

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

Az öröklődő információkat szervezetünkben a nukleinsavak hordozzák:

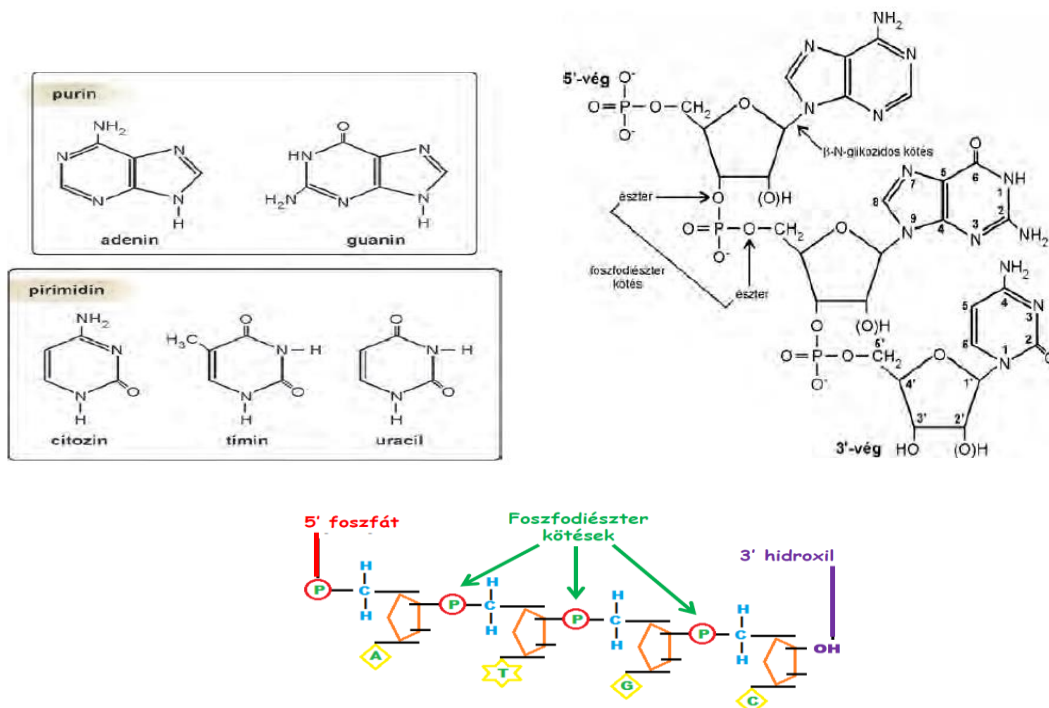
- dezoxiribonukleinsavak(DNS): genetikai információ tárolása
- ribonukleinsavak (RNS): segítségével történik meg a genetikai információ kifejeződése, működése.

Mindkét vegyület makromolekula, melyek építőelemei a **nukleotidok**. A nukleotidok maguk is több részből állnak:

- nitrogéntartalmú szerves bázisok, a genetikai információ kódolásáért
 - Purinvázas szerves bázisok: adenin, guanin
 - Pirimidin vázas szerves bázisok : citozin, uracil, timin
- Pentóz monoszacharid egységek:
 - D-ribóz (RNS)
 - 2'-dezoxi-ribóz (DNS)
 - A szerves bázis az 1-es(pirimidin) és a 9-es (purin) Nitrogénjével kapcsolódnak össze
 - Szerves bázis + pentóz= nukleozid
- Foszfát csoport:
 - A pentóz 5' OH csoportjához észteresedik

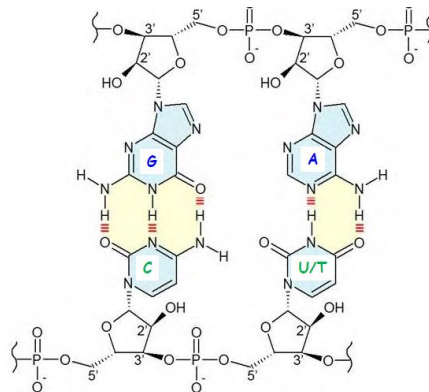
Ez a három molekula építi föl a **nukleinsavak alapelemeit, a nukleotidokat**.

Ezek a nukleinsavláncban úgy kapcsolódnak egymáshoz, hogy a foszfátcsoportok a szomszédos nukleotid pentóz egységének 3'-OH csoportjával alakítanak ki észterkötést (foszfodiészter kötés), így a nukleinsav gerincét ezen pentóz-foszfát-lánc alkotja. Ebből következik a nukleinsavak **irányítottsága, polaritása** is, vagyis az a biológiailag fontos tulajdonság, hogy a **DNS- és RNS-szál 5'- és 3'-vége szerkezeti és funkcionális szempontból is eltér egymástól**.

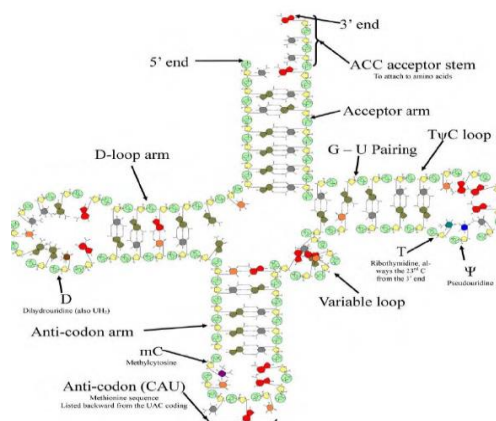


2. A nukleinsavak másodlagos és harmadlagos szerkezete. A DNS denaturációja, a hibridizáció.

A láncról lelógó bázisok képesek specifikus H-híd kötést létesíteni a közelükben lévő más bázisokkal: **Az adenin két H-hidat alkot az uracillal vagy timinnel, a guanin pedig három H-hidat alkot a citozinnal.** Ezt a mechanizmust hívjuk **bázispárosodásnak**, ami, ahogy azt látni fogjuk, a genetikai információ tárolásában és olvasásában elengedhetetlen fontosságú.



Az RNS molekulák ribonukleotidokból álló polimerek, néhány kivételtől (például kettős szálú RNS vírusok) eltekintve egy szálból állnak. Ne úgy képzeljük azonban, hogy ez az egy szál úgy úszik a sejtekben, mint valami cérna; a bázispárosodás szabályainak megfelelően bizonyos részek összehajolhatnak, összetapadhatnak, ún. hajtűket és hurkokat képezhetnek, így kialakítva az **RNS másodlagos szerkezetét**. Tipikus példa erre a tRNS.



Egy tRNS

Az így összetapadt részek és az egyszálúan maradt részek egymásra tekeredhetnek, jellegzetes **harmadlagos szerkezetet** hozhatnak létre. Azonban ezek a háromdimenziós struktúrák korántsem olyan állandóak és egyediek. A H-hidak hőmérséklet emelkedés hatására fellazulhatnak, és más helyeken, más kapcsolatok jöhetnek létre, új formát adva az RNS-molekuláknak. Néhány speciális RNS fajtának viszont nagyon is állandó a térszerkezete, minek következtében fontos szerepet tölthetnek be katalitikus reakciókban. Ilyenek például a tRNS-ek, melyek az aminosavakat szállítják a fehérjeszintézis helyére (3.18. ábra), vagy az rRNS-ek, melyek a riboszómák alkotórészei.

A DNS (néhány kivételtől eltekintve) kettős szálú molekula. A **DNS másodlagos szerkezetének** a bázispárosodás miatt létrejött **kettős hélix** tekinthető. A kettős szál antiparalel irányultságú (az egyik szál 5' végével szemben található a másik szál 3' része). A szemben lévő bázisok H-hidakkal kapcsolódnak egymáshoz adeninhez ugyanis mindig timin kötődik két H-kötéssel, míg guaninnal szemben minden esetben citozin helyezkedik el, és közöttük három H-híd található (tehát az egyik szál bázissorrendje egyértelműen meghatározza a másik szál bázissorrendjét). A kettős lánc a térben csigaszerűen feltekeredik. a kettős hélix másodlagos szerkezetben a középen elhelyezkedő bázispárok a hélix tengelyére merőlegesek. A hélix jobb menetes. Egy fordulatban 10 bázispár helyezkedik el, ezek távolsága 0,34 nm. A molekula felszínén a párhuzamos láncok között egy kisebb, 0,6 nm-es és egy nagyobb, 1,2 nm nagyságú bemélyedés, a kis és nagy árok található.

A DNS kettős hélixének széttékert vagy éppen ellenkezőleg: túltekert formáját szupertekercsnek nevezzük, ez a **DNS harmadlagos szerkezete**. A széttékert DNS-t negatív szupertekercsnek hívjuk, ebben az esetben 10-nél több bázispár helyezkedik el egy csavarulatban. Ebben az állapotban található a replikációra és transzkripcióra képes aktív DNS. Ezzel szemben pozitív szupertekercsnek nevezzük a szorosabb, túltekert hélixet, amely fordulatonként tíznél kevesebb bázispárt tartalmaz.

A DNS denaturációja során a hőmérséklet emelkedésével a H-híd kötések felbomlanak, és **két egyszálú nukleinsav láncra esik szét a DNS molekula**. A denaturációs olvadáspont amikor a DNS-ek fele egyszálú formában van. Renaturáció során visszaáll a kettős hélix szerkezet.

Nukleinsavak hibridizációja: Komplementer láncokból mesterségesen létrehozott kettősszálú nukleinsav (DNS-DNS, vagy DNS-RNS).

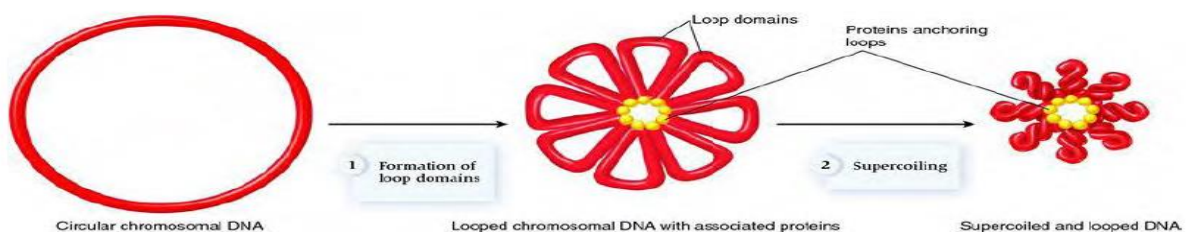
3. A gén, a pozitív (kódoló) és negatív (antisense) DNS szál fogalma. A prokarióta, az eukarióta és a vírus genom összehasonlítása.

Egy élőlény teljes genetikai információját **genomnak** nevezzük. A genom funkcionális egységei a **gének**. A gének legtöbb esetben fehérjéket kódolnak, kiolvasható belőlük a fehérjék primer szerkezete. Az eukarióták esetében egy gén egy fehérje kifejeződéséért felelős, prokariótákban ezzel szemben policisztronos, több fehérje kifejeződését egyszerre lehetővé tevő funkcionális egységek is ismertek. Fontos, hogy a gének egy része olyan RNS-molekulákat kódol, melyek nem fordítódnak le fehérjére, de a fehérje szintézis folyamatában nélkülözhetetlenek (pl. rRNS-ek, tRNS-ek, mikroRNS-ek).

