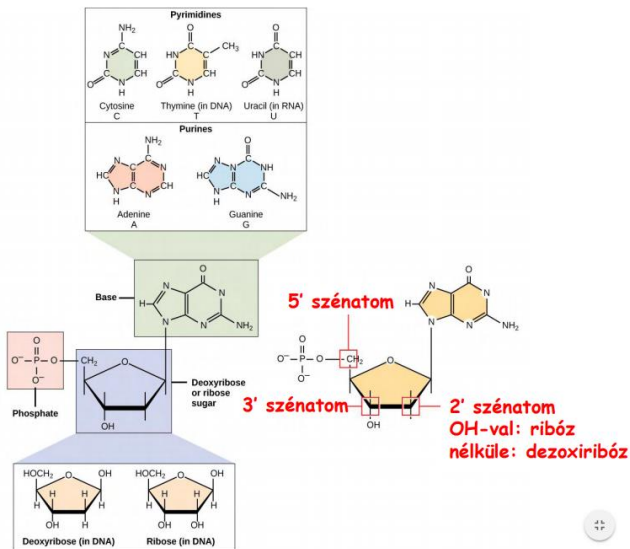


(1) A nukleinsavak alkotó elemei, a nukleotidok és a polinukleotid-láncok elsődleges szerkezete, polaritása.

Három összetevő: nitrogéntartalmú bázis, cukormolekula, foszfátcsoport. Bázis lehet purin v. pirimidin gyűrűs. Cukor ribóz v. dezoxiribóz.

Nukleotidok sorrendjét mindig 5'→3' irányba írjuk fel. Ha a nukleozidhoz észterkötéssel egy foszfátmolekula kapcsolódik nukleotidnak nevezzük. Ezekből állnak össze a polinukleotidok. Gerincüket a 3'→5' foszfodiészter kötések adják.

Polaritást az 5'→3' vagy ezzel ellentétes lefutás adja.



(2) A nukleinsavak másodlagos és harmadlagos szerkezete. A DNS denaturációja, a hibridizáció.

Elsődleges szerkezet a két polinukleotid lánc, másodlagos a H-hidakkal összekapcsolt hélix. Legstabilabb a B-forma. Két helikális polinukleotidlánc közös tengely körül. Egyik lánc 5'→3', másik fordított lefutású, cukor-foszfát gerinc néz kifelé, bázisok befelé. A-T két hidrogénkötéssel, G-C három hidrogénkötéssel. Árkok szerepe a fehérjék kötődésében van.

Harmadlagos szerkezet a pozitív és negatív szupertekercs.

Denaturációkor hő hatására a két komplementer szál szétválik. Olvadáspont amikor a DNS molekulák 50%-a egyszálú.

Hibridizációkor hűtés hatására két egyszálú DNS új kétszálú DNS-t vagy DNS-RNS-t hozhat létre.

(3) A gén, a pozitív (kódoló) és negatív (antisense) DNS szál fogalma. A prokarióta, az eukarióta és a vírus genom összehasonlítása.

Gén: funkcióval rendelkező molekulát kódoló nukleinsav szakasz. DNS két összeillő komplementer szál közül egyikről történik DNS átírás (transzkripciónál mRNS-re) az antisense szálról, másik a sense. Antisense 3'→5' lefutású, sense 5'→3' lefutású.

Prokarióta genom: Egyetlen kör alakú DNS molekula és plazmid (fakultatív), szinte csak kódoló szekvenciákból áll.

Eukarióta: Sejtmagban található, kromoszómába tömörülnek, több lineáris kettősszálú magi DNS és cirkuláris mitokondriális DNS.

Vírus: Változatos genetikai anyaga lehet DNS v. RNS.

(4) Az eukarióta genom elemei, kódoló, nem kódoló, egyedi és ismétlődő szekvenciák.

Nem kódoló: Eukarióták genomja átlag 20-50%-ot tartalmaz. Sem fehérje, sem RNS kódolásáért nem felel.

Egyedi szekvenciákon belül nem ismétlődő DNS és nem is kódoló, intronok, fehérje kódoló régiók.

Ismétlődő szekvenciák: Pl. tandem, ilyen gének termékeiből (tRNA, rRNA) nagy mennyiségre van szükség, ezért egymás követő sorozatot alkotnak → ismétlődések száma egyénre jellemző „genetikai ujjlenyomat”. Másik a transzpozonok (mobilis genetikai elemek) LINE, SINE. szatellit, mikroszatellit, miniszatellit, telomer (lineáris DNS rövidülése ellen véd).

(5) Az eukarióta kromoszóma szerveződése, a ploiditás, a trisómia.

DNS kettősspirál 200 bázispáronként feltekeredik egy-egy fehérje magra → nukleosómák. Ez spirálisan feltekeredik → szolenoid struktúra. Ez hurkot alkot, még egyszer feltekeredik → kromoszóma. Hiszton, DNS között elektrosztatikus kötődés.

DNS molekula interfázisban kromoszóma, mitózis pro és metafázisban kromatida. Része telomer, centomer.

Ploiditás: A kromoszóma készletek száma egy sejtben. Monoploid: 1 kromoszómakészlet. Diploid: 2 kromoszómakészlet 1 anyai+1 apai=2*n db kromoszóma. Triploid: növények.

Aneuploiditás ha kromoszómák száma nem n többszöröse. Trisómia: egy kromoszómából három van.

(6) A DNS replikációjának elve, a DNS-polimerázok általános tulajdonságai, a replikációs villa, az Okazaki fragmentumok, a gap és a nick fogalma, a DNS-ligázok. A DNS-topoizomerázok.

DNS szemikonzervatíván replikálódik, egyik lánc eredeti, másik teljesen új. Nukleinsavak szintézisét a polimerázok végzik. $n \text{ egység} + \text{NTP} = n+1 + \text{PP}$. Az új nukleotid 5' csatlakozik a polinukleotid 3' OH-hoz.

POLIMERÁZOK	MINTA	EGYÉB
DNS-dependens-DNS-polimerázok	DNS	ÚJ NUKLEOTIDOT CSAK MEGLEVŐ LÁNCHOZ KÉPESEK KAPCSOLNI: INDÍTÓT, PRIMERT IGÉNYELNEK
RNS-dependens-DNS-polimerázok	RNS	EUKARIÓTA TELOMERÁZ, A RETROVÍRUSOK REVERZ TRANZSKRIPTÁZA INDÍTÓT, PRIMERT IGÉNYELNEK
DNS-dependens-RNS-polimerázok	DNS	
RNS-dependens-RNS-polimerázok	RNS	RNS VÍRUSOK ENZIME
Poli-A-polimeráz (RNS-polimeráz)	nincs	RNS LÁCHOZ KAPCSOL ADENIN NUKLEOTIDOKAT

A DNS replikáció a két lánc szétválasztásával kezdődik. Kialakul 2 db replikációs villa és a replikációs buborék. A primáz (DNSdep,RNSpol) RNS primázt készít. A villa haladási, nyílási irányával azonosan szintetizálódik a vezető lánc (DNS-polimeráz által). Másik irányban újabb és újabb primerekre van szükség, láncdarabok jönnek létre (Okazaki-fragmentumok).

Primer eltávolítása után a DNS-ligázok megszüntetik a nicket (Prokarióta NAD⁺, EUkarióta ATP hidrolízisével).

Topoizomeráz I: Egyik DNS szálát elvágja, majd újraegyesít, pozitív szupertekercset lazít energia nélkül.

Topoizomeráz II: Mindkét szál elvágásával negatív szupertekercset hoz létre ATP hidrolízisével.

(7) A cirkuláris prokarióta genom replikációjának menete, a prokarióta DNS-polimerázok. A plazmidok.

Replikáció speciális OriC szekvenciánál kezdődik, innen mindkét irányban halad. A láncok szétválásával pozitív szupertekercs tekercselődik.

Indítás: Topoiz.II negatív szupertekercs -> dnaA protein oriC-n elindítja a repliszóma kialakulását -> dnaB protein széttekeri a DNS kettősszálat -> dnaC protein segíti a primer szintézisének indítását -> primáz(dnaG) dnaB és dnaC-vel DNS-hez kötődik ez a primoszóma.

A polimeráz III sok alegységből álló holoenzim és egyszerre szintetizálja a vezető és követő szálát. Elakadásakor DNSpol I eltávolítja az RNS primert. DNS-ligáz összekapcsolja az 5' 3' véget, megszűnik a nick.

Plazmid nem feltétlenül létező kromoszómától függetlenül replikálódni képes F-faktor, antibiotikum rezisztencia faktor, mérget kódoló gén.

(8) A DNS replikációjának menete eukarióta sejtekben, az eukarióta DNS-polimerázok. A telomeráz működése és jelentősége.

Eukarióta DNS polimerázoknak nincs exonukleáz aktivitásuk, Polimerázok:

α	A késlekedő szál szintézise, hiányzó DNS szakasz pótlása
δ	Vezető lánc szintézise
ϵ	RNS primerek cseréje, hibajavítás
β	DNS hibajavítás
γ	A mitokondriális DNS szintézise

Két folyamat hasonló, de itt van sejtmag, replikáció számos startponton indul (replikátor szekvencia), Okazaki fragmentumok rövidebbek.

Replikátor szekvenciához ORC komplex (Origin recognition complex) tud kötődni. RNS primereket RNáz H endonukleáz darabolja fel. A késlekedő lánc 5' végén DNS polimeráz nem tud szintetizálni, mert csak 5'->3' irányba tud, DNS-ligáz megszünteti a nicket, de az 5' még mindig rövidebb. Telomeráz illeszkedik a telomer szekvenciához és TTAGGG szekvenciákkal meghosszabbítja, ezután már primáz után DNS polimeráz ki tudja egészíteni a láncot.

	polimeráz I	polimeráz II	polimeráz III
v (nukleotid / s)	16-20	2-5	250-1000
3' exonukleáz aktivitás	+	+	+
5' exonukleáz aktivitás	+	-	-
processzivitás (nukleotid / akció)	3-200	10.000	500.000
Funkció	RNS primer kicserélése, DNS hibajavítás	SOS DNS repair (?)	DNS replikáció fő enzime

(9) A DNS replikáció hibajavító mechanizmusai prokariótákban és eukariótákban.

Bázis kivágáson alapuló, az idegen bázisokat (uracil, hipoxantin, xantin) a DNS-glikozidáz enzim kivágja és csak dezoxiribóz-foszfát marad. Ezt egy AP endonukleáz kivágja GAP jön létre. Prokariótákban DNS polimeráz I, emberben DNS polimeráz β kipótolja, majd DNS-ligáz megszünteti a nicket (foszfátészter kötés hiánya).

UV sugárzás hatására két egymás melletti pirimidin bázisok szénatomjai között kovalens kötés alakulhat ki. (pl: Timin dimér). Nukleotid kivágáson alapuló repair EU és PROban is működik: UV specifikus endonukleáz kivágja a sérült nukleotidokat, DNS polimeráz kitölti a hiányzó szakaszt, DNS-ligáz megszünteti a nicket. Közvetlen repair csak prokariótákban, egy kék fény hatására aktiválódó enzimmel, mely elvágja a kovalens kötéseket.

