

## **I. A genetikai információ tárolása és kifejeződése**

### **1. Nukleinsavak szerkezete, a genetikai információ tárolása és kifejeződése, a nukleotidok és a nukleinsav lánc szerkezete, polaritás, 3',5' vég fogalma.**

#### **Nukleinsavak szerkezete:**

- A nukleinsavak nukleotid egységekből álló polimerek.

#### **A genetikai információ tárolása és kifejeződése:**

- A genetikai információ hordozója az egymást követő bázisok sorrendje: a bázissorrend.

#### **A nukleotidok és a nukleinsav lánc szerkezete:**

- A polimerek építőelemei: adenin, guanin, citozin vagy uracilbázist tartalmazó ribonukleotidok (RNS), vagy dezoxi ribonukleotidok (DNS, uracil helyett timinbázis).
- A polimer váza a nukleotidok foszfodiészter kötéssel összekapcsolódó ribóz vagy dezoxiribóz részeiből áll. A foszfodiészter kötés az egyik nukleotid 3'OH és a másik nukleotid 5'OH csoportja között jön létre.
- A lánc neutrális pH-n flexibilis helikális szerkezetet alkot. A DNS szál legtöbbször az antiparalell párjával együtt fordul elő, akkor kettős hélix szerkezetet alkot, jobbméretes tekercsként csavarodik fel (B - forma).

#### **Polaritás:**

#### **3',5' vég fogalma:**

- A DNS / RNS lánc egyik végét képező 5'OH-ja foszfáttal észteresített formában van, ez az 5' vég
- A 3'OH vég többnyire szabad, ez a 3' vég

**a szekvencia jelölése:** A szekvencia jelölése a bázisok betűivel: A,C,G,U,T

## 2. A DNS szerkezete, a komplementer láncokat összekötő kötések, a DNS denaturációja, DNS topoizomerek

### A DNS szerkezete:

- A B formájú DNS dezoxi-ribóz váza kifelé, a bázisok befelé állnak, merőlegesen a kettős spirál képzeletbeli tengelyére.
- A kettős spirál méretei B-formában:
  - Átmérő 2 nm
  - Bázistávolság: 0,34 nm
  - 10 bázis jelent egy teljes fordulatot a spirál tengelye körül
  - A bázispárokat a gerinchez kötő glikozidos kötések közötti távolság: 1,085 nm (vagyis ebben benne van a két bázis és közöttük lévő hidrogén kötés)
  - A csavart hélix szerkezetben kialakuló két helikális árok: kis-árok és nagy-árok (ide épül be a legtöbb polimeráz)
- Kialakulhat még Z, A és C forma

### A komplementer láncokat összekötő kötések:

- Hidrogénhidak alakulnak ki a bázispárok között
- Geometriai okokból csak a adenin-timin és a guanin-citozin hidak jöhetnek létre (csak egy purin és egy pirimidin bázis fér el egymással szemben)
- A timin-adenin bázispárt kettő, a guanin-citozin bázispárt három híd köti össze
- A DNS szerkezeti stabilitásának alapja az enol-oxo tautomeriát mutató bázisok oxoforma felé történő eltolódása.

### a DNS denaturációja:

- A DNS szerkezetét melegítéssel denaturálni lehet.
- A hőmérséklet emelése megbontja a hidrogénhidakat.
- Az a hőmérséklet, ahol a hidak 50%-a felbomlik, a DNS "olvadáspontja" (nem fix hőmérséklet, a bázisaránytól függ)

### DNS topoizomerek:

- A prokarióta sejtben gyakori az önmagába záródó DNS lánc
- Ha a gyűrű is tovább tekeredik, pozitív (zárttá tesz) v. negatív (fellazít) szupertekercset alkot
- Olyan zárt cirkuláris DNS láncok, amelyek csak a szupertekercs irányában, méretében vagy hiányában különböznek, topológiai izomerek.

### 3. RNS, mRNS, tRNS, rRNS szerkezete

- **RSN - ribonukleinsav**
  - Nem dezoxi ribózhhoz, hanem sima ribózhhoz csatlakoznak a bázisok :)
  - Különbség a DNS-hez képest, hogy Timin helyett URACIL van benne.
  - Általában egyszálú, de ha vannak komplementer részei egymáshoz közel, hajtúszerű szerkezetbe is összeállhat.
  - Lúggal szemben érzékeny
  
- **Biológiai szerepe:**
  - Bázisinformációt hordoz
  - A fehérjeszintézisben vesz részt
  
- **Típusai:**
  - **mRNS** - messenger~
    - Ez szállítja az INFÓT a riboszómához(milyen aminosav kell a fehérjéhez), ahol a fehérjeszintézis folyik
  
  - **tRNS** - transzfer~
    - Ez szállítja az ALAPANYAGOT(aminosavakat) a riboszómához
    - Egyik végén aminosav kötőhely van (ez fogja meg az alapanyagot)
    - A másik végén pedig antikodon, ami bekötődik az mRNS azon részéhez, ami kódolja az adott aminosav típusát
  
  - **rRNS** – riboszoma~
    - A fehérjeszintézist végző sejtszervecskében van
    - Hozzá köt az mRNS és a tRNS is a peptidkötés kialakítása során, ami a fehérjeláncban összeköti az aminosavakat

#### **4. A prokarióta genom, az eukarióta genom és a vírus genom fogalma**

##### **Prokarióta genom:**

A prokarióta sejt genetikai információját tartalmazó molekula, cirkuláris kettős szálú DNS

##### **Eukarióta genom:**

Eukarióta sejt sejtmagjában található, a genetikai információt tartalmazó molekulák, amik kromoszómákba tömörülnek, lineáris kettős szálú DNS formában

##### **Vírus genom:**

Rövid genetikai információt tartalmazó lineáris (RNS vagy DNS, egy vagy kétszálú, lineáris vagy cirkuláris), amelyek a gazdasejtbe jutva, részben annak fehérjéit használva önmagukban, vagy a gazdasejt genomjába beépülve transzkriptálódnak.

## **5. Az információ áramlásának iránya, a gén fogalma, a genetikai kód, illetve a kodon fogalma**

### **Az információ áramlásának iránya:**

DNS -> RNS -> Fehérje (centrális dogma)

### **A gén fogalma:**

A gének olyan nukleinsav-szakaszok a sejtek magjainak kromoszómáiban, melyek a szervezet működését és növekedését befolyásoló fehérjékszabályozásához és előállításához szükséges információkat tartalmazzák

### **A genetikai kód:**

A bázissorrend által hordozott genetikai információ tartalom.

### **A kodon:**

Egy- egy aminosavnak megfelelő nukleotidhármaszt nevezük kodonnak.

## 6. A DNS replikációja prokariótákban, a replikáció elve, DNS dependens DNS polimerázok működése, templát, primer fogalma, a proof reading, a nick és a DNS ligáz által katalizált reakció

### A DNS replikációja prokariótákban:

- A DNS szál pontos megkettőződése

### A replikáció elve:

A replikáció lényege, hogy a két DNS szál - ami külön-külön ugyanazt az információt hordozza - szétválik, és mindkettőről, mint mintáról komplementer másolat készül, amivel aztán összekapcsolódik (szemikonzervatív), tehát az eredeti DNS molekulával teljesen megegyező molekula jön létre.

### A DNS dependens DNS polimerázok működése:

- A DNS-lánc szintézisét a DNS-dependens DNS-polimerázok végzik.
- A DNS- polimeráz -III felelős a replikációért
  - szintetikus aktivitás
    - Replikáció - a polimeráz a komplementer szálát 3'-5' irányban olvassa, és az új szálát 5'-3' irányban szintetizálja
  - 3'-5' exonukleáz aktivitás
    - a replikáció közben hasítja le az utolsó nukleotidot, ha érzékeli, hogy hibás nukleotid épült be. A polimeráz a kialakuló hidrogénhidat képes érzékelni, ennek hiányában indul be az exonukleáz aktivitás. Azért exo, mert "magon kívüli", ami a prokariótákra in design teljesül.
- DNS - polimeráz - I a DNS repairben játszik szerepet, de a replikáció egyik segédenzime is
  - Szintetikus aktivitás
  - polinukleotidokat hidrolitikusan bontó aktivitás
    - Korrekciós 3'-5' irányban - mindkét aktivitás képes működni kettős szál esetén is, míg a DNS-III-nál csak egy szálon!
    - Hibajavító 5'-3' irányban

### Templát:

Az a DNS szál, amiről a replikáció készül

### Primer:

A DNS polimeráz működéséhez szükséges indító lánc. Ez lehet komplementer DNS vagy RNS, melynek utolsó nukleotidja szabad 3' OH-val rendelkezik.

**A szintézis indulásához szükséges feltételek:** Template, Primer, dNTP-k (deoxiribonukleozid-5'-trifoszfátok: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) és magnéziumionok együttes jelenléte.

### Proof reading:

### Nick és a DNS ligáz által katalizált reakció:

- A DNS polimeráz csak úgy tud két nukleotidot összekötni, hogy a szabad nukleotid 5' trifoszfát foszfátját hozzáköti a láncvégi 3' OH-hoz (pirofoszfát lehasadás)
- Nem képes azonban a kötésre, ha egy DNS szál 5' végét kellene bekötni (egyetlen foszfodiészter kötés kialakulása). Az ilyen kötőhely a nick (bemetszés).
- Ezt a reakciót a DNS-ligáz végzi el. Alkalmas így pl. a DNS-lánc önmagába zárására (cirkuláris DNS). DNS ligáz NAD<sup>+</sup> terhére dolgozik.

## 7. A cirkuláris prokarióta genom replikációja, a replikációs origo, a replikáció iránya illetve a két lánc szintézisének iránya, Okazaki fragmentumok

### A cirkuláris prokarióta genom replikációja (origo, irányok):

- A DNS szál megkettőződése
- A replikációt DNS-dependens DNS polimerázok segítik.
- A replikáció a cirkuláris DNS-en egy ún. start-ponttól kiindulva halad előre a kör mentén mindkét irányban, és a start ponttal szemben végződik a körön.
- A replikáció kezdeti stádiuma
  - A replikáció start pontjában (origo) egy meghatározott szekvenciájú DNS szakasz van (oriC). Ide kapcsolódik a **dnaA** fehérje. Ehhez még kapcsolódik a dnaB és dnaC fehérje. A három együtt segíti elő a DNS lokális olvadását, azaz a lánc széttekercsét és szétválasztását.
  - **iniciációs buborék:** Az origo-ban lévő lokálisan széttekercselt lánc alkotta zárt hurok
  - **primoszóma:** A dnaC-dnaB komplexhez csatlakozik még a dnaG (primáz) fehérje, együtt felelősek a kezdeti RNS indítósál (primer) létrehozásáért. Ez a komplex a primoszóma.
  - **repliszóma:** a primoszómához kapcsolódó DNS-polimeráz III enzim és további **rep** fehérjék alkotta komplex, ami a replikációt végzi.
  - A repliszóma mögötti láncszakasz stabilizálását az SSB fehérjék végzik.
- Az eredeti szál folyamatosan felnyílik, és ún. replikációs villa jön létre. A felnyílt kör alakú DNS két irányába mindig két replikációs villa halad előre (óramutató járásával megegyező ill. ellentétes irányban).
- Replikáció az 5'-3' irányban
  - A DNS polimerázok nem képesek megszintetizálni a nukleotid lánc első pár nukleotidját, ezt egy külön polimeráz végzi (primáz), ami primert (indító RNS) láncot készít. Ennek 3'OH végéhez csatlakozik a további nukleotid. Ezt az új láncot vezető láncnak nevezzük.
- Replikáció a 3'-5' irányban, azaz a start ponttól ellentétes irányban
  - Mivel a polimeráz csak 5'3' irányú működésre képes, a replikáció úgy működik, hogy pár ezer nukleotiddal 5' irányban előre lép a polimeráz, és innen visszafelé, 3' irányban szintetizál. Minden egyes fragmentumhoz külön primer szükséges. Ezt az új láncot késlekedő láncnak nevezzük.
  - **figyelem!** A replikációt a vezető és a késlekedő szálon is ugyanaz a DNS-polimeráz III végzi, ami egy kétkarú molekula. Ahhoz, hogy ez topológiailag teljesüljön, a késlekedő szál időlegesen hurkot képezve visszahajlik.

### Okazaki fragmentumok:

- 3'5' irányú replikációkor létrejövő töredékes, majd egyesülő fordított 5'-3' irányban egyesülő szakaszok az Okazaki fragmentumok.
- Az Okazaki fragmentum leszintetizálása után DNS-polimeráz I. enzim a fragmentum elején található RNS nukleotidokat lehasítja, és 5'-3' hibajavító mechanizmussal DNS nukleotidokra cseréli le. A fragmentum hozzáépítését a kész szálhoz (a nick megszüntetését) DNS-ligáz végzi.

### Plazmidok:

Prokarióta sejtben a nagy cirkuláris DNS-től elkülönülő, kisebb kör alakú DNS-ek. A plazmidok a nagy cirkuláris DNS-től függetlenül is replikálódhatnak. A plazmidok három típusa: F vagy sexfaktor, R vagy rezisztenciafaktor és a kolicinogén faktor. Az R plazmidokat a rekombináns géntechnikában gyakran alkalmazzák vektorként.

## 8. A DNS replikációja eukarióta sejtekben. Az eukarióta kromoszóma szerveződése. DNS polimerázok, telomeráz.

### Az eukarióta DNS szerveződése

- **menyiség:** az eukarióta DNS kb.  $10^3$ -szor annyi nukleotidot tartalmaz mint a prokarióta (pl. emberben  $10^9$ ). Lineárisan kb. 180 cm.
- **szerveződés:** kromoszómánként 1 DNS molekula. Emberi sejtekben 46 kromoszóma. A kromoszómában feltekeredve igen komplex, fehérjékhez kötött szerkezet. A lazább vagy tömörebb szerkezet a génaktivitást is meghatározza.
  - **hiszton fehérje:** Bázikus fehérjék, amelyeknek az aminosavszekvenciája nagyon hasonló az egymástól távoli fajokban is.
    - Core hisztonok: H2a, H2b, H3, H4 (10-20 kDa)
    - Nem-core hiszton: H1 (21 kDa)
    - A hiszton fehérjék felelősek a DNS lánc tömörítéséért, igen nagy számú molekulával kapcsolódnak a DNS lánchoz. A hisztonok az S fázisban szintetizálódnak!
  - **nem hiszton fehérjék:** csak kevés molekulával kapcsolódnak a DNShez, és pl. a replikációban, génexpresszióban vesznek részt
  - **nukleoszóma:** A DNS kromoszóma szerveződés alapja. Kb. 200 bázispáronként ismétlődik. A H2x, H3, H4 core-hisztonokból két darab (összesen 8 db molekula) együtt alkot egy olyan korongszerű képződményt, amire a DNS rátekeredik kb. 150 nukleotidnyi. Ez a komplex a nukleoszóma. A következő nukleoszóomával egy 50 nukleotidnyi szakasz köti össze.
    - Nukleoszóma átmérője 11 nm.
  - A **H1 nem-core hiszton** a többi core hisztonhoz kapcsolódva közel húzza egymáshoz a nukleoszóomákat. A H1 megszabja azt is, mennyire kompakt a nukleoszóma.
    - H1-el összefogott nukleotidok is nagyobb, 300 nm átmérőjű hurokba rendeződnek. Ez még tovább kondenzálható, 1400 nm átmérőjű hurkokra.

### A DNS replikációja eukarióta sejtekben:

- **Replikációs buborék:** Az eukarióta DNS nem cirkuláris, a replikáció nem az origóból indul. Ehelyett a szálon több start ponton replikációs buborékok alakulnak ki, a replikáció ezekből indul.
- **Résztevő fehérjék**
  - **alfa-DNS polimeráz:** Késlekedő szál szintézise
  - **beta-DNS polimeráz:** A DNS repair mechanizmusokban vesz részt
  - **delta-DNS polimeráz:** A vezető szál szintézise
  - **gamma-DNS polimeráz:** Az extranukleáris (ciklikus) DNS szintézisében vesz részt.
    - Extranukleáris DNS: Eukarióta sejtek mitokondriumában található cirkuláris DNS, a mitokondrium fehérjéinek 5%-át kódolja, és a mitokondriális önálló fehérjeszintézishez szükséges RNS és tRNSt kódolja. A sejtciklustól függetlenül replikálódik, anyai úton öröklődik -> "Éva-hipotézis" (A ma élő egész emberpopuláció 200.000 évvel ezelőttről egy anyától származik)
  - Nincs önálló exonukleáz aktivitásuk, a 3'-5' javításokat és az RNS indítók kimetszését önálló nukleáz enzimek végzik. Ezek a fehérjék a polimerázokkal komplexet képeznek!
  - **DNS-ligáz:** ua. mint a prokariótáknál, de ATP-t fogyaszt.

**Telomerek, telomeráz:** A hosszú lineáris eukarióta DNS végeit telomereknek nevezik. A telomér a DNS 3' végének egyszálú túlnyúlása.

- **Telomér szekvencia:** a telomér nukleotid szekvenciája főleg G-ben gazdag, kétszeresen ismétlődő ún. telomér szekvencia
- **Telomervégi fehérje:** a replikációk közötti időszakban ez a fehérje kötődik a telomerekhez
- **Telomeráz enzim:** ez az enzim készíti a minta DNS szál 3' végére a telomér szakaszt. Az enzim egy RNS darabot tartalmaz, és ennek komplementere szintetizálódik telomérként.
- **A telomér funkciója:** A DNS replikáció során a késlekedő lánc 5' végén keletkezett RNS-t kimetszik, de nem pótolják DNS-el. Ezért a késlekedő szál rövidebb lesz, mint a minta DNS. Hogy emiatt ne legyen információ veszteség, a telomeráz enzim meghosszabbítja a minta DNS 3' végét, ezért a kárba vesző szakasz erről, a funkció nélküli, telomér szakaszcól másolódik.
- **Felnőttekben** már nincs telomeráz enzim aktivitás, ezáltal határolt a lehetséges replikációk száma. Tumoros elváltozásokban viszont újból észlelhető a telomér aktivitás.



## 9. A DNS szintézis és a hiszton szintézis időpontja a sejtciklusban, a hisztonok megoszlása

### • Sejtosztódási ciklus:

A mitózis (**M**, a sejtek kettéosztódásának fázisa) több szakaszból áll: profázis (kromoszómák tömörítése), metafázis (mikrotubuláris orsó kialakulása), anafázis (a kromatidok kétfelé csoportosítása).

### • A mitózisok közötti időszak az interfázis. Szakaszai:

- **G1**: a mitózis és a replikáció közti időszak. Ebben az időszakban szintetizálódik a sejtre jellemző fehérjék többsége. Általában ez a fázis szabja meg a sejtciklus hosszúságát.
- **G0**: ez a speciális állapot csak bizonyos sejteknél fordul elő (magasabbrendű, soksejtű szervezetben a sejtek jelentős része ilyen). Ebben az állapotban a sejt "alvó", nem szaporodik, csak a funkcióját látja el. Ebből az állapotból stimuláló kémiai szignálok, ún. növekedési faktorok hatására kerülhet ki, újra G1 állapotba.
- **S**: a DNS replikáció ideje.
- **G2**: S és M fázis közötti időszak

### • A sejtosztódási ciklus szabályozása:

A ciklin nevű fehérjékkel történik, az azok által szabályzott ciklindependens protein kinázok által. Beavatkozási pontok: G1/S (elkötelező lépés), G2/M.