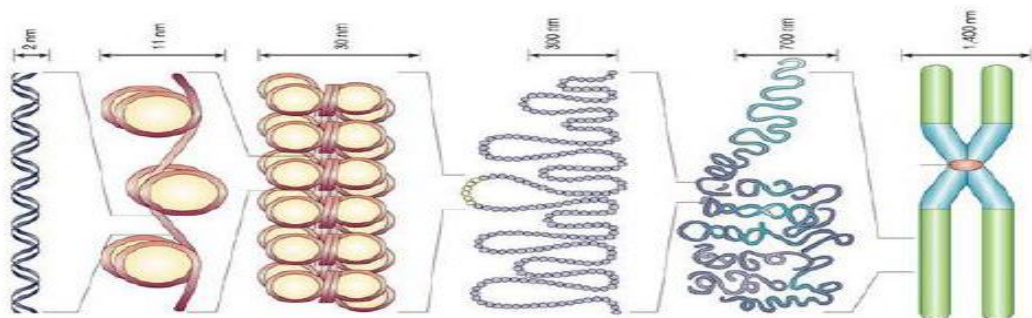
A transzkripció szempontjából megkülönböztetünk egy kódoló DNS-szálat (pozitív, értelmes, **sense szál**), melynek szekvenciája azonos a szintetizálódó RNS-sel, illetve egy minta DNS-szálat (**negatív, templát, antisense szál**), mely leolvasásra kerül. Mivel a DNS mintaszál komplementer a másik (a kódoló) DNS-szállal, és a transzkripció során az RNS a DNS-minta komplementereként készül, a keletkezett RNS szekvenciája meg fog egyezni a kódoló DNS-szál szekvenciájával (kivéve, hogy a DNS-ben lévő timint az RNS-ben uracil helyettesíti). Fontos megjegyezni, hogy az átírás iránya génenként változó lehet, azaz **egy adott DNS-szál valójában az egyik génre nézve lehet kódoló (pozitív, értelmes), a másik szempontjából pedig minta (negatív, antisense) szál**, annak megfelelően, hogy a gén milyen orientációban helyezkedik el a DNS-szálon.

Prokarióta genom: A prokarióta sejt genetikai információját tartalmazó molekula, cirkuláris kettős szálú DNS.

A PROKARIÓTA DNS CSOMAGOLÁSA



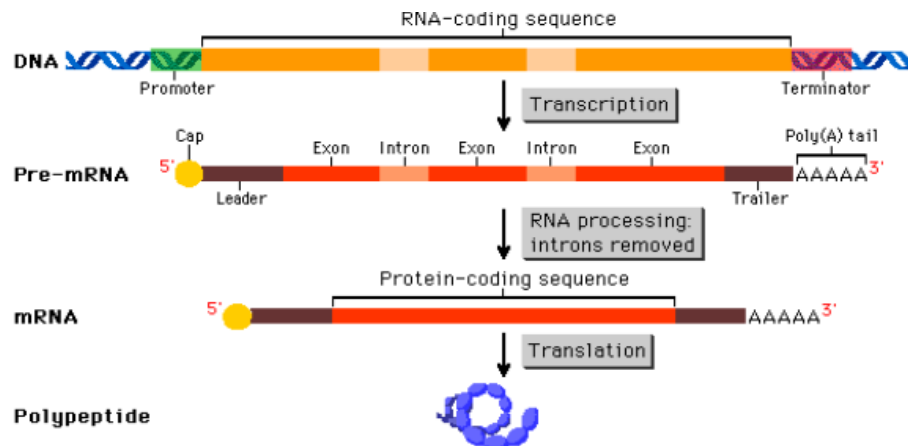
Eukarióta genom: Eukarióta sejt sejtmagjában található, a genetikai információt tartalmazó molekulák, amik kromoszómákba tömörülnek, lineáris kettős szálú DNS formában.



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

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

Az eukarióta gén szerkezet bonyolultabb, mint prokariótáknál. A gén nem minden szakasza kódol fehérjét. Azok a szakaszok, amik fehérjét kódolnak, **exonnak** nevezzük. **Intron** az 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 eukarióták genomja átlag 20-50% nem kódoló szekvenciát tartalmaz. Ezek jelentős része több példányban előforduló, ismétlődő, repetitív DNS.

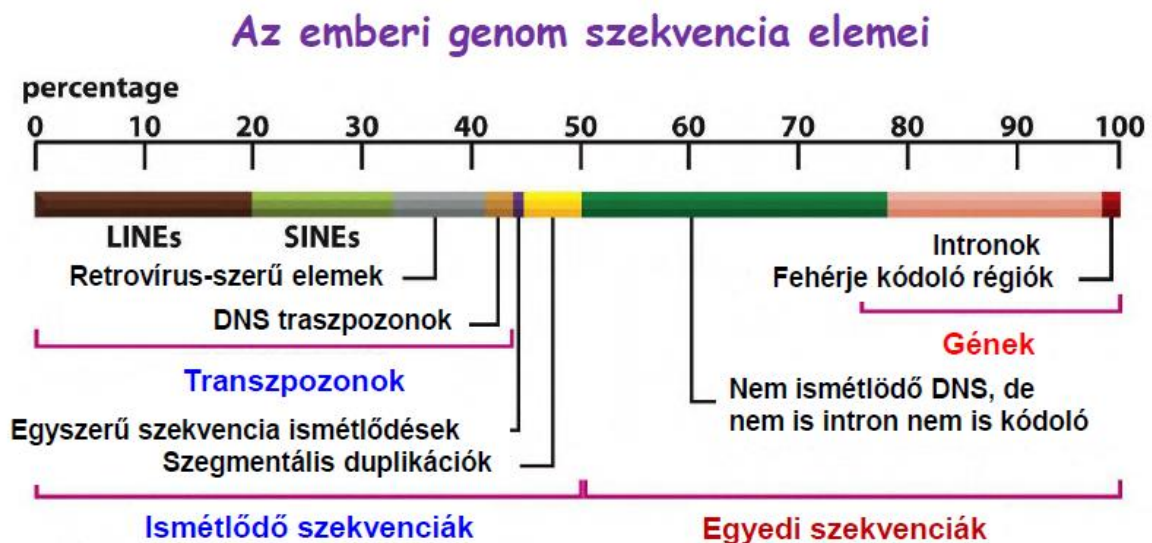


Figure 4-17 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

- 20,687 fehérje kódoló gén
- 11,224 pszeudogén
- 76% átíródik
- 8800 small RNA
- 9600 long noncoding RNS
- 3,9 millió fehérjekötő hely

Az ismétlődő szekvenciák főbb típusai:

A. Géncsaládok:

- Kettőnél több gén példány a genomban

Szétszórt géncsaládok:

- Az egyes gének szekvenciái különbözhetnek, az evolúció során eltérő funkciót nyerhetnek
- Egy családon belül mutációk során egy gén funkcióképtelenné is válhat: pszeudogén

Tandem géncsaládok:

- Bizonyos gének termékeiből a sejtnak nagyobb mennyiségre van szüksége (rRNS-ek, tRNS-ek, hisztonok génjei)
- Az ilyen családok génjei egymást követő sorozatokat alkotnak.

B. Nem kódoló ismétlődő szekvenciák

Telomer szekvenciák:

- A DNS lineáris rövidülése ellen véd

Szatellit DNS:

- 5-200 bázispár egységekből álló ismétlődő elemek
- Méretük több száz kb is lehet
- Főként eukariótákban fordul elő
- Hatalmas blokkok a centromernél, a kromoszómák végein
- **Heterokromatint alkotnak, a kromoszóma szervezésében vesznek részt**

- Minisatellitek:

- Maximum 25 bázispár egységek
- Maximum 20 kb
- VNTR: Variable Number Tandem Repeats

- Mikrosatellitek:

- Maximum 10 bázispár
- Méretük maximum 200 bázispár
- STR: Short Tandem Repeats

**Tandem
szekvenciák**

Transzpozonok (*Ugráló gének*) : a genomban könnyen helyet változtató génszakaszok. Növelik a változatosságot, áthelyeződésük új gének átíródását indíthatja el. Evolúciós jelentősége lehet. Két típusa lehet:

- *DNS-transzpozonok*:
a DNS-szakasz kihasad a genomból és egy másik helyen integrálódik (nonreplikatív transzpozíció), vagy a DNS-régió megkettőződik, az egyik kópia marad a helyén, a másik máshol integrálódik (replikatív transzpozíció)

- Retrotranszpozonok:

RNS-intermedier közvetítésével történik, a donor DNS-régió RNS-be íródik át, majd azon mint templáton reverz transzkriptáz segítségével kettős láncú DNS szintetizálódik és az beépül a cél-DNS-be.

A retrotranszpozonok egyik csoportja hasonlít a retrovírus genom DNS-másolatára, provírusára, ezek a virális retrotranszpozonok.

A nonvirális retrotranszpozonok inkább celluláris mRNS-ekre hasonlítanak, 3'-végükön például poli(A)-szekvenciát tartalmazhatnak.

Emberi genomban 1 millió másolat, a genom 11%!.

5. Az eukarióta kromoszóma szerveződése, a ploiditás, a triszómia.

Az eukarióta sejtek esetében a prokariótákhoz képest a DNS lényegesen hatékonyabb feltekeredése szükséges, ami annak hosszát öt nagyságrenddel csökkenti. Ezt az igen kompakt **kromoszóma** szerkezetet **kromatinnak** nevezzük, melynek kialakulásában a **hiszton fehérjék** játszanak alapvető szerepet. A hisztonok és a DNS közötti erős kölcsönhatás kémiai alapja az, hogy ezen fehérjék rendkívül gazdagok bázisos, azaz fiziológiás pH-n pozitív töltésű aminosavakban: lizinben és argininben, amelyek erősen kötődnek a DNS negatív töltésű dezoxiribóz-foszfát vázához. Ezek segítségével alakul ki a kromoszóma szerkezet alapja, ami egy fonalra felfűzött gyöngysorhoz hasonlítható. A gyöngyök a **nukleoszmák**, amelyeket összesen 8 hiszton fehérje alkot. A nyolc hisztonból álló nukleoszmára kb. 150 bázispár hosszúságú DNS-szál tekeredik fel megközelítőleg 1,5 fordulatot képezve. A hisztonok a DNS kis árkához kapcsolódnak, így a nagy árok más – a DNS működésének szabályozásában szerepet játszó fehérjék számára szabadon hozzáférhető. Két nukleoszmát 20–90 bázispárnyi DNS-lánc köt össze, a DNS ezen szakaszához a H1 hiszton kötődik, amely a nukleoszmákkal is kölcsönhatásba lép, így kezdődik meg a DNS további feltekeredése. A nukleoszmák a DNS-lánc mentén elmozdulhatnak, így egyes szakaszok feltekeredése szorosabbá válhat, míg a szerkezet máshol lazul, azaz a DNS jobban hozzáférhetővé válik. A teljes DNS-láncrea kiterjedő rendkívül kompakt szerkezet alakul ki a mitózis metafázisa során (ilyenkor a kromoszómák fénymikroszkóppalláthatók). Ezzel szemben a DNS működését, azaz a gének transzkripcióját éppen a lazább kromatinszerkezet teszi lehetővé.

Heterokromatin: a kromatin olyan típusa, mely nem aktív. A DNS-t körülvevő hiszton fehérjék szoros kapcsolata miatt a polimeráz (DNS-ről RNS átírást végző) enzim nem fér hozzá a DNS-hez. Két fajtája a konstitutív és a fakultatív heterokromatin. A konstitutív soha, a fakultatív bizonyos esetekben kifejeződik.

Eukromatin: a kromatin egy típusa, mely gazdag génekben, legalábbis a heterokromatin régióhoz viszonyítva. Mivel a génjeit körülvevő hiszton fehérjék nem szorosan kötődnek a DNS-hez, ezért a génexpresszió (génkifejeződés) aktív, szinte folyamatosan íródnak át az mRNS-be (messenger RNS-be) a gének információi.

A hisztonok aminosavainak acetilációval, metilációval, foszforilációval történő módosítása befolyásolja a töltést, így a kromatin állapotát.