Mismatch (nem komplementer bázis) esetén: Prokariótákban a szülői lánc metilálódik bizonyos pozíciókban, az új lánc azonban csak később. Eukariótákban nincs metiláció, helyette a Mut S protein felismeri a mismatcht a Mut H és Mut L fehérjék megkeresik a legközelebbi nicket, endonukleáz kivágja a szakaszt, majd DNS-polimeráz és ligáz kipótolja.

(10) A DNS károsodás, a replikációs hiba és a mutáció fogalma. A nukleotidok leggyakoribb kémiai károsodásai. A timin jelentősége a DNS-ben. A DNS károsodások javító mechanizmusai.

DNS maradandó megváltozása a sejt életét veszélyezteti, mert a genetikai információ végleg megváltozik. DNS hibát okozhatják: UV(timin-dimérek), radioaktív sugárzás(dezamináció), mutagén vegyületek, spontán folyamatok, ritkán DNS-polimeráz hibája. Repair rendszereknek köszönhetően 1 hiba lesz permanens 1000ból.

Mutáció: A permanens, replikációig ki nem javított hiba. Mutációk nagy része ún. csendes mutáció, mert vagy nem kódoló területen érint, vagy nem jár aminosav cserével.

Depurinizáció: Adenin és guanin bázisok hidrolizálnak (leszakadnak). Átlagos emberi sejtben 10^4 -szer naponta.

Dezamináció: Bázisok megváltozása adenin->hipoxantin esetén komplementer láncon timin helyett citozin épül be, guanin->xantin,

citozin->uracil esetén komplementer láncon guanin helyett adenin épül be. Ha DNS uracilt tartalmazna a repair rendszer nem tudna különbséget tenni rendes uracil és a citozin dezaminációjából készült között, ezért van a DNS-ben timin.

Timin dimérek, Deléció (nukleotid elvesztése), Inzerció (nukleotid beépülése), lánctörések.

(11) A pontmutációk típusai, a kódoló régiókat érintő pontmutációk következményei, a szupresszor mutáció. Az Ames próba.

Pontmutáció: 1db bázispár cseréje a DNS láncban.

Helyettesítés:

A, **tranzíció:** pirimidin $\rightarrow$ pirimidin
purin $\rightarrow$ purin

B, **transzverzió:** pirimidin $\leftrightarrow$ purin
(DNS polimerázok okozzák)

Kereteltolódással járó mutáció (frame-shift):

A, **deléció:** egy nukleotid-pár kiesése
B, **inzerció:** egy extra nukleotid-pár beépülése

Mutáció < 1% < SNP = single nucleotide polymorphism

Ha exon részben történik pontmutáció lehet samesense (azonos aminosavat kódol), missense (másikat), nonszensz (stop kodon, ez durva fehérje, enzim sérülés)

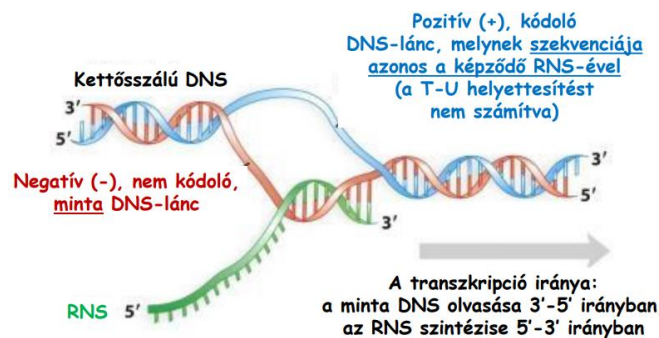
Deléció hatására a pontmutációtól balra eltolódik a szekvencia, teljesen megváltozik az aminosav sorrend.

Inzerciónál új nukleotid beépül, jobbra tolja a szekvenciát, innen az aminosav sorrend teljesen megváltozik.

Ames teszt: Vizsgáljuk, hogy mennyi szupresszor mutációt (egy második mutáció, mely funkcionálisan helyreállítja az első hatását) okoz a vegyület. Olcsó eljárás, mellyel megbecsülhető egy mutagén/karcinogén vegyület hatása. Eljárás Salmonella baktérium törzset használ, melynek hisztidinre van szüksége a növekedéshez, ugyanis a hisztidin szintéziséért felelős génjét pontmutációval inaktiválták. A vizsgált vegyület a hisztidin szintéziséért felelős génben egy szupresszor mutációt okozhat, melynek hatására a baktériumnak ezen túl nem lesz szüksége külső hisztidinre a növekedéshez.

(12) A prokarióta transzkripció egység, a promoter és funkciója, a konstitutív gének, a transzkripció menete prokariótákban, a prokarióta mRNS szerkezete.

Transzkripció: Eredmény más típusú nukleinsav azonos tartalommal.



A DNSdependens-RNSpolimeráz nem igényel primert, nincs 3'→5' exonukleáz hibajavító aktivitása. Átírás iránya génenként változó.

A σ faktor a promóter régiót felismerve pozicionálja az RNS polimerázt. RNS polimeráz a DNShez kötődve 13bp hosszan felnyitja azt → transzkripció buborék. Keletkező RNS vége elhagyja a polimeráz komplexet, buborék elmozdul a DNS szálon. Termináció történhet rho faktor (fehérje) nélkül, a palindrom szekvencia összetapadva hajtút képez és gyenge A (dezoxiadenilát)-U (uridilát)-nál kötésnél kiszakad. Rho faktorról is kialakul a hajtú, de nincs U ismétlődés.

Prokarióta mRNS-e naszcens állapotban alkalmas arra, hogy fehérjék termelődjenek segítségével.

Konstitutív gén: Átírás gyakoriságát csak a promóter erőssége szabályozza, minél jobban hasonlít a konszenzus szekvenciára annál könnyebben ismeri fel a σ faktor.

(13) Az operon fogalma, a prokarióta transzkripció negatív és pozitív szabályozása a lac-operon példáján.

Az operon egy promóterhez tartozó transzkripció egység, amely egy adott funkcióhoz szükséges minden fehérje génjét tartalmazza.

Operátor: Promóter utána cisz-regulációs elem, ehhez kötődik a represszor fehérje, amelyet kódoló gén „távoli” transz-regulációs. Represszor fehérje akadályozza az RNS polimeráz működését.

lac-operon kettős szabályozás alatt áll: glükóz és laktóz mennyisége határozza meg a transzkripció mértékét. Ha nincs laktóz akkor a represszor az operátorhoz kötődik így nincs átírás (nem keletkeznek laktóz bontó enzimek). Ha van laktóz, de van glükóz is, akkor a lac-operon promótere gyenge, nem tudja magához „csalogatni” az RNS polimerázt. Ha van laktóz, de nincs glükóz, akkor a glükóz hiány miatt ciklus AMP CAP-n keresztül aktiválja a transzkripciót.

(14) Az eukarióta gének szerkezete, a transzkripció egység, az eukarióta RNS-polimerázok. Az eukarióta mRNS szerkezete, az 5' – Cap, a 3' – poliA farok kialakulása.

Eukariótákban az információ szakaszosan van tárolva. Az információt nem tároló részeknek (intronok) ki kell vágódniuk (splicing). A splicingot irányító konszenzus szekvenciák (3db) az intronban találhatók.

Transzkripció buborék ugyanaz mint prokariótáknál (ábra), azonban eukariótában a sejtmagban zajlik, transzkripció után pre-RNS keletkezik, melynek még a sejtmagban érne ki, majd onnan kijutnia és csak transzport után tud a transzláció végbemenni.

RNS pol	szintetizált RNS	érett RNS termék	α -amanitin hatása
I	nagy rRNS-kezdemény	28S, 18S és 5,8S rRNS-ek	nem gátol
II	hnRNS-ek pri-miRNS snRNS-ek	mRNS-ek miRNS snRNS-ek	nagyon kis koncentrációban gátol
III	5S rRNS-kezdemény tRNS-kezdemények snRNS egyéb	5S rRNS tRNS-ek U6 snRNS	magasabb koncentrációban gátol

Pre-mRNS 5' végére (egy v. két 2'-metil nukleotid) 7-metil guanilát csatlakozik három foszfátsoporton keresztül, ez a „sapka” véd az exonukleázok ellen. Ez a folyamat már a transzkripció során megkezdődik.

Transzkripció után a 3' végéből levágódik egy rövidebb szakasz, amihez ATP-k segítségével poli-adenilát farok csatlakozik.

(15) Az eukarióta mRNS splicing mechanizmusa, lehetőségei és eredménye. A miRNS szintézise, szerepe a génexpresszió szabályozásában.

Az intron középső szekvenciájában található adenilát 2' OH csoportjával betámad az intron első nukleotidjának 5' foszfátjára, ez így kiszakad. Az exon szabadon maradt 3' OH csoportja támadja be a következő exon első nukleotidjának 5' foszfátját. A kötés létrejöttkor a lasszó alakú intron kivágódik. A folyamat a spliceoszóma nevű enzimkomplex segítségével folyik.

Előfordulhat, hogy néhány exon intronokkal együtt kivágódik, így más fehérje is kifejeződhet (alternatív splicing). Spórolást jelent a szükséges gének számában.

miRNS képződhet szabályos transzkripcióval vagy intronból. RNS-ek saját magukkal bázispárosodhatnak (ez a pri-miRNS). Ez a sejtmagon belül érik, majd kijut, ennek a pre-miRNS-nek levágja a Dicer a hajtú alakú hurkát. Ez a rövid dupla szálú RNS több fehérjével együtt enzimkomplexé áll össze, egyik szála ledisszociál (utas szál), megmaradó rész a RISC. A miRNS vezeti célhoz a RISCet, ami hasíthat komplementer szekvenciánál, transzlációt gátolhat, deCapitálást végezhet.

(16) A transzkripció szabályozása eukariótákban. Általános (obligát) és specifikus (génszelektív) transzkripciós faktorok, a hisztonok acetilációjának jelentősége. A magi receptorok családjába tartozó transzkripciós faktorok. Hiányos!

A transzkripció faktorok közvetlenül kötődnek a DNS promóter, enhancer vagy gátló szakaszához, de a távol lévő géneken szintetizálódnak (ezért transz). Tehát transzkripció faktornak minimum rendelkeznie kell egy DNS-kötő és egy transzaktivációs/gátló fehérjedoménnel.

TATA-Bindig protein nem specifikus.