### • A hiszton fehérjék szintetizálása:

egyedülálló módon az S fázisban (és nem a G1-ben) történik. A hisztonok szintézise azért szükséges a DNS replikáció előtt, mert az újonnan szintetizált DNS láncnak is tömörödnie kell, a kondenzált szerkezetet pedig a hiszton fehérjék segítik elő. Az új kromatin felépüléséhez a DNS-el kb azonos tömegű hisztonra van szükség. Emiatt a legtöbb sejt típusban minden hiszton gén többszörös kópiában van jelen. Gerincesekben pl. 20 kópia van mind az 5 hisztonból.

• **A régi és új hisztonok eloszlására** az a jellemző, hogy az eredetileg meglévő, régi hisztonok a vezető szálnál maradnak, míg a késlekedő szálnál az újonnan szintetizált hisztonok kapcsolódnak.

## 10. A DNS károsodásainak javítása repair mechanizmusok, mutációk, a DNS leggyakoribb kémiai károsodásai, a bázisok dezaminációja, depurinizáció

### A DNS károsodásainak javítása

#### A DNS sérülés főbb okai:

ionizáló sugárzások, UV fény, kémiai hatások, ezek dózisa és gyakorisága.

#### Ezeknek hatásai:

- depurinizáció
- bázisok dezaminációja
- timin dimérek képződése
- nukleotidok kiesése vagy beékelődése
- lánc törések
- lánckereszteszódések

#### Repair mechanizmusok:

- **Repair mechanizmus:** Replikáció előtt a fenti hibák detektálása az épen maradt komplementer szál alapján, és a hiba kijavítása
- **Dimerizáció:** Timin bázisokban UV fény hatására egymás mellett lévő két timin 5. és 6. szénatomja között kovalens kötés alakul ki
  - Repair:
    - Prokariótákban: Kék fény hatására beinduló enzim, ami a timinpárok között kialakult kovalens kötést képes elvágni.
    - Eukariótákban (prok. is): Egy specifikus endonukleáz képes felismerni a kovalensen összekötött timin bázisokat, és a sérült nukleotidot a 3' és 5' foszfodiészterkötéseknél fogva kihasítja. A keletkező "gap" pótlására a DNS-polimeráz I. vagy a beta-DNS-polimeráz a komplementer párnak megfelelően befoltozza a szálát. A keletkező nick-et a DNS ligáz állítja helyre.
- **Depurinizáció:** hő vagy savak hatására fordul elő. Az A vagy G tartalmú bázisok glikozidos kötése hasad fel, és bázis nélküli dezoxi ribóz foszfát marad a láncban.
  - Repair: speciális endonukleáz kivágja a bázis nélküli cukorfoszfát gerincet (így lesz gap a helyén), végül a DNS-polimeráz + DNS-ligáz befoltozza a lyukat.
- **Dezamináció:** Spontán, ionizáló sugarak, alkiláló szerek hatására következik be. Ez idegen bázisok megjelenését eredményezi. Citozinból pl. uracil képződik (az uracil idegen bázis a DNS-ben. Épp azért van timin a DNS-ben, hogy ez a gyakori hiba így detektálható és javítható legyen), vagy guaninból, adeninből xantin vagy hipoxantin, idegen bázisok.
  - Repair: specifikus glikozidázok felismerik az idegen bázisokat, azokat glikozidos hasítással eltávolítják a láncból. Az endonukleáz kivágja az így üressé vált cukorfoszfát gerincet, végül a DNS-polimeráz + DNS-ligáz befoltozza a lyukat.
- **Hibás bázisok**
  - Repair: a hibás bázis felismerése, a glikozid kötés felszakítása, a nukleotidmaradvány kimetszése, a DNS polimeráz befoltozza a "gap"-et, végül a DNS ligáz megszünteti a nick-et
- **Mismatch repair:** A DNS-polimeráz replikáció közben elkövetett hibáinak kijavítása. Az alapvető kérdés: honnan tudjuk, hogy az egymással szemben lévő, de nem komplementer bázisok közül melyik a helyes? Az eredeti lánc pár másodpercig még felismerhető. A lánc ugyanis metilálva van (CH<sub>3</sub> csoport kapcsolódása, bizonyos pontokon pl. e. coli: GATC). A metilálás az újonnan szintetizált szálon pár mp késéssel kezdődik.
  - Repair: A legközelebbi nem metilált GATC megkeresése, onnan a lánc hasítása, és a szintetizálás folytatása onnan újból.

#### Mutáció:

Ha a hibát nem javítják ki a replikáció előtt, a replikáció során a hiba rögzül, és az utódban a sérült információ öröklődik. Ez a mutáció.

**11. Timin dimérek kialakulása. Timin-uracil helyett, biztonsági szerepe a DNS-ben. DNS károsodások javításának mechanizmusai, a repair rendszerek kapacitásának határa, a mismatch repair. A kijavíthatatlan károsodások rögzülése, mutációk.**

• **Mismatch repair:** A DNS-polimeráz replikáció közben elkövetett hibáinak kijavítása. Az alapvető kérdés: honnan tudjuk, hogy az egymással szemben lévő, de nem komplementer bázisok közül melyik a helyes? Az eredeti lánc pár másodpercig még felismerhető. A lánc ugyanis metilálva van (CH<sub>3</sub> csoport kapcsolódása, bizonyos pontokon pl. e. coli: GATC). A metilálás az újonnan szintetizált szálon pár mp késéssel kezdődik.

◦ Repair: A legközelebbi nem metilált GATC megkeresése, onnan a lánc hasítása, és a szintetizálás folytatása onnan újból.

## 12. A pontmutációk kialakulásának mechanizmusa, a spontán mutáció mechanizmusa, a pontmutációk következményei kódoló DNS szakaszon, a frame shift illetve a nonsense mutáció fogalma. A mutációk következményei csírasejtekben és szomatikus sejtekben, szupresszor mutáció- Ames próba

### Mutációk:

Repair által ki nem javított, replikáció által rögzült hibák a DNS-ben

#### • **Pontmutáció:** Egyetlen bázisszekvencia mutációja.

◦ **Szubsztitúció:** Egy bázispár helyére egy másik bázispár kerül.

▪ **Tranzíció:** pirimidin helyére pirimidin, purin helyére purin kerül, tehát a bázisok szerkezete ugyanaz marad. Ezt pl. dezaminálódás idézheti elő. Spontán tranzíció minden 10-ik átírásnál 1 nukleotidon előfordulhat. Ez az evolúció során nagy jelentőségű. Oka a nukleotidok enol-oxo tautomériája. Normál esetben oxo alakban fordulnak elő, ha viszont valamilyen oknál fogva pl. egy guanin enolalakban van jelen, nem citozint, hanem tímint fog komplementerként beépíteni a polimeráz enzim. Az enolforma megjelenését ionizációs sugárzás fokozza.

▪ **Transzverzió:** pirimidin helyére purin, vagy fordítva kerül. A polimeráz enzim hibás működése okozza.

◦ **Frame shift:** Ha a nukleotidok száma változik meg, beékelődés vagy kiesés következik be. Ha egy fehérjét kódoló szakaszon fordul elő, a fehérjét kódoló kodon szekvencia elcsúszik, és hibás fehérje jön létre.

▪ **Deléció:** egy nukleotid teljes kiesése a láncból. Pl. depurinizáció idézheti elő.

▪ **Inzerció:** egy többlet nukleotid beépülése a láncba. Bizonyos aromás vegyületek, pl. akril festékek beépülése (interkaláció) okozhatják.

#### • **Ames-próba:** Az ún. szupresszor mutáció jelenségén alapul. Ez az a második mutáció, ami azért jön létre, hogy megszüntesse az eredeti mutáció következményeit.

◦ Az Ames teszt szupresszor mutációs próba. A salmonellák törzsébe tartozó baktérium egy mutáció során elvesztette a hisztidin termelési képességét, ezért csak olyan táptalajban növekszik, amiben van hisztidin. Bizonyos anyagok mutagén hatására a baktérium visszanyerheti ezt a képességét. Az Ames próba lényege, hogy adott anyag esetén  $10^9$  baktériumból mennyi nyeri vissza a hisztidin képző képességét. Ezt a tesztet emberi fogyasztásra szánt termékeknél is elvégzik.

#### • **Mutációk következményei eltérő sejtekben:**

◦ Csírasejtekben: megváltozik a generációról öröklődő információ.

◦ Szomatikus sejtekben: életfolyamatok károsodása, csökkent funkció vagy életképtelen sejt.

◦ Kontrollálatlan sejtszaporodás: lást protoonkogének, tumorszupresszív gének.

### **13. Protoonkogének és tumor szupresszor gének fogalma**

#### **A tumorszupresszor gének szerepe:**

Pl. a p53-as tumorszupresszor gén nem engedi S fázisba lépni a sejtet, amíg minden repair reakció le nem zajlott. UV fény besugárzás esetén a p53 mennyisége jelentősen megnő. Ha a sérülés olyan mértékű, hogy a repair nem lehetséges, a hatás pont ellentétes: a p53 segíti a sejt apoptózisát. A p53 meghibásodása ezért erősen tumorkeltő. Általánosan: Rb fehérje foszforilációjának gátlása tartja a sejtet G1-ben. A gátlást elősegítő fehérjéket (p53, p16) és az Rb fehérjét kódoló géneket nevezzük tumorszupresszor géneknek. A tumorszupresszor géneknél a csökkent aktivitás vezet daganathoz.

#### **Protoonkogének szerepe:**

A növekedés fiziológias stimulálását szolgáló fehérjéket kódoló gének, melyek szerkezetének vagy expressziójának hibája okoz daganatot. Protoonkogéneknél a túlzott aktivitás vezet daganathoz. Pl. G0/G1 átmenetnél a növekedési faktorokat (polipeptidek) és a jelüket közvetítő fehérjéket (szignáltranszdukció) kódoló gének.

## 14. A vírusgenom, a fágok replikációjának litikus és lizogén útja, fág represszor

### A vírusgenom:

- **A vírus:** fertőzőképes nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeköpenyből álló részecskre. Kizárólag élő sejtekben képesek önmaguk replikációjára, mert energiaszolgáltató és fehérje szintetizáló rendszerük nincsen (abszolút parazita).
- **virion:** Egy egyedi vírus részecske (egyes számú alak).
- **Bakteriofág:** Baktériumban élősködő vírus.
- **A vírusgenom:** A vírusok genetikai információját hordozó nukleotidlánc. Hossza 4-5 nukleotidtól pár száz nukleotidig terjedhet.
  - Egyszálú / kétszálú DNS vírusgenom
  - Egyszálú/kétszálú RNS vírusgenom : az RNS vírusok replikációjához olyan RNS-dependens RNS-polimeráz szükséges, amit a gazdasejt nem is tartalmaz. Ezeket a fehérjéket maga a vírusgenom kódolja. Előfordulnak *átfedő génszakaszok* is, vagyis az olvasási kerettől függően más-más fehérjét kódol ugyanaz az a rövid RNS.

**A fágok replikációjának litikus és lizogén útja:** A bakteriofágok replikációja két úton folyhat le: litikus/lizogén vonalon.

- **Litikus út:** A gazdasejt azonnali pusztulásával jár
  - Példa T4-fág támadása E. Colin: A T4-fág az E.Coli külső membránjának egy meghatározott helyére csatlakozik, és bejuttatja a 150 nukleotidos kettős DNS-ét. A DNS-en két féle gén kódolódik:
    - Korai gének (azonnali korai + késleltetett korai): Azokat a fehérjéket kódolják, amelyek leállítják a baktérium saját makromolekuláinak szintézisét és lebontják a gazdasejt DNS-ét.
    - Késői gének: A fág DNS replikációja. Ez kódolja a vírus köpenyt alkotó fehérjéket, és a lizozim nevű enzimet, ami lebontja a gazdasejt falát
    - Az összerendeződött T4 fágok a lizozim által készített lyukon át kiszabadulnak, és fertőzőképesek. A baktériumsejt szétesik (bakteriolízis).
- **Lizogén út:** A gazdasejtet generációkon át nem károsítja.
  - **Cirkuláris vírus DNS:**  
A lineáris DNS vírusgenom a gazdasejtbe jutva cirkuláris DNS-é alakul, és önálló replikációra képes.
  - **Profág:**  
Bizonyos körülmények között a vírus DNS **rekombinációval** a gazdasejt DNS-ének egy jól meghatározott helyére integrálódik. Ez a profág.
  - **Lizogén baktérium:**  
olyan baktérium, aminek kromoszómája a profágot is tartalmazza
  - **fág represszor fehérje:**  
A profág kihasítását a baktérium genomból egy olyan fehérje végzi, amit a profág genom kódol. Ennek a fehérjének a transzkripcióját azonban gátolja az ún. fág represszor fehérje. Amíg a represszor fehérje jelen van, a profág nem hasítódik ki, a vírus inaktív marad. A lizogén baktérium szaporodhat tovább, szaporítva ezzel a profágot is, de a sejt károsodása nélkül. A profág által kódolt fehérjék közül kizárólag a represszor fehérje szintetizálódik. A represszor fehérje a profág operátor régióhoz kötődve akadályozza meg a többi fágfehérje transzkripcióját.
  - **cro fehérje:**  
Abban az esetben, ha környezeti hatásokra (pl. UV) a represszor fehérje száma csökken, az első, nem represszált profágból szintetizálódik a cro fehérje, ami viszont a fág represszor transzkripcióját gátolja. Ezzel a profág aktivizálódik, termelődni kezd a kimetszésért felelős fehérje, és a fág irreverzibilisen átvált a litikus útra.
- **Temperált fágok:** a két út közül a körülményektől függően választanak.

## 15. Az állati vírusok replikációja. A DNS genommal rendelkező vírusok. A kettős szálú RNS megjelenésének szerepe az interferonok hatásmechanizmusában

## 16. Az állati vírusok csoportosítása replikációs mechanizmusuk szerint

**Állati vírusok replikációja:** Általában a DNS-t tartalmazó vírusok a DNS-t, és további fehérjéket juttatnak a gazdasejtbe, ott önállóan replikálódnak, és idővel a gazdasejt károsodását, lízisét okozzák.

• **Transzformáló DNS vírusok:** speciális típus, amelyek a gazdasejtek csak speciális típusaiban járják végig a replikáció szokásos, fenti útját.

◦ **Permisszív gazdasejt:** Amiben a vírus DNS replikációja önállóan végbemegy.

◦ **Nem permisszív gazdasejt:** Ezekben a sejtekben a vírus DNS nem képes replikációra. Azonban a sejtek nagyon kis hányadában ( $10^{-5}$ ) a transzformálódó vírus DNS beépül a gazdasejt genomjába, és a gazdasejt tumorsejtté való transzformációját okozza.

▪ A vírus DNS random helyen épülhet be a gazda genomba. Gyakran előfordul, hogy csak a vírusgenom egy része integrálódik.

▪ **provírus:** A gazda DNS-be beépült vírus genom

▪ A provírusról folyamatosan szintetizálódnak olyan fehérjék, amik a gazdasejt tumorszupresszor fehérjéivel komplexet képeznek, és gátolják a működésüket. Ezáltal a sejt előbb lép G1-ből S fázisba, ami a vírus szaporodásának kedvez. Azonban a repair mechanizmusok a gazdaszervezetben ekkor még nem zajlottak le, így a mutációk kialakulása, ezzel a tumoros sejt képződés rizikója megintcsak nő. (Pl. nagy-T antigén SV40 vírusnál gátolja a p53 tumorszupresszor fehérjét).

• **RNS vírusok**

◦ **Tisztán RNS vírusok:**

A vírusgenom replikációját az RNS-dependens RNS-polimeráz (replikáz) végzi

▪ A mutációk gyakorisága nagy, mert az RNS-polimeráznak nincs hibajavító nukleáz aktivitása

▪ **Stratégiájuk** különbözik aszerint, hogy +RNS vagy -RNS szálú a vírus.

▪ +RNS: betöltheti azonnal az mRNS funkciót, és a vírusreplikációhoz szükséges speciális fehérjék

szintézisét is biztosítja. A replikációhoz meg kell szintetizálnia a -RNS szálnak is.

▪ -RNS: nem használható mRNS-ként, ezért először meg kell szintetizálni a komplementer +RNS láncot. Ezért a replikáz enzimet is a gazdasejtbe kell juttatni fertőzéskor.

▪ Kettős szálú RNS: először itt is az mRNS-ként szolgáló +RNS-t kell megszintetizálni.

▪ **interferonok:** A vírusgenom replikációja közben átmenetileg mindenképp megjelenik a kettős szálú RNS lánc. Ez a gazdasejtben egy védelmi reakciót indít be, amit a többi sejt felé az interferonok közvetítenek.

▪ A kettős szálú RNS megjelenése után a gazdasejt interferonnak nevezett fehérjéket szintetizál és szekretál.

▪ A többi sejtben három enzim szintézisét indukálják:

▪ Ezek a szintézist követően nem aktívak, csak védelmi készütségben állnak.

▪ Ha a kettős szálú RNS megjelenik, az enzimek működésbe jönnek. A hatásmechanizmus meggátolja, hogy vironok termelődjenek.

▪ **oligoA szintetáz:**

a kettős szálú RNS hatására aktiválja az oligoA-dependens endonukleáz

▪ **oligoA-dependens endonukleáz:**

degradálja az mRNS és rRNS molekulákat

▪ **kettős szálú RNS-dependens protein kináz:**

leállítja a sejtben a fehérje szintézist (eIF-2 iniciációs faktor foszforiláció)

## 17. A retrovírusok replikációja, a reverz transzkriptáz. RNS dependens DNS polimeráz

### Retrovírusok:

Az információ iránya a centrális dogmával ellentétes (pl. HIV vírus)

• **A centrális dogmának ellentmond:** az információ áramlás iránya nem DNS- >RNS->Fehérje! Itt RNS->DNS átírás van!

◦ Az RNS-mintáról történő DNS szintézist az RNS-dependens DNSpolimeráz (reverz transzkriptáz) végzi. Ezt a retrovírusok genomja kódolja.

• **A retrovírusok genomja:**

egyszálú +RNS molekula, amelynek két, azonos kópiáját tartalmazza a vírus.

• **virion felépítése:**

Az RNS szál egy fehérjeburokkal van körbevéve, ami egyúttal tartalmazza a reverz transzkriptáz enzimet is. Ez tehát a fertőzésekor az RNS-el együtt a gazdasejtbe kerül.

• **glikoprotein tüskék:**

A köpeny körül glikoprotein tüskék vannak, amik a vírusgenom által kódolt fehérjék, ill. lipid kettősréteg, amit a virion az előző gazdasejt membránjából "rabolt"

• **Életciklus**

◦ A retrovírus a glikoprotein tüskékkel a gazdasejt membránjának specifikus helyére tapad -> a vírus és a gazdasejt membránja összeolvad, és a virion a gazdasejt belsejébe kerül.

◦ A +RNS-ről szintetizálódott DNS-nek mindenképpen be kell épülnie a gazdasejt genomjába!

◦ **A reverz transzkriptáz működése:**

▪ A +RNS-ről először a -DNS szintetizálódik meg.