Ploiditás: A kromoszóma készletek száma egy sejtben

- Monoploid: 1 kromoszóma készlet, n db kromoszóma, diploid élőlények ivarsejtjeit haploidnak nevezzük
- Diploid : 2 kromoszóma készlet, 1 anyai+1 apai= $2n$ db kromoszóma
- Triploid : 3 kromoszóma készlet

Ha a DNS replikációt nem követi osztódás, akkor poliploid sejtek jönnek létre.

Euploid: A kromoszómák száma egyenlő n 2-szeres többszörösével (n , $2n$, $4n$, $8n$ stb)

Aneuploid: A kromoszómák száma NEM egyenlő n 2-szeres többszörösével. Pl triszómia során egy kromoszómából 3db 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.

Mind egy élőlény kifejlődése, mind pedig egy faj fenntartása során mindazonáltal alapvető jelentőségű, hogy a sejtek osztódása során a genomi DNS (csaknem) hibátlan másolata mindkét utódsejtben jelen legyen. Ez a folyamat a **DNS replikációja**, ami alapelveit tekintve minden élő sejtben (pro- és eukariótákban egyaránt) hasonló módon valósul meg.

A DNS azon alapvető szerkezeti jellegzetessége, hogy adenin mindig timinnel, guanin pedig mindig citozinnal képez bázispárt, azt eredményezi, hogy a kettős hélix egyik szálának szekvenciája egyértelműen meghatározza a másik lánc bázissorrendjét, azaz lényegében mindkét szál tartalmazza ugyanazt a genetikai információt. Éppen ez a **szemikonzervatív megkettőződés** alapja, melynek lényege, hogy a két lánc elválik egymástól, majd mindkettő alapján egy-egy új szál szintetizálódik. Ez azt jelenti, hogy minden DNS-molekula egy eredeti szülői és egy újonnan felépített láncból áll.

A folyamatban alapvető szerepet játszó enzimek a DNS-függő DNS-polimerázok. Ezek az enzimek több különböző aktivitással rendelkezhetnek. Nélkülözhetetlen a szintetikus aktivitás, amely az új DNS-lánc felépítését jelenti. **A szintézis szigorúan 5'-3' irányú!** Szükséges továbbá egy mintául szolgáló DNS-szál is, mivel ez fogja meghatározni az új lánc bázissorrendjét, azaz azt, hogy milyen bázist tartalmazó nukleozid-trifoszfátok képezik a szubsztrátot az egyes lépések során. **Az új nukleotid az 5' foszfátjával észteresedik a 3' OH-hoz!** Egy új nukleotid beépítése 2 nagy energiájú, makroerg kötés felhasználásával jár. A minta olvasása mindig 3'-5' irányú.

A polimerázok alaptípusai

POLIMERÁZOK	MINTA	EGYÉB
DNS-dependens-DNS-polimerázok	DNS	ÚJ NUKLEOTIDOT CSAK MEGLÉVŐ 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

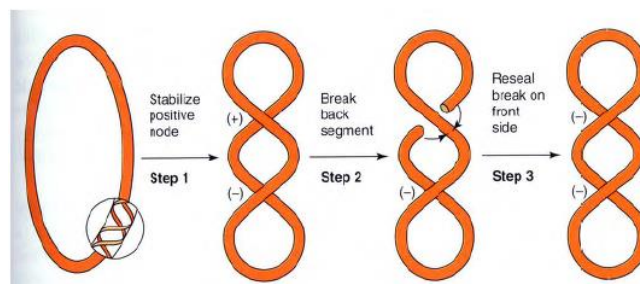
A DNS-függő DNS-polimerázok ezen alapfunkció mellett 5'- és 3'-exonukleáz aktivitással is rendelkezhetnek. Ezen reakció során az enzimek egy DNS lánc 5'- vagy 3'-végi nukleotidját tudják lehasítani, ami a replikáció egyes lépései során szükséges, valamint alapvető szerepet játszik a DNS-megkettőződés nagyfokú pontosságának biztosításában.

Endonukleáz aktivitás során a lánc köztes foszfodiészter kötését szakítja fel az enzim. Ennek során létrejöhet a foszfodiészter-kötés hiánya a láncon belül egy vagy két szálon, melyet **nick**-nek nevezük. Megszüntetését a DNS-ligáz végzi.

A DNS replikációja a két lánc szétválasztásával kezdődik. Replikációs buborék alakul ki, amely két replikációs villából áll. A szétnyíló DNS mindkét szálával szemben először mindig egy rövid (kb. 6-8 nukleotid hosszú) RNS-darab szintetizálódik. Ennek az az oka, hogy a DNS-polimeráz enzim működéséhez szüksége van egy olyan szakaszra, amely már kettős szálú; a második szál polimerizációját csak annak a végétől tudja folytatni. Ezt a rövid RNS-darabot (primert) használja majd fel a DNS-polimeráz, hogy dezoxiribonukleotidokkal hosszabbítsa meg a rövid RNS-szakaszt. A primáz, egy DNS-dependens-RNS-polimeráz amely az RNS primert készíti. nukleinsavak polimerizációs folyamatának szubsztrátjai mindig nukleozid-trifoszfátok. A két foszfo-anhidrid kötés felszakadásának energiája nemcsak a nukleozid-monofoszfátok közötti, vízkilépéssel járó foszfoészter kötés létrejöttéhez, hanem a reakció irreverzibilissé tételéhez is elegendő. Mivel a polimerizáció mindig 5'-3' a templát olvasása pedig 3'-5' irányú, ennek következménye hogy mindkét szálon csak az egyik irányban történhet meg a folyamatos szintézis. A replikációs villában megkülönböztethető az a rész, ahol a szintézis folyamatosan történik (**vezető szál**), és ahol szakaszosan történik (**követő szál**). A vezető szálon a primáz enzim szintetizálta rövid RNS-szakaszt követően a DNS-polimeráz folyamatosan építi fel a DNS második láncát, míg szemben vele, a követő szálon, mindig újra és újra kell a primáznak egy rövid RNS-primert szintetizálni, hogy a DNS-polimeráz azután megsintetizálja a hiányzó szakaszt. Ezeket a követő szálon található, most még különálló 1000-2000 nukleotid hosszúságú fragmentumokat felfedezőjükről **Okazaki-fragmentumoknak** nevezzük.

DNS-topoizomerázok:

- **Topoizomeráz I:** a kettősszálú DNS egyik szálát vágja el, majd a láncvégeket újraegyesíti, pozitív szupertekercset létrehozva energiabefektetés nélkül.
Mechanizmusa:
 - Az enzim először a DNS-hez kötődik
 - ezután elvágja az egyik DNS láncot (nick)
 - közben kovalensen megköti a 3' láncvéget az energiát konzerválva
 - az ép lánc magától átbújik a másik szál végei közötti résen
 - megszünteti a nick-et, amihez nem igényel energiát
- **Topoizomeráz II:** a DNS lánc mindkét szálát elvágja, így hoz létre negatív szupertekercseket. Energiaigényes folyamat, ATP hidrolízisével jár.



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

Prokariótákban a replikáció a cirkuláris DNS egyetlen pontján, a replikációs origóban (*oriC*) indul meg mindkét irányban. Ezt a DNS-szakaszt a *dnaA* fehérje ismeri föl, és ehhez a *dnaC* segítségével a *dnaB* fehérje kötődik. A *dnaB* egy helikáz enzim, amely a DNS két szálát egymástól széttekeri, ez a replikáció alapfeltétele. A folyamat energiaigényes, ATP terhére történik, és a két szál a helikáz aktivitású *dnaB*–*dnaC* komplex mögött egyből újra kettős hélixé alakotna, ezt az SSB (single strand binding) fehérjék akadályozzák meg: a DNS-t egyszálú formában tartják. Így jön létre a két egymással szemben elhelyezkedő replikációs villa, melyek együtt az iniciációs buborékot alkotják. A DNS egy ponton történő széttekerése azonban a széttekert szakasz előtti kettős hélix túltekeredését eredményezi. A replikáció során éppen ezért fontos szerepet játszik a II. típusú topoizomerázok csoportjába tartozó DNS-giráz, ami – ATP felhasználása mellett – képes negatív szupertekercset létrehozni, illetve pozitív szupertekercset megszüntetni.

A következő fehérjék, illetve enzimek szükségesek a DNS replikáció elindításához prokariótákban:

- **Topoizomeráz II:** negatív szupertekercseket hoz létre
- ***dnaA* protein:** az *oriC*-hez kötődve elindítja a replizóma kialakulását, kötődése negatív szupertekercset igényel
- ***dnaB* protein:** helikáz aktivitással rendelkező enzim, mely széttekeri a DNS kettős láncát
- ***dnaC* protein:** a *dnaB*-vel együtt elősegíti a primáz bekötődését, illetve a primer szintézisének megindítását
- **Primáz: (*dnaG*)** a DNS-hez kötődik a *dnaB* és *dnaC* fehérjékkel együtt, ezt a struktúrát primoszómának hívjuk
- **Rep protein:** ennek is van helikáz aktivitása
- **HD vagy SSB fehérjék:** hélix destabilizáló (HD) vagy „single strand- binding” (SSB) fehérjék

A replikációs villában prokariótáknál a **DNS-polimeráz III enzim** található, ez katalizálja a polimerizációt. A polimeráz III egy sok alegységből álló holoenzim, amely egy irányba mozogva, egyzerre szintetizálja a vezető és a követő szálát. A késlekedő lánc szintézisékor a három karja közül kettő felváltva dolgozik.

Az Okazaki fragmentumok szintézise és egyesítése:

A DNS-polimeráz III az RNS-primerekig szintetizálja a DNS-láncokat. Van egy másik DNS-polimeráz is, a **DNS-polimeráz I**, amely 5'-3' polimeráz és 3'-5' exonukleáz aktivitáson kívül **rendelkezik 5'-3' exonukleáz aktivitással** is. Ez a polimeráz tehát megtalálja azokat a helyeket a szálon, ahol szakadás van, és ott elkezdi 5'-3' irányban leemésztetni a ribonukleotidokat (majd a dezoxiribonukleotidokat is), és szintetizálja az új komplementer DNS szálát is helyette. Ezt követően a DNS-ligáz összekapcsolva az 5' és 3' véget megszünteti a nick-et, folyamatossá teszi az új láncot.

A baktériumsejtek gyakran tartalmaznak a genom mellett további lényegesen kisebb, szintén gyűrűs szerkezetű DNS-molekulákat, ezeket **plazmidoknak** nevezzük. A plazmidok a genomtól függetlenül replikálódhatnak, így egy sejtben belül több másolat jelen lehet. Ennek különös jelentősége az, hogy a plazmidokat a baktérium sejtek egymásnak át is tudják adni, így a genetikai információ nem csak generációról generációra adható át, hanem rendkívül gyorsan horizontálisan is kicserélhető. Ebben a folyamatban játszik alapvető szerepet az „**F**” **plazmid**, mely olyan fehérjéket kódol, melyek segítségével két baktérium sejt – plazmid átadása céljából – össze tud kapcsolódni. Más plazmidok („**R**”) antibiotikummal szembeni rezisztenciát okozó fehérjéket kódolnak. Ezek a gének mobilis genetikai elemekben helyezkednek el (transzpozonok). A transzpozonok olyan fehérjét kódoló gént is hordoznak (transzpozáz), amely képes kivágni a transzpozont a DNS-ből és beilleszteni egy másik DNS-be. Így a rezisztencia-gén átkerülhet a baktérium kromoszómájába.

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

Az eukarióta replikáció a folyamat elvét és menetét tekintve a prokarióta DNS megkettőződésével lényegében azonos, a folyamatban azonban természetesen más fehérjék és enzimek vesznek részt.