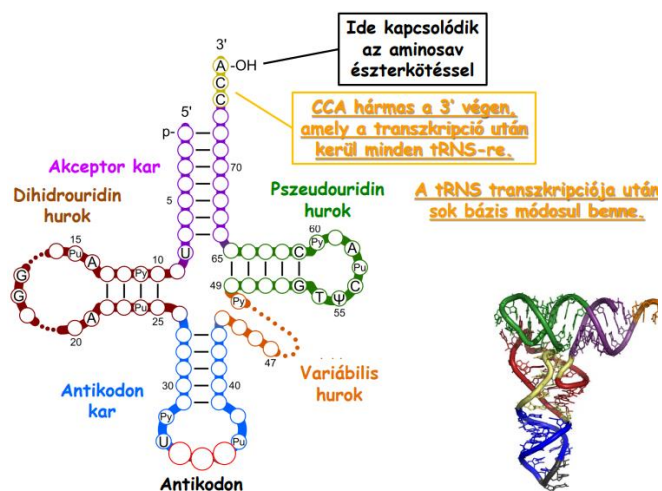
DNS felismerő részek: Hélix-kanyar-hélix, Hélix-hurok-hélix , Cinkujj, Leucincipzár

Transzkripció faktorok közvetve vagy közvetlenül acetilálhatják vagy deacetilálhatják a hisztonfehérjéket (DNS-t veszik körül speciális szerkezetben). Ha acetilálják a hisztonokat (HiszonAcetil-transzferázzal), akkor gyengítik a DNS kötő képességüket ezáltal enzimek könnyebben hozzáférnek, génkifejeződés fokozódik. Ha acetilcsoportokat eltávolítanak (Hisztondeacetilázzal), akkor kötődés erősödik, ezáltal csökken a génkifejeződés.

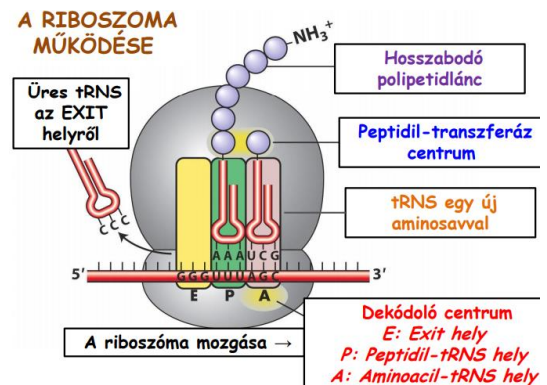
Extracelluláris jelként funkcionáló endogén hidrofób ligandok receptorai is transzkripciósfaktorok, amelyeket magi receptoroknak nevezünk. Ilyen ligandok lehetnek a szteroid típusú ösztrogén v. progreszteron, melyek a citoplazmában kerülnek a receptorra. A tiroid szerű, nem szteroidok pedig ligand nélkül is a DNS-hez tudnak kötni.

(17) A tRNS és az rRNS szerkezete, transzkripciója és érése eukariótákban, a nukleolusz. A prokarióta és eukarióta riboszómák szerkezete és kötőhelyei.

tRNS: tolmács, stabil térszerkezettel rendelkezik. Szára köt egy aminosavat, egyik hurka antikodona a megfelelő mRNS kodonjának. Elsődleges transzkriptumból vágódik ki a tRNS és rRNS. rRNS érés során metilálódik, tRNS 3' végére pedig felkerül a CCA nukleotid hármas.



A polipeptidlánc szintézisének helyszíne a riboszoma, mely rRNSből és fehérjéből épül fel. Két alegységből áll (kis, nagy). Kis egységen mRNS felismerése a nagy alegység csatlakozása előtt. Dekódoló centrum kialakítása ahol kodon, antikodon illeszkedés történik. Nagy alegységen a peptidil-transzferáz centrum alakul ki, ahol a peptidkötés létrejön.



Az rRNS szintézise és a riboszómák összeszerelése a sejtmag speciális területén a nukleoluszban (sejtmagvacska) történik. Prokariótában a transzkripció és transláció szimultán, míg eukariótában a két folyamat időben és térben is elválasztva.

(18) A kódszótár, az aminoacil-tRNS szintetázok, a kodon-antikodon kapcsolat, a lötyögés biológiai jelentősége.

Négy féle nukleotid és 20 aminosav. Három nukleotid kódol egy aminosavat (ez egy kodon).



A genetikai kód kevés kivétellel minden földi élőlényben ua. jelenti. Olvasási keret első (START) kodonja mindig metionint kódoló AUG. Három kodon nonsense, ezek a STOP kodonok. A genetikai kód degenerált (redundáns). Az ilyen kodonok leggyakrabban csak a 3. nukleotidban térnek el és azonos vázúak, mutációkkal szembeni ellenállást növel. Továbbá van kapcsolat az aminosavak és az őket kódoló kodonok között kémiai tulajdonságban, ez is mutációk ellen kedvező.

Az antikodon 1. nukleotidja nem feltétlenül teljesen komplementer (lötyögés) a felismert kodon 3. nukleotidjával (csak 31-41 tRNS fajtól függően a 61 kodonra). Azonban egy adott tRNS által felismert különböző kodonok ugyanazt az aminosavat kódolják.

Aminoacil-tRNS-szintetázokból aminosavak számával egyező 20db van egy sejtben, élővilág egyik legspecifikusabb enzime. Aminosav tRNS-ra való kapcsolódását katalizálja egy ATP felhasználásával. Egyetlen kodon, melyhez két tRNS tartozik az AUG. Mert meg kell különböztetni START és láncközi kodont.

(19) A transzláció iniciációs szakasza prokariótákban és eukariótákban.

Prokariótákban: Iniciációs faktor IF1 lefedi az A-hely (aminosavhely) kezdeményt, IF3 akadályozza a riboszóma nagy alegységének csatlakozását. A kis alegység komplementer az mRNS 5' purin gazdag régiójával, pozicionálja a START AUG kodont a P-hely (peptidhely) kezdeményhez. Az IF2 GTP-t kötve szállítja az iniciátor Met-tRNS-t a P-hely kezdeményre. Ezután csatlakozik a nagy alegység, IF2 hidrolizálja a GTP-t, minden IF leválik, kialakulnak a funkcionális E, P, A-helyek.

Eukariótákban: mRNS nélkül csak az eIF2 képes csatlakozni a kis alegységhez, ami Met-tRNS-t szállít GTP-vel, így létrejön a 43S iniciációs komplex. Az eIF4E felismeri az mRNS 5' Cap-et, így létrejön a sapka komplex. A két komplex 5'-3' irányban mozogva megkeresi és a P-hely kezdeményre illeszti a START AUG kodont (scanning). Ehhez az aktív folyamathoz ATP hidrolízise adja az energiát. A nagy alegységet eIF5B GTP kötő fehérje szállítja, eIF2, eIF5B hidrolizálják GTP-üket, iniciációs faktorok disszociálnak, indulhat az elongáció.

(20) A transzláció elongációs szakasza, terminálás. A fehérjeszintézis gátlószerei.

Az EF-TU GTP kötő fehérje (elongációs faktor) a következő aminosavval rendelkező tRNS-t szállítja az A-helyre. A GTP hidrolizálása időt ad a helyes kodon-antikodon illeszkedés kialakulásához, ellenőrzéséhez. Az EF-TU leválik, EF-TS GDP-t GTP-re cseréli, így EF-TU újabb töltött tRNS-t kereshet. A peptidil-transzferáz centrum a nagy alegységen átveszi a P helyen lévő aminoacil-tRNS-hez észterkötéssel csatlakozó aminosavat és a karboxil-csoportjával fogva az A-helyen lévő aminosav aminocsoportjára teszi, kialakul a peptidkötés, amihez nem kellett energia. Az EF-G GTP kötő fehérje GTP hidrolízisével tovább gördíti a riboszómát, a töltetlen tRNS E-helyre kerülve távozik, a peptidet hordozó tRNS P-helyre kerül tovább, A-hely felszabadul és az mRNS is egy kodonnal arrébb kerül. Terminációkor a három STOP kodon egyikéhez sem illeszkedik tRNS. de ún. RF (release faktor) fehérjék valamelyike (RF1 v. RF2) igen. Ezek A-helyre kötődésekor a peptidil-transzferáz hidrolizálja a polipeptidlánc utolsó aminosava és tRNS közötti észterkötést, a polipeptidlánc leválik. Ekkor a riboszóma alegységeire esik szét, mRNS is felszabadul.

Eukariótákban nagyon hasonló. eEF1A=EF-TU, eEF1B+eEF1G+eEF1D=EF-TS, eEF2=EF-G. Terminációkor STOP kodont eRF1 ismeri fel.

Antibiotikumok a transzlációt csak prokariótákban gátolják (mitokondrium is lehet). Pl: Mupirocin Ile-tRNS szintetáz gátlás, Tetraciklin aminoacil-tRNS kötődés gátlás, Streptomycin iniciáció gátlás és mRNS helytelen olvasása. Torokgyík egy törzsének toxinja eEF2-t inaktíváló enzim, néhány µg halálos. Ricin a 28S rRNS meghatározott adenozinjáról lehasítja az adenint, percenként 1500 riboszómát tehet tönkre.

(21) Az eukarióta transzláció szabályozásának mechanizmusai.

Általános szabályozás: Jóllakott állapotban, növekedési faktorok hatására iniciáció engedélyezése eIF4E-t fogva tartó 4E-BP „lefoszforilálásával”. Aminosav hiány, sok félkész fehérje, vírusfertőzés esetén eIF2 foszforilálásával iniciáció gátlása.

Speciális szabályozás hairpin hajtűstruktúrával: Vashiány esetén hairpinhez enzim tud kötni, melynek hatására ferritin (tárolja a vasat a sejtben) mRNS nem fejeződik ki, transzferrin receptor (behozza a vasat a sejtbe) igen. Vasfeleslegben a vas allosztérikusán gátolja az enzim hairpinhez kötődését, így ferritin kifejeződik, transzferrin nem.

Spec. szabályozás IRES (internal ribosome entry site) szekvenciával: Ilyenkor nincs szükség sapka komplexre, kevéssé v. nem szabályozott. Pl. mitózis során amikor nem lenne 4E-BP foszforiláció, így nem lenne szabad eIF4E. Patológiás eset vírusok mRNS-ei.

Szabályozás miRNS-sel: miRNS vezeti célhoz a RISC-et. Ami hasítani tud komplementer szekvenciánál, transzlációt gátolni, DeCapitálni.

(22) A fehérjék szortírozása a citoplazmába, a sejtmagba és a mitokondriumba. A citoplazmai fehérjék leggyakoribb poszt-transzlációs módosulásai.

Poliptidlánc hajtogatása energiaminimumra való törekedéssel. Először olvadt gombóc állapot, ebben még sok víz van. Dajkafehérjék segédkeznek a natív szerkezet kialakulásában, pl: megakadályozzák az idő előtti tekeredést.

Leggyakoribb poszt-transzlációs módosulásuk a foszforiláció (fehérjék 30%-a), ezt protein-kinázok katalizálják. Funkciói: főkapcsoló, kijelölés enzimek számára szubsztrátként, fehérjekomplexek képződésének irányítása, szubcelluláris lokalizáció szabályozása. Másik lehetőség során citoplazmai fehérjék membránhoz rögzülnek lipid oldalláncok segítségével, majd ezeket enzimek kapcsolják a fehérjék speciális szekvenciáihoz. Pl: Palmitoiláció, Mirisztoiláció.

Szabad, citoplazmai riboszómákon szintetizálódnak a citoplazmai szabad fehérjék (nincs jelzés) és a citoplazmai, de membránhoz kötött fehérjék, magi fehérjék, mitokondriális fehérjék azon része melyeket nem a mitokondriális DNS kódol, peroxiszómális fehérjék. Ezen utóbbiak poszt-transzlációs transzport útján jutnak el az aminosav szekvenciájuk alapján.