▪ Ezután a DNS-RNS hibridben az RNS nagyrésze lebontásra kerül

▪ Az elkészült -DNS láncról készül ezután a +DNS szál

▪ A DNS lánc elejéhez persze primer szükséges

▪ A -DNS szál elejét egy tRNS 3'OH vége szolgáltatja.

▪ A +DNS szál elejét az eredeti +RNS szálból származó kis darabka 3'OH vége szolgáltatja. Végül ezt is javítják DNS-re

◦ **Hosszú terminális ismétlődés szekvencia (LTR):** A megsintetizált

DNS hélix mindkét végére az RNS-ben csak egyszer szereplő szakasz szintetizálódik.

◦ **provírus fázis:** A DNS ezután cirkuláris alakot vesz fel, és bejut a sejtmagba, ahol rekombinációval beépül a gazdasejt DNS-ébe, valamelyik **TCAG** szekvenciánál.

▪ A transzformáló DNS vírusokkal ellentétben ez a beépülés majd minden sejtben megtörténik!

◦ A vírus nem öli meg a gazdasejtet, lízishez csak akkor vezet, ha a vírusok szintetizálása nagyon felgyorsul. A provírusról történő szintézis általában mérsékelt marad.

◦ Példa: HIV - T4 limfociták. gp 120 glikoprotein köt a T4 membránhoz, ellenanyag termelés jelenleg lehetetlennek tűnik. Védekezés: reverztranszkriptáz gátlása, de toxikus.



## 18. Onkogéneket hordozó retrovírusok és a celluláris protoonkogének.

### Onkogéneket hordozó retrovírusok:

Olyan retrovírusok, amelyek provírusa olyan géneket hordoz, amik az integrálódott provírusról folyamatosan transzkripcióra kerülve a gazdasejt rosszindulató daganatsejtté történő transzformációját segítik elő. A transzformáló DNS vírusokkal ellentétben gyors, akut transzformációt idéznek elő.

#### • onkogének:

a sejtben akut transzformációt előidéző fehérjéket kódoló, retrovírus által hordozott gének.

- A fertőzés után a daganatos átalakulás legtöbbször akut bekövetkezik.

#### • protoonkogének:

Érdekesség, hogy az onkogénekkel teljesen homológ gének az egészséges sejtekben is megtalálhatók. Ezek a protoonkogének, és a növekedési faktorok szabályozásában vesznek részt. A különbség annyi, hogy míg a protoonkogének szigorú szabályozás alatt állnak, az onkogénekre ezek a szabályozások nem hatnak, mivel mutáns, intron nélküli fehérjéket kódolnak.

- A protoonkogének átalakulása (a retrovírusoktól függetlenül, külső behatásra - szomatikus mutációval) onkogénekké a daganatok kutatásának fontos állomása. Mára kiderült, hogy a legtöbb daganatos betegség kialakulásának ez a háttere.

### FONTOS:

Az onkogének (protoonkogének) által kódolt fehérjék a G0/G1 sejtciklus átmeneten hatnak, túlzott aktivitásuk okoz daganatot (növekedési faktorok, szignáltranszdukciós fehérjék, receptorfehérjék stb). A tumorszupresszor gének által kódolt fehérjék a G1/S átmeneten hatnak, csökkent aktivitásuk okoz daganatot. A transzformáló DNS vírusok vagy genetikai mutáció következtében kieső tumorszupresszív rendszer elősegítheti a protoonkogének átalakulását onkogénekké.

## 19. A gén és a transzkripció prokariótákban, a DNS-dependens RNS polimeráz működése, a gén orientációja a kódoló sense (+) DNS – lánc és a templát (-) DNS-lánc fogalma, a prokarióta transzkripció egység, a promoter (erős, gyenge) fogalma

**A gén és a transzkripció prokariótákban:** A fehérjék szerekezetére vonatkozó genetikai információt a DNS kódolja. A DNS-ről a fehérje szintéziséért felelős apparátushoz, az RNS szállítja az információt.

- **Riboszóma:** A fehérje szintéziséért felelős apparátus
- **mRNS:** A DNS-ről átírt információt szállítja a riboszómához
  - Lineáris, egyszálú molekula, de ha komplementer bázispárok vannak egymáshoz közel, "hajtúszerű" képződmények alakulnak ki, mert a komplementer párok között hidrogénkötés alakul ki. a közbelső nem komplementer szakaszokból pedig hurkok alakulnak.
  - **snRNS:** Az eukarióta mRNS érésében szerepet játszó kisméretű nukleáris RNS
  - **hnRNS:** Az érett mRNS molekulák előanyagának tekinthető eukarióta sejtmagban
- **rRNS:** A riboszómák szerkezetének részét képező molekula
  - **scRNS:** kisméretű citoplazmái RNS, ami a szekretálódó fehérjéket szintetizáló riboszómákat irányítja az endoplazmás retikulumhoz
- **tRNS:** A három betűs genetikai kódot a megfelelő aminosavszekvenciára átfordító adapter molekula
  - Eukariótákban a mitokondriumban található extranukleáris cirkuláris DNS-ről való átíráshoz speciális rRNS-eket és tRNS-eket tartalmaz!
  - A tRNS harmadlagos szerkezettel is rendelkezik, a lineáris láncon található kötött helyzetű komplementer nukleotidok miatt, ami hidrogénkötésekkel harmadlagos térbeli szerkezetet hoz létre. Ezen túl a bázisok közötti kölcsönhatások helikális szerkezetet hozhatnak létre.

**Transzkripció egység:** A DNS-ről RNS-re való átírást végző egység

- **Pozitív (kódoló, sense) DNS szál:** Aminek a bázisszekvenciája megegyezik az RNS bázisszekvenciájával. Hogy melyik a pozitív szál, attól is függ, hogy pl. a cirkuláris DNS melyik szakaszáról, milyen irányban folyik a transzkripció
- **Negatív (template, antisense) szál:** A bázisszekvenciája ellentétes az RNSével. A transzkripció során a másolás a DNS meghatározott szakaszainak egyik száláról, az ún. template szálról történik. A keletkező RNS szál komplementaritása azonos lesz a másik (nem template) DNS szállal, csak timin helyett az RNS-ben uracil lesz beépítve.
- **Az RNS szintézis iránya:** 5'-3' irányban történik a szintézis, 3'5' irányban az olvasás.

**A DNS-dependens RNS polimeráz működése:**

- DNS template jelenlétében, azzal komplementer, antipararell RNS-láncot szintetizálnak a négyféle NTP-ből (ribonukleozid-trifoszfát): ATP, GTP, CTP, UTP. A reakcióhoz még Mg<sup>2+</sup> ionokat használnak
  - RNS(n-ik nukleotid egység, 3'OH) → RNS(n+1-ik nukleotid egység, 5' foszfát) + PPi
- Az RNS polimeráznak nincs szüksége indító láncre!
- nincs nukleáz aktivitásuk, ezért a transzkripció hibáit nem képes kijavítani
- A polimeráz **core enzim** négy alegységből épül fel (α<sub>2</sub>ββ')
- **βéta':** A DNS-hez való kötődéshez
- **βéta:** a nukleozid-trifoszfátok kötésében játszik szerepet
- **szigma alegység:** a core enzimet egészíti ki holoenzimmé, feladata: a transzkripció specifikus iniciációs helyének a felismerése a DNS-en
- **promoter:** A transzkripció specifikus iniciációs helye a DNS-en. Speciális bázisszekvencia. Nem kódol fehérjét, de esetleg még más olyan régiókat tartalmazhat, ahová az átírás sebességét befolyásoló fehérjék kötődhetnek
  - **konszenzus szekvencia:** olyan promoter szekvencia, amit a polimeráz felismer. A struktúr génektől az 5' vég irányában visszafelé -10 egységre, és -35 egységre.
    - ....(-35)TTGACA.....(-10)TATAAT.....
  - **erős promoter:** a szekvenciája azonos a "konszenzus" szekvenciával (időegység alatt több mRNS szintetizálódik róla).
  - **gyenge promoter:** a szekvenciája hasonlít a "konszenzus" szekvenciához

- **struktúr gének:** a DNS olyan további szekvenciái, amik egy-egy adott polipeptidláncot kódolnak.
- **cisztron:** folytonos struktúr gén szakasz (egy polipeptidláncot kódol).
  - A prokarióta genomban egy-egy polipeptid lánc szisztronjából csak egy példány van. Speciálisan prokariótákban az is előfordul, hogy pl. egy anyagcsereút összes fehérjéjét egy cisztron kódolja (policisztronos mRNS - több polipeptidláncot kódol)
- **A transzkripció menete**
  - **iniciáció**
    - A transzkripció egység az 5' végén kötődik be a DNS-re a promoternél. Ezt az **RNS-polimeráz holoenzimmel** végzi, ami a promoterral **zárt** komplexet alkot
    - Ezután a zárt komplex nyitottá válik amelyben a DNS széttekeredik egy rövid darabon
      - **5' végen** az újonnan szintetizálódó RNS-be elősként beépülő nukleotid egy purinbázis(pppA vagy pppG)
      - Az iniciáció vége az első nukleotid 3'OH-ja és a második nukleotid 5'OH-ját észteresítő foszfodiészter kötés kialakulása
      - Ezután a szigma faktor disszociál a komplexről
  - **elongáció**
    - A core enzim végzi: a -DNS folyamatosan széttekeredik, a szintetizálódó új RNS egy rövid szakaszon a -DNS komplementereként hozzákapcsolódik a -DNS-hez, majd leválasztódik, és az RNS lánc kilép a transzkripció egységből, ezután a DNS visszatekeredik
    - **Transzkripciós buborék:** a széttekeredett DNS helye, ami folyamatosan halad lefelé 5'-3' irányban
    - Mivel a prokariótáknak nincs sejtmagjuk a transzkripció és a transláció nincs térben szétválasztva. A nascens mRNS 5' vége felől már a termináció előtt már megindul a polipeptidlánc szintézise.
  - **Termináció**
    - A szintézis befejező szakasza, a DNS-en kódolt szekvencia alapján (a terminációt előidéző aktív jel mindkét esetben az RNS-en jön létre)
      - **palindrom termináció:** A DNS olyan szekvenciát tartalmaz, ami a DNS szálon balról jobbra és a komplementer DNS szálon jobbról balra olvasva ugyanazok (palindrom szekvencia). Ez az mRNS-re átíródva olyan szakaszt hoz létre, ahol kialakulnak a hidrogénkötések, és a szál hajtűszerű harmadlagos szerkezetet vesz fel. Ez okozza a terminációt.
      - **rho-fehérje termináció:** A rho-fehérje az RNS-t figyeli, amikor a termináló jelet érzékeli, beköt rá és a transzkripció leáll.

## 20. Az operon fogalma, a lac-operon és a lac promoter szerkezete, a prokarióta mRNS szerkezete

### 25. A transzkripció szabályozása prokariótákban, regulátor fehérjék, cisz és transz regulátor elemek a laktóz (lac) –operon működésének negatív és pozitív szabályozása, sztringens kontroll és a prokarióta riboszóma RNS transzkripciója

#### konstitutív mRNS szintézis:

Egy adott fehérje szintézisének aktivitását és sebességét az is befolyásolja, hogy az azt kódoló struktúr gének előtti promoter erős vagy gyenge. A szigma alegység nagyobb affinitással kötődik az erős promoter helyekhez. Ha a sebességet csak a promoter befolyásolja, konstitutív szintézisről beszélünk. Ez esetben semmilyen környezeti hatás nincs befolyással a szintézis sebességére, tehát az így szabályozott transzkripció sebessége egyenletes a sejt teljes életciklusa alatt.

**Regulált mRNS szintézis:** Egy adott fehérje szintézisének aktivitását az befolyásolja, hogy egy adott regulátor fehérje jelen van-e vagy sem.

• **transz regulátor elemek:** olyan regulátor fehérjéket kódoló gének, amik a DNS-re kötődve, befolyásolják az RNS transzkripciós egység bekötődésének valószínűségét. A transz-elem bárhol elhelyezkedhet a DNS-en, akár egy másik DNS molekulán is lehet. Maga a regulátor fehérje a citoplazmában szintetizálódik, s a citoplazmán át éri el a számára specifikus DNS szekvenciát.

• **cisz regulációs elem:** olyan hely a DNS szekvencián, ahova transz regulátor elemmel kódolt fehérje kapcsolódni képes. Ez jól meghatározott helyen (prokariótáknál az általuk regulált transzkripciós egység közvetlen közelében, annak promoterén vagy közvetlenül utána) helyezkednek el és nem kódol fehérjét.

• **represszor fehérjék:** Csak egyetlen transzkripciós egység működését befolyásolja. Ha bekötődik, arról a DNS szakaszcól nem folyhat transzkripció -> **negatív szabályozás.**

◦ **operátor:** a represszor fehérjékhez tartozó cisz-regulációs elem a (promoteren vagy a promoter és a struktúrgének között)

◦ **operon:** egy bizonyos bázisszekvenciájú operátor és az ahhoz bekötött represszor fehérje szabályozása alatt álló transzkripciós egység (pl. policisztronos egység).

◦ **regulátor gén:** represszor fehérjét kódoló struktúrgén (transz elem), a regulált transzkripciós egységen kívül helyezkedik el, saját (gyakran konstitutíven gyenge) promoterrel rendelkezik

◦ **induktor:** a represszor fehérje allosztérikus ligandja, pl. valamilyen tápanyag molekula, ami a represszor fehérjéhez kötve leállítja annak tevékenységét, és disszociál a DNS-ről. Tehát ha valamilyen tápanyagot

vagy mérget bontani kell (a környezet megváltozása), az induktor beköt a represszorhoz, az leválik a DNS-ről, és megindulhat a megfelelő fehérjék szintézise (induktív enzimrendszer - a represszor fehérje csak szabad formában köt az operonhoz, ha induktor-represszor komplex kialakul -> felszabadul).

◦ **indukció:** egy-egy enzim vagy enzimesoport szintézisének szelektív fokozódása

◦ **korepresszor:** olyan ligand, ami a represszor fehérjéhez kötődve alkalmassá teszi arra, hogy a DNS-hez kötődjön. Általában a represszor egy bioszintetikus út végterméke. Ha megjelenik, az azt gyártó fehérjéknek le kell állni, a korepresszor beköt a represszorhoz, az a DNS-re, és leállítja a fehérjék szintézisét (represszor-korepresszor komplex -> gátol).

• **szabályozás a transzkripció idő előtti terminációjával:** kizárólag prokarióták esetében egyes aminosav-szintézisben résztvevő enzimek szintézisénél létezik, amelyre az ad lehetőséget, hogy a transzkripció és a transláció nincs térben és időben szétválasztva.

◦ **attenuátor régió:** a promoter után, a struktúrgének előtt helyezkedik el. Ha a kérdéses aminosavból elegendő mennyiséggel rendelkezik a sejt, a transzkripció az attenuátornál leáll. A jelzést az illető aminosavval töltött tRNS mennyisége adja. Ha a mennyiség nem elegendő a transzkripció túlhalad az attenuátoron, a struktúrgének átíródnak.

• **pozitív reguláció:** olyan regulátor fehérjéken keresztül, melyek a transzkripció iniciációját segítik.

◦ **cAMP akceptor fehérje (CAP):** alloszterikus ligandja a cAMP, az RNSpolimeráz bekötődésének elősegítéséért a cAMP-CAP komplex felelős. A komplex specifikus DNS-szekvenciához köt, ha a cAMP szint elég magas. Ezen operonok működéséhez nem elegendő csak a specifikus induktor, az operon akkor működik (akkor van transzkripció), ha az induktor és a cAMP együttesen jelen van.

◦ **katabolitrepresszió:** a glukóz többi cukor lebontásáért felelős enzimek szintézisére gyakorolt gátló hatása, amely a cAMP szint csökkentésén alapul. Biológiai háttere: a baktérium szívesebben használja fel a glukózt ha rendelkezésre áll, mint más cukrokat (pl. laktóz). Más cukrokat lebontó anyagcsere út enzimeji ezért csak akkor szintetizálódnak, ha 1) jelen van más cukor, 2) nincs jelen glukóz. Ezért a szintézist vezérlő **kettős szabályozás** induktora tetszőleges cukor lehet, de az glukóz jelenléte a cAMP szintet csökkenti. Vagyis a szintézis akkor indul be, ha nincs jelen gluóz (cAMP szint csökkent) és a baktérium ráfanyalodik az alternatív cukorra.

**Példa: lac-operon:** a laktóz operon egy policisztronos egység, egy anyagcsere út enzimeit kódolja (béta-galaktozidáz, permeáz, transzacetiláz), kettős szabályozás alatt áll.

• **Induktív szabályozás:** A lac-represszor fehérje konstitutív gyenge promoter szabályozás alatt áll, kevés termelődik (egy E. Coliban kb 10 db van). A lac-represszor fehérje nagy affinitással kötődik a DNS-en a lac-operon operátorához, és az RNS transzkripció egység kötődési helyével átfed, tehát szterikusan gátol. Induktorja a béta galaktozid a represszor fehérjéhez kötve csökkenti annak affinitását az operátorhoz.

• **Pozitív szabályozás (cAMP):** a lac promoter maga is gyenge promoter, de a transzkripció csak úgy indul be, ha egyidejűleg egy cAMP-CAP komplex is beköt a promoter régió elé.

### Prokarióta riboszóma-RNS transzkripciója:

• **riboszóma-RNS gén:** nem egy hanem több van a prokarióta genomban (pl. E. coli - 7db), a róla átíródó RNS még nem kész rRNS, hanem az elsődleges transzkriptum további módosulásokon megy keresztül, hogy kialakuljon az érett rRNS. (tRNS-re is igaz ez).

• **elsődleges transzkriptum:** tartalmazza a háromféle, különböző riboszóma alegységhez tartozó rRNS-t és egy tRNS-t is. Az egyes szakaszokat spacer régiók választják el egymástól. (Vagyis a különböző rRNS-ek az egyes transzkripció egységekről nem külön-külön, hanem egy hosszú, folyamatos elsődleges transzkriptum formájában szintetizálódnak).

• **ribozim:** kisméretű RNS, ami az elsődleges transzkriptum hasításában játszik szerepet, bizonyos esetekben fehérje nélkül is képes katalizálni a hasítást.

• **poszttranszkripció módosulások:** a hasítás után az rRNS (és a tRNS is) még más módosulásokon is keresztül megy. Pl. rRNS esetében pár bázis metilálódik. (tRNS esetében: metillódás, ritka bázisok beépülése -timin, hipoxantin-, pszeudouridin szerkezet kialakulása, CCA terminális a 3' végre.)

• **riboszómafehérjék szintézise**

◦ a riboszóma génjei 20 különböző transzkripció egységben lokalizálódnak. Ezeknek a fehérjéknek egyforma arányban kell szintetizálnia!

◦ a riboszómafehérjék szintéziséek szabályozása főként a transláció szabályozásának segítségével történik.

▪ **sztringes kontroll:** ha a baktérium nem rendelkezik elég aminosavval a fehérjeszintézishez, a tRNS-ek nem töltődnek aminosavval, és ekkor a tRNS a kész riboszómákhoz kötődik, és egy ppGpp nukleotid szintézisét idézi elő. A ppGpp segíti elő a riboszóma RNS transzkripciójának gátlását, több riboszóma nem keletkezik.