A következő eukarióta DNS polimerázokat ismerjük: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ stb.

Polimeráz neve	Feladata
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

Az eukarióta DNS polimerázoknak nincsen exonukleáz aktivitásuk független nukleázok segítik a replikációt. A polimerizációkor beépített nem komplementer nukleotidokat a FEN1 3' exonukleáz távolítja el a replikáció során, az RNS primert az RNÁz H endonukleáz darabolja fel.

Az eukarióta replikáció egyik legfőbb jellegzetessége, hogy a DNS megkettőződése még egy kromoszómán belül is számos ponton egyszerre kezdődik meg. Erre nem csak azért van szükség, mert az eukarióta genom lényegesen nagyobb, hanem azért is, mert az eukarióta DNS-polimerázok kb. egy nagyságrenddel lassabban építik fel az új DNS-láncokat(50 nukleotid/sec) . A replikáció kiinduló pontjait az ORC (origin recognition complex) ismeri fel, majd ehhez egy másik, helikáz aktivitású komplex kötődik.

Eukarióta sejtekben az Okazaki fragmentumok sokkal rövidebbek.

Az eukarióták genomja lineáris DNS-szakaszokba van csomagolva. Ezek a kromoszómák, melyeknek a végeit telomereknek hívjuk. A **telomerek** a kromoszóma igen fontos részei; speciális fehérjék kötődnek hozzájuk, épségük a megfelelő sejtosztódáshoz elengedhetetlen. A telomerek minden osztódási ciklus után rövidülnek, hiszen a követő szálon az 5' végen maradna egy olyan szakasz, amely a replikáció során nem tudna átíródni (a replikáció ugyanis egyirányú), ezáltal minden egyes osztódás után egyre rövidebb DNS adódna tovább az utódsejtbe. A telomér szekvenciák átírását a **telomeráz enzimek (reverz transzkriptázok)** segítik. A telomerek többszörösen ismétlődő motívumokat tartalmazó, úgynevezett repetitív (ismétlődő) szekvenciákkal rendelkeznek. A telomeráz enzimhez asszociálódva található egy

rövid RNS-szekvencia, mely komplementer ezekkel a szekvenciákkal, és egy rövid részen hibridizálni tud a telomér túlnyúló 3' szálával. Ez a kis hibridizált szakasz megfelelő primernek bizonyul ahhoz, hogy az enzim saját polimeráz aktivitását kihasználva meghosszabbítsa a 3' véget. A véghosszabbítás után a telomeráz áthelyeződik úgy, hogy az RNS-e ismét össze tudjon párosodni az újonnan szintetizálódott 3' véggel, ezáltal ismét primerként használva azt. A lánchosszabbítás többször megismétlődik, a megfelelően hosszú 3' túlnyúló véghez egy primáz most már tud RNS-darabot szintetizálni, és a DNS-polimeráz segítségével feltöltődik a másik szál.

9. A DNS replikáció hibajavító mechanizmusai prokariótákban és eukariótákban.

Bár több mechanizmus biztosítja a DNS-replikáció nagyfokú pontosságát, a folyamat mégsem 100%-os. Ennél is fontosabb, hogy a sejtet és annak genetikai állományát számos hatás éri: nemcsak a külső, károsító tényezőkre (pl. sugárzásokra) kell gondolni, hanem bizonyos anyagcsere folyamatok, pl. oxigén tartalmú szabad gyökök keletkezése is alapvető jelentőségű. Mindezen faktorok mellett teljesen spontán folyamatok (oxo-enol tautoméria) is előidézhetik a DNS károsodását. A **DNS-károsodásokat hibajavító mechanizmusok** folyamatosan javítják azon egyszerű elv alapján, hogy a párhuzamos ép DNS lánc alapján a károsodott szakasz eredeti szerkezete visszaállítható. Ha azonban egy DNS-károsodás javítása mégsem történik meg a replikációig, a hiba az új DNS-be bemásolódik, rögzül, és többé már nem korrigálható. A még javítható DNS-károsodások így a DNS-megkettőződése során már nem javítható **mutációvá** alakulnak.

A mutációk nagy része ún. csendes mutáció, mert vagy nem kódoló területet érint a DNS-en (kb. 10% a kódoló szakasza az emberi genomnak), vagy pl. nem jár aminosav-cserével.

1. Dezamináció

Az adenin, a guanin és a citozin ionizáló sugárzás, alkilálószerrek vagy spontán folyamat következtében **dezaminálódhat**, a folyamat során hipoxantin, xantin, illetve uracil keletkezik. Ezek a DNS-ben idegen bázisok.

Mivel az aminocsoport a H-hidak létrehozása során H-donor, az oxo-csoport pedig H-akceptor, ezen átalakulás kijavítása döntő fontosságú. Ha ez a replikációig nem történik meg, a DNS-szintézis során az **adeninből létrejövő hipoxantinnal szembe timin** helyett citozin épülbe, és hasonlóan: a **citozinból keletkező uracil guanin helyett adeninnel képezbázispárt**. (A guanin–xantin átalakulás a bázispárosodást nem változtatja meg.) Feltételezhető hogy éppen ezen viszonylag gyakori – minden sejtben naponta több ezerszer lejátszódó –, spontán folyamattal magyarázható, hogy a DNS-ben uracil helyett fiziológiásan timin fordul elő, azaz az uracil a DNS-ben idegen bázis, hibának számít. Ha ugyanis ez nem így lenne, akkor a javító mechanizmusok a citozin dezaminálódása révén keletkező uracilt a többi uraciltól nehezen tudnák elkülöníteni.

2. Dimerizáció

Ultraibolya fény hatására következik be leggyakrabban a **pirimidinek dimerizálódása**. Ez leggyakrabban két szomszédos timin között történik meg: a gyűrűk 5-ös, illetve 6-os C-atomjai között **alakul ki egy-egy kovalens kötés**, de két egymás mellett elhelyezkedő citozin, vagy egy citozin és egy timin is képezhet dimert hasonló módon.

3. Depurinizáció

Rendkívül gyakori, spontán folyamat a **depurinizáció**, azaz a dezoxiribóz és a purin bázis közötti β -N-glikozidos kötés elhasadása, ami átlagosan 5000-szer történik meg naponta minden emlős sejtben. A folyamat ritkábban a pirimidin tartalmú nukleotidokat is érintheti. Oka a sejten belüli metabolitok hatása.

4. Deléció-inzerció

Deléciónak nevezzük, ha egy vagy több nukleotidpár kiesik a szekvenciából, **inzerciónak** pedig azt, ha egy vagy több nukleotidpár beépül a szekvenciába. Ha a többlet, vagy hiányzó nukleotidpárok száma nem osztható hárommal, akkor úgynevezett **kereteltolódás** következik be; az átíró **polipeptidlánc szinte bizonyosan funkcióvesztett vagy súlyosan sérült lesz**.

A DNS **replikáció előtt a hibát ki kell javítani**, melyhez a komplementer lánc szolgálja az információt (pl. depurinizáció esetén).

Repair mechanizmusok

1. Bázis kivágáson alapuló DNS javítás

A DNS-ben lévő hibák javítása (repair) legtöbb esetben azonos módon, az érintett szakaszon a károsodott bázis, illetve nukleotid kivágásával történik pro- és eukariótákban egyaránt. A hibás bázisokat specifikus **DNS-glikozidáz** enzimek távolítják el a DNS-ből a β -N-glikozidos kötés elhasításával. Így a depurinizáció eredményéhez hasonló hely keletkezik. Ezt az **AP-endonukleáz** ismeri fel, és a bázis nélküli dezoxiribózt a láncból kihalásítja egy másik enzimmel együttműködve. **Az ilyen lánchiányt gap-nek nevezzük**. A hiányzó nukleotidot a **prokariótákban a DNS-polimeráz I, az eukariótákban a DNS-polimeráz- β építi fel**. Ilyenkor a lánc még nem folytonos: hiányzik a foszfodiészterkötés, ez a **nick**. A két láncot a DNS-ligáz enzim köti össze.

2. Pirimidin nukleotidok dimerizációjának javítása

a. Nukleotid kivágáson alapuló repair

Egy UV specifikus endonukleáz kivágja a sérült nukleotidot, majd a DNS-polimeráz szintetizálja a hiányzó nukleotidokat 5'-3' irányban, végül a DNS-ligáz kialakítja a foszfo-észter kötést (nick megszüntetése). Eu- és prokariótákban egyaránt működő mechanizmus.

b. Kizárólag prokariótákban előfordul egy enzim (fotoliáz), mely kék fény(látható fény) hatására aktiválódik és elvágja a timin dimérek között kialakult kovalens kötések.

3. Mismatch repair mechanizmus

Ha a replikáció során a DNS polimeráz nem jó nukleotidot épít be az újonnan szintetizálódó láncba, ennek bázisa nem lesz komplementer a templáton található bázissal. Ezt hívjuk angol nyelvből átvett szóval **MISMATCH**-nek.

Ahhoz, hogy a hibásan beépített nukleotidot ki lehessen javítani, a repair **rendszernek fel kell ismernie, hogy melyik a szülői vagy templát lánc, és melyik az új lánc**.

Prokariótákban a szülői lánc **metilálódik** bizonyos pozíciókban (GATC szekvenciánál, ahol az adenin metilálódik az N-6 nitrogénen). A metilációt a **Dam metiláz** végzi. Azonban az új lánc csak késleltetve metilálódik, miután a mismatch repair rendszer ellenőrizte a nukleotidok

korrekt beépülését. Hiba esetén a hibajavító rendszer a hibás bázispárokat felismeri, és a még nem metilált szálból ennek meglehetősen hosszú környezetét kivágja. Majd a DNS-polimeráz enzimek pótolják a hiányzó szakaszt.

Eukariótákban a mismatch repair elve nagyon hasonló. A fontos különbség az, hogy nincs metiláció, helyette **az újonnan szintetizált lánc „nick”-eket tartalmaz. Mut S protein** felismeri a mismatch-t, amíg **a Mut H és Mut L fehérjék**, hasonlóan a bakteriális rendszerhez, **megkeresik a legközelebbi nick-et, majd az endonukeláz kivágja az új láncon a nick és a mismatch közötti szakaszt, amit a DNS polimeráz és ligáz kipótol.**

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.

A 9. tétel kidolgozás ezt is lefedi.

Mutációk kiegészítés:

Sajnos a repair rendszer kapacitása korlátozott!

--- Így, ha a DNS hibák száma túl nagy (túl sok UV vagy ionizáló

sugárzás éri szervezetet, fokozott rákkeltő anyag expozíció, stb.) a repair rendszer nem tud minden hibát eliminálni

--- Magának a DNS repair rendszernek is lehet sérülése (enzimhiány, stb)

A kettő együttese **MUTÁCIÓK** kialakulásához vezet!