Fehérjék sejtmagba NLS (nukleáris lokalizációs szignál) keresztül, IMPORTIN és Ran GTP-áz enzimekkel. Importin viszi be, ahol Ran GTP-áz leszakítja a fehérjét és ki tud jutni az importinnal a citoszolba. Sejtmagból az EXPORTIN Ran GTP-ázzal veszi fel a fehérjét, egy komplexként jutnak ki, ahol a GTP felhasználásával disszociálnak, exportin visszatud jutni a sejtmagba.

Mitokondriális fehérjék közül N-terminális preszekvenicával a TOM külső membrán transzporterén keresztül a TIM23 belső membrán transzporterhez jutnak, ahol belső membrán fehérjék lesznek, vagy mátrix fehérjék. CysProCys fehérjék a TOM-on keresztül jutnak be és intermembrán fehérjék lesznek S-S hídval. C-terminális β -redő, β -hordó külső membrán vagy belső membrán carrier fehérje TIM22-n keresztül.

(23) A fehérjék szortírozása az endoplazmás retikulumon, Golgi rendszeren keresztül, az N- és az O-glikoziláció.

Minden fehérje szintézise a citoplazmában kezdődik, de bizonyos fehérjék szintézise az ER felszínén folytatódik, ekkor az egész transzlációs apparátus transzlokálódik az ER felszínére amit DER durva felszínű endoplazmás retikulumnak nevezünk ilyenkor. Az ER retikulumra irányító szekvenciát szignálpeptidnek nevezzük, fehérje N terminálisán található. Ezt kotranszlációnak nevezzük, mert ha fehérjeszintézis befejeztével kerül az ER-hez, akkor már nem tud bejutni. A riboszómát elhagyó polipeptidlánc közvetlenül jut át a transzlokonon (Riboforin I+II), amelyen áthaladást követően szignál-peptidáz hasítja le a szignálpeptidet.

A szekretációra kerülő, illetve membránhoz nem kötött ER, Golgi, lizoszóma fehérje csak N-terminális szignálpeptiddel rendelkezik, a belső szignálszekvenciával rendelkezők membránfehérjék. A plazmamembránhoz kívülről és az ER membránhoz belülről rögzülő fehérjék először karboxi terminális része membránba kerül, majd glikozil-foszfatfil-inozitol horgony alakul ki, polipeptidlánc intramembrán része levágódik.

Legtöbb ER-ben szintetizálódó fehérje poszt szintetikusán szénhidrátok hozzáadásával glikolizálódik. Ha szerin v. treonin -OH csoportjához kapcsolódik akkor O-glikozidáció, ha aszparagin nitrogénjéhez akkor N-glikozidáció.

Nglik: Az oligoszacharid egységcsomag a citoplazmában kezd szintetizálódni a dolichol-doszfát nevű lipidhez kötve, ami majd beviszi ezt az ER-be ahol oligoszacharid-transzferáz rakja az fehérjéhez. Még az ER-ben három utolsó glükóz és egy mannoz lehasad. Majd Golgiban lizoszómiális fehérjékre mannoz-6-foszfát kerül, szekretálódó és plazmamembrán fehérjékre N-acetil-glükózamin, fukóz, galaktóz, szialinsav kerül.

Oglik: Golgiban ez tovább O-glikozidálódhat. Az extracelluláris mátrixba kerül.

Az ER-rezidens fehérjék sem maradnak végig az ER-ben, először vezikuláris transzporttal a Golgi-apparátusba jutnak, majd onnan vissza.

(24) A lizoszóma saját fehérjéinek szintézise, a fehérjék lebontása a lizoszóma, illetve az ubiquitin-proteaszóma rendszer útján.

Lizoszomális fehérjék felismerését, vezikulákba való bekerülését a mannóz-6-foszfát (M6P) teszi lehetővé. Ez csak az N-glikozidált glikoproteineken alakulhat ki cisz-Golgiban. Transz-Golgiban lévő receptorok felismerik az M6P-t és vezikulákba kerülnek. 6 alatti pH-nál hidrolázok disszociálnak a receptorról lizoszómákba kerülnek a fehérjék, receptorok vissza Golgiba.

A lizoszóma funkciója a membránba csomagolt makromolekulák lebontása. Ezek eredet szerint lehetnek heterofágok (sejtbe visszajutó fehérjék), autofágok (sejtben belüli makromolekulák, organellek, melyek elöregedtek v. éhezés miatt forrásként szolgálhatnak).

Ubiquitin 76 aminosavból álló fehérje, mely a lizin oldalláncainak amino csoportjához karboxil csoportjával tud kapcsolódni.

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer funkciói a selejt v. elöregedett fehérjék eltávolítása, aminosavak újrahasznosítása olyan fehérjékből melyekre más nincs szükség, sejtműködés regulációja fehérjék eltüntetésével. Ubiquitináció során először E1:aktivátor, majd E2 konjugátor, E3 célfehérje azonosítás. Ez a folyamat során lehet Poli, Multi v. Monoubiquitináció, proteolitikus útvonalon csak a poli halad tovább. A poliubiquitináció lényegében jelzés a fehérje lebontására.

(25) A vírusok csoportosítása replikációs mechanizmusuk szerint. Az alfa és béta interferonok jelentősége.

Vírus: Fertőzőképes, de önálló anyagcserével nem rendelkező és szaporodásra képtelen, nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeköpenyből álló (0,02-0,3mmes) részecskék. Köpeny v. kapszid részük egy-kétfajta fehérjéből összeálló geometriai alakzat, legtöbbször hengeres, spirális v. ikozahedrális.

Kettősszalú és egyszalú DNS vírus replikációja is használhatja a gazdasejt enzimeit.

Kettősszalú, tisztán RNS vírus replikációjakor RNSdep-RNSpolimerázra van szüksége, amit a vírusnak kell magával hoznia. Egyszalú, negatív, tisztán RNS vírus replikációjakor szintúgy.

Egyszalú, pozitív, tisztán RNS vírus replikációjakor nem kell RNSdep-RNSpolimerázt hoznia, mert rögtön mRNS-ként funkcionálhat.

Retrovírus replikációjakor örökítőanyag egyszalú, pozitív RNS, replikációhoz reverz transzkriptáz kell, amit hoznia kell magával. A vírus örökítőanyaga

alapján készült DNS-nek kötelező integrálódnia a gazdasejt DNS-ébe.

(26) A fágok replikációjának litikus és lizogén útja, a fág represszor. A restriktációs endonukleázok.

A baktériumok vírusai a fágok, örökítőanyaguk lehet RNS v. DNS.

Lítikus út: T4 Fág megtapad a sejten, DNS belövése. Korai fág gének expressziója sejten belül, gazdasejt kromoszóma lebontása. Fág DNS replikációja, késői fág gének expressziója. Kapszaid fehérjék és lizozim szintézise, majd kapszaid megtöltése DNS-sel. Virionok összeállása, gazdasejt lízise a lizozimtól.

Baktériumok metiláz enzimpárokkal védekeznek, mert a restriktációs endonukleáz a metilált DNS-t nem vágja el.

Lizogén út: λ fág megtapad a sejten, DNS belövése. Fág DNS gyűrűvé záródik ezután még elmehet lítikus felé is. Lizogén úton a DNSe integrálódik a baktérium kromoszómájába, profágga alakul. A lizogén baktérium normálisan osztódik, profág öröklődik. Sok osztódással lizogén baktériumtörzs alakulhat ki v. profág kivágódhat és egy utódsejt profággal jön létre.

A λ fág DNS-e citoplazmában gyűrűvé záródik: plazmid. Az integrálódott λ fág génjei közül csak a represszor fehérje génje fejeződik ki. Ez gátolja a fág többi génjének kifejeződését. DNS károsodása esetén egy proteáz aktiválódik, mely elbontja a λ represszort, így kifejeződhet a Cro fehérje, a fág DNS kromoszómából kimetszését katalizáló enzim is kifejeződik, a kiszabadult fág lítikus ciklusba kezdhet.

(27) Az emberi DNS vírusok kapcsolata a daganatképződéssel, a tumor szupresszor gének fogalma.

Az egyszerű DNS vírusok lítikus ciklussal szaporodnak. A transzformáló DNS vírusok lítikus ciklussal szaporodnak a permisszív gazdasejtben (olyan sejt, amelyben a vírus teljes genomja tud replikálódni). A nem permisszív sejtben nem képesek szaporodni, azonban kis valószínűséggel integrálódhat a gazdasejt genomjába: provírus. Az integrálódott provírus nem szaporodik a hagyományos úton (nem képződnek virionok), de DNS-éről olyan fehérjék fejeződnek ki, amelyek Rb(retinoblasztóma), p53 működését gátolják, ezek a sejtciklus G1/S kontroll pontját ellenőrzik, biztosítják, hogy a sejt ne osztódjon felszólítás nélkül v. sérült DNS-sel. Az ilyen sejtosztódást lassító, ellenőrző, apoptózist kiváltó fehérjék a tumor szupresszorok. Ezek gátlása miatt a fertőzött sejt gyakrabban osztódik, könnyebben szenvednek mutációt és válnak daganatsejteké. Ilyen p53 működést gátol pl: Hepatitis B.

(28) A retrovírusok replikációja, a reverz transzkriptáz.

Az állati sejteket fertőző retrovírusok örökítőanyaga egyszálú pozitív RNS két kópiában. Erről az RNS-ről reverz transzkripcióval DNS készül, melynek integrálódnia kell a gazdasejt DNS-ébe, a vírus szaporodásához. A reverz transzkriptáz DNS-polimeráz: primert igényel. A primer egy részben kirekért tRNS 3' vége. A reverz transzkripció végeredményeként a vírusgenom átíródik DNS-re a két végén LTR szekvencia, melyek a gazdasejt DNS-ébe való integrálódást irányítják.

(29) Az onkogéneket hordozó retrovírusok, a protoonkogén és az onkogén fogalma, kapcsolatuk a daganatképződéssel.

Egyes állati retrovírusok onkogéneket is hordozhatnak, melyek azonnal daganatot okoznak, azáltal, hogy az általuk kódolt fehérjék külső növekedési jelet szimulálnak folyamatosan.

retrovírus	onkogén	fehérje
Majom szarkóma	sis	Növekedési faktor
Madár eritroblasztózis	erbB	Növekedési faktor receptor
Rous madár szarkóma	src	Tirozin-kináz (növekedési faktorok jelpályái)
Harvey Kristen patkány szarkóma	H-ras K-ras	Kis GTP-kötő fehérje (növekedési faktorok jelpályái)
FJB rágcsáló osztozsarkóma	fos	Transzkripció faktor (növekedési faktorok jelpályái)
Madár mieloblasztózis	myc	

Protoonkogének: Ép sejtekben található, a sejtosztódást szabályozott módon elősegítő fehérjéket kódoló gének.

Onkogének: A sejt mutációt szenvedett protoonkogénjei, melyekről túl sok v. állandóan aktív fehérje szintetizálódik. Vagy retrovírusok akut transzformációt előidéző onkogénjei, melyek a celluláris onkogének homológjai, úgy rabolta el őket egy-egy retrovírus.

A normális sejtosztódást a tumor szupresszor és a protoonkogének által kódolt fehérjék együtt szabályozzák. Több tumor szupresszor gén kiesése és több protoonkogén onkogénné való mutálódása vezet proliferációhoz (burjánzáshoz), rosszindulatú daganat kialakulásához.

