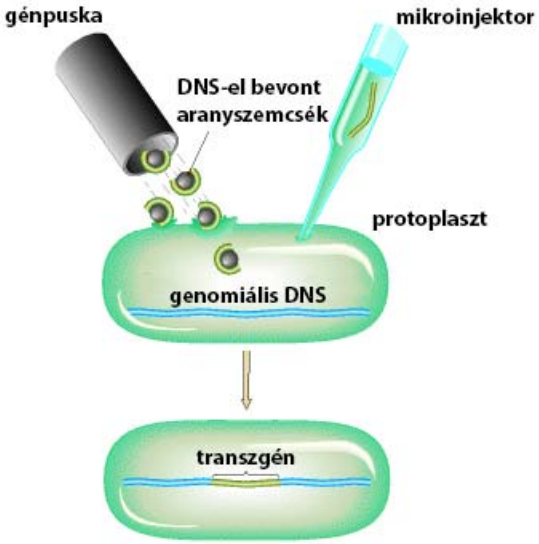
Egyszikű növényi sejtekbe is be lehet transzgént juttatni **elektroporációval**, miután a sejtfalat celluláz enzimmel eltávolították (ezáltal **protoplaszt**ot hoztak létre).

Végül megemlítünk egy szellemes génbejuttatási módszert, amit manapság leginkább használnak transzgenikus kultúrnövények (szójabab, kukorica, rizs) előállítására. Ez az ún. **génpuska** (lásd **19.36. ábra**). A bejuttatandó DNS-t arany vagy volfrám részecskék felszínén lövik be (400 m/s-os sebességgel) növényi protoplasztokba, meglepően jó hatékonysággal.

A következőkben bemutatunk néhány példát arra, hogy milyen transzgéneket juttatnak be növényekbe. Az elsők között (1987-ben) rovarra toxikus fehérjét termelő transzgént tartalmazó dohánynövényt állított elő. Ez volt a Bt dohány, amibe *Bacillus thuringiensis* baktériumban termelődő endotoxin génjét vitték be, ami rovarölő hatású fehérjét termel. A Bt növények alkalmazhatóságával kapcsolatban az az aggály, hogy mivel az ilyen növényeket nemcsak a kórokozók, hanem a közelben élő más rovarok is elfogyaszthatják, a toxin ezek populációit is pusztíthatja.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

2000-ben állították elő az első olyan transzgenikus növényt, az **aranyrizs**t, melynek a tápértékét sikerült javítani. Nevét sárgás színéről kapta, mely β-karotin termelésének köszönhető. A cél a főleg a harmadik világot érintő A-vitamin hiány miatti nagyfokú elhalálozás (és vakság) visszaszorítása volt. Habár humanitárius célokat szolgál, negatív visszhangot váltott ki a közvéleményben elsősorban transzgenikus volta miatt. (A β-karotin előállításához, ami az A-vitamin prekurzora (lásd **11.3.2. fejezet**), két enzim hiányzik a rizs terméséből, ezeket vitték be transzgénként.)



19.36. ábra: Génpuska, egy új DNS génbeviteli eszköz működési sémája

19.8.3. Génterápia

A génterápia célja, hogy genetikailag hibás testi sejtek genomját módosítsa emberben, a helyes gén bevitelével pótolva az „elromlott” gén szerepét. Az emberi zigóta, vagy az ivarsejtek genetikai módosítása etikai normákat sért, ezért **a génterápia csak a szomatikus sejtek genetikai állományát célozza meg.** Kétféle szomatikus sejttípust használhat a génterápia: **őssejteket és differenciált**, nem osztódó **sejtek**et.

A génterápia legfontosabb kérdése, hogy milyen **hordozó vektor**ral juttassák be a terápiás gént a célsejtekbe. Erre a célra **többféle vírus-alapú vektor**ral kísérleteznek, amelyek közül megemlítjük a **retrovírusok**at, **adenovírusok**at és az **adeno-asszociált vírusokat.**

Az **őssejtek** esetében a terápiás gént hordozó vektor általában retrovírus, ami beépül a genomba, így osztódást követően is jelen van az utódsejtekben. Génterápiára jelenleg kétféle forrásból származó őssejtet használnak, az egyik a csontvelőből származó hematopoetikus őssejt, a másik egy, a bőr alsó rétegében található őssejttípus. Ezek az őssejtek viszonylag könnyen hozzáférhetőek, és *ex vivo* is fenntarthatók. A génterápia másik célpontja - **differenciált**, nem osztódó **sejtek** - esetében, a vektor nem feltétlenül kell, hogy beépüljön a genomba, ezért a retrovírus vektorok mellett DNS vírusokkal is kísérleteznek.

A **retrovírusok** egyszálú RNS genommal rendelkeznek, mely a fertőzött sejtben a virális **reverz transzkriptáz** és **integráz** enzimek segítségével kétszálú DNS-sé íródik, és beépül a fertőzött sejt genomjába. A terápia egyik eleme egy olyan vektor DNS, melyben fontos virális géneket cserélnek le a terápiás gén beépítésekor (**rekombináns vírus**). A vektor tehát önálló vírusként nem funkcionál. A másik elem egy ***helper*** (segítő) **vírus**, mely képes termelni az összes szükséges virális fehérjét (reverz transzkriptáz, integráz, burokfehérjék stb.), de hiányzik a genomjából egy szakasz, ami a genom virális részecskébe pakolásához kell. A két elem együttes alkalmazásával olyan vírusok keletkeznek, melyek tartalmazzák a terápiás gént, hordoznak reverz transzkriptázt és integrázt, vagyis a DNS beépülhet a genomba, de a beépült vektor DNS már nem funkcionál többé vírusként.

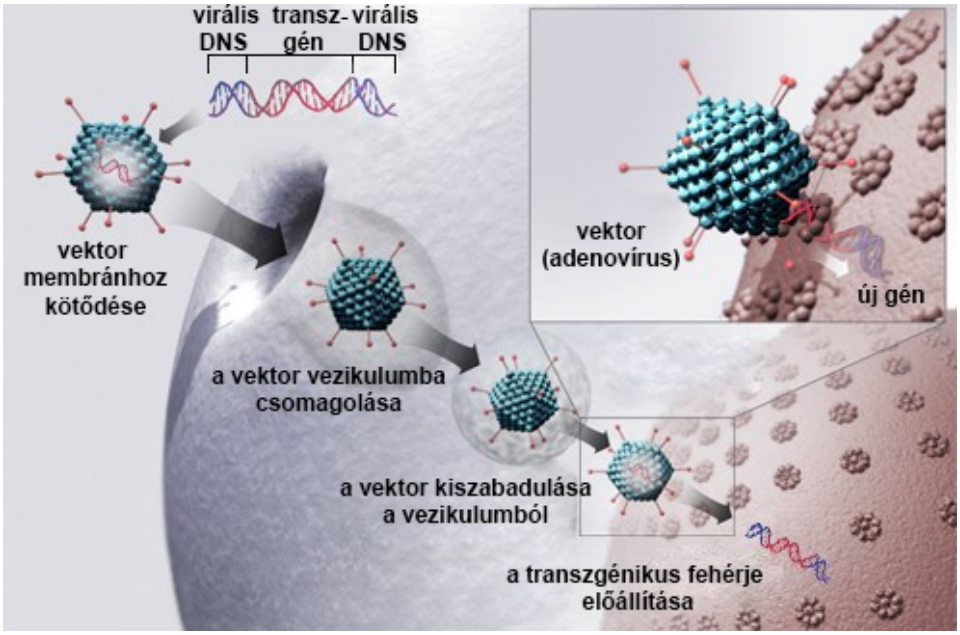
A jelenleg rendelkezésre álló retrovírus vektorok esetében a vektor genomba integrálódása nem specifikus, és a véletlenszerű beépülés más gének tönkremeneteléhez vezethet. A véletlenszerűen beépült vektor érintetlenül hagyja

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

az eredeti hibás gént, vagyis csak akkor ígéretes a terápia, ha a hibás gén funkciókiesést jelentett, nem pedig funkcióváltozást. A helyspecifikus rekombináció lehetővé tenné a hibás gén cseréjét, tehát megoldaná ezt a gondot – de egyelőre ilyen vektorok nem állnak rendelkezésünkre.

Az **első génterápiás kísérletet 1990**-ben végezték, egy **adenozin-dezamináz (ADA) enzimhiányos, súlyos kombinált immundeficiencia** (**SCID**: *severe combined immunodeficiency*) betegségben szenvedő pácienssel. A betegből eltávolított csontvelői őssejteket **retrovírus konstrukcióval** fertőztek, amely funkcionális ADA gént tartalmazott, majd a sejteket visszajuttatták a szervezetbe. Azóta sok száz hasonló, retrovíruson alapuló génterápiát alkalmazó klinikai tesztről számoltak be, különböző, elsősorban immunsejtek kóros működésével összefüggő betegségek gyógyításával kapcsolatban, egyelőre felemás eredménnyel, a már jelzett okok miatt.

A **adenovírusok kétszálú DNS genom**mal rendelkeznek és nem épülnek be a genomba. A sejtmagban **extrakromoszómális**an átmenetileg fennmaradnak, de a sejtosztódás után „kihígulnak", tehát az ilyen alapú vektor konstrukciókat folyamatosan újra be kell juttatni szervezetbe. Előnyük viszont, hogy a nem-specifikus integráció miatti problémák ennél a vektor típusnál nem állnak fenn. Egy ilyen, adenovírussal-közvetített génterápiás kísérletet mutat be a **19.37. ábra.** A rekombináns vírus receptor-közvetített endocitózissal jut be a sejtekbe. A sejt belsejében a vezikulum lebomlik, a vírusvektor kiszabadulása után a sejtmag pórusaihoz asszociálódik. A sejtmagba a rekombináns vírus DNS-ről a terápiás gén átíródik, a mRNS visszajut a citoplazmába és szintetizálódik a terápiás célú fehérje.



19.37. ábra: Egy lehetséges génterápiás hordozó vektor, az adenovírus célsejt fertőzési lépései *(forrás: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gene_therapy.jpg)*

Az **adeno-asszociált vírus** viszont egy adott helyre integrálódik a 19-es kromoszómán. Ezzel a betegséget nem okozó és csak gyenge immunválaszt kiváltó vektorral szintén számos génterápiás kísérletet hajtottak már végre. Az **egyszálú DNS genom**mal rendelkező vírusból olyan vektorokat hoztak létre, amelyekbe (itt nem ismertetett módon) helper vírusok segítségével lehet bevinni a terápiás gént. A vírus különböző szerotípusai különböző és már nem osztódó gazdasejteket fertőznek – mind a két tulajdonságuk ígéretes génterápiás vektorrá teszi őket.

Végül megemlítünk egy olyan lehetőséget is, ahol vírus-alapú génbejuttatás helyett a terápiás gént **transzpozon**nal viszik be a gazdasejt genomjába. A magyar kutatók közreműködésével kifejlesztett *Sleeping Beauty* (Csipkerózsika) nevű transzpozon is ígéretes génterápiás eszköz lehet. (A transzpozonok olyan genetikai elemek, „ugráló gének" amelyek mindössze egy gént tartalmaznak, a transzpozázt, ami képes kivágni a transzpozont a genomból és áthelyezni akár sok kópiában is a genomban. Barbara McClintock fedezte fel őket kukoricában 1951-ben, de csak jóval később tárták fel, hogy az élővilágban általánosan elterjedtek. Ezzel is magyarázható, hogy a felfedező csak 1983-ban kapott Nobel-díjat.)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

19.9. Célzott génmódosítás *in vivo*: génkiütés és géncsendesítés

A molekuláris szintű biológiai kutatások egyik fő célja, hogy az élő rendszeren belül derítsék ki a gének és a fehérjék szerepét és működését. Van-e lehetőség arra, hogy a hely-specifikus mutagenezis kapcsán már említett fordított genetikai megközelítést ne csak egy-egy sejt, hanem egy soksejtű organizmus szintjén is alkalmazzák? Az előző fejezetben láttuk, hogy egy állat vagy növény genetikai összetételét meg tudjuk változtatni egy-egy transzgén bevitelével, azonban a transzgenikus technológia hátránya, hogy az esetek döntő többségében a transzgén beépülését a genomba nem lehet kontrollálni (bár a módszerrel egy-egy gén dózishatása vizsgálható több, bárhová beépült gén esetén is – lásd pl. az első, a patkány növekedési hormonra transzgenikus egér esetét a **19.8.1. fejezet**ben). A 1980-as években, a transzgén technika megjelenésével párhuzamosan megjelentek az ***in vivo* célzott génmódosításra alkalmas módszerek** is, ami viszont már az organizmus szintjére emelte a reverz genetikai megközelítést.

Az *in vivo* célzott génmódosítások, amelyek a kromoszóma DNS-t célozzák meg, ugyan kis hatékonysággal működő **homológ rekombináción alapszanak**, de alkalmasak egyetlen gén inaktiválására is. Az alapmódszer az, amikor a megcélzott gént inaktiválják. Ez a célzott **génkiütés**, angolul ***knockout*** módszer, amit a magasabbrendű élőlények közül jó hatékonysággal például egereken lehet kivitelezni (**KO egér**).

A génkiütést technikailag nem könnyű kivitelezni (főleg a homológ rekombináció alacsony hatékonysága és a nem-homológ rekombinációk viszonylag nehéz kiküszöbölése miatt), de van más lehetőség is a gén, pontosabban a már átírt mRNS célzott eltávolítására. Ez pedig az **RNS interferencián alapuló** ún. **géncsendesítés** (lásd **19.9.2**), amit az1990-es évek végén alkalmaztak először. A módszer alapvetően abban különbözik a génkiütéstől, hogy nem a DNS-t, hanem a génátiratokat, az mRNS molekulákat tesszük tönkre (amiből egy sejtben sok van a DNS-sel ellentétben, ezért a módszer csak erősen lecsökkenti a génexpresszió szintjét, ezért hívjuk géncsendesítésnek). A módszer az egyszerűsége és a génkiütéshez képes olcsósága miatt nagy népszerűségnek örvend a kutatók körében, s a géncsendesítéssel ma már gyakorlatilag az összes emlős gén fenotípus hatását vizsgálni lehet, legalábbis sejtkultúrák szintjén (soksejtű állatok közül pl. a *C. elegans* fonalféregben nagyon egyszerűen kivitelezhető a módszer az egész állat szintjén).

A következő fejezetben a génkiütésről és a géncsendesítés lesz szó.