Mutációk lehetnek a csíra sejtekben

Mutációk lehetnek a testi sejtekben

-- a sejtre, illetve a szervezetre lehetnek halálosak

-- a sejt működését megváltoztathatják

-- RÁK: egyetlen sejtben bekövetkező többszörös mutációk okozzák, az érintett gének a sejt osztódását szabályozzák (proto-onkogének és tumor szuppresszor gének)

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

Ha a DNS-ben létrejött károsodás javítására nem kerül sor a replikációig vagy éppen a DNS-megkettőződés folyamata során keletkezik hiba, akkor a DNS mindkét szálának bázissorrendje megváltozik. Ez a későbbiekben már nem korrigálható, a **DNS szekvencia ilyen végleges és öröklődő megváltozását mutációnak nevezzük**. Leggyakrabban ezek **egyetlen bázispár megváltozását** jelentik, ezeket **pontmutációnak** hívjuk. A pontmutáció az esetek túlnyomó többségében **szubsztitúció**, azaz **egy bázispár egy másikra cserélődik**, de egy **nukleotid kiesése (deléció)** vagy egy **extra nukleotid beépülése (inzerció)** is a pontmutációk csoportjába tartozik. **Tranzíciónak nevezzük azokat a báziscseréket, melynek során pirimidin pirimidinre vagy purin purinra cserélődik** (C $\leftrightarrow$ T vagy A $\leftrightarrow$ G mutációk). Ezek létrejöhetnek ki nem javított dezaminálódás révén, vagy úgy, ha a mismatch hibajavító rendszer az oxo–enol tautóméria következtében kialakult hibás bázispárt nem korrigálta. Ha **pirimidin helyére purin** vagy **purin helyére pirimidin** kerül (A $\leftrightarrow$ T vagy C $\leftrightarrow$ G mutációk), **transzverzióról** beszélünk, ez minden esetben a DNS-polimeráz enzim tévedésére vezethető vissza. Deléció hátterében depurinizáció állhat: a DNS-polimeráz a bázis nélküli dezoxiribózt átugorja, vele szembe nem épít be semmilyen nukleotid egységet. Inzercióhoz vezethetnek olyan vegyületek (főként policiklusos aromás szénhidrogének) melyek a DNS bázispárjai közé ékelődnek. Ezeket a molekulákat a polimeráz tévesen bázisként értelmezi, és így számfeletti nukleotidot épít be az új láncba.

Ha a pontmutáció a DNS kódoló szakaszában található (exonban az eukariótákban) a fehérje aminosav szekvenciája változhat meg, így előfordulhat:

- **Samesense** mutáció: azonos aminosavat jelent.
- **Missense** mutáció: más aminosavat jelent.
- **Nonsense**: egy stop kodon kialakulását jelenti. A stop kondontól megszűnik a fehérje további szintézise, ez durva fehérje/enzim-sérülést eredményez
 - Stop kodonok a DNS-ben: TAA, TAG, TGA
 - Stop kodonok az RNS-ben: UAA, UAG, UGA

Inzerció és deléció során, ha a többlet, vagy hiányzó nukleotidpárok száma nem osztható hárommal, (tehát egy nukleotidpárt érintő pontmutáció esetén is) akkor úgynevezett **kereteltolódás** következik be; az átíródó polipeptidlánc szinte bizonyosan funkcióvesztett vagy súlyosan sérült lesz, megváltozik a fehérje komplett szerkezete a mutációtól a fehérje C-terminálisa felé.

Ames-próba

A legkülönbözőbb vegyületeknek mutagén/karcinogén hatásuk lehet. Számos teszt ismeretes az irodalomban, melyben ezt a mutagén hatást számszerűsíteni lehet. Ezek közül a legismertebb, legelterjedtebb az **Ames teszt**. Az Ames teszt alapja, hogy a vizsgálandó

vegyületet baktériumokhoz adjuk és mérjük, hogy mennyi ún. **szupresszor** mutációt okoz a vegyület.

Szupresszor mutáció: egy második mutáció, mely funkcionálisan helyreállítja az első mutáció hatását (pl.: inzerció után delécio).

A teszt során a szalmonellák 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.

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

A transzkripció folyamatát úgy definiálhatjuk, hogy DNS-minta (templát) alapján RNS-szintézis történik a **DNS-függő RNS-polimerázok (nem igényel primert, nincs exonukleáz aktivitása)** segítségével, ribonukleozidtrifoszfát-szubsztrátok (ATP, GTP, CTP és UTP) felhasználásával. A transzkripció folyamata sejttípustól, fejlődési stádiumtól és egyéb tényezőktől függően csak bizonyos RNS-t és fehérjét kódoló gének területét érinti, mely esetenként igen kis hányada a teljes genomnak. A transzkripció során különböző RNS-ek képződhetnek, mint például a fehérjék szintézist irányító hírvívő vagy messenger RNS (mRNS), az aminosavak szállítását végző transfer RNS (tRNS), a riboszómákat alkotó riboszomális RNS (rRNS), valamint további, kisebb méretű RNS-ek, mint például a sejtmagban maradó kis magi RNS-ek (snRNS-ek), vagy a citoplazmába jutó mikro-RNS (miRNS). Bár a különböző RNS-eknek változatos funkciója van, valamennyi RNS szintézise az ún. **elsődleges transzkriptum** elkészítésével kezdődik, mely az RNS vagy fehérje gének területeinek hű másolata.

A transzkripció iránya megegyezik a DNS-szintézis irányával, azaz a szintézis 5'-3', a templát másolása 3'-5' irányban folyik.

A DNS-függő RNS-polimerázoknak egy kettős szálú DNS-szakaszhoz, a **promóter régióhoz** kell kapcsolódniuk ahhoz, hogy a promóter mögött található kettős szálú DNS szétnyíljon, és az egyik DNS-szál leolvasása megkezdődjön.

A transzkripció szempontjából megkülönböztetünk egy **kódoló DNS-szálat** (pozitív, értelmes, sense szál), melynek **szekvenciája azonos a szintetizálódó RNS-sel (timin helyett uracil)**, illetve **egy minta DNS-szálat** (negatív, templát, antisense szál), **mely leolvasásra kerül.**

Fontos megjegyezni, hogy az átírás iránya génenként változó lehet, azaz egy adott DNS-szál valójában az egyik génre nézve lehet kódoló (pozitív, értelmes), a másik szempontjából pedig minta (negatív, antisense) szál, annak megfelelően, hogy a gén milyen orientációban helyezkedik el a DNS-szálon.

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



Promóter: a transzkripciót elősegítő szekvencia

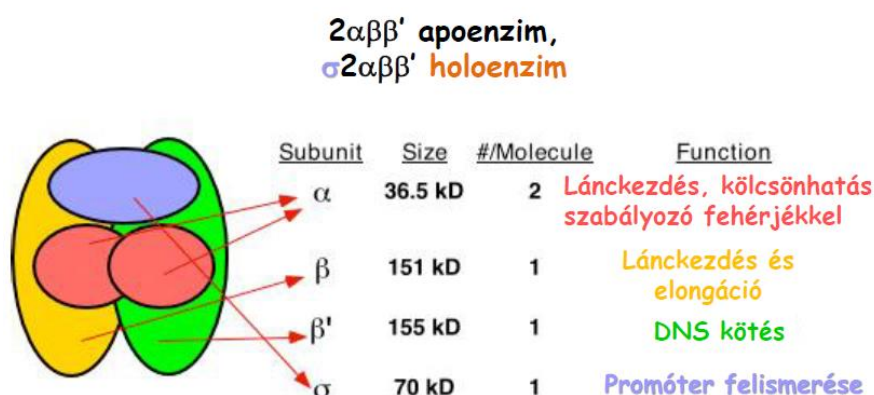
olvasási keret = egy polipeptid-láncra vonatkozó információ a START kodontól az első STOP kodonig

transzkripció egység ≠ olvasási keret!

*transzkripció kezdőpontja ≠ START kodon,
terminációs jel ≠ STOP kodon!*

A prokarióta DNS-dependens-RNS-polimeráz működése

a DNS-függő RNS polimeráz teljes formájában (holoenzim) 5 alegységet tartalmaz (2 alfa, béta, béta' és szigma), a szigma-alegység leválása után „core” vagy apoenzimről beszélünk.



A transzkripció folyamata három szakaszra bontható: **iniciáció, elongáció és termináció.**

Az iniciáció első lépéseként a **szigma alegység csatlakozik az RNS-polimeráz core enzimhez** és így létrejön a holoenzim, mely a DNS-hez kapcsolódva a **promóter meghatározott szekvenciáihoz kötődik**, létrehozva a **zárt promóter komplexet**. Ezután az enzim egy rövid szakaszon (kb. 25 bázispár) **felnyitja a kettős szálú DNS-t (transzkripciós buborék, 10-12 nukleotidnyi szakaszon egyszálú DNS a szintetizálódó RNS-el)**, és elkezd a gén másolását (**nyitott promóter komplex**), azaz **elkezdődik** a bázisok komplementaritása alapján történő **átírás**. Amikor az átírás során létrejön egy kb. 9 bázispár hosszúságú RNS-DNS hibrid, akkor a szigma faktor leválik, és újabb iniciáláshoz használandó fel.

A transzkripció **elongációs szakaszában** a transzkripciós buborék folyamatosan halad a pozitív, kódoló szálát tekintve a 3' irányba, az RNS 3' végére újabb nukleotidok épülnek be, miközben az 5' vége folyamatosan letekeredik az RNS-DNS hibridről és elhagyja a transzkripciós buborékot. Prokariótákban gyakran előfordul, hogy az összetartozó funkciójú fehérjék génei közvetlenül egymás mellett helyezkednek el a DNS-en, és ezek a gének egyszerre íródnak át egyetlen mRNS-be. Az ilyen mRNS több polipeptidlánc információját hordozza, azaz policisztronos. Természetesen a policisztronos mRNS-ről képződő fehérjék a transzláció során már önálló polipeptid láncként fognak megszintetizálódni, mivel az egyes polipeptidláncok elejét és végét jelzik a start és a stop kodonok.

Amikor a transzkriptum az átírandó DNS szakasz vége felé közeledik, a **termináció** szakaszába lépünk. A prokarióta termináció lehet **rho faktor függő vagy rho faktor nélküli**. Ha a transzkriptumban megjelenő terminációs szekvencia hatására az RNS polimerázhoz egy újabb alegység, a rho kapcsolódik, ami megállítja a további átírást. akkor rho-függő terminációról beszélünk. A prokarióta transzkripció megállításához azonban nem feltétlen szükséges fehérje faktor, esetenként a transzkriptum végén található terminációs szekvencia önmaga is le tudja állítani az átírást. A termináció általában egy palindrom, G-C gazdag szekvencia segítségével történik, mely lehetővé teszi egy hurok kialakulását, ez viszont akadályozza a transzkripciós

buborék továbbhaladását, és **kirántja** a DNS-hez gyenge U-A hidrogén hidakkal kapcsolódó **RNS-t** a polimerázból.

A prokariótákban a **fehérjét kódoló gének transzkripciójával közvetlenül mRNS születik**. Már a transzkripció ideje alatt megindul a transzláció. (A transzkripció buborékából távozó RNS 5' végéhez kötődik a riboszóma). Az **RNS gének átírása esetében azonban az elsődleges transzkriptum több RNS-molekula információját tartalmazza**, és ezeket utólag kell szétvagdosni. E. coliban például a háromféle rRNS egyetlen elsődleges transzkriptum formájában képződik, sőt, ugyanebben a transzkriptumban van még egy tRNS is. Az egyes RNS géneket **meghatározott szekvenciák (spacer) választják el egymástól**. A megfelelő feldarabolásban egy kisméretű RNS vesz részt(**RNázP**), amely egyes esetekben endonukleáz fehérje nélkül is képes katalizálni a hasítást. Az olyan RNS-t, mely enzim-szerűen katalizál egy adott reakciót, **ribozimnek** nevezik.

A transzkripció szabályozása prokariótákban

Konstitutív gén: az átírás gyakoriságát csak a promóter erőssége szabályozza.

Promóter: hívójel a szigma faktor számára

Minél jobban hasonlít a konszenzus szekvenciára a promóter, annál könnyebben ismeri fel a szigma faktor, annál erősebb a promóter.