## 21. Az eukarióta transzkripciós egység, az eukarióta RNS polimerázok

## 22. Az eukarióta promóterek, enhancerek és silencerek, a heteronukleáris RNS fogalma

## 23. Az mRNS érése, az 5' – cap, a 3' – poliA farok kialakulása és a splicing mechanizmusa

## 24. Az eukarióta mRNS szerkezete, az alternatív splicing

### Exon:

Az eukarióta gén szerkezet bonyolultabb, mint prokariótáknál. A gén nem minden szakasza kódol fehérjéket. Azok a szakaszok, amik fehérjét kódolnak, exonnak nevezzük.

### Intron:

Olyan génszakasz, ami nem kódol fehérjét, és két exon között helyezkedik el. Az intronok hossza arányaiban nagyobb részét teheti ki a láncnak, mint az exonok. Az érett mRNS-ben az intron már nem található meg.

- Az exon-intron szerkezet nagy jelentőségű lehet az evolúciós fejlődésben
- Az eukarióta génszerkezet speciális tulajdonsága, hogy igen sok ismétlődő szakaszt tartalmaz. Ezek egyaránt lehetnek exon és intron szakaszok.

### Az eukarióta RNS polimerázok:

A transzkripciót három DNS-dependens RNS polimeráz végzi.

- **RNS-polimeráz I.:** A riboszóma RNS-ek szintéziséért felelős (a legtöbb riboszóma alegységet). A kötődése transzkripciós faktorokkal történik a DNS-hez.
- **RNS-polimeráz II.:** A fehérjék szerkezetét kódoló gének transzkripcióját végzi. DNS-hez való kötődéséhez speciális transzkripciós faktorok szükségesek.
  - Érdekesség, hogy a gyilkos galóca alfa-amanitin nevű toxinja gátolja az RNS-polimeráz II aktivitást
- **RNS-polimeráz III.:** A tRNS átíródását végzi, plusz a riboszóma RNS egyik alegységének átírását. A kódoló DNS meghatározott szakaszára kötődik.
- A mitokondriumokban a nukleáris enzimektől különböző, speciális RNS polimeráz működik.

### Az eukarióta transzkripció menete

- **Iniciáció:** Általánosan elmondható, hogy sokkal bonyolultabb, mint a prokarióta transzkripció esetén. Az RNS-polimeráz II nem tud önmagában a DNS-re kötődni a promoternél. A bekötődésnél speciális fehérjék támogatására van szükség.
  - **transzkripciós faktor:** olyan fehérje, ami az RNS-polimeráz II a promoterhez kötődését segíti elő. A transzkripciós faktorok egymáshoz, és az RNS-polimeráz II-höz is kötődnek. Ezt a kromatin hurok térbeli helyzete teszi lehetővé.
  - **cisz-elem:** olyan, a promoterhez közel eső génszekvencia, ahová a transzkripciós faktor kötődni tud
    - **enhancer:** "erősítő dns szakasz", olyan cisz-elem, amihez **specifikus transzkripciós faktorok** kötődnek. Ezek a faktorok segítik az RNS-polimeráz II kötődését a promoterhez. Maga az enhancer a promoterhez képest több ezer nukleotid távolságban, akár 5', akár 3' irányban elhelyezkedhet és mindkét irányban kifejti hatását!
    - **silencer:** "gyengítő DNS szakasz", olyan cisz-elem, amihez egyes gének transzkripcióját *gátló* fehérjék kötődhetnek
  - **TATA-box:** consensus szekvencia (enhancer), ahová specifikus transzkripciós faktor kötődik, a ...(-25)TATA..... helyen
  - **GC-box és CAAT box:** szintén consensus szekvenciák

### • Transzkripció

## • Terminálás

- **AAUAAA-box:** termináló szekvencia, az RNS-re is átíródik, ott ez a poliA-hely. Ezt követi még egy kb. 20 nukleotid hosszú terminális szakasz. Egy speciális endonukleáz enzim az RNS-en felismeri az AAUAAA-t, és elvágja az RNS-láncot, a transzkripció leáll.

• **Érés folyamat:** Az elsődlegesen, a transzkripcióval keletkezett RNS még nem a kész mRNS, mivel exon és intron szakaszokat egyaránt tartalmaz (elsődleges transzkriptum - heteronukleáris RNS -hnRNS). A fehérje szintézist irányító, kész mRNS előállításához tehát az RNS-nek érnie kell, azaz a nem kódoló, intron szakaszokat ki kell vágni az RNS-ből.

- **Cap-képződés:** az RNS 5' végének módosulása (ami elsőnek szintetizálódott...)
  - Tulajdonképpen előbb megtörténik, mint a terminálás
  - Eredetileg egy purin-nukleozid trifoszfát (pppA vagy pppG) van az 5' végen. Ezt cserélik le egy GTP-ből készülő **metileződött guanin nukleotidra**, aminek 5' vége pirofoszfátkötéssel kapcsolódik az RNS lánc elejéhez.
  - Ez a Cap védi az RNS-t a lebomlástól, és a transláció iniciációjához is kell.
- **PoliA-farok képződés:** az RNS 3' végének módosulása (ami utoljára szintetizálódott)
  - A terminálás után egy **poliA-polimeráz** nevű enzim ATP-ből készít kb 250 nukleotid hosszú láncot a 3' végre.
- **splicing:** az intron szakaszok kimetszése, és a maradó exon darabok összeillesztése. Rendkívüli pontosságot igényel, egy nukleotid elcsúszás is framing error-t okoz! A kimetszések helyét speciális gén szakaszok kódolják:
  - **5' splice hely:** az intronnak megfelelő nukleotid szakasz 5' végén helyezkedik el. (vagyis ezzel találkozunk először...)
  - **3' splice hely:** az intronnak megfelelő nukleotid szakasz 3' végén
  - **elágazódási hely:** 20-50 nukleotidnyira az intron 3' végétől, 5' irányban visszafelé
  - Csak akkor lehet splicing, ha mindhárom hely megtalálható az elsődleges transzkriptumon (ahány intron van rajta annyiszor)!!! (Ez ad lehetőséget az alternatív splice-ingra, lsd. alább)
  - **snRNS:** a splicing mechanizmust segítő kisméretű nukleáris RNS-ek
  - speciális fehérjékkel komplexet képezve működnek
  - külön snRNS ismeri fel az 5', 3' és elágazódási splicing helyeket, és magában a splicing mechanizmusban is snRNS-ek vesznek részt
  - **a splicing mechanizmusa:** az elágazódási helyen lévő adenin 2'OH-ja megtámadja az intron 5' végén lévő nukleotidot és foszfodiészter kötést létesít vele. Így az intron 5' végén lévő exon 3' OH ja szabadabbá válik és megtámadja az intron 3' végén lévő exont tartó foszfodiészter kötést. Az intron így lehasad, az exonok csatlakoznak.
- **Alternatív splicing:** Az a jelenség, amikor az eukariótákban egy adott DNS szakasz a splicing helyek megválasztásától függően különböző polipeptidláncokat kódol. Ilyenkor az egyik polipeptidlánc szempontjából intronként viselkedő DNS szakasz egy másik polipeptidlánc szintézisében exon lehet, és fordítva.
  - **Példa:** immunoglobulinok nehéz láncának szintézise. A DNS szálon két terminációs hely van, reguláció szabályozza, hogy a transzkripció melyik terminális ponton áll le. Az egyik esetben a transzkripció terminálás után hiányozni fog a 3' splice hely az intronon, így ez a rész nem fog kivágásra kerülni, vagyis intronként kódoló szekvencia lesz. (Másik terminálás esetben mindhárom splice hely meglesz, a splicing rendben végrehajtódik, de eltérő fehérje keletkezik).

## 26. A transzkripció szabályozása eukariótákban. A transzkripció iniciációjának szabályozása, általános és specifikus transzkripciós faktorok

### 28. Magi (szteroid, tiroid) receptor géncsaládhoz tartozó transzkripciós faktorok.

**Eukarióta transzkripciós faktorok:** alapfogalmakat lásd az előző tételben

• **aktív kromatin:** Azt a harmadlagos DNS szerkezetet, miben a transzkripció lehetővé válik, aktív kromatin szerkezetnek hívunk, ami legalábbis a transzkripció helyén lazább szerkezetű, mint a teljes kondenzáltságú kromoszómákban

- A promoterek bizonyos szakaszai egyáltalán nem rendeződnek nukleoszómákba
- másrészt a transzkripció helyén a nukleoszómák nem alkotnak szoros szerkezetet
- Valószínűleg az illető sejt differenciáltsága szabja meg, hogy a kromatin melyik részen mennyire kondenzált

• **reszponzív elem:** olyan specifikus consensus DNS szekvencia, ami egy-egy specifikus kémiai jelre adott sejtválaszban érintett. Promoteren vagy enhanceren található, kb. 10 nukleotid hosszú. Pl. CRE (cAMP responsive element).

- A rezponzív elemhez kapcsolódik egy transzkripciós faktor, ami a DNShez való kötődést segíti elő.
- A rezponzív elemekhez kapcsolódó specifikus transzkripciós faktorok tehát befolyásolhatnak más transzkripciós faktorokat, ilyen módon valósul meg a szabályozás, és hosszú szabályozási kaszkádok is kialakulhatnak. A transzkripciós faktorok működését a kémiai jelek különböző úton befolyásolhatják (alloszterikus, foszforilációdefoszforiláció, fehérje-fehérje kölcsönhatás stb.)
- A transzkripciós faktorok a DNS nagy árkában létesítenek kapcsolatot a nukleotidokkal (ionos kötés, hidrogénkötés, van de Waals).

• **hisztonok acetilációja:** fontos szerepe van a transzkripció szabályozásában. Az acetiláció megbontja a nukleoszóma szerkezetét, szükséges az iniciációhoz.

• **koaktivátor fehérjék:** az obligált transzkripciós faktorok (TATA, GC és CAATbox hoz kötnek) és a specifikus transzkripciós faktorok (reszponzív elemhez kötnek) közötti kapcsolatot hozzák létre, segítik az RNS-polimeráz II bekötődését. Emellett acetilezik a hisztonokat is.

### A DNS-hez kötődő fehérjék szerkezeti motívumai

• **helix-kanyar-helix:** jellemző rájuk egy rövid alfa-helikális rész, amely a DNS nagy árkába illeszkedik. Dimerként kötődnek a DNS-hez, egymással szomszédos nagy árkokban helyezkednek el.

• **cinkujj:** ismétlődő szerkezet, amiben négy, speciálisan elrendezett Zn<sup>2+</sup> iont közö aminosav oldallánc található. Az így kialakuló motívumnak van egy alfa helikális szegmentje, amely képes kapcsolódni a DNS nagy árkában lévő nukleotidokkal

• **leucinzippar:** nem a DNS-hez kötődésben van szerepe, hanem két fehérje kapcsolódásában (a DNS-hez kötő regulációs fehérjék dimerizációja gyakori). A fehérje alfa helikális szakaszán hat aminosavanként elhelyezkedő leucin a másik fehérje ugyanilyen szerkezetével úgy kapcsolódnak, hogy a leucin fogak egymás közé csúsznak.

### A transzaktivátor fehérjék (speciális transzkripciós faktorok) csoportosítása

• **liganddal aktivált transzaktivátor fehérjék**

- Ligandjuk nélkül inaktív, a citoszolban vagy a sejtmagban ül
- Ligandja hatására (a megfelelő hormon bekötése) a DNS-en a megfelelő rezponzív elemhez beköt, és ezzel elősegíti (néha gátolja) bizonyos fehérjék transzkripcióját
- Pl.: szteroid hormonok receptorai, thyreoideahormon receptora, D-vitamin receptor, reténsav-receptor, aril szénhidrogén receptor.

• **foszforiláció-defoszforiláció elvén működő transzaktivátor fehérjék**

- **CREB:** cAMP dependens protein kináz ÁLTAL foszforilált transzkripciós faktor, a cAMP rezponzív elemhez (CRE) köt.
- **fos és jun fehérjék:** AP-1 regulációs elemhez kötnek, sejtproliferációt szabályoznak.
- **p53:** a p21, sejtproliferációt gátló fehérje génjének transzkripciós faktor. A p53-at kódoló gén tumorszuppresszor gén.
- **Rb:** olyan fehérje, ami komplexet képez egy olyan transzkripciós faktorról, aminek feladata a sejt G1->S átmenetének gátlása. (Lsd. következő tétel!)



27. Protoonkogének és tumor szupresszor gének által kódolt fehérjék szerepe a sejtciklus szabályozásában. A sejtciklus kontrol pontjai a G1/S és a G2/M fázisok határán. Ciklinek és ciklin dependens protein kinázok.

**Protoonkogének és tumor szupresszor gének szerepe a sejtciklus szabályozásában:**

**A sejtciklus szakaszai:**

- **M (Mitózis, osztódás)**
- **G1 (fehérje szintézis (nem mindegyik), ez a leghosszabb)**
- **G0 (csak bizonyos sejteknél, itt látja el a funkcionális működést a sejt)**
- **S (DNS replikáció)**
- **G2 (osztódás előkészítésének fázisa)**

**A sejtciklus szabályozása:**

Az egyes fázisok szigorúan meghatározott feltételek szerint követhetik egymást. Ha ez a szabályozás sérül, mutációk, kóros sejt szaporodás jöhet létre.

- **növekedési faktorok:** olyan extracelluláris kémiai jelek, amik a sejtet a G0 fázisból újra G1 fázisba juttatják.
  - A növekedési faktor jeleit bonyult szignáltranszdukciós rendszer közvetíti a sejtmag felé.
- **protoonkogének:** olyan fehérjéket kódoló gének, amik a sejt fiziológias szaporodásának (stimulálásának) szabályozásában vesznek részt. Ezek transzkripciójának sérülése daganatos folyamatot idézhet elő. (A túl nagy aktivitás idézi elő a daganatot).
- **Szabályozás a G1/S fázis határán:** az a pont, ahol a sejt végleg elközelezi magát a szaporodásra! **Ciklinek + ciklin dependens protein-kinázok!**

- összefoglalva: **p53 (++) --> p16,p21 (++) + CDK2,CDK4 (--)** + **RBE2F (szétesik) --> E2F (aktivizálódik) ---> az S fehérjéinek szintézise ---> S**
- **E2F transzkripció faktor:** Az S fázis beindulásában ennek a transzkripció faktornak van központi szerepe. Ez aktiválja azoknak a géneknek a transzkripcióját, ami a DNS replikációhoz szükséges fehérjéket kódolja. Ezt a komplexet tartja azonban inaktív állapotban az **Rb** transzaktivátor fehérje (retinoblastoma gén kódolja).
  - **p16 és p21:** az Rb-t foszforilálva tartó fehérjék, ami tehát az S fázisba lépést gátolja. A p16 a CDK4, a p21 a CDK2 aktivitását gátolják.
  - **p53:** a p21 fehérje expresszióját szabályozó transzkripció faktor
  - **tumorszupresszor gének:** a p16 és p53 fehérjéket kódoló gének, az általuk kódolt fehérjék csökkent aktivitása okoz daganatot.
- **ciklinek:** olyan fehérjék, melyeknek szintézise és lebontása a sejtciklus szerint történik.
  - **Ciklin D és E**
- **ciklindependens protein kinázok:** olyan kinázok, amiket a ciklinnel komplexet alkotnak.
  - **ciklindependens protein kináz II és IV. (CDK2, CDK4):** Ezek foszforilálják az E2F-et, arról leválik az Rb, és így beindul az S fázis.

• **Szabályozás a G2/M fázis határán**

- **ciklin B**
- **ciklin-dependens protein kináz I. (CDK1):** mennyisége állandó a sejtciklus folyamán, de nem aktív. A ciklin B viszont az S fázisban szintetizálódik csak, mitózis közben degradálódik. A ciklinB-protein kináz a G2/M fázis határán foszforilálja a magmembrán és citoskeleton fehérjeit valamint a H1 hisztont úgy, hogy az M fázis beindulhasson.

**29. A kódszótár, a translációs apparátus komponensei. A translációhoz szükséges sejtorganellek és makromolekulák.**

**30. A tRNS szerkezet és funkció kapcsolata, aminoacil-tRNS szintetázok.**

**31. mRNS, kódon-antikodon kapcsolat, a lötyögés biológiai jelentősége.**

**32. Prokarióta és eukarióta riboszómák szerkezete és kötőhelyei, a riboszóma ciklus**

### **Fehérje:**

Proteinek, aminosavakból felépülő polipeptidláncok, amelyben az egyik aminosav alfa-karboxil csoportja egy másik aminosav alfa-amino csoportjához peptidkötéssel kapcsolódik. A polipeptidlánc szabályosan ismétlődő részből (fő lánc) és változó részből (oldallánc) épül fel.

- **alfa-karboxil csoport:** COO, az aminosav végén (C-terminális)
- **alfa-aminocsoport:** NH<sub>2</sub>, az aminosav elején (N-terminális)
- **polipeptidkötés:** A két csoport kapcsolódása, ahol víz lép ki (H<sub>2</sub>O), és az N és C között kialakul a kötés
- A polipeptidlánc első tagja olyan alfa aminocsoport, ami szabadon marad, az utolsó tagja pedig szintén szabad karboxilcsoport. A lánc felírását az NH<sub>2</sub> végtől a COO vég felé történik.

### **Kodon:**

Egy-egy aminosavnak megfelelő nukleotidhármaszt nevezik kodonnak. Az mRNS-ről a kodonok olvasása 5' - 3' irányban történik

- **64 kodon:** a 4 féle nukleotid 3 féle helyen állhat,  $4^3=64$  féle különböző kodon létezik
- **redundáns kódszótár:** A fehérjék felépítéséhez összesen 20 féle aminosav szükséges, tehát a kodon kódszótár redundáns. A 20 aminosavat 61 kodon határozza meg. A Met (metionin) és Trp (triptofán) csak egyszeresen kódolt, a többi aminosav redundánsan. (vagy ahogy a biológusok mondják, degeneráltan...)
- **stop kodon, nonsense kodon:** 3 kodon semmilyen aminosavat nem kódol, ezek stop (UAA, UGA, UAG) és nonsense kodonok.
- **AUG (startkodon):** jelzi az mRNS-en a polipeptidlánc szintézisének startpontját, de egyben a **Met** aminosav szekvenciája, ami minden polipeptidlánc első aminosav molekulája!
- **olvasási keret:** a start és stopkodon közötti rész
- **univerzalitás:** Minden élőlényre (néhány genetikai zsákutcának tartott egysejtű kivételével...) ugyanaz a kódszótár érvényes

### **A kódszótár:**

#### **A translációs apparátus komponensei:**

- **tRNS (adapter molekula):** amely a nukleotidsorrendet aminosavsorrendé transzformálja. Ezt a szerepet látja el a tRNS.
  - **tRNS szerkezete:** a tRNS kiterítve lóhere alakú molekula, több hurokból áll (a hurkokat hajtúképződmények előzik meg, palindrom szerkezet)
  - **CCA vég:** A tRNS 3'OH vége mindig CCA nukleotidokból áll. Ez transzkripció után alakul ki a molekulán. Ehhez kötődik a tRNS által szállított meghatározott aminosav.
  - **II. hurok (antikodon hurok):** A hurkot 7 nukleotid alkotja, és magában foglalja azt a 3 nukleotidot, amely az RNS láncon a soron következő nukleotidhármas **felismerésére** képes.
    - **antikodon:** nukleotidhármas a II. tRNS hurokban, amely az mRNS-en soron következő kodon komplementere. Tehát elvileg különböző kodonokhoz különböző tRNS tartozik. Az antikodon 5' oldalán mindig egy pirimidin van, a 3' oldalán általában egy módosított purin.
  - **III. hurok:** felelős a tRNS molekula nagyságáért (változtatható, 65-110 nukleotid)
  - (I. hurok - dihidouridin tartalmú, IV. hurok - pszeudouridin hurok)
  - **kodon-antikodon lötyögés:** aminosavat jelentő különböző kodonból általában több van, mint ahány féle tRNS molekulát a sejt tartalmaz (minden aminosavnak más-más tRNS, de nem minden kodonhoz tartozik egy másik tRNS). Tehát az azonos aminosavakat jelző különböző kodonokat gyakran ugyanaz a tRNS molekula ismeri fel. Ez úgy lehetséges, hogy ebben a térbeli formációban a komplementaritás

nincs olyan szigorú sztérikus feltételhez kötve, mint a DNS kettőslánc esetén. A lötyögés mindig az antikodon 1. és a kodon 3. helye között alakul ki, ha az 1. helyen uracil, guanin vagy inozinsav található. Lehetséges például U-A-n kívül U-G, vagy G-C-n kívül G-U, is.

• **inozinsav:** olyan posztszintetikusán módosult nukleotid, ami a tRNS antikodon részeként U,C,A-val egyaránt képes kötést kialakítani.

◦ **aminoacil-tRNS-szintetáz:** olyan enzim, ami a tRNS-hez hozzáköti az antikodon által meghatározott aminosavat. Figyelem! Csak ez biztosítja a dekódolás hűségét! A reakció mérlege: **ATP+ aminosav + tRNS -> aminoacil-tRNS+AMP+PPi** (két lépésben, első lépés az aminosav aktiválása ATP-vel)

- Minden aminosavat saját, csak rá specifikus aminoacil-tRNSszintetáz köt a megfelelő tRNS-re.
- a tRNS felismerése könnyű, mert a nukleotidavsorrendje a különböző tRNS-eknek különböző. Az aminosavak viszont hasonlóak. Hibásan aktivált aminosav esetén a tRNS-hez való kötődés egy második allosztérikus ellenőrzési lehetőség. A kötődés csak úgy jöhet létre, ha a megfelelő aminosavat hozta az enzim.

• **Riboszóma:** két alegységből álló szerkezet, ami az aminosavlánc szintézisét végzi. Inaktív állapotban a két alegység disszociál. A riboszóma ciklus az alegységek ciklikus disszociációját és összekapcsolódását jelenti.

◦ **S=Svedberg egység, a molekula méretére és alakjára egyaránt jellemző.** A centrifugás ülepítés mértéke alapján határozzák meg

◦ **prokarióta riboszóma:** molekula asszociált szerkezetben **70S riboszóma** (29 nm x 21 nm)

- **nagy alegység:** 50 S alegység, két rRNS-t tartalmaz: 5S rRNS, 23 rRNS (összesen 3120 nukleotid), + 34 különböző fehérje
- **kis alegység:** 30 S alegység, 16 S rRNS (kb 1500 nukleotid) + 21 fehérje

◦ **eukarióta riboszóma:** az aktív, asszociált szerkezet **80S riboszóma** (32 nm x 22 nm)

- **nagy alegység:** 60S alegység, három rRNS-t tartalmaz : 28S rRNS, 5,8S rRNS, 5S rRNS (5280 nukleotid) + 45 fehérje
- **kis alegység:** 40S alegység, 18S rRNS-t + 33 fehérjét tartalmaz

**A translációhoz szükséges sejtorganellek és makromolekulák:**

Összességében: mRNS, tRNS, aminosavak, ATP, aminoacil-tRNS-szintetázok, riboszóma, különböző enzimek ill. translációs faktorok.

### 33. A transláció iniciációs szakasza prokariótákban és eukariótákban

### 34. A transláció elongációs szakasza, terminálás

### 35. Az eIF2 faktor foszforilációjának szerepe a transláció szabályozásában

#### A transláció iniciációs szakasza prokariótákban és eukariótákban (lásd 3-37 ábra)

**Irányítás:** A transláció az mRNS-en 5' 3' irányba olvasás, miközben a polipeptidlánc aminosavakból az NH<sub>2</sub> végétől a COOH vége felé növekszik

#### Iniciációs komplex

- Az iniciációs komplex kialakulása a polipeptid lánc szintézis első lépése • **A riboszóma komplex kis alegységének bekötődése: (30S)** tulajdonképpen az mRNS kötődik hozzá a kis alegységhez, a start AUG kodonnál
- **Az AUG iniciációs tRNS bekötése:** A start AUG kodonhoz, a 30S szerkezet és a kis alegység együtt a **30S iniciációs komplex**
  - Ez a metionint szállító tRNS annyiban különbözik a nem iniciációs, szintén metionint szállító tRNS-től, hogy a bekötődés után ennek a metioninját formilezik (HC=O csoport). Figyelem! Eukariótákban ez a lépés kimarad, de nem is szükséges, mert az eukarióta mRNS csak egyetlen polipeptidláncot kódol.
- Az iniciációs komplex kialakításához GTP és ún. iniciációs faktor fehérjék szükségesek (prokariótákban IF1, IF2, IF3)
  - **IF3:** Az IF3 megakadályozza, hogy az üres 30S és 50S riboszóma alegység asszociáljon
  - **IF2:** GTP kötő fehérje, segíti az mRNS és az iniciátor tRNS kötődését a 30S alegységhez
- **70S iniciációs komplex:** miután a tRNS bekötött, az 50S alegység asszociál a komplexhez, és az iniciációs faktorok disszociálnak (a GTP hidrolizálása miatt GTP → GDP + Pi). Két kötőhely alakul ki rajta:
  - **P kötőhely:** peptidil kötőhely, az AUG kodon és a hozzá illeszkedő formil-metionil-tRNS ide kerül
  - **A kötőhely:** aminoacil kötőhely, ide pont az mRNS második kodonja kerül, az AUG-tól 3' irányban

#### Elongáció:

ciklikusan ismétlődő három lépésből áll

- **A tRNS bekötődése az A kötőhelyre:** ehhez GTP-t igényel, (ugyanaz a reakció mint az IF2-nél)
  - **EF-Tu:** GTP kötő fehérje (G-fehérje), ami a tRNS-nek az A helyhez kötődését segíti, ún. **elongációs faktor**. A GDP az EF-Tu-n marad, és inaktívvá teszi
  - **EF-Ts:** Megszabadítja az EF-Tu-t a ráragadt GDP-től, így az ismét aktív állapotba tud kerülni. Ez bizonyos szinkronizációs késleltetést visz a transláció folyamatába (kodon-antikodon illeszkedéshez szinkronizál)
- **Az első peptidkötés létrehozása:** A P helyen lévő iniciációs tRNS formilmetionin csoportja és az A helyre bekötött tRNS aminosava között.
  - **peptidil-transzferáz:** enzim katalizálja a peptidkötés kialakulásának reakcióját, bár az aminoacil-tRNS reakcióban raktározott ATP energiájának terhére magától is végbemegey. Egyúttal a peptidkötés létrejötte leválasztja az aminosavat az első tRNS CCA végéről, csak a másodikhoz marad kötve a második aminosav.
- **Transzlokáció:** a riboszóma elgördülése az mRNS-hez képest, egy shift 3' irányba, egy GTP terhére
  - **EF-G (transzlokáz):** a transzlokációt segítő elongációs faktor
- Ezek a lépések ismétlődnek egészen az mRNS, ezzel a polipeptidlánc végéig

#### Termináció:

A transláció befejező lépése

- **Stop kodon megjelenése:** Amikor az utolsó kodonnak megfelelő aminosav beépült a láncba, a következő transzlokációval az utolsó kódoló kodon a P helyre, az A helyre pedig egy STOP szekvencia kerül.
  - Ennek hatására az A helyen nem tRNS, hanem egy **terminációs faktor (RF1, RF2, RF3)** köt be.
  - Ennek hatására viszont egy enzim lehasítja a polipeptidláncot a P helyen lévő utolsó tRNS-ről.
  - A polipeptidlánc elszabadul, a riboszóma pedig alegységekre esik szét.

**Energiagény:** A polipeptidlánc szintézise peptidkötésenként 4 makroerg kötés hidrolízisébe kerül (2 GTP az elongációhoz, 2 ATP-ből AMP + 2 PPi aminoacil-tRNS kialakulásakor). A polipeptidlánc iniciációja további 3 makroerg kötet igényel (2 az iniciátor amino-acil-tRNS kialakulásához, 1 a bekötődéshez kell).

**Poliszóma:** Egy riboszóma, méreteinél fogva kb. 80 nukleotidnyi helyet foglal el az mRNS-ből. Ha az mRNS 5' végén az első 80 nukleotid már transzlálódott, egy következő riboszómába vezethető, és az is elkezdheti a transzlációt. Ez így megy egészen addig, ahány riboszóma elfér az adott hosszúságú mRNS-en. Ez a lánc a poliszóma. (lásd 3-38 ábra)

**párhuzamosítás:** A transzláció az mRNS 5' végén már akkor megkezdődhet, amikor a 3' végét a DNS-ről még át sem írták (csak prokariótákál)!

### **Eukarióta faktorok:**

Jelölésük: eIF<sub>n</sub>, eEF<sub>n</sub>, és eRF<sub>n</sub>, ahol I iniciáció, E elongáció, R termináció, n pedig a résztvevő faktor fázissorrend száma az adott reakcióban

• **eIF2:** fontos iniciációs faktor, az iniciációs tRNS bekötését segíti elő. GTP-GDP kötő fehérje, ha GDP van rajta, akkor inaktív. A vírusoknál megismert védelmi mechanizmusban az **interferonok** közvetítette vészszignál által indukált **kettős láncú RNS-dependens protein kináz**, kettős szálú RNS megjelenése esetén (=vírusfertőzés), az eIF2-t foszforilálja, így a fehérje szintézis nem indulhat be, amíg a kettős szálú RNS jelen van a sejtben (foszforilált állapotban eIF2 a GDP-t nem tudja GTP-re cserélni, ezért inaktív marad). Az eIF2 ezen kívül pl. a globin termelésben is szabályozó funkciót tölt be (retikulocitákban). Ha elfogy a hem, az eIF2 inaktív lesz, hem jelenlétében viszont egy enzim defoszforilálja, és beindulhat a hemoglobin termelés.

### • **Egyéb különbségek az eukariótáknál:**

- az eukarióta mRNS csak egyetlen polipeptidláncot kódol
- az első beépülő (start) metionin nem formileződik, mert eukariótákban hiányzik az ezt a reakciót katalizáló enzim
- a 40S riboszóma kis alegység csatlakozik az mRNS 5' Cap-jéhez, 3' irányban keresi az első AUG-t, ez a mozgás ATP-t igényel.

## 36. A fehérje szintézis gátlószerei

### A fehérjeszintézis gátlószerei:

- A fehérjeszintézis mechanizmusában részt vevő komponensek működésének gátlása az egyik leggyakrabban használt fegyver kórokozó baktériumok ellen
- A módszer lényege az, hogy a baktériumok prokarióták, és a prokarióták translációs faktorai különböznek az eukarióta translációs faktoroktól. Ezért a prokarióta translációs faktorok gátlása az eukarióta sejtekből felépülő szervezetre nincs káros hatással.
- **az antibiotikumok:** prokarióta translációt gátló anyagokat bizonyos gombák termelnek, ezek szintetikus származékai és továbbfejlesztett módosulatai az antibiotikumok
  - **sztreptomicin:** gátolja az iniciációt (a kis alegységhez kötődnek) és az mRNS téves leolvasását, kódtévesztést okoz a prokariótákban
  - **neomicin és gentamicin:** szintén az iniciáció kis alegységéhez kötődnek, (de más helyen, mint a sztreptomicin), és kódtévesztést okoznak
  - **tetraciklinek:** a kis alegységhez kötődnek, és az aminoacil-tRNS bekötődését akadályozzák meg
  - **eritromicin:** a nagy alegységhez kötve a transzlokációt gátolja
  - **klóramfenikol:** nagy alegységhez köt, gátolja a peptidil-transzferáz aktivitást
- eukariótákban a mitokondriumokban lévő translációs apparátus komponensei eltérnek a citoszolban találhatótól, és hasonlítanak a prokarióta megfelelőjükre. Így nem jelenthető ki, hogy az antibiotikumoknak nem lehet az eukariótákat is károsító hatásuk.
- **transzlációt eukarióta sejtekben gátló vegyületek:** nem minősülnek gyógyszernek, de hasznosak a megismerésben
  - **puromicin:** tRNS-re hasonlít a felépülése, beköt a P helyre, korai láncterminációt okoz. Emellett a klóramfenikol analógiájaként viselkedik eukariótákban.

### 37. A fehérjék sejtorganellumokba irányítása és a transláció utáni módosulások, szekréciós fehérjék szintézise és transzportja az ER membránban. A glikoproteinek szintézise.

#### A fehérjék sejtorganellumokba irányítása:

elvé az, hogy a frissen szintetizált fehérjék olyan jeleket tartalmaznak, ami arra utal, hová kell őket szállítani a sejten belül. Ezek a helyek lehetnek: citoszolba, plazmamembránba, külső membránba, az extracelluláris térbe, sejtmagba vagy mitokondriumba (utóbbi kettő eukariótáknál)

• **lásd: 3-39 ábra**

• **szignál peptidszekvencia:** olyan rész a fehérje aminosavláncán, ami arra utal, hová kell irányítani az elészült fehérjét (pontosabban a riboszómát irányítja az ER retikulum membránhoz). Ez a szignál általában a fehérje NH<sub>2</sub> végéhez közel helyezkedik el. Tartalmaz egy olyan részt, amit egy speciális részecske ismer fel, és egy olyat, ahol a szignált le lehet hasítani.

• **prefehérje:** olyan fehérje, ami szignál peptidszekvenciát tartalmaz. A szignálszekvenciát a transláció utáni módosulások keretében egy speciális enzim kivágja, ezután normál fehérjéről beszélünk. (létezik pro-fehérje is, de ez azt jelenti, hogy szintetizálódás után inaktív).

• **szignálfelismerő részecske:** olyan citoplazmai ribonukleoprotein részecske, ami kb 300 nukleotidból és ehhez kapcsolódó 6 fehérjéből áll.

- A szignálpeptiddel rendelkező fehérjét gyártó riboszóma közelében helyezkedik el
- nagy affinitással beköt a riboszómához, amint a szignál-peptidszekvencia megsintetizálódott.
- Ennek hatására a transláció üteme lelassul (az elongációt lassítja).
- Az így képződött komplex a endoplazmás retikulum membránjához diffundál

• **dokkoló fehérje:** olyan fehérje az endoplazmás retikulum membránjához kötve, ami képes felismerni, és megkötni a szignálfelismerő részecske-riboszómafélkész fehérje komplexet. A bekötés után a komplex disszociál, és a riboszóma tovább diffundál a riboforinhoz.

• **riboforin I és II:** olyan membránfehérje, amely képes a riboszómát megkötni, és a készülő polipeptid láncot az endoplazmás retikulum lumenébe irányítja (a kötődés helyén lokálisan megnyitja a membránt, a transzlokáció aktív folyamat ATP terhére). A frissen szintetizált polipeptidlánc ekkor még nincs felcsavarodva, ez is könnyíti a transzlokációt!

• **szignál peptidáz:** olyan enzim, ami a DER lumenén belülre került polipeptidláncon felismeri a szignál peptidszekvencia vágási helyét, és levágja a polipeptidlánctól

#### • Csoportosítás a transzlokáció helye szerint:

• **citoszolban szintetizálódik:** a citoszolban található szabad riboszómákon

- Ami eleve a citoszolban marad
- Ami a sejtmagba megy, de az aminosavszekvencia speciális jelet tartalmaz, ami alapján a sejtmagba kerül
- Ami a mikokondriumokba megy, de az aminosavszekvencia speciális jelet tartalmaz, ami alapján a mitokondriumba kerül. Mindkét esetben a mozgás energiaigényes folyamat

• **A durva endoplazmás retikulumon szintetizálódik:** a membránhoz kötött riboszómákon. Itt olyan jelzés kerül az aminosav szekvenciába, aminek hatására a DER membránján keresztül annak lumenébe irányítja az elkészülő fehérjét.

- a lizoszómákba kerülő fehérjék
  - **Lizoszóma:** A lizoszóma a citoplazmában elhelyezkedő eukarióta sejtsejtszervecske, melynek alapvető jelentősége van a sejtvédekezési mechanizmusában és bizonyos anyagcserefolyamatokban.
- a plazmamembránba integrálódó fehérjék
- a szekretálódó fehérjék

**A transláció utáni módosulások:** Eslősorban a fehérjék éréséhez szükségesek. A megsintetizált polipeptidláncon még kisebb-nagyobb módosulások következnek be, illetve még nincs meg a fehérjére jellemző harmadlagos szerkezet.

• **Módosulások:**

- Az NH<sub>2</sub> vég deformilezése
- A láncvégi aminosavak lehasítása

- **tekeráz enzim:** a polipeptidláncon diszulfidhidak kialakulását elősegítő enzim (protein-diszulfid-izomeráz).
  - **molekuláris chaperonok:** A harmadlagos szerkezet kialakításában vesznek részt. Olyan fehérjék, amik az instabil polipeptid konformációhoz kötve elősegítik a stabil konformáció kialakulását. A nascens polipeptidlánc N-terminális végéhez kötődve megakadályozzák az idő előtti, nem natív szerkezetűvé történő összetekeredést. (hősokk esetén is)
  - **acetileződés:** Egyes fehérjék hosszú szénláncú zsírsavakkal acetileződnek (fontos szerepe van abban, hogy a membránhoz utána ki tudnak horgonyozni)
  - **foszforilálódás:** a fehérjék 30%-ra jellemző.
- **A Golgi-komplex szerepe:** itt gyűlnek össze a szintetizált fehérjék, és a komplex feladata a megfelelő helyre irányítani őket.
    - **lásd: 3-41 ábra**
    - **transzfer hólyagocskák:** a sejten belül ilyen, membránnal határolt hólyagocskák szállítják a fehérjéket a Golgi komplex különböző membránzsákjaiba. A transzfer hólyagocskák különbözik aszerint, hogy mi a transzlokáció végső állomása!
    - **cisz-kompartment:** az endoplazmás retikulumhoz van közel. Ez fogadja a transzfer hólyagokat, amik a ER-ből jövő fehérjéket szállítja
      - mannózegységek hasadnak le a a membránba kerülő vagy szekretálódó fehérjékről.
      - mannózegységek kerülnek az olyan fehérjékre, amik a lizoszómába kerülnek. Ezt, mint speciális jelet ismeri fel egy receptor, és egy speciális transzport hólyagocskával kerül kapcsolatba, amit a lizoszómához transzferál.
    - **középső kompartment:**
      - N-acetil-glukozamin és fukózegységek hozzáépülése az oligoszacharid oldallánchoz
    - **transz kompartment:**
      - galaktóz és szialinsav hozzáadása az oldallánchoz.
      - hidrofób jellegű fehérjék a membránhoz jutnak és integrálódnak
      - hidrofil jellegű fehérjék szekretálódnak. Ezek speciális szekréciós zsákocskákba kerülnek. Ezek ürülése vagy folyamatos (pl. májenzimek), vagy regulált.
      - konstitutív szekréciós úton távoznak a speciális jelet nem tartalmazó fehérjék.
      - a sejtmagba jutó fehérjék az ER-ből apró pórusokon át transzferálódnak
  - **Glikoproteinek szintézise:** az endoplazmás retikulumhoz kötött riboszómákon szintetizálódó lizoszomális, plazmamembrán és szekretálódó fehérjék. Kovalansen kötött szénhidrátkomponensük kialakítása több lépésben történik.
    - **core-glikolizáció:** EP retikulum lumenjében megy végbe, 14 tagú oligoszacharid kötődik a fehérjéhez, amit a dolikol-foszfát szállít.
    - **terminális glikolizáció:** A glikoproteinek szénhidrát egységei a Golgi minden kompartmentjében módosulhatnak.



## II. Molekuláris biológiai módszerek

### 38. Fizikai-kémiai elválasztási módszerek (elektroforézis, kromatográfia) alapelvei, Az enzimdiagnosztika alapjai. Makromolekulák szintézisének mérése jelzett prekursorokkal.

#### 1. Elektroforézis

- Töltéssel rendelkező molekulák (pl. aminosavak, peptidek, fehérjék, nukleotidok, nukleinsavak) szétválasztása elektromos térben történő vándorlás alapján.
- A szétválasztás a molekulák mérete és töltése alapján történik (fajlagos töltés).
- A nukleinsavak esetén ez csak a mérettől függ, ezt elérhetjük fehérjék esetében is, ha a töltésüket egyenlővé tesszük (SDS kezeléssel).

#### 2. Kromatográfia

- molekulák szétválasztására szolgáló módszer, az egyik fázis álló (stacioner), a másik mozgó (mobilis), amely átáramlik az álló fázison

1. géلكromatográfia: eltérő molekulaméret alapján
2. adszorpciós kromatográfia
3. megoszlási kromatográfia (eltérő oldhatóság különböző oldószerekben)
4. ioncserélő kromatográfia (töltéssel rendelkező molekuláknál)
5. affinitáskromatográfia (biospecifikus adszorpció alapján)

Mindkét módszernél számos hordozó használható (papír, gél, vékonyréteg, oszlop, magas nyomás (HPLC), gáz (GLC)).

#### Enzimdiagnosztikai mérések:

- alapegyenlet: **E (enzim) + S (szubsztrátok)  $\leftrightarrow$  ES komplex  $\rightarrow$  E (enzim) + T (termékek)**
- az enzimaktivitás mértéke: 1Unit = 1mikromol termék /perc
- mérési módszerek:
  - keletkező termék mérése spektrofotometriával
  - keletkező termék mérése spektrofluorimetriával
  - radioaktivitás mérés: jelzett szubsztrátból jelzett termék mérése alapján
- általában az enzimfehérje mennyiségére vonatkoztatják
  - specifikus aktivitás: U/mg fehérje
- **Miért mérnek enzimeket vérből/szérumból?**
  - Az elpusztult sejtek szétesnek és a fehérjék belőlük a vérbe kerülnek
  - az enzimek részben jellemzőek a sejtípusra
  - ezért a szérumban lévő enzimaktivitás emelkedése bizonyos szervek károsodására utal (pl. máj - izoenzimek).

#### Makromolekulák bioszintézisének mérése jelzett prekursorokkal:

- **DNS szintézis kvantitatív mérése:** jelzett 3H-t vagy 14C-timidint adunk a sejtekhez, 30-60 percig hagyjuk beépülni, majd a sejteket kicsapjuk 1M perklórsavval. Utána 0.5M perklórsavval hidrolizáljuk és a centrifugált oldatból folyadék-szintillációs módszerrel mérjük a radioaktivitást. DNS kvantitatív mérés: a dezoxiribóz fotometriáson meghatározható
- **RNS szintézis kvantitatív mérése:** a fentihez hasonló, de 3H vagy 14C-uridin beépülését kell mérni és a ribózt kell meghatározni
- **Fehérjeszintézis mérése:** 3H vagy 14C-jelzett esszenciális aminosavat kell a sejtekhez adni és a fentiekhez hasonlóan kicsapni. A kicsapódott fehérje NaOH-ban feloldható, a jelzés mérhető. A fehérje mennyisége biuret-reakcióval vagy coomassie-blue festékkel határozható meg. Használható aminosavak: általában valin vagy leucin. Nem esszenciális aminosav esetén a sejt által termelt aminosav hígítja az izotóp jelzést.

### 39. A prokarióta és eukarióta genom szerveződése közti különbségek, méret és genetikai információ tartalom, repetitív és nonrepetitív szekvenciák, DNS reasszociációs kísérletek, megszakított gének: exonok és intronok jelentősége

#### Genom szerveződésének elvei:

- **Prokarióta**
  - cirkuláris DNS, nem kapcsolódik fehérjékkel, nincs sejtmag
  - gének átírása szabályozott, az operonban folyamatosan helyezkednek el a struktúrgének -> policisztronos mRNS, rövid életű, már a transzlációs során bomlani kezd
  - transzkripció-transzláció időben/térben nincs szétválasztva
- **Eukarióta**
  - a DNS hisztonfehérjékkel komplexet alkot, kromatin, sejtmag, osztódáskor kromoszómákba szerveződik
  - különbség a kódoló, nemkódoló szakaszok között (exon, intron) (emberben kb. a DNS 10%-a kódol fehérjét)
  - az mRNS-nek érnie kell (splicing), ki kell jutnia a sejtagból, a riboszómán íródik át.
- **repetatív szekvenciák:** olyan DNS szakaszok, amelyek a genomban többször ismétlődnek. Az ismétlődések számának eltérése polimorfizusra ad lehetőséget.
- **szatellita DNS:** nagy számban előforduló, nem átíródo szekvenciák, egymás után helyezkednek el a genomban. Változó a hosszuk (VNTR v.num.tandem.rep). Vannak szórtan elhelyezkedő, nagy számban ismétlődő szekvenciák, amik lehetnek rövidek (SINE) és hosszúak (LINE). Feltehetőleg kromoszómák szerkezetének szerveződésében van szerepük.
- **struktúrgén:** olyan génszakaszok, amelyek fehérjeszekvenciákat kódolnak.
- **mobil genetikai elemek: transzpozonok,** a genomban könnyen helyet változtató génszakaszok. Növelik a változatosságot, áthelyeződésük új gének átíródását indíthatja el. Evolúciós jelentősége lehet.

## 40. Restriktív enzimek, restriktív endonukleázok jellemzői. DNS fragmentek elektroforézise – Restriktív térképek készítése

### restriktív enzimek:

olyan enzimek (endonukleáz-metiláz pár), amelyek a baktériumok specifikus fágok elleni védekezését biztosítják. Működésük alapja egy specifikus nukleotidszekvencia felismerése. Többféle csoportjuk ismert (azonos DNS szekvenciákat ismernek fel, jelölésük I,II,III...)

- **restriktív endonukleázok:** olyan enzimek, amik a DNS-t specifikus nukleotidszekvenciáknál hasítják el. A hasítás a DNS mindkét szálát érinti.
  - A restriktív endonukleázok a laboratóriumi géntechnika fontos alapeszközei
  - Általában 4-10 nukleotid egységből álló **palindrom** szekvenciákat ismernek fel. Az endonukleáz minden esetben (+ és - szálon is) a szekvencia meghatározott (utolsó) nukleotidja mellett hasít.
  - **tompá vég:** a DNS két szálán lévő szekvencia olyan, hogy az endonukleáz pont egymással szemben lévő nukleotidok mellett hasítja el a DNS két láncát. Ezáltal a keletkező fragmentumok egyszeres, túllógó száltól mentesek lesznek.
  - **ragadós végek:** Ha a DNS szekvencia olyan (pl. palindrom szekvencia miatt), hogy az endonukleáz hasítási helyei a két szálon pár nukleotid távolságban helyezkednek el, a két fragmentumon egymással komplementer, rövid egyszeres szálak maradnak. Ezek a szálak aztán az eredeti komplementer párjukkal, vagy más, ugyanilyen nukleáz által hasított fragmentum komplementer szálvégével könnyen "összeragadnak".
    - (pl. 5'G\*AATTC3' és 3'CTTAA\*G5' (\* a hasítási hely) ragadós végei az AATT-TTAA)
    - Ezzel tehát tetszőleges sejtéből származó DNS molekulák azonos endonukleázzal hasítva maguktól összekötnek a ragadós végeknél.
    - A spontán kialakuló végeken a **DNS-ligáz** enzimmal alakítják ki a hiányzó foszfodiészter kötések.
  - restriktív enzimekből ma már több százat azonosítottak és tisztítottak, kereskedelmi forgalomban kaphatók. Elnevezésük az őket termelő baktérium nevéből és római számból áll (ha a baktérium több félélt is termel).
- **restriktív metiláz:** A baktérium saját DNS-ének megóvása az endonukleáztól. A metiláz ugyanazt a DNS szekvenciát ismeri fel mint az endonukleáz, csak más időpontban. A metiláz közvetlenül a DNS replikáció előtt metilálja a specifikus DNS szakasz egy nukleotidját, ami megakadályozza az endonukleáz tevékenységét.

**Rekombináns DNS molekula:** Két különböző DNS molekulából származó DNS fragmentum készítése és összeillesztése restriktív endonukleáz és DNS-ligáz enzim segítségével. Ezt a folyamatot szokták génszúrásnak is nevezni.

### Restriktív térképek készítése

- **DNS nukleotid szekvencia analízise:** történhet olyan módon, hogy csupán annyit vizsgálnak meg, hogy egy adott sejtéből származó DNS molekula illetve a restriktív endonukleáz elegye létrehoz-e hasítási reakciót. (ezt úgy mondják, hogy a DNS molekulát restriktív enzimmal emésztik)
  - **emésztés restriktív enzimmal:** a DNS molekula több helyen is tartalmazhatja azt a szekvenciát, amit a restriktív enzim felismer, és hasít. A hasítások azonban nem egyszerre következnek be: az emésztés idejének változtatásával elérhető, hogy a lehetséges hasításoknak csak bizonyos része menjen végbe.
  - **agaróz-gélelektroforézis:** Eljárás a DNS fragmentek hosszának detektálására. A fragmenteket elő kell kezelni:
    - **etidium-bromid festéssel** (fluoreszcencia), a megvilágított DNS fragmentek fluoreszcensen világítanak
    - **5' vég radioaktív foszfáttal való megjelölése:** ekkor autoradiográfias képalkotással láthatóvá válnak azok a DNS fragmentek, ami az 5' véget tartalmazzák
    - **gélelektroforézis:** A DNS molekuláknak negatív töltése van. Az elektroforézis során az anód és katód közé nagy feszültséget kapcsolva statikus elektromos tér alakul ki. Az elektródák között agaróz gél van. A DNS-eket a géltre helyezve azok elindulnak a katód

felé, de az egyes fragmentumok mozgásának sebessége a fragmentum tömegével, tehát hosszával arányos. Az elektrosztatikus tér megszűnte után a különböző hosszúságú DNS fragmentumok különböző távolságban lesznek a katódtól, és egy etalon (létra) alapján meghatározható az egyes fragmentumok hossza.

- A restrikciós térkép úgy készül, hogy a DNS molekulákat kétfelé választják és a kettőt különböző ideig emésztik, ugyanazokkal a restrikciós endonukleázokkal
  - **1. minta, teljes emésztés:** az emésztés idejét olyan hosszúra választják, hogy nagy valószínűséggel a DNS fragmentumokat (és azok további fragmentumait) minden lehetséges restrikciós helyen elhasítsák a restrikciós enzimek. Ezáltal a lehető legrövidebb fragmentumok alakulnak ki. (**legrövidebb fragmentumok**)
  - **2. minta, részleges emésztés:** a 2. mintát csak annyi ideig emésztik, hogy csak a hasítások bizonyos része tudjon végbemenni. Ezáltal hosszabb, és rövidebb fragmentumok keletkeznek. Egy részük természetesen az legrövidebb fragmentumokkal azonos hosszúságú, más fragmentumok pedig a legrövidebb fragmentumok összegeiből állnak.
  - Meg lehet határozni, hogy a hosszú fragmentumok melyik rövid fragmentumok összegéből állnak össze, ezzel pedig egy egyenletrendszert alkothatunk, és a kirakós játékhoz hasonlóan össze lehet válogatni, hogy az eredeti DNS-ben a legrövidebb fragmentumok milyen sorrendben álltak össze. Ez a restrikciós térkép.
- **Mutáció vizsgálata:** pontmutáció esetén ha a mutáció a restrikciós helyet érinti előfordulhat, hogy az endonukleáz azon a helyen nem fog hasítani (vagy épp olyan hely jön létre ahol hasítani fog). Így megváltozik a fragmentumok száma és hossza.
  - **RFLP-térkép:** restrikciós fragment hossz pilomorfozisz, két egyed DNS-e közötti különbségeket mutatja ki.

#### 41. A DNS bázisszekvenciájának meghatározása kémiai hasítási módszerrel (Maxam-Gilbert) és megszakított enzimatis szintézissel (Sanger)

##### DNS bázisszekvenciájának meghatározása:

Alapvetően csak pár száz nukleotidnyi szakaszok bázisszekvenciájának meghatározása megoldható a mai módszerek érzékenysége mellett. Persze a hosszabb DNS is fragmentálható restrikciós hasítással. Két féle módszer terjedt el.

##### Specifikus kémiai hasítás (Maxam-Gilbert)

#### AUTORADIOGRAM OF SAMPLE MAXAM-GILBERT SEQUENCING GEL

G	A+G	C+T	C	SEQUENCE (END)
		---	---	C (3')
---	---			G
	---			A
		---		T
		---		T
		---		T
		---	---	C
---	---		---	G
---	---			G
	---			A
		---		T
		---	---	C
	---			A
				A (5')

- **3' vég jelölése:** Az egyik lánc 3' végeit <sup>32</sup>P-vel jelzett dezoxi-ribonukleotid segítségével megjelölik (DNS-polimeráz rakja rá).
- **Lánc denaturációja:** Magas hőmérsékleten a két DNS két láncát denaturálják, a továbbiakban csak a jelzett végű láncot használják. Gyakran a komplementer szálon is elvégzik ugyanazt a vizsgálatot.
- **A preparátumot négy részre osztják:** specifikus kémiai hatással az egyes preparátumokban egy-egy adott nukleotid összes előfordulási helye mentén hasítják a láncokat, de a reakciót mindig csak annyi ideig folytatják, hogy az összes hasításnak csak egy kis része tud bekövetkezni. Ezután a különböző lánchosszúságú egyszálú darabokat poliakramid-gélelektroforézis segítségével szétválasztják. A gélt ezután autoradiográfia módszerével vizsgálják. Csak azok a fragmentumok láthatók, amik a 3' véget is tartalmazzák! Az egyes preparátumok:
  - **G:** csak a guaninnál hasít
  - **A+G:** adenin vagy guaninnál hasít
  - **C+T:** citozinnál vagy timinnél hasít
  - **C:** citozinnál hasít
- **A sorrend meghatározása:** A gélelektroforézist a négy preparátumra párhuzamosan futtatják. Ha például a C citozin preparátum az 5, 7, 13 helyen ad csíkot, akkor citozin biztos volt az 5., 7., 13. helyen. A+G esetén, ha ugyanabban a pozícióban a G üres, akkor A volt, egyébként G. (segít a 3-44. ábra, de vigyázat, a gél melletti betű létra el van csúsztatva 1-el felfelé...)

## Megszakított enzimatisz szintézis (Sanger):

### AUTORADIOGRAM OF SAMPLE SANGER-COULSON SEQUENCING GEL

A	C	G	T	SEQUENCE (END)
			---	T (3')
	---			C
	---			C
		---		G
		---		G
			---	T
		---		G
---				A
	---			C
	---			C
		---		G
			---	T
	---			C
---				A (5')

A módszer a denaturált DNS egyik szálából indul ki. A szálhoz primert adnak, és egy polimeráz elkezd meg szintetizálni a komplementer láncot

- **Klenow-fragmentum:** olyan DNS-polimeráz I enzim, ami elvesztette az 5'3' endonukleáz aktivitását
- **didezoxi-ribonukleotid:** olyan ribonukleotid, ahol a ribóznak a 2' és 3' szénatomján hiányzik az OH csoport. A DNS-polimeráz beépíti ezeket a láncba, de ezekhez már nem tud új nukleotid csatlakozni, mert nem tud kialakulni a foszfodiészter kötés.
- **Folyamat:**
  - az újonnan szintetizált lánc 5' végét (tehát amit legelőször szintetizált le a polimeráz enzim) radioaktívan megjelölik
  - a preparátumot négy részre osztják
  - a négy minta mindegyikéhez hozzáadják a Klenow fragmentumokat, a négyféle dezoxi ribonukleotidot, és a négy mintába külön-külön a négyféle didezoxi ribonukleotidból egyet-egy
  - A komplementer láncok szintézise megindul, de ahogy didezoxi ribonukleotid beépülése történik, a lánc szintézis leáll (versengés az eredeti dezoxiribonukleotiddal).
  - Ezáltal különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek, amik specifikus nukleotidoknál álltak le az egyes mintáknál.
  - A fragmentumok hosszának kimutatása, a sorrend meghatározása úgy megy, mint a Maxam-Gilbert módszernél.
- Ma már a folyamat teljesen automatizálható.

## 42. Hibridizáció – Southern blot, Northern blot, in situ hibridizáció

## 43. A rekombináns DNS vektorok (plazmid, fág, cosmid, YAC) jellemzői, a vektor tervezés szempontjai

## 44. A genom könyvtár készítése, használata, gének azonosítása, kromoszóma séta, genom térképezési stratégiák

### Rekombináns DNS vektorok:

**Rekombináns DNS:** a már ismertetett restriktív enzimmel történő hasítással ragadós végű DNS szakaszok készíthetők, és különböző DNS molekulákból kiindulva olyan fragmentumok hozhatók létre, amik aztán egyesülni tudnak a ragadós végeknél. Az így készült DNS a rekombinációs DNS.

**Sokszorosítás:** a rekombináns DNS készítésének többféle célja lehet, az egyik feladat egy kiválasztott DNS szakasz sokszorosítása.

- **Klónozás:** ha a sokszorosítás baktériumban történik, klónozásról beszélünk. Olyan DNS fragmentumot kell készíteni (restriktív hasítással), ami a baktériumban gyorsan replikálódik.
- **Klón:** azonos DNS-t tartalmazó utódok sokasága
- **vektor DNS:** a baktériumba könnyen bejuttatható, és ott gyors replikációra képes DNS
  - **plazmid:** antibiotikumok elleni rezisztenciáért felelő géneket hordozó DNS szakasz, ami fehérjeszintézist gátló antibiotikumok jelenlétében is gyorsan képesek replikálódni. A plazmidokat igen gyakran használják vektorként
  - A rekombináns DNS szakaszt a vektorba kell építeni, így jut be és replikálódik a baktérium belsejébe.
    - A beépítés úgy történik, hogy a plazmidot restriktív enzimekkel hasítják, a ragadós végekhez pedig a restriktív DNS szakasz épül be
  - **cosmid:** hosszabb DNS-szakaszok klónozásához fág-vektor DNS segítségével készítenek megfelelő rekombinánst.
    - A fág-DNS-ből a végeinek megfelelő bizonyos szakaszokat kapcsolnak a 25000-50000 bázishosszúságú DNS darabok két végére, így alakulnak ki a cosmid szerkezetek.
    - A cosmid mindig tartalmazza a replikációs origót is!
- **transzformált baktérium:** olyan baktérium, aminek membránja kétértékű kationok,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  hatására átmenetileg permeábilis lesz a kis DNS molekulákra, ezért a baktériumok egy részébe képes bejutni a vektor, és ott gyorsan replikálódik.
- **a transzformált baktériumok kiválasztása** úgy történik, hogy a baktériumokat olyan táplálékra teszik, ami olyan antibiotikumot tartalmaz, hogy csak a vektort tartalmazó baktériumok rezisztensek rá. Ekkor csak ezek a baktériumok képesek szaporodni.

**Génkönyvtárak készítése** úgy történik, hogy egy DNS szál (pl. egy eukarióta genomját) minden restriktív helyen hasítanak egy adott restriktív enzimmel, és ezek bizonyos statisztikai valószínűség szerint beépülnek egy-egy plazmidba. Ezután a baktériumpopulációt szaporítják. A baktériumokban található, a vektorból replikálódott DNS-ek összessége a teljes genomot tartalmazza.

- **a génkönyvtár kezelése**
  - **próba:** a vizsgált DNS-darabot tartalmazó rekombináns plazmiddal transzformált baktériumegyed szaporodása révén létrejövő klón kiválasztása. A kívánt klónt tartalmazó baktériumtelep megkeresése a próbával zajlik.
    - **hibridizáció:** mesterségesen létrehozott komplementer lánckapcsolat
      - a vizsgált baktériumtelepek elhelyezkedését lemásolva egy nitrocellulóz membránra oltják a baktériumokat megfelelő higításban, majd egy olyan, radioaktívan jelzett, a kiválasztott DNS-el komplementer DNS darabot adnak hozzá, ami autoradiográfiás képen megmutatja, melyik baktériumtelep tartalmazza a kiválasztott génszakaszt.
    - A kiválasztott klón megtalálása után az abból származó baktériumokat tovább szaporítják, majd izolálják a bakteriális DNS-től a most már sokszorosára növekedett mennyiségű rekombináns plazmidot.

**Blottolás:** denaturált, egyszálú, a gélelektroforézissal hosszuk szerint szétválasztott DNS-darabok átvitele egy nitrocellulózmembránra, amelyen a nukleinsav erősen kötődik, és az ilyen módon rögzített molekula analízisre alkalmassá válik.

- **Southern blot:**

- A különböző hosszúságú DNS fragmentumok közül egy bizonyos, vizsgálni kívánt DNS-darab kiválasztására, illetve azonosítására szolgál.
  - A DNS fragmentumokat különböző hosszúságuk szerint lokalizált géllapot szűrőpapírra fektetik
  - Közvetlenül a gél tetejére nitrocellulózmembránt tesznek
  - majd e fölé ismét szűrőpapírt
  - Az alsó szűrőpapírréteget tömény sóoldattal nedvesítik, ami a kapillaritás elve alapján keresztülnyomul a gélen és a nitrocellulózmembránon, végül eljut a felső papírig
  - Közben az agaróz gélből a DNS átmosódik és fixálódik a cellulózmembránon
  - Ezután **hibridizáció** segítségével választják ki (próba alapján) a keresett DNS fragmentumot.
- **Northern blot:** a southern blot módszer, csak RNS-en végezzük el

**In situ hibridizáció:** amikor a kettősszalú DNS-t magas pH-jú oldatban szétválasztják, majd egy **próbát** hibridizálnak a láncre. A próba éppen ott fog bekötni, ahol a DNS-szálon a próba komplementere található, tehát a módszer megmutatja egy specifikus DNS szekvencia helyét a szálon.

**Kromoszóma séta:** olyan eljárás, ami az eddig megismert eljárásokat felhasználva egy igen hosszú DNS szekvencia, vagy egy teljes kromoszóma vizsgálatát lehetővé teszi. A másik előnye az, hogy a módszerrel kijelölhető és sokszorozható olyan szakasz is, ami egy adott **gén** szekvenciáját tartalmazza.

- **a folyamat:**

- Adott egy **ismeretlen szekvenciájú kromoszómadarab**. Ennek a szekvenciának az egyik végéhez közel van egy ismert szekvenciájú darab komplementere, legyen ez **próba I**.
- A kromoszómadarabot különböző helyeken hasító (ezek közül persze lehet olyan enzim is, ami a DNS-t több helyen hasítja!) restriktív enzimekkel emésztjük, de **nem végzünk** teljes emésztést, így különböző hosszúságú fragmentek jönnek létre, amikből sok olyan lehet, ami **egymással átfed**.
- A fragmenteket **vektorokba** ültetjük, és a megismert klónozási eljárással **génkönyvtárat hozunk létre**.
- Ezután hibridizációval megkeressük azokat a baktériumtelepeket, amiben olyan fragment van, amire **próba I** radioaktív komplementere be tud kötni.
- Legyen ez az "A" fragmentum, aminek a megismert módszerek valamelyikével **meghatározzuk a szekvenciáját**.
- A szekvencia ismeretében az "A"-n megkeressük azt a szekvenciát, amit egy másik (vagy ugyanez) a restriktív enzim elhasíthat. Lesznek tehát olyan fragmentek is, amik ezzel a szekvenciával kezdődnek. Kijelölünk az "A"-n ezen szekvencia **után** egy újabb ismert szakaszt, legyen ez, illetve ennek komplementere **próba II**.
- Most a próba II-t tartalmazó, pl. "B" fragmentumokra keresünk rá, és innen a folyamat kezdődik előlről.
- Nyilván ilyen módszerrel a teljes kromoszómadarabon "végigsétálhatunk", ezzel a teljes darab nukleotidszekvenciája meghatározható.



## 45. A cDNS fogalma, készítése, vektor konstruálása, a cDNS könyvtár jellemzői

### cDNS:

mivel a DNS klónozás igen kifejlett technika, az RNS-ek vizsgálatát is célszerű erre visszavezetni.

- Erre a retrovírusoknál megismert **reverz transzkriptáz** nyújt lehetőséget.
- Az így nyert DNS a cDNS, vagy copy DNS, ami pl. egy adott fehérjére jellemző mRNS-ről másolódott.
- A szükséges primer előállítását leegyszerűsíti az eukarióta sejtek mRNS-ének 4' végén jelen lévő poliA farok

### cDNS könyvtár:

Ha a sejt teljes mRNS készletéből indulunk ki, a reverz transzkriptáz által végrehajtott reakciók után minden mRNS-ből képződhet cDNS.

- Az ilyen módon létrehozott cDNS keveréket vektorokba ültetve olyan rekombináns DNS populáció jön létre, ameynek egyedei más-más cDNS darabot tartalmaznak.
- Ha ezzel a vektorpopulációval transzformálunk egy baktériumtenyészetet, és minden cDNS-t tartalmazó vektor baktériumba jutott, az adott sejtre jellemző cDNS könyvtár jött létre.
- A cDNS könyvtár tagjai együttesen tartalmazza a sejt minden működő génjéről származó mRNS-ek cDNS-ét.
- ezt a technikát nagy mennyiségű fehérjét akarnak termeltetni, pl. gyógyszeriparban

#### 46. A polimeráz láncreakció elve, allél-specifikus PCR. A PCR orvosi, igazságügyi orvostani alkalmazása

**PCR:** polimeráz láncreakció, (polimerase chain reaction) az utóbbi 10 évben kifejlesztett módszer, ami arra alkalmas, hogy a DNS-ben megtalálható specifikus szekvenciát akár milliószorosan megsokszorozza. Ezáltal az is kimutatható, hogy a keresett szakasz szerepel-e a DNS-ben vagy sem.

- **Taq polimeráz:** olyan baktériumból származó DNS polimeráz I. enzim, amely nagy hőtűrésű (95 C fokot is kibír), illetve aktivitását magas hőfokon (kb. 75 fok) végzi.
- **primer:** A megsokszorozni kívánt génszakaszt, vagy legalább az elejét ÉS végét ismerni kell, és ennek 3' végétől induló komplementerét nagy mennyiségben hozzá kell adni az elegyhez, ami tartalmazza a négyféle nukleotidot, a Taq polimerázt és a vizsgált DNS-eket. Két primer kell, az egyik a kívánt génszakasz elejét, a másik a végét tartalmazza!
- 
- **Folyamat:**
  - **denaturálás:** A reakcióelegyet kb 95°C-ra melegítik, ahol a DNS denaturálódik.
  - **primer hibridizáció:** Alacsonyabb hőfokra hűtve a primerek hibridizálnak a láncokkal a komplementer szakaszon
  - **DNS megkétszerezése:** A reakcióelegyet a megfelelő hőmérsékleten tartva a Taq polimeráz megszintetizálja a láncok további részét. A kérdéses génszakasz illetve komplementere mindkét láncra meglesz. Látható, hogy a keresett génszakasz kétszeresen szerepel, míg a többi továbbra is egyszeresen.
  - Az újabb ciklus a denaturálással indul, és így folytatódik. A DNS tartalom minden ciklusban megkétszereződik, kb 20-25x futtatják le a ciklust, ezzel  $2^n$  -szeresére növekszik az eredeti DNS, a keresett gén tartalmazó része.
- A PCR-t ma már rutinszerűen és automatizáltan használják, pl. az igazságügyi orvoslásban, ahol egy igen kis mennyiségű mintából (hajszál) kell kiindulni.

## 47. Prokarióta expressziós vektorok, fúziós fehérjék, biológiailag aktív anyagok ( inzulin, véralvadási faktorok, antikoagulánsok) előállítás a géntechnológiával

**Expressziós vektor:** A rekombináns DNS készítésének gyakori célja egy gén működésének tanulmányozása vagy egy kívánt fehérje termelése. Ezekben az esetekben olyan vektorokat kell alkalmazni, amelyek nem csak bejuttatják a kívánt DNS szakaszt egy sejtbe, hanem lehetővé teszik annak expresszióját, vagyis a kívánt fehérje termelését is. Expressziós rendszerként használhatunk baktériumokat, de eukarióta génekhez gyakran előnyösebb az eukarióta expressziós rendszer (pl. rovarok).

**Eukarióta (humán) génextpresszió prokariótákban:** Az eukarióta gén baktériumban történő expressziójához bizonyos feltételeknek teljesülnie kell, amit a vektortervezésnél figyelembe kell venni.

**A vektor tehát tartalmazza:**

- az expresszálni (termelni) kívánt fehérje exonját (cDNS)
- bakteriális promoter szakaszt (bakteriális RNS polimeráz számára felismerhető legyen)
- regulációs elemeket (pl. a termelendő fehérje ki/bekapcsolásához)
- bakteriális riboszóma kötőhelyét (bakteriális mRNS 5' végén a riboszómához való kötődést megfelelő szekvencia biztosítja)
- **fúziós fehérjék:** a fenti problémák megoldására olyan rekombináns DNS-t készítettek, amely magában tartalmazza egyrészt a baktérium által termelt egyik fehérje kódját, másrészt az eukariótából származó, új fehérjét kódoló cDNS-t. Ezen DNS által kódolt fehérje a fúziós fehérje, amely egyrészt tartalmazni fogja a termelni kívánt polipeptidláncot, másrészt a baktérium fehérjének egy részét.
  - **Példa:** a fág vektor tartalmazza a lac-operon promóterét és az azt követő béta-galaktozidáz kódoló gén egy részét, ehhez csatlakozik a termelni kívánt polipeptidláncot kódoló cDNS. A szintetizált fúziós fehérje a béta-galaktóz egy részéből és a termelendő polipeptidláncból fog állni.
  - **Szeparálás és tisztítás:** a megszintetizált fúziós fehérjét először szeparálni kell:
    - **lízissel:** a sejt szétbontása után izoláljuk a fehérjét, majd tisztítjuk
    - **szekrécióval:** ha a fúziós fehérjét tartalmazó konstrukció tartalmazza a megfelelő szignál polipeptid szekvenciát, akkor a baktérium extracelluláris térbe tudja szekretálni a kész fehérjét, így sokkal könnyebb elkülöníteni a többi bakteriális fehérjétől.
  - **hasítás:** a fúziós fehérjéből tisztítás után kémiai vagy enzimatiszta módszerrel le lehet hasítani a termelni kívánt fehérjét.

**Alkalmazás:** "fehérjék ipari előállítása":

- **rekombináns gyógyszerek gyártása:**
  - inzulin - diabetes,
  - tPA - trombózis,
  - hGF (growth factor) - hGF hiány (növekedési rendellenesség),
  - VIII. factor - hemofília,
  - eritroprotein - anemia,
  - interleukin, CSF (colony stimulating factor) - immundeficiencia,
  - vaccinák - pl. hepatitis B.
- **Példa: inzulin gyártása (az első engedélyezett rekombináns gyógyszer):**
  1. **A vector konstrukció:** lac-promoter, lac-operátor, béta-galaktózt kódoló szakasz, inzulin A vagy B láncot kódoló rész, origó, AmpR rész (az antibiotikum rezisztenciáért felel, az azonosításhoz kell) (lásd *rektech.pdf 11.slide*)
  2. **Bakteriális transzformáció:** AmpR klónok szelektálása és klónozása
  3. **Fúziós fehérje termelése:** A termelés szabályozható, mivel a lac-operátor szabályozó régióhoz beköt a lac-represszor fehérje és normál állapotban leállítja a gyártást. A lac-represszor fehérje indukciós eltávolítása (IGCN beadása) kezdi meg a fehérje termelését.
  4. **Lízis, fehérje izolálás, tisztítás**
  5. **Fúziós fehérje hasítása:** CN Br kezelés, metionin lebomlik, inzulin felszabadul.
  6. **Inzulin A és B lánc in vitro egyesítése.**
- **Példa 2: hGF gyártása:**
  - hasonló az inzulinhoz, a különbség az, hogy itt egy bakteriális szignál szekvencia segítségével az extracelluláris térbe szekretáltatjuk a kész fehérjét. Itt egy bakteriális periplazmális proteáz levágja a szignál polipeptidet a hGF fehérjéről, amit ezután lehet tisztítani.

## 48. Expressziós vektorok eukariótákban, riporter gének, Western-blot, ELISA.

**Expresszió eukariótákban** (pl. humán génexpresszió emlősökben):

- **tranzien expresszió:**
  - nem integrálódó virális vektor (pl. adenovírus)
  - előny: nem transzformálhatja a sejtet
  - az expresszió csak átmeneti, a transzfektált sejt az idegen DNS-t utódaiba nem tudja átörökíteni
  - hátrány: időigényes
- **transzgenetikus állatok:**
  - a megtermékenyített petesejt mikroinjektálása
  - előny: az idegen gén stabil integrálódása (stabil, sejtosztódás során expressziós képességét megőrző rendszer keletkezik)
  - random integráció
  - bővebben: lásd 51.tétel

**Eukarióta sejtek transzfekeciója:** a DNS bejutása, a baktériumok transzformációjával analóg folyamat. Történhet úgy, hogy a sejtek membránját rövid időre elektromosan kilyukasztják, amíg a DNS bejut a sejtbe, más esetekben kalcium-foszfáttal csapadékosítják a DNS-t, mely így endocitózissal juthat be a sejtbe.

**Expressziós vektor felépítése:** gyakoriak az eukarióta sejteket fertőző DNS vírusokból és retrovírusokból készült expressziós vektorok. Ezekből származnak az expressziót biztosító regulációs elemek, melyeket antibiotikum elleni rezisztenciáért felelős gént is hordozó plazmidvektorba ültetnek.

**Klónok kiválasztása:** a transzfektált sejtpopulációból ki kell választani azokat a sejteket (klónokat) melyekben a bevitt gén működik

**Northern-blot:** a képződő mRNS-en (lásd 42. tétel)

- **Western-blot:** a szintetizálódott fehérje kimutatására, immunológiai reakción alapuló eljárás. A blotolás itt is arra utal, hogy a sejtlyázátuból a nagyságuk szerint SDS poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szétválasztott fehérjemolekulákat nitrocellulózmembránra juttatjuk. A membránon adott pozícióban rögzült fehérjék közül az ELISA eljárással analóg immunológiai eljárással mutatjuk ki a kérdéses fehérjét.
  - Először egy primer antitestet adunk a fehérjéhez, majd egy második, enzimmal (peroxidáz) konjugált antitestet. Végül az enzimmal reagáló szusztrátot adjuk a komplexhez (peroxidáz szubsztrát), a fény jelet röntgenfilmmel tehetjük láthatóvá.
  - A minták (lizátumok) azonos anyagmennyiségének biztosítására és vizsgálatára egy konstitutívan expresszáldó standard fehérjét is használnak (pl. household fehérjék - bét aktin)

**ELISA (enzyme linked immunosorbent assay):** Fehérjék (közvetve RNS) expressziójának kvantitatív meghatározására képes módszer

- **Elve:** Egy polisztirol lemez 96 lyukába egy adott fehérje ellen termelt antitestet rögzítenek. Ehhez adják a mintát, amiből az adott fehérje megkötődik a lyukban. Ezután egy második, biotinnal konjugált antitestet kötnek rá, majd egy streptavidin-peroxidáz konjugátummal kezelik, ami köt a biotinhoz. Végül peroxidáz szubsztátummal kezelik, ami zöld terméket eredményez, savas környezetben pedig sárga színt ad, ami spektrometriával mérhető. Ismert fehérjéből kalibrációs sort is mérhetünk, így a koncentrációk meghatározhatók.
- **biotin:** H-vitamin, kismolekula
- **streptavidin:** biotinhoz kötő fehérje
- **peroxidáz reakció:**  $AH_2 + H_2O_2 = A \text{ (zöld)} + 2H_2O$
- **spektrofotometria:** fényelnyelésen alapuló, koncentrációmérő módszer (Lambert-Beer törvény)

**Riporter gének:** gének expresszióját vagy gészakasz regulációs szerepét lehet velük vizsgálni. A leggyakrabban használt riporter a **CAT enzim** kódoló plazmid gén (klóramfenikol acetiltransferáz enzim). A CAT aktivitása nagyon könnyen mérhető és eredetileg nem termelődik eukarióta sejtekben, csak ha bevisszük. Így tehát például egy promotér funkcióképességét ill. az azt reguláló komponensek jelenlétét és viselkedését a CAT megjelenésén keresztül lehet vizsgálni úgy, hogy a promotert a CAT-gén elé ültetjük és az ily módon előállított plazmidot transzfektáljuk egy eukarióta sejtbe. Riporter gén rendszerek még:

- **luciferáz:**  $ATP \rightarrow ADP + Pi + \text{fény}$
- **béta-galaktozidáz:** laktóz analóg (LakZ)  $\rightarrow$  kék sejtek

## 49. A mutagenézis főbb lehetőségei, kémiai mutagenézis, irányított mutagenézis

**Mutagenézis:** Egy klónozott DNS bizonyos kiválasztott szakaszán vagy egyetlen nukleotidján végrehajtott változtatás, a mutáció segíthet felderíteni a kérdéses DNS szekvencia regulációs szerepét, vagy ha kódoló, akkor a fehérje megfelelő aminosavjainak jelentőségét a fehérje funkciójában. A mutáció következményeit figyeljük meg.

### In vitro mutagenézis lehetséges formái:

- Regulátor régió mutagenézise
- kódoló szekvenciák mutagenézise
  - deléción
  - inzerción
  - szubsztitúción
  - pontmutáción
  - helyspecifikus mutáció (site directed mutagenézis vagy oligonukleotid irányította mutagenézis)
  - random mutagenézis

### Klasszikus site-directed mutagenézis lépései:

1. Oligonukleotidtervezése és szintézise (primerként fog funkcionálni)
2. Oligonukleotid hibridizációja az egyszálú (cirkuláris) DNS plazmidhoz
3. A komplementer DNS lánc szintézise az oligonukleotid primer és DNS polimeráz felhasználásával (+ 4dNTP-k felhasználásával)
4. Új DNS lánc körösítése DNS ligázzal
5. Kompetens baktériumok transzfekciója
6. A mutáns plazmidot tartalmazó baktériumtelepek azonosítása
7. A mutáns DNS izolálása a baktériumból (miniprep)
8. A mutáns DNS megerősítése DNS szekvenálás segítségével

### A random mutagenézis formái:

- **kémiai mutagenézis**
  - a legjobb hatásfokú a randomon belül (egyébként rossz hatásfokúnak számít), max 200 bp mutagenézisére
  - kémiai mutagénekkel kezelik a duplaszálú DNS-t
    - **hidroxilamin** -> dezaminálja a citozint -> uracil keletkezik
    - **biszulfid** -> dezaminálja a citozint -> uracil keletkezik
    - **hidrazin** -> elszakítja a citozin és a timin hexaciklikusgyűrűjét ami a pirimidinek elvesztéséhez vezet. A replikáció során ezekkel szemben bármi beépülhet.
    - egyéb pl. kálium peranganát, salétromsav, hangyasav.
- **kazetta mutagenézis**
- **miskorporális mutagenézis**
  - in vitro DNS szintézisnél az egyik bázisból nagyon keveset teszünk a reakcióelegybe, ezért az "éhező" polimeráz más bázisból fog a helyére építeni
  - a polimeráznak csökkentett hibajavító képességgel kell rendelkeznie (pl. Klenow fragment)

## 50. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása a diagnosztikában (PCR, DNS chip)

### A PCR orvosi alkalmazásai:

- **genetikai tanácsadás**
  - betegséget okozó mutációk kimutatása
    - monogénes öröklésmenet
      - letális/kezelhető betegségek
      - prenatális diagnózis
  - rizikófaktorok
    - poligénes öröklésmenet (pl. onkogének)
  - DNS minta forrása
    - invazív
      - vér (Guthrie vércsepp)
      - CVS (korionboholy minta)
    - noninvazív
      - Bucca sejtek
      - hajszál, köröm
- **idegen genom azonosítása**
  - fertőző baktérium, vírus, gomba: idegen szevenciák
  - kimutatásuk: speciális primerek, lesz-e PCR termék?
  - példák:
    - pneumococcus - köpet
    - mycobacterium tuberculosis - TBC
    - HIV (?)
    - Chlamydomonas
- **egyéb alkalmazások**
  - apasági per
  - kriminológia
  - rokonsági fok megállapítása (bevándorlás)
  - terroristák keresése

**DNS-chipek:** elve a nukleinsav hibridizáció: általunk tervezett oligókat kis lapokra viszünk fel és ezen kimutatjuk milyen mutáns génszakaszokkal hibridizál

- ma akár 1cm<sup>2</sup>-re 40.000 féle oligót lehet felvinni
- az oligók rögzítése a chipen fotolitográfiával történik, rétegenként (védőcsoport végi a kötődéstől az egyes rétegeket, amik megvilágítás hatására deaktiválódnak), min. 8, de általában 18-30 tagú oligókat építenek fel a chipre.
- a chiptérképet számítógéppel tervezik, elvileg bármilyen mutációt meg lehet keresni egy génszakaszban
- A hibák kiküszöbölésére mindkét szálról terveznek oligonukleotidot, továbbá általában a mutációt középre tervezik (9-10. nukleotid) így a nemkomplementer szálak biztosan nem fognak hibridizálni. Hosszú szálak esetén léptetéssel készítik el az oligópróbákat, így kisebb a hiba esélye.
- **detektálás elve:**
  - cél-DNS fluoreszcens jelölése
  - cél-DNS jelölése biotinnal, majd fluoreszcensen jelölt streptavidin hozzáadása
  - intenzitásmérés -> kvantitatív analízis (homozigóta - erősebb jel, heterozigóta - gyengébb jel)
  - két szín analízis: vad és mutáns mintákat eltérő színű fluoreszcensen jelölni (zöld/piros)
  - **megjegyzésem:** ma már fejlettebbnek számítanak a jelölésmentes technikák pl. elektrokémiai, optikai, kvarc-kristály mikromérleg stb.
- **alkalmazások:**
  - BRCA gének kimutatása (emlőrák, tumorok)
  - fertőző mikroorganizmusok kimutatása (gyors eredmény)
  - AIDS-vírusok közötti differenciálás (terápia tervezés)
  - p53 gén mutációi (daganatok)
  - CF-gén, globin-thalassemia gén...stb.
  - mitokondriális DNS-chip - a mitokondriális DNS mutációit mutatja ki

## 51. Géntranszfer, transzgenikus állatok, knock-out állatok

### transzgenikus állat:

ha egy gén funkcióját egy állat teljes szervezetében kívánják vizsgálni, a kérdéses idegen gént egy megtérmekeyített petesejt genomjába viszik be, általában egy vektor segítségével. Ebből a petesejtből kifejlődő állat minden sejtje tartalmazhatja az idegen gént.

- **felhasználási területe:**
  - **tudományos kutatás:** annak vizsgálata, hogy különböző gének között milyen kölcsönhatások léphetnek fel, hogyan expresszálódnak.
  - **gazdasági célú** (növényekkel is): cél a profitszerzés, de súlyos etikai és biztonsági kérdéseket vet fel (pl. torzszülött állat, nem egészségbiztonságos növény)
- **elkészítésük:**
  1. mikroinjektálás (több száz petesejt, mikromanipulátor)
  2. beültetés ál-terhes nősténybe
  3. az utódok ellenőrzése (PCR a farkból)
  4. pároztatás
  5. beltenyészet - klónozás (szomatikus sejttranszplantáció, először 1997-ben birkákon)
    - példa (tg-állat): 1982 - óriás egér. Növekedési hormon gént injektáltak a hím pronukleuszába.
    - **knock-out állat (növény):** a kérdéses gén hibás változatát viszik be a petesejtbe, ez rekombinációval kicserélődhet és ha a gén hibája az étellel összeegyeztethető KO-állat (növény) jön létre. Az lehet vizsgálni vele, hogy egy bizonyos gén az élet szempontjából mennyire fontos fehérjét kódol, ennek elvesztése milyen hatással van az életképességre. Fontos de drága kutatási eszköz.
    - **knock-in állat:** az előzővel ellentétben itt nem kiütünk egy gént, hanem újat illesztünk be (ill. kecsereünk egyet). Alkalmazása: betegségmodellek felállítása, génregulációs mechanizmusok tanulmányozása.

## 52. A génterápia eddigi eredményei (TIL, ADA, cisztás fibrózis)

**Génterápiás eljárások:** Jelenleg nincs igazán megbízható, általános orvosi eljárássá tehető génterápia, csak kísérleti próbálkozások vannak.

- **Probléma:** a hibás gént még a petesejtben ki kellene javítani, mert később a szomatikus sejtekben már csak részleges és időleges eredmények érhetők el - reménytelen esetben ezt is meg lehet próbálni.

### Virális vektorok:

- a vírus állati/emberi sejteke fertőz
- DNS bevitelre alkalmas, ha
  - patogenitást csökkentjük (kibelezett vírusok)
  - ki/be kapcsolásra lehetőség van
  - random integráció <-> homológ rekombináció
- virális vektorok például:
  - **adenovírus**
    - citoplazmatikus, természetes patogén, **tranzienz vektor**
  - **retrovírus**
    - csak osztódó sejtek (sejtostódás szükséges), **integráció**
  - **lentivírusok (HIV)**
  - **herpes simplex vírus (HSV)** - öngyilkos gének
    - HSV dTK: timidin kináz, széles szubsztrát specificitás
    - Ganciklovir: csak a HSV foszforilálja, foszforilált formái erős DNS szintézis gátlószer
    - HSV dTK géntranszfer
      - HIV specifikus limfocitákat támadja meg
      - HIV fertőzés esetén ganciklovir kezelés

**Egyéb géntranszfer rendszerek:** hasonló megoldásokat használnak a GM növények előállítására is, de ott nem terápiás hanem profitszerzés céllal

- génpuskák - nagynyomású hélium sugár
- csupasz DNS - izomba (vaccinák)
- kationos lipidek - légúti epithel sejtek (spray)

**NeoRez TIL - génben jelölés** (neomicin rezisztencia gén, TIL : tumor infiltráló limfocita) -az első engedélyezett humán géntranszfer

- kérdés: specifikus limfociták (TIL) megtalálják ill. pusztítják-e a tumort
- mechanizmus: beteg (tumor) -> TIL izolálás -> NeoRez géntranszfer (retrovírussal) -> felszaporítás -> vissza a betegbe
- eredmény: néhány NeoRez - TIL a tumorban, de nincs gyógyulás

**Adenozin dezamináz (ADA) hiány:** az első génterápia (1990)

- ADA hiány: "nem-HIV AIDS" immundeficiencia
- feltételezett mechanizmus: adenozin szintje nő -> dATP szintje nő -> ribonukleotid reduktáz gátlás -> DNS szintézis (sejtostódás gátlás)
- génterápia mechanizmus: beteg -> vérből T-limfocita izolálás -> ADA géntranszfer (retrovírussal) -> felszaporítás -> vissza a betegbe
- sokszorosan ismételni kell, újabb lehetőség a csontvelő őssejtek korrekciója

**Cisztás fibrózis (CF) génterápiája:** target sejtek a légúti epithel sejtek, bevitel aerosol (spray) formájában



## 53. A génmódosított növények előállítása, termesztése, engedélyezése

### GMO növények előállítása

- Mire van szükség hozzá?
  - **Promoter** (ekapcsolja a bevitt gént)
    - CaMV35S képes felülrni az eredeti utasításokat!
  - **STOP** jelzés (génszakasz)
    - Jelzi, hogy ne másolódjon tovább a génszakasz
  - **Markerek/riporter gének** (hogyan tudjuk, hogy melyik sejtet sikerült átalakítani)
    - Antibiotikum rezisztencia gének
    - Herbicid-tolerancia gének
    - UV fényben fluoreszkáló fehérje előállításért felelős gének
  - És persze a **transzgén** is kell, amit bele akarunk tenni :)
    - Kódolja a bejuttatandó gént
    - EU-ban két féle van engedélyezve:
      - Amelyek maguk állítják elő a növényvédő szert
        - ◆ Pl. maguknak termelik a rovarirtó szereket! Pl. cry-gén: *Bacillus thuringiensis* protoxint termel (emésztés során lesz mérgező belőle)  
Az aktív mérget kódoló gént a Bt-növényekbe teszik...
      - Amik képesek egy gyomirtó elbontására (herbicid toleránsak)
        - ◆ Pl. Roundup Ready (piacvezető!!!) bacik életbenmaradtak a szennyvíztárolóban -> ezek képesek voltak a gyomirtót metabolizálni -> izolálták a génszakaszt és a RoundupReady növényekbe ültették

- **Módszerek a transzgén bejuttatására:**

A transzgéneket egy a vektort tartalmazó génkonstrukció részeként juttatják a sejtbe.

- **Génpuska**
  - Apró wolfram részecskék felületét a kívánt DNS-sel vonják be, majd több száz km/óra sebességgel belövik a sejtbe. (precíz és irányított)
- **Fertőzés *Agrobacterium plazmida*val**
  - Talajbaktérium - jól fertőz és tumort okoz (de ezt a részt kiiktatják)
- **Oldószeres módszer**
  - Nem túl elterjedt, sejtfal permeabilizálásán alapul
- **Szelekció és szaporítás**
  - Alacsony a génbevitel határfoka, ezért meg kell határozni, hogy melyik sejtben van új DNS részlet.
    - *Lásd fenti három módszer*
  - A szelekció után:
    - GM-növény regenerálódása
    - GM-növény morfológiájának vizsgálata (van-e gyökere, levele, stb...)
    - Üvegházi nevelés
    - Szabadföldi továbbtermesztés, vizsgálódás
    - Felszaporítás, 3 generáción át szelektálás, majd egymással/hagyományos növényekkel keresztezés
    - Sikeres próbálkozás után engedélyeztetés
- Fontos **különbségek** a hagyományos és a GM növények között:
  - Hagyományosnál csak a fajban, szülőben már meglévő DNS szakaszok kombinálódnak, de lehetőség van az előnyös tulajdonságok erősítésére, és a rosszak gyengítésére (nemesítés)
  - GM-nél bármit bele lehet tenni! Más fajból is. Állat-növény között sincs határ, lehet pakolni mindent mindenhová... **PROBLÉMA:** Az evolúciós szűrő nem működik ilyenkor. Túl nagy, és túl gyors a változás!

- **Egyéb problémák:**
- Eukariótákban nem igaz, hogy egy gén - egy fehérjét kódolhat csak
  - Vagyis nem megjósolható, hogy a bevitt gén csak azt az egyfajta fehérjét fogja kódolni, amire tervezték! (Spliceosoma - nem igazán ismert a felismerési mechanizmus)
  - Poszttranszlációs fehérjemódosulások fajoként, szervenként mások lehetnek!
  - Esetleg mutációkat okozhat a transzgén, mert nem tudjuk, hogy pontosan hová épül be.
- **Antisense-technológia:**
  - Nem visznek be újat, hanem egy meglévőt hallgattatnak el.
  - Ez is lehet veszélyes.
- **Terminátor technika:**
  - Steril GM növény (nem szaporodhat tovább) - a promoterekhez való bekötődést gátolják
- **Engedélyeztetés alapja:**
  - **Lényegi azonosság elve**
    - *Ha a génmódosított növény anatómiailag és alapvető kémiai összetételében (fehérje-zsír-szénhidrát) nem mutat lényeges eltérést a hagyományoshoz képest, akkor további vizsgálatok nélkül azzal azonosnak tekintendő. (!!!)*
    - Nem bizonyított elv, nem definiált a lényegi különbség, és az sem, hogy milyen összetevőket vizsgál pontosan.
    - Eddigi tapasztalatok alapján nem a transzgén, hanem a pontatlan beviteli technológia a veszélyes.
  - Magyarországon is elég sűrű a helyzet:
    - Beadja egy cég az igénylést
    - Kérdésekre kell válaszolnia az elfogadás során
    - A cég válaszol a kérdésekre és ő biztosítja a kísérleti adatokat is
    - (Ellentétben a gyógyszerek engedélyeztetésével) nem muszáj minden eredményt beadniuk. Ha van olyan, ami előnytelen lehet, elhallgathatják titkosságra hivatkozva.
  - EU 1998 óta nem engedélyezett új GM növényt
  - Kevés állami pénz a kutatásra -> úgyis a cégeknek van hasznuk belőle, fizessék ők -> a saját kutatóik az eredményeket manipulálhatják

## 54. A génmódosított növények termesztésének kockázatai

- **Egészségügyi veszélyek:**
  - Toxikus hatások, esetleges rákkeltő hatás
  - Allergizáló hatás (BIZONYÍTOTT!)
    - Új térszerkezetű fehérjék
    - Pl. GM szója óta a szójaallergia 50%-kal nőtt
    - Súlyos reakciókat válthat ki
- **Biodiverzitást károsító hatás, ökológiai szennyezés**
  - A transzgén akaratlan átvitelére nincs garancia
  - A hagyományos növénykultúrákat visszaszoríthatja
  - Fokozott herbicid használat
- **Gazdasági-társadalmi károk:**
  - Ellenőrizhetetlen élelmiszer-monopóliumok kialakulása (lásd: Monsanto)
  - Harmadik világ kistermelőinek tönkretétele
    - Munkanélküliség növekedése
  - Tudományos kutatások manipulálása állami és magántulajdonosi részről! :(
- **Antibiotikum rezisztencia gén áttevődése emberre**
  - 0.001 ezrelék a kockázat, de 100 milliárd baktérium (az emberben) esetén ez már jelentős.
  - Ma már nem használják, de a régiéknél kijutott a természetbe.
- **Tűrőképességi kérdés:**
  - Külön-külön vizsgálják a toxin határmennyiségét.
  - De mi van, ha többet eszünk belőle? Összeadódik, veszélyes lehet.
- **Transzgén biztonsága:**
  - Baktériumokkal (prokarióta) teremtet fehérjéket etetnek állatokkal a növényi (eukarióta) helyett. Más ez a fehérje, mert mások a poszttranszlációs módosulások)
- **Károk:**
  - Pl. a királylepke kiirtása a táplálékául szolgáló növény toxinja miatt az egész táplálékláncot tönkretette, a csúcsreagadozóig...
- **Egyéb:**
  - GM repce, biodízel
  - Hamis reklámok:
    - Nem az élelmiszerhiány az éhezés oka, hanem a logisztika és pénzhiány (nem tudják megvenni, tárolni, szállítani)
  - Probléma:
    - Technológiai megoldások társadalmi problémákra
    - + a kistermelőket tönkreteszi, függenek a gyártótól

## 55. Humán Genom Project, Eddigi eredmények, a jövő lehetőségei

- 1990-2003-ig

Állami szektor, nemzetközi

A teljes humán

- (Privát szektorban hasonló:

- Celera Genomics - teljes humán genom renadom szekvenálása)

- Citogenetikai térképek - átfedő fragmentumok klónozása – restrikciós térképezés - szekvenálás

1. Minél több markek kifejlesztése (egyszer előforduló Unique szekvencia)

Eredmény: Kb. 30.000 markek

2. Izolált kromoszómák feldarabolása

Ritkán vágó restrikciós endonukleázokkal

3. A keletkező darabokat klónozzák

BAC(bacterial artificial chromosome) könyvtár

4. Ebben vannak átfedő darabok

a. Restrikciós térképezés

b. Sorbarendezés

c. Minimális számú BAC klón kisselektálása (kb. 2.000-10.000 bp hosszú darabok)

- International Nucleotide Sequence Database Collaboration

- USA (GenBank)

- Európa (EMBL-Bank)

- Japán (DNA Data Bank)  $100 \times 10^9$  bázispár-t tartalmaznak. / 165.000 faj teljes, vagy részleges genomjai

- Hasznos infó - hány génünk van?

- 18.000 fehérje kódoló gén (kevés viszonylag)

- A humán genom 45%-át ugráló gének (transzpozonok) alkotják

- A legtöbb exon 100-200 bp hosszú

- 7-9 exon/gén

- Intron: 1000-4000 bp

- Egyedi új mutációk: 100/egyed (spermában főleg)

- A humán genom egyedi variációi:

- 99.9% azonosság (kb.  $3 \times 10^6$  bp különbség egyedenként)

- Ember és majom: 95% azonosság

- Egészséges emberekben is előfordul, hogy

- Egy gén kiesik

- Helye megváltozik

- Egyéb vizsgálatok:

- Sok ember genomjának összehasonlítása

- Különbségek vizsgálata, betegségek feltérképezése

- Jogok:

- Szabad hozzáférés, az információból szabadalmak lehetségesek

- Az eredeti szekvencia maga nem szabadalmaztatható

- (nem találmány, hanem felfedezés!)

- Copyleft (az szabad hozzáférés védelme)