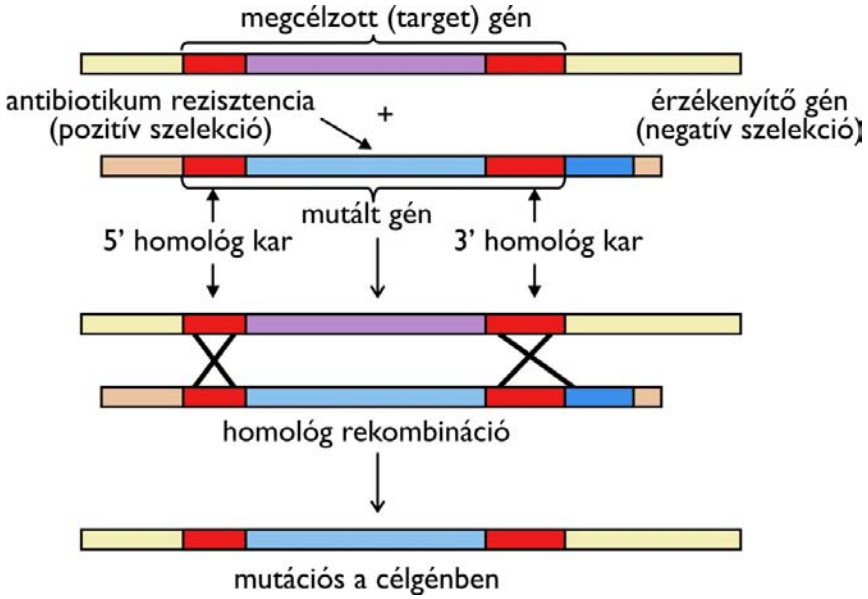
19.9.1. Génkiütés (*knockout*) egérben

A célzott génkiütéses módszer kifejlesztésében kulcsszerepet játszó Mario **Capecchi**, Oliver **Smithies** és Martin **Evans** 2007-ben Nobel-díjat kapott. Bizonyították, hogy az emlős sejtekben lejátszódó **homológ rekombináció** felhasználható arra, hogy adott géneket **célzottan módosítsanak** a genomban. A módszer egy **kettős pozitív-negatív szelekció**n alapszik, melynek segítségével tesztelhetővé vált a homológ rekombináció sikeressége bármely megcélzott DNS szakasz esetén embrionális őssejtbe bejuttatva a megfelelő rekombináns DNS konstrukciót.

A módosítás nem feltétlenül jelenti a megcélzott **gén inaktiválását (*knockout*)**; lehetséges a megcélzott helyre egy teljes, funkcióképes új **gén beépítése is (*knockin*)**. A módszerrel lehetőség nyílt bármely gén funkcióját közvetlenül, a teljes élőlényben vizsgálni és elsősorban KO egereket felhasználva emberi betegség kutatásához elengedhetetlen modellállatokat lehetett létrehozni.

Egy emlős homológ rekombinációra alkalmas rekombináns DNS konstrukciót és a rekombináció sémáját a **19.38. ábra** mutatja be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.38. ábra: A homológ rekombinációra alkalmas, egy pozitív (antibiotikum rezisztencia gén) és egy negatív („érzékenyítő" gén) szelekciós markert tartalmazó rekombináns DNS konstrukciós és a rekombináció sémája

A nem-célzott génbevitellel ellentétben, – amire a transzgenikus állatok létrehozásánál leírt megtermékenyített petesejtbe történő mikroinjektálás a példa – a célzott génmódosításhoz pluripotens embrionális őssejtteket (ES: *embryonic stem cells*) használunk sejttenyészetben (a kétféle módszer összehasonlítását a **19.39. ábra** mutatja be). Ezek a sejtek egérből származnak, mivel már jeleztük, hogy technikailag az emlősök közül KO egeret a legkönnyebb és a leghatékonyabb előállítani. Az ES sejtekbe a DNS konstrukciót elektroporálással vagy liposzómákba csomagolva juttatjuk be.

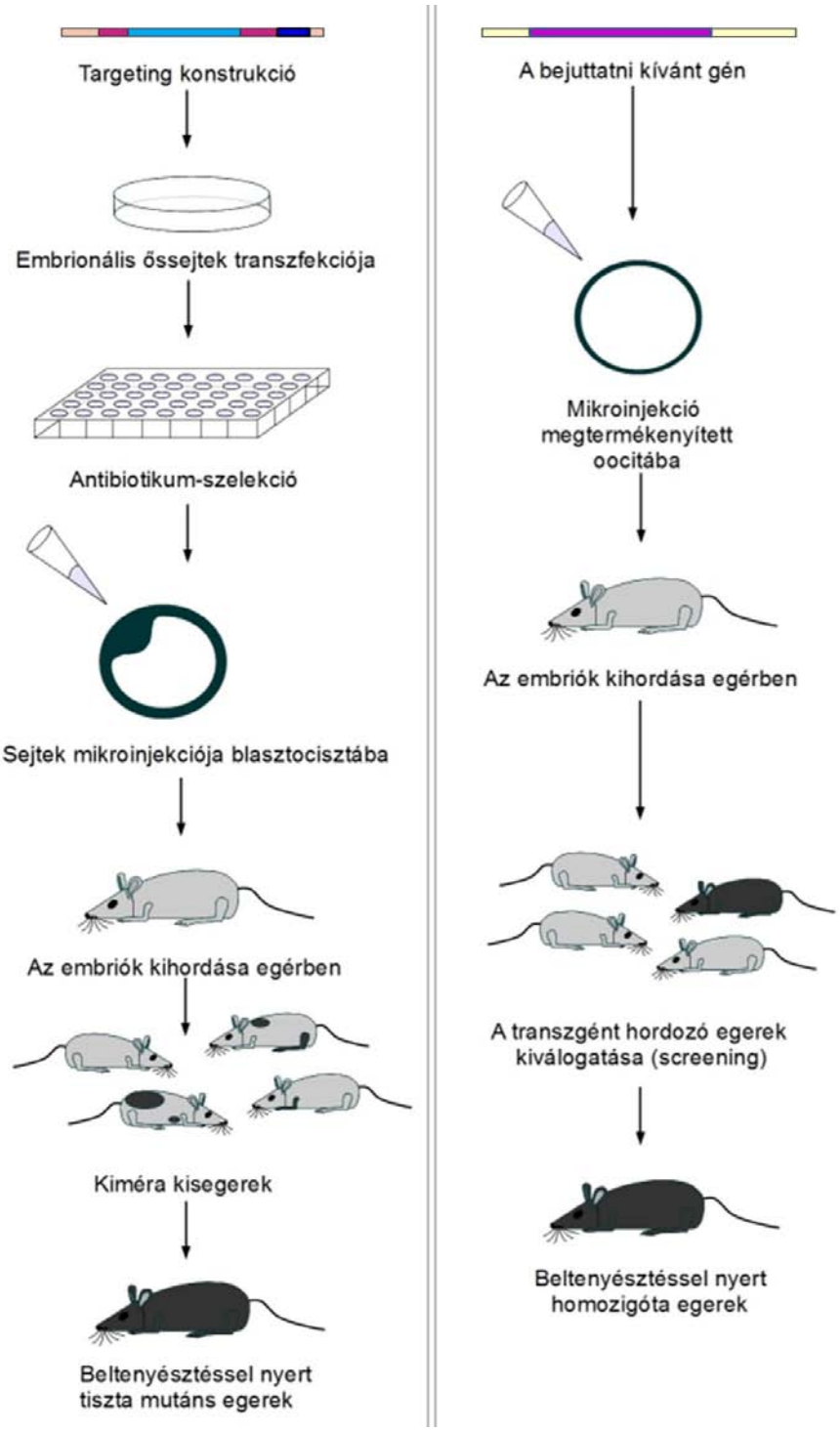
Hogyan kell megtervezni az ún. targeting („célzó") rekombináns DNS-t? Először is lineáris DNS konstrukcióra van szükség, mivel a prokariótákkal ellentétben itt nem egy autonóm replikálódó DNS-t kell a sejtbe juttatni, hanem egy önálló replikációra nem képes DNS-t, aminek be kell épülnie az eukarióta sejtek genomjába. A homológ rekombináció lineáris DNS-sel jobb hatásfokkal megy végbe. A homológ rekombináció érdekében a célgén mindkét oldalán viszonylag hosszú (1-2 kbp) homológ szakaszoknak kell lennie. A pozitív szelekciót a két homológ „kar" közé helyezett antibiotikum rezisztencia gén biztosítja. A rezisztencia génnek legalább egy exont kell a tönkretenni tervezett gén kódoló régiójából helyettesítenie.

Olyan antibiotikumot kell használni, ami emlős sejtekben is hatékony (pl. genticin). A pozitív szelekciós marker azonban önmagában nem elegendő. A homológ karokon túlnyúló végekre kell legalább egy **negatív szelekciós marker**, hogy a jóval gyakoribb nem-homológ rekombinációs eseményeket megpróbálják kiszűrni. A homológ rekombináció a rezisztenciát hordozó kazetta két végén lévő homológ karokon fog bekövetkezni, így a negatív szelekciós marker, az "érzékenyítő gén" ilyenkor kiesik (lásd **19.38. ábra**).

A leggyakrabban használt **érzékenyítő gén** emlős rendszerekben a **herpeszvírus timidilát-kináz (TK)**, ami ganciklovir jelenlétében a sejtek pusztulásához vezet. A ganciklovir egy dezoxi-guanidin analóg, ami a sejtben dGTP-analóggá alakul, kompetitív módon gátolja a normál dGTP beépülést, s végső soron a sejt szaporodását gátolja (ezzel a TK gént nem-homológ rekombinációval felvett sejteket ki lehet szelektálni).

A következő lépésben az **embrionális őssejteket** 3,5 napos blasztociszta stádiumú **embriókba** mikroinjektálják (lásd **19.39. ábra**), majd álvemhes befogadó nőstény egér méhébe ültetik be.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.39. ábra: Célzott génmódosítás, „génkiütés” (bal oldal) és célzás nélküli génmódosítás létrehozása egérben (jobb oldal). Az utóbbi eljárással transzgenikus egeret hoznak létre.

A születő kisegerek genetikai **kimérák** lesznek, amelyek szerencsés esetben a csíravonalukban is hordozzák a módosított sejtek utódait. Az egerek pároztatásával, majd (szükség esetén) beltenyésztésével hozhatóak létre a tisztán KO egerek (az állatokat természetesen genotipizálni kell, pl. Southern-blottal vagy PCR-rel).

19.9.2. Géncsendesítés (*gene silencing*, *knockdown*)

Ahogy már jeleztük, az **RNS interferencián** alapuló **géncsendesítés (*knockdown*)** nagyon fontos módszer, mellyel gének működésének célzott módosítására van lehetőség.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A RNS interferencia felfedezését és molekuláris mechanizmusát a **18.5. fejezet**ben már bemutattuk, itt a géncsendesítés néhány lehetőségére hívjuk fel a figyelmet.

Az RNS interferenciát kiváltó kétszálú RNS molekulák sejtbe juttatatására több módszer létezik. Kezdjük egy olyan példával, ahol az egész szervezeten belül kiváltható egy adott gén „csendesítése", azaz a róla átírt mRNS degradációja (és/vagy bizonyos esetekben közvetlenül a transzláció gátlása). Ilyen szisztémás RNS-interferencia megvalósulhat a *C. elegans* modellállatban. Mivel rendelkezik kettős szálú RNS-sek felvételére szolgáló receptorokkal és a szállításukhoz szükséges fehérjékkel, az RNSi válasz az állat kettős szálú **RNS-sel való etetésével** (a fonalférgek baktériumot fogyasztanak, amelyek expressziós vektorokról átírják az siRNS két szálát) is kiváltható. Gerincesekben azonban nincs ehhez hasonló szisztémás RNS interferencia: a kétszálú RNS hatása az egyes sejtekre korlátozódik.

Emlőssejteket transzformálhatunk olyan **rekombináns DNS konstrukció**val, amibe erős promóter (pl. a spliceoszóma egyik snRNS génjének promótere, lásd **14.9.2. fejezet**) mögé építjük be a hajtűkanyar-képző szekvenciát. Ezeket a rövid hajtű RNS-seket (shRNS: ***short hairpin RNA***) kódoló plazmidokat széles körben alkalmazzák géncsendesítésre. A kis hajtűkanyart a **Drosha** és **Pasha** endonukleázok vágják ki a hosszabb RNS-szakaszból, akárcsak a természetes miRNS gének esetén. Ezután a **Dicer** endonukleáz lehasítja a hurkot, így az siRNS dimerré válik. A méretre vágott (nagyjából 21 nukleotid hosszú) siRNS-darabka végül a **RISC komplex**be kerül. A komplex magját alkotó **Argonauta** endonukleáz a két siRNS szál egyikét (*guide strand*) stabilan **megköti**, a másik szálat (*passanger strand*) pedig **kiveti**. A komplex ezután a megkötött siRNS-szállal komplementer mRNS szálat, és azt az Argonauta **elhasítja**. Ezzel **megakadályozza a transzlációt.**

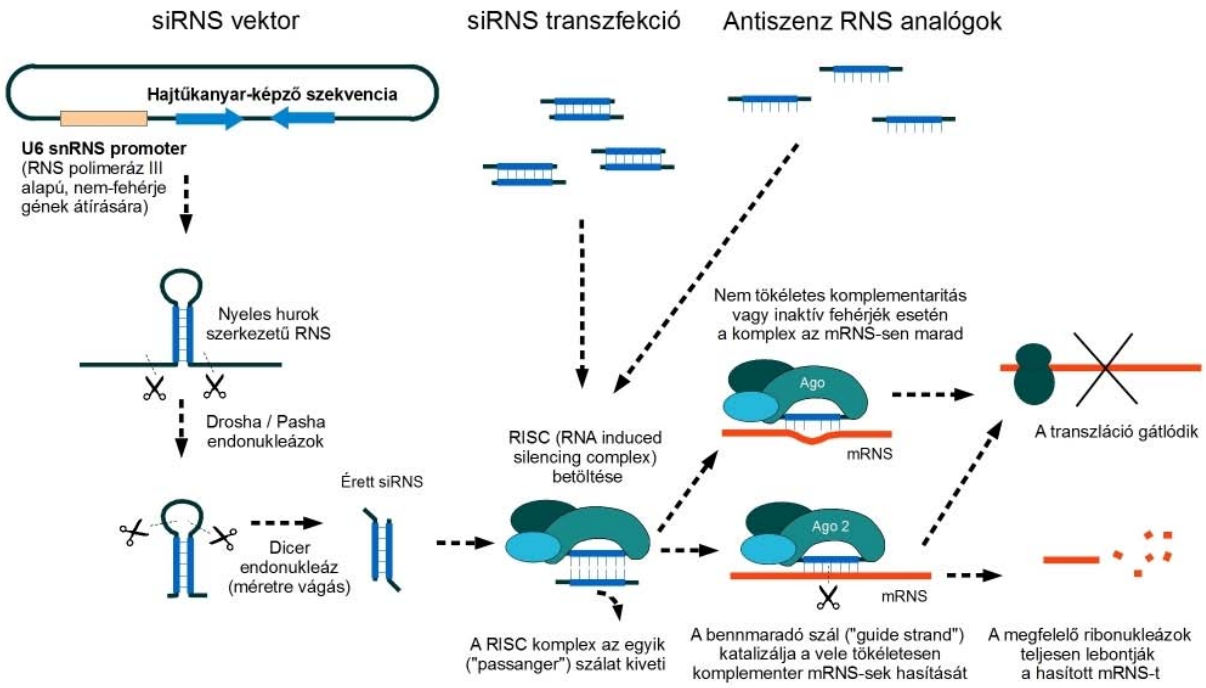
Az RNS-interferenciára egy másik lehetőség, hogy **szintetikusan** előállított siRNS-eket jutattunk a sejtekbe.