13. Az operon fogalma, a prokariota transzkripció negatív és pozitív szabályozása a lac-operon példáján.

A bakteriális szabályozó rendszer másik fontos sajátossága, hogy az egyes metabolikus utakhoz tartozó **enzimek génjei általában egymás mellett helyezkednek el a genomban, létrehozva** a prokarióta transzkripciós egységet, **az operont**. Az operon egy adott funkcióhoz szükséges minden fehérje génjét tartalmazza. Például a laktóz transzportjához és bontásához szükséges fehérjék génjei az ún. **lac operonban** tömörülnek.

A lac operon negatív szabályozása

A laktóz metabolizmusához *E. coli*-ban három enzim szükséges, melyeknek génjei lacZ, lacY és lacA. Ennek a három strukturális génnek a képződését a gének előtt található **lacO operátorhoz** és a **lacP promóterhez** kapcsolódó fehérjék szabályozzák. A lacI egy szabályozó fehérjét kódoló gén, melyről a **lac represszor** fehérje képződik.

A lac represszor fehérje kis sebességgel, de állandóan képződik, így a sejtben állandóan található néhány molekula lac represszor, mely **a DNS-hez igen erősen kötődik az operátor (lacO) régiójában**. Ha a lacO-hoz represszor fehérje kötődik, **az RNS-polimeráz nem tud hozzákapcsolódni a promóter régióhoz**, és az átírás nem kezdődhet el. Ha a baktérium **laktóztartalmú közeggel érintkezik**, néhány **laktózmolekula bejut a sejtbe**, és a **lac represszor fehérjét inaktiválja**, azaz a lac represszor nem tud bekötődni a lac operátor génhez. Így az RNS-polimeráznak lehetősége adódik arra, hogy a promóterhez kapcsolódva elkezdje a policisztronos mRNS szintézisét, és a **lac strukturális gének kifejeződjenek**.

Mivel a lacO és a lacP régiók részlegesen átfednek, az operátorhoz kötődött represszor fehérje fizikailag akadályozza az RNS-polimeráz promóterhez való kötődését. **Az operátor régió az ún. cisz-regulációs elem**, mivel a promóterhez közel helyezkedik el. A represszor fehérjét kódoló **lacI gén ún. transz-regulációs elem**, mert a lac operontól távolabbi DNS-szakaszon található.

A lac operon pozitív szabályozása

A lac operon azonban **pozitív szabályozással is rendelkezik**, ebben az **esetben a regulátor fehérje elősegíti az RNS-polimeráz promóterhez való kötődését** és a transzkripció elindulását. Ilyen **regulátor fehérje a CAP** (katabolit aktivátor protein), mely minden olyan operont szabályoz, mely katabolikus (bontó) enzimeket kódol, a glukóz anyagcsere enzimeinek kivételével. A **CAP cAMP-al együtt tud bekötődni a promóterekhez**, és így cAMP jelenlétében segíti elő a katabolikus enzimek szintézisét. A cAMP koncentráció növekszik, ha a glukóz koncentráció csökken.

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

Az eukarióta gén szerkezet bonyolultabb, mint prokariótáknál. A gén nem minden szakasza kódol fehérjét. Azok a szakaszok, amik fehérjét kódolnak, **exonnak** nevezzük. **Intron** az 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 eukarióta génkifejeződés első lépése, hogy a **szuperhelikális struktúrából kitekeredjen a kromatin és létrejőjön az aktív kromatin szerkezet**, amelyben továbbra is kettős spirál állapotban van a DNS. Ezután kötődnek a transzkripció iniciációjához szükséges obligát és specifikus transzkripció faktorok a DNS promóter és egyéb szabályozó régióihoz, és az így kialakult **DNS-fehérje komplexhez fog hozzákötődni az RNS-polimeráz**.

Eukarióták esetében a transzkripció a sejtmagban történik, és valamennyi transzkriptum számos változáson megy át, mielőtt kikerül a citoplazmába, a sejtmagot csupán az érett RNS-ek hagyják el és így jutnak a fehérjeszintézis helyére, a citoplazmába. Az eukariótákban tehát a transzkripció és a transzláció térben és időben elkülönül.

Az eukarióta DNS-függő RNS-polimerázok

Eukariótákban a **DNS-függő RNS-polimerázoknak három fő típusát** ismerjük. Ebből kettő, az **I. és a III. típus** olyan RNS-eket szintetizál, melyekről **nem traszlálódik fehérje**: az **I. típus a rRNS-ek szintéziséért felelős, míg a III. típus kisméretű RNS-eket készít**, mint pl. tRNS-t és a legkisebb riboszomális RNS-t (5S rRNS). A **DNS-függő RNS polimeráz-II feladata a fehérjét kódoló gének átírása, azaz a mRNS szintézise**

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

Az eukarióta mRNS érési folyamata

A mRNS érése három fő folyamatot foglal magába: (1) az **5'-sapka (cap) képzése**, (2) az **intronok kivágása (splicing)** és (3) a 3'-végen képződő **poliA farok**.

Az 5'-sapka (cap) egy **specifikus (capping) enzim** segítségével képződik. Ez az enzim GTP-ből egy **guanozint kapcsol a szintetizálódó mRNS 5' trifoszfát végéhez**, létrehozva egy igen speciális, **5'-5' irányú kötést**. Ezt követően **specifikus metilázok** S-adenozil-metionin felhasználásával **metilálják az 5' végre rakott guanin bázist és az első két ribózt**. Tehát az eukarióta mRNS-nek nincs szabad 5' vége. Az 5'-sapka még a transzkripció befejezése előtt, tehát ko-transzkripcionálisan képződik. Feladata az mRNS stabilitásának növelése, továbbá a fehérjeszintézis iniciációjában is szerepe lesz.

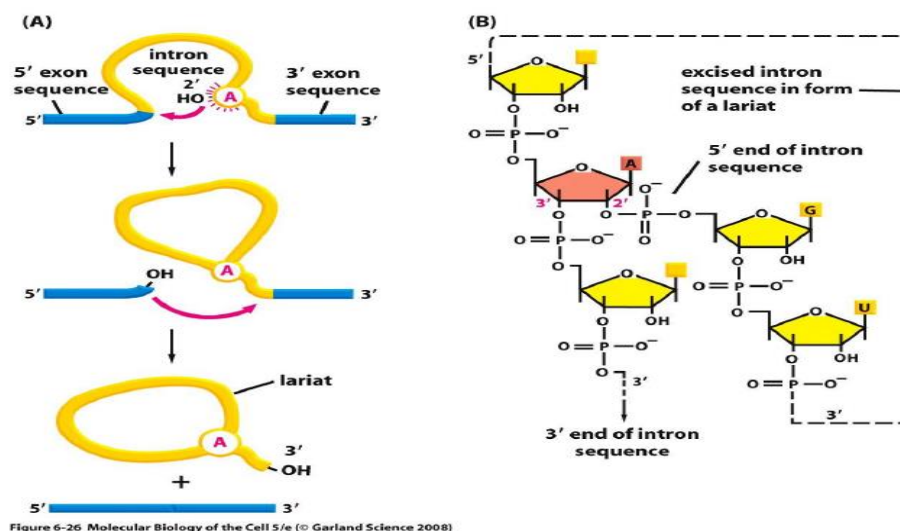
A leendő mRNS 3' vége általában jóval hosszabb, mint ami a fehérjelánc kódolásához szükséges. A fehérje információ végét jelző stop kodon után található mRNS szekvenciát 3'-nem kódoló régiónak (3' untranslated region, 3' UTR) nevezzük. Ez az RNS szakasz hordozza például a translációt szabályozó miRNS kötőhelyeket (lásd az eukarióta génkifejeződés szabályozásáról szóló fejezetben), és itt található a transzkripciót termináló szignál ami egyben a poliadenilációs szignál is. A 3' UTR vége felé található konszenzus AAUAAA szekvenciához egy specifikus vágó komplex kapcsolódik, és kb. 20 bázissal lejjebb (3' irányban) elvágja a transzkriptumot. A transzkriptum így keletkező **szabad 3' OH végéhez egy poliA-polimeráz 50-150 AMP-ből álló poliA farkat szintetizál**. A **poliA-polimeráz templát nélkül működik, szubsztrátja az ATP**, és a szokásos foszfodiészter kötést hozza létre a nukleotid egységek között. Vagyis **az érett mRNS 3' végén mindig megtalálható egy olyan poliA szekvencia, ami a genomban nincs jelen**.

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

A pre-mRNS érésének egyik legfontosabb lépése a fehérje információt hordozó exon-szekvenciákat elválasztó **intronok kivágása, a splicing**. A szintetizálódó pre-mRNS kibújik a transzkripció buborékából, és a kis nukleáris RNS-ek (snRNS, más néven U-RNS) fehérjével alkotott komplexeihez (snRNPs, snurps) kapcsolódva egy **intron kivágó komplex (splicesosome) jön létre**.

A pontos vágási hely felismerésében szerepe van az **intronok kezdő és végső szekvenciáinak**, ugyanis **minden intron GU-val kezdődik és AG-val végződik**. Ugyan a két-két bázis **szükséges, de nem elégséges feltétele** a kivágandó szekvencia pontos felismerésének, mivel sok olyan GU dimer van, ami mellett nem történik hasítás. A splicing folyamatában részt vevő harmadik fontos szerkezeti elem az **intronban található elágazódási hely nevű szekvencia** (UACUAAC; a szekvencián belül vastag betűvel írt **A** vesz részt a hasítás folyamatában). Akkor történhet splicing, ha mindhárom említett szerkezeti elem jelen van a pre-mRNS-ben annyiszor, ahány intront tartalmaz.

Az intron kivágása a következőképp történik. Első lépésként az elágazódási hely adenosin nukleotidjának 2'-OH csoportja megtámadja az előtte található exon 3' és a kivágandó intron 5'-vége közti foszfátcsoporthoz, így foszfortriészter kötés alakul ki. Ez a kötés gyorsan visszaalakul foszfodiészterré, olyan módon, hogy az első exon 3'-OH csoportja felszabadul, az adenosin pedig az intron 5' végi guanozinjával formál 2'-5' foszfodiészter kötet. Az első exon szabaddá vált 3'-OH csoportja ekkor megtámadja az intron másik, 3'-vége és a következő exon 5'-vége közötti foszfodiészter kötetet, így most itt alakul ki egy foszfortriészter kötés. Ez a foszfortriészter kötés is rövid életű, az első exon 3'- és a második exon 5'-vége között marad meg egy foszfodiészter kötés, az intron 3'-OH csoportja pedig felszabadul. A kivágott intron egy érdekes, 2'-5' foszfodiészter kötéssel kialakult hurkot tartalmazó, lassószerű struktúra



Alternatív splicing

A gén exon-intron szerkezete lehetővé teszi azt, hogy **egy adott génnek többféle fehérje produktuma legyen**. Egyes fehérje izoformák génje azonos, de a mRNS érése során eltérő

exon szám alakul ki, azaz egyes szövetekben az intron kivágó rendszer bizonyos pre-mRNS szakaszokat szövet-specifikusan kezelhet exonként vagy intronként.

A miRNS szintézise, szerepe a génexpresszió szabályozásában

A miRNS-ek olyan 20–24 nukleotidból álló egyszálú RNS-ek, amelyek döntően a **transzláció szintjén szabályozzák a génexpressziót** argonauta fehérjék segítségével. A miRNS-eket kódoló DNS-szakaszok lehetnek önálló miRNS gének, amelyek legtöbbször csoportosan fordulnak elő a genomban. Sokszor egy promoter régió mögött több miRNS szekvenciája is megtalálható. Érdekes azonban, hogy a miRNS-ek közel felének (kb. 40%-ának) a DNS szekvenciája fehérjét kódoló gének intronikus régiójában helyezkedik el, amely az intronok kivágása során nyer önálló életet.

