# 6. Nukleinsav-módosító enzimek

A cím egy kicsit félrevezető lehet, mert a nukleinsavakat nukleotidokból szintetizáló enzimeket is ebbe a csoportba soroltuk. Az alábbi kategóriákat tudjuk megkülönböztetni:

Polimerázok

Nukleázok

Ligázok

Másodlagos módosító enzimek

Térszerkezet módosító enzimek

Ebben a fejezetben a fenti csoportokba tartozó, a molekuláris biológiában leggyakrabban használt enzimek felsorolása történik. Ismertetjük az enzimek specifitását, főbb jellemzőit, és a legfontosabb felhasználási területüket. Ha az említett felhasználási területeket az olvasó nem ismeri, nem kell megijednie; ilyenkor tovább kell lapozni, a jegyzet későbbi részeiben többségük ismertetésre kerül. Akkor lesz érdemes visszalapozni ehhez a fejezethez, hogy az enzimek tulajdonságainak függvényében lehessen értelmezni az adott technikát.

## 6.1. Polimerázok

A polimerázok katalizálják a nukleotidokból történő nukleinsavláncok felépülését. A polimerizáció **energiaigényes**, a láncba beépüléskor a nukleotid-trifoszfátok magas energiájú foszfoanhidrid-kötése felhasad, ami a szükséges energiát szolgáltatja. A felszabaduló pirofoszfát két inorganikus foszfáttá történő hasadása pedig a reakciót (energetikailag) **egyirányúvá** teszi. Működésük mechanizmusából következik, hogy a polimerizáció **kizárólag 5’-3’ irányú** lehet (ez alól az élővilágban nincs kivétel). Megkülönböztetünk **DNS- és RNS-polimerázokat**, értelemszerűen ezek DNS vagy RNS polimerizációját katalizálják. A különböző polimerázok eltérhetnek sebességi állandójukban, hőstabilitásukban, hibajavító képességükben, processzivitásukban, a módosított nukleotidok felismerésének képességében.

### 6.1.1. DNS-polimeráz

A DNS-polimerázok a DNS egyik szálának polimerizációját katalizálják. Működésükhöz többnyire szüksége van egy **templát szálra**, amely mintául szolgál az új szál szintéziséhez. A templát szál többnyire DNS, de vannak RNS-dependens DNS-polimerázok is. Szintén fontos feltétel, hogy a nukleinsav legalább egy rövid részen dupla szálú legyen (egy komplementer szakaszra, ún. **primerre** van szükség), a DNS-polimerázok innen képesek 5’-3’ irányban hosszabbítani a láncot (6-1. ábra).

6-1. ábra

http://www.virology.ws/wp-content/uploads/2009/05/dna-polymerase-1.jpg

2013.09.12.

Molekuláris biológiában igen sokféle DNS-polimerázt használnak az elvégzendő feladat igényeinek megfelelően. Standard körülmények között az egyik leggyakrabban használt enzim az E. coli DNS-polimeráz I enzimének (limitált proteáz hasítással létrehozott) egy darabja, az ún. **Klenow fragment**. Jellemző rá, hogy nemcsak 5’-3’ polimeráz, de 3’-5’exonukleáz aktivitása is van, az 5’-3’ exonukleáz aktivitása viszont hiányzik. Általánosan használják a DNS második szálának megszintetizálására, radioaktív próbák készítésére, 5’ túlnyúló végek feltöltésére és 3’ túlnyúló végek visszaemésztésére (ún. „tompa végek” készítésére).

 A Klenow fragmenthez nagyon hasonló a működése a T4 és a T7 bakteriofágok polimerázainak. A **T4 polimeráz** 3’-5’ exonukleáz aktivitása kb. 200-szor nagyobb a Klenow fragmenténál, ezért az enzim jóval pontosabb átírásra képes (kevesebb hibát ejt a polimerizáció során). Leggyakoribb alkalmazási formái: a 3’-vég visszaemésztése során tompa vég (**blunt end**) vagy 5’ túlnyúló vég keletkezhet, **tompa végű vagy ligálás-independens klónozás**i technikáknál tudjuk ezt kihasználni. **Nagy** pontossága (**fidelitása**) és hiányzó 5’-3’ exonukleáz aktivitása miatt polimerázként használható **irányított mutációk** bevitelére szolgáló reakciókban. A **T7 polimeráz** 3’-5’ exonukleáz aktivitása még nagyobb (kb. 1000-szerese a Klenow fragmentének), viszont amivel igazán kitűnik, az a **magas processzivitás** (ez azt jelenti, hogy ha az enzim megkapaszkodott, nehezen engedi el a DNS-szálat, sokáig tudja a polimerizációt katalizálni ugyanaz a molekula). Elterjedten használják irányított mutageneziseknél, 3’-5’ exonukleáz aktivitását elrontva pedig **szekvencia-analízisnél** (**szekvenáz enzim**).

 Az ép **E.coli DNS-polimeráz I**-nek van **5’-3’ exonukleáz** aktivitása is: Egész addig halad a polimerizáció az egyes szálon, amíg egy dupla szálú részhez nem ér. Ezután azonban az enzim nem áll le: a dupla szálú rész egyik felét 5’-3’ irányban emészti maga előtt, és a helyére új szálat szintetizál (ha talál az oldatban dezoxi-nukleotid-trifoszfátokat). Ezt a tulajdonságát kihasználva az enzimet elsősorban ún. **nick transzlációhoz** használják: Ha van a kettős szálú DNS-ünk egyik szálán egy szakadás (nick), az enzim a szakadástól kezdve 5’-3’ irányban kicseréli a szálat (mondjuk radioaktívan jelölt nukleotidokat tartalmazó új szálra) (6-2. ábra). DNS-polimeráz I-et használhatunk **cDNS második szálának** átírásakor is (lásd: 11. fejezet).

6-2. ábra

http://www.bbioo.com/uploadfile/200511/20051115143423244.gif

2013.09.12.

Hőforrásokban élő organizmusokban **hőstabil** DNS-polimerázok találhatóak. Ezeknek az ismertetésére a következő fejezetben kerül sor.

 Ritka, csak RNS-vírusokban található polimerázok az RNS templátról DNS-t szintetizálni képes ún. **reverz transzkriptázok**. Döntően cDNS-ek (például cDNS-könyvtárak) készítésére szokták őket használni. Egyes reverz transzkriptáz enzimeknek gyenge RN-áz aktivitásuk is van, amit szintén ki lehet használni cDNS-ek második szálának szintézisekor.

 Templátfüggetlen enzim a terminális dezoxiribonukleotidil-transzferáz (röviden: **terminális transzferáz**), mely random nukleotidokat beépítve képes egyes szálú DNS-t szintetizálni. Exonukleáz aktivitása nincs, működéséhez kobaltionok szükségesek. Használata igen elterjedt, elsősorban azonos nukleotidokat tartalmazó **3’ túlnyúló végek** készítésére használják (**homopolimer farkazás**) (6-3. ábra).

6-3. ábra

http://biosiva.50webs.org/dna%20cl51.gif

2013.09.12.

### 6.1.2. RNS-polimeráz

Az RNS-polimerázok többnyire DNS-, ritkábban RNS-dependens polimerázok (utóbbiak néhány RNS-vírusban találhatóak). A polimerázok működéséhez nem kell már meglévő dupla szálú szakasz, **primer-függetlenek**. Néhány speciális RNS-polimerázon (pl. primáz) kívül kötődésükhöz szükségük van egy jól meghatározott nukleotidsorrendű DNS-szekvenciára (**promóter-régió**), amely közvetlen közeléből elkezdődik az RNS-szintézis (a széttekert DNS egyik szálát használva templátnak). Eukariótákban a polimeráz DNS-hez történő kapcsolódása más segédfehérjék (transzkripciós faktorok) segítségével történik. Molekuláris biológiában a DNS-dependens RNS-polimerázok közül elsősorban bakteriofágok (**T4**, **T7** és **SP6**) polimerázait használják elterjedten.

Az RNS-sé átírni kívánt DNS-szakaszt valamelyik (a T4, a T7 vagy az SP6 RNS-polimeráz felismerőhelyének megfelelő) promóter mögé klónozzák. A felszaporított, és izolált génkonstrukciót a gén mögött restrikciós endonukleázzal (lásd később) hasítják. A rendszerbe megfelelő RNS-polimerázt és ribonukleotid-trifoszfátokat adnak, így állítják elő az adott RNS-t *in vitro*. Ezt hívjuk az RNS „run-off” szintézisének (6-4. ábra).

6-4. ábra

http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/runoff.gif

Az RNS-polimerázok között is akad templátfüggetlen: ez a **poli-A polimeráz**, mely az mRNS-ek poliadenilációjában részt vesz. A polimeráz specifikus az ATP-re. Molekuláris biológiában mikroinjektálandó mRNS-ek stabilitásának növelésére, oligodT primerek templátjának elkészítéséhez, és RNS-ek radioaktív jelöléséhez használják.

## 6.2. Nukleázok

A nukleázok a nukleinsavak nukleotidokká, vagy oligonukleotidokká történő degradációját katalizáló enzimek. A DNS-t dezoxiribonukleázok (**DN-ázok**), az RNS-t ribonukleázok (**RN-ázok**) bontják. Megkülönböztetünk **exo- és endonukleázokat** attól függően, hogy a nukleinsavakat a végük felől, vagy a szál belsejében hasítják. Vannak **aspecifikusak**, és vannak olyanok, amelyek egy adott nukleotidszekvencia felismerése után hasítanak (**restrikciós endonukleázok**).

### 6.2.1. Dezoxiribonukleázok

6.2.1.1. Aspecifikus DN-ázok

Az aspecifikus DN-ázok nem specifikus (vagy csak nagyon tágan értelmezve specifikus) szekvenciáknál hasítják a DNS-t. Ha egy mintát szeretnénk DNS-szennyeződéstől megszabadítani, akkor általában emlős (pl. szarvasmarha) eredetű **DN-áz I**-et használunk. A DN-áz I endonukleáz, a DNS-t mono-, di-, tri- és oligonukleotidokra hasogatja. Csak **RN-áz mentes** DN-ázt használjunk, ha ép RNS-ekre van szükségünk a mintánkban.

 A **BAL31 exonukleáz** mindkét végén hasítja a **dupla szálú DNS**-t. Nick-eknél és gap-eknél (a kétszálú DNS-ben lévő egyszálú részek) **endonukleázként** hasítja a DNS-t, de a tisztán egyszálú DNS-t is hasonló módon emészti (6-5. ábra). Leggyakrabban **deléciók generálására** használják.

6-5. ábra

http://bioweb.wku.edu/courses/biol350/EnzymeTools7/Images

2013.09.12.

 Az **S1 endonukleáz egyszálú nukleinsavakat** hasít, legyen az láncvégi rész, vagy nem bázispárosodó egyszálú hurok. DNS-en ötször olyan aktív, mint RNS-en. Felhasználási módjai: egyszálú túlnyúló végek eltávolítása, **RNS-térképezés** (6-6. ábra), (5’, 3’ határok, intron-exon határok felderítése), **nuclease protection assay** (RNS-szintek összehasonlítása), **hajtűkanyarok elvágása** (pl. reverz transzkripciónál vagy irányított deléció generálásnál), **deléciók generálása** exonukleáz III enzimmel keverve. (RNS-térképezés során jelölt próba segítségével az adott RNS hosszáról, végeinek elhelyezkedéséről, valamint a belőle kivágódott intronok hosszáról és elhelyezkedéséről nyerhetünk információkat. A többi módszer felhasználhatóságát a későbbiekben ismertetjük).

6-6. ábra

http://www.nationaldiagnostics.com/images

2013.09.12.

Az **exonukleáz III dupla szálú DNS**-re specifikus, annak a **3’ végeit emészti**, 5’ túlnyúló véget generálva (6-7. ábra). Nem processzív, ezért az emésztés lassú, jól kontrollálható. Sebessége függ az éppen leemészteni kívánt nukleotid bázisától (C>A=T>G). Felhasználási területek: **szálspecifikus** radioaktív **próbák** készítése, szekvenáláshoz **egyszálú templát** készítése, **deléciók generálása** (S1 nukleáz segítségével).

 Jó néhány más, aspecifikus DN-ázt is használnak a molekuláris biológiában (exonukleáz VII, „mung bean” nukleáz stb.), ezek működésére azonban itt most nem kívánunk kitérni.

6-7. ábra

http://www.thermoscientificbio.com/uploadedImages/Products/DNA\_RNA\_Modifying\_Enzymes/Nuclease/en019\_1.gif

2013.09.12.

6.2.1.2. Restrikciós endonukleázok

A restrikciós endonukleázokra tekinthetünk úgy is, mint a baktériumok „immunrendszerének” tagjaira, melyeket a vírusok elleni védekezésre fejlesztettek ki. Működésük során specifikusan felismernek egy adott DNS-szekvenciát, hozzákötnek a DNS-hez és **elhasítják** azt. Gyakran képesek ugyanazon DNS-szakasz **metilációját** is katalizálni. A metilált DNS-szakaszt többnyire nem tudják hasítani a restrikciós endonukleázok. Az enzimeket működés alapján három típusba oszthatjuk:

**I. típusú**: Több alegységből állnak, ugyanaz a komplex katalizálja a hasítást és a metilálást. A DNS-t a specifikus felismerőhelytől messze, **aspecifikusan** hasítják. Molekuláris biológiában nem tudjuk őket használni.

**III. típusú**: Az I. típushoz hasonlóan több alegységből állnak, ugyanaz a komplex katalizálja a hasítást és a metilálást. Két, egymással szimmetrikus felismerőhelyük van, de azoktól távol, **aspecifikusan** hasítanak. Molekuláris biológiában nem tudjuk őket használni.

**II. típusú**: **Homo-** vagy **heterodimerek**, a felismerőhely szekvenciájában, vagy annak közvetlen közelében hasítanak, **pontosan kiszámítható** módon. A komplexeknek **metiláz aktivitásuk nincs**, működésükhöz Mg2+-iont igényelnek. A **homodimer** enzimek **palindrom** (visszafele olvasva is ugyanaz) szekvenciákat ismernek fel. Működésük következtében a felszabaduló 5’ végeken foszfát-, a 3’ végeken hidroxilcsoport található. Attól függően, hogy milyen hosszú a felismert palindrom szekvencia, megkülönböztetünk 4, 6 vagy 8 kulcsos enzimeket. Molekuláris biológiában ennek a típusnak az enzimeit használják (6-8. ábra).

6-8. ábra

http://www.scq.ubc.ca/wp-content/endonuclease2.gif

2013.09.12.

 A restrikciós enzimek elnevezése emlékeztet a baktériumfajra, amiben megtalálták, és hogy hányadik enzimet találták meg az adott fajban. Az ugyanazon baktériumfajban talált enzimek hasonló pufferben működnek megfelelően, de a különböző fajokban sokszor nagyon más körülmények uralkodnak. A restrikciós enzimeket gyártó cégek megpróbálnak **optimalizált puffer-rendszerek** alkalmazásával úrrá lenni a sokszínűségen, és minél kevesebb puffer alkalmazásával lefedni az összes enzim működési optimumát. A pufferek kiválasztásánál figyelembe kell venni a kémhatást, az ionerőt, a főbb kationok jelenlétét, elsősorban több enzim együttes használata esetén. Hőmérséklet-optimum tekintetében is változatosak ezek az enzimek.

 Előfordulhat az is, hogy az enzim nemcsak a specifikus felismerőhely környékén hasít, hanem másutt is. Ezt hívjuk az enzimek **sztáraktivitásának**. Ez jellemzően akkor fordulhat elő, ha túl sok enzimmel emésztünk, vagy túl magas a glicerinkoncentráció (>5%), esetleg lúgos a kémhatás (pH>8), vagy szerves oldószerek (EtOH, DMSO) maradtak a reakcióelegyben.

 **Mesterségesen** is elő tudnak állítani teljesen új restrikciós endonukleázokat úgy, hogy az egyik enzim adott felismerőhelyéhez (kapcsoló domén) egy másik enzim hasítóhelyét (nukleáz domén) kapcsolják.

 A restrikciós endonukleázok felhasználása igen széles körű, elsősorban DNS **fizikai térképezéséhez**, **rokonsági kapcsolatok** felderítéséhez vagy **genetikai manipulációhoz** használják őket.

### 6.2.2. Ribonukleázok

Többféle ribonukleáz létezik, részletes jellemzésükre most nem térnénk ki. Mindannyiukra jellemző, hogy az RNS-t degradálják. Elsősorban DNS-minták RNS-től való megtisztítására (RN-áz A), vagy cDNS készítésekor a második DNS-szál szintézise előtt/közben használják (RN-áz H).

## 6.3. Ligázok

A ligázok a DNS **replikációjában** és a DNS **hibajavító folyamataiban** vesznek részt. Mindig a nukleinsavak 5’ foszfát-csoportját kapcsolja egy másik lánc utolsó nukleotidjának 3’ –OH csoportjával. A legismertebb, széles specifitású, és ezért a legtöbbet használt a **T4** bakteriofág **DNS-ligáz** enzime. Képes kettős szálú RNS-eket, DNS-eket és DNS/RNS hibrideket egymáshoz „ligálni”, vagy kettős szálú nukleinsavakban lévő, egyszálú szakadásokat (nickeket) befoltozni (6-9. ábra).

6-9. ábra

http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg15\_02.gif

2013.09.12.

A leggyakrabban használt T4 DNS-ligáz működéséhez ATP energiájára van szükség. A reakció-puffernek tartalmaznia kell még Tris-t (pH:7,8), Mg2+- ionokat, és redukálószert (DTT). A ligáz hőmérsékleti optimuma 20-25 °C.

A T4 DNS-ligáz segítségével kapcsolhatunk egymáshoz ragadós, vagy tompa végekkel rendelkező nukleinsavakat, ezért a rekombináns DNS-technikák egyik legfontosabb enzime.

 Az egyszálú nukleinsavak összekapcsolásához legtöbbször a **T4 RNS-ligázt** használják. Ez nem csak RNS-fragmenteket, de egyszálú DNS-fragmenteket is képes egymáshoz ligálni. Működése a T4 DNS-ligázhoz hasonlóan **ATP-függő**. Gyakran használják oligonukleotidok kapcsolására egyszálú cDNS-ekhez (például RACE során, lásd: 11. fejezet).

## 6.4. Másodlagos DNS-módosító enzimek

Ide azokat az enzimeket soroljuk, melyek nem két nukleotid kapcsolatát szüntetik meg, vagy hozzák létre.

### 6.4.1. Alkalikus foszfatázok

A foszfatáz enzimek katalizálják **foszfátcsoportok hidrolízisét** nagyobb molekulákról (nukleinsavakról, fehérjékről stb.). Legelterjedtebbek a lúgos vagy semleges közegben működő **alkalikus foszfatázok**. Molekuláris biológiában legtöbbször arra használják őket, hogy a nukleinsavak 5’ végéről leemésszék a foszfátcsoportot. Erre akkor lehet szükség, ha meg akarják akadályozni, hogy az adott nukleinsav egy nem kívánt ligációs reakcióban részt vegyen (például a linearizált plazmid egyik vége ne a másik végével kapcsolódjon össze) (6-10. ábra). Legismertebbek a bakteriális, az északi rákból származó és a borjúbélből származó alkalikus foszfatázok. Utóbbit (**calf intestinal phosphatase, CIP**) használják a leggyakrabban.

6-10. ábra

http://www.escience.ws/b572/L6/images/CIAP.gif

2013.09.12.

### 6.4.2. Polinukleotid-kináz

A kinázok foszfátcsoport transzferét katalizáló enzimek. A **T4** vagy a **T7 bakteriofágokból** származó polinukleotid-kinázok az ATP γ-helyzetű foszfátját helyezik az 1-es vagy 2-ős szálú DNS vagy RNS 5’ végére.

Az enzim az esetleges 3’ foszfátcsoportok hidrolízisét is katalizálja. A T4 polinukleotid-kináz alkalmazási területei: ligációhoz szükséges **5’ foszfátok generálása**, **5’ vég jelölése** radioaktív foszfáttal (pl. szekvenáláshoz), 3’ foszfátcsoportok eltávolítása.

### 6.4.3. Metilázok

A vad típusú E. coliban **Dam** (DNS adenin-metiláz) és **Dcm** (DNS citozin-metiláz) enzimek metilálják a DNS-t, S-adenozil-metionin felhasználásával. A Dam a GATC, a Dcm a CCAGG vagy a CCTGG szekvenciákat ismeri fel. A metilázok szerepe kettős: egyrészt a **DNS-hibajavításban**, másrészt a **replikáció regulációjában** vesznek részt. Mivel a metiláció gyakran elrontja a restrikciós endonukleázok felismerőhelyét, gyakran **metiláz-deficiens** E. coli törzseket (dam- vagy/és dcm-) alkalmaznak a kutatómunkához. A metilázokat a molekuláris biológiában elsősorban akkor használják, ha a fenti szekvenciákkal **átfedő felismerőhellyel** rendelkező restrikciós endonukleázok működését szeretnék **akadályozni**, vagy **elősegíteni** (ez utóbbira példa a DpnI restrikciós enzim, mely a metilált GATC szekvenciát ismeri fel és hasítja, de a metilálatlant nem).

## 6.5. Térszerkezet-módosító enzimek

Ide azokat az enzimeket soroljuk, amelyek a nukleinsavak elsődleges szerkezetét nem változtatják meg.

### 6.5.1. Helikázok

A helikázok a **replikáció során** működő enzimek, a DNS két szálát **szeparálják** egymástól energia befektetésével. Molekuláris biológiai felhasználhatóságuk elsősorban a konstans hőmérsékleten végrehajtott **polimerizációs reakciók** (például a PCR-hez hasonló elven működő ún. izotermális amplifikáció) elősegítésében rejlik, hogy a reakcióban elkerülhessük a magas hőmérsékletű denaturáló lépéseket.

### 6.5.2. Topoizomerázok

A topoizomerázok a DNS „feltekeredettségi állapotát” szabályozzák. A molekuláris biológiában elsősorban az E. coli **Topoizomeráz I** enzimjét használják, a sokszorosan feltekeredett (supercoiled) **DNS relaxációjához**, vagy a később (11. fejezet) ismertetendő **TOPO-klónozás**i technikához.