A fejezet végén megemlítjük, hogy a géncsendesítésnek van egy „klasszikus" változata az ún. ***antisense*** (az mRNS-sel komplementer) **oligonukleotidok** használata. Azt már régen feltételezték, hogy az mRNS-eket – ismerve a transzláció mechanizmusát – feltehetően inaktiválni lehet, ha a komplementer szállal (ez az *antisense* szál) kétszálú RNS molekulák alakulnak ki (mivel a kétszálú RNS-t a riboszóma nem tudja kiolvasni). Ezek a kétszálú RNS-ek is, ha nem is minden esetben, de bekerülhetnek a RISC komplexbe és RNS interferencián keresztül gátolhatják a transzlációt.

Érdekességként megemlítjük, hogy antiszensz RNS technológiával állították elő az első forgalomba került GMO-t (1994-ben az USA-ban), egy hosszabb eltarthatósági idejű paradicsomot. A poligalakturonáz enzim génjét csendesítették, amely enzim a paradicsom érésekor a sejtfalban lévő pektint bontja le, így a paradicsom puhul és sérülékenyebb lesz.

A géncsendesítés RNS interferencián alapuló lehetőségeit a **19.40. ábra** foglalja össze.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



19.40. ábra: Az RNS interferencián alapuló géncsendesítés három lehetséges mechanizmusa

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

20. fejezet - A bioenergetika alapjai és az anyagcsere áttekintése

(szerző: Pál Gábor)

20.1. Általános bevezető

Az anyagcsere (**metabolizmus**) olyan sejtaktivitás, amelynek során egymást követő reakciókat katalizáló enzimekből álló rendszerek (**anyagcsere útvonalak**) működnek együtt szigorúan szabályozott módon, alapvetően négyféle funkció ellátására:

a) Kémiai energiaszerzés napenergiából, vagy a környezetből felvett, kémiai energiában gazdag tápanyagokból.

b) Tápanyag molekulák átalakítása a sejtre jellemző kismolekulákká, pl. a makromolekulák szintézisének kiindulási molekuláivá (prekurzorokká).

c) Monomer kiindulási anyagokból (prekurzorokból) specifikus makromolekulák: fehérjék, nukleinsavak, poliszacharidok szintézise.

d) Speciális sejtfunkciókhoz szükséges egyéb molekulák (pl. membrán lipidek, sejten belüli hírvivő molekulák stb.) előállítása.

Az élőlények a hasznosított szénforrás szempontjából két nagy csoportra oszthatók. Az **autotrófok** szerves vegyületeket elő tudnak állítani kizárólag széndioxidból, mint szénforrásból. A **heterotróf** élőlények (pl. a legtöbb mikroba és az állatvilág tagjai) ezzel szemben szénforrásként komplex vegyületeket, mint pl. a szőlőcukor, igényelnek.

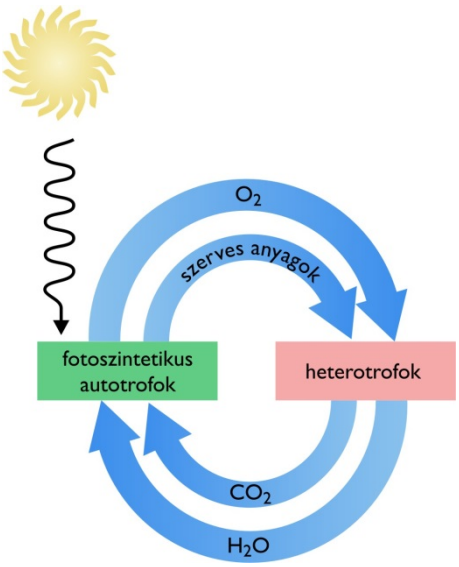
Az **autotróf** élőlények zöme **fotoszintetizál (fotoautotróf)**, vagyis napfényből nyer energiát (pl. fotoszintetizáló prokarióták vagy magasabbrendű növények), kisebb hányaduk kemoszintézissel jut energiához (**kemoautotrófok**). Ezek az élőlények az így szerzett energia révén a szerves molekuláik szénvázát széndioxidból kiindulva állítják elő. A legtöbb autotróf így nagyjából „önellátó”.

A **heterotrófok** ezzel szemben komplex szerves vegyületek lebontásából nyernek energiát is, tehát más élőlények által készített szerves molekulákat igényelnek. Végső soron a heterotrófok által felhasznált szerves vegyületek, tehát mind a szerves szén, mind az energia az autotróf élőlényekből származnak.

A **széndioxid és oxigén** a bioszférában globális **ciklus**ban mozog az autotróf és a heterotróf élőlények között. Évente kb. 400 milliárd tonna szén halad keresztül ezen a cikluson. Ezt az óriási anyagáramlást a fotoszintetizáló autotrófok által elnyelt hatalmas mennyiségű fényenergia biztosítja.

Az anyagcsere minden energiaátalakítási lépése szabadenergia csökkenéssel, tehát a rendszer + környezet együttesére nézve entrópia növekedéssel jár, spontán módon és visszafordíthatatlanul megy végbe. Ezért amíg az anyagáramlás ciklikus, az energiaáramlás egyirányú (lásd **20.1. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.1. ábra: A szén globális körforgása

Ahogyan azt a termodinamika alapjairól szóló **3.4. fejezet**ben már tárgyaltuk, a termodinamika második főtétele szerint egy zárt rendszer (így a mai modell szerint az univerzum) összes entrópiája folyamatosan növekszik, más szóval csak olyan folyamatok zajlanak le spontán, amelyek a világegyetem entrópia növekedésével járnak. Az élőlények a környezetüknél sokkal rendezettebbek, bennük az entrópia értéke vagy állandó, vagy éppenséggel csökken. Vajon miként valósulhat ez meg?

A Földet rendezett állapotú fényenergia éri a Napból, ezt hasznosítják közvetlenül az autotrófok, és rajtuk keresztül közvetve a heterotrófok. **A felvett fényenergia vagy kémiai energia jelentős részét az élőlények hő formájában leadják**.

Az egész ökoszisztémát hosszabb idő átlagában tekintve az élő rendszerek ugyanannyi energiát vesznek fel, mint amennyit leadnak. A leadott energia azonban hő formájában távozik, így rendezetlenebb állapotban adódik le, mint ahogy felvételre került.

A **környezet entrópiája** mind az élőlény, mind a teljes ökoszisztéma tekintetében **nagyobb mértékben növekedik, mint** ahogyan **az élőlények**, illetve az azokból kialakuló rendszerek **entrópiája csökken**, tehát a teljes rendszerre (élőlények + környezet) nézve az entrópia növekszik.

Ez magyarázza, hogyan alakulhat ki az **élőlények**ben, mint **nyílt termodinamikai rendszer**ekben **folyamatos energia és anyagátáramlással komplex, rendezetett állapot**.

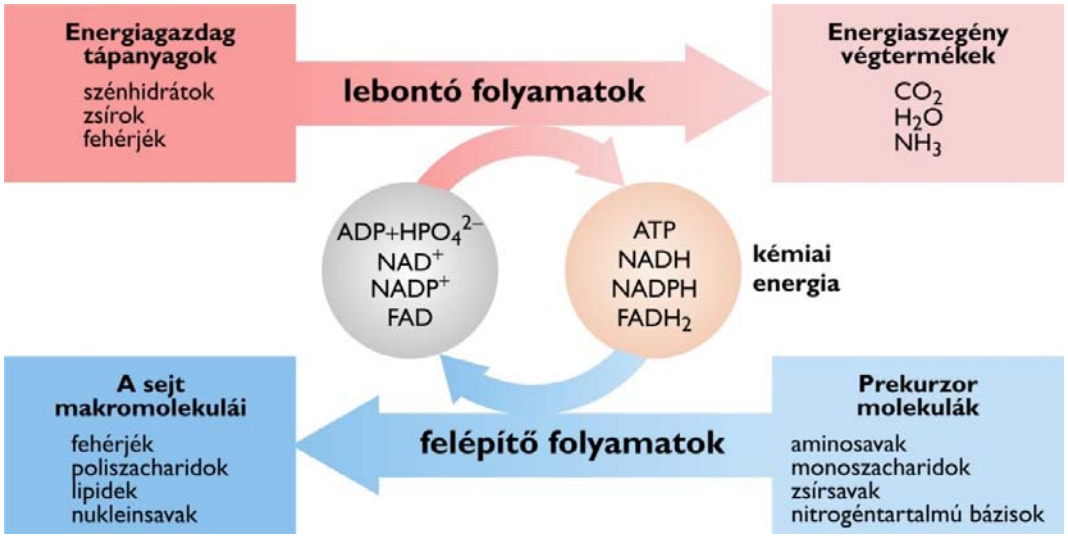
Az **anyagcsere** a sejtben illetve szervezetben lezajló kémiai átalakulások összessége, amely **enzimkatalizált reakció**kon, vagyis **anyagcsere utak**on keresztül zajlik. Egy anyagcsereút minden lépése egy-egy elemi kémiai átalakulást jelent, mely általában egy-egy atom, vagy funkcionális csoport eltávolítását, hozzáadását, átadását, vagy molekulán belüli áthelyezését jelenti. A reakciósorok köztes termékeit „intermedieknek” nevezik (ezek más néven **metabolitok**), ezért ezek egymásba-alakulását gyakran **intermedier anyagcseré**nek nevezik. Az intermedier anyagcserének két ellentétes irányba mutató része van.

A lebontó, vagy **katabolikus folyamatok (katabolizmus)** során szerves tápanyagok (szénhidrátok, zsírok, fehérjék) alakítódnak át egyszerűbb vegyületekké (pl. széndioxiddá, vízzé, ammóniává), és a **kémiai kötésekből felszabadított energia egy része ATP és redukált elektronhordozók** (NADH, NADPH, $FADH_2$) **formájában tárolódik**. A maradék energia hő formájában elvész.

A felépítő, vagy **anabolikus folyamatok**ban (más néven bioszintetikus folyamatok, **anabolizmus**) egyszerű kezdő vegyületekből (prekurzorok) nagyobb komplex szerves vegyületek (zsírok, fehérjék, nukleinsavak, poliszacharidok) keletkeznek. Ehhez a szintetikus útvonalhoz **energiát kell befektetni**, amely **ATP-ből** származik, és **redukáló-képes koenzimek** (NADH, NADPH, FADH2) is kellenek hozzá.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

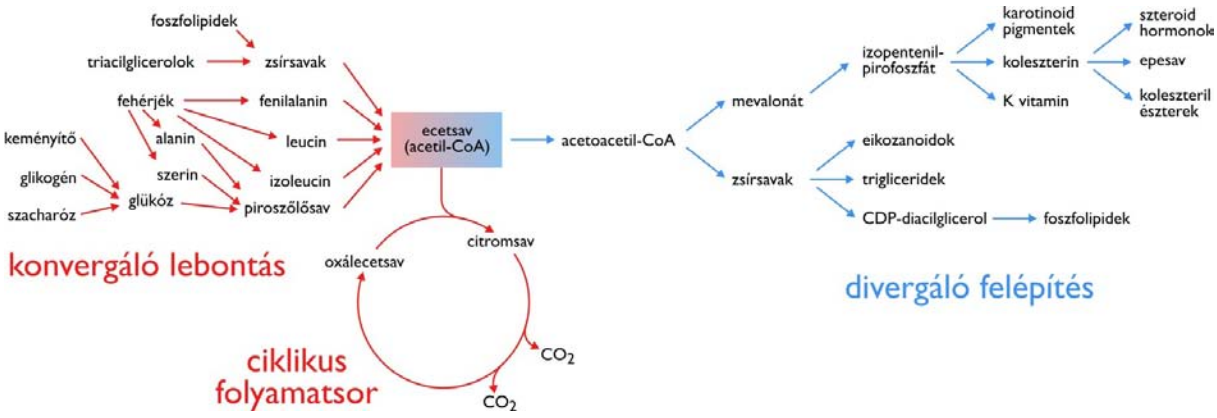
A két alapvető anyagcsereirány tehát kiegészíti egymást. A lebontó folyamatok által szolgáltatott ATP és redukált koenzimek kerülnek felhasználásra az energiaigényes felépítő folyamatokban (lásd **20.2. ábra**).



20.2. ábra: A lebontó és felépítő folyamatok kiegészítik, feltételezik egymást. Az általános folyamatábrán jelzett prekurzorok minden élőlény számára hasznosíthatók, de az autotrófok ezeknél jóval egyszerűbb szervetlen prekurzorokból (is) képesek építkezni.

Az anyagcsere útvonalak lehetnek egyenesek, vagy elágazók, amikor egy prekurzor átalakítása több hasznos termékhez is vezet, illetve több prekurzor is összeépülhet egyetlen végtermékben.

Nagy általánosságban a **lebontó folyamatok konvergensek**, vagyis sokféle prekurzorból néhányféle végtermékre vezetnek, míg a **felépítő folyamatok divergensek**, hiszen néhány kiindulási vegyületből számos eltérő vegyületet hoznak létre (lásd **20.3. ábra**).

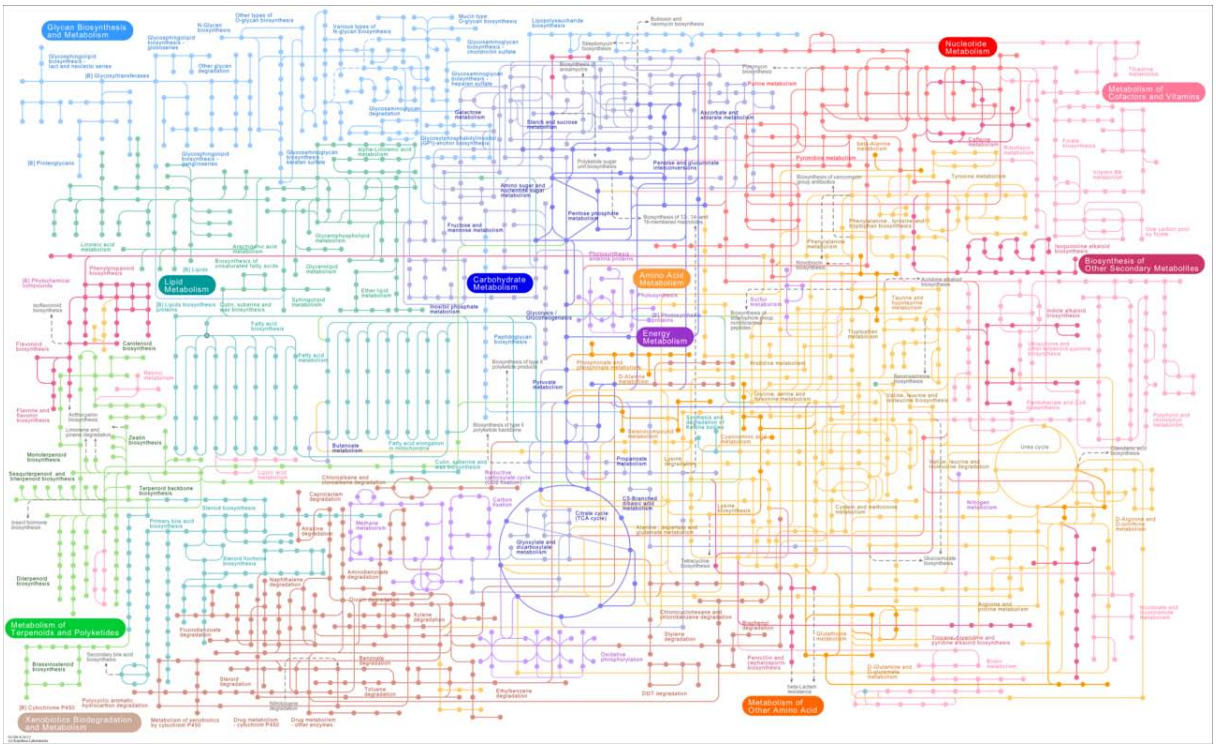


20.3. ábra: A lebontó folyamatok konvergensek, a felépítő folyamatok divergensek

Vannak **ciklikus útvonalak** (körfolyamatok) is, amikor a kezdő komponens úgy válik termékké egy több lépéses folyamatban, hogy közben egy másik komponensből a kezdő komponens újra kialakul. Ezek a folyamatok (lásd citromsavciklus) egyaránt szerepet játszhatnak lebontó és felépítő folyamatokban.

Az élő szervezetekben lejátszódó reakciók összefüggő **anyagcsere hálózat**ot alkotnak (lásd **20.4. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.4. ábra: Az anyagcsere útvonalak komplex hálózatot alkotnak

Az ábra részletei nem fontosak, az ábra csak annak illusztrálására szolgál, hogy milyen komplikált egy sejt anyagcsere hálózata. Az ábra vonalai valós kémiai reakciósorokat illusztrálnak. Egy-egy kis kör egy-egy vegyület, a köztük lévő vonalak azt a reakciót jelképezik, ami az egyik vegyületből a másikba alakuláshoz vezet. Az egyes vegyület típusokkal (pl. szénhidrátok, lipidek, aminosavak) kapcsolatos anyagcsere útvonalakat eltérő színek jelölik. Jól látható, hogy a vonalak átvezetnek ezeken a blokkokon, tehát az egyes vegyület típusok anyagcseréje egymással összefügg.

20.2. Az egyes anyagcsere folyamatok szabályozásának általános alapelvei

A legtöbb sejtben egyszerre vannak jelen a különböző vegyületek (pl. a zsírsavak) lebontásáért és szintéziséért felelős enzimek. Az egy időben zajló **lebontás és szintézis** nyilvánvaló pazarlás lenne. A két folyamatot összehangoltan, **reciprok módon kell szabályozni**. Amíg az egyik zajlik, a másikat szüneteltetni kell.

Eukariótákban a **lebontó és szintetikus folyamatok független szabályozhatóságá**nak egyik fontos eleme, hogy ezek rendszerint térben elkülönítve, **más-más sejtalkotóban** zajlanak. A zsírsavak lebontása például a mitokondriumban és a peroxiszómákban, míg a zsírsavak szintézise az endoplazmás retikulumban, illetve növényeknél a színtestekben zajlik. Így az egyes lépésekben szereplő közös intermedierek koncentrációja is más és más lehet az egyes térrészekben.

A termodinamikai összefüggések ismeretében nyilvánvaló, hogy ha az egyik folyamat, például a lebontás, spontán végbemegy, akkor annak ellentettje nem mehet végbe spontán. Az ellenkező irányú folyamatot, amely önmagában endergonikus lenne, exergonikus reakciókhoz kapcsolva lehet végrehajtatni, exergonikussá tenni.

Ebből nyilvánvaló, hogy azokban a **lebontó és felépítőanyagcsere útvonalak**on, amelyek ugyanazt a két intermediert kötik össze, (pl. glükóz → → piroszőlősav, illetve piroszőlősav → → glükóz) van **legalább két** egymástól **eltérő reakció**, amit eltérő enzimek katalizálnak.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

Mind az önmagukban is exergonikus lebontó folyamatokban, mind pedig a kapcsolt reakciókkal exergonikussá tett felépítő folyamatokban **legalább az egyik lépés** termodinamikailag nagyon kedvező, nagy negatív ΔG-vel jár, **gyakorlatilag irreverzibilis**.

A lebontó folyamatoknál ezek azok a lépések, amelyek során ATP keletkezhet ADP-ből.

A felépítő folyamatoknál ezek általában azok a lépések, amelyek során ATP felhasználásával válik az adott lépés, és ezen keresztül a teljes folyamat exergonikussá, irreverzibilissé. A lebontó és felépítő folyamatok regulációjának fő módja az ilyen eltérő, nagy negatív ΔG-vel járó lépések regulálása az ezeket katalizáló enzimek szabályozása által.

20.3. Az egyes enzimatikus lépések szabályozásának módjai

Az egyes tipikus szabályozási módszereket azok sebessége szerint rendeztük sorba.

Ahogyan azt az enzimkinetika **9. fejezet**ben már tárgyaltuk, amennyiben a szubsztrát koncentrációja az enzimreakcióra jellemző $\mathbf{K_m}$ **érték alatt** van, a reakciósebesség egyik meghatározó eleme maga a **szubsztrát-koncentráció**. A szubsztrát más reakcióirányokba történő átalakítása, vagy más organellumokba történő szállítása ezért **szabályozó elem**. Ez a szabályozás rendkívül **gyors**.

Az egyik leggyorsabb, legáltalánosabb, ezért legfontosabb mód az **allosztérikus szabályozás** (lásd **17.2. fejezet**). Ennek során az enzimaktivitást **valamilyen anyagcseretermék szabályoz**za. Ez sokszor a végtermék (végtermékgátlás, negatív visszacsatolás, lásd később), de lehet bármelyik intermedier, gyakran az ATP, AMP vagy éppen egy koenzim. Az ATP, AMP és a redukált illetve oxidált koenzimek koncentrációja jelzi a sejtben zajló anyagcsere állapotokat. Magas ATP és redukált koenzim koncentráció a sejtben például azt jelzi, hogy elegendő kémiai energia áll rendelkezésre. Ezzel összefüggésben az ATP számos lebontó folyamat negatív szabályozója.

A sejtek energia állapotát kvantitatív módon az ún. **energiatöltöttség** (*energy charge*) adja meg:

([ATP] + 0,5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])

A képletben az ADP azért szerepel, mivel egy “makroerg” foszforsavanhidrid kötést még tartalmaz (lásd később). Normál esetben az energiatöltöttség értéke 0,8 és 0,95 közötti. A fent leírt szabályozás a megkívánt érték között tartja az energiatöltöttséget.

Soksejtűekben az egyes szervek illetve szövetek anyagcseréjének összehangolt működését **hormonok** biztosítják, melyek a **sejten kívülről** hoznak **információt**. A hormonok **a sejtben másodlagos hírvivő** molekulák megjelenését indukálják. A másodlagos hírvivők **allosztérikus szabályozó**ként működnek.

A másodlagos hírvivők többek között kináz, és foszforiláz enzimeket is szabályoznak. A **protein-kinázok** egy része anyagcsere folyamatokban résztvevő enzimek specifikus oldalláncaira kapcsol **foszfátcsoport**ot, tehát kovalensen módosítja ezeket az enzimeket. Ez a módosítás olyan értelemben reverzibilis, hogy megfelelő foszfatáz enzimekkel ezek a foszfátcsoportok idővel eltávolításra kerülnek. Az anyagcsere folyamatok egy részében tehát **kovalens módosítás** is szerepel, ami szintén gyors szabályozás mód. Ezt az általános fehérjeszabályozási módot is tárgyaltuk korábban, a **17.3.1. fejezet**ben.

Egyes hormonok, például a szteroidok az anyagcserében szereplő egyes enzimek koncentrációját változtatják meg olyan módon, hogy specifikus gének expressziójának szabályzásán keresztül megváltoztatják az enzim szintézisének vagy lebomlásának a sebességét. Ez **a szabályozás típus lassabb**, perceket, vagy órákat igényel.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/

20.4. Az allosztérikus szabályozás alapelve, és fő előnyei

Ez az elektronikus tankönyv több helyen is foglalkozik az allosztéria jelenségével (részletesen lásd a **17.2. fejezet**ben), amelynek során egy ligandum (vagy szubsztrát) kötődése a fehérje konformációs állapotának változása révén befolyásolja más ligandumok kötődését (vagy szubsztrát átalakítását).

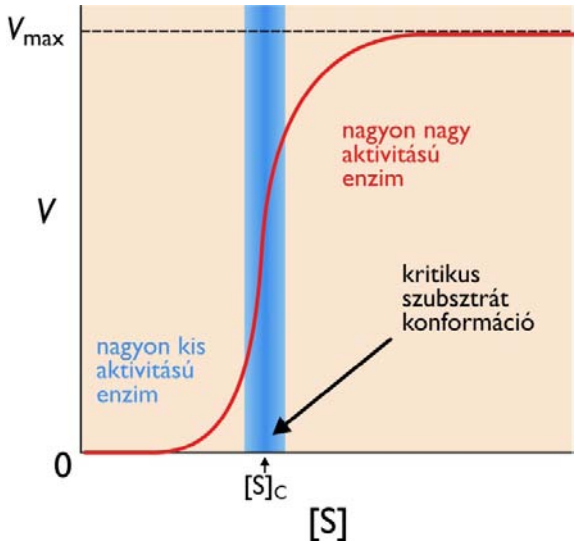
A hemoglobin kémiai reakciót nem katalizál, tehát nem enzim, de működése többrétűen, kifinomultan, allosztérikusan szabályozott. A hemoglobinnal foglalkozó **7.11. fejezet**ben a szabályozásáról leírtak az alloszterikusan szabályozott enzimekre is vonatkoznak.

A **legtöbb allosztérikus enzim** a hemoglobinhoz hasonlóan **több alegységes**. Amikor egy több alegységes fehérjében egy ligandumnak több kötőhelye is van, lehetőség nyílik arra, hogy ezek a kötőhelyek együttműködjenek, kooperáljanak egymással. (Természetesen léteznek olyan több kötőhelyes fehérjék is, amelyek ligandum kötőhelyei egymástól függetlenül funkcionálnak). Az együttműködés lényege, hogy az egyes, azonos felépítésű ligandum molekulák kölcsönösen befolyásolják egymás kötődését. Ekkor **homotróp szabályozás**ról, **kooperativitás**ról beszélünk.

A hemoglobinnál például az első oxigénmolekulák kötődése elősegíti, hogy a hemoglobin többi kötőhelyére is oxigén lépjen be. Ennek eredményeként a hemoglobin oxigéntelítésének függése az oxigén parciális nyomásától nem derékszögű hiperbola függvényt követ, hanem szigmoidális görbével jellemezhető.

Ugyanígy, a több alegységes enzimek esetében, ha az egyes aktívhelyek segítik egymást, a reakciósebesség, vagyis az ES komplex kialakulása, más szóval az **enzim telítése** a szubsztrát koncentráció függvényében **szigmoid görbé**t ad (lásd korábban a **17.4. ábra**).

A szigmoid görbe funkcionális szempontból abban tér el egy egyszerű telítési görbétől, hogy egy kitüntetett régióban (a féltelítés környékén) erősebben függ a telítés értéke a szubsztrát koncentrációtól. Mivel egy egyszerű ligandummal szemben a szubsztrát átalakul, enzimeknél a kooperativitás elősegíti a szubsztrát koncentráció állandóan tartását. Egy bizonyos koncentráció értékig a szubsztrát alacsony ütemben alakul át, ha azonban a koncentrációja egy kritikus értéket túllép, az általa szabályozott enzim telítettségének mértéke és/vagy aktivitása hirtelen emelkedni kezd (lásd **20.5. ábra**).

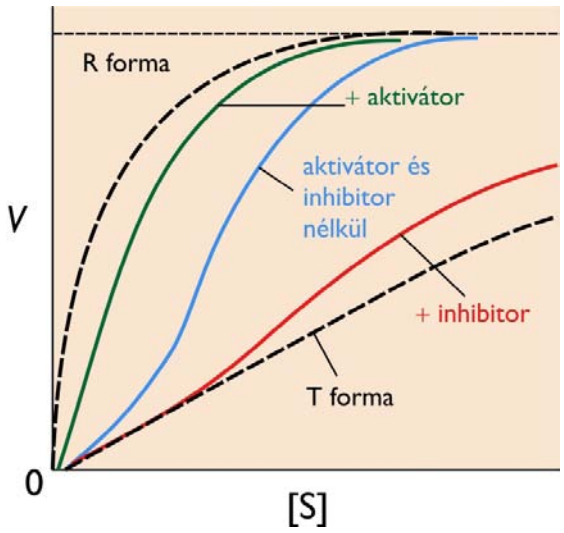


20.5. ábra: Az allosztéria pozitív homotróp szabályozási típusa erőteljesebbé teszi a kezdeti sebesség szubsztrát-koncentráció függését a fél-maximális sebességhez tartozó szubsztrát-koncentráció környékén

A homotróp hatástól eltérően heterotróp hatásról, illetve heterotróp modulátorról akkor beszélünk, amikor egy, a szubsztráttól eltérő molekula kötődik reverzibilisen az enzim aktívhelyétől eltérő részéhez úgy, hogy ezáltal megváltoztatja az enzim konformációját, és ezen keresztül az aktivitását.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Korábban leírtuk (lásd **17.2. fejezet**), hogy az allosztérikus fehérjéket leíró modellek két szerkezeti állapotot feltételeznek, amit R és T betűvel jelöltünk. A modulátor vagy az aktívabb **R formát stabilizálja**, és akkor **heterotróp allosztérikus aktivátor**, vagy a kevésbé aktív **T formát stabilizálja**, és akkor **heterotróp allosztérikus inhibitor** (lásd **20.6. ábra**).

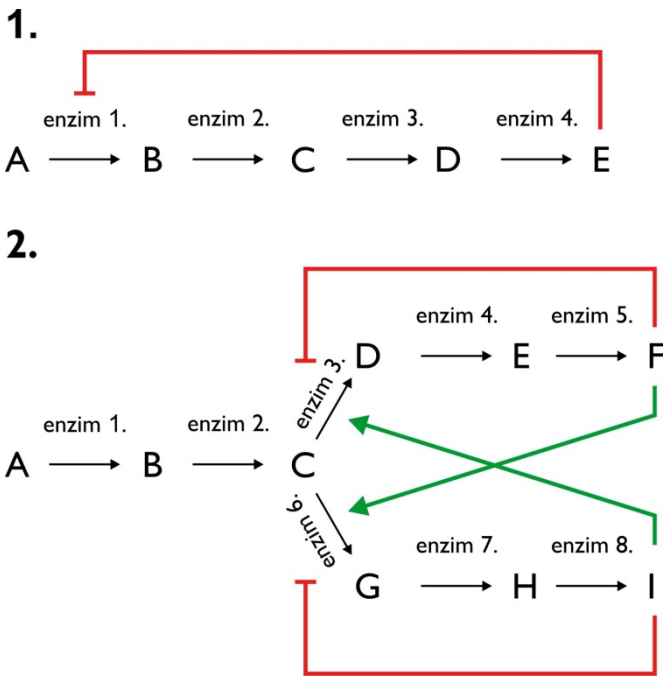


20.6. ábra: Egy allosztérikus enzim szabályozása heterotróp allosztérikus aktivátorral, illetve inhibitorral

A **20.6. ábra** mutatja, a heterotróp aktivátor az R-forma, az inhibitor a T forma felé tolja el az egyensúlyt.

A **hemoglobin** esetében látott **BPG** egy tipikus **heterotróp allosztérikus modulátor**ként csökkentette a hemoglobin oxigénkötő affinitását.

A heterotróp modulátorok (effektorok) szerkezete egyáltalán nem kell, hogy hasonlítson a szubsztrát, illetve termék szerkezetéhez (lásd **20.7. ábra**). Valójában ennek köszönhető, hogy az allosztérikusan szabályozott enzimek az anyagcsere utak fő regulátorai.



20.7. ábra: A heterotróp allosztérikus regulátorok összetett folyamatszabályozásokat tesznek lehetővé

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

A **20.7. ábra** felső blokkjában egy lineáris anyagcsere utat látunk. Ez az útvonal egy A kiindulási anyagból 4 enzimkatalizált lépésben egy E terméket képez. Az E termék egyéb utakon felhasználásra kerül. Ha az E termék koncentrációja egy bizonyos értéket meghalad, az jelzi, hogy kisebb ütemben használódik fel, mint ahogyan keletkezik. A homeosztázis fennmaradásához a keletkezés ütemét tehát vissza kell fogni.

Az ábra azt mutatja, hogy az E termék a reakciósor első enzimatikus lépését gátolja azáltal, hogy az azt katalizáló enzim negatív allosztérikus modulátora. Mivel az E termék koncentrációjának az emelkedése maga a jel arra, hogy az útvonal túlműködik, rendkívül ökonomikus megoldás az, hogy maga az E termék legyen a szabályozó molekula. Ahogy az E koncentrációja emelkedik, úgy tudja telíteni az általa szabályozott enzim E-kötőhelyét.

Vegyük észre, hogy az is egy rendkívül gazdaságos megoldás, hogy az E termék éppen az első enzimatikus lépést gátolja. Ezáltal nemcsak az E termék nem keletkezik feleslegesen, de mindazon intermedierek sem, amiken keresztül az E termék kialakulna.

Az allosztérikus szabályozást az teszi univerzálissá, és rendkívül rugalmassá, hogy az E és az A molekuláknak egyáltalán nem kell hasonlítaniuk ahhoz, hogy ez a szabályozás létrejöhessen. A szabályozó E molekula ugyanis nem az A molekulát felismerő szubsztrát kötőhelyhez köt.

Ez a szabályozás egy **allosztérikus termékgátlás**on keresztül megvalósuló **negatív visszacsatolás** (***feedback*gátlás**).

A **20.7. ábra** második blokkja, egy komplexebb esetet illusztrál. Ebben a példában az A-ból kiinduló anyagcsereút kétféle végtermékhez (F és I) vezet, mivel a C molekulánál elágazik. Egy ilyen szerkezetű anyagcsere útvonalnál a leghatékonyabb szabályozási megoldás az, amikor az F és az I molekulák gátolják a kizárólag a saját keletkezésükhöz vezető, tehát az elágazás utáni szakasz első lépését, miközben aktiválják az elágazás utáni másik útvonal első lépését.

Ha tehát az F termék koncentrációja emelkedik, akkor csökkenti a saját keletkezésének ütemét, miközben növeli a másik termék keletkezésének az ütemét, és mindez reciprok módon fordított relációban is igaz.

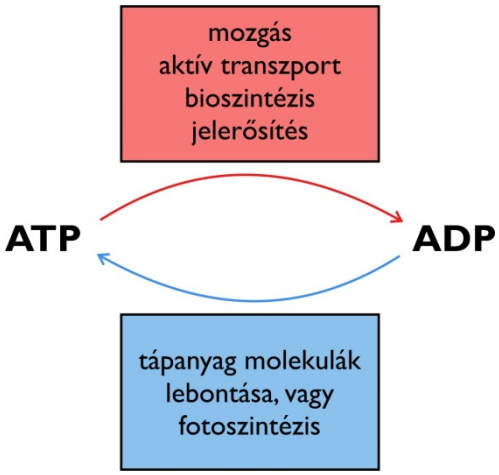
20.5. Az ATP központi szerepe

Az **ATP** egy közös „**energiavaluta**” ami összeköti a lebontó folyamatokat az energiaigényes felépítő és egyéb folyamatokkal. A lebontó folyamatok során felszabaduló kémiai energia (illetve fototrófoknál a fényenergia) ATP formájában kerül tárolásra. Az ATP-ben tárolt energia **hasznosul** az energiaigényes folyamatokban, mint például a **felépítő** (szintetikus) **folyamato**k, membránokon keresztüli, a koncentráció gradiens ellenében történő **aktív transzport**, **motorfehérjék** általi mozgatás, stb. Az ATP tehát folyamatos körforgásban van (lásd **20.8. ábra**).

Amikor a **motorfehérjék** mozgása, vagy aktív **transzportot végző pumpák** működése során használódik fel az ATP, akkor a motorfehérje, vagy a pumpa ATP-áz aktivitásán alapuló hidrolízis zajlik. Az ATP átalakulása ilyenkor konformációváltozáshoz vezet az ATP-t hidrolizáló fehérjében, és ez a konformációváltozás biztosítja a mozgatást, vagy a pumpa-működését. Ezek **energiatranszdukciós folyamatok**, ahol a kémiai energia rendezett mechanikai mozgássá illetve ozmotikus energiává alakul.

A **felépítő folyamatokban** azonban az **ATP kapcsolt reakciókban**, kovalens intermedierként szerepel, tehát közvetlenül részt vesz a kémiai reakcióban. Más szóval nem egy, a reakciótól független hidrolízis lépésben alakul át az ATP, mert akkor a felszabaduló energia nem kerülhetne felhasználásra, csak hő szabadulna fel, ami a szintetikus folyamatokban nem hasznosítható. Az élőlények nem hőerőgépek.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.8. ábra: Az ATP körforgása

20.6. Az ATP energiatároló képességének szerkezeti okai

Az ATP terminális **foszforsavanhidrid** csoportjának hidrolízise **nagy negatív szabadentalpia változás**sal jár, más szóval a foszforsavanhidrid kötés egy úgynevezett **makroerg kötés**. A makroerg kötést szokták pongyolán „nagyenergiájú" kötésnek is hívni, de ez félrevezető. A kötési energia ugyanis az az energia, amit a kötés felbontásához be kell fektetni. Itt pedig éppen fordítva, arról az energiáról (szabadentalpia változásról) van szó, ami a kötésbomlás nyomán hasznos munkára fordítható. Az ATP-ADP átalakulás tehát a felbomló foszforsavanhidrid kötés makroerg volta miatt exergonikus, munkavégzésre fogható folyamat.

Ennek **szerkezeti okai** az alábbiakban foglalhatók össze (lásd **20.9. ábra**).

Az **ATP-ben négy negatív töltés** is közel van egymáshoz, és ezek elektrosztatikusan **taszítják egymást**. A gamma helyzetű foszforsavanhidrid kötés **hidrolízis**ével a terminális foszfát a töltések egy részével együtt távozik, így **csökken ez a taszítás**.

A **távozó** inorganikus **foszfát** egy olyan **stabil rezonanciaszerkezet**et vesz fel, amilyet az ATP szerkezetben nem vehetett fel. A **foszfátion hidratáltsága** is nagyobb lesz, mint a foszforilcsoporté volt.

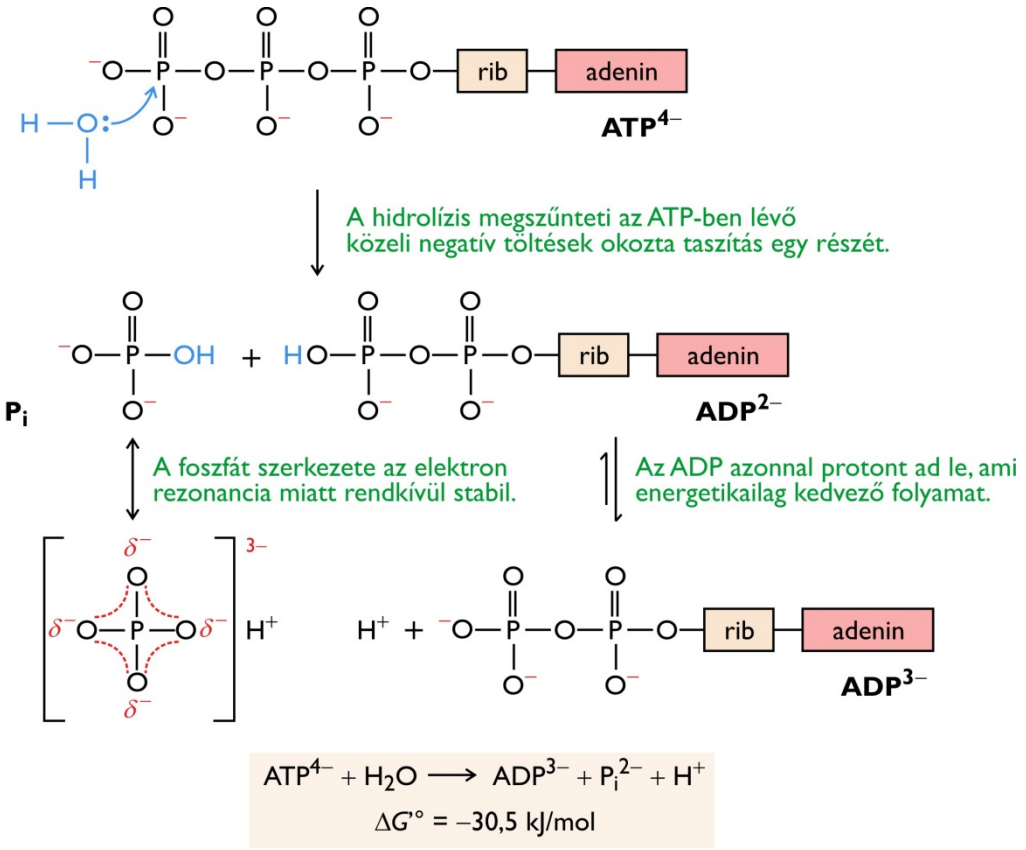
A hátramaradó **ADP** rész azonnal **deprotonálód**ik, ami szintén egy exergonikus lépés. Ráadásul ezzel a termékek száma három lesz, a két kiindulási anyaggal szemben, ami entrópikusan is hozzájárul a szabadentalpia csökkenéshez.

Mindezek miatt az **ATP-ADP átalakulás**ra jellemző **standard** moláris **szabadentalpia változás -30,5 kJ/mol**. Ugyanakkor, ahogyan azt a kémiai reakciókat kísérő szabadentalpia változással kapcsolatban már levezettük, a tényleges, a sejtben lezajló reakció szabadentalpia változása a standard értéken kívül a reakcióban résztvevő anyagok aktuális koncentrációjától is függ.

Ezen felül azt is figyelembe kell venni, hogy a sejtekben az **ATP és az ADP is Mg^{2+}-ionokkal komplexben** szerepel. Magnéziumionok nélkül az ATP-nek négy, az ADP-nek három negatív töltése lenne, az arány tehát négyharmad. Mg^{2+}-ionokkal komplexben az ATP-nek két, az ADP-nek egy negatív töltése van, az arány tehát kettő. Tehát ilyenkor a töltéseffektus nagyobb.

A két hatás eredőjeként a **sejtekben** lévő koncentrációviszonyokat figyelembe véve az **ATP-hidrolízist** kísérő tényleges moláris szabadentalpia változás **-50 kJ/mol** körül van. Ezt az értéket **foszforilációs potenciál**nak is nevezik. Precízen és röviden fogalmazva azt mondhatjuk, hogy az **ATP** azért kitüntetett helyzetű „energia valuta", mert **nagy** a **foszfáttranszfer potenciálja.**

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.9. ábra: Fizikokémiai tényezők, ami miatt az ATP-ADP átalakulás exergonikus

Habár az ATP hidrolízise nagymértékben exergonikus, az **ATP kinetikailag stabil** vegyület, mert a hidrolízishez szükséges **aktiválási szabadentalpia magas**. Az ATP hidrolízis csak megfelelő **enzim jelenlétében** zajlik nagy sebességgel. Emlékezzünk rá vissza, hogy egy reakció ΔG értéke semmit nem mond a reakció sebességéről. A sebesség az aktiválási szabadentalpia (ΔG*) értékétől függ.

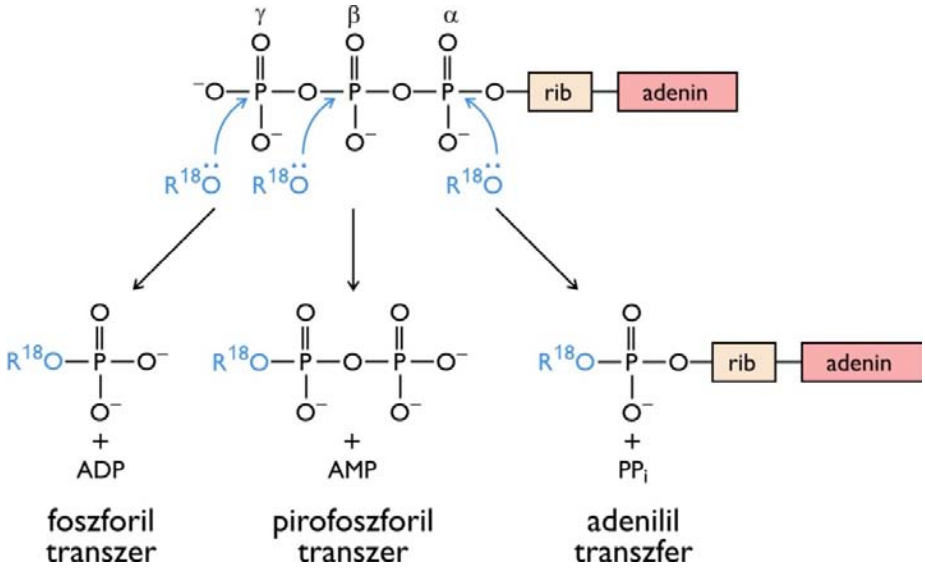
20.7. Csoportátvitel ATP-ről kapcsolt reakciókban

A felépítő folyamatokban az **ATP**-ben tárolt **kémiai energia úgy hasznosul**, hogy az ATP valamelyik csoportja átadódik a reakcióban résztvevő egyik vegyületnek, amely így aktivált, magas szabadentalpia szintű állapotba kerül.

Leggyakrabban ADP + Pi hasadást követően **foszforilcsoport** adódik át, de AMP + PPi hasadás esetén akár a **pirofoszforil-** akár az **adenilil-csoport** is **átadás**ra kerülhet (lásd **20.10. ábra**). Az utóbbi esetben ki kell hangsúlyoznunk, hogy a termék **pirofoszfá**t egy kapcsolt reakcióban mindig **hidrolizál** az általánosan elterjedt **pirofoszfatáz** enzim hatására. Ez utóbbi, szintén nagy szabadentalpia csökkenéssel járó reakciónak (ΔG'° = -19,2 kJ/mol) fontos szerepe van adenilil-csoport átadásával járó reakciók „egyirányúsításában", irreverzibilissé tételében (lásd például lejjebb az aminosavak aktiválását).

Az ábrán szereplő kísérletben az ATP-vel reagáló vegyületeket az oxigén stabil (nem radioaktív) ^{18}O izotópjával jelölték. A cél az volt, hogy atomi pontossággal állapítsák meg, pontosan milyen csoportok adódnak át, és ennek megfelelően milyen mechanizmussal zajlik a folyamat. Az ATP-n három foszforatomon lehet nukleofil támadást végezni. Ez a kísérlet tisztázta, hogy az ATP-ről **foszforilcsoport adódik át (és nem foszfát)**, illetve pirofoszforil csoport adódik át (és nem pirofoszfát).