Az önálló miRNS gének elsődleges **transzkriptumát** legtöbbször az **RNS-polimeráz-II készíti el** – a fehérje kódoló gének átírásához hasonlóan – sőt, az 5'-sapka és a poliA-farok is elkészül. Erre az ún. primer miRNS (pri-miRNS) közti termékre jellemzőek a hajtú-szerkezetek, melyek megfelelnek a kettős szálú RNS kritériumának. Így a **Drosha** nevű, kettős szálú RNS-re specifikus endoribonukleáz hozzákapcsolódik, és levágja a kettős szálú RNS-régió túlógó szekvenciákat, beleértve az 5'-sapkát és 3'-poliA-farkat is.

Ezt követően a pre-miRNS-ek a citoszólba kerülnek, ahol a **Dicer** nevű enzim (endoribonukleáz+helikáz) tovább hasítja. Az érési folyamat végén a kivágott kettős szálú RNS argonauta fehérjékhez kötődik, létrehozva a Dicer-rel és más specifikus RNS kötő fehérjékkel az ún. **RISC komplexet** (RNA-induced silencing complex). A komplex helikáz aktivitása szétválasztja a kettős szálú miRNS-t, melyből csak az egyik szál fog a komplexhez kötve maradni. Így a RISC komplex részévé vált miRNS a komplementaritás elve alapján képes hozzákapcsolódni a cél mRNS 3' UTR részéhez.

A miRNS-ek gátló hatása leggyakrabban a fehérjeszintézis csökkenésével jár, ezt a folyamatot **átíródás utáni géncsendesítésnek (post-transcriptional silencing)** nevezzük.

A létrejött komplex mechanizmusai:

- deCapitálás (5' sapka eltávolítása), deAdenilálás (poli-A farok levágása)
- Transzláció gátlása
- Hasítás a komplementer szekvenciánál

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

A **génátíródást** eukariótákban a **promoter régióhoz**, illetve ettől messzebb eső, de még ugyanazon a DNS-szálon levő, ún. **cisz-regulátor elemekhez** bekötődő **transzkripciós faktorok indítják el**. Ezek a fehérjék a kettős szálú DNS-hez való kötődés után toborozzák az RNS polimerázt (recruitment folyamata). Azokat a **cisz-elemeket**, amelyek a **gén kifejeződését pozitívan** szabályozzák **erősítő (enhancer)**, míg a **negatívan ható** szekvenciákat **csendesítő (silencer)** elemnek nevezzük.

A gén átíródást befolyásoló **transz-elemek közé tartoznak a transzkripciós faktorok (aktivátorok és represszorok)**, illetve **kofaktorok (koaktivátorok és korepresszorok)**. Ezek olyan fehérjék, amelyek a szabályozandó géntől független gének termékei, így térben elkülönülnek (innen a transz elnevezés). Az aktivátor fehérjék az erősítő (enhancer) szekvenciákhoz, a represszorok a csendesítő (silencer) szekvenciákhoz kötődnek.

A fehérjéket kódoló eukarióta gének promoter régiója többféle konszenzus szekvenciát tartalmazhat az ún. **obligát, általános transzkripciós faktorok bekötődésére**, amelyek szükségesek az RNS-polimeráz-II toborzásához. Ilyen konszenzus szekvenciák :

- Iniciátor elem
- Disztális promóter elem
- TATA-box-TATA binding protein
- GC-box
- CAT-box

Az általános transzkripciós faktorok mellett **specifikus transzkripciós faktorok bekötődése erősíti** vagy **gyengíti** az adott gén transzkripciós aktivitását. Az enhancer és silencer elemek a promotertől távolabb helyezkednek el. Ezek a cisz-elemek a kromatinhurok tekeredése révén kerülnek közel a preiniciációs komplexhez. A transzkripciós faktorok közvetlenül vagy kofaktorokon keresztül tudnak kapcsolatot létesíteni a preiniciációs komplexszel, elősegítve (koaktivátorral) vagy gátolva (korepresszorral) annak funkcióját. A koaktivátoroknak általában hiszton-acetil-transzferáz, míg a korepresszoroknak hiszton-dezacetiláz aktivitása is van, így egyszerre több szinten is módosíthatják az adott gén átírását.

Jellegzetes transzkripciós faktor motívumok:

- **Leucin-cipzár:** a fehérje alfa-helix szakaszán hat aminosav távolságában leucinok ismétlődnek, így a leucinok mindig a helix azonos oldalára kerülnek.
- **Hélix-hurok-hélix:** a fehérjében lévő két alfa-helix szakaszt egy rugalmas hurok rész köt össze
- **Hélix-kanyar-hélix:** a fehérjében lévő két alfa-helix szakaszt egy kanyar köt össze
- **Cink-ujj:** a fehérje hurokban levő négy aminosav oldallánc egy Zn^{2+} -ionnal létesít koordinált kötést.

A magi receptorok családjába tartozó transzkripciós faktorok. ???

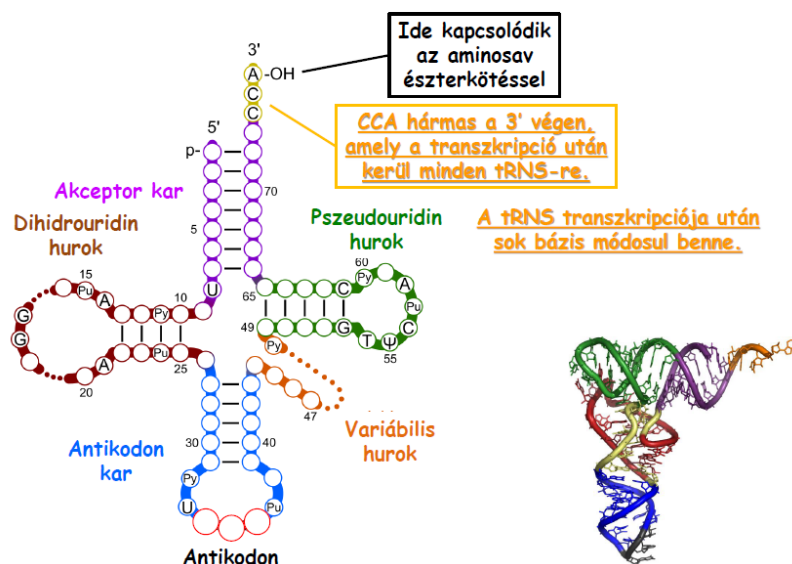
17. A tRNS és az rRNS szerkezete, transzkripciója és érése eukariótákban, a nukleolusz. A prokarióta és eukarióta riboszómák szerkezete és kötőhelyei.

A TRANSZLÁCIÓ ADAPTERE A tRNS

A transzkripció során keletkező mRNS-ben lévő kodonokat nem ismerik fel az aminosavak, azaz a genetikai kód nem fordítható közvetlenül fehérjére. A probléma áthidalásának közreműködői a **transzfer RNS (tRNS)** molekulák, melyek egyrészt az **mRNS kodonjához kapcsolódnak antikodonjukon keresztül**, másrészt kovalensen kötve hordozzák a kodonnak megfelelő aminosavat.

A tRNS-ek transzkripciójukat követően nyerik el végleges formájukat, melynek során bizonyos részeik kihasadnak, számos nukleotidjuk módosul, a 3' végükre pedig egységesen CCA triplet kerül (aminosav-akceptor hely). Az érett tRNS mintegy 80 bázis hosszúságú, sajátos térbeli szerkezettel rendelkező molekula. A sematikus szerkezeti ábrázoláson látható, hogy **a tRNS bázispárosodásokon keresztül 3 nagy és egy kis hurkot hoz létre, így egy lóherére emlékeztető alakzat jön létre**. A molekula **térbeli szerkezete** azonban ettől eltérően egy olyan **L betű**, amelynek egyik végén az antikodon hurok, másik végén pedig a CCA triplethez (a transzkripció után kapja meg) észterkötéssel kapcsolva az aminosav helyezkedik el.

A mRNS-RNS kodon-antikodon bázispárosodása alapján várható lenne, hogy minden kodonhoz tartozik egy azzal komplementer tRNS. Az élőlényekben azonban **a 64 kodonhoz csak jóval kevesebb**, például emberben mindössze 48 különböző tRNS társul. Az ellentmondás magyarázata az ún. **lőtyөгő bázispárosodás** jelenség, azaz bizonyos tRNS molekulák abban az esetben is kapcsolódni tudnak az mRNS-hez, ha **csak a kodon első két nukleotidja komplementer az antikodon bázisaival**. Azonban egy tRNS által felismert különböző kodon mindig ugyanazt az aminosavat kódolják!



RIBOSZÓMA: A POLIPEPTID LÁNC SZINTÉZISÉNEK HELYE

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
 - 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
 - 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

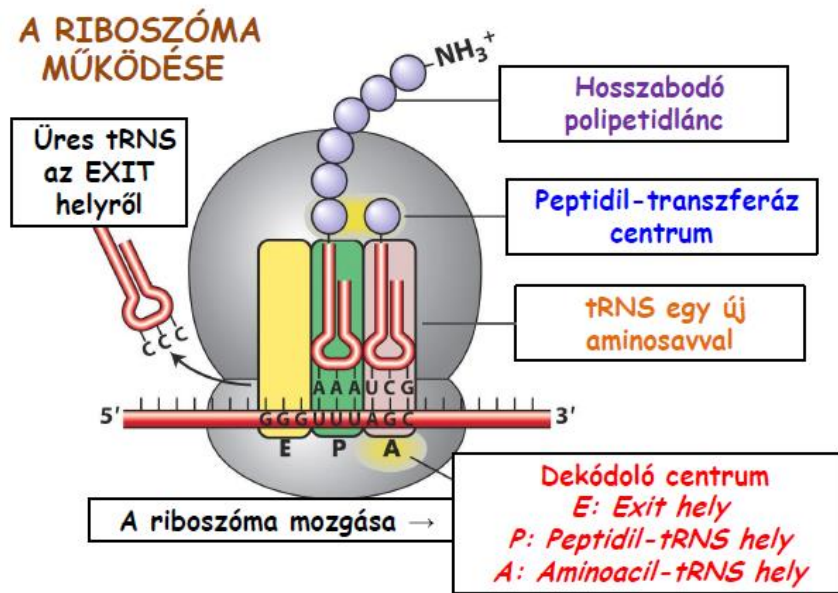
Az eukarióta riboszomális RNS-ek és a tRNS-ek érése

Mind az rRNS, mind pedig a tRNS érése poszt-transzkripcionálisan történik, azaz az elsődleges transzkriptum elkészítése után. A riboszomális gének transzkripciója a sejtmagvacskában, a nukleoluszban történik. Az eukarióta rRNS-ek átírása némiképp emlékeztet a prokariótáknál leírtakhoz, mivel itt is egy közös, hosszú, elsődleges transzkriptum készül, mely tartalmazza mindhárom rRNS szekvenciáit. A végleges rRNS-ek kivágása meghatározott sorrendben történik egy nagy, fehérjéket és RNS-eket tartalmazó komplex hatására. Az érés során specifikus helyeken bázis-metiláció is történik, sőt, pszeudouridin is képződhet. Ezt a reakciót egy kis magi, RNS-eket és fehérjéket tartalmazó partikulum végzi, melyet snoRNP-nek nevezünk. Az snoRNP-k tartalmaznak egy segéd RNS-t, mely komplementer azokkal az rRNS szekvenciákkal, ahol módosítás fog történni. Így a metiláció és a pszeudouridin képzés szekvenciaspecifikus. Végül az érett rRNS-ek a megfelelő fehérjékkel együtt riboszómává rendeződnek a nukleoluszban.

A különböző tRNS-ek egyenként íródnák át, azaz az elsődleges transzkriptum csak egyetlen tRNS információját tartalmazza. Az elsődleges transzkriptum mindkét végén hosszabb, és tartalmazhat intront is. Az 5' véget a ribonukleáz P vágja le, amely endonukleáz aktivitású ribozim. A 3' végen exonukleáz fogja lehasítani a felesleges nukleotidokat. A prokariótákhoz hasonlóan, az eukarióták tRNS-ének 3' végére is utólag, templáttól független reakcióban kerül rá a jellemző CCA szekvencia. Ha van intron az elsődleges transzkriptumban, akkor az is kivágásra kerül. A tRNS érési folyamatára rendkívül jellemző a nukleozidok utólagos módosítása.

A prokarióta és eukarióta riboszómák szerkezete és kötőhelyei

A riboszóma kis alegységéhez kapcsolódik az mRNS, míg a nagy alegységben alakulnak ki a peptidkötések. tRNS a kodon-antikodon bázispárosodás mellett a riboszóma meghatározott helyeivel is kapcsolatba lép. Ebből a szempontból három, mindkét alegységén átívelő helyet különböztetünk meg a riboszómán: A (aminoacil-tRNS), P (peptidil-tRNS) és E (exit) hely.



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

A kódszótár

A fehérjék elsődleges szerkezetére, azaz aminosav szekvenciájára vonatkozó információ bizonyos vírusoktól eltekintve DNS-ben tárolódik. A fehérjék alapvetően huszonegyféle aminosavból épülnek fel, a DNS-t alkotó négy nukleotidnak azonban csak húsz aminosavat kell leírnia, mivel a huszonegyediként számon tartott szelenociszteinnak nincs saját genetikai kódja. Ahhoz, hogy a négyféle nukleotiddal húsz aminosav leírható legyen, a genetikai kódnak minimálisan három betűsnek kell lennie. A három betűs kód $4^3 = 64$ variációt tesz lehetővé, és mivel minden kombinációnak van jelentése, a genetikai kód degenerált (redundáns), egy adott aminosavat, illetve a transzláció végét jelző stop jelet többféle nukleotid triplet, ún. kodon is leírhat. A genetikai kód ugyanakkor generalizált (univerzális) is, néhány ritka kivételtől eltekintve az egész élővilágra érvényes. Az egy meghatározott aminosavat jelentő kodonok száma változó, míg a fehérjékben leggyakrabban előforduló metioninnak és triptofánnak mindössze egy kodonja van, addig több olyan aminosavat is találhatunk, amelyek hat kodonnal rendelkeznek.

		Második nukleotid								
		U		C		A		G		
		kodon	aminosav	kodon	aminosav	kodon	aminosav	kodon	aminosav	
Első nukleotid	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC		UCC		UAC		UGC		C
		UUA	Leu	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP	A
		UUG		UCG		UAG	STOP	UGG	Trp	G
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC		CCC		CAC		CGC		C
		CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
		CUG		CCG		CAG		CGG		G
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC		ACC		AAC		AGC		C
		AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	CGU	Gly	U
		GUC		GCC		GAC		CGC		C
		GUA		GCA		GAA	Glu	CGA		A
		GUG		GCG		GAG		CGG		G

Harmadik nukleotid

A kodonok ismeretében és annak tudatában, hogy az mRNS olvasása 5'-3' irányú, a fehérjék polipeptidláncainak aminosav-sorrendje a nukleinsav szekvenciából az olvasási kerettel megadható. Olvasási keret a polipeptid lánc aminosavait kódoló szakasz az mRNS-ben, a START kodon (mindig AUG-metionin) első nukleotidjától a STOP kodonig. Az olvasási keret folyamatos, azaz a kodonok egymást közvetlenül követik, nem fednek át.

Az aminoacil-tRNS szintetázok

A genetikai kód értelmezéséért a kettős funkcióval rendelkező **aminoacil-tRNS szintetáz** (ARS) **enzimek felelősek**. Az enzimsalád tagjai ATP terhére a tRNS 3' végén található ribóz kettes

vagy hármasszénatomjának hidroxil csoportja és a megfelelő aminosav karboxilcsoportja között **egy észterkötést hoznak létre**. A reakció két lépésben, **aminoacil-AMP intermediéren keresztül** valósul meg. Az aminoacil-tRNA komplex kialakulása tulajdonképpen az aminosav aktivációjának tekinthető, mivel a létrejött észterkötés fedezni tudja a fehérjeszintézishez elengedhetetlen peptidkötések kialakulásának energiaigényét. Az aminoacil-tRNA-szintázok a tRNA-ekeket **a teljes nukleotid szekvencia alapján ismerik fel** (második genetikai kód), nem az antikodon alapján! A 20 aminosavnak megfelelően a legtöbb organizmusban 20féle aminoacil-tRNA szintetáz fordul elő. Ezek az élővilág legspecifikusabb enzimei. Az aminoacil-tRNA szintetázok többsége hibajavító aktivitással is bír.

A lötyögés biológiai jelentősége

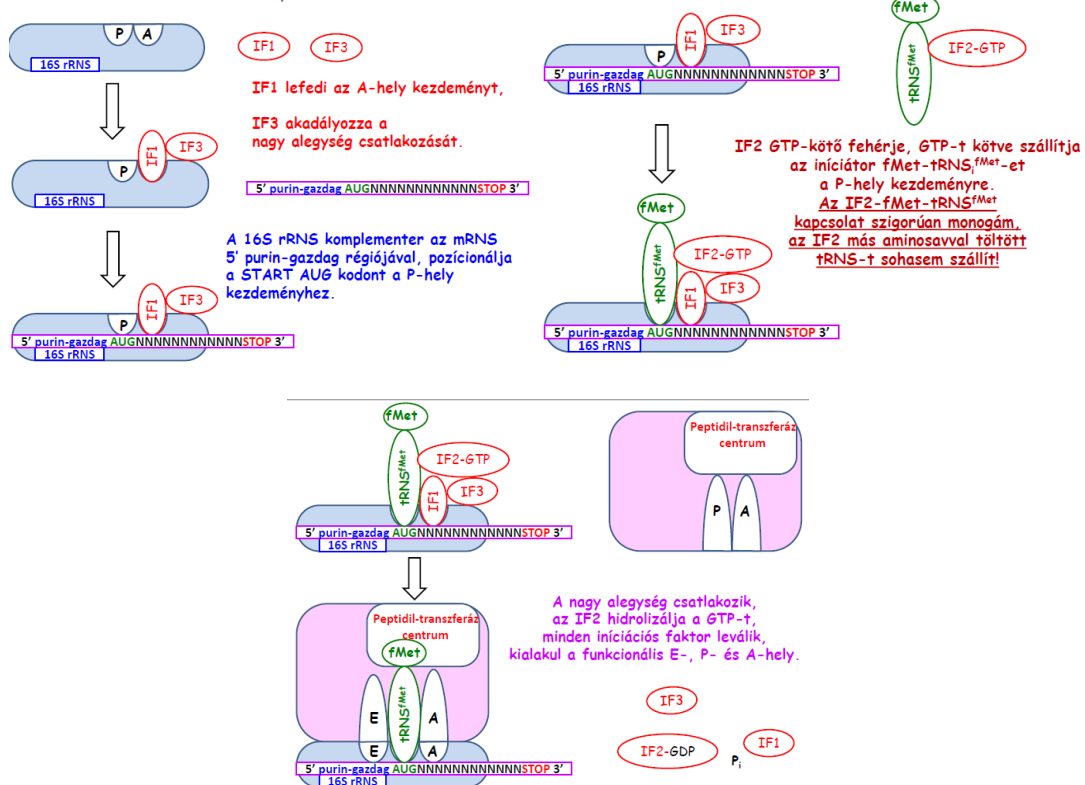
A mRNA-tRNA kodon-antikodon bázispárosodása alapján várható lenne, hogy minden kodonhoz tartozik egy azzal komplementer tRNA. Az élőlényekben azonban a 64 kodonhoz csak jóval kevesebb, például emberben mindössze 48 különböző tRNA társul. Az ellentmondás magyarázata az ún. lötyögő bázispárosodás jelenség, azaz bizonyos tRNA molekulák abban az esetben is kapcsolódni tudnak az mRNA-hez, ha csak a kodon első két nukleotidja komplementer az antikodon bázisaival. **A kód így ellenállóbb a mutációkkal szemben!**

19. A transzláció iniciációs szakasza prokariótákban és eukariótákban.

Prokariótákban

A transzláció során beépülő első aminosav a metionin egy módosult formája, az formil-metionin. A bakteriális mRNS-ben a start kodon előtt néhány bázissal **egy purin gazdag szakasz, az ún. Shine-Dalgarno motívum helyezkedik el**. Ez a nukleotid szekvencia rész **komplementer a riboszóma kis alegységében található 16S rRNS 3' végével**, így ezen keresztül **az mRNS a megfelelő pozícióban kötődik** a riboszóma kis alegységéhez. A polisztronos mRNS-ekben minden start kodont megelőz egy Shine-Dalgarno motívum, így a riboszóma az mRNS belső szakaszain is megkezdheti a fehérjék szintézisét. A transzlációhoz a riboszómán és az aminoacil-tRNS-en kívül számos egyéb fehérje faktorra is szükség van. Ezek közül az **iniciációban három játszik szerepet. Az IF1 és IF3 (iniciációs faktor) fehérjék a riboszóma kis alegységéhez kötődnek. Az előbbi megakadályozza a két alegység idő előtti kapcsolódását, az utóbbi a f-Met-tRNS-t a kis alegység P-helyére irányítja. A f-Met-tRNS a GTPáz aktivitással rendelkező IF2 segítségével kapcsolódik a Shine-Dalgarno motívum közelében lévő AUG triplethez. Az IF2-fMet-tRNS^{fMet} kapcsolat szigorúan monogám, az IF2 más aminosavval töltött tRNS-t sohasem szállít!** Az iniciációban résztvevő tRNS különbözik a peptidlánc belsejében található metioninok tRNS-étől. A f-Met-tRNS start kodonhoz kötődését követően **mindhárom iniciációs faktor leválik a riboszóma kis alegységéről, és az IF2 hidrolizálja a vele komplexben lévő GTP makroerg kötését, így az GDP-vé alakul. Ezeket a lépéseket követően a két riboszóma alegység kapcsolódását már nem gátolja az IF1, kialakulhat a funkcionális, két alegységből álló 70S riboszóma, és a transzláció az elongáció fázisába léphet.**

AZ INICIÁCIÓ PROKARIÓTÁKBAN, INICIÁCIÓS FAKTOROK: IF



Eukariótákban

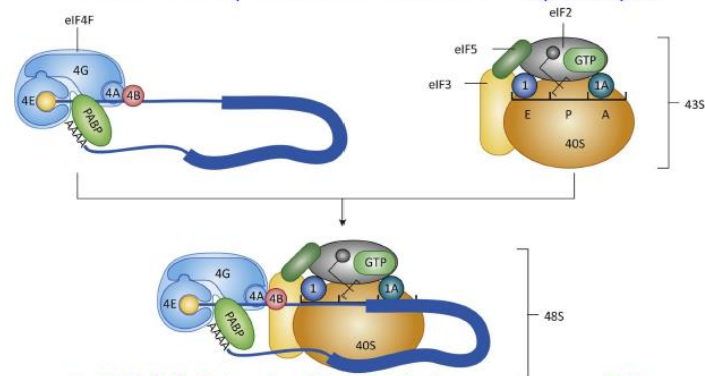
Az eukarióta transzláció iniciációja számos ponton eltér és jóval összetettebb a prokariótáknál látottaktól. Az eukarióta mRNS sajátosságