

DISS. B 1093

DNS-DIAMIN KOMPLEXEK STABILITÁSÁNAK ÉS ALKILÉZETT DNS-EK
TEMPLÁT AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori disszertáció

Sági János
okleveles vegyész

MTA
Központi Kémiai Kutató Intézete
Budapest
1973



Tartalomjegyzék

	Oldal
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi előzmények összefoglalása	2
2.1. Alifás diaminok hatása a DNS hőstabilitására	2
2.1.1. A DNS stabilitását meghatározó tényezők ol- datban	2
2.1.2. A DNS hőstabilitás vizsgálati módszere és a hőstabilitást meghatározó tényezők	3
2.1.3. Alifás di- és poliaminok hatása	7
2.2. Dipeptidek hatása a DNS hőstabilitására . .	14
2.3. Enzim katalizálta RNS szintézis DNS temp- látón	15
2.3.1. DNS függő RNS polimeráz	16
2.3.2. Az RNS szintézis mechanizmusa	16
2.3.3. Az RNS szintézis inhibitorai	20
2.4. Alifás di- és poliaminok hatása az enzim katalizálta RNS szintézisre	20
2.5. Az in vitro alkilálás hatása a DNS fizikai kémiai sajátságaira	24
2.6. Epoxi vegyületekkel alkilezett DNS	27
2.7. RNS szintézis alkilezett DNS templáton . .	28
2.8. Célkitűzés	31
3. Kísérleti anyagok és módszerek	32
3.1. Modell vegyületek előállítása	32
3.1.1. Diamino vegyületek	32
3.1.2. Dipeptidek	33
3.1.3. Epoxidok	33
3.2. A kísérletekben felhasznált egyéb anyagok	38
3.3. Kísérleti módszerek és eszközök.	39
3.3.1. Hődenaturációs görbék felvétele	39
3.3.2. DNS transzkripció in vitro	40
3.3.3. DNS alkilezése	41

3.3.4.	DNS minták dializise	41
3.3.5.	A DNS renaturálhatóságának meghatározása . .	42
4.	Eredmények és kiértékelésük	43
4.1.	Alifás diamin származékok hatása a DNS hő- stabilitására	43
4.2.	Dipeptidok kölcsönhatása a DNS-sel	49
4.3.	Alifás diamino vegyületek hatása az in vitro DNS transzkripcióra	53
4.4.	Epoxi vegyületekkel alkilezett DNS templát aktivitása enzim katalizálta RNS szintézis- ben	58
5.	Összefoglalás	75
6.	Irodalomjegyzék	77

Bevezetés

A nukleinsav kutatás az elmúlt husz év alatt a genetikai számos alapvető kérdésére választ adott. Ugyanakkor számtalan új problémát vetett fel, és sok részletfolyamat és jelenség továbbra is tisztázatlan, vagy nincs egyértelmű magyarázat rájuk.

Munkám célkitűzése a DNS bizonyos *in vivo* reakcióinak *in vitro* kísérletekben való vizsgálata volt.

Kimutatták, hogy az alifás di- és poliaminok metabolizmusa szorosan összefügg a nukleinsavakéval. Az említett vegyületek stabilizálják a DNS-t inaktiváló folyamatokkal szemben. A hatvanas évek végén kétféle elmélet született a stabilizáció mechanizmusára. Az egyik a konfigurációs effektusokat emeli ki. A sztereokémiai sajátosságok tanulmányozására különböző szerkezetű diaminokat szintetizáltunk, és megvizsgáltuk a DNS-sel való kölcsönhatásukat hődenaturációs módszerrel.

A poliaminok metabolizmusa a sejtbeli RNS szintézissel hozható legszorosabb kapcsolatba. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a di- és poliaminok stimulálják az RNS szintézist, a mechanizmusra azonban nincs egységes magyarázat. Kísérleteinkben megvizsgáltuk néhány, a DNS-t különböző mértékben stabilizáló diamin *in vitro* enzimatis RNS szintézisre való hatását.

A DNS-sel reagáló biológiai alkilezőszerek peptid hordozóinak vizsgálata gyógyszerkémiai jelentőségű, továbbá nukleoprotein alapmodellként is szolgálnak. Az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén szintetizált, elsősorban bázikus dipeptidok DNS-sel való komplex képzését vizsgáltuk meg hődenaturációs módszerrel.

Az intézetben korábban részletes vizsgálatok folytak különböző bifunkciós alkilezőszerek és a DNS közötti reakció tanulmányozására, sztereokémiai és gyógyszerkémiai jelentőségük miatt. Lényeges különbség adódott a sztereoizomer diepoxi-butánok, valamint a különböző térszerkezetű diepoxi-hexitek és ezek szubsztituált származékainak keresztkötő képessége között. A DNS keresztkötéses alkilezése szempontjából jelentős különbséget mutató diepoxi-vegyületekkel alkilezett DNS templáton végbemenő enzim katalizálta RNS szintézist tanulmányoztuk sztereokémiai és mechanizmus vizsgálati célból.

2. Irodalmi előzmények összefoglalása

2.1. Alifás diaminok hatása a DNS hőstabilitására

2.1.1. A DNS stabilitását meghatározó tényezők oldatban

A dezoxiribonukleinsavak másodlagos strukturáját /Watson-Crick-féle dupla hélix/ alapvetően kétféle kölcsönhatás stabilizálja: a komplementer bázisok közötti H-híd, az ún. transverse kölcsönhatások és a szomszédos bázisok közötti ún. longitudinal, interplanar kölcsönhatások, vagy stacking¹. A stabilitáshoz oldatban hozzájárulnak még hidrofób kölcsönhatások és a hidratált ionok effektusai is². A kölcsönhatásokat, így a stabilizáció mértékét a közeg ionkoncentrációja, a H⁺ koncentráció, az oldat hőmérséklete és a nukleinsav bázis összetétele befolyásolja. Ezek a tényezők egymással is szoros összefüggésben vannak.

A DNS stabilitásának meghatározásához a helix-coil átmenetet, azaz a denaturációt kell erre alkalmas módszerrel követni. A DNS denaturációja a fentebb elmondottak alapján hőkezeléssel, pH változtatással, hígítással, valamint az oldószer összetételének megváltoztatásával változhat ki.

A DNS denaturációja az átalakulást kísérő konformációváltozás révén különböző fiziko-kémiai módszerekkel követhető: viszkozitás, optikai forgatóképesség mérés, ultracentrifugás analízis, fényszórás, fényabszorpció-mérés, stb.³⁻⁶. Az egyik legalkalmasabb, valamint legegyszerűbben kivitelezhető és pontos módszer a DNS hővel szembeni stabilitásának vizsgálata, az ultraibolya tartományban történő fényabszorpció változás mérésével.

2.1.2. A DNS hőstabilitás vizsgálati módszere és a hőstabilitást meghatározó tényezők

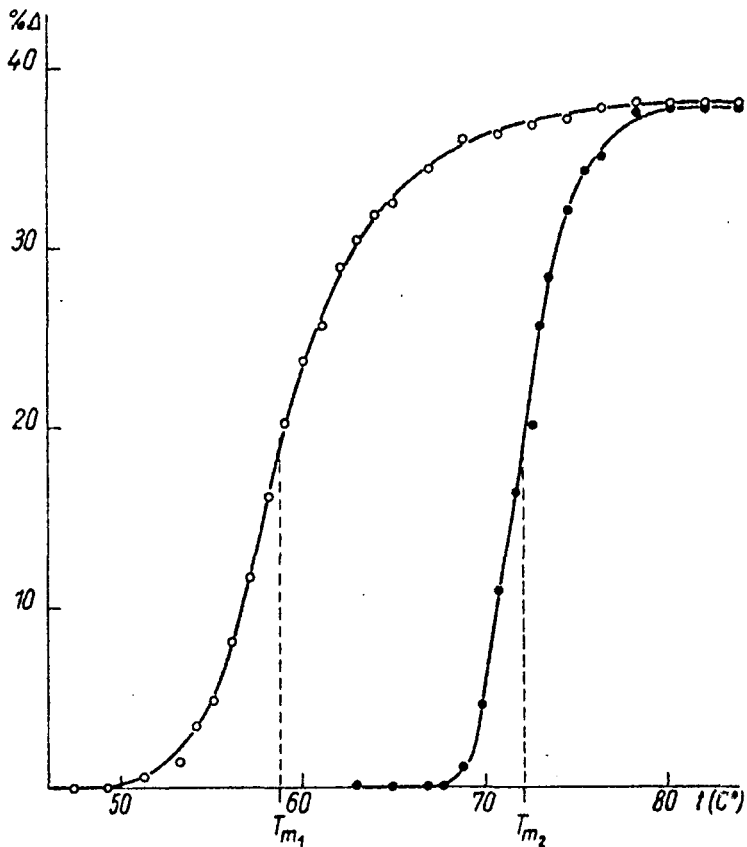
Thomas⁷ és Doty^{6,8} azon felfedezése óta, hogy a DNS oldat hőmérsékletének emelése a dupla hélix disszociációját okozza, sokan tanulmányozták a természetes és szintetikus nukleinsavak hő hatására bekövetkező hélix-coil átalakulását. A vizsgálatokat fiziko-kémiai és biológiai hatás tanulmányozása céljából végezték. A hő indukálta átalakulás követésével az oldatban lévő DNS kötéseiről, szerkezetéről, valamint a természetes DNS-ek bázis összetételéről nyertek információkat. A jelenséget többféleképpen nevezik: hődenaturáció, olvadás /"melting"/, "unwinding" és "unzipping"⁹. A denaturáció elvével és mechanizmusával sok cikk, közöttük több összefoglaló munka, és könyv is foglalkozik^{9,10}.

Kísérletileg a hődenaturációt hig DNS-oldatban /10-40 µg/ml/ és standard pufferban /SSC-puffer: 0,15 M NaCl, 0,015 M trinátriumcitrát, pH=7,2/ 260 nm-nél a fényabszorpció hőmérséklet függvényében bekövetkező változásával mérik. A hődenaturációs folyamat infravörös spektroszkópiával is követhető^{11,12}. A fényabszorpcióban bekövetkező növekedés a bázispárok kötéseinek felbomlása következtében a bázisok elektron eloszlásában beálló változást tükrözi⁹. A fényabszorpció a hőmérséklet függvényében szigmoid-görbét ír le. A görbét "thermal transition profil", "absorption-temperature profil", "melting curve"-nek nevezik. Ilyen görbéket mutat be az 1. ábra.

Az abszcisszán a hőmérséklet van feltüntetve C^o-ban, az ordináta adatait a következő képlet alapján számolják:

$$\% \Delta = \frac{\epsilon_t^{\circ} - \epsilon_{25^{\circ}}}{\epsilon_{25^{\circ}}} \cdot 100 \quad /1/$$

ahol ξ a 260 nm-nél mért extinkciós koefficiens. Az ordináta adatait ξ_{t_0} / ξ_{25^0} formában is szokás megadni¹³. Az előbbi esetben a hiperkróm effektust %-ban kapjuk meg. A megfelelően tiszta, nagy mólsúlyu DNS komplett denaturációja mintegy 40 %-os hiperkróm effektushoz vezet.



1. ábra

A 260 nm-nél mért extinkciós értékeket a hőmérséklet hatására bekövetkező higulást figyelembe vevő ún. hő-expanziós faktorról szokták korrigálni. Ezek az értékek táblázatosan megtalálhatók az irodalomban¹⁴.

A hődenaturációs görbe karakterizálására két paramé-

tert használnak. Az egyik az a hőmérséklet, amelynél a kötések 50 %-a felbomlik: T_m pont. Nevezik "melting temperature"-nek, "thermal transition midpoint"-nak, "half conversion temperature"-nek^{14,15}. A T_m a görbéből grafikusán kapható: a hiperkróm effektus fél értékéhez tartozó hőmérséklet. A második paraméter a T_m -nél mért meredekség, amely szintén grafikusán kapható a görbéből: a hiperkróm effektus 17 és 85 %-ához tartozó hőmérséklet intervallum, jele: ΔT , vagy $\Delta_{2/3}$.

A T_m pont az oldat ionkoncentrációjától, pH-jától, a DNS bázis összetételétől és nativitásától függ.

A T_m pont pH=5,5 és 8,5 között viszonylag független a hidrogénion koncentrációtól¹⁶.

A DNS T_m pontja és bázis összetétele között Marmur és Doty¹⁷ lineáris összefüggést találtak. SSC pufferben az alábbi összefüggés adódott:

$$GC \text{ /\%/} = /T_m - 539/ 2,44 \quad /2/$$

Az összefüggés 30-70 GC% tartalom között érvényes.

Az olvadáspont görbe alakja és a T_m alig függ a DNS mólsúlyától, kivéve drasztikus mólsúly csökkenés esetén^{17,18}.

Schildkraut és Lifson¹⁹ az ionkoncentráció hatását tanulmányozták és *E. coli* DNS esetén egyértékű kationokra a következő összefüggést találták:

$$T_m = 16,6 \lg c_{Me^+} + 102 \quad /3/$$

ahol c_{Me^+} a moláris sókoncentráció. A /2/ és a /3/ egyenlet kombinációjával az alábbi egyenletet kapták:

$$T_m = 16,6 \lg c_{Me^+} + 0,41 /CG\%/ + 81,5 \quad /4/$$

amely egyértékű kationokra $3 \cdot 10^{-4}$ - 0,2 M ionkoncentráció között érvényes, semleges pH-n. A /4/ empirikus egyenlettel viszonylag jól megegyezik a Nagasawa²⁰ által termodinamikai alapon elméletileg levezetett egyenlet:

$$T_m = 15,0 \lg c_{Me^+} + 0,41 /CG\% / + 80,3 \quad /5/$$

A T_m értéke függ az egyértékű kationok minőségétől is. Zimmer és Venner²¹ kimutatták, hogy összehasonlítható körülmények között a T_m lineárisan csökken a kationok ionrádiuszának növekedésével, azaz:



A /3/ ill. /4/ egyenlet csak 0,2 M-ig érvényes. Ennél nagyobb ionkoncentráció esetén a T_m -et az ionkoncentráció \lg -ával szemben ábrázolva a korábbi egyenes egy lapos maximumba hajlik át, majd egy ellenkező iránytangensű egyenes következik^{19,21}. A maximumba való áthajlás a foszfát anionok kationokkal való teljes leárnyékolását jelzi. A destabilizálódás az anionok hatásának következménye^{19,22}. Ez a hatás a hidrofób kölcsönhatások megszüntetésén alapul /"hydrofobic bond breaker"/²².

A T_m pont két- és háromértékű kationoktól való függését Zimmer²³ foglalta össze egy 258 referenciát tartalmazó cikkben.

Erősen heterogén DNS-ek, vagy többfázisú olvadásgörbét adó nukleoproteinek T_m pontjának meghatározására pontosabb módszer az ún. differencia görbék /"differential melting profil"/ felvétele^{24,25,26,27}, vagy az abszorpció-hőmérséklet adatok ún. normal probability graph paper-en való ábrázolása²⁸.

Az így nyert T_m -ek a Doty féle ábrázolással kapott értékekkel jó egyezést mutatnak.

Állati szövetekben a spermin és a spermidin fordul elő leggyakrabban, míg mikroorganizmusokban a spermidin és a putrescin. Kivételek azonban vannak³⁵. A szabad aminosavakon kívül a putrescin és a spermidin acetilált származékait is leírták³⁷.

A di- és poliaminok bázikus, stabil vegyületek. A primer amino csoportok pK_s értékei 9,3 és 11,0 közé, a szekunder aminoké 8,1 és 9,1 közé esnek^{38,39}. A poliaminok szervesen savakkal alkotott sói a foszfátok kivételével mind jól oldódnak vízben⁴⁰.

A di- és poliaminok DNS-sel való direkt, in vitro kölcsönhatásának első vizsgálata Freser, Mahler és Mehrotra⁴¹⁻⁴⁵, valamint Tabor⁴⁶ nevéhez fűződik: a diaminok /poliaminok/ dikationok /polikationok/ formájában növelik a DNS T_m pontját, azaz stabilizálják a DNS-t a hődenaturációval szemben. /A hőmérséklet emelkedésével a dikation molekulában lévő pozitív töltések száma nem, vagy csak alig csökken, $n=3-5$ C-atomszám esetén⁴⁷. /Savi denaturációval /láncossz specificitás nincs/⁴⁸ és hígítással szemben is stabilizálják a DNS-t³².

A diaminok /ált. képlettel $H_3N^+/CH_2/n NH_3^+.2X^-$ / DNS T_m pontját növelő hatása függ az amin koncentrációtól, a két amin csoportot elválasztó alifás lánc hosszától, a DNS bázis összetételétől, a közeg ionkoncentrációjától és a pH-tól⁴⁵.

A stabilizáció mértékére jellemző ΔT_m -ek a vizsgált aminok koncentrációjának függvényében /standard puffer: un. standard saline citrate v. SSC/ telítési görbét irnak le. A görbe az alábbi egyenlettel írható le:

$$\Delta T_m = \frac{\Delta T_{m/\max/} \cdot [A]}{K_A + [A]} \quad /6/$$

ahol a ΔT_m a mért változás, $[A]$ az amin moláris koncentrációja és a $\Delta T_{m/\max/}$ és a K_A a görbére jellemző állandók. A fenti egyenlet bármely di- és poliaminra és DNS-re érvényes. A /6/ egyenlet reciprok alakja:

$$1/\Delta T_m = \left[1/\Delta T_{m/\max/} \right] \left[1 + K_A/[A] \right] \quad /7/$$

$1/\Delta T_m$ -et $1/[A]$ függvényében ábrázolva az ordináta tengelymetszete $1/\Delta T_{m/\max/}$ -ot adja. A K_A gyakorlatilag független az amin lánchosszától, míg a $\Delta T_{m/\max/}$ erősen függ: $n=2-10$ -ig vizsgálva az optimális az $n=5$ /cadaverin/ volt DNS-ek esetén. Az $[A] = 0,04-0,05$ M esetén a ΔT_m már konstans, és a $\Delta T_{m/\max/}$ -nak kb. 70 %-a, azaz a $\Delta T_m = 1,2-5,3$ C° az n -től függően. /A Mg^{2+} ugyanilyen koncentrációban elhanyagolható effektust fejt ki⁴⁵./ Az alifás monoaminok hatása Venner és munkatársai szerint ellentétes⁴⁹, vagyis a T_m az alábbi sorrendben csökken /destabilizáció/:

Na^+ , NH_4^+ > $CH_3NH_3^+$, $/CH_3/2NH_2^+$, $/CH_3/3NH^+$, $/CH_3/4N^+$ > $R/CH_2/nNH_3^+$, ahol az utolsó képlettel jelölt sorozaton belül $n=3-7$, és n növekedésével a T_m fokozatosan csökken.

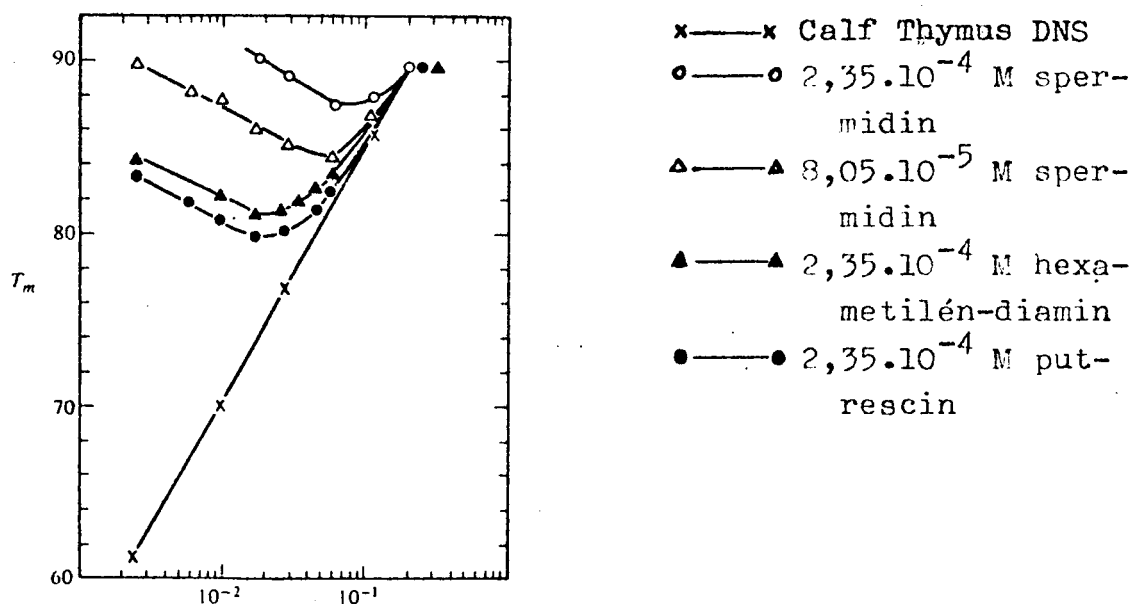
A fenti kísérletekben az aminok nagy sztöchiometrikus feleslegben voltak. A stabilizáló hatás ilyen esetekben független a DNS koncentrációtól /10-40 $\mu g/ml$ /⁴⁵.

Diaminok esetén kvantitatív összefüggést találtak a ΔT_m és a DNS bázis összetétele között, amely utóbbit a standard körülmények között mért T_m ponttal is ki lehet fejezni:

$$\Delta T_m = c T_m + d \quad /8/$$

ahol c a meredekség és d a tengelymetszet, amely a diamin lánchosszától $/n/$ függ⁴¹.

A DNS T_m pontja konstans poliamin koncentráció esetén függ az ionkoncentrációtól: növekvő NaCl koncentrációval egy minimum görbe szerint változik, míg a ΔT_m fokozatosan csökken⁵⁰. /2.ábra/



2. ábra

Magyarázata az, hogy versengés van a Na^+ és NH_3^+ ionok között a foszfát anionokért; a destabilizáció a DNS-poliamin komplex disszociációját jelenti, míg a stabilizáció a növekvő ionkoncentráció miatt van. Nagyobb ΔT_m eléréséhez ezért praktikus kis ionkoncentrációkat használni. Ehhez standard puffer az ún. SSC/33⁴⁵: 10^{-3} M NaCl, 10^{-3} M nátriumcitrát, pH=7,2. Ebben a pufferban a diaminok már $\leq 10^{-3}$ M koncentrációban a telítési ΔT_m értékeket adják. A bázis összetételétől való függés hasonló, mint SSC-ben és ugyanugy a cadaverin adja a legnagyobb ΔT_m -et, a dia-

minok közül⁴⁵.

Gabbay és munkatársai kimutatták, hogy a dikvaterner ammónium sók / $R_1R_2R_3^+N / CH_2/n N^+R_1R_2R_3 2Br^-$ / szubsztituenseinek hidrofobitását növelve csökken a poliribonukleotid hélixek stabilitása, míg a poláris szubsztituensek növelik a hélix T_m -jét. A maximális stabilizáló hatást $n=3$ -nál találták. Az L-aminosav származékok: amidok, diaminosavak, lizil-dipeptidek jobban növelik a DNS T_m pontját, mint a megfelelő D-enantiomerek. Méréseiket poliribonukleotidok és Calf Thymus DNS-en végezték^{47,51-58}.

A diaminok, éppugy, mint bizonyos kétértékű kationok /pl. Mg^{2+} /, viszonylag erősen kötnek a DNS-hez /un. "strong-interaction"/. Az egyértékű kationok és aminosavak gyengén kötődnek.

A diaminok és a DNS disszociábilis komplexet alkotnak, az előbbieket dialízissel eltávolíthatók⁴⁵. A diaminok nem változtatják meg a DNS UV spektrumát sem szobahőmérsékleten, sem a T_m felett⁴⁵, valamint O.R.D. mérések alapján a konformációt sem³⁵. A diaminok által létrehozott kötések ugyan mind felszakadnak a denaturálódási folyamatban, de a renaturáció sebességét megnövelik⁴⁵.

Egyszálas /"single-stranded"/ DNS T_m pontját a diaminok sokkal kevésbé emelik, mint az a /8/ egyenletből várható lenne⁴⁵. RNS-ek /rRNS, tRNS/ T_m -jét⁴⁵ szerint a diaminok nem, míg⁵⁹ szerint di- és poliaminok megnövelik. A Poli/A/, Poli/A/.poli/U/ és poli/I/.poli/C/ poliribonukleotid dupla hélixeket az $n=2$ és $n=3$ diaminok stabilizálják legjobban^{48,51}. A poli/U/-t az $n=2$, míg a poli/rT/-t az $n=5$ diaminok⁶⁰.

A fenti kísérleti tényekből következik, hogy a diaminok és a DNS közötti kölcsönhatás elsősorban elektrosztatikus, és így a hatása negatív foszfát anionok töltésének leárnyé-

kolásán alapszik. A lánchossz specifitás azonban arra utal, hogy a nukleinsavnak bizonyos szerkezeti és térbeli paraméterekkel is rendelkeznie kell ahhoz, hogy a stabilizáló hatás létrejöjjön.

Mahler és Mehrotra elképzelése szerint csak az egyik NH_3^+ köt ionosan foszfát anionhoz. Második kötőhelynek az A vagy/és T bázisokat tartották, mivel csak így tudták értelmezni az AT %-tól való függést⁴⁵. A lánchossz specifitás azonban így is értelmezhető volt. Az $n=5$ optimum nemcsak az áthidalt távolságból ered, mivel ugyanezt az $n=6$ is el tudja érni a szabad rotáció következtében, hanem az alifás lánc hidrofób kölcsönhatásai is közreműködnek. Feltételezték ezenkívül hidrogén-hidak kialakulását is^{45,48}.

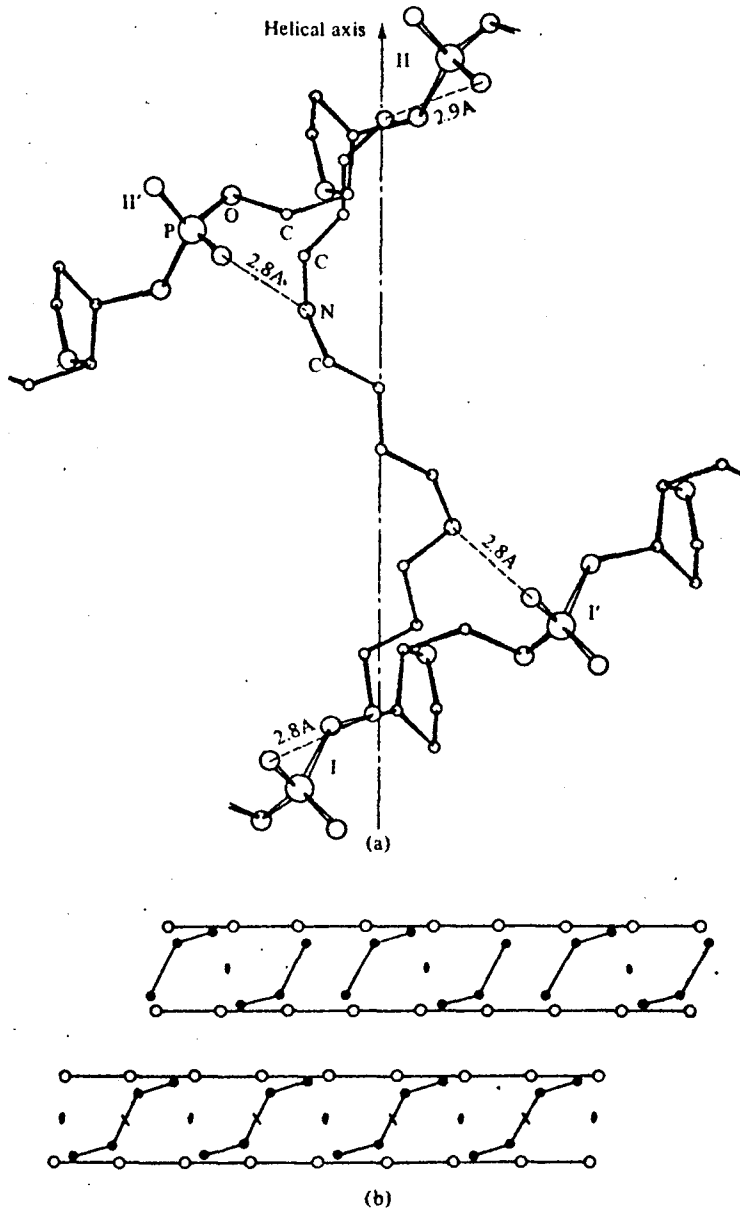
Tsuboi⁶¹ a spermin-DNS komplexet úgy képzelte el, hogy a primer és szekunder amino csoportok a DNS négy foszfátjával úgy lépnek kölcsönhatásba, hogy a szekunder amino csoportok a DNS narrow /v. shallow/ groove-jában egy hidat alkotnak a két szál között.

Liquori és munkatársai⁶² a spermin.HCl kristály röntgen-diffrakciós analíziséből, valamint a DNS komplexek elektrokémiai vizsgálataiból ugyanerre a következtetésre jutottak, ezt mutatja a 3. ábra.

Suwalsky⁶³ a spermin-DNS komplex röntgen-diffrakciós felvételeiből bebizonyította, hogy a poliaminok a DNS B formáját stabilizálják, valamint alátámasztotta Liquori eredményeit. /A sperminnel kicsapott DNS-ben a spermin N és a DNS P ekvivalens volt^{35,64,65}.

A Tsuboi-Liquori modell alapján az A-T %-tól való függés úgy értelmezhető, hogy vizes oldatban a kölcsönhatás a jobban szolvatálódó A-T gazdag régiókban koncentrálódik.

- a./ tetramin spermin molekula a DNS két szála között
- b./ triamin spermidin és tetramin spermin a DNS két szála között, sematikususan



3. ábra

Az ionos kölcsönhatások mellett természetesen a hidrogénhid és hidrofób kölcsönhatásokat is feltételezik, amely utóbbiak a nukleotidok és poliaminok apoláris részei között lépnek fel⁶². Ezek a modellek értelmezik a diaminok hatását is³⁴⁻³⁶.

Gabbay és munkatársai nem fogadják el ezt a magyarázatot, mivel szerintük a diaminok /optimális ΔT_m $n=3$ -nál/ esetén kicsi az N-N távolság az áthidaláshoz /azonosnak veszik a DNS-t és a poliribonukleotidokat/, és ugy értelmezik eredményeiket, hogy a kétszeres pozitív töltésű sók a hélix egyazon szálán egymás mellett elhelyezkedő foszfát anionokkal létrehozott gyűrűs ionos szerkezettel stabilizálják a hélixeket^{47,51-58}.

2.2. Dipeptidek hatása a DNS hőstabilitására

A hisztonok genetikai folyamatokban való szerepének megismerése céljából számos kutatócsoport foglalkozik a polinukleotid-polipeptid kölcsönhatások vizsgálatával, egészen egyszerű modellektől kezdve /bázikus aminosavak, dipeptidek, poli-L-lizin, acetilált poli-L-lizin, poli-L-arginin, stb./. A hisztonok és hisztonszerű vegyületek stabilizálják a natív DNS-t.

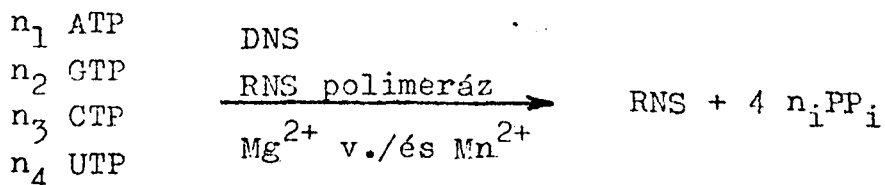
A peptidek nukleinsavakkal való kölcsönhatásának vizsgálata azonban nemcsak a hiszton modellezést szolgálja, hanem biológiai alkilezőszerek, mint kemoterapeutikumok legmegfelelőbb hordozóinak kiválasztását is⁶⁶⁻⁷⁰. Ez utóbbi célból lényeges a peptid konfigurációja, lánchossza, valamint aminosav aldallánca. Dipeptidek és DNS kölcsönhatásának vizsgálatával két kutatócsoport is foglalkozik: Gabbay^{47,57} és P.E.Brown⁷¹ és munkatársaik.

Gabbayék a lizil-dipeptidek konfigurációs effektusát emelték ki. Brown különböző bázikus dipeptid metilészterek DNS T_m -jére való hatását vizsgálta. /Az észterezés a dikationos szerkezet fenntartása miatt szükséges./ Az N-terminális aminosav arginin és lizin volt. Azt tapasztalta, hogy az a dipeptid adta a nagyobb ΔT_m -et, amelyben triptofán volt. A hatáshoz az ionos kölcsönhatáson kívül a planáris hetero gyűrű DNS bázis párjai közé való beékelődése, az un. "intercalation" is hozzájárult.

Az interkaláció Lerman⁷² szerint erős kölcsönhatás a DNS és a planáris gyűrűs vegyületek között. Számos vegyület biológiai hatásmechanizmusának első lépése az interkaláció. /Pl. karcinogének: 3,4-benzpirén, halucinogének: LSD, tranquillánsok, antitumor antibiotikumok: Daunomycin, a maláriaellenes gyógyszer: Chloroquin, stb.⁷³/ A triptofán és a tirozin aromás aminosavak interkalációját is megemlíti az irodalomban, mint a proteinek -kiváltképpen a savas proteinek- nukleinsavakhoz való kötésében szerepet játszó effektust⁷⁴⁻⁷⁷.

2.3. Enzim katalizálta RNS szintézis DNS templáton

A DNS nukleotid szekvenciáiban tárolt genetikus információ a DNS-függő RNS polimeráz katalizálásával íródik át az RNS-be, a négy ribonukleozid-trifoszfát szekvenciális beépítésével, pirofoszfát kihaladás közben:



2.3.1. DNS-függő RNS polimeráz

A DNS-függő RNS polimeráz /szisztematikus neve: nucleoside-triphosphate: RNA nucleosidyltransferase /DNA-dependent/; EC 2.7.7.6./ savas protein, pH optimuma pH=8 körül van.

Legjobban ismertek a bakteriális enzimek, kereskedelmi forgalomban is többségében ilyenek vannak. Legtöbbet vizsgált, és általunk is használt enzim az E. coli-ból izolált RNS polimeráz. Az E. coli RNS polimeráz és a bakteriális enzimek többségének összetettebb szerkezetét a szelektív átírás indokolja, nem pusztán a katalitikus funkció. Az E. coli un./holo-v. full-enzim/ teljes enzime négy féle alegységből áll; és összetétele: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, mólsúlya 480 000 D / \pm 10 %/. A σ nélküli enzim az un. core-enzim, mólsúlya 400 000 D / \pm 10 %/⁷⁸⁻⁸². A core-enzim is képes transzkripcióra egy szálu vagy dupla hélixű templáton, azonban effektív és specifikus /azaz nem statisztikus és aszimmetrikus/ átírásra csak a holo-enzim képes^{78,83}.

2.3.2. Az RNS szintézis mechanizmusa

Az RNS szintézis alatt az enzimnek több különböző feladatot kell ellátnia. Ki kell választania a templát szálat - mivel az in vivo transzkripció aszimmetrikus -, megfelelő helyeken a templáthoz kell kötődnie, fel kell ismernie az átírás irányát. Működnie kell egy mechanizmusnak, amely az enzimet mozgatja a templáton, végül megfelelő helyen be kell fejeznie a szintézist^{80,83}.

Az enzimátikus folyamat az alábbi lépésekre bontható⁸⁴:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. DNS + enzim \rightleftharpoons DNS-enzim | Asszociáció |
| 2. DNS-enzim + XTP ₁ \rightleftharpoons DNS-enzim-XTP ₁ | } Iniciáció |
| 3. DNS-enzim-XTP ₁ + XTP ₂ \rightleftharpoons DNS-enzim-XTP ₁ -XTP ₂ | |
| 4. DNS-enzim-XTP ₁ -XTP ₂ \rightleftharpoons DNS-enzim-XTP ₁ -XMP ₂ +PP | |
| 5. Enzim továbbvándorlása a templáton | } Polimerizáció |
| 6. DNS-enzim-XTP ₁ -XMP ₂ + XTP ₃ \rightleftharpoons
\rightleftharpoons DNS-enzim-XTP ₁ -XMP ₂ -XMP ₃ + PP | |
| 7. DNS-enzim-XTP ₁ -XMP _i \rightarrow DNS+enzim+XTP ₁ -XMP _i | Termináció |

Asszociáció

A transzkripció in vivo, és gondosan kontrollált körülmények között in vitro is szelektív folyamat⁸³, azaz csak az egyik DNS szál és annak is csak adott régiói iródnak át. A szelektivitást a templát másodlagos strukturája is befolyásolja⁸⁵. Az in vitro szintézisnél a DNS protein szennyeződése, ill. a DNS degradációja vagy egyéb károsítása nagy mértékben csökkenti a transzkripció szelektivitását. Pl. röntgen sugár, deuteron és α -részecskék a dózis függvényében az eredeti templát aktivitást 5-10 %-ára csökkentik^{80,86}. A DNS mólsulya is lényeges: $4 \cdot 10^6$ D alatt az RNS szintézise hirtelen lecsökken, és $1-2 \cdot 10^5$ D-nál nullává válik, viszont $4 \cdot 10^6$ D felett már csak kevéssel növekszik a mólsullal⁸⁷.

Az enzimátikus folyamat első lépése a reverzibilis asszociáció /a sókoncentráció növelésével megfordítható/.

A holo-enzim a natív, dupla hélixű DNS-en csak meghatározott helyekre kötődhet. Ezek az ún. "promoter site"-ok, amelyek 15-40 pirimidin, vagy pirimidin nukleotidokban gazdag részekből állnak⁸⁸, így az iniciáció jórészt purin nukleozid-trifoszfátokkal történik. A promoter helyeket a β' alegység ismeri fel, a σ faktor jelenlétében. A σ faktor a DNS szálak promoter helyekhez közeleső részeinek felnyitására is szükséges. A σ a core-enzim β láncához kötődik, megváltoztatja az enzim konformációját, ezzel a β' alegység kötési tulajdonságait is, képessé téve így a kód felismerésére^{85,89-91}. A kötődésen kívül a σ faktor a láncindításhoz is szükséges. Iniciálás után az enzim elengedi a σ -t^{85,91}.

Az enzim kötődésére és a DNS templátként való felhasználására több elképzelés van. Legvalószínűbbnek az látszik, hogy az enzim kötődése a hélix egy kismértékű, de határozott letekeredését /"unwinding"/ okozza, amely letekeredés függ a hőmérséklettől is. A polimerizáció előrehaladásával ez a részleges letekeredés és az RNS-DNS hibrid szétválása utáni visszatekeredés /"rewinding"/ az enzim haladásával szinkron folyamat^{80,92-94}.

Az asszociáció gyors reakció, a sebességmeghatározó lépés valószínűleg a hélix felnyílása. Érzékeny a pH-ra, pufferra, az optimális sókoncentráció 0,2 M /KCl/ körül van.

Iniciáció

Az első szubsztrát kötődési reakció szintén gyors lépés. Az első foszfodiészter kötés létrejötte után a komplex már nem disszociálható a sókoncentráció növelésével,

és nem érzékeny az iniciálást inhibáló egyéb vegyületekre sem. Ez az állapot egészen a terminációig fennáll. A lánc iniciálás az egész templát molekulát tekintve nem teljesen szinkron folyamat^{80,82,95-97}.

Polimerizáció

Az RNS lánc növekedés iránya: 5' → 3'. A láncnövekedés sebessége in vitro 0,2 M KCl-ban 37 C°-on 16-100 nukleotid/sec. A sebesség függ a templáttól, az ionkoncentrációtól, a hőmérséklettől, a pH-tól, a szubsztrát koncentrációtól, az enzim és templát mennyiségétől^{95,98,99}. A sókoncentráció polimerizációs kinetikára való hatása valószínűleg a termék inhibíció megszüntetésén alapul. Ugyanakkor a 0,2 M sókoncentráció a termináció utáni re-iniciációt is lehetővé teszi, így megnöveli az összes szintetizált RNS mennyiségét. Megfelelő szubsztrát koncentráció esetén a szintézis több órán keresztül mehet in vitro, miközben a sebesség alig csökken.

Termináció

A lánc befejezésért az E. coliban a nemrég felfedezett ρ faktor a felelős. Ez specifikus terminációt okoz. A terminációt a templáton, hasonlóképpen, mint az iniciációt, 15-40 megfelelő szekvenciájú pirimidin nukleotidokból álló kód jelzi, amelyet ρ az RNS polimerázhoz való - reverzibilis - kötődésével felismer^{88,98,100}. A termináció után a terner komplexből először az RNS, majd az enzim válik ki, amely így új láncot indíthat a σ -val való kombináció révén¹⁰¹.

2.3.3. Az RNS szintézis inhibitorai^{80,102-107}

1. Az iniciáció inhibitorai

- a./ 0,35 M feletti sókoncentráció, valamint karbamid, Na-dodecilszulfát, stb.
- b./ enzimhez kötődő ágensek: rifamycin / β alegységhez/, polietilén-szulfonát, heparin, szulfhidril csoporttal reagáló vegyületek.
- c./ kelátképző ágensek /az E. coli enzim Mg^{2+} -on kívül vas és réz ionokat is tartalmaz, valamint stöchiometrikus mennyiségű cink iont is¹⁰⁸.
- d./ templáthoz kötődő ágensek: proflavin /a szekunder strukturát módosítja, de az enzimhez is köthet/.

2. A polimerizáció inhibitorai /templét inaktivátorok/: fizikai, kémiai kötődéssel megakadályozzák az enzim haladását, pl. Actinomycin, Chromomycin, stb., alkilezőszerek, hisztonok, polibázisok.

2.4. Alifás di- és poliaminok hatása az enzim katalizálta RNS szintézisre

A 2.1.3. fejezetben röviden megemlítettem, hogy a poliaminok metabolizmusa szorosan összefügg a nukleinsavakéval. A di- és poliaminok minden sejtben, és viszonylag nagy mennyiségben fordulnak elő. Pl. az Azatobacter vinelandii-ban a putrescin és a spermidin az összes sejtbeli nitrogén 4 %-át, és a nem-protein nitrogén 22 %-át teszi ki¹⁰⁹.

Funkcióik közé tartozik, hogy el tudják látni a K és Mg ionok feladatait ezek hiányában, kontrollálják a sejtosztódást, és az RNS és protein szintézis majd minden lépésében szerepet játszanak³⁴. Hatással vannak a ribonukleázok aktivitására, ezáltal az RNS szint regulátorai is^{35,110,111}, elősegítik a riboszóma alegységek asszociációját, és a mRNS

és tRNS-ek riboszomákhoz való csatlakozását³⁵. Stimulálják a tRNS metilálást^{112,113}, jelenlétükben az aminoacil-tRNS szintézisből kimarad a PP_i -ATP csere lépése¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Általában véve a poliaminok növekedés stimulátorok minden rendű szervezetben³⁶, eszenciálisak a növekedéshez³⁴. Ott vannak legnagyobb koncentrációban jelen, ahol aktiv protein és RNS szintézis folyik. A normális és patológias növekedéssel összefüggő jelenségekben, ideértve a tumoros növekedést is, a poliaminok mennyiségének növekedése egyike a legkorábbi reakcióknak^{34-36,117-119}. Ennek alapján diagnosztizálásra is felhasználható: D.H. Russel¹²⁰ klinikai vizsgálatai alapján a leukémiában, ill. különböző szilárd tumorokban szenvedő páciensek vizeletében ugrásszerűen megnövekszik a poliamin koncentráció.

Mind a pro- mind az eukariotikus szervezetekben a poliamin metabolizmussal legszorosabban összefüggő jelenség az RNS szintézis. Különösen a spermidin koncentrációjával korrelálható jól az RNS szintézis sebessége, de nem tudják, hogy az összefüggés direkt vagy indirekt^{34,35,121,122}.

Több kutatócsoport tanulmányozta a fenti in vivo eredmények után a poliaminok in vitro hatását. Megállapították, hogy megfelelő feltételek mellett a di- és poliaminok stimulálják az enzim katalizálta RNS szintézist^{34,35,109,123-126}. Megnövelik az iniciálás és láncnövekedés sebességét, továbbá megnövelik az összes szintetizált RNS mennyiségét dupla hélixű, nativ DNS templáton. Képesek disszociálni az enzim-RNS komplexet. Denaturált DNS-en folyó RNS szintézist nem stimulálják, a szintetikus polinukleotidokon pedig inhibiálják a szintézist. A poli-ribofluoruridilsav által DNS-en okozott RNS szintézis inhibíciót megszüntetik¹⁰⁹.

A di- és poliaminok csak meghatározott koncentráció-intervallumban stimulátorok, nagyobb koncentrációkban inhibitorok. Pl. Krakow¹⁰⁹ kísérleteiben nativ Calf Thymus DNS templáton /60 μ g/, Azatobacter vinelandii RNS

polimerázzal /5 μg / 60 perces reakcióban a poliaminok az alábbiak szerint hatottak:

amin	max. stimuláció /%/	max. stim.-hoz tarozó amin konc. /mM/	inhibíció kezdete /mM/
spermin	100	2	5
spermidin	130	20	50
putrescin	80	40	100
cadaverin	60	40	nincs adat
L-lizin	10	40	nincs adat

A spermidin /12 mM/ és putrescin /40 mM/ elegye effektivebb, mint ezek külön-külön, de a hatás nem additív.

A stimuláció nagy DNS/RNS polimeráz arányoknál a legnagyobb: pl. 2 μg -ról 60 μg -ra növelve a templát mennyiségét /RNS polimeráz 6,9 μg /, az RNS szintézis ötszörösére növekszik, poliaminok jelenlétében nyolcszorosára /2 μg templát esetén alig van különbség/¹⁰⁹.

Gumport *Micrococcus lysodeicticus* enzimmal dupla hélixű DNS templáton azt tapasztalta, hogy a spermidin 1-6 mM koncentrációban /in vivo is ilyen koncentrációban van jelen/ lecsökkenti a transzkripció szimmetriáját, azaz a strand szelekcióban is szerepet játszhat, habár *E. coli*-ből izolált enzim spermidin nélkül is aszimmetrikus transzkripciót katalizál in vitro¹²⁷, amely bizonyosan a σ faktor jelenlétével van összefüggésben.

A spermidin natív DNS-en növeli az iniciálási helyek számát is^{126,128}.

Mivel az enzim pH-optimumát a poliaminok nem változtatják meg, feltételezik, hogy ezek maguk az enzimmal nem lépnek közvetlenül kölcsönhatásba³⁵.

A szintézisrendszerekben jelenlévő harmadik makromolekula a szintetizált RNS. A poliaminok, és az RNS közötti

kölcsönhatás kevésbé tanulmányozott. Mitra és Kaestery^{129,130} kimutatták, hogy a spermin képes vírus RNS-t egy olyan kompaktabb strukturába összegömbölyíteni, hogy kevésbé érzékeny a ribonukleázra. Az élesztő RNS-t a spermin stabilizálja a hődenaturáció ellen, valószínűleg aggregát képződésen keresztül¹³¹.

A fenti kísérleti eredmények alapján Abraham¹²⁵ három lehetséges hatásmechanizmust tételez fel:

- 1./ Az aminok a DNS dupla hélix stabilizációjával elősegítik az RNS szintézis közben történő parciális szál szeparáció utáni rewind-et. Ehhez a sémához az előfeltétel az, hogy a sebességhatározó lépés a re-winding legyen, azonban a kísérleti eredmények ezt nem támasztják alá. A nagyobb koncentrációju aminok inhibitor effektusa azonban részben magyarázható a hélix stabilizációjával.
- 2./ Mivel a poliaminok megváltoztatják az RNS strukturáját, valamint képesek disszociálni az enzim-RNS komplexet, elősegítik a szintetizált RNS eltávolítását a turner komplexből, és megakadályozhatják az RNS nem specifikus kapcsolódását a DNS-hez, ill. a DNS-enzim komplexhez. A sebesség növelés eszerint a termék inhibíció megszüntetésén alapul.
- 3./ A natív DNS-ek is rendszerint tartalmaznak hibás /pl. parciálisan denaturált/ régiókat, és ezek egyben promoter helyek is lehetnek. Az enzim ilyen helyeken is képes kötni, azonban láncot indítani nem. Viszont a poliaminok helyreállítják a dupla hélixet, ezáltal stimulálhatják az RNS szintézist.

A polinukleotidokon történő RNS szintézis poliamin inhibíciója kizárja azt a régebbi feltételezést, amely szerint az aminok hatása pusztán a polimerázban lévő nukleáz aktivitás inhibícióján alapszik.

2.5. Az in vitro alkilálás hatása a DNS fizikai kémiai sajátosságaira

A DNS alkilezés termékei intenzív kutatás tárgyát képezik Elmor¹³² S-mustárral végzett kísérletei, 1948. óta. Sok alkilezőszert találtak, ami a foszfát csoportokat észterezi¹³³, majd a purinok N⁷ helyzetben való alkilezését mutatták ki^{134,135}. A purinok alkilezését az un. transzalkilezési mechanizmus szerint képzelték először¹³⁶, ezt később részben cáfolták^{137,138}, de részben ma is elismerik¹³⁹.

In vitro alkiláláskor a támadási pontok a DNS bázisai és a nem észter kötésben lévő foszfát oxigénje. A bázisok közül az N⁷-G a legnagyobb százalékban alkilezett atom. Az alkilezőszer számára ez sztérikusan hozzáférhető a dupla hélix "wide-groove"-jában, azonkívül nukleofilítása miatt a legreaktívabb. Az alkilezőszertől függően a G O⁶ alkilálása is megtörténik, azonban savas hidrolizire G-ra bomlik, ezért azonosítása nehéz¹⁴⁰. Az A N³ atomja sztérikusan szintén könnyen hozzáférhető¹⁴¹, azonban az N³-alkil-A a DNS-ben maximálisan 1/4-1/3-a az N⁷-alkil-G-nek. Az arány függ a DNS GC %-ától is^{142,143}. Nagyon kis %-u alkilezés az A N¹ és N⁷ atomján is megtörténik. A pirimidinek közül a C N³ atomja alkileződik, szintén elhanyagolható mennyiségben^{140,144}.

A foszfát-triészterek szintén labilisak alacsony pH-nál, ezért az alkilezés szintjét nehéz meghatározni¹³⁹. A foszfát észteresedése dimetil-szulfát esetén kb. 5 %-a az összes metilált terméknek¹⁴², mások szerint¹⁴⁵ monofunkciós alkilálás esetén általában 5-18 %. A foszfát-triészterek bomlása degradációhoz vezethet¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

Az alkilezés mechanizmusa: az aromás mustárok S_N1 szerint, alifás mustárok, az alkil-alkánszulfonátok S_N2 szerint¹⁴⁰ reagálnak. Újabb tapasztalatok szerint^{144,146}

azok az alkilezőszerek, amelyek a bázikus N-t támadják, S_N2 szerint reagálnak, pl. alifás mustárok, epoxidok; amelyek ezenkívül a bázis C atomját is támadják, S_N1 szerint reagálnak, pl. alkilnitrózamidok. Az előbbi felosztástól¹⁴⁰ eltérően az izopropil-, izobutil-, neopentilmetánszulfonátok S_N1 szerint reagálnak¹⁴⁸.

Az alkilálás "azonnali" következménye a DNS flexibilitásának növekedése^{142,149}, a szerkezet eltorzulása¹⁵⁰, amely kvantitativ is követhető a girálási rádiusz, valamint a határviszkozitás csökkenésével. Mindkét effektus az un. "coiling" átalakulásra utal /a molsúly nem változik, és denaturáció sem következik be^{142,149}. Ez azt jelenti, hogy a DNS rigiditása csökken, és így képes kisebb térfogatra összegömbölyödni. ¹⁴⁹ szerint a coiling a foszfát alkilezés következménye, amely csökkentve a negatív össztöltést, csökkenti a taszítást. A foszfát észterezéssel magyarázzák a bázikus proteinek felé mutatott affinitás csökkenését is¹⁴⁷. Későbbi értékelés szerint¹⁴² a DNS dimenzió- és alakváltozása oldatban a bázisokba bevitt pozitív töltés eredménye, ami a negatív foszfátokkal való kölcsönhatás révén fejti ki hatását.

A bevitt alkil csoport sztérikus effektusa sem elhanyagolható¹⁴⁰, és a DNS hidrációs burka is megváltozik¹⁴².

Az alkilált DNS neutrális pH-n és alacsony hőmérsékleten viszonylag stabil¹⁴⁹. 37 C°-on történő inkubálás hatására azonban neutrális pH-n is instabilis az alkilált DNS. Oka a depurinálódás, azaz a purinok imidazolgyűrűjében lévő pozitív töltés miatti N-glukozid kötés felnyílása. Ez a folyamat függ a pH-tól, hőmérséklettől és az inkubációs időtől^{145,151}. A depurinálódás után a dezoxiribóz rész instabil marad, amely szabad aldehid csoport jelenlétének a következménye¹⁴⁷. /Erre utal a pozitív Schiff-reakció¹⁵², valamint NaBH_4 -del történő redukcióval és NH_2OH -nal történő oximképzéssel a depu-

rinált DNS stabilizálódik¹⁵⁰./ A depurinált DNS β -elimináción keresztül bekövetkező foszfor-diészter hasadás, azaz degradáció révén stabilizálódik¹⁴⁷. A degradáció pH, hőmérséklet és idő függő, valamint függ a puffertől is¹⁵². Az alkilált DNS degradációja nemcsak a β -elimináció következménye, hanem a foszfát alkilezést követő triészter hasadásé is^{146,147,153}.

A degradáció akkor vezet molsúly csökkenéshez, ha mindkét szál eltörik. Monoalkilálás esetén statisztikusan 70 "single-strand" törésre esik egy "double-strand" törés, egy 10^7 D molsúlyu DNS-ben¹⁴⁹. 37 C°-on, neutrális pH-n inkubálva az alkilezett DNS-t, a molsúly hamarosan csökkenni kezd, mivel a depurinálódás és degradáció is megtörténik ilyen körülmények között. A molsúly csökkenés természetesen nagyobb mérvű bifunkciós alkilezőszerekkel történt alkilálás után, mivel egy keresztkötés teljes kihasadása rögtön a dupla hélix töréséhez vezet.

Az alkilezés hatásai közé tartozik a T_m -ben bekövetkező csökkenés is. Dimetil-szulfáttal metilált DNS T_m -je lineárisan csökken a metilálás fokának növekedésével^{142,154}. A csökkenés nem a denaturálódás, hanem a depurináció és a degradáció miatt van¹⁵⁵. A metilált DNS T_m pontja sokkal kevésbé függ a kation koncentrációtól, mint a nativé. Spermidin és spermin csökkentik a metilált DNS T_m pontját. A poli-L-lizin - metilált DNS T_m -je alig magasabb, mint a metilált DNS-é. Kielégítő magyarázatot ezekre a jelenségekre nem adtak¹⁴².

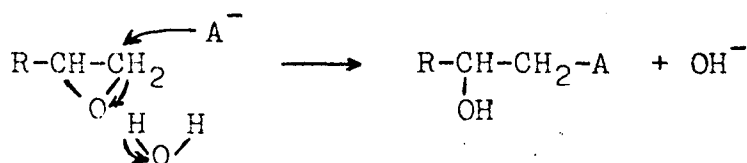
Bifunkciós alkilezőszerekkel történő alkilezés esetén diguanil származékok is létrejönnek. Mennyiségük kb. 25 %-a a monoalkilezett származékoknak^{140,156}. A diguanil képződés két lépéses reakció: a monoalkilezés gyors, a második rendszerint lassu lépés. A diguanil származékok három csoportba oszthatók: intra strand, inter strand és intermolekuláris keresztkötés. Ez utóbbi a kísérletek-

ben alkalmazott DNS koncentrációk mellett elhanyagolható. A diguanil származékok legalább 30 %-a, az alkilezőszertől függően, inter strand keresztkötés. A keresztkötési reakció hőmérséklet és idő függő. A keresztkötéses alkilezés mérésére többféle módszer használatos: UC analízis, renaturálódás vizsgálata, T_m pont mérés, DNase-zal történő emésztés.

2.6. Epoxi vegyületekkel alkilezett DNS

Az intézetben korábban és jelenleg is részletes vizsgálatok folynak különböző bifunkciós alkilezőszerek és a DNS közötti reakció vizsgálatára, sztereokémiai és gyógyszerkémiailag jelentőségük miatt. Ezek során jelentős különbség adódott a sztereoizomer diepoxi-butánok keresztkötőképessége között, valamint különböző térszerkezetű diepoxi-hexitek és ezek szubsztituált származékainak hatása között¹⁵⁷.

Az epoxi vegyületek nukleofil centrumokkal A^- , S_N2 mechanizmus szerint reagálnak:



Ilyen nukleofil centrum a DNS-ben pl. a guanin N^7 atomja, valamint a foszfát nem észter kötésben lévő O-je. A nukleofil centrumok támadási pontja az epoxi gyűrű metilén csoportja. Majdnem minden karcinostatikus epoxi vegyület tartalmaz minden epoxi gyűrűn egy szubsztituálatlan metilén csoportot. A szubsztitúció jelentősen lecsökkenti mind a kémiai, mind a biokémiai reaktivitást¹⁵⁸.

A diepoxi-butánok és a szubsztituálatlan hexitek, valamint a monofunkciós analógok k konstansai /Swain-Scott egyenlet/ közel azonosak, 1,0 körül vannak. 37 °C-on, pH=7, tiszta vízben a diepoxi-bután fél átalakulási

ideje 100 óra¹⁵⁷.

A keresztkötetést létrehozó kétszeres alkilezési folyamatban lényeges a konfiguráció. Így a diepoxidok DNS-sel történő reakcióinak vizsgálata kiemeli a sztérikus faktorok jelentőségét.

A reakcióidő függvényében vizsgálva a renaturálhatóságot, amely a keresztkötés mértékére utal /lásd 3.3.5. fejezet/, az L- és D-diepoxi-bután azonos koncentrációkban, időben elkülönülve fejtik ki hatásukat: a D csak jóval később éri el a telítési szakaszt. A mezo pedig jóval kisebb $\%$ -ban létesít keresztkötetéseket¹⁵⁷. Az L-diepoxi-bután a mustárok után az egyik legerősebb keresztköttető szer, antitumor hatása¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. A depurináció az L-nél gyorsabb, mint a D-nél, de mindkettőnél igen nagy mértékű, ami érthető, mivel a 4 C-atomos lánc rövid a 8 Å át-hidalásához. Hogy egyáltalán lehetséges, az a DNS flexibilitásával magyarázható. A feszültség a depurinálódással megszűnik^{159,161}.

A hexit-diepoxidok közül az 1,2-5,6-dianhidro-dulcit és az 1,2-5,6-dianhidro-mannit hatása közötti különbség a konfigurációnak tulajdonítható. Az utóbbi vegyület 3,4 helyzetben izopropilidén csoportot tartalmazó származéka viszont már alig hoz létre keresztkötetést. Oka a sztérikus gátlás. A dianhidro-dulcit 3,4-diacetil származékának gyengébb hatása szintén térgátlással magyarázható¹⁵⁷.

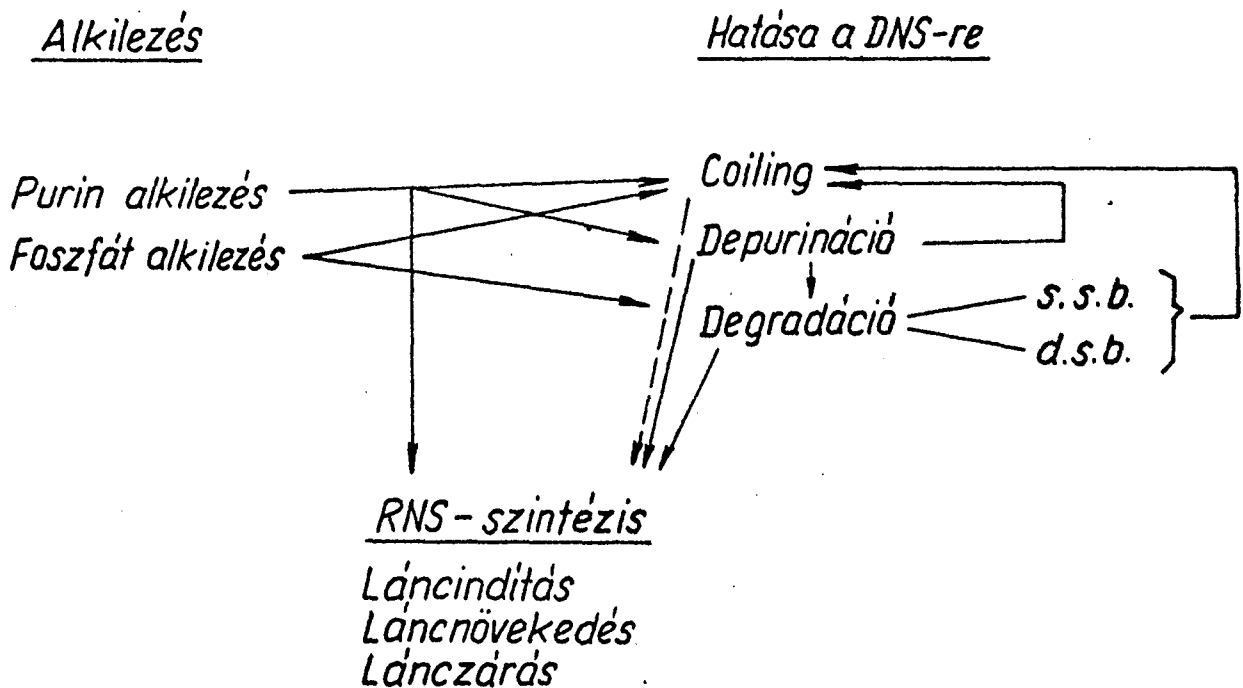
2.7. RNS szintézis alkilezett DNS templáton

A biológiai alkilezőszerek in vivo effektusa három csoportba osztható: citosztatikus ill. tumorgátló, mutagén és karcinogén hatás. Ez utóbbi valamely sejtbeli makromolekulával való reakció eredménye. A mutagén effektus vagy az alkilezés okozta anomális bázis párosodás, vagy a

depurináció miatt bekövetkező ún. "mutation by deletion" következménye. A citosztatikus hatás pedig elsősorban a DNS replikáció gátlásán alapul.

A DNS replikáció gátlására a bifunkciós alkilezőszerek sokkal hatásosabbak, mint a monofunkciósok. Azonban a replikáció teljes gátlása esetén is az RNS szintézis kisebb sebességgel, de tovább folyhat ugyanazon a templáton, mivel ehhez csak részleges templát lecsavarodás szükséges. A sebesség csökkenés okára egyértelmű magyarázat nincs, mivel a folyamat összetett.

A 4. ábra a 2.5. fejezetben említett hatások sematikus összefoglalása, kibővítvén az RNS szintézisre való hatás ábrázolásával.



4. ábra

Az alkilezés hatására bekövetkező RNS szintézis sebesség csökkenés számbajöhető okai: coiling effektus, alkil csoportok hatása /számuk, eloszlásuk, térkitöltésük,

liofilitás változása/, depurináció és degradáció. Kis mértékű alkilezésnél /akár mono- akár bifunkciós vegyülettel/, amikor még nincs kimutatható depurináció és degradáció, a templát aktivitás jelentősen csökkenhet. Ez a bevitt alkil csoportok hatását mutatja /az alkilezés hatását a coiling effektustól nem lehet elválasztani/^{142,162,163}.

N-mustárral végzett kísérletek alapján a DNS templát aktivitása /RNS szintézisben/ lineárisan csökken a bevitt alkil csoportok számának logaritmusával¹⁶⁴. Kimutatták továbbá, hogy a templát aktivitás logaritmusá lineárisan csökken az alkilezőszer koncentrációjával¹⁶⁵.

Azonos mértékű alkilezés esetén a S-mustár és mono-funkciós analógja közel egyformán hatásos az RNS szintézis gátlásában¹⁶⁶.

A bevitt alkil csoportok direkt hatása főleg a láncnövekedést gátolja, azaz korai terminációt okoz. A korai termináció a depurinálódás és a degradáció miatt is bekövetkezik^{142,163,167}.

A bifunkciósokkal történő alkilezéskor a kialakult keresztkötések közvetlen hatása ugyanaz, mint a monoalkilálásnak. Nagyobb százaléku keresztkötés azonban a lánc indításhoz szükséges lecsavarodást is gátolhatja, így direkt hatása is nagyobb, mint a monoalkilálásnak. Indirekt hatásában pedig a molsúlyt csökkentő effektusa miatt erősebb inhibitor¹⁶⁴, és a templát aktivitást nullára is csökkentheti¹⁶².

Növekvő alkilálással nemcsak a szintetizált RNS összes mennyisége csökken, hanem a molekulasúlya is. A molekulasúly eloszlás is jelentősen megváltozik: növekvő mértékű alkilálással az RNS fő tömege mind kisebb szedimentációs állandóju lesz¹⁶².

2.8. Célkitűzés

- 1./ A biokémia egyik igen érdekes kérdése, hogy miért egyetemesek a természetben az L-aminosavakból felépülő proteinek, és a D-ribózból és D-dezoxiribózból felépülő nukleinsavak. A kérdést sokan vizsgálták, egészen egyszerű modellekből kiindulva. Gabbay és munkatársai T_m pont mérések alapján modelleket állítottak fel a DNS diaminok által történő stabilizációjának bizonyítására. Elméletük azonban vitatható. Sztereo-kémiai hatások vizsgálata céljából különböző diamino származékokat szintetizáltunk, és hődenaturációs módszerrel megvizsgáltuk a DNS-sel való kölcsönhatásukat.
- 2./ Az alkilezőszerek peptidhordozóinak vizsgálata gyógyszerkémiai jelentőségű, ezenkívül érdekes sztereokémiai szempontból is. Az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén Dr. Szekerke Mária irányításával különböző dipeptideket szintetizáltak, amelyek DNS-sel való komplex képzését intézetünkben vizsgáltuk meg hődenaturációs módszerrel.
- 3./ Nincs egyértelmű magyarázat a diaminok hatására létrejövő RNS szintézis stimulációnak. Megvizsgáltuk néhány, a DNS T_m pontjára különbözőképpen ható diamin templát aktivitásra való effektusát.
- 4./ Az intézetben korábban a DNS kereszt-kötéses alkilezése szempontjából megvizsgált különböző szerkezetű, epoxid típusu alkilezőszerekkel kezelt DNS-en végbe-menő enzim katalizálta RNS szintézist tanulmányoztuk sztereokémiai és mechanizmus vizsgálati célból.

3. Kisérleti anyagok és módszerek

3.1. Modell vegyületek előállítása

3.1.1. Diamino vegyületek

A diamino vegyületek / $H_2N/CH_2/n/NH_2$, $n=2-6$ / dihidrokloridjainak előállítása a megfelelő diamino vegyületekből /Fluka/ történt.

Az L-, D- és DL-lizin monohidrokloridjai Reanal vegyszerek voltak, amelyek átkristályosítás után kerültek felhasználásra.

A diamino-mannit-dihidroklorid, valamint a D-mannit, dulcitol és D-szorbit a Chincin termékei.

A sztereoizomer lizin-metil-, -etil-, -izopropilészterek tionilkloridos módszerrel¹⁶⁸ készültek az észternek megfelelő Reanal készítményű oldószerekben a sztereoizomer lizinekből.

A két kvaterner ammónium vegyület $-R_3N^+/CH_2/5N^+R_3 \cdot 2 Br^-$ - 1,5-dibróm-pentánból /Fluka/ és a megfelelő terciár aminből készült etanolban⁵¹. $R=CH_3$ - esetén a reakció bombacsőben 20 órán át szobahőmérsékleten, $R=CH_3CH_2$ - esetén 20 órás reflux alatt ment végbe.

A 3-metil-pentametilén-diamin.2HCl /a pentametiléndiamin a továbbiakban PMD/ szintézisének lépései: malonészter, 2-metil-malonészter, $LiAlH_4$ -es redukcióval 2-metil-1,3-propándiol, bombacsőben 48 %-os HBr-dal 2-metil-1,3-dibróm-propán, 2-metil-1,3-propán-dinitril, katalitikus redukció, majd sóképzéssel a végtermék.

DL-1-hidroximetil-PMD.2HCl: L-lizinből kiindulva tionilkloridos módszerrel DL-lizin-metilészter.2HCl, trifenil-metilkloriddal¹⁶⁹ N,N'-ditritil-DL-lizin-metilészter, $LiAlH_4$ -es redukcióval¹⁷⁰ a hidroxil vegyület, végül a tritil csoport lehasítása HCl-ban való forralással.

DL-1-metil-PMD.2HCl: acetecetészterből és akrilnit-

rilből Michael-addícióval 2-propionitril-acetecetészter, ketonná hasítással 5-oxo-kapronitril, hidroxilamin-hidrokloriddal 5-oximino-kapronitril¹⁷¹, Na/n-butilalkoholos redukcióval¹⁷² a diamin, végül sóképzéssel a vegyület.

A DL-1-izopropil-PMD.2HCl: acetecetészterből és izovajsavkloridból 2-izobutiril-acetecetészter¹⁷³, savvá hasítással izobutiril-ecetsav-etilészter. A további lépések -Michael-addíció, ketonná hasítás, stb.- az előző vegyületnél leirtakkal azonosak.

Az anyagok azonosítása és tisztasági fokának meghatározása olvadáspont méréssel, elementáris analizissel /C, H, N, Cl/, forgatási értékek meghatározásával, infravörös és egy esetben /DL-1-hidroximetil-PMD/ NMR spektroszkópiával történt /2. táblázat/.

3.1.2. Dipeptidok

A modell dipeptidok szintézise az ELTE Szerves Kémiai Tanszékén történt. A szintézisek menete és a fizikai állandók a ¹⁷⁴ dolgozatban találhatóak meg.

3.1.3. Epoxidok

Az 1,2-5,6-diepoxi-dulcit /DAD/ és az 1,2-5,6-diepoxi-3,4-izopropilidén-D-mannit /DAMAM/ a Chinoin termékei, az 1,2-5,6-diepoxi-3,4-diacetil-dulcit /diAcDAD/ előállítása osztályunkon történt DAD-ból.

DL-2,3-epoxi-propanol/l/, /v. glicid v. epihidrin-alkohol/: epiklórhidrinből az epoxi gyűrű hig kénsavas felnyitásával glicerin- α -klórhidrin, ebből KOH/absz. etanolos gyűrűzárással a vegyület¹⁷³.

L/+/-1,2-3,4-diepoxi-bután: D-borkósavból azeotrop észteresítéssel D-borkósav-dietilészter, ebből 2,2-dimetoxi-propánnal 2,3-O-izopropilidén-D-borkósav-dietilészter, LiAlH₄-es redukcióval 2,3-O-izopropilidén-D-treitol. Absz. piridinben metánszulfonsavkloriddal 2,3-

2. táblázat

Vegyület	$[\alpha]_D^{25}$ /c3,H ₂ O/	Op. /C°/		Összegképlet Molsúly	Analízis	
		mért	irod.		számolt	talált
Etiléndiamin. 2HCl	-		szubl.	C ₂ H ₁₀ N ₂ Cl ₂ 133,03	C 18,05 H 7,52 Cl 53,3	C 18,0 H 8,0 Cl 53,52
Propiléndiamin. 2HCl	-	243	243	C ₃ H ₁₂ N ₂ Cl ₂ 147,06	C 24,5 H 8,16 N 19,1 Cl 48,3	C 24,7 H 8,36 N 18,9 Cl 48,3
Putrescin.2HCl	-	-	315	C ₄ H ₁₄ N ₂ Cl ₂ 161,08	C 29,8 H 8,7 N 17,4 Cl 44,15	C 29,85 H 9,0 N 17,5 Cl 43,94
PMD /cadaverin/ .2HCl	-	261-2		C ₅ H ₁₆ N ₂ Cl ₂ 175,11	C 34,3 H 9,16 N 16,0 Cl 40,6	C 34,4 H 9,01 N 15,85 Cl 40,62
Hexametilén- diamin.2HCl	-	250	248-50	C ₆ H ₁₈ N ₂ Cl ₂ 189,13	C 38,1 H 9,55 Cl 37,55	C 37,9 H 10,0 Cl 37,59
L-lizin-metil- észter.2HCl	+16,0	211-2	212	C ₇ H ₁₈ N ₂ O ₂ Cl ₂ 233,14	C 36,0 H 7,7 N 12,0 Cl 30,5	C 36,2 H 7,86 N 12,17 Cl 30,3

Név	$[\alpha]_D^{25}$ /c3,H ₂ O/	Op./ θ /		Összegképlet Molsúly	Analízis	
		mért	prod.		számolt	talált
D -lizin-metil- észter.2HCl	-15,67	210-11		C ₇ H ₁₈ N ₂ O ₂ Cl ₂ 233,14	C 36,0 H 7,7 N 12,0 Cl 30,5	C 36,23 H 8,19 N 12,01 Cl 30,45
DL-lizin-metil- észter.2HCl	-	216-7	218	"	"	C 36,11 H 8,0 N 12,1 Cl 30,51
L-lizin-etil- észter.2HCl	+11,67	143-4	143,5- 144,5	C ₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ Cl ₂ 247,17	C 38,8 H 8,1 Cl 28,7	C 38,6 H 8,5 Cl 28,6
D-lizin-etil- észter.2HCl	-10,67	143-4		"	"	C 38,5 H 8,5 Cl 28,6
DL-lizin-etil- észter.2HCl	-	165-6		"	"	C 38,6 H 8,5 Cl 28,5
L-lizin-izopro- pilészter.2HCl	+8,33	163-5		C ₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ Cl ₂ 261,2	C 41,4 H 8,4 Cl 27,2	C 41,6 H 8,41 Cl 26,87
DL-lizin-izopro- pilészter.2HCl	-	130-2		"	"	C 41,2 H 8,9 Cl 27,4

Vegyület	Op. /C°/		Összegképlet Molsúly	Analízis	
	mért	irod.		számolt	talált
DL-1-hidroximetil- PMD.2HCl	125		$C_6H_{18}N_2OCl_2$ 205,13	C 35,0 H 8,78 N 13,6 Cl 34,6	C 34,73 H 9,27 N 13,4 Cl 34,94
DL-1-metil-PMD. 2HCl	178-9		$C_6H_{18}N_2Cl_2$ 189,13	C 38,1 H 9,55 N 14,8 Cl 37,55	C 37,98 H 9,98 N 14,69 Cl 37,6
DL-1-izopropil-PMD .2HCl	199-200		$C_8H_{22}N_2Cl_2$ 217,19	C 44,2 H 10,25 N 12,9 Cl 32,75	C 43,93 H 10,28 N 13,15 Cl 32,85
3-metil-PMD.2HCl	253-4		$C_6H_{18}N_2Cl_2$ 189,13	C 38,1 H 9,55 Cl 37,55	C 37,86 H 10,03 Cl 37,12
N,N,N,N;N,N'-hexa- etil-PMD.2Br ⁻	270	270	$C_{17}H_{40}N_2Br_2$ 432,34	C 47,20 H 9,26 N 6,47 Br 37,05	C 47,20 H 9,07 N 6,8 Br 36,77
N,N,N,N;N,N'-hexa- metil-PMD.2Br ⁻	-	303	$C_{11}H_{28}N_2Br_2$ 348,18	C 57,92 H 8,05 N 8,05 Br 46,0	C 38,04 H 8,29 N 8,13 Br 46,0

Vegyület	$[\alpha]_D^{25}$ /c2,CHCl ₃ /	Fp. /C°/ egyéb állandók	Összegképlet Molsúly	Analízis	
				számolt	talált
DL-2,3-epoxi- propanol/1/	-	53-54/9,5 mm $n_D^{25} = 1,4311$ /fs ²² =1,111/	C ₃ H ₆ O ₂ 74,08	C 48,62 H 8,17	C 49,07 H 8,45
L/+/-1,2-3,4- diepoxi-bután	+22,85	143-5/760 mm $n_D^{20} = 1,435$ /fs ²⁰ =1,113/	C ₄ H ₆ O ₂ 86,09	C 55,9 H 7,04	C 55,94 H 7,08
D/-/-1,2-3,4- diepoxi-bután	-23,925	144/760 mm /fs ²⁰ =1,113/	"	"	C 55,78 H 7,31

-O-izopropilidén-D-treitol-1,4-bisz-metánszulfonát. Metánszulfonsavval refluxálva 1,4-bisz-meziloxi-D-treitol, végül ez utóbbi éteres oldatában tömény lug hatására gyűrűzárással a vegyület¹⁵⁷.

D/-/-1,2-3,4-diepoxi-bután: az előző vegyület előállításánál említett 2,3-O-izopropilidén-D-treitolból 48 %-os HBr/cc. kénsavval 1,4-dibróm-D-treitol, ennek éteres oldatában tömény luggal gyűrűzárás¹⁵⁷.

3.2. A kísérletekben felhasznált egyéb anyagok

A NaCl, Na₂HPO₄·2H₂O /Sörensen szerint/, NaH₂PO₄·H₂O, KCl, MgCl₂·6H₂O és a triklórecetsav a.l.t. minőségű Reanal készítmények voltak. A trinátrium-citrát Merck, a TRIS /trihidroximetil-metilamin/ Koch-Light Lab. Ltd., a 2-merkaptóetanol Calbiochem p.a. minőségű készítmények voltak.

SSC puffer: 0,15 M NaCl, 0,015 M trinátrium-citrát, pH=7,2 bidesztillált vízben, $c_{Na^+} = 0,195$ M.

SSC/33 puffer: 0,001 M NaCl, 0,001 M trinátrium-citrát, pH=7,2 bidesztillált vízben, $c_{Na^+} = 4 \cdot 10^{-3}$ M.

Dezoxiribonukleinsav: csirkevérből izolált magas polimerizációs fokú Reanal készítmény. GC-tartalma $41,7 \pm 1,0$ mol% hődenaturációs méréseink alapján $T_m = 87,0 \pm 0,4$ C° SSC pufferben/. $\epsilon_{P/} = 7100$ /foszfor tartalomból számolva/ Átlagmolsúly $7,41 \cdot 10^6$ D ultracentrifugás szedimentációs állandóból, $S_{20,w} = 20,0$ /Kémiai Szerkezet Kutató Laboratórium/ számolva ez irodalomban¹⁷⁵ megadott képlet alapján : $0,445 \lg M = 1,819 + \lg /S_{20,w} - 2,7/$.

Adenozin-5'-trifoszfát-, guanozin-5'-trifoszfát-, uridin-5'-trifoszfát- és citidin-5'-trifoszfát-diNa sók Miles Lab. Inc. készítmények.

A ¹⁴C/U/-uridin-5'-trifoszfát 300 mCi/mM specifikus aktivitású, 96 % radiokémiai tisztasági fokú csehszlovák

gyártmány volt /Institut für Forschung, Herstellung und Anwendung der Radioisotope, Praha/.

RNS polimeráz enzim: E. coli K₁₂-ből izolálva /Miles Lab. Inc./ . Specifikus aktivitása: 294 U /egység//mg protein. Az egység definíciója: az enzim azon mennyisége, amely 1 nM ¹⁴C-ATP savoldhatatlan anyagba való beépülését katalizálja Calf Thymus DNS templáton 10 perc alatt 37 C°-on. Az enzim egyéb adatai: 312 U/ml /az enzim 1:1 0,01 M TRIS puffer:glicerin oldatban, pH=7,9, 0,01 M MgCl₂, 0,1 M KCl, 0,1 mM ditio-treitol, 0,1 mM EDTA/, valamint 1,06 mg protein/ml.

3.3. Kísérleti módszerek és eszközök

3.3.1. Hődenaturációs görbék felvétele

Az abszorpció-hőmérséklet profil felvétele a ¹⁴ irodalom alapján egy, az intézetben átalakított UNICAM SP-500 spektrofotométerrel történt. A méréseket 1 cm-es küvettában, pufferral ill. puffer és diamino ill. dipeptid vegyülettel szemben végeztük, alifás diamino vizsgálatánál 260 nm-nél, az aromás oldalláncot tartalmazó dipeptidnél 258 nm-nél. A hőmérséklet mérését a küvette teflon dugóján át, közvetlenül a fényut fölé az oldatba benyúló, üvegbe ágyazott vas-konstantán termoelem biztosította. A termoelem hidegpontja egy 25 C°-os termosztátban volt. A hőmérséklet leolvasására kompenzációs műszert használtunk /Thermocontrol, Typ:YAK, Ganz, Budapest/. A küvettaház ill. a küvetták egyenletes felfűtését /0,5 C°/perc/ az intézetben készített lineáris hőmérséklet programozó biztosította, a fűtőközeg víz-glicerin elegy volt.

A DNS törzsoldatok 1000-1400 µg/ml koncentrációjuk voltak. A T_m pont méréséhez az oldatok 14-26 µg/ml DNS-t tartalmaztak, a 25 C°-on mért kiindulási ε₂₆₀ értékekből

/0,23-0,43/ számolva, ami a DNS foszfor tartalma alapján 3,2-6,0.10⁻⁵M-nak felel meg. A hiperkrom effektus 35-42 % között volt. Az elnyelési értékek nincsenek korrigálva a víz expanziós faktorával. Minden görbe felvétele minimálisan 20 mérési pont alapján történt. A mérés pontossága $\pm 0,05$ - $\pm 0,5$ C^o között változott. Minden megadott T_m pont minimálisan három T_m pont mérés átlaga.

Az alifás diaminok vizsgálata a már említett SSC és SSC/33 pufferekben történt. A dipeptidok vizsgálatánál a puffer, az ionkoncentráció és a pH a Brown⁷¹ által leirtakkal volt azonos, hogy a mért adatok az általa publikáltakkal összehasonlíthatók legyenek: 0,002 M foszfát puffer pH=6,35, 0,001 M NaCl hidsztillált vízben.

Az oldatok hidrogénion koncentrációjának beállítása Radelkis pH-méterrel történt /Typ:OP-205/. A beállítás pontossága: pH=7,2 \pm 0,03.

3.3.2. DNS transzkripció in vitro

Mivel az RNS polimeráz katalizálta RNS szintézis függ a puffertól, pH-tól, stb., standardizált rendszerre van szükség összehasonlítható eredményekhez. A kísérleteket az alábbi összetételű reakcióelegyben hajtottam végre⁸⁰: 0,04 M TRIS pH=7,9, 0,2 M KCl, 0,012 M MgCl₂, 4,2 mM 2-merkaptoetanol, 0,8 mM XTP, 0,1 mCi ¹⁴C-UTP /300 mCi/mM/, 100 µg DNS, 10,6 µg azaz 10 µl E. coli RNS polimeráz 0,5 ml ösztérfogatban. Az enzim bemérés Hamilton mikropipettával történt, a DNS koncentrációt ϵ_{260} mérés alapján határoztam meg. A DNS mintákat a diaminok vizsgálatánál dialízis nélkül, alkilezett DNS-ek vizsgálatánál dialízis után mértem be az RNS szintézis reakcióelegybe. Minden enzimes méréshez 3 v. 5 párhuzamos mintát készítettem.

Az RNS szintézis előrehaladásáról a ¹⁴C-UTP savold-

hatatlan anyagba való beépülése / ^{14}C -UMP formájában/ ad felvilágosítást.

A reakció az enzim hozzáadásával indult meg. Az inkubáció 37 C° -on történt meghatározott ideig. A reakció leállítására $0,1\text{ ml}$ kb. $1300\text{ }\mu\text{g/ml}$ -es denaturált DNS hozzáadása után 2 ml jéghideg 5% -os triklórecetsavval történt. A kémcső jeges fürdőbe került 30 percig, majd a savoldhatatlan anyagot $0,45\text{ }\mu$ pórusméretű membránszűrővel szűrtem /Sartorius GmbH/, $4 \times 5\text{ ml}$ 5% -os triklórecetsavval mostam. A szűrőlemezek megszáradás után radioaktivitás mérésre kerültek az intézetben kifejlesztett gáz fázisú, proporcionális tartományban mérő ^{14}C analízátorban.

3.3.3. A DNS alkilezése

A DNS minták alkilezési reakcióinak végrehajtása és spektrofotometriás analízise 157 alapján történt. A reakcióelegyek azonban más összetételűek voltak. Az összetételt az RNS szintézis követelményei szabták meg.

Az alkilezéshez használt pufferek összetétele: $0,04\text{ M}$ TRIS $\text{pH}=7,9$, $0,1\text{ M}$ KCl, a DNS koncentráció 1 mg/ml / $2,29 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ a foszfor tartalom alapján/. Az alkilezőszer koncentrációja a reakció időfüggésének / $0-24$ óra/ vizsgálata esetén $0,1\text{ M}$ /koncentráció arány $43,67$ alkilezőszer molekula/DNS bázis /, az alkilezőszer koncentrációja hatásának vizsgálatakor $0,01-0,5\text{ M}$ /koncentráció arány $4,37-218,35$ /, a reakcióidő 2 óra, a hőmérséklet 37 C° .

3.3.4. A DNS minták dialízise

Az RNS szintézis vizsgálatához az alkilezési reakcióelegyből 5 ml -es mintákat vettem. Ezek egy dializáló zsákba kerültek /Kalle AG, Wiesbaden/, amelyek $0-5\text{ C}^\circ$ hőmérsékletű, 500 ml térfogatú dializáló pufferbe / $0,04\text{ M}$

TRIS pH=7,9, 0,1 M KCl/ merültek. A hirtelen hűtés a reakció leállítását szolgálta. A dialízis célja pedig az el nem reagált, ill. a nem DNS-sel elreagált és elhidrolizált alkilezőszerek makromolekulás oldatból való eltávolítása volt. Irodalmi adatok alapján¹⁶⁴ 10^{-3} M N-mustár 25 %-kal csökkenti az RNS polimeráz aktivitását, 10^{-3} M alatt pedig az aktivitást gyakorlatilag nem befolyásolja. Az epoxid vegyületek Ross-féle¹⁷⁶ tioszulfátos meghatározással 0,005-0,01 M koncentrációig mutathatók ki. Kísérleteinkben a dializáló folyadékot /500 ml/ 3-4-szer cseréltem, és a dialízis összesen 100-120 óráig tartott 0-5 °C közötti hőmérsékleten. A dialízis első szakasza után /kb. 30 óra/ már nem volt analitikailag kimutatható mennyiségű alkilezőszer a makromolekulás oldatban.

3.3.5. A DNS renaturálhatóságának meghatározása

A DNS renaturálhatóságának meghatározásához a dializált mintákból 0,5 ml-es térfogatokat 25 ml bidesztillált vízbe pipettáztam. Ebből az elegyből 4x4 ml-t kémcsőbe mértem, kettőhöz 1-1 ml deszt. vizet adtam, a másik kettőhöz előbb 0,5-0,5 ml 0,2 n NaOH-ot, majd 2 perc múlva alapos összerázás után 0,5-0,5 ml 0,2 n ecetsavat. Ezután a minták extinkciós koefficienseit határoztam meg /260 nm-nél/, majd a nyert adatokból az alábbi képletek alapján a keresztkötéses alkilezés mértékére jellemző renaturálhatósági értékeket számoltam ki:

$$\text{Renaturálhatósági \%} = \frac{h_k - h}{h_k} \cdot 100 \quad /9/$$

ahol $h_k = \frac{\epsilon_k}{\epsilon_0} - 1$. A h_k a kontroll minta hiperkrom effektusa, az ϵ_k a renaturált minta, ϵ_0 a natív minta extinkciós koefficiense. A $h = \frac{\epsilon}{\epsilon_0}$, az alkilezett minta hiperkrom effektusa, ϵ a renaturált minta extinkciós koefficiense¹⁵⁷.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. Alifás diamin származékok hatása a DNS hőstabilitására

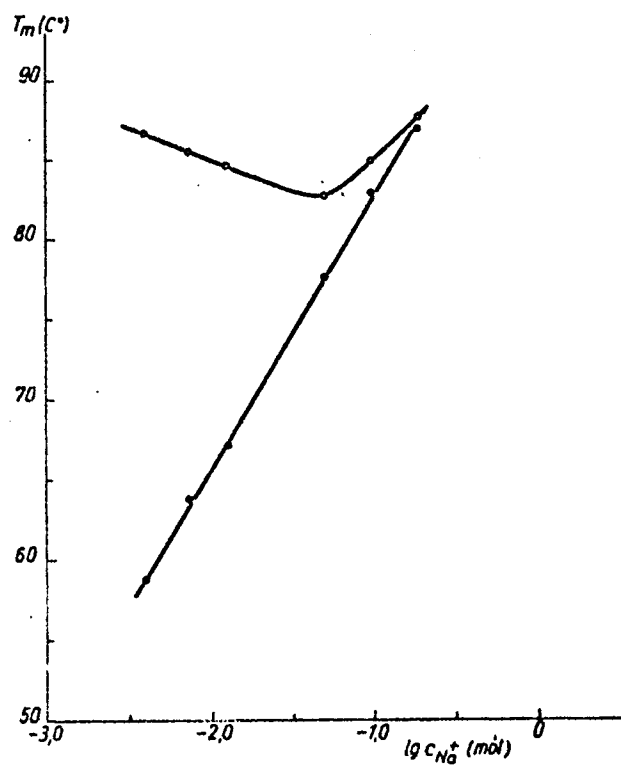
A polimetilén-diaminok DNS hőstabilitást növelő hatása az irodalomból ismert. Calf Thymus DNS esetén $n=5$ -nél $\Delta T_m = 5,3 \text{ C}^\circ$ /ez a maximális effektus/, $n=2$ -nél $2,0 \text{ C}^\circ$ SSC pufferben. Csirkevérből izolált DNS-nél $T_m = 87,0 \pm 0,4 \text{ C}^\circ$, SSC pufferben/ ezek az értékek $5,0$ ill. $1,7 \text{ C}^\circ$. /Az amin koncentráció $0,05 \text{ M}$, a DNS koncentráció $4,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, az amin/bázis koncentráció arány 1087 ./

A mérések pontosságához viszonyítva ezek a hőmérséklet különbségek kicsik finomabb effektusok méréséhez.

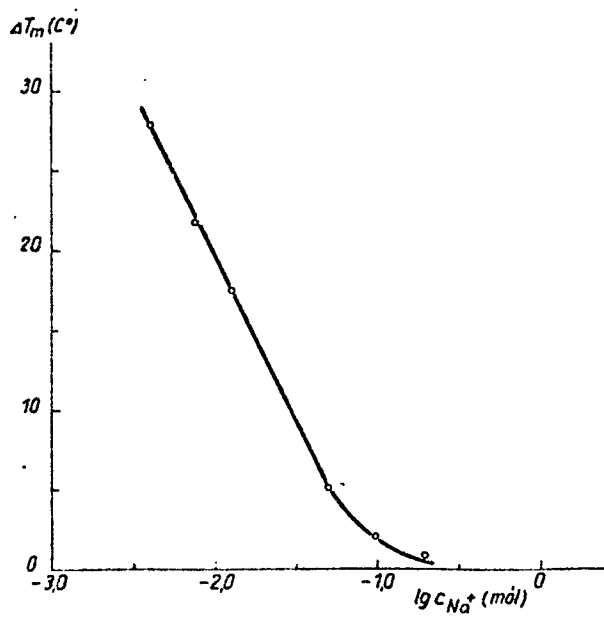
Horacek⁵⁰ mérései alapján a ΔT_m növelhető az ionkoncentráció csökkentésével változatlan v. csökkenő diamin koncentráció mellett. Ezt az effektust megmértük csirkevér DNS-sel. A kapott eredményeket a 3. táblázat, valamint az 5. és 6. ábra mutatja $10^{-3} \text{ M PMD.2HCl}$ esetén.

3. táblázat

Sókonc. [Na ⁺] /M/	lg.[Na ⁺]	T _m /DNS/ /C ^o /	10 ⁻³ M PMD.2HCl	
			T _m /C ^o /	ΔT _m /C ^o /
4,00.10 ⁻³	-2,3979	58,8 ± 0,5	86,7 ± 0,1	27,9
7,40.10 ⁻³	-2,1300	63,8 ± 0,2	85,6 ± 0,3	21,8
1,25.10 ⁻²	-1,9031	67,2 ± 0,2	84,7 ± 0,3	17,5
5,01.10 ⁻²	-1,3002	77,7 ± 0,3	82,8 ± 0,3	5,1
9,80.10 ⁻²	-1,0088	83,0 ± 0,2	85,0 ± 0,2	2,0
1,95.10 ⁻¹	-0,7100	87,0 ± 0,4	87,8 ± 0,2	0,8



5. ábra



6. ábra

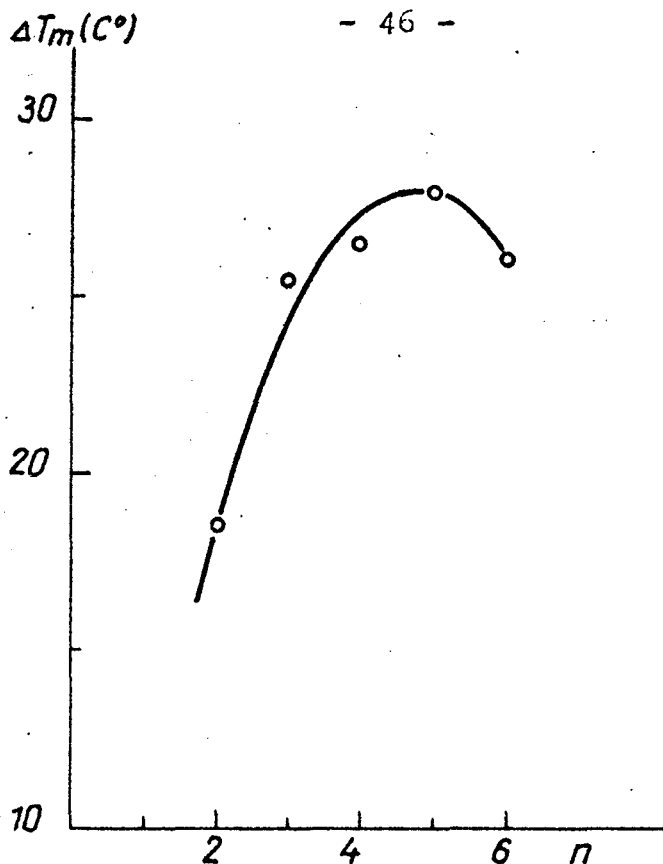
Az 5. ábrán a T_m /DNS/ - lg sókoncentráció egyenes iránytangense azonos az irodalomban a DNS-ekre leírtakkal, azaz leírható a /4/ egyenlettel. Eszerint $1 \cdot 10^{-3}$ M-lal megnövelve a NaCl koncentrációt az SSC/33 pufferben /a csirkevér DNS T_m pontja ebben a pufferben $58,8 \pm 0,5$ C^o, 20 mérés alapján/ $1,6$ C^o-kal növekszik meg a DNS T_m -je. $1 \cdot 10^{-3}$ M PMD.2HCl pedig $27,9$ C^o-kal növeli meg a T_m -et. Ez 5,58-szorosa az SSC-ben mért maximális effektusnak.

A finomabb effektusok tanulmányozására ezért a továbbiakban a kisebb ionerősségű SSC/33 puffert használtam. Az aminok koncentrációja mindig $1 \cdot 10^{-3}$ M volt /Mähler mérései szerint a ΔT_m itt már a telítési szakaszon van/ és az amin/DNS bázis koncentráció arány 21,74.

A maximális effektus itt is $n=5$ -nél van: 4. táblázat és 7. ábra, megegyezően Mähler⁴⁵ és ellentétben Gabbay^{51,57} adataival. /A táblázatokban a továbbiakban a DNS-diamin komplexek T_m -jét nem tüntetem fel, csak a nyert ΔT_m -eket./
4. táblázat

V e g y ü l e t	ΔT_m /C ^o /	$\frac{\Delta T_m}{27,9} \cdot 100$ /%/	R_{Δ} /%/
Etilén-diamin.2HCl	$18,5 \pm 0,2$	66,3	42,0
Propilén-diamin.2HCl	$25,4 \pm 0,2$	91,0	39,5
Butilén-diamin.2HCl	$26,4 \pm 0,2$	94,6	40,6
PMD.2HCl	$27,9 \pm 0,1$	100,0	41,1
Hexametilén-diamin.2HCl	$26,0 \pm 0,2$	93,2	40,0
Diemino-mannit.2HCl	$30,2 \pm 0,4$	108,2	40,0
D-dulcit	$2,5 \pm 0,3$	9,0	38,0
D-mannit			
D-szorbit			

/ R_{Δ} a hiperkrom effektus/



7. ábra

A PMD effektusát is felülmúlja azonban a hexametilén-diamin 2,3,4,5-tetrahidroxi származéka mannit konfigurációjú izomerjének /diamino-mannit/ hatása. A hidroxicsoporthok megnövelik az alapvegyület stabilitást növelő effektusát $4,2\text{ C}^\circ$ -kal. A 2,3,4,5-tetrahidroxi-hexán különböző izomerjeinek azonos hatása van, ez azonban kisebb, mint a diamino-mannit által adott $\Delta/\Delta T_m$, azaz a $4,2\text{ C}^\circ$.

A pentametilén sorban l-helyettesített származékok esetén a metil- és izopropil csoport PMD-hez viszonyított effektus csökkentő hatása /5. táblázat/ valószínűleg elsősorban az apoláros karakter növekedésével van összefüggésben, éppen úgy, mint a 3-metil származéknál. Azonban nem mindegy, hogy a szubsztitúció hol történik. A protonált amino csoport mellett kialakult liofil szféra megzavarása egy apoláros csoporttal /ionszolvatáló képesség csökkentése/ jobban csökkenti az effektust. Er-

5. táblázat

V e g y ü l e t	$\Delta T_m /C^\circ/$	$\frac{\Delta T_m}{27,9} \cdot 100$ [%]	R_Δ [%]
PMD.2HCl	27,9 \pm 0,1	100,0	41,1
3-metil-PMD.2HCl	26,0 \pm 0,2	93,2	40,5
DL-l-hidroximetil- PMD.2HCl	25,6 \pm 0,2	91,8	39,0
DL-l-metil-PMD.2HCl	24,8 \pm 0,1	88,9	41,5
DL-l-izopropil-PMD.2HCl	23,8 \pm 0,3	85,3	40,7
L-lizin-etilészter.2HCl	15,6 \pm 0,3	55,9	39,8
D-lizin-etilészter.2HCl	15,0 \pm 0,2	53,8	40,8
DL-lizin-etilészter.2HCl	15,2 \pm 0,2	54,5	39,0
L-lizin-metilészter.2HCl	14,0 \pm 0,1	50,2	40,0
D-lizin-metilészter.2HCl	13,7 \pm 0,2	49,1	37,8
DL-lizin-metilészter. 2HCl	13,7 \pm 0,2	49,1	38,0
L-lizin-izopropilészter. 2HCl	13,5 \pm 0,2	48,4	38,2
DL-lizin-izopropil- észter.2HCl	13,1 \pm 0,3	47,0	39,0
L-lizin.HCl	1,5 \pm 0,2	5,4	39,5
D-lizin.HCl	1,3 \pm 0,2	4,7	37,0
DL-lizin.HCl	1,3 \pm 0,2	4,7	38,5
N,N,N,N;N;N'-hexametil- PMD.2Br ⁻	18,2 \pm 0,2	65,2	39,2
N,N,N,N;N;N'-hexaetil- PMD.2Br ⁻	0,9 \pm 0,2	3,2	37,0

re utal az l-metil- és a 3-metil-PMD ΔT_m -jei közötti különbség: $\Delta/\Delta T_m = 1,2 C^\circ$. Az l-helyettesített származé-

koknál a metil csoportok elektronküldő effektusa is hozzájárulhat a csökkenéshez. Tergátlás a szabad rotálás miatt kevésbé képzelhető el.

A hidroximetil-PMD vegyület ΔT_m -je $0,8\text{ C}^\circ$ -kal magasabb, mint az l-metil-PMD-é. Ez a hidroxil csoport polaritásával és a H-hid kötésben való részvételével magyarázható.

A PMD karboximetil, -etil és -izopropil származékai kb. 50 %-kal csökkentik az alapvegyület stabilitás növelő effektusát. A csökkenés feltehetőleg a karbonil csoport oxigénje elektronsűrűségének és az apoláros lánc hatásának a következménye. A karboxietil származékok adják a legnagyobb ΔT_m -et az észterek közül. Ez valószínűleg hidrofób kölcsönhatásokkal függ össze.

A PMD karboxil származékai /sztereoiszomer lizinek/ a PMD effektusát szinte teljesen eltüntetik. A kapott ΔT_m -ek $1 \cdot 10^{-3}\text{ M}$, azaz azonos koncentrációju NaCl ill. az ezzel egyenértékű NH_4Cl hatásával azonosak. Ennek oka az aminosav ikerion szerkezete.

A PMD, N,N,N,N;N;N'-hexametil-PMD, N,N,N,N;N;N'-hexaetil-PMD sorban az apoláros szubsztituensek méretének növelése a ΔT_m csökkenéséhez vezet, hasonlóképpen, mint azt Gabbay⁵¹ poliribonukleotidokra megállapította. A csökkenés részben tergátlással, részben a hidrofób karakter megnövekedése miatti ionszolvatáló kapacitás csökkenésével magyarázható.

A sztereoiszomer lizinek és észterek ΔT_m -jei azt mutatják, hogy habár minden esetben az l. származékok adják a mérési átlagok alapján a nagyobb effektust, az értékek csak egyetlen sztereoiszomer pár esetében /L- és D-lizinetilészter/ nem fedik át egymást. A különbség itt is csak min. $0,1\text{ C}^\circ$, max. $1,1\text{ C}^\circ$. Habár Gabbay^{47,57} mérései szerint a diamino-propionsav, -vajsav, ornitin és lizin sztereoiszomereknél is csak a legelső /max. $1,1\text{ C}^\circ$ / és a

legutolsó /min. $0,1\text{ C}^\circ$, max. $1,3\text{ C}^\circ$ különbség/ esetben nincs átfedés /a második és harmadik vegyületnél a különbség 0, ill. $0,2\text{ C}^\circ$, a mérési hiba $\pm 0,3\text{ C}^\circ$ /, a különbségnek nagy jelentőséget tulajdonít, és ebből, valamint az $n=3$ max. effektusból felépíti az egy szálon való stabilizáció elvét, amelyet mind DNS-ekre, mind poli-ribonukleotidokra érvényesnek tekint.

Mivel egy metil csoport /3-metil-PMD/ az amin-foszfát kötéstől távol, valószínűleg pusztán az apoláros lánc destabilizáló hatása miatt $1,9\text{ C}^\circ$ -kal csökkenti a PMD ΔT_m -jét, az amino csoport közelében lévő pedig /1-metil-PMD/ $3,1\text{ C}^\circ$ -kal, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a konfigurációnak az alifás diaminok és a DNS kölcsönhatásában nincs lényeges hatása.

A csirkevér DNS hőstabilitása növekedésének az aminok alifás lánchosszától való kísérleteinkben kimért függése, valamint a DNS és az aminok molekuláris paramétereinek^{51,57,62} ismerete alapján a Tsuboi-Liquori modellel jobban magyarázhatjuk a DNS diaminok által történő stabilizációját, mint a Gabbay-féle modellel.

4.2. Dipeptidek kölcsönhatása a DNS-sel

A vizsgált dipeptidek egyik része N-terminálisként lizint és ornitint, C-terminálisként tirozin- és triptofán-metilésztereket tartalmazott. Ezek a bázikus dipeptidek így az adott pH-n dikation szerkezetűek voltak. A második csoport N-terminálisa szerin, C-terminálisai tirozin- és triptofán-metilészterek voltak. Ezek monokation szerkezetűek, hasonlóképpen, mint a tirozin-metilészter.

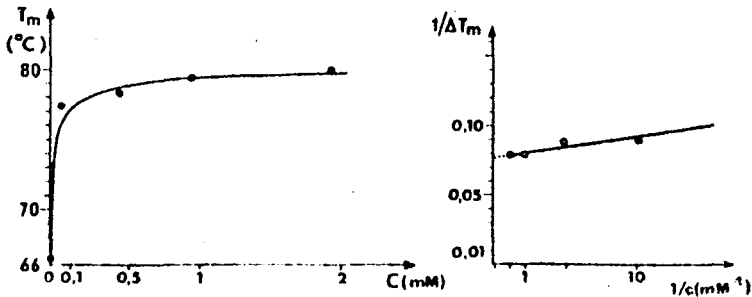
A bázikus aminosavakat tartalmazó dipeptidek DNS-sel való kölcsönhatása minden esetben a DNS T_m pontjának



növekedéséhez vezetett. Az effektus nagysága a peptidet alkotó aminosavaktól és a peptidek koncentrációjától függött /6. táblázat/, standard körülmények között / $2 \cdot 10^{-3}$ M foszfát puffer pH=6,35, $1 \cdot 10^{-3}$ M NaCl, DNS koncentráció: $4,6 \cdot 10^{-5}$ M /foszfor//.

6. táblázat

Dipeptid	$\Delta T_m / ^\circ C /$			
	Peptid koncentráció /M/			
	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Lys-TyrOMe	10,9 \pm 0,4	11,9 \pm 0,3	13,0 \pm 0,5	13,2 \pm 0,4
Lys-D-TyrOMe	-	10,4 \pm 0,1	10,5 \pm 0,2	-
Orn-TyrOMe	-	11,4 \pm 0,2	11,8 \pm 0,4	-
Lys-TrpOMe	16,7 \pm 1,0	-	-	-
Orn-TrpOMe	11,2 \pm 0,5	13,6 \pm 0,8	-	-



8. ábra

A bázikus dipeptidek T_m -jei a koncentráció függvényében tipikus telítési görbét irnak le. A 8. ábra az L-lizil-L-tirozin-metilészter koncentrációinak hatását mutatja be.

A triptofán peptidek hatását $5 \cdot 10^{-4}$ M felett nem tudtuk megmérni, mert a heterogyűrű UV elnyelést zavaró hatása miatt a mérések érzékenysége és pontossága erősen lecsökkent.

A Lys-TyrOMe nagyobb mértékben stabilizál, mint a megfelelő koncentrációju D enantiomer, megegyezésben Gabbay⁴⁷ méréseivel. A különbségek itt már nagyobbak, mint a lizin és észterei sztereoizomerjeinek esetén /4.1. fejezet/: $1 \cdot 10^{-3}$ M peptid koncentrációnál min. $1,8$ C°, max. $3,2$ C°. A molekula mérete és az aromás oldallánc miatt a stabilizáció mechanizmusa valószínűleg nem ugyanaz, mint az egyszerű diaminoknál.

A 6. táblázat adataiból jól látható, hogy mind a triptofánt, mind a tirozint tartalmazó, azonos konfigurációju vegyületeknél a lizil-dipeptidek magasabb ΔT_m -et adnak, mint a megfelelő ornitil származékok. Ez a különbség analóg a 4.1. fejezetben a cadaverin és a putrescin között említett különbséggel.

A kölcsönhatás specificitásához az aromás oldallán-cok is hozzájárulnak. Az analóg tirozin és triptofán peptidek közül a triptofán vegyületek stabilizálnak jobban. Ez az eredmény megegyezik Brown⁷¹ eredményeivel, aki Arg-Trp dipeptid esetén kapta a legnagyobb ΔT_m -et. Mivel a triptofán hetero indol gyűrűjében lévő NH bázicitása elhanyagolható, bázikus aminosavakkal képzett dipeptidjei normál dikationok. A planáris indol gyűrű azonban képessé teszi a triptofánt a bázis párok közé való beékelődésre /"intercalation"/, hasonlóképpen megtörténhet ez a tirozinnal is⁷⁴. A stabilizáló kapacitásban

lévő különbség így az interkalációra vezethető vissza.

A stabilizációs effektus további vizsgálatához a DNS olyan dipeptidekkel való kölcsönhatását vizsgáltuk meg, ahol a bázikus aminosavak helyett szerin van. A kapott eredményeket a 7. táblázat tartalmazza /a reakcióelegy összetétele változatlan/.

7. táblázat

Dipeptid	$\Delta T_m /C^\circ/$				
	Peptid koncentráció /M/				
	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Ser-TrpOMe	1,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	-	-
D-Ser-TrpOMe	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	-	-
Ser-TyrOMe	1,1	0,1	-0,1	-1,1	-2,9 \pm 0,2
TyrOMe	1,0	-	-	0,4	-2,3

A kapott ΔT_m -ek, mivel a vegyületek monokation szerkezetűek, hasonló nagyságrendűek, mint az egyértékű kationok, valamint a lizinek /4.1. fejezet/, továbbá az irodalomban említett alifás monoamino-hidrokloridok effektusa⁴⁹. Koncentrációfüggést az irodalom azonban nem említ.

A triptofán peptidekben, a mért koncentráció intervallumban a ΔT_m független a peptid koncentrációtól, míg a tirozin peptid ΔT_m -je ugyanebben a tartományban csökken, sőt destabilizálja a DNS dupla hélixet. Ugyanez a hatása a TyrOMe-nek is /negatív ΔT_m /.

Az L-szerin és a D-szerin dipeptidek stabilizáló effektusa közötti különbség az abszolút értékeket tekintve

nem olyan jelentős, mint a bázikus dipeptidok esetén, azonban a stabilizáció mértékéhez képest ez is figyelemreméltó.

$1 \cdot 10^{-4}$ M-nál az azonos konfigurációjú tirozint és triptofánt tartalmazó peptidok stabilizáló hatása azonos. A koncentráció növekedésével azonban a triptofán származék hatása változatlan, míg a tiroziné csökken.

Habár mindkét típusu dipeptidnél van különbség a triptofán és a tirozin oldallánc által létrehozott stabilizáló effektus között, meg kell említeni, hogy az interkalációs effektus nem szükségképpen tükröződik vissza a hőstabilitásban /fluoreszcencián alapuló spektrofotometria a legmegfelelőbb módszer az interkalációs effektus mérésére/. Az a következtetés azonban levonható, hogy az aromás oldalláncok DNS hőstabilitásra való hatása közötti különbség jobban megmutatkozik, ha a peptidben a dikation szerkezet jelen van.

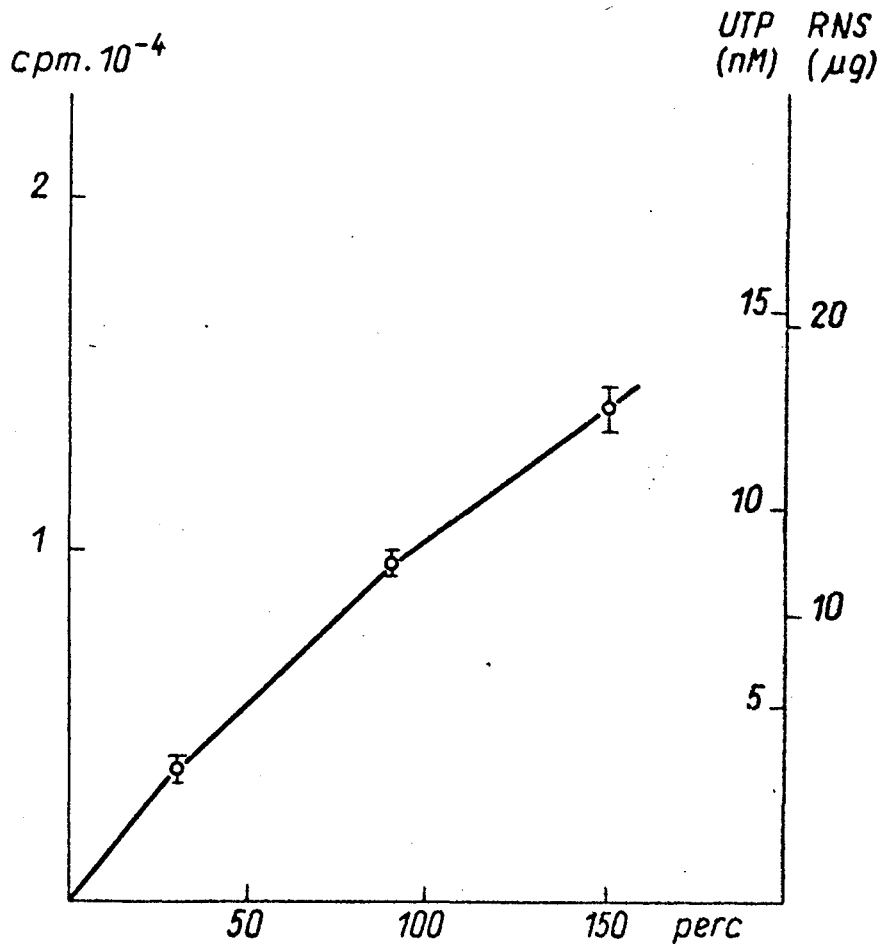
4.3. Alifás diamino vegyületek hatása az in vitro DNS transzkripcióra

A 4.1. fejezetben megvizsgáltuk különböző diamino származékok DNS stabilizációjára való hatását. A vegyületek szubsztituenstől függően különböző mértékben stabilizálják a DNS dupla hélixét. Kiválasztottunk három, különböző mértékű stabilizációt létrehozó vegyületet, hogy megvizsgáljuk, milyen összefüggés van a DNS T_m pontja és a templát aktivitás között.

A 9. ábra egy natív DNS-en /csirkevér, Reanal/ végbemenő RNS szintézist ábrázol, az enzimatis reakció idejének függvényében. Az adatokat a 8. táblázat tartalmazza. A reakcióelegy összetétele a 3.3.2. fejezetben található.

8. táblázat

Reakcióidő /perc/	cpm	Beépült UTP /nM/	Szintetizált össz RNS/kémcső /µg/
30	3800 ± 400 /± 10,5 %/	3,39 ± 0,36	4,63 ± 0,49
90	9700 ± 300 /± 3,1 %/	8,66 ± 0,27	11,83 ± 0,37
150	14000 ± 600 /± 4,3 %/	12,50 ± 0,54	17,07 ± 0,73



9. ábra

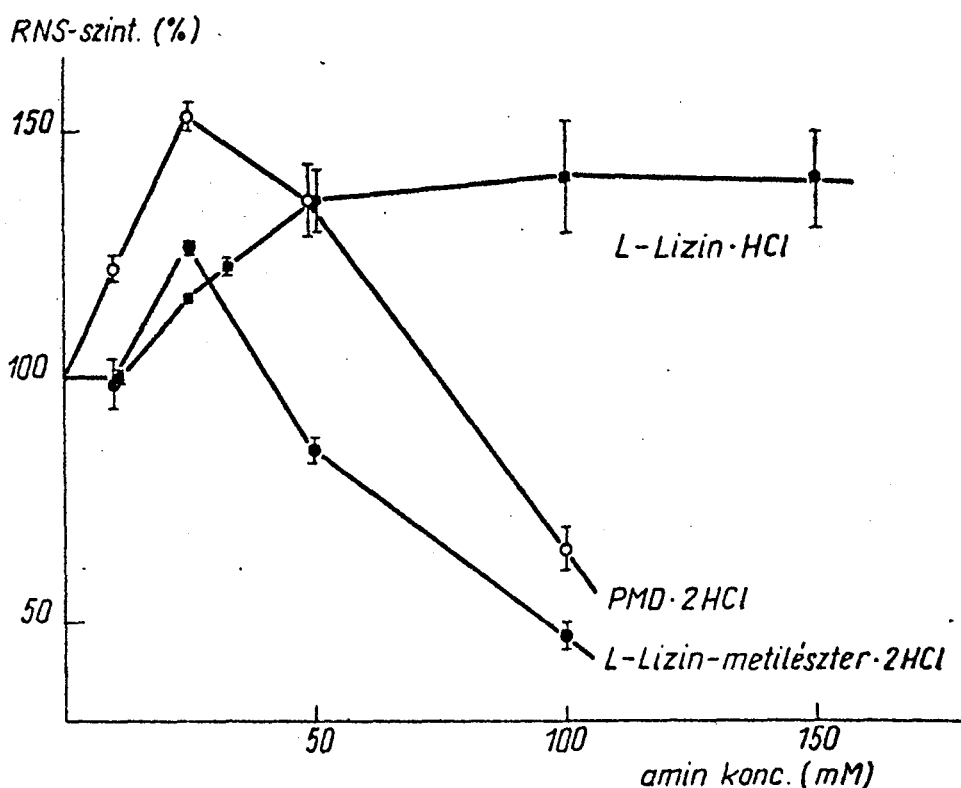
A reakció sebessége 150 percnél még alig csökken. A továbbiakban ezért minden megadott érték 150 perces reakcióidőre vonatkozik. /Módosított és nem módosított templáton folyó szintézis aránya a különböző időpontokban az irodalom alapján azonos./

A három kiválasztott vegyület az L-lizin.HCl, az L-lizin-metilészter.2HCl és a PMD.2HCl volt. A létrehozott stabilizáció 10^{-3} M diamin koncentráció esetén SSC/35 pufferben $1,5\text{ C}^{\circ}$, $14,0\text{ C}^{\circ}$ és $27,9\text{ C}^{\circ}$, azaz egy gyenge, egy közepes és egy erős effektust létrehozó vegyület. Mindhárom vegyület befolyásolta az RNS szintézist. Az effektus koncentráció függő, és függ a diamin szerkezetétől is /9. táblázat és 10. ábra/.

9. táblázat

Diamino vegyület konc. /mM/	RNS szintézis /%/		
	L-lizin.HCl	L-lizin-metil- észter.2HCl	PMD.2HCl
0	100,0 \pm 3,8	100,0 \pm 3,8	100,0 \pm 3,8
1	100,35 \pm 5,1	-	-
10	99,75 \pm 1,3	98,4 \pm 4,8	122,0 \pm 2,6
25	116,15	126,5 \pm 1,2	153,0 \pm 3,0
33	122,60 \pm 1,1	-	-
50	136,50 \pm 6,7	85,2 \pm 2,3	135,8 \pm 7,4
100	140,40 \pm 11,5	47,4 \pm 2,8	64,9 \pm 4,6
150	140,00 \pm 9,8	-	-

A PMD maximális és a három vegyület közül is legnagyobb effektusa az 53 %-os stimuláció, 25 mM koncentráció-



10. ábra

nál van. Az észter maximális effektusa is ennél a koncentrációnál van, ez 20,5 %-os stimuláció. Az utóbbi vegyület azonban már 40 mM-től, az előbbi pedig 75 mM-től csökkenti az RNS szintézis sebességét a 0 koncentrációhoz viszonyítva. Az L-lizin 25 mM-nál 16 %-os stimulációt hoz létre, azonban ez a pozitív hatás tovább növekszik növekvő koncentrációval. 150 mM feletti koncentrációkban a mérési pontok szórása annyira megnövekedett, hogy az értékelést lehetetlenné tette. Így nem tudtuk eldönteni, hogy az effektus telítési görbe szerint, vagy maximum görbe szerint változik.

Az RNS szintézis reakcióelegyben T_m pontot mérni a nagy DNS koncentráció miatt nem lehet. Az SSC Na^+ koncent-

rációja azonban közel azonos az RNS szintézisnél használt puffer K^+ koncentrációjával. Az utóbbi puffer egyéb összetevői feltehetőleg nem befolyásolják a DNS-diamin kölcsönhatást. Így az RNS szintézis reakcióelegyben történő DNS stabilizáció minőségileg azonos az SSC-ben ill. az SSC/33-ban történő stabilizációval. Az összehasonlításnál azonban figyelembe kell venni a DNS és a diamín koncentráció arányokat.

Az RNS szintézis reakcióelegyben a PMD maximális sebességnövelő hatása 25 mM koncentrációnál volt. A DNS koncentráció 200 $\mu\text{g/ml}$, ez molárisan $4,6 \cdot 10^{-4}$ M /foszfor/, az amin/DNS bázis koncentráció arány így 54,35. Ez mindössze 5,0 %-a az SSC-ben a PMD-vel mért, maximális ΔT_m -hez tartozó PMD/DNS bázis koncentráció aránynak /1087/. T_m pont mérésnél SSC-ben ez 0,0025 M PMD-nek felel meg. Tehát az RNS szintézist stimuláló hatás olyan PMD koncentrációknál lép fel, ahol a dupla hélixet stabilizáló hatás még kicsi, azaz számszerűleg $0,8 C^\circ$ a ΔT_m , az összstabilizációnak /5,0 C° / 16 %-a. A PMD 75 mM koncentráció felett már RNS szintézis inhibitor. Itt a koncentráció arány 163,05, ez 15 %-a 1087-nek, és T_m pont mérésnél SSC-ben ez 0,0075 M PMD-nek felel meg. Ebben a koncentrációban a $\Delta T_m = 2,5 C^\circ$, azaz a maximális stabilizáció 50 %-a.

A 25 mM diamín koncentrációnál a három vegyület RNS szintézisre való hatása a PMD hatásának százalékában kifejezve a következő: PMD 100 %, L-lizin-metilészter 50 %, L-lizin, 30,5 %. A sorrend megegyezik a ΔT_m -ek sorrendjével, a lizin azonban jóval nagyobb effektust ad, mint az a ΔT_m alapján várható lenne. Ikerion szerkezete miatt várhatólag hatásmechanizmusa is különbözik az előbbi két vegyületétől.

A PMD és a lizin-metilészter adataiból viszont az a következtetés vonható le, hogy RNS szintézisre való hatásuknak köze van a dupla hélix stabilizációjához. Az

effektus két részre osztható: 1./ 25 mM koncentrációig a stimuláló hatás alapja valószínűleg az RNS termék inhibíciójának megszüntetése /2.4. fejezet/. Ez a DNS-sel ill. a DNS-RNS hibriddel való kölcsönhatás eredménye lehet. 2./ 25 mM felett a hélix stabilitásának további növekedése miatt valószínűleg fokozatosan gátolt lesz az enzim-DNS asszociációhoz szükséges parciális DNS letekeredés. Ez a hatás 75, ill. 40 mM felett olyannyira előtérbe lép, hogy inhibícióról beszélhetünk. Érdekes azonban, hogy a kisebb ΔT_m -et és RNS szintézis stimulációt létrehozó észter már majdnem fele olyan koncentrációban inhibitor, mint a PMD, holott ez fordítva lenne várható, ha csak a DNS stabilizálás lenne a mérvadó.

A tiszta dikation szerkezetű vegyületek /alifás diaminok/ RNS szintézist stimuláló hatása tehát kvalitatíve összefüggésbe hozható e vegyületek által kiváltott DNS hőstabilitás növekedéssel. Az inhibitor hatás azonban nem írható le a ΔT_m függvényeként.

4.4. Epoxi vegyületekkel alkilezett DNS templát aktivitása enzim katalizálta RNS szintézisben

Az előbbi bifunkciós alkilezőszerek hatását vizsgáltam meg: L- és D-1,2-3,4-diepoxi-bután /továbbiakban L-DB és D-DB/, 1,2-5,6-diepoxi-dulcitol /DAD/, 1,2-5,6-diepoxi-3,4-izopropilidén-mannit /DAMAM/ és 1,2-5,6-diepoxi-3,4-diacetil-dulcitol /diAc-DAD/. Megvizsgáltam továbbá két, keresztkötést létre nem hozó monofunkciós vegyületet: etilénoxid /EO/ és DL-2,3-epoxi-propanol/1/ /DL-EP/.

A munka célja többek között az volt, hogy megvizsgáljuk, összefüggésbe hozható-e a keresztkötésre jellemző renaturálhatóság értéke az in vitro RNS szintézissel. Ezért először a bifunkciós alkilezőszerekkel alkilezett DNS renaturálhatóságát vizsgáltam meg, az alkilezési re-

akció és a dialízis után. A renaturálhatóság különböző alkilezőszerekkel való vizsgálata egy korábbi dolgozat tárgya volt¹⁵⁷. A renaturálhatósági értékek ismételt meghatározása ezért volt szükséges, mert az alkilezési reakció körülményei /DNS-, alkilezőszer- és ionkoncentráció, a puffer, valamint az utókezelésnek számító dialízis/ nem voltak azonosak a korábbiakkal.

A 10. táblázat az öt bifunkciós vegyülettel alkilezett DNS renaturálhatósági értékeit mutatja be /alkilezőszer koncentráció = 0,1 M/ a reakcióidő függvényében.

10. táblázat

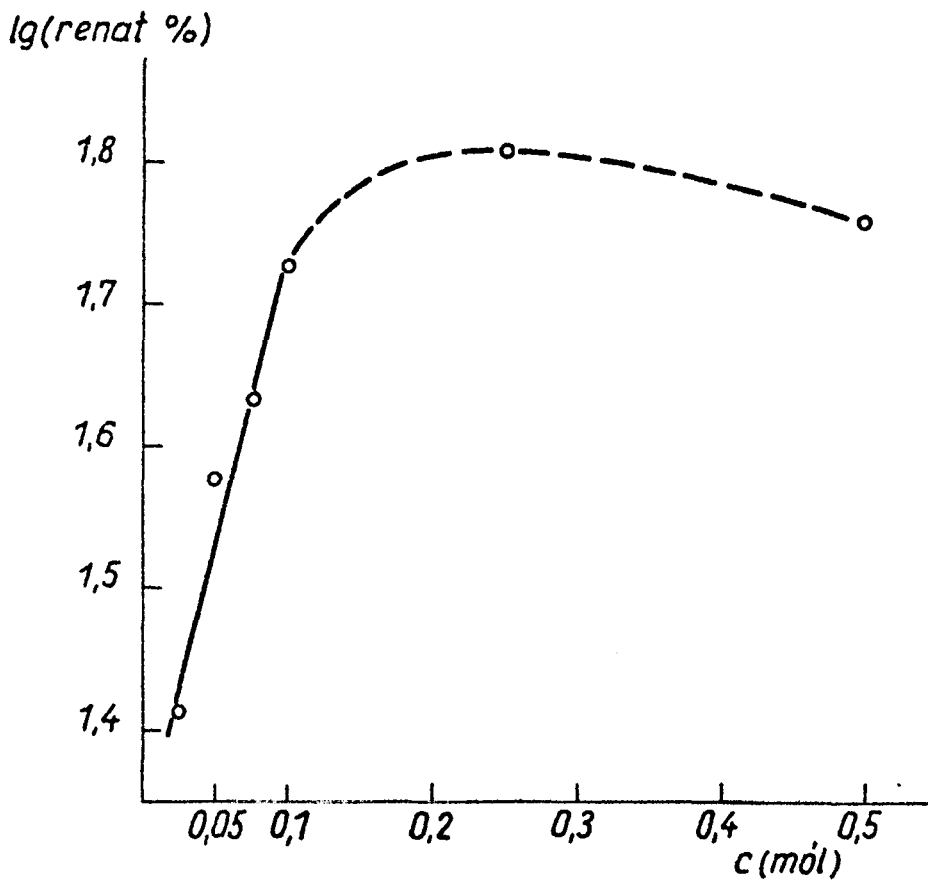
Reakcióidő /óra/	Renaturálhatósági %				
	L-DB	D-DB	DAD	diAc-DAD	DAMAM
0,5	39,80	25,62	10,1	-	-
1,0	45,95	30,48	13,7	-	-
2,0	51,00	41,23	27,5	12,8	-
4,0	52,25	39,08	50,5	18,9	4,1
6,0	-	-	-	22,1	-
8,0	51,60	37,91	49,7	-	-
10,0	-	36,93	-	-	-
18,0	-	-	-	-	7,5
24,0	30,60	21,20	34,6	21,8	11,0

A 11. táblázat az L-DB koncentrációjának függvényében mutatja be a renaturálhatósági értékeket /reakcióidő 2 óra/.

A 11. ábra az L-DB renaturálhatóságának logaritmusát ábrázolja az alkilezőszer koncentrációjának függvényében. Megállapítható, hogy a renaturálhatóság logaritmusa egé-

11. táblázat

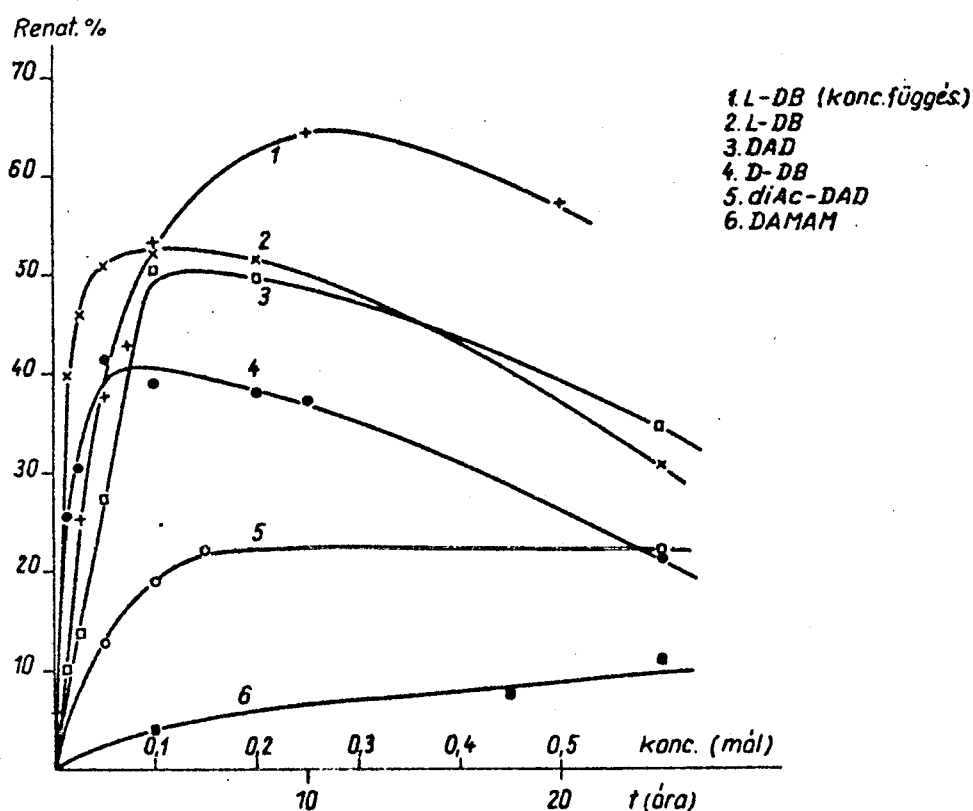
L-DB konc. /M/	Renaturálható- sági %	lg/Renaturál- hatósági %/
0,025	25,25	1,4122
0,050	37,76	1,5775
0,075	42,87	1,6325
0,100	53,36	1,7275
0,250	64,21	1,8075
0,500	57,11	1,7566



11. ábra

szén 0,1 M alkilezőszer koncentrációig a koncentráció lineáris függvénye.

A 12. ábra az öt bifunkciós vegyület renaturálhatósági értékeit ábrázolja a reakcióidő ill. az alkilezőszer koncentráció /L-DB/ függvényében.



12. ábra

Az ábrából látható, hogy a reakció előrehaladtával a két szálát összekötő, kétszeres alkilezési reakció is jelentősen előrehalad, majd az erősebben keresztköttő vegyületek esetén egy lapos maximum után a görbe csökkenni kezd. Ennek oka a depurináció. A depurinációs folyamatok

természetesen már rögtön az alkilezés ill. a keresztkötéses alkilezés után megindulnak, azonban sebességük itt még kicsi. Az alkilezés előrehaladtával azonban ez is növekszik, és bizonyos idő után sebessége meghaladja az alkilezés ill. a keresztkötési reakciók sebességét. A bisz-guanil származékok kihaladási folyamatának előtérbe kerülése okozza az értékek csökkenését. Mind a renaturálódás, mind a depurináció sebessége nagy mértékben függ az alkilezőszertől.

A 12. táblázat az öt bifunkciós vegyülettel alkilezett DNS templáton végbemenő RNS szintézis adatait tartalmazza az alkilezési reakció idejének függvényében.

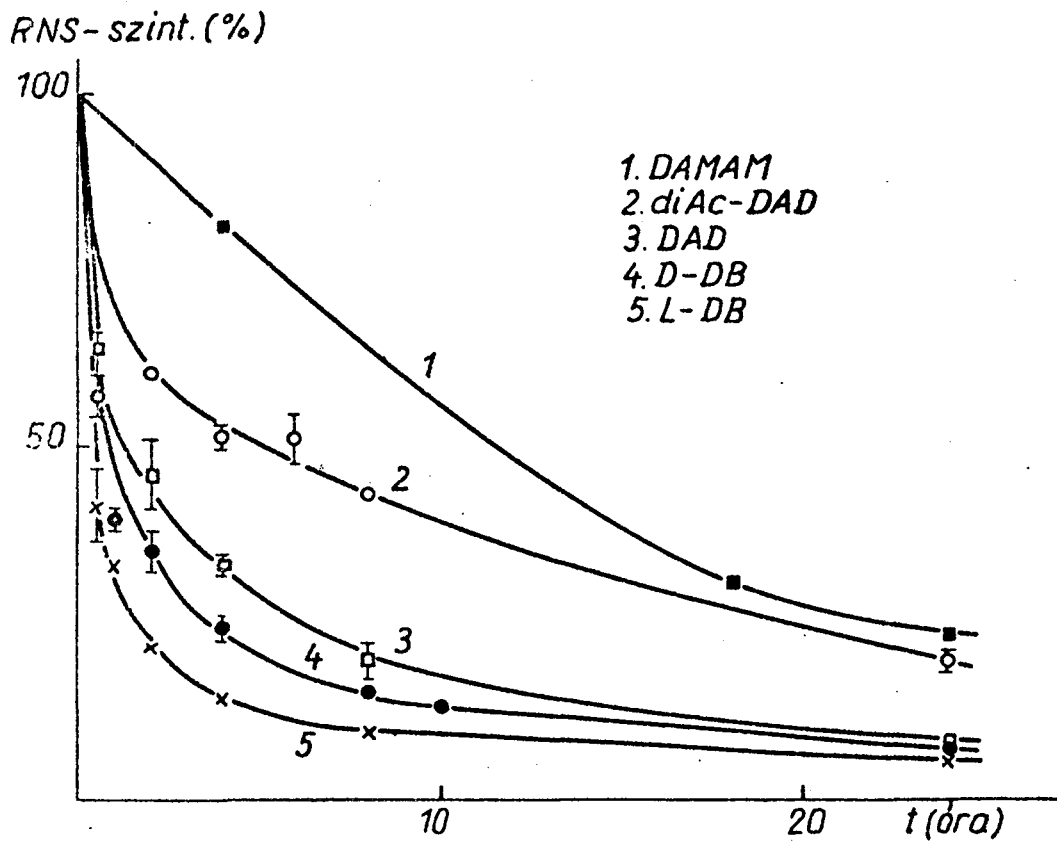
12. táblázat

Reakció-idő /óra/	RNS szintézis /%/				
	L-DB	D-DB	DAD	diAc-DAD	DAMAM
0,5	41,58 \pm 5,1	64,16 \pm 1,8	57,1 \pm 2,7	-	-
1,0	33,32 \pm 0,4	39,34 \pm 1,4	-	-	-
2,0	21,44 \pm 1,2	35,06 \pm 3,0	46,1 \pm 5,1	59,7	-
4,0	14,65 \pm 0,5	23,77 \pm 1,4	33,1 \pm 1,5	50,8 \pm 1,3	80,9 \pm 0,9
6,0	-	-	-	51,1 \pm 3,5	-
8,0	9,64 \pm 0,4	14,95 \pm 0,6	19,4 \pm 2,6	42,9	-
10,0	-	13,30 \pm 0,6	-	-	-
18,0	-	-	-	-	30,4 \pm 0,4
24,0	5,12 \pm 0,1	6,72 \pm 0,5	8,3 \pm 0,2	19,2 \pm 1,6	23,0 \pm 0,4

/Az enzimatis RNS szintézis reakcióideje 150 perc volt./
A táblázat minden adatát a savoldható makromolekulába beépült ¹⁴C-UMP radioaktivitási értékeiből számoltuk, és

a natív, nem alkilezett DNS-en végbement RNS szintézis százalékában adtuk meg, ez utóbbit 100 %-nak véve.

A 13. ábra a 12. táblázat adatait ábrázolja. Az alkilezés előrehaladtával az RNS szintézis sebességének csökkenése minden alkilezőszerrel alkilezett DNS templát esetén megfigyelhető. A görbe lefutása jelentősen függ az al-

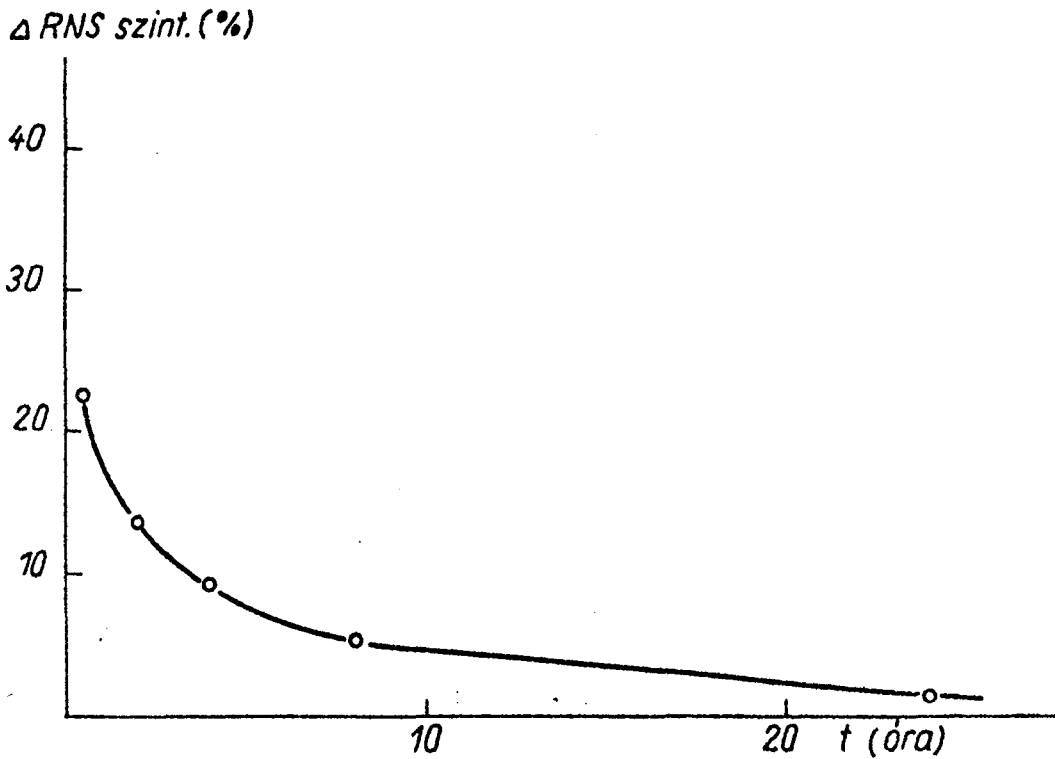


13. ábra

alkilezőszertől, 24 órás reakció után azonban már minden érték 25 % alatt van. A legmeredekebb az L-DB görbéje, és 24 órás reakció után az eredeti templát aktivitásnak

csak 5,12 %-a marad meg. Legkevésbé meredek a DAMAM-mal alkilezett DNS görbéje, de 24 óra alkilezés után már itt is csak 23 %-a marad meg a natív DNS templát aktivitásának.

Az L- és a D-DB között a renaturálhatósági százalékokban kezdetben meglévő különbség /0,5 óránál 14,18 %/ a reakcióidő függvényében fokozatosan csökken /24 óránál 9,4 %/ /12. ábra/. Hasonlóképpen az RNS szintézis gátlásában a 0,5 óránál meglévő 22,58 % különbség 24 óránál 1,6 %-ra csökken. A csökkenés itt exponenciális, eltérően a renaturálhatósági % értékeiben meglévő különbség csökkenésétől: 14. ábra.



14. ábra

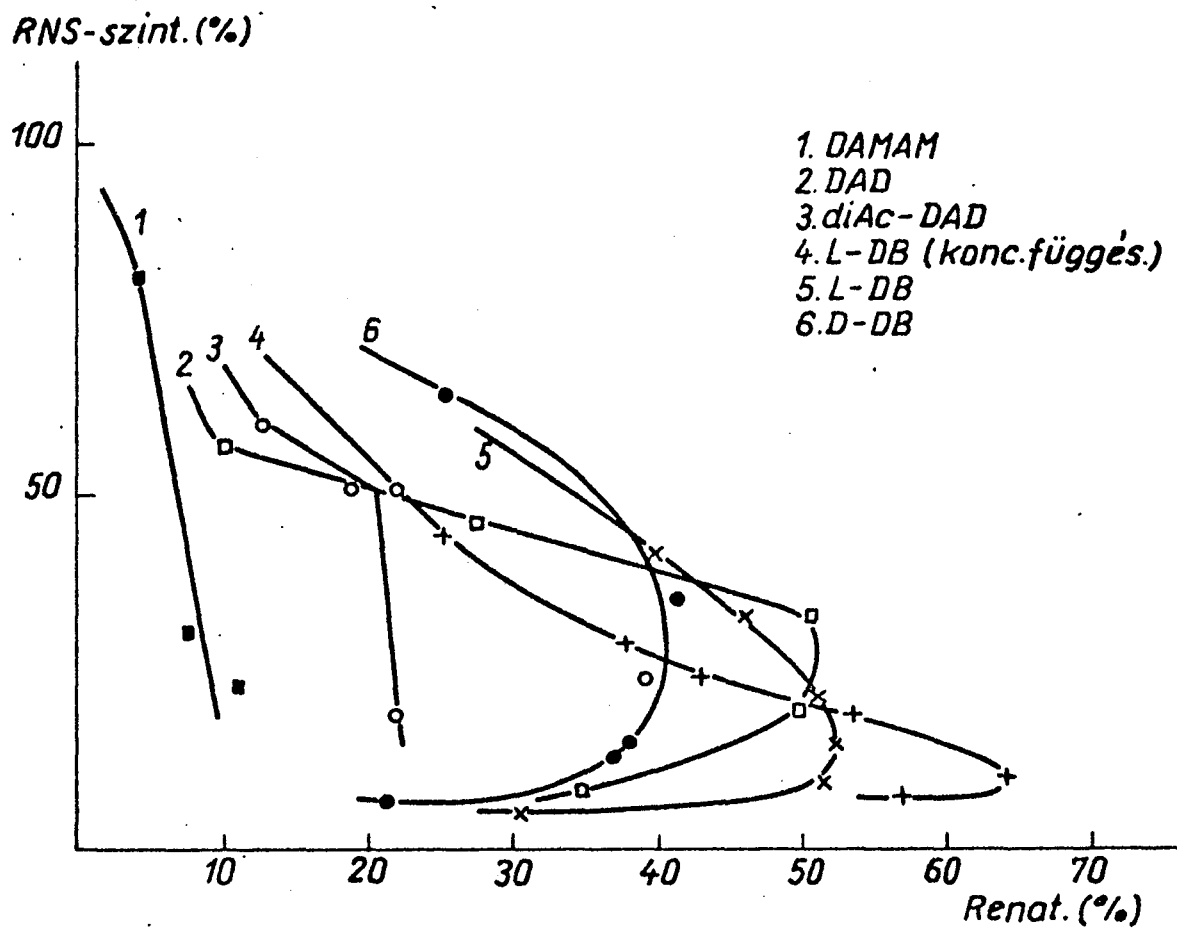
A keresztkötéseket nagyobb százalékban létrehozó L-DB a templát aktivitást is jobban csökkenti. Hogy 24 óránál majdnem azonos hatásuak, az okozhatja, hogy meghatározott számú alkilezés v. keresztkötés és depurináció ill. degradáció ill. ezek kombinációi elegendőek a majdnem teljes inhibícióhoz. Az ilyen hatást pedig a kisebb keresztkötő képességű D-DB is elérheti.

A renaturálhatóságban a DAD és az L-DB között 0,5 óránál meglévő közel 30 % különbség 4 órás reakció után már csak mintegy 2 %, a későbbiekben pedig a két vegyület görbéje együtt fut, ill. metszik is egymást. Ennek ellenére a DAD sehol sem, még 24 óránál sem csökkenti annyira az RNS szintézis sebességét, mint az L-DB, sőt még a D-DB görbéjét sem éri el. Az eltérés 24 óránál nem nagy, de megvan, kb. 3 %. A jelenség magyarázata az, hogy az L-DB és a D-DB esetén is a depurinálódás sebessége jóval nagyobb a négy C-atomos lánc miatt, mint a hat C-atomos DAD-nál¹⁵⁷. A depurinálódás, ill. az azt követő degradáció pedig valószínűleg épp olyan jelentős a templát funkció szempontjából, mint a keresztkötéses alkilezés.

A három hexit, a DAD, a diAc-DAD és a DAMAM renaturálhatósági értékeinek aránya hasonlóképpen, mint a sztereoizomer diepoxi-butánoknál, összefüggésbe hozható a templát aktivitás gátlás arányaival /24 órás reakció után a DAD 34,6 %, a diAc-DAD 21,8 % és a DAMAM 11 % renaturálhatóságot hoz létre. A templát aktivitást pedig 8,3, 19,2 ill. 23 %-ra csökkentik le./

A diepoxi vegyületek egy-egy típusán belül /butánepoxidok, hat C-atomosak/ a renaturálhatósági értékekből tehát következtetni lehet az RNS szintézist gátló hatására. A csoportok összehasonlításánál azonban már a hatásmechanizmust is figyelembe kell venni.

A 15. ábra a renaturálhatósági értékek /12. ábra ordinátája/ függvényében ábrázolja az RNS szintézis százalékot /13. ábra ordinátája/.



15. ábra

Az ábrából az alábbi következtetések vonhatók le:
1./ A nagy reakcióidőkhöz tartozó renaturálhatósági %-ok csökkenése miatt /12.ábra/ a görbék visszahajlanak. Ez

azt jelenti, hogy a renaturálhatósági % csökkenése nem állítja vissza az eredeti templát aktivitást, vagyis a depurináció és az azt követő degradációs folyamatok RNS szintézisre való hatását emelik ki. 2./ Egy adott renaturálhatósági %-hoz nem tartoznak azonos RNS szintézis %-ok különböző alkilezőszerrel alkilezett templátokon, sőt még az azonos alkilezőszerrel, különböző körülmények között alkilált templáton sem. Pl. 45 % renaturálhatóságnál az L-DB reakcióidő függvényében felvett görbén 34 %-os, míg az alkilezőszer koncentrációja függvényében felvett görbén 23 %-os RNS szintézis tartozik. Ez a monoalkilezési és a másodlagos folyamatok RNS szintézisre való hatását emeli ki. 3./ Az L-DB-vel kétféleképpen felvett görbén lévő azonossági pont /0,1 M alkilezőszer koncentráció és 2 órás alkilezési reakcióidő mindkét esetben előfordult/ az ismételt mérések hibáját ill. pontosságát mutatja meg: renaturálhatósági értékekben 2,36 %, RNS szintézisben pedig 2,26 % az eltérés.

A további kísérletekben a monoalkilálás hatását vizsgáltuk. A 13. táblázat két monofunkciós alkilezőszer, az etilénoxid és az epoxi-propanol templát funkcióra való hatását mutatja.

A 16. ábra az EO-val alkilezett DNS templát aktivitását mutatja be a már korábban ábrázolt diepoxi-butánok görbéjével együtt, mivel az EO egy fél DB-nek felel meg.

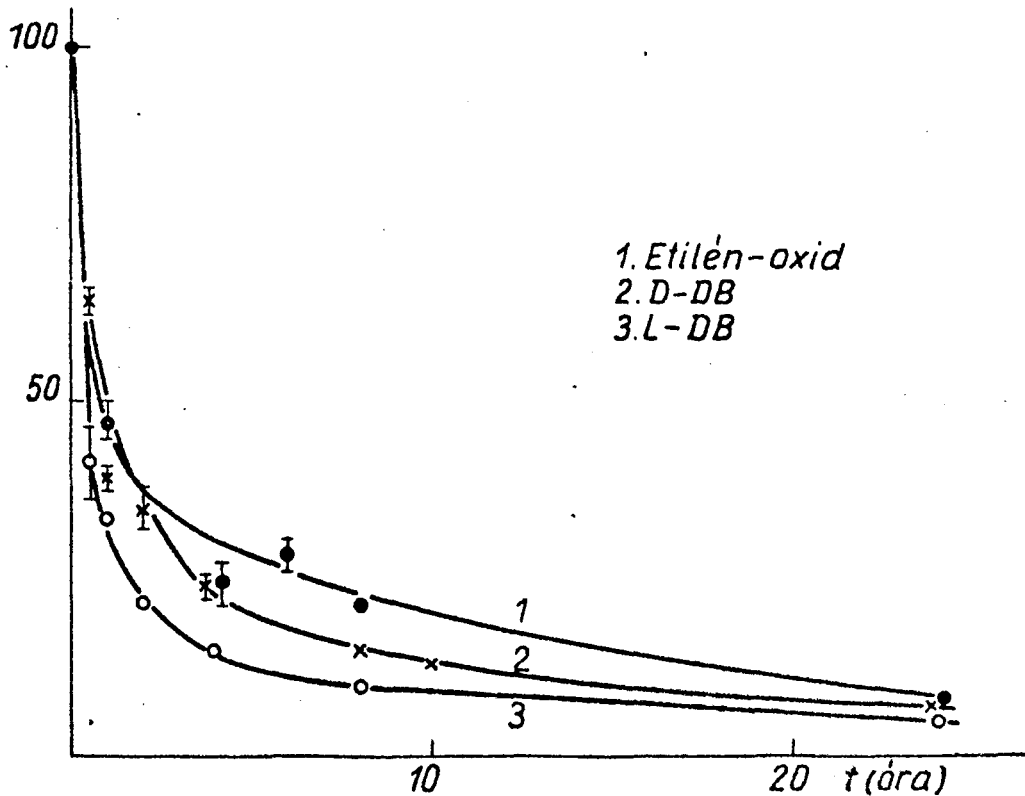
Habár a pontok szórása nagyobb, mégis látszik, hogy nincs nagyságrendi eltérés az analóg mono- és difunkciós vegyületek azonos koncentrációival alkilezett DNS-eken végbemenő RNS szintézis sebesség között, sőt 24 óránál a különbség már minimális. Ez csak úgy lehetséges, hogy a monoalkilezésnél is pontosan úgy lejátszódik minden, az alkilezést követő másodlagos folyamat.

10 órás reakciónál a D-DB-vel alkilezett DNS-en az RNS szintézis sebessége 13 %-ra csökkent /87 %-os gátlás/,

13. táblázat

Reakcióidő /óra/	RNS szintézis /%/	
	EO	DL-EP
1	47,2 ± 2,8	-
2	-	61,37 ± 2,8
4	24,3 ± 3,1	49,72 ± 3,9
6	28,3 ± 1,9	-
7,55	-	37,87 ± 0,4
8	21,3 ± 0,8	-
18	-	19,82 ± 0,6
23,1	-	13,20 ± 0,4
24	8,2 ± 0,4	-

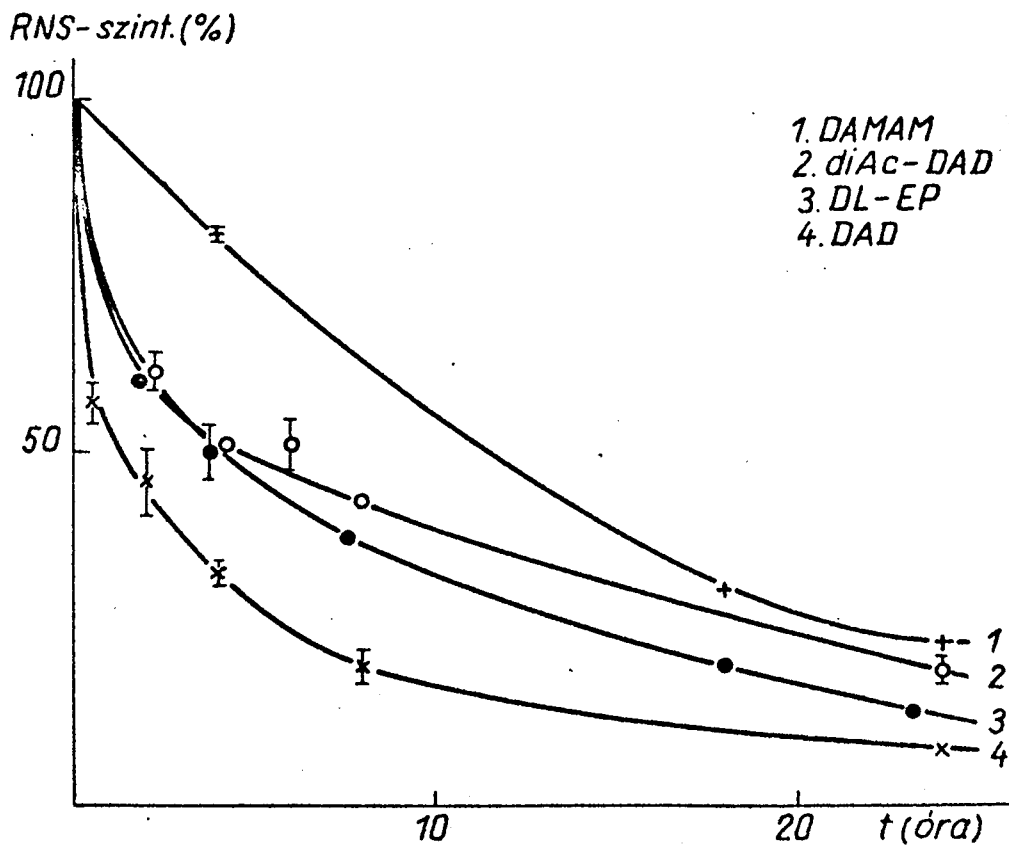
RNS-szint. (%)



16. ábra

mig az EO-nál 20 %-ra /80 %-os gátlás/. A köztük lévő 7 %-os különbség /az egész gátlás 8,05 %-a/ származik csak tehát a bifunkciós alkilezéstől, azaz a keresztkötés miatti iniciálás inhibíciótól, valamint a kettős depurináció ill. az azt követő azonnali molsúlycsökkenéstől. A monofunkciós alkilezés okozta 80 %-os szintézis inhibíció pedig a monoalkilezés és az azt követő depurinálódás ill. degradálódás következménye.

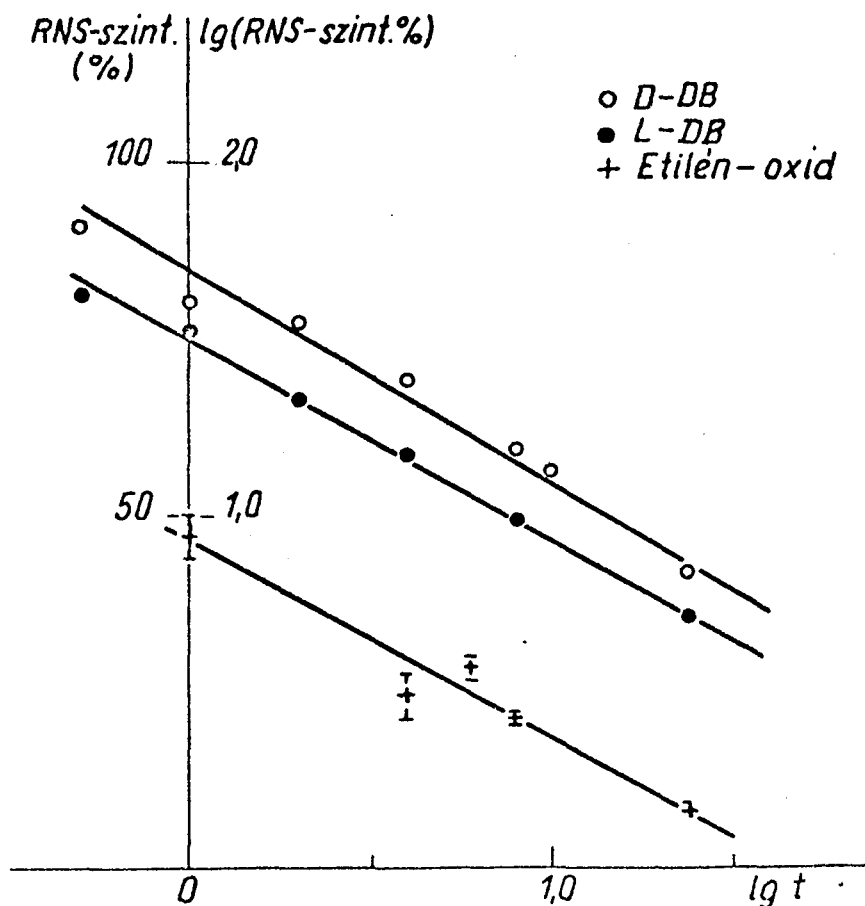
A 17. ábra a DL-EP-vel alkilezett templáton végbeménő RNS szintézis alkilezési idő függvényét mutatja be a már említett hexitek görbéjével együtt /az EP a DAD molekula fele/.



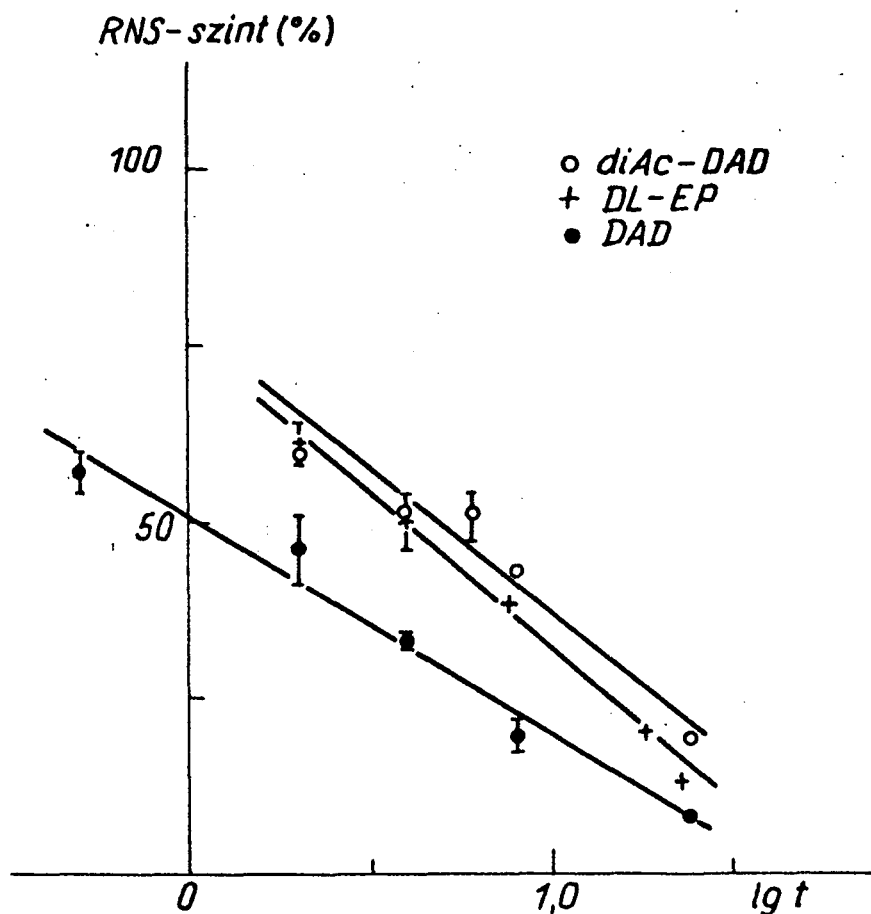
17. ábra

A DAD és az EP-vel alkilezett DNS görbéi között hasonló fokú különbség van, mint a 16. ábrán az EO és a DB között. Abból viszont, hogy az EP, amely egyáltalán nem hoz létre keresztkötést, csak monoalkilezést, és mégis jobban csökkenti a templát aktivitást, mint a keresztkötést 24 óránál 10 ill. 20 %-ban létrehozó DAMAM ill. di-AcDAD, az következik, hogy az acilezett diepoxi vegyületeknél nemcsak a keresztkötéses alkilezés, hanem a monoalkilezési reakció is kisebb mértékű a térbeli gátlás miatt.

A 16. és 17. ábra görbéinek pontosabb elemzését teszi lehetővé az a tény, hogy a görbék adatainak kétszeres ill. fél logaritmikus ábrázolása egyenest eredményez. Ezt mutatja a 18. és 19. ábra.



18. ábra



19. ábra

Az L- és a D-DB esetében mindkét paraméter kétszeres logaritmusos ábrázolása ad egyenest, míg a többi esetben az RNS szintézis % - $\lg t$ függvény. A különbség oka a hatásmechanizmusból adódik: a diepoxi-butánok esetén a nagyfokú depurinálódás miatt nagyobb mértékben csökken a templát aktivitás, mint a többi vegyülettel alkilezett templát esetén, így a görbék lefutása is minőségileg különböző.

Az egyenesek lehetővé teszik az RNS szintézis mértékének kiszámítását kisebb és nagyobb reakcióidők esetén, és természetesen a folyamat egyenlet formájában történő

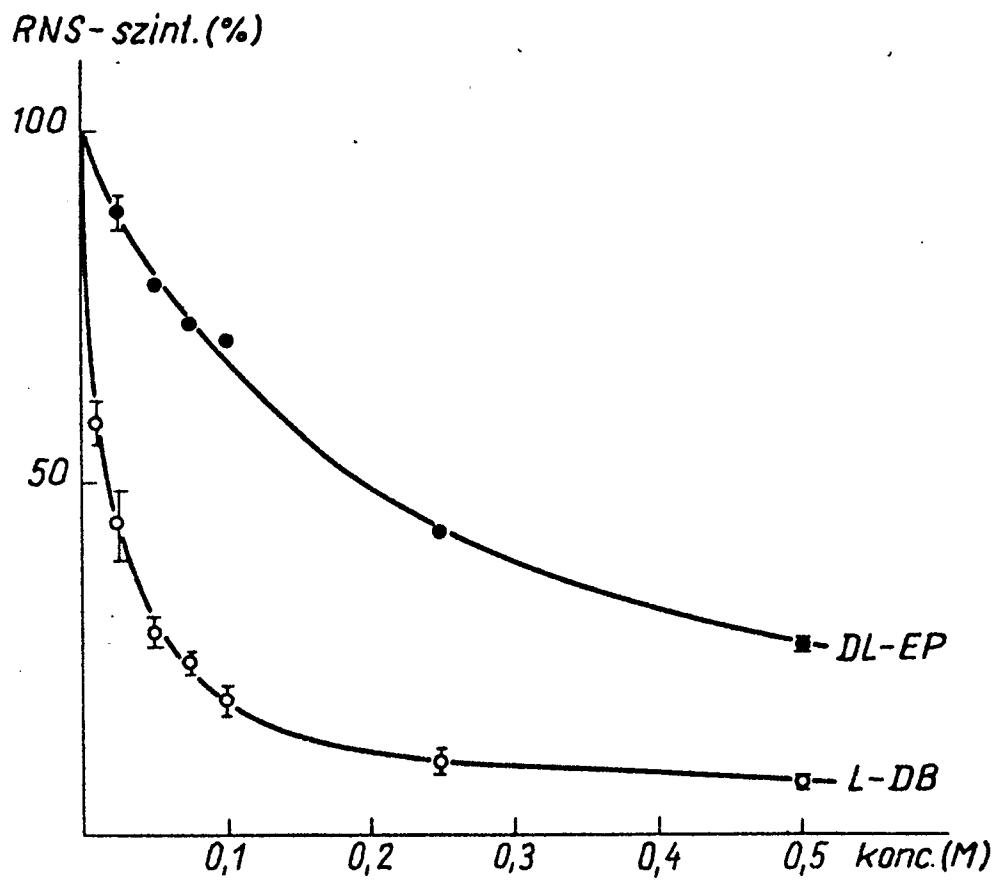
leírását.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogyan folyik az RNS szintézis olyan templáton, amelynek alkilezése különböző alkilezőszer koncentrációk mellett történik. A vizsgált alkilezőszerek az L-DB és a DL-EP voltak. Az alkilezési reakcióidő minden esetben 2 óra volt. A mérési eredményeket a 14. táblázat tartalmazza.

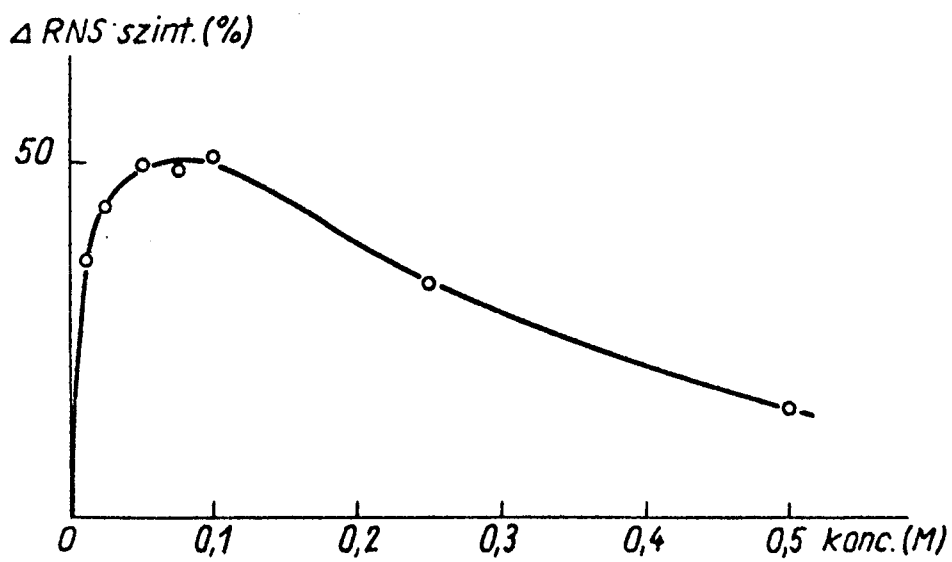
14. táblázat

Alkilezőszer koncentráció /M/	RNS szintézis %	
	L-DB	DL-EP
0,010	58,40 ± 3,3	-
0,025	44,28 ± 5,1	88,48 ± 2,8
0,050	28,83 ± 2,0	78,40
0,075	24,30 ± 1,4	72,38
0,100	19,18 ± 2,1	69,86 ± 0,06
0,250	10,35 ± 0,7	43,16 ± 0,36
0,500	7,38 ± 0,5	22,67 ± 1,1

Mindkét alkilezőszerrel alkilezett DNS templát aktivitása jelentős mértékben csökken az alkilezőszer koncentráció növekedésével: 20. ábra. A görbék lefutása hasonló jellegű, mint az alkilezési idő függvényében felvett görbéké. A mono- és bifunkciós vegyülettel alkilezett templát görbéjének lefutása azonban eltérő meredekségű. A köztük lévő különbség a 21. ábrán látható.

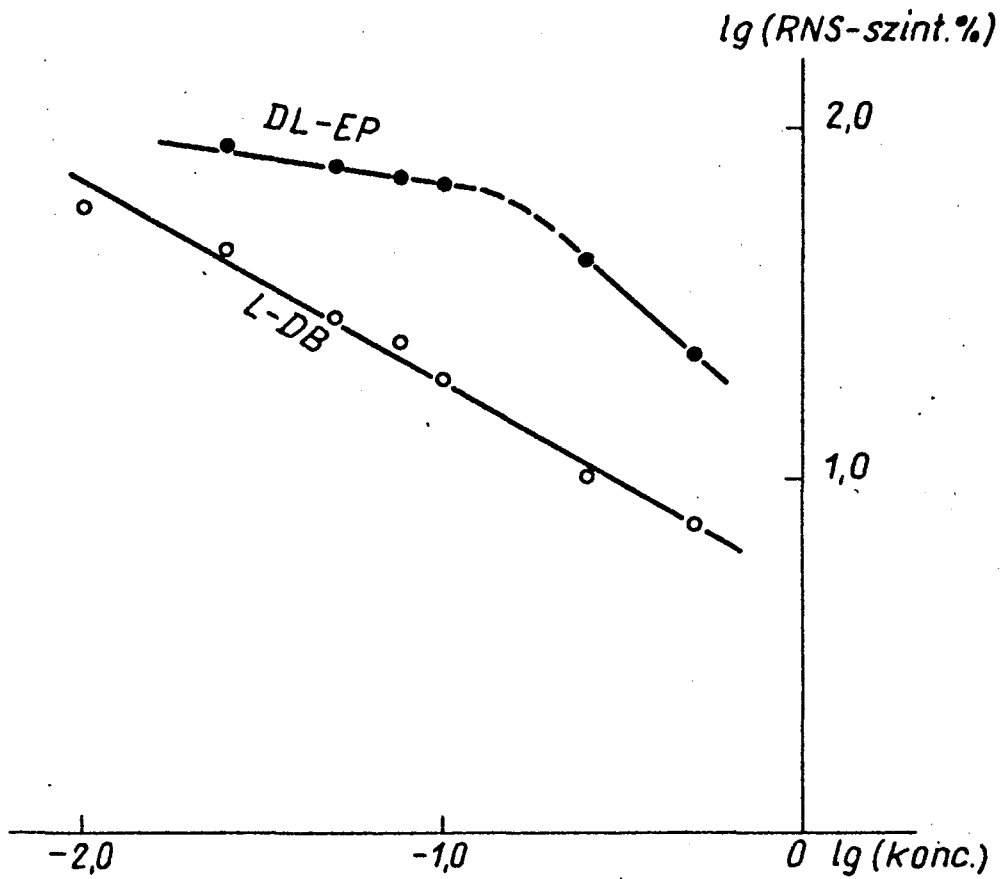


20. ábra



21. ábra

A 22. ábrán az RNS szintézis % logaritmusát ábrázoltuk az alkilezőszer koncentráció logaritmusának függvényében.



22. ábra

Az L-DB adatai jó közelítéssel egyenest adnak, míg a DL-EP kis alkilezőszer koncentrációihoz tartozó lg/RNS szintézis %/ értékeiből húzható egyenes. Ez a grafikus ábrázolás, ill. a változás egyenlettel való leírása a kis alkilezőszer koncentrációk hatására bekövetkező templát aktivitás változás kiszámítását teszi lehetővé.

5. Összefoglalás

I. A polimetilén-diaminok közül a pentametilén-diamin stabilizálja legnagyobb mértékben a csirkevérből izolált DNS dupla hélix szerkezetét, hődenaturációs mérések alapján.

- 1./ A pentametilén sorban az 1-helyettesített származékok közül a karboximetil, -etil és -izopropil vegyületek mintegy 50 %-ára, a karboxil származékok pedig 5 %-ára csökkentik a pentametilén-diamin stabilitás növelő effektusát.
- 2./ A sztereoisomer lizin és észtereinek vizsgálatából arra következtethetünk, hogy a DNS és az alifás diaminok kölcsönhatásában a konfigurációnak nincs lényeges szerepe.
- 3./ A pentametilén-diamin effektusát is felülmúlja a hexametilén-diamin-2,3,4,5-tetrahidroxil származéka mannit konfigurációjú izomerjének hatása.

II.A. Hődenaturációs vizsgálatok alapján a bázikus dipeptidek és a DNS közötti kölcsönhatás az alábbiak szerint összegezhető:

- 1./ A kölcsönhatás eredménye minden esetben a DNS hőstabilitásának növekedése.
- 2./ A konfigurációnak lényegesebb szerepe van a stabilizációban, mint alifás diaminok esetén.
- 3./ A lizil-dipeptidek mindig nagyobb effektust adnak, mint az azonos koncentrációjú ornitil-dipeptidek.
- 4./ A kölcsönhatás specificitásához az aromás oldalláncok is hozzájárulnak: az analóg triptofán- és tirozil-dipeptidek közül a triptofánt tartalmazók stabilizálnak nagyobb mértékben. Oka az interkalációs effektus.

B. A bázikus aminosavakat szerinre cserélve a dipeptidok minden effektusa megváltozik.

- 1./ A stabilizáció rendkívül kis mértékű és
- 2./ a dipeptid koncentráció növekedésével destabilizáció lép fel.
- 3./ Habár a konfiguráció hatása kimutatható, a különbség kicsi.
- 4./ A triptofánt és tirozint tartalmazó peptidok hatása közötti különbség csak nagyobb peptid koncentrációk esetén nyilvánul meg.

III. Az alifás diaminok hatással vannak az in vitro enzim katalizálta RNS szintézisre. A tiszta dikation szerkezetű vegyületek RNS szintézist stimuláló hatása összefüggésbe hozható a DNS-t stabilizáló hatásukkal.

IV. Az epoxi vegyületekkel alkilezett DNS templát aktivitása enzim katalizálta in vitro RNS szintézisben jelentősen csökken az alkilezési reakció előrehaladtával.

- 1./ A csökkenés mértéke függ az epoxi vegyület szerkezetétől.
- 2./ Az analóg mono- és diepoxidok hatása között nincs lényeges különbség.
- 3./ A diepoxidok esetén lényeges faktor a szénlánc hossza, valamint a szubsztitúció.
- 4./ Azonos szénatomszámú diepoxidokkal alkilezett DNS-ek renaturálhatósági értékeiből következtetni lehet az in vitro RNS szintézist inhibáló hatásra.

6. Irodalomjegyzék

1. S. Lazurkin, M.D. Frank-Kamenetskij, E.N. Trifonov:
Biopolymers 9, 1253 /1970/
2. A.E. Pegg, A. Hawks: Biochem. J. 122, 120 /1971/
3. H. DeVoe, I. Tinoco: J. Mol. Biol. 4, 518 /1962/
4. J. Marmur, R. Rownd, C.L. Schildkraut: J. N. Davidson,
W.E. Cohn, Progress in Nucleic Acid Res., Vol.1,
231. o. /1963/, Acad. Press, New York, London
5. J. Marmur, P. Doty: Nature 183, 1427 /1959/
6. P. Doty, H. Boedtker, J.R. Fraser, R. Haselkorn,
M. Litt: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45, 482 /1959/
7. R. Thomas: Soc. Chim. Biol. Bull. 35, 609 /1953/
8. S.A. Rice, P. Doty: J. Am. Chem. Soc. 79, 3937 /1957/
9. R.M. Wartell, E.W. Montroll: Advances in Chem.
Physics, Vol.22, 129. o. /1972/, John Wiley and
Sons Inc.
10. S. Lazurkin és munkatársai: Biopolymers 9, 1253
/1970/
11. H. Fritzsche: Biochim. Biophys. Acta 228, 344 /1971/
12. H. Fritzsche: Zeitsch. Chem. 12, 1 /1972/
13. M. Mandel, J. Marmur: S.P. Colowick, N. O. Kaplan,
Methods in Enzymol., Vol. XII/B, 203. o. /1968/,
Acad. Press, New York, London
14. Ibid. 200. o.
15. H. Klump: Biopolymers 11, 2331 /1973/
16. J. Marmur, R. Rownd, C.L. Schildkraut: J.N. Davidson,
W.E. Cohn, Prog. in Nucleic Acid Res., Vol. 1,
260. o. /1963/, Acad. Press, New York, London
17. J. Marmur, P. Doty: J. Mol. Biol. 5, 109 /1962/
18. M. Mandel: J. Mol. Biol. 5, 435 /1962/
19. C. Schildkraut, S. Lifson: Biopolymers 3, 195 /1965/

20. M. Nagasawa, Y. Muroga: Biopolymers 11, 461 /1972/
21. C. Zimmer, H. Venner: Naturwiss. 49, 86 /1962/
22. K. Hamaguchi, E.P. Geiduschek: J. Am. Chem. Soc. 84, 1329 /1962/
23. C. Zimmer: Zeitsch. Chem. 11, 441 /1971/
24. M. Edelman és mtsai: Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 208 /1971/
25. R. Wells, R. Sager: J. Mol. Biol. 58, 611 /1971/
26. T. Huguet, L. Jouanin: Biochim. Biophys. Acta 262, 431 /1972/
27. H.J. Li: Biopolymers 11, 835 /1972/
28. M.D. Knittel és mtsai: Can. J. Microbiol. 14, 239 /1968/
29. A.D. Hershey: Virology 4, 237 /1957/
30. B. Ames, D.T. Dubin, S.M. Rosenthal: Science 127, 814 /1958/
31. D. Fraser, H.R. Mahler: J. Am. Chem. Soc. 80, 6456 /1958/
32. H. Tabor: Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 382 /1960/
33. S. Razin, R. Rozansky: Arch. Biochem. Biophys. 81, 36 /1959/
34. S.S. Cohen: Introduction to the Polyamines, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, /1971/
35. L. Stevens: Biol. Rev. 45, 1 /1970/
36. T.A. Smith: Endeavour 31/112, 22 /1972/
37. D.T. Dubin, S.M. Rosenthal: J. Biol. Chem. 235, 776 /1960/
38. R. Rometsch és mtsai: Helv. Chim. Acta 34, 1611 /1951/
39. S.Z. Hirschman, N. Leng, G. Felsenfeld: Biopolymers 5, 227 /1967/
40. H. Tabor, C.W. Tabor: Pharmac. Rev. 16, 245 /1964/
41. H.R. Mahler, B.D. Mehrotra: Biochim. Biophys. Acta 55, 252 /1962/
42. D. Fraser, H.R. Mahler: J. Am. Chem. Soc. 80, 6956 /1958/

43. H.R. Mahler, B.D. Mehrotra, C.W. Sharp: Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 79 /1961/
44. D. Fraser, H.R. Mahler: Biochem. Biophys. Acta 53, 199 /1961/
45. H.R. Mahler, B.D. Mehrotra: Ibid. 68, 211 /1963/
46. H. Tabor: Biochemistry 1, 496 /1962/
47. E.J. Gabbay, R. Kleinman, R.R. Shimshak: J. Am. Chem. Soc. 90, 1927 /1968/
48. B.D. Mehrotra, H.R. Mahler: Biochim. Biophys Acta 91, 78 /1964/
49. H. Venner, C. Zimmer, S. Schröder: Ibid. 76, 312 /1963/
50. P. Horacek, I.J. Cernohorsky: Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 956 /1968/
51. E.J. Gabbay: Biochemistry 5, 3036 /1966/
52. E.J. Gabbay: Biopolymers 5, 727 /1967/
53. R. Glaser, E.J. Gabbay: ibid. 6, 243 /1968/
54. E.J. Gabbay, R.R. Shimshak: ibid. 6, 255 /1968/
55. E.J. Gabbay, R. Kleinman: J. Am. Chem. Soc. 89, 7123 /1967/
56. E.J. Gabbay, R. Kleinman, R.R. Shimshak: Biopolymers 6, 993 /1968/
57. E.J. Gabbay: J. Am. Chem. Soc. 90, 5257 /1968/
58. E.J. Gabbay, R. Glaser: Biochim. Biophys. Acta 224, 272 /1970/
59. L. Stevens, A. Heaton: Experientia 28, 785 /1972/
60. W. Szer: Annal. New York Acad. Sci. 171, 801 /1970/
61. M. Tsuboi: Bull. Chem. Soc. Japan 37, 1514 /1964/
62. A.M. Liquori és mtsai: J. Mol. Biol. 24, 113 /1967/
63. M. Suwalsky és mtsai: ibid. 42, 363 /1969/
64. D. Heby, I. Agrell: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 29 /1971/
65. D. Heby, I. Agrell: ibid. 352, 39 /1971/
66. I.F. Iarionov: R.I.C. Harris, Biol. Approaches to Cancer Chemotherapy, 139. o. /1961/, Acad. Press, N.Y.

67. F. Bergel és mtsai: R.I.C. Harris, Biol. Approaches to Cancer Chemotherapy, 125. o. /1961/, Acad. Press, New York
68. M. Szekerke, J. Császár, V. Bruckner: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 46, 379 /1965/
69. M. Szekerke, R. Wade, F. Bergel: J. Chem. Soc. /1965/, 1907
70. M. Szekerke, R. Wade, F. Bergel: J. Chem. Soc. /C/, /1968/, 1792
71. P.E. Brown: Biochim. Biophys. Acta 213, 282 /1970/
72. T. Ierman: J. Mol. Biol. 3, 18 /1961/
73. M. Waring: ibid. 54, 247 /1970/
74. C. Helene: Nature N. B. 234, 120 /1971/
75. R.L. Novak, J. Dohnal: ibid. 243, 155 /1973/
76. C. Helene, T. Montenay-Garestier, J.L. Dimicoli: Biochim. Biophys. Acta 254, 349 /1971/
77. C. Helene, J.L. Dimicoli: FEBS Letters, 26, 6 /1972/
78. I. Pilz, O. Kratky, D. Rabussay: Eur. J. Biochem. 28, 205 /1972/
79. J. Hurwitz: The Harvey Lectures, Ser. 64, 157. o. /1969/, Acad. Press, New York, London
80. J.P. Richardson: J.N. Davidson, W.E. Cohn, Progress in Nucleic Acid Res. Mol. Biol. Vol. 9, 75. o. /1969/, Acad. Press, New York, London
81. B.H. Nicholson: Biochem. J. 123, 117 /1971/
82. W. Zillig és mtsai: Annals N. Y. Acad. Sci. 171, 910 /1970/
83. J.I. Sirlin: Biology of RNA, Acad. Press, New York, London /1972/
84. D.A. Goldthwait: Lepetit Colloq. on Biol. and Medic.: 1. RNA Polymerase and Transcription, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, London /1970/, 10. o.
85. S.K. Niyogi: J. Mol. Biol. 64, 609 /1972/

86. C. Pitra, W. Malz: Stud. Biophys. 27, 67 /1971/
87. A.E. Gato, O.W. Jones: Biochim. Biophys. Acta 262,
154 /1972/
88. M.W. Taylor és mtsai: J. Mol. Biol. 33, 809 /1968/
89. D.C. Hinkle, J. Rind, M.J. Chamberlin: ibid. 70,
197 /1972/
90. K. Müller: Mol. Gen. Genet. 111, 273 /1971/
91. W. Zillig és mtsai: Annals N.Y. Acad. Sci. 171, 912
/1970/
92. J.M. Saucier, J.C. Wang: Nature N.B. 239, 167 /1972/
93. P.A. Riley: ibid. 228, 519 /1970/
94. A. Travers, D. Baillie, S. Pederson: ibid. 243, 161
/1973/
95. D. Drahovsky, N.R. Morris: J. Mol. Biol. 57, 475
/1971/
96. A. Sentenac, P. Fromageot: 20. Colloq. der Gesellsch.
für Biol. Chem. /1969/, Moschbach/Baden, 64. o.
97. A.G. So, K.M. Downey: Biochemistry 9, 4788 /1970/
98. J.L. Darlix, P. Fromageot: Biochimie 54, 47 /1972/
99. J.L. Darlix, P. Fromageot: ibid. 54, 59. /1972/
100. J.S. Beckmann és mtsai: Biochem. Biophys. Res. Comm.
43, 806 /1971/
101. U. Maitra: ibid. 41, 1255 /1970/
102. D.A. Smith, A.M. Martinez, R.L. Ratliff: J. Mol. Biol.
60, 395 /1971/
103. P.R. Clark, P. Byvoet: Experientia 26, 725 /1970/
104. T.Y. Shik, J. Bonner: J. Mol. Biol. 50, 333 /1970/
105. U. Iill és mtsai: 20. Colloq. der Gesellsch. für
Biol. Chem. /1969/, Moschbach/Baden, 48. o.
106. J. Sümegi, T. Sanner, A. Pihl: Int. J. Radiat. Biol.
20, 397 /1971/
107. J. Sümegi, T. Sanner, A. Pihl: FEBS Letters 16, 125
/1971/

108. M.C. Scrutton, C.W. Wiz, D.A. Goldthwait: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 2497 /1971/
109. J.S. Krakow: Biochim. Biophys. Acta 72, 566 /1963/
110. E.N. Brewer: Exptl. Cell. Res. 72, 586 /1972/
111. A. Raina, J. Jänne: Fed. Proc. 29, 1568 /1970/
112. A.E. Pegg: Biochim. Biophys. Acta 232, 630 /1971/
113. B. Hacker, B.J. McDerwott: Physiol. Chem. Phys. 4, 41 /1972/
114. K. Igarashi, K. Matsuzaki, Y. Takeda: Biochim. Biophys. Acta 254, 91 /1971/
115. K. Igarashi, K. Matsuzaki, Y. Takeda: ibid. 262, 476 /1972/
116. A. Pastuszyn, R.B. Loftfield: Biochem Biophys. Res. Comm. 47, 775 /1972/
117. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 11, 69 /1970/
118. P.E. Duffy, E. Defendini, L.T. Kremmer: Neuropath. and Exp. Neurol. 30, 698 /1971/
119. J. Chin, S.C. Sung: Biochim. Biophys. Acta 281, 535 /1972/
120. D.H. Russel: Nature N. B. 233, 144 /1971/
121. B. Barbiroli, C.M. Caldarera: Biochem. J. 123, 123 /1971/
122. D.H. Russel, J.B. Lombardini: Biochim. Biophys. Acta 240, 273 /1971/
123. C.F. Fox, R.I. Gumpport, S.B. Weiss: J. Biol. Chem. 240, 2101 /1965/
124. E. Fuchs, G. Walter: Eur. J. Biochem. 3, 183 /1967/
125. K.A. Abraham: ibid. 5, 143 /1968/
126. E.E. Petersen, H. Kröger: Z. Naturforsch. 25 b, 1042 /1970/
127. R.F. Gumpport, S.B. Weiss: Biochemistry 8, 3618 /1969/
128. E.E. Petersen, H. Kröger, U. Hagen: Biochim. Biophys. Acta 161, 325 /1968/

129. S. Mitra, P. Kaestery: Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 146 /1963/
130. S. Mitra, P. Kaestery: J. Mol. Biol. 14, 558 /1965/
131. J. Goldstein: Biochim. Biophys. Acta 123, 620 /1966/
132. D.T. Elmore, J.M. Gulland, D.O. Jordan, H.F.W. Taylor: Biochem. J. 42, 308 /1948/
133. P. Alexander: Nature 169, 226 /1952/
134. P. Brookes, P.D. Lawley: Biochem. J. 77, 478 /1960/
135. T. Reiner, S. Zamenhof: J. Biol. Chem. 228, 475 /1957/
136. P. Alexander és mtsai: Proc. Intern. Congr. Biochem., 4th Congr., Symp. IX. 98 /1959/
137. R.J. Rutman, E.H. L. Chun, J. Jones: Biochim. Biophys. Acta 174, 663 /1969/
138. K.W. Kohn, C.L. Spears: ibid. 145, 734 /1967/
139. Z.M. Bacq: Fundamentals of Biochemical Pharmacology, 461. o. /1971/, Pergamon Press, Oxford, New York
140. P.D. Lawley: J.N. Davidson, W. Cohn, Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. Vol. 5, 89. o. /1967/, Acad. Press, New York, London
141. P. Brookes: Chemother. Cancer, Proc. Intern. Symp., Lugano, Switz. /1964/, 32. o.
142. J. Ramstein, C. Helene, M. Leng: Eur. J. Biochem. 21, 125 /1971/
143. D.C. Livingstone: Biochim. Biophys. Acta 186, 130 /1969/
144. P.D. Lawley, T. Thatcher: Biochem. J. 116, 693 /1970/
145. B. Strauss, T. Hill: Biochim. Biophys. Acta 213, 14 /1970/
146. D.B. Ludlum: ibid. 174, 773 /1969/
147. W.C.J. Ross: Biological Alkylating Agents /1962/ Butterworths, London
148. S. Osterman-Golkar, L. Ehrenberg, C.A. Wachtmeister: Rad. Botany 10, 303 /1970/

149. J.T. Lett, G.M. Parkins, P. Alexander: Arch. Biochem. Biophys. 97, 80 /1962/
150. S.M. Hadi, D.A. Goldthwait: Biochemistry 10, 4986 /1971/
151. S. Zamenhof, S. Arikawa: Mol. Pharmacol. 2, 570 /1966/
152. C. Tamm, H. Shapiro, E. Chargaff: J. Biol. Chem. 203, 673 /1953/
153. M.D. Mamet-Bratley: Biochim. Biophys. Acta 247, 233 /1971/
154. C. Zimmer, H. Venner: Stud. Biophys. 6, 215 /1968/
155. E.L. Uhlenhopp, A.I. Krasna: Biochemistry 10, 3290 /1971/
156. P.A. Edwards, K.V. Shooter: ibid. 10, 2079 /1971/
157. Elekes I.: Kandidátusi disszertáció, MTA Központi Kémiai Kutató Intézete, Budapest, 1971
158. J.A. Stock: Drug Design, Vol. 2, Chapter 13, /1971/ Acad. Press, New York, London
159. W.G. Verley, L. Brakier: Biochim. Biophys. Acta 174, 674 /1969/
160. W. G. Verley, L. Brakier, P.W. Feit: ibid. 228, 400 /1971/
161. P.D. Lawley, P. Brookes: J. Mol. Biol. 25, 143 /1967/
162. O.L. Klammerth, N. Kopun: Eur. J. Biochem. 21, 199 /1971/
163. M. Leng, C. Rosilia, J. Boudet: Biochim. Biophys. Acta 174, 574 /1969/
164. R.W. Ruddon, J.M. Johnson: Mol. Pharmacol. 4, 258 /1968/
165. L. Boule-Charest, M.D. Mamet-Bratley: Biochim. Biophys. Acta 277, 276 /1972/
166. S. Venitt, P. Brookes, P.D. Lawley: ibid. 155, 521 /1968/

167. M. Degre-Couwe, M.D. Mamet-Bratley: Eur. J. Biochem. 32, 292 /1973/
168. N. Brenner, W. Huber: Helv. Chim. Acta 36, 1109 /1953/
169. F. Chillemi: Gaz. Chim. Ital. 93, 1079 /1963/
170. J. Szammer: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 61, 417 /1969/
171. G. Vita, G. Bucher: Chem. Ber. 99, 3387 /1966/
172. C.M. Suter, E.W. Moffett: J. Am. Chem. Soc. 56, 487 /1934/
173. Organikum, Műszaki Könyvkiadó, Budapest /1967/, 429.o.
174. Érczegyi J.: Diplomadolgozat, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, Budapest /1972/
175. S.P. Colowick, N.O. Kaplan: Methods in Enzymol. Vol. XII/B, 386. o. /1968/, Acad. Press, New York, London
176. W.C.J. Ross: J. Chem. Soc./1950/, 2257.

Köszönetet mondok Dr. Ötvös Lászlónak, a kémiai tudományok doktorának munkám témájának megválasztásáért, valamint a feladatom végrehajtása során felmerült elméleti és gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítségéért.

Köszönetet mondok továbbá Dr. Elekes Ilonának, Dr. Mády Györgynek és Dr. Payer Károlynak értékes segítségükért.