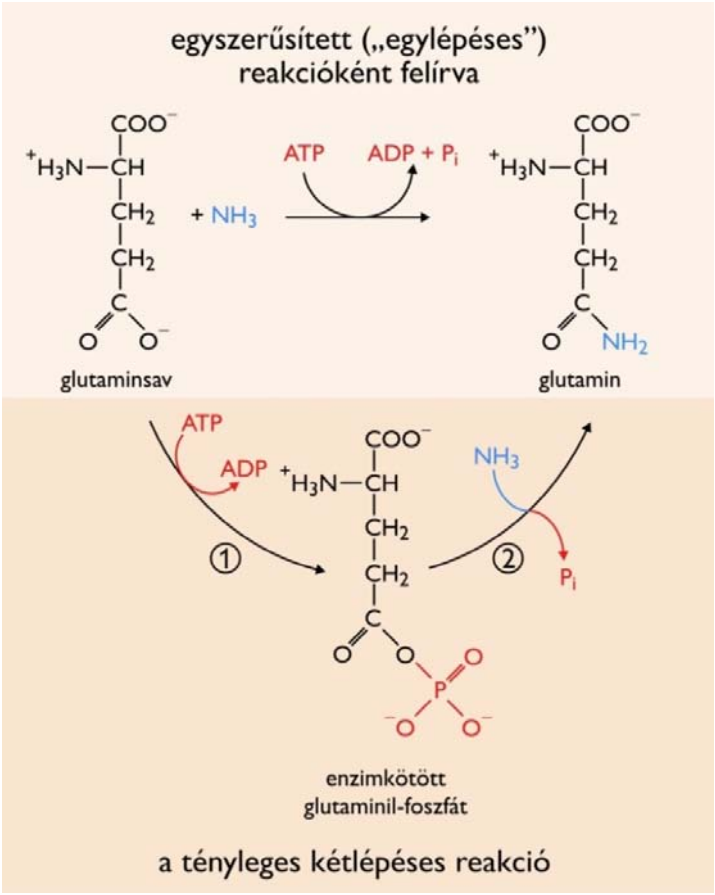
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO Formatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.10. ábra: ATP bomlással járó különböző csoporttranszferek

A könyvben számos példát említettünk, amelyben ATP, vagy azzal analóg NTP illetve dNTP szerepelt. Egyfajta összefoglalásul említsük meg ezeket.

Egy ATP-ADP átalakulással kapcsolt reakció a glutaminsav-glutamin átalakulás, ami önmagában endergonikus lenne (lásd **20.11. ábra**)

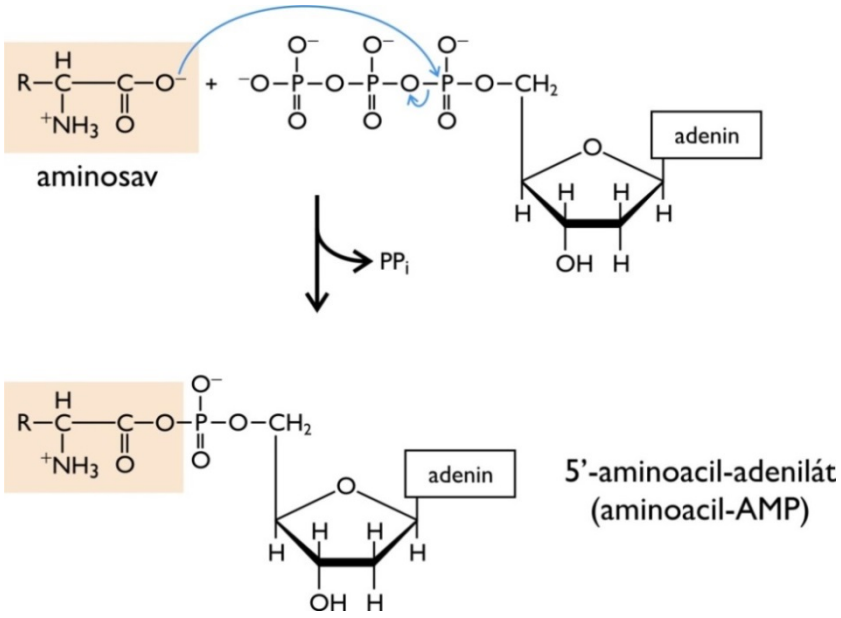


20.11. ábra: A glutamin szintézise glutaminsavból és ammóniából ATP-vel kapcsolt reakcióban

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Jól látható, hogy ebben a reakcióban foszforil transzferre kerül sor, a glutaminsav egy vegyes karbonsav-foszforsav anhidrid intermedier keretében kerül aktivált állapotba.

Amikor a transzláció első szakaszában az aminosavak ATP-felhasználásával aktiválásra kerülnek, első lépésben adenilil csoport kerül átvitelre, és egy aminoacil-adenilát keletkezik. Ebben az esetben is egy vegyes karbonsav-foszforsav anhidrid kötés keletkezik az intermedierben (lásd **20.12. ábra**).

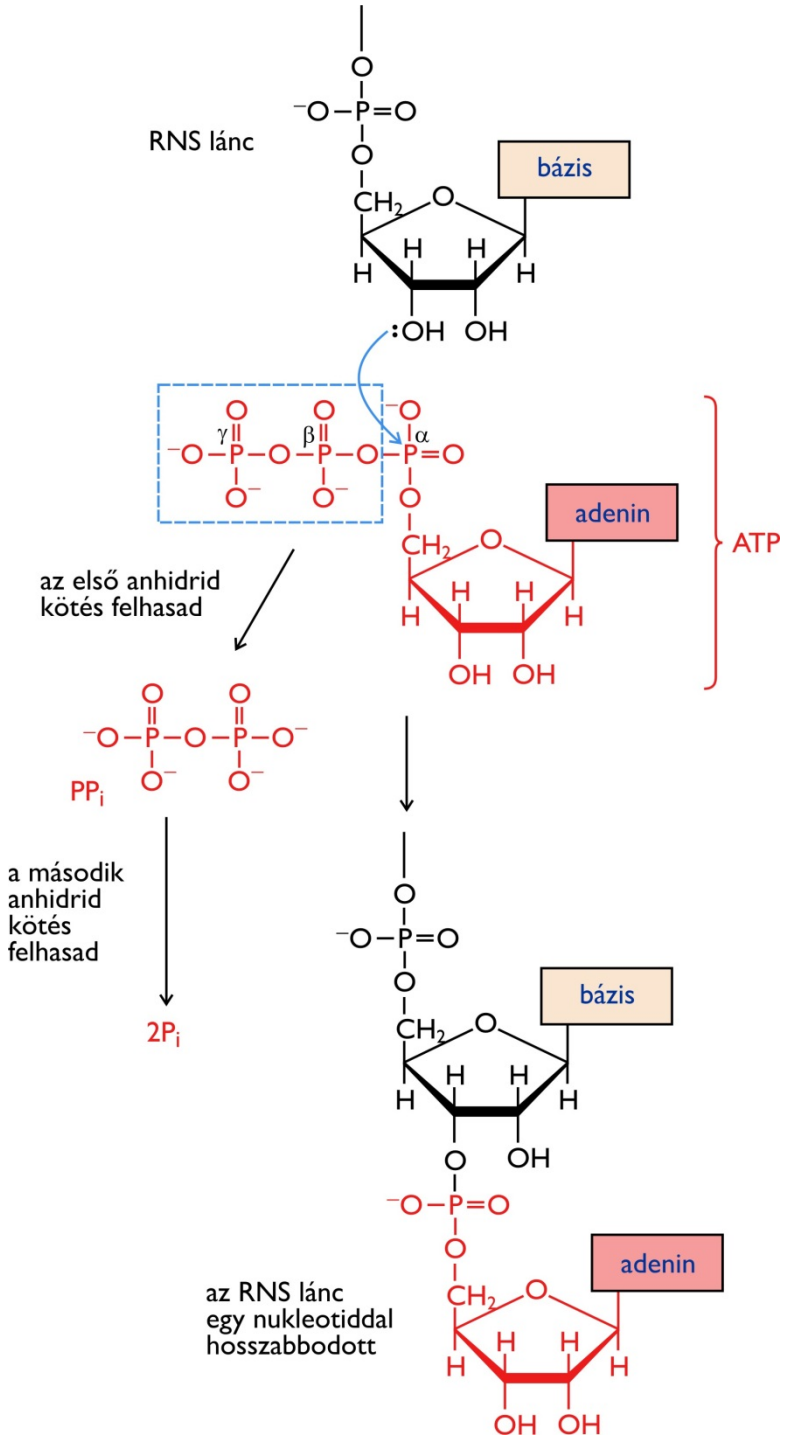


20.12. ábra: Az aminosavak aktiválása ATP-vel

A transzkripció kémiájának ismertetésekor bemutattuk, hogy az RNS szintézishez szükséges kémiai energiát maguk a szubsztrátok biztosítják. Az ATP maga is szubsztrát ebben a folyamatban, amelyben rajta kívül további három, analóg szerkezetű molekula, a CTP, GTP és UTP is szerepel. A reakció során ezek NTP→NMP + PP_i átalakuláson mennek keresztül.

Itt nem beszélhetünk kapcsolt reakcióról, hiszen valójában egyetlen reakció megy végbe, amelynek során NTP→NMP átalakuláshoz hasonló reakció zajlik, bár itt az NMP-k láncba épülnek (lásd **20.13. ábra**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.13. ábra: Az RNS szintézis során NTP vegyületek bomlanak

20.8. Az ATP-keletkezés szubsztrát-szintű foszforilálással

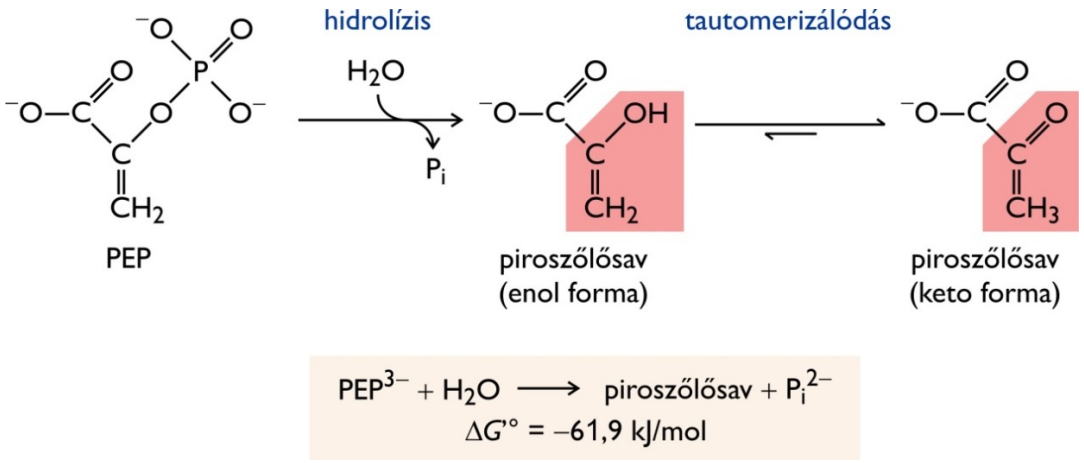
Mint említettük, az ATP ADP-t eredményező hidrolízisét kísérő negatív szabadentalpia változás nagy abszolút értékű, vagyis az **ATP foszforilációs potenciálja magas**.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Ugyanakkor a sejtben vannak olyan **egyéb foszforilált vegyületek** is, amelyek hidrolízisét **még nagyobb** (negatív) szabadentalpia változás kíséri, ezeknek a vegyületeknek a **foszforilációs potenciál**ja tehát az ATP-énél is magasabb (lásd **20.14. ábra**).

Ebből következően ezek a vegyületek **képesek ADP-nek foszforilcsoportot átadni**. Az ATP részben ilyen utakon keresztül keletkezik ADP-ből. Ezt az ATP-keletkezési módot **szubsztrát szintű foszforilációnak nevezzük**.

Jó példa erre a foszfoenol-piroszőlősav (PEP) átalakulása piroszőlősavvá (lásd **20.14. ábra**).



20.14. ábra: A foszfoenol-piroszőlősav az ATP-nél is nagyobb foszforilációs potenciállal rendelkezik

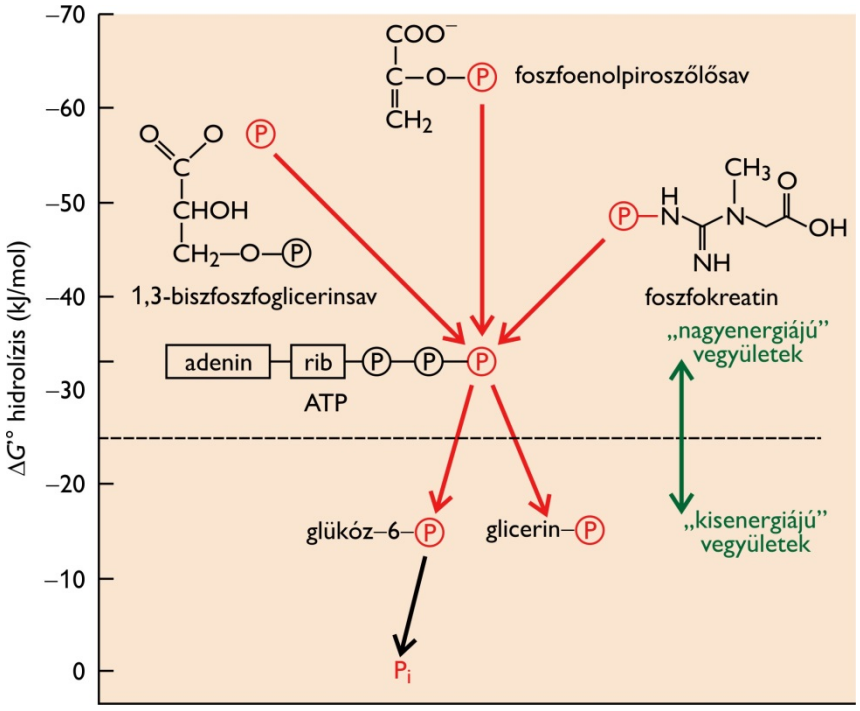
A PEP szerkezetében a foszforilcsoport jelenléte egy egyébként instabil, nagyenergiájú enol formába fagyasztja a molekula elektronszerkezetét. A foszforilcsoport átadását követően kialakulhat a keto forma stabilabb elektronszerkezete. Ez magyarázza, hogy a foszforilcsoport átadása miért jár nagy negatív szabadentalpia változással.

A PEP hidrolízisét az ATP hidrolízisénél nagyobb abszolút értékű, negatív szabadentalpia változás kíséri. A PEP foszforilációs potenciálja tehát meghaladja az ATP-ét. Azonos koncentrációk esetén a PEP képes átadni foszforilcsoportot az ADP-nek (lásd **20.15. ábra**).

A kreatin az izom (és agy) könnyen mobilizálható **energiaraktározó** vegyülete **foszfokreatin** (kreatin-foszfát) formájába. Csekély igénybevétel, illetve nyugalmi állapot esetén az izomsejt ATP szintje magas, és ekkor a kreatin + ATP ↔ foszfokreatin + ADP reakció egyensúlya jobbra tolódik. Tehát ilyenkor a glükóz teljes oxidációjának eredményeként folyamatosan termelődő ATP hatására feltöltődik a foszfokreatin raktár. Amikor az igénybevétel miatt az ATP szint csökken, ez a raktár biztosítja egy ideig az ATP szintjét.

Mind az 1,3-biszfoszfoglicerinsav, mind a kreatinfoszfát esetében az magyarázza a magas foszforilációs potenciált, hogy a foszforilcsoport átadása által egy-egy funkciós csoport elektronszerkezete delokalizálódik, alacsonyabb energiaszintűvé válik.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.15. ábra: A foszforilációs potenciálok különbsége megszabja a foszforil-transzfer irányát

20.9. ATP biztosítja a többi nukleozid-trifoszfát létrejöttét

Az összes nukleozid-trifoszfát, tehát a CTP, GTP, TTP, UTP, valamint a dezoxinukleozid-trifoszfátok (dATP, dGTP, dTTP és dCTP) energetikailag egyenértékűek az ATP-vel. Ezek hidrolízise gyakorlatilag ugyanakkora szabadenergia változással jár, mint az ATP-é, vagyis foszforilációs potenciáljuk megegyezik.

A lebontó folyamatokban elsősorban ATP keletkezik. A **többi nukleozid-trifoszfát keletkezését** a megfelelő nukleozid-difoszfát formából **ATP segítségével** a minden sejtben megtalálható **nukleozid-difoszfát-kináz** katalizálja az alábbi módon:

ATP + NDP = ADP + NTP, illetve ATP + dNDP = ADP + dNTP

Egyes folyamatokban az ATP-ből AMP keletkezik. ATP közvetlenül azonban csak ADP-ből keletkezhet foszforiláció útján. Az **AMP-t** tehát első lépésben **ADP**-vé kell **regenerálni**. Ezt az ATP-igényes folyamatot az **adenilát-kináz** enzim katalizálja az alábbiak szerint:

ATP + AMP = 2 ADP

20.10. Redoxreakciók

A foszforilcsoport transzfer mellett bioenergetikai szempontból kiemelkedően fontos a sejten belüli **oxidációs-redukciós folyamatok** során lezajló **elektrontranszfer** is.

Amikor a lebontó folyamatok (**katabolizmus**) során a komplexebb **szerves vegyületek oxidálódnak**, végső soron víz és széndioxid keletkezik. Ezek a vegyületek egyrészt a kiindulási szerves vegyületeknél oxidáltabbak, másrészt minden egyes lebomló szerves molekulából több molekula oxidált termék keletkezik.

Az oxidált végtermékekben lévő kovalens kötések erősebbek, mélyebb energiaszinten vannak. Részben ez, részben a termékek kiindulási anyagokhoz képesti nagyobb moláris mennyiségéből fakadó entrópia növekedés hajtja a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

szerves vegyületek teljes oxidációját. A felszabaduló energia egy része ráadásul hőleadással a környezetbe távozik, ami növeli a környezet entrópiáját.

A lebontó reakciókat, a **katabolizmust** tehát egyrészt a **stabilabb vegyületek kialakulása (entalpikus tényező)**, másrészt a **termékek megnövekedett száma**, és a **környezetnek leadott hő (entrópikus tényezők) hajtja**.

A szerves vegyületek oxidálásának exergonikus folyamata során az energia egy része ATP és **redukált koenzimek** formájában tárolódik.

Az élő szervezetben csak a terminális oxidáció során történik olyan, közvetlenül oxigén részvételével lezajló oxidáció, ami energetikai szempontból releváns.

Bár vannak a szervezetben olyan kémiai reakciók, amelyek során különböző oxigenáz enzimek segítségével a szerves molekula közvetlenül oxigénnel reagál, de ezek a reakciók nem a kémiai energia felszabadításával és felhasználásával kapcsolatosak.

A **tápanyag molekulákról** az elektronokat és protonokat, vagyis végső soron a **hidrogén atomokat** speciális **koenzimek veszik át**. A reakciót **dehidrogenáz enzimek katalizálják**. Az oxidáció tehát kis elemi lépésekben történik, és redukált koenzimek keletkeznek.

Ebben a soklépéses folyamatban tehát az oxigén végső soron hidrogénnel reagál, és víz keletkezik. A **széndioxid** nem úgy keletkezik, hogy oxigén reagálna szénatommal. Ehelyett az egyre több hidrogént vesztő, egyre oxidáltabb állapotú szenet tartalmazó vegyületekből **dekarboxileződéssel keletkezik** a széndioxid. Az oxigén egy része ilyenkor az eredeti szerves molekulából származik, másik részét pedig víz szolgáltatja, amelyik kettőskötésre addícionálódva lép be.

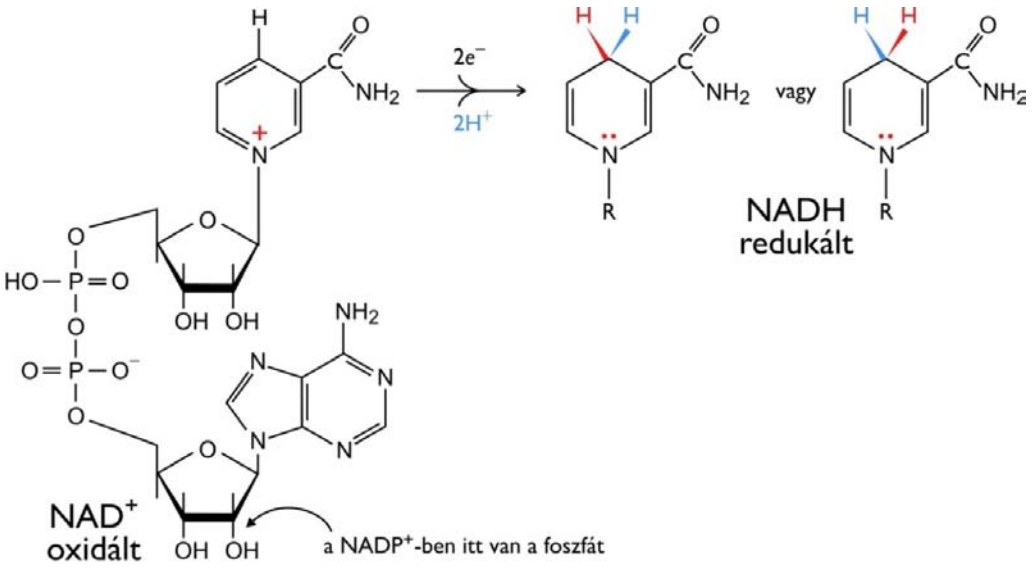
Ahogyan azt a redoxreakciók leírásánál már tárgyaltuk, az oxidáció előrehaladottsága jól követhető az egyes molekulákban lévő szénatomokhoz rendelhető elektronok számával, ha az egyes közös elektronokat mindig teljes mértékben a nagyobb elektronegativitású molekulához rendeljük, tehát az oxidációs számmal (lásd **20.1. táblázat**).

20.1. táblázat: A szénatom oxidációs száma különböző vegyületekben

	Vegyület típusa	A szénatom oxidációs száma
$-CH_2-CH_2$	alkánok	0-től (csak C–C kötés) –4-ig (CH_4)
$-CH_2-CH_2OH$	alkoholok	–1
$-CH_2-C(=O)H$	aldehidek	+1
$-CH_2-C(=O)OH$	karbonsavak	+3
$O=C=O$	széndioxid	+4

A koenzimek közül kiemelendők a **NAD^+**és redukált formája a **$NADH+H^+$** (lásd **20.16. ábra**) és a **FAD** és a redukált **$FADH_2$** (illetve ez utóbbiak FMN változatai) (lásd **20.17. ábra**). A legtöbb redoxreakcióban ugyanis ezek a koenzimek szerepelnek.

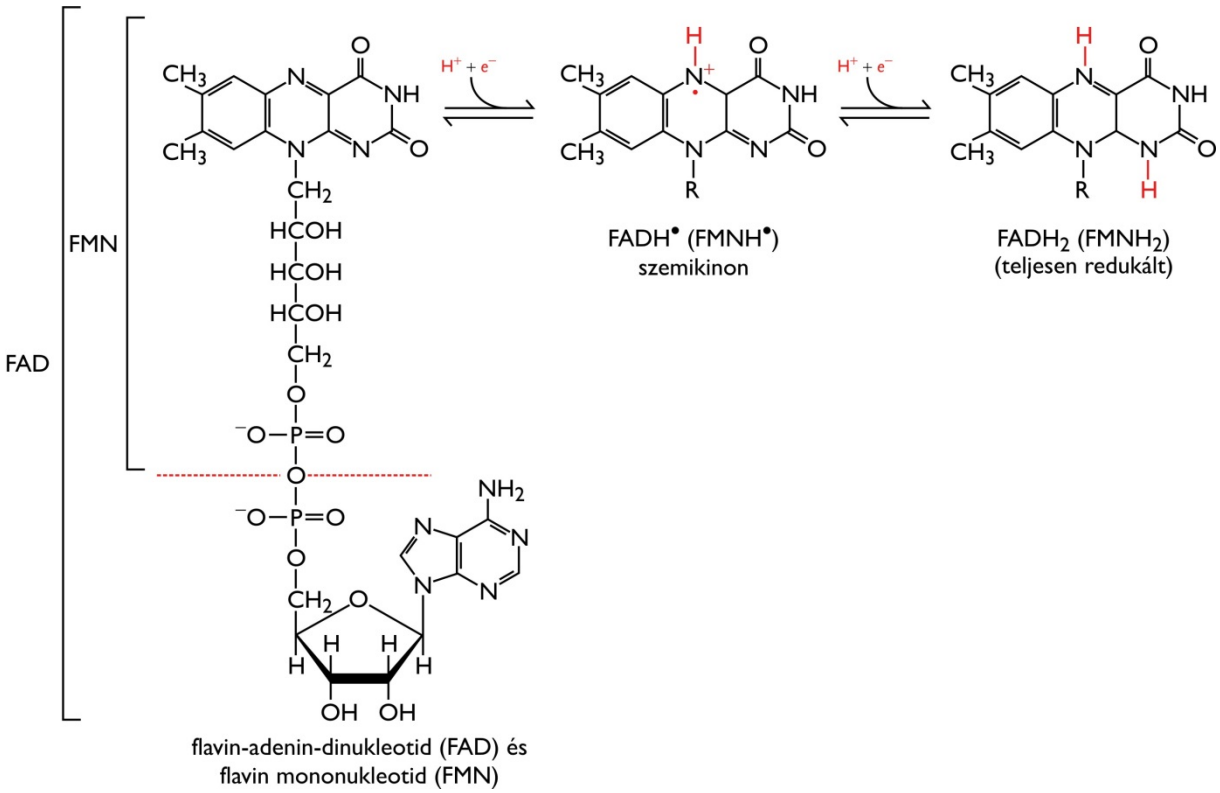
XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.16. ábra: A NAD koenzim szerkezete oxidált és redukált állapotban

A **nikotinsavamid-adenin-dinukleotid**, NAD^+ és annak 2' foszforilált analógja a $NADP^+$**hidridiont** (két elektron és egy proton) **képesfelvenni** redukciója során. A reakció eredményeként a **nikotinsavamid gyűrű** elektronszerkezete megváltozik, a nitrogén pozitív töltése megszűnik, és **kinonoid szerkezet jön létre (**lásd **20.16. ábra**). A változás spektrofotometriával követhető.

A NAD^+ és a $NADP^+$ lazán kapcsolódnak a dehidrogenázhoz, arról leválva szabadon diffundálnak a sejtben, és másik enzimhez kötődhetnek. Más szóval **ko-szubsztrátként működnek**. A **NAD** főleg **lebontó folyamatokbanelektronakceptor**ként működik, míg a **NADPHfelépítő folyamatok** fontos **elektron donora** (ez biztosítja az ún. „**redukáló erő"**-t**)**. A legtöbb enzim szelektíven vagy csak NAD-ot vagy NADP-t használ kizárólagos specifitással.



20.17. ábra: A flavin-mononukleotid és a flavin-adenin-dinukleotid szerkezete oxidált és redukált állapotban

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

Az elektron akceptor koenzimek másik két fontos tagja a **flavin-mononukleotid (FMN)** illetve **flavin- adenin-dinukleotid (FAD**). Ezek a koenzimek **egy**, **illetve két elektron + proton felvétel**re egyaránt képesek. Ezek a koenzimek szorosan, **prosztetikus csoport**ként kötnek a dehidrogenáz enzimhez, így nem diffundálnak szabadon egyik enzimről a másikra. Az egy illetve két hidrogéntranszfer lehetősége miatt többféle kémiai reakcióban vesznek részt, mint a NAD^+ ill. $NADP^+$.

20.11. Példa egy összetett anyagcsere útvonalra: a tápanyagok aerob lebontása, vagyis a sejtlégzés áttekintése.

A tápanyagok **aerob lebontás**ának sémáját a **20.18. ábra** illusztrálja.

Az összetett folyamaton belül **három fő szakasz**t különíthetünk el.

Az **első szakasz**ban történik a **zsírsavak, a glükóz és egyéb szénhidrátok**, valamint egyes **aminosavaklebontása acetil-csoportoki**g, melynek eredményeképpen **acetil-koenzim-A**(acetil-CoA) **keletkezik**. Az acetilcsoport a koenzim-A-hoz egy **tioészter kötés**en keresztül kapcsolódik, ezáltal aktiválódik. Az első és második szakasz oxidációs lépéseiben NADH keletkezik.

A **második szakasz**ban a keletkezett **acetil-CoA a citromsavciklusban oxidálódik**. A ciklus négy lépésében elektronok elvonásával redukált koenzimek (3 NADH és egy $FADH_2$) keletkeznek.

A **harmadik szakasz**ban a redukált koenzimek által szállított **elektronok**at membránkötött elektronszállítók, a légzési lánc tagjai (**elektrontranszportlánc**) veszik át, melyek végső soron **oxigént redukálnak vízzé**. Ennek energiája segítségével ATP szintetizálódik.

Eukarióták esetében az **elektrontranszportlánc** tagjai a **mitokondrium belső membránjá**ban helyezkednek el. A redukált koenzimek által szállított protonok és elektronok ebben a folyamatban ideiglenesen elválnak egymástól. Az **elektrontranszportlánc**ban az elektronok vegyületről vegyületre vándorolva egyre alacsonyabb energiaszintre kerülnek. Az energiaszint csökkenését kísérő felszabaduló energia egy része arra fordítódik, hogy **protonok pumpálód**j**anak** a mitokondrium lumenéből **a mitokondrium két membránja közötti térbe**.

Ennek következtében a két membrán közötti térben nagyobb lesz a protonkoncentráció, mint a lumenben.