(30) Az elektroforézis és a kromatográfiák alapelvei. Makromolekulák szintézisének mérése jelzett prekursorokkal. Enzimek a diagnosztikában.

Elektroforézis: Töltéssel rendelkező molekulák (pl: aminosavak, peptidek, fehérjék, nukleinsavak) szétválasztása elektromos térben töltésük és méretük alapján. Nukleinsavak esetén csak méret szerint, fehérjéknél is lehetséges SDS-kezeléssel töltésük egyenlővé tételével.

Kromatográfia: Molekulák szétválasztására szolgáló módszer lehet gélkromatográfia(eltérő molekulaméret alapján), megoszlási kromatográfia(eltérő oldhatóság alapján), ioncserélő kromatográfia (töltéssel rendelkező molekuláknál), affinitás kromatográfia (adszorpció alapján).

DNS-szintézis mérése: jelzett 3H vagy 14C-timidin sejtekhez hozzáadásával. Perklórsavval kicsapjuk, folyadék-szintillációs módszerrel mérjük a radioaktivitást.

RNS-szintézis: hasonlóan csak 3H vagy 14C-uridin beépülését kell mérni.

Fehérjeszintézis: 3H v. 14C jelzett esszenciális aminosav hozzáadásával.

Enzimaktivitás mérése: Mértékegysége U[μ mol termék/perc]. Lehetséges spektrofotometriával, spektrofluorimetriával v. radioaktív méréssel a jelzett szubsztrátból jelzett termék mérése. Az elpusztult sejtek szétesnek, belőlük fehérjék vérbe kerülnek, az enzimaktivitás mérésével a vérérszékben lehet következtetni bizonyos szervek károsodására, mert enzimek részben sejtípusra jellemzőek.

(31) A Western-blot és az ELISA alapelve és felhasználása. AlphaLISA módszer.

Western-blot (Expresszált fehérje azonosítás): Gélelektroforézist követően a fehérjéket egy nitrocellulóz membránra visszük át (a fehérjék membránra vándorlása a transzfer elektromos áram segítségével történik). A folyamat először blokkolással kezdődik, egy közömbös fehérje réteget visznek fel a membránra, hogy a „támadó” antitesteket a membrán ne kösse meg. Ezt követően az elsődleges antitestek felismerik a hozzájuk tartozó membránon lévő antigéneket és kötődnek. A másodlagos már jelölt antitest az elsődleges antitestekhez köt. A másodlagos antitest jelölése lehet pl. fluoreszcens festékkel és ezt filmen előhívhatjuk.

ELISA: Nem szükséges hozzá SDS-PAGE gélelektroforézis, kvantitatív eljárás. A Western-blot technikánál lényegesen egyszerűbb, első lépésben a vizsgált fehérjét valamilyen módon (pl. rögzítő antitesttel) felszínhez (polisztirol lemez 96 lyuka) kötik, majd elsődleges, másodlagos antitestekkel hasonlóan. A másodlagos antitesthez konjugált enzim rendszerint valamilyen színes termék képződését katalizálja.

AlphaLISA: A donor gyöngyöket streptavidinnal vonják be, ezzel azok képessé válnak biotinilált antitestek megkötésére. A biotinilált (biotinhez kapcsolt) antitest egy adott epitopra (antigén azon része mellyel ellenanyaghoz kötődik) specifikus, amely a vizsgálandó molekulán található. Az akceptorra egy másik molekulán lévő epitopra specifikus antitestet tesznek. A vizsgálandó molekula ezáltal szoros közelségbe hozza a két gyöngyöt. Ha ekkor 680 nm-es excitációs hullámhosszon gerjesztjük a donort, szinglet oxigén keletkezik, amely az akceptor gyöngyre jutva 615 nm-nél fényemissziót idéz elő. Az emittált fény intenzitása arányos a vizsgálandó anyag koncentrációjával.

(32) Aptamerek és alkalmazásuk, ELONA. A spiegelmer-technika elve.

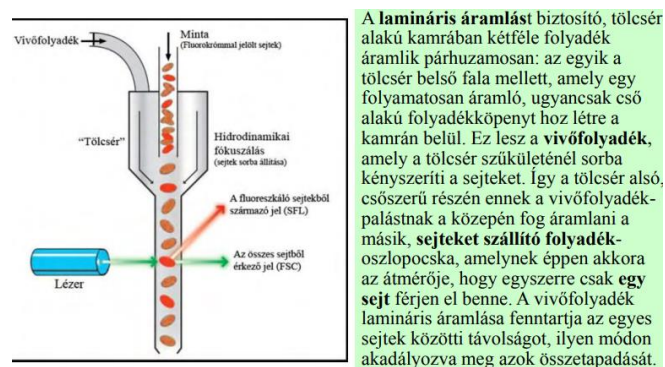
Aptamerek: Mesterségesen előállított nukleinsavak v. peptidok, melyek az antitestekhez hasonló specifitással és affinitással (piko/nanomolos tartomány) képesek az adott fehérjéhez kötni. Képesek fehérje-fehérje kapcsolatok megszüntetésére, alacsony az immunogenitásuk. Alkalmazása pl. toxinhoz konjugálódva az aptamer elősegítheti a célsejtek felismerését és a toxint a hatás helyére irányítja.

ELONA: (Enzyme Linked Oligonucleotide Assay) Antitest helyett aptamer nukleinsav a „befogó” capture molekula. Detektálható pl. úgy, hogy a ligand kötődése megváltoztatja a konformációt és a fluoreszcenciát. FRET hatás változtatása.

A spiegelmer olyan mesterséges oligonukleotidok, amelyek a természetes oligonukleotidok tükörképei. Mivel ezek nem a természetben előforduló L konfigurációjúak, ezért a nukleázok nem ismerik fel, rezisztensek velük szemben. Először D aminosavakból megsztintetizálják az L-peptid tükörképét, majd elvégzik a SELEX eljárást és végül az L-konfigurációjú aptamer (spiegelmer)-t kapjuk. Az így előállított spiegelmerhez terápiás kismolekulák köthetők, amelyeket a vérplazma RN-áza nem képes lebontani, az RNS aptamereket mindenütt bontja, ezért előnyös velük szembe a spiegelmer.

(33) Az áramlási citometria elve és felhasználása.

Módszer alkalmas a sejtméret meghatározására, sejtek eloszlásának meghatározására, sejtekben lévő makromolekulák detektálására, mérésére. Hátránya, hogy sejteket szuszpenzióban kell vizsgálni. Detektálás fényszóráson és fluoreszcencia mérésen alapul.



Megoldható vele, hogy a sejtek fluoreszcenciája alapján a kijövő sejtet elektromosan feltöltjük és töltésük alapján szeparáljuk őket. Fluorokrómok lehetnek közvetlenül vagy közvetetten (jelöletlen primer + jelölt szekunder) csatlakozó antitestek. Eredmények hisztogramon v. dotploton ábrázolhatók.

(34) A DNS bázisszekvenciájának meghatározási módszereinek elvi alapjai (kémiai hasítás – Maxam-Gilbert; megszakított enzimatisz szintézis – Sanger; új generációs szekvenálások – piroszekvenálás, ion-félvezetős szekvenálás)

Maxam-Gilbert: A DNS-t ³²P radioaktívan jelölték, majd kémiai módszerekkel hasították G, A+G, C+T, C, elektroforetikus szétválasztáskor a legkisebb nukleotidok vándorolnak a leggyorsabban, az így kialakult foltokból lehet következtetni a bázissorrendre.

Sanger: Lényege, hogy DNS-polimeráz I-gyel egyszálú DNS-t szintetizálunk. Az 5' végét radioaktívan jelöljük, 4 közeg mely tartalmazza a 4 féle dNTP-t plusz az egyiknek a didezoxinukleotid változatát. Ez azért lényeges mert a hiányzó –OH vég miatt nem tud ott tovább szintetizálódni, fragmentum keletkezik. A keletkező fragmentumokat elektroforézissel szét lehet választani és hosszuk szerint megállapítható a szekvencia, a kapott szekvencia a komplementere a valós, mérni kívántnak. Utóbbi időben radioaktív jelzés helyett fluoreszcens festéket használnak.

Ion-félvezetős: Alapja, hogy az új nukleotid lánchoz való kapcsolásakor PP (pirofoszfát) és hidrogén ion (proton) keletkezik. A jelzetlen dNTP hozzáadásakor csak akkor szabadul fel proton ha az új nukleotid komplementer a templát soron következő nukleotidjával, ilyenkor pH csökkenés detektálható. Piroszekvenáláskor a keletkező PP mennyiségét mérjük egy kapcsolt reakcióval, aminek a végén a luciferáz enzim fényvillanással jelez.

(35) Restriktív endonukleázok jellemzői. DNS fragmentek elektroforézise. Restriktív térképek készítése.

Restriktív enzim: Olyan endonukleáz (belül hasító, nem végéről), amely specifikus (legtöbbször palindrom) szekvenciáknál hasítja a DNS-t. Ragadós végek esetén komplementer véggel „összeragad”, DNS-ligáz befoltozza a hiányt, az így keletkezett molekula a rekombináns DNS-molekula.

Restriktív térkép: Ismert specifikus restriktív enzimekkel a DNS feldarabolható. A rövidebb darabok DNS szekvenálása elvégezhető az átfedő szekvenciákkal, a teljes nukleotid-sorrend meghatározható.

(36) Hibridizációs módszerek – Southern blot, Northern blot, in situ hibridizáció

Hibridizáció: Kettős DNS-szál létrehozás a bázis-komplementaritás alapján, mesterségesen előállított DNS-próbák segítségével.

Southern-blot (DNS-re): Eljárás nagyon hasonló a Western-blothoz, csak itt egyszálú DNS-t vizsgálunk, a nitrocellulóz membránra transzferált DNS mintákhoz a keresett szakasznak megfelelő radioaktívan v. fluoreszcensen jelölt komplementert adunk, ahol megfelelően hosszú komplementer szakasz van ott létrejön a hibridizáció és a szakasz helye filmen megjeleníthető.

Northern-blot (RNS-re): Az előbbi módszer egyszálú RNS-szakaszok azonosítására is alkalmazható, próba itt is jelzett DNS-szál, azonban problémát okoz az RNS bomlékonysága RN-áz mindenütt van, sterilitás szükséges.

In situ hibridizáció: Amikor a sejtben azonosítjuk egy fehérje v. nukleinsav jelenlétét. Ilyenkor jelzett komplementer DNS-t v. antitestet használnak. A sejthez hozzáadott próba kötődik, helye, kötődés mértéke mikroszkóppal a festés, fluoreszcencia alapján meghatározható.

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

Vektorok: Idegens nukleinsav szakaszt a sejtbe juttatni képes egység. Prokariota gazdasejtbe plazmidok és bakteriofágok, eukariota gazdasejtbe vírusok.

Plazmidvektor (20kb): Idegen DNS fragmentum és plazmid vektor ragadós végek miatt integrálódnak, rekombináció. Előnyük a rezisztencia faktor szelekció.

λ fág (25kb) előnye, hogy nagyobb méretű DNS inzertálható.

Cosmid (45kb): Mesterséges plazmid, a λ-fág karjainak vége „cos” beleilleszthető egy plazmidba, a cos szekvencia miatt az inzert becsomagolható λ-fágba, de a baktériumba jutva szaporodik.

YAC (1000kb): Yeast artificial chromosome

(38) Génkönyvtárak. Genom könyvtár készítése, használata, gének azonosítása, kromoszóma séta, genom térképezési stratégiák. A cDNS fogalma, készítése, vektor konstruálása, a cDNS könyvtár jellemzői. EST könyvtárak.

Génkönyvtár: Egy adott szervezet teljes genetikai anyagát reprezentáló klónozott DNS fragmentumok gyűjteménye.

Kolónia-hibridizáció: Baktériumok transzfekciója egy genomiális könyvtárral, szélesztés, petricsészéről nitrocellulózra vitel és táptalajon kinövesztés, elrakás.

Azonosítás: Lízis, DNS denaturáció, mosás, hibridizáció a jelzett próbával, mosás, majd megjelenítés filmen.

Kromoszóma séta: Ha nincs jelen olyan klón, amelyik a teljes keresett szekvenciát tartalmazza, akkor sorba rendeznek több olyan átfedő inszertet, melyek együttese tartalmazza az összes keresett információt. Mindig az aktuális inzert végének szekvenálásával keresik a könyvtárban az új próbát.

c(copy)DNS: mRNS-ről készült másolat, reverz transzkriptáz végzi, a primer (oligo dT) az mRNS poliA farka alapján. (mRNS->RNSDNS->DNS)

Génkönyvtár	cDNS-könyvtár	EST-könyvtár (Expressed sequence tag)
exon/intron promoter/enhancer alacsony expressziójú fehérjék vizsgálata	csak exonok komplett gén expressziós vektorok	Gének azonosítása rövid, expresszáldó szekvenciák alapján

EST könyvtárak létrehozása

Kiindulás: szövetspecifikus cDNS könyvtárakból
Rövid másolatok (150-400 bp) PCR reakcióval



(39) Helyspecifikus nukleázok (cinkujj- és meganukleázok)

Cinkujj: Olyan fehérjemotívum, amely specifikus DNS szekvenciákhoz kötődik. α -hélice a DNS nagy árkában három bázispárral létesít kötést, 3-5 egymást követő cinkujj 25-40bp. A hasító domént a cinkujj C-terminálisára tervezik, nem palindrom helyen fog hasítani. A cinkujj nukleáz elhasítja a DNS láncot, a sejt javító mechanizmusa az eredeti DNS-el homológ végeket tartalmazó templát jelenlétében építi be a helyes szekvenciát.

Technikával allél-gyengíthető pl. betegégek elnyomására, triplet ismétlődések javítása, génterápiás felhasználások. Gyakorlati problémák, cinkujj rossz helyen hasít, immunogenitás. Távlati lehetőség, mert ezekkel az endonukleázokkal kiküszöbölhető lehet a restrikciós enzimek random helyekre történő DNS-bevitele->káros hatás.

(40) A CRISPR/Cas technológia alapelve és alkalmazási lehetőségei. „Gene drive”.

CRISPR: A baktériumok genomjában található rövid, ismétlődő DNS-szakaszok neve. Szakaszok olyan vírus vagy plazmid egy szekvenciájának felel meg, amellyel a baktérium korábban már találkozott. A CRISPR/Cas rendszer a prokarióták védekezési módszere a vírusok és káros plazmidok ellen. A Cas fehérjék a CRISPR-ek közötti helykitöltők alapján felismerik a baktériumsejtbe behatoló idegen nukleinsavakat és darabokra vágják őket.

Alkalmazás: Pl. Gomba, burgonya barnulás oka: a polifenol-oxidáz; az enzim génjét „csendesítik” 30 %-os aktivitás csökkenés, ez nem GMO. Génszerkesztésre használható, ha bevisznek egy sejtbe CRISPR-plazmid minden komponensét, amit a célzott helyen elvágja a DNS-t. Összefűzés lehet templát nélkül vagy templáttal.

Gene drive: Egy faj egyedeibe olyan gént visznek át, ami a nőtényeket szaporodásra képtelenné teszi. Több generáció után a terméketlen egyedek száma nő, és végül a populációban elhanyagolhatóvá válik a termékeny állatok száma - a populáció kihal. Párosodás után lehet NHEJ, HDR vagy nem következik be vágás.

(41) Prokarióta expressziós vektorok, fúziós fehérjék, biológiaiaktív anyagok (inzulin, hormonok, véralvadási faktorok) előállítás géntechnológiával

Rekombináció során két eltérő forrásból származó DNS-t kapcsolnak össze. A két alkotórészt vektornak és inzertnek nevezzük. A rekombináns DNS-ek gyakori alkalmazási területe az expressziós rendszerek.

Expressziós vektorok: Olyan vektorok, melyeket a célorganizmusba juttatva ott a számunkra előnyös fehérje termeltethető.

Inzulin: Vektor konstrukció: promóter + operátor + rezisztencia faktor + idegen nukleinsav szakasz + pl. β -galaktozidáz (stabilitás megjelölés miatt) Ezután szelekció és klónozás. IPTG adásra a fúziós fehérje expresszió aktiválódik. Végül izolálás, tisztítás (pl. CNBr kezeléssel). Insulin esetén az A B láncot külön termeltetik, utána kell in vitro egyesíteni (diszulfid hidak kialakítása).

(42) Expressziós vektorok eukariotákban, riporter gének.

Tranziens v. transzgenikus állatok (megtermékenyített petesejt mikroinjektálásával)

Vírusvektor létrehozása riporter génnel. Majd expresszió mérése a riporter fehérje alapján (pl. luciferáz lumineszcencia, CAT)

A vektorban riporter gén, B-ben pedig transzaktivátor fehérje. Ha a transzaktivátor fehérje aktiválja az A vektorban lévő gének kifejeződését, akkor a riporter fehérje alapján ez mérhető.

(43) A polimeráz láncreakció elve, restrikciós fragmentum hosszúság-polimorfizmus (RFLP), allél-specifikus amplifikáció (ASA).

PCR: (polimeráz láncreakció) A genom egy kiválasztott szakaszának nagy mennyiségben való előállítása vizsgálati célokra. Alapelve a DNS szemikonzervatív megkettőződés, így n ciklus alatt 2^n másolat készül. A folyamat három lépésből áll, első denaturálás (95fok) elválnak a DNS szálak, második (50fok) primerek a minta DNS megfelelő részéhez kötnek (anneálás), harmadik DNS-dependes DNS-polimeráz felépíti az új láncot (70fokon). Az első új láncok mindig hosszabbak az egyik oldalukon, de arányuk egyre csökken a ciklus ismétlődésének számával $2(n+1)$ hosszabb DNS van. A hőmérséklet ciklikus szabályozásáról a PCR-berendezés gondoskodik. Fém termoblokkból áll, reakcióelegyben minta DNS, primerek, dNTP-k, DNS polimeráz.

ASA: PCR reakció csak megfelelő primer jelenlétében zajlik, ezáltal lehet az adekvát szálakat szaporítani specifikusan. Lehetséges az eljárás során, hogy a két allélhez (gén alternatív formái) más primer kapcsolódik, más színű festékkel festjük meg. Pl. Ha csak erős kék szín akkor A-specifikus próba kötődött csak, genotípus (szervezet v. sejt genetikai információjának összessége) homozigóta AA, ha közel azonos kék-piros akkor mindkét próba működött genotípus heterozigóta AC.

(44) A PCR orvosi-diagnosztikai, igazságügyi és élelmiszerbiztonsági alkalmazásai.

A polimeráz láncreakció orvosi alkalmazásai Genetikai tanácsadás, populációgenetikai vizsgálatok idegen genom kimutatása (fertőzések)

Monogén betegségek
Betegséget okozó mutációk kimutatása
letális/kezelhető betegségek prenatális diagnózisa

Rizikó faktorok
Poligén öröklés pl. onkogének

A DNS minta forrása:
invazív minta vétel: vér (Guthrie vércsepp); CVS (korionboholy minta)
nem-invazív mintavétel: Bucca sejtek, hajszál, köröm

Fertőző baktérium, vírus, gomba, egyéb idegen szekvenciák
Kimutatásuk: specifikus primerekkel – keletkezik-e PCR-termék ?
Példák: Pneumococcus, Mycobacterium tuberculosis (köpetből)
HIV-vírus (vérmintából)
Chlamydomonas aeruginosa (trágya, szennyezett víz)
Egyéb szekvenciák (élelmiszermintából idegen faj DNS-e)

A polimeráz láncreakció nem orvosi alkalmazásai

DNS "ujjlenyomat" vizsgálat – Alu szekvenciák (l. később !)
Apasági perek
Kriminológia
Rokonsági fok (bevándorlás)
Terroristák keresése (9/11 szindróma)
Az emberi evolúció kutatása

A polimeráz láncreakció az élelmiszer-biztonságban

Élelmiszerhamisítások leleplezése - aktuális esetek:
Európai Unió: lóhús a marhahúsos lasagne-ban
USA halbotrány: az éttermi és bolti halak 33 %-ban mások, mint ami rájuk van írva (pl. tonhal helyett kígyómakrél – emésztési zavarok !)
A probléma oka: az ellenőrzés módszere adott, de az állami kiadások csökkentése miatt nincs elég ember – „dereguláció” !

(45) A real-time PCR elve és felhasználása. Rekombináz polimeráz amplifikáció (RPA)

A valós idejű PCR rendszer a termékeket minden ciklusban detektálja, így annak megsokszorozódása végig nyomon követhető. Lehetséges DNS-interkalátor festék alkalmazásával, mely akkor bocsájt ki fluoreszcens jelet, ha a duplaszámú DNS-el komplexet alkot. Másik eljárás egy próba oligonukleotidot használ, egyik végén riporter festék másikon csillapító. Alapállapotban csillapító elnyeli, azonban PCR-termék szintézisekor a DNS-polimeráz a próbát lebontja nukleotidokra, a csillapító térben távolabb kerül.

Koncentráció meghatározható abszolút kvantifikálással ismert DNS-ből hígítással, kalibrációs görbével, vagy relatív kvantifikálással arányokat határozhatunk meg.

RPA: Előnye, hogy izoterm, nem kell termoblokkos készülék, szobahőmérsékleten is működik. Három fehérje szükséges rekombináz, polimeráz és single strand binding protein. Alk: pl. Fertőzés kimutatás nem korhízi környezetben, GMO szennyezettség kimutatása, kriminalisztikai vizsgálatok.

(46) A DNS-chip elve és alkalmazása a diagnosztikában.

Az általunk tervezett oligonukleotidokat kis lapokra visszük és vizsgáljuk mely mutáns génszakasszal hibridizál. A chip felszínén nukleotidokkal reagáló csoportok vannak, gyártáskor világítás hatására a nukleotid 3' végén lévő sapka lehasad a chiphez köt. Az 5' vége is védve van, ez is fény hatására disszociál, a négy nukleotidot 4 lépésben különböző maszkokkal visszük fel emeletről emeletre. Így gyakorlatban 18-30 emelet=ilyen hosszú oligonukleotidokat építenek. PCR-el amplifikálják és fluoreszcens elven megjelölik a DNS-eket. Az egyik allélt zölden másikat pirosan festik, sárga együttes előfordulás esetén heterozigóta. Az üres fekete helyeken nem történt hibridizáció.

(47) A mutagenézis főbb lehetőségei, kémiai mutagenézis, random és irányított mutagenézis

- A. regulátor régiók mutagenézise – a transzkripció szabályozása változik meg**
- B. kódoló szekvenciák mutagenézise – az expresszált fehérje szerkezete változik meg**
 - 1. Deléciók (kereteltolódást okoz)**
 - 2. Inzerciók (kereteltolódást okoz)**
 - 3. Szubsztitúciók (nem okoz kereteltolódást)**
 - 4. Pontmutációk (egyetlen nukleotid változását jelenti)**
- I. Helyspecifikus mutációk („site-directed mutagenesis” vagy oligonukleotid-irányította mutagenézis)**
- II. Random mutagenézis (a mutáció helye véletlenszerű)**

Irányított: A mutációk révén valamilyen megváltozott, számunkra előnyösebb fehérjék hozhatók létre. Pl. mosóporokban használt fehérjebontó enzim, eredeti enzimben metionin, melynek oxidációja tönkreteszi az enzimet, a mutánsban alanin, ellenáll az oxidációnak használható pl. hypoval is.

Random: „Misinkorporációs” v. Kémiai mutagenézis v. „Kazetta” mutagenézis. Misinkorporációsnál a 4 nukleotid egyikéből nagyon keveset teszünk, így a DNS polimeráz hibázni fog, fontos, hogy a DNS polimeráz rossz vagy hiányos hibajavítóképeséssel kell rendelkeznie. Kémiai mutagenézis a randomok közül legjobb hatásfokú, valamilyen kémiai mutagénnel kezelik a dupla szálú DNS-t pl. salétromsav. Kazetta mutagenézisnél mutáltatni kívánt szakaszt restrikciós endonukleázzal kivágjuk és egy új szintetikus oligonukleotiddal helyettesítjük.

(48) Géntranszfer, transzgenikus állatok, knock-out állatok.

Géntranszfer: A horizontális géntranszfer az a jelenség, amikor élőlények géneket, genetikai információt adnak át egymásnak. A vertikális géntranszfer a szaporodás útján az utódoknak juttatott géneket jelenti, a horizontális géntranszfer esetében azonban az egyedek nem feltétlenül rokonok, sőt más fajhoz is tartozhatnak. Transzgenikus állatok a megtermékenyített petesejt mikroinjektálásával.

Transzgén: Egy idegen gén bevitelle egy megtermékenyített petesejt genomjába, általában vektor segítségével. Az ebből kifejlődött egyed idegen géneket tartalmazhat.

Knock-out állat: A megtermékenyített petesejtbe egy adott gén hibás változatát juttatják be, ez rekombinációval kicserélődhet és ha gén hibája élettelen összeegyeztethető, KO-élőlény jön létre.

Knock-in állat: Hiányzó gén célzott beépítése embrionális őssejtekbe.

(49) A mikro-RNS-ek kialakulása, szerepe a sejtekben, illetve felhasználása géncsendesítésre.

A miRNS-ek olyan 20-24 nukleotidból álló egyszálú RNS-ek, melyek döntően a transzláció szintjén szabályozzák a génexpressziót az argonauta fehérjékkel. Mivel a miRNS-ek gátló hatása leggyakrabban fehérjeszintézis csökkenésével jár géncsendesítésnek nevezzük. miRNS-t kódoló DNS szakasz lehetnek önálló miRNS gének, vagy intronokban is lehet. Az 5' sapkával és poliA farokkal rendelkező a pri-miRNS. Ezek levágásával és hajtúknél szétvágással létrejönnek a pre-miRNSek. Ezeket a citoszólban a Dicer tovább hasítja és több fehérjével kialakul az ún. RISC komplex, az egyik miRNS szálát kilöki. A miRNS és mRNS a komplementaritás elve alapján kapcsolódik.

(50) A Humán Genom Projekt és a hozzá kapcsolódó újabb humángenetikai vizsgálatok. Humán mutációk jelentősége a diagnosztikában és a terápiában. Az egyéni genetikai adatok védelmének jelentősége.

13 éves projekt 2003-ban fejeződött be, közpénzből, nemzetközi koordinációval. Hierarchikus stratégiával az alacsony felbontástól mentek a nagy felé.

Következtetések voltak pl. miRNSek, emberi fajon belül genom 99.5%-ban azonos. A különbséget a mutációk, polimorfizmus okozza. Polimorfizmus több mint 1% hatása semleges lehet, mutáció <1%, de betegség lehet a hatása v. súlyos következményekkel járó pl. sarlósejtes anémia.

Erős politikai nyomásra adatok szabad forgalmának elve érvényesült. Eredménye a világ bármely pontján elérhető genetikai adatbázisok.

(51) A génterápia változatai és eddigi eredményei (TIL, ADA, cisztás fibrózis terápiái).

Génterápia: A páciens sejtjeinek genetikai módosításán alapuló terápia. Egyelőre kísérleti próbálkozások vannak. Klasszikus: Célsejtbe juttatjuk a gént és expressziót idézünk elő. Nem klasszikusan az adott gén expresszióját gátoljuk.

1989: Első engedélyezett humán géntranszfer. Azt vizsgálták, hogy a TIL (tumor infiltráló limfocita) elpusztítja-e a tumort. Neomicin rezisztencia gén beültetése, nyomon követése, a visszainjektált néhány NEOrez-TIL megtalálta a tumort, de nincs gyógyulás.

1990: Első működő génterápia adenzin-dezamináz hiány kijavítása. Sokszoros ismétlés szükséges, költséges, invazív módszer.

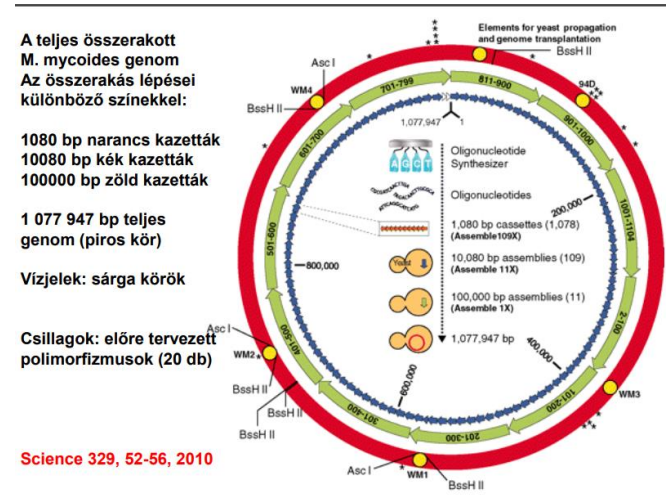
Cisztás fibrózis: Mutáció következtében egy Cl-ioncsatorna nem működik, a testnedvek koncentráltabbak, viszkózusak. A célsejtek a légúti epitel sejtek, aeroszol terápiával sprayben bevitt gének. Aeroszolban liposzómákba zárt DNS.

CRIPR felhasználása hibás expresszió gátlásával NHEJ, vagy hibás génszakasz kicserélésével HDR.

Csak szomatikus (testi sejteken) génterápia végezhető.

(52) A szintetikus biológia fogalma. Mycoplasma átprogramozása mesterséges genommal.

Szintetikus biológia: Molekuláris biológiai módszerekkel teljesen szintetikusan létrehozott genom bevitele baktériumokba. Genom tervezése in silico történik. Elvileg teljesen új, soha nem létezett élőlények is előállíthatók. 2010-ben mycoplasma mycoides genom szintézise és bevitele M. capricolumba, az új baktérium életképes, szaporodik.



Szintetikus biológia távlata pl. mikroorganizmusok programozása különféle anyagok termelésére, biológiai hadviselés veszélye.

(53) Természetben nem létező nukleinsavak és fehérjék előállításának elvi alapjai.

Első sikeres mesterséges nukleotid-pár, amely DNS-be építhető, majd replikálható 2014-ben d5SICS-dNAM naftalin/izokinolin gyűrűket apoláros kölcsönhatások tartják össze.

Eddigi stratégiák újabb aminosavak beépítésére fehérjékbe: 1. A stop kodonok és ritkán használt kodonok megváltoztatása.

2. Kétlépéses szelekció ortogonális tRNS-szintetáz párokkal. Csak azok a sejtek maradnak életben, melyekben a nem természetes aminosavat kódoló tRNS maradtak meg.

3. Ortogonális riboszómák és ortogonális tRNS enzimpár készletek.

(54) A molekuláris biológia internetes adatbázisai és használatuk (NCBI, Uniprot, Brenda, KEGG). Az adatbázisok szabad felhasználásának jelentősége.

NCBI Blast programjával ismert nukleotid szekvenciával azonos szekvenciák megtalálása, tervezett primer valóban csak a kimutatandó szekvenciához kötnek e.

(55) Orvosi és biológiai publikációs adatbázisok (Pubmed, Ovid, Scopus, Web of Science) és felhasználásuk a kutatásban. Az OMIM és jelentősége. A Magyar Tudományos Művek Tára. Az „Open access” fogalma.

OMIM: Online Mendelian Inheritance of Man: NCBI honlapjáról elérhető, betegségek adatait tartalmazza.

Pubmed előnye, hogy ingyenes, bárholnan elérhető.

Scopus, Web of Science idézet kereső oldal.

Ovid/Medline – a Semmelweis Egyetem hálózatában olvasható, orvosi cikkek kivonatait, számos esetben teljes szövegét tartalmazza, 1950-től az olvasás időpontjáig. Elérés: www.lib.sote.hu-n keresztül „Adatbázisok”

ISI Web of Knowledge/Web of Science (WOS) ill. Journal Citation Reports (JCR). WOS: cikkek összefoglalói, teljes szövegek is, továbbá idézettség is kereshető benne; JCR: folyóiratok impakt faktorai éves bontásban.

Sciverse/Science Direct ill. Scopus

Science Direct: cikkek összefoglalói, előfizetett folyóiratok teljes szövegei
Scopus: idézettség keresésére alkalmas, 1995-től, de régebbi cikkek 1995 utáni idézetei is megtalálhatók.

Szabadon elérhető szakirodalmi adatbázisok:

Pubmed: az NCBI adatbázis része, nagyon sok cikknek a teljes szövege is elérhető (l. előbb)

MTMT: Magyar Tudományos Művek Tára; az MTA adatbázisa, magyar kutatók irodalmi munkássága szabadon vizsgálható, cikkek adott csoportosításban, valamint a kutatók szcientometriai adatai is. Jelentőségük: a közpénzből végzett kutatások eredményeinek közzétevése – a tudás ne legyen monopolizálható !

Open Access: A tudományos folyóiratokban megjelent szakkikkek szabad elérhetőségét, kereshetőségét jelenti az interneten.

(56) Mycobacterium tuberculosis és Leiden-szindróma kimutatására szolgáló primer internetes adatbázissal történő tervezésének szempontjai.

Átfedő szekvenciák megkeresése. Pl. Primer 3 programmal primer tervezés, fontos, hogy a két primer között az olvadáspont nagyon közel legyen, mert egy annealing hőmérsékletet tudunk használni a PCR-ben. Olvadáspontot primer hossza és GC tartalma határozza meg.

Tervezünk egy primert amely akkor ad terméket ha van mutáció az 506-dik aminosavban, és egyet amely akkor ha aminosav glutaminra módosult. Ki kell keresni, hogy melyik triplet kódolja ezt az aminosavat. Előfordulhat, hogy a saját és primerpárok közötti dimerizáció csökkenti a PCR reakció speciticitását, erre is figyelmeztet a Primer 3 program.

(57) Fehérjehomológiák keresése internetes adatbázisokkal. A homológiák felhasználása tudományos elemzésekben. Fehérje térszerkezetek modellezése.

Blast programmal két fehérjeszekvencia egyezőség összehasonlítható. Pl. human NOS II és II izoenzim 51% teljes homológiát mutat. Ha NOS II izoenzimét hasonlítjuk össze az embernek és az egérnek 81%-os egyezést kapunk.

Alkalmazása lehet allergén előrejelzéseknél, immunogenitást elsősorban a térszerkezet határozza meg. Egy adott élelmiszerre való allergia homológ epitopokra (antigén molekula azon része melyhez az antitest kötődik) való allergiát is jelenthet.

Fehérjék térszerkezetének ábrázolására Rastop program képes. Uniprot adatbázisból letöltött pdb fájlt tudjuk Rastopba importálni.

(58) A rendszerbiológia alapfogalmai, skálafüggetlen hálózatok fogalma és tulajdonságai. Merev és rugalmas hálózatok. Poligénis öröklődésű betegségek kialakulásának elméletei. Az inzulin, mint elágazó hálózati kiindulópont.

Skálafüggetlen eloszlás: pl. internet, biológiai rendszerek. A nagyfokszámú csúcsok nagyobb eséllyel kapcsolódnak egymáshoz, erős hibatűrés a véletlen hibákkal szemben, de célzottan szétverhetők.

Merev hálózat: Stabil „nem tanul”. Rugalmas hálózat: „Tanulásra” képes, de instabil.

Egymásba épültség: A hálózatokon belül egyéb hálózatok találhatóak (sejt hálózatában, fehérjék)

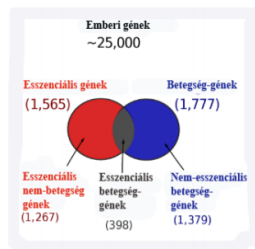
„Kisvilágság”: Csomópontok közel vannak egymáshoz, hálózat csak logaritmikusan nő.

Modularitás: Egyes csoportok tagjai között jóval sűrűbb a kapcsolat, mint két csoport között.

Hierarchikus hálózatok hatékonyan irányítanak, de információterjesztő képességük gyenge.

Fő biológiai hálózatok: Fehérjeszerkezet hálózatok, fehérje-fehérje kölcsönhatás hálózatok, metabolikus hálózatok, jelátviteli hálózatok.

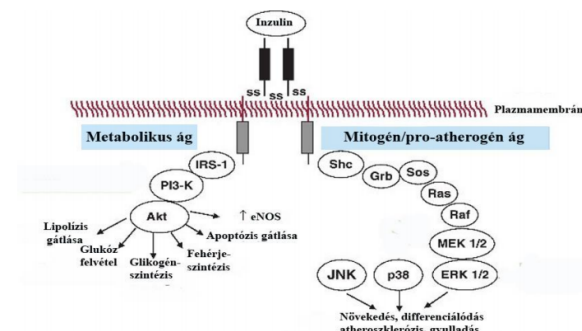
Szupracelluláris hálózat: idegsejtek hálózata, immunrendszer.



Komplex, poligénis betegségek kialakulásának elméletei:

1. CD/CV (common disease/common variants) hipotézis – a betegség-gének csomópontok a hálózatban
2. CD/RV (common disease/rare variants) hipotézis – populációsán ritka, de erős variánsok kölcsönhatása környezeti tényezőkkel

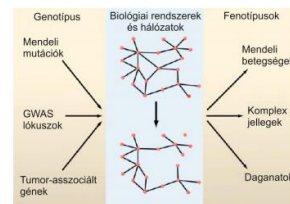
Közös betegség-gének: azonos szomatikus mutációk a jelátviteli utakon különböző betegségek kialakulásában játszanak szerepet. Ezek a hálózatelmélet szerint csomópontok, és olyan gyógyszerek terápiás célpontjai lehetnek, amelyek több betegség esetén is használhatók – pl. különböző daganatokban azonos mutációk lehetnek a foszforilációs hálózatokban – azonos szer többféle daganat esetén használható.



Az inzulinhatás metabolikus ága az anyagcserét anabolikus irányba tolja el a PI-3-kinázon keresztül. A mitogén ág a kapcsoló fehérjéken és a Ras-on keresztül a MAP-kináz kaskádát aktiválja, ami a sejtek proliferációjához vezet. Fontos kapcsolat a két ág között: a proliferáció számos vegyület szintézisét (anabolizmus!) igényli.

(59) Hálózatok megzavarása – betegségek. A hálózatok kutatás és gyógyszertervezés kapcsolata, különös tekintettel a daganatterápiára (irányító mutációk jelentősége). Gyógyszercélpontok előrejelzésének alapelvei.

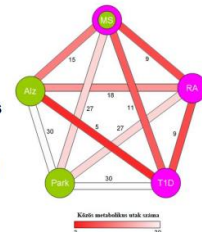
1. Csomópontok eltávolítása; 2. élék módosítása (él megszűnése/új él kialakulása)



GWAS: genome wide association study; a teljes genom vizsgálata nagy létszámú populációban, SNP-k és betegségek asszociációjának megállapítására.

Betegségek hálózata: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes adatbázis, benne részleges adatbázissal (pl. humán betegségek, gyógyszercélpontok). Átfedések: olyan csomópontok, amelyek több betegségben is szerepet játszanak

Öt különböző betegség közötti kapcsolat GWAS gének alapján; A számok a közös anyagcsereutak számát mutatják. Három adatbázist használtak fel



Hálózatok kutatás és gyógyszertervezés

Közös metabolikus utak és jelátviteli kaskádok – kombinált terápiák
A hálózati szomszéd célbavétele – palliatív terápiás lehetőség

Új célpontok predikciója – számítógépes gyógyszertervezés

1. Vegyület-alapú (drug-based) megközelítés – ismert hatású molekulákból indul ki; alapul vett tényezők:
 - a. Kémiai szerkezeti hasonlóságok; b. Hasonló molekuláris hatásmechanismusok
2. Betegség-alapú (disease-based) megközelítés – azonos terápiás lehetőségekből indul ki; alapul vett tényezők:
 - a. Ismert azonos terápiák; b. Közös molekuláris patológiai mechanizmusok; c. Hasonló mellékhatások

A számítógépes előrejelzést követően kísérletek, majd klinikai kipróbálás szükséges az új célpont(ok) elleni hatás vonatkozásában

Jelentősége: 1. az ismert hatások/mellékhatások miatt az új alkalmazás költségei lényegesen alacsonyabbak, gyorsabban törzskönyvezhető; 2. az új fejlesztések eleve multicentrikusan végezhető – szélesebb körű felhasználás – kedvezőbb ár. Ezért az új fejlesztéseket hálózati csomópont-célpontokra kell irányítani!

Hálózatok kutatás és daganatterápia

Klasszikus kemoterápia – a sejtosztódás közvetlen gátlása – súlyos mellékhatások

Célzott daganatterápia – a daganat kialakulásában szerepet játszó jelátviteli mutációját veszi célba – kevesebb mellékhatás, csak a daganatsejtet „találja el”. Előzetes célzott genetikai vizsgálatot igényel – hátrány: magas költségek!

A tumor progressziójának genetikai háttere:

1. Irányító (driver) mutációk – a sejtek proliferációját fokozó módosulások, a tumorsejt szelekciós előnyhöz jut
2. Rezisztencia mutációk (driver alosztyál?) – eleinte kevés sejtben vannak jelen, de elszaporodhatnak – kivédhetik a célzott kezelést (de más szerrel szemben érzékenyek lehetnek!)
3. Utazó (passenger) mutációk – nem jelentenek szelekciós előnyt a rákos sejteknek

A daganatos elfajulás a darwini szelekció sémáját követi – proliferációs előny

Általában több driver mutáció kell a daganat kifejlődéséhez és elfajulásához:

1. Tumorsuppresszor gének (pl. p53) mutációja; 2. Mutációk/mutáns sejtek kritikus száma; 3. Véréllátás (angiogenezis); 4. Immunsuppresszív jellegű mutáció(k)

Ha ezek közül csak egy-kettő van jelen, korlátozott proliferáció – jóindulatú tumor

Rákos őssejt problémája – korlátlan élettartam, számuk nem nő, de ellenálló, belőlük keletkeznek a gyorsan proliferáló daganatos sejtek – új terápiás célpont!

Daganatterápiás lehetőségek példái:

Azonos irányító mutációk: azonos gyógyszerek alkalmazhatók többféle daganat ellen, pl. a Ras gén mutációi driver mutációk lehetnek több daganatban;

JAK/STAT kinázok közös jelátvivők daganatok és gyulladásos és/vagy immunológiai folyamatok esetében – NF-κB-n keresztül hat, ill. gátolja a T-helper sejtek antitumor választát. Mutáns STAT3-ra ható gyógyszernek gyulladásos és tumoros célpontjai is lehetnek.

Merev és rugalmas („tanuló”) hálózatok és kölcsönös átalakulásaik – a rugalmas hálózatokat a csomópontokon, a merev hálózatokat a csomópontok szomszédjain lehet megtámadni (Csermely P.)

(60) A génmódosított növények előállítása, termesztése, engedélyezése.

<http://mek.oszk.hu/03200/03216/html/#5>

(61) A génmódosított növények termesztésének kockázatai, egy-egy példával.

<http://mek.oszk.hu/03200/03216/html/#5>

(62) A molekuláris biológia ökológiai vonatkozásai. A mikrobiom/mikrobiota fogalma. Az ökológiai egyensúly jelentősége, az ökológiai lábnyom fogalma, Gaia-elmélet.

Mikrobiom: Az emberi testben lévő mikroorganizmusok összessége. Ide tartoznak baktériumok, vírusok, gombák. Emberi test több mint tízszer annyi mikrobiális sejtet tartalmaz, mint emberit.

Ökológiai lábnyom: Egy erőforrásmenedzselésben és társadalomszervezésben használt érték, ami kifejezi, hogy adott technológiai fejlettség mellett egy emberi társadalomnak milyen mennyiségű vízre és földre van szüksége önmaga fenntartásához és a megtermelt hulladék elnyeléséhez. (Szén, legelő, erdő lábnyom)

Gaia-elmélet: A Föld összes élő és élettelen része szorosan összefüggő, homeosztatikus rendszert alkot, tág határok között képes fenntartani létezésének feltételeit. A Föld bioszféráját, atmoszféráját, vizeit, földet magába foglaló komplex egység.