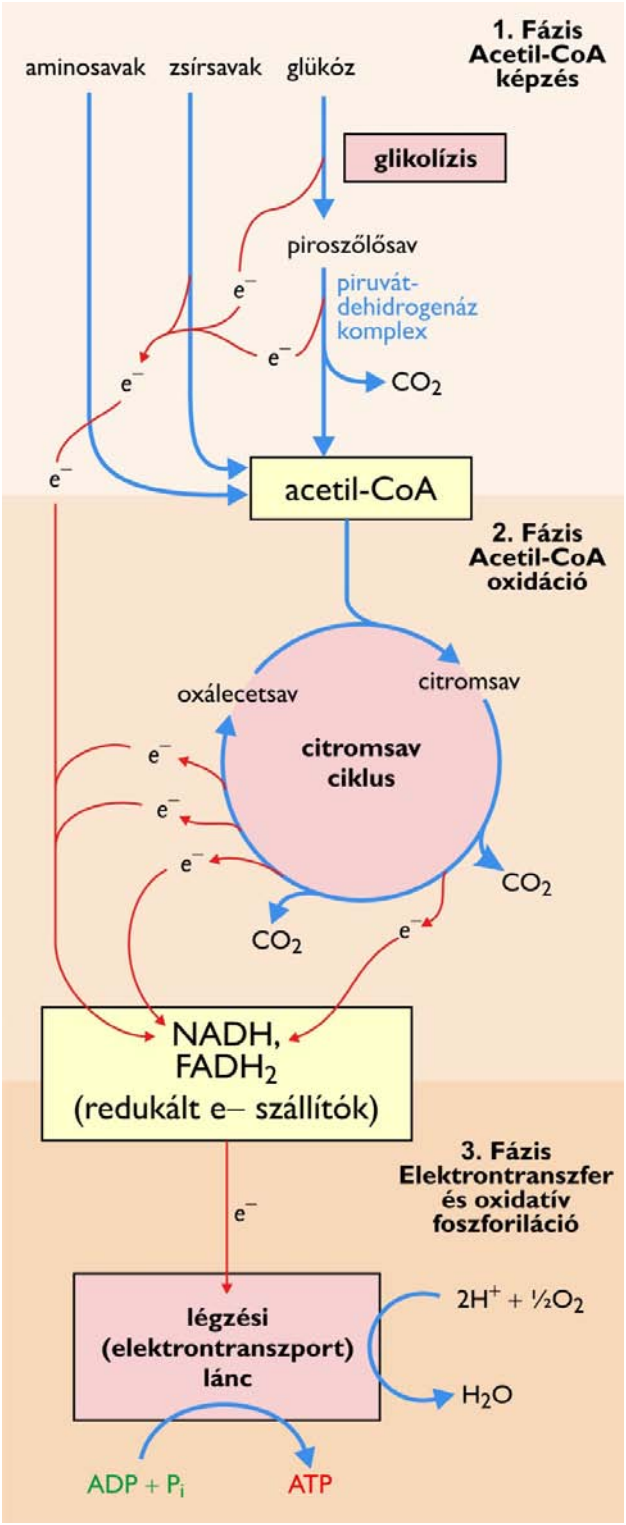
A protonkoncentráció **részben kémiai potenciálkülönbséget**, **részben elektromos potenciál különbséget** generál **a belső membrán két oldalán**.

A proton koncentráció a gradiens irányában, exergonikus folyamatban egyenlítődik ki. A protonok a belső membránba ágyazódó **ATP-szintáz enzim**en keresztül vándorolnak át, amely a protonok átvándorlásában megtestesülő energia egy részét arra használja, hogy ADP-ből és inorganikus foszfátból kiindulva ATP-t generál.

Ennek a fejezetnek egy korábbi részében már ismertettük, hogy az ATP egy része szubsztrátszintű foszforilációval keletkezik ADP-ből. Aerob élőlényekben az ATP nagyobb része azonban az itt említett, **terminális elektrontranszportlánchoz kapcsoltoxidatív foszforiláció** útján keletkezik.

Az itt vázolt folyamat molekuláris mechanizmusát, az úgynevezett **kemiozmotikus modell** részleteit, valamint a természet egyik legcsodálatosabb fehérje gépezetének, az ATP-szintáznak a működését az e-jegyzet következő „kötetében” fogjuk kifejteni.

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



20.18. ábra: A tápanyagok aerob lebontásának sémája

20.12. Összefoglalás

Az **élőlények termodinamikailag az egyensúlytól távol eső, nyílt rendszerek**, ezért fennmaradásukhoz állandó anyag- és energiaáramlás szükséges. Az **univerzális energiaátvivő az ATP** (bár egyes reakciókban specifikusan más nukleozid trifoszfát szerepelhet). A tápanyagok lebontása során, vagy fototrófok esetén részben a

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

fotofoszforiláció során ATP keletkezik, az ATP-ben tárolt kémiai energia használódik fel az energiaigényes folyamatokban.

A tápanyagok oxidációja során a **legfontosabb proton és elektron akceptor a NAD és a FAD** oxidoredukciós **koenzimek**, amelyek redukált "feltöltött"állapota hasonlóan más feltöltött aktivált hordozó-koenzimhez szintén nagyenergiájúnak tekinthető. A reduktív bioszintetikus lépések során **a legfontosabb proton és elektron donor a NADPH**.

A **lebontó folyamatok konvergensek**, a szénhidrátok, zsírok és fehérjék lebontása során néhány közös intermedier keletkezik, amelyek a citrát-ciklushoz csatlakoznak.

A **felépítő folyamatok divergensek**, viszonylag kisszámú kiindulási anyagból készül minden összetett szerves molekula.

A lebontó és felépítő utak minden esetben többé- kevésbé eltérnek egymástól, így az elkülönült utak eltérően szabályozhatók. A szabályozás gyakran az ATP/ADP/AMP szintek érzékelésén, az energiatöltöttség beállításán keresztül, allosztérikus módon valósul meg (lásd **17.2.2.** és **20.3. fejezetek**).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

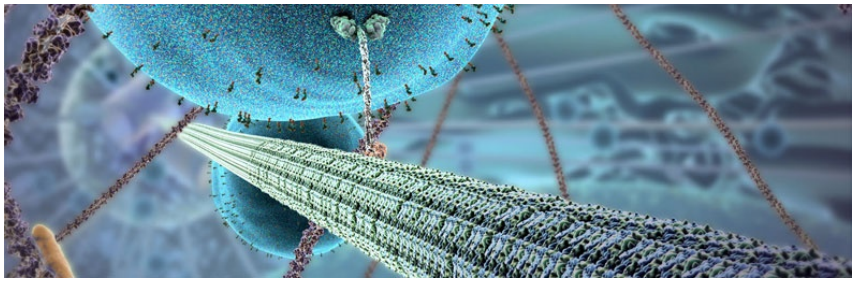
A. függelék - Függelék

Az e-jegyzethez kapcsolódó animációk

„Egy sejt belső élete” (**Inner Life of a Cell**, © 2006 President and Fellows of Harvard College. Created by Alain Viel, PhD and Robert Lue, PhD in collaboration with XVIVO, LLC and John Liebler, Lead Animator). Az animációt a szerző bocsájtotta a rendelkezésünkre és a Harvard Egyetem szíves hozzájárulásával mutatjuk be (lásd **1. animáció**).

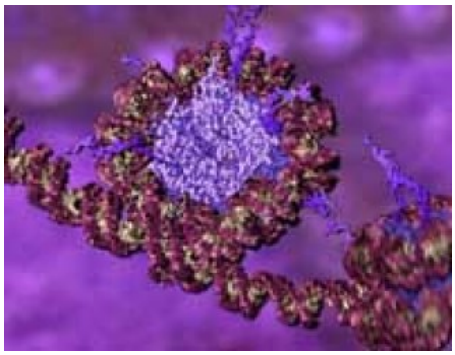
Az animáció egy, a vérerek belső falán végiggördülő fehérvérsejt működésébe enged bepillantást. Az intracelluláris folyamatok közül a sejtmembrán és a sejtváz dinamikája, egy motorfehérje (a kinezin transzport motor mozgása egy mikrotubulus mentén) működése, valamint a transzláció lépései és egy extracelluláris szabályozó fehérje exocitózisa kerül bemutatásra a résztvevő fehérjék valós térszerkezeti modelljei felhasználásával.

Az animáció online megtekinthető itt: http://multimedia.mcb.harvard.edu/



1. animáció: Egy sejt belső élete” (The Inner Life of a Cell)

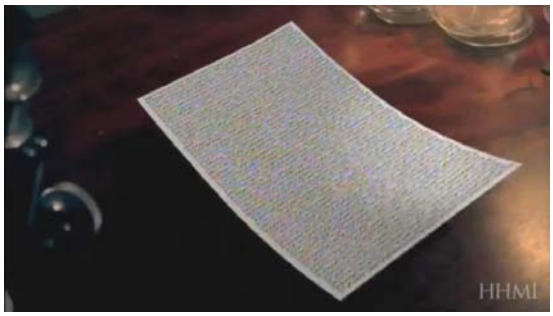
A „Body code” című video a fő molekuláris biológia folyamatokat (A DNS és a kromoszómák szervezédőse, replikáció, transzkripció, transzláció) mutatja látványos molekuláris grafikai animáció formájában (lásd **2. animáció**). Az animációt a szerző, Drew Berry szíves hozzájárulásával mutatjuk be. Az animáció számos egyéb biológiai animációval együtt megtekinthető a Walter and Eliza Hall Institute (Victoria, Australia) honlapján: http://www.wehi.edu.au/education/wehitv/.



2. animáció: „Body code” (molekuláris biológiai folyamatok molekuláris grafikai animációja)

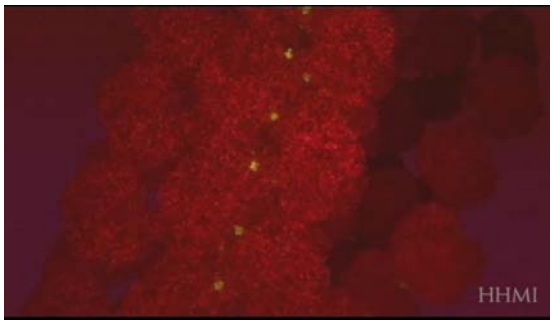
Az e-jegyzet anyagához kapcsolódó alábbi animációkat (lásd **3. animáció - 13. animáció**) a Howard Hughes Medical Institute (HHMI) bocsájtotta rendelkezésünkre. Az eredeti forrásuk: http://www.hhmi.org/biointeractive

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



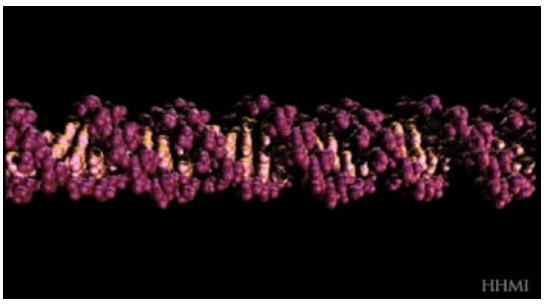
3. animáció: A humán DNS információtartalma

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/coding-sequences-dna)



4. animáció: Sarlósejtes vérszegénységet okozó hemoglobin mutáció

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/sickle-cell-anemia)



5. animáció: A DNS kémiai szerkezete

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/chemical-structure-dna)



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

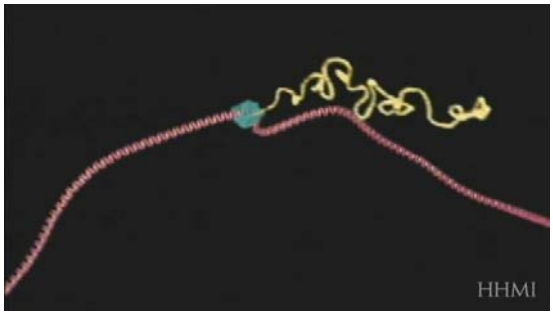
6. animáció: A DNS magasabbrendű szerkezeti formái

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/dna-packaging)



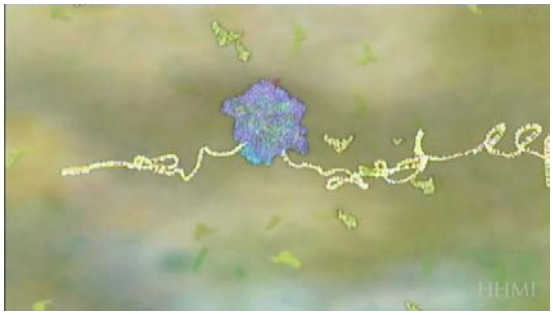
7. animáció: A replikáció mechanizmusa

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/dna-replication-advanced-detail)



8. animáció: Az eukarióta transzkripció mechanizmusa

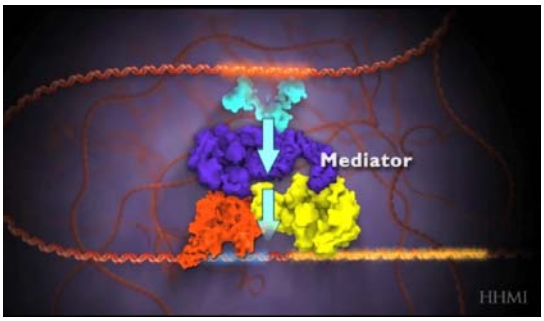
(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/dna-transcription-advanced-detail)



9. animáció: A transzláció mechanizmusa

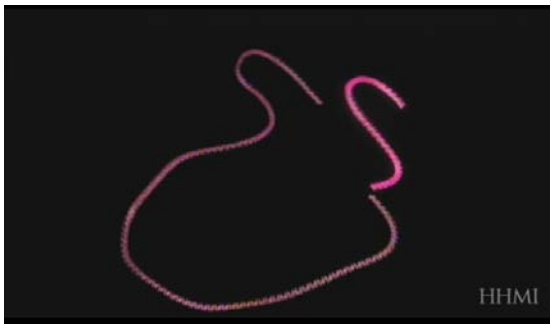
(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/translation-advanced-detail)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/



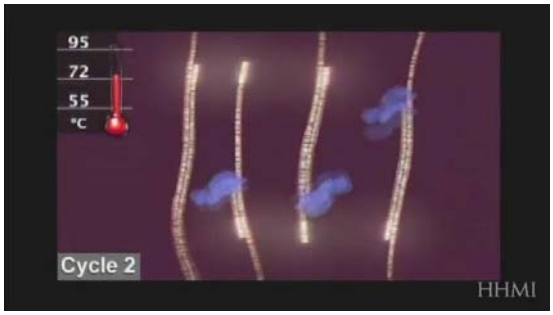
10. animáció: Az eukarióta transzkripció szabályozása

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/regulation-eukaryotic-dna-transcription)



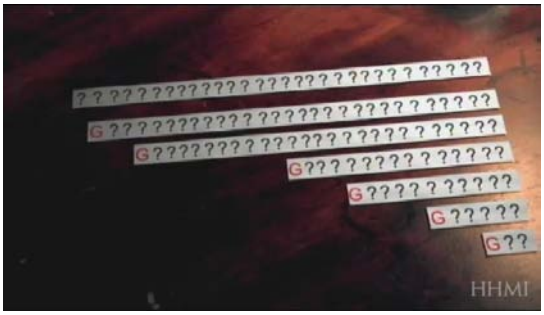
11. animáció: Klónozás plazmid vektorba EcoRI enzimmel

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/genetic-engineering)



12. animáció: Polimeráz láncreakció

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/polymerase-chain-reaction)



XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/

13. animáció: DNS-szekvenálás láncterminációs módszerrel

(forrás: http://www.hhmi.org/biointeractive/sanger-method-dna-sequencing)

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at http://www.renderx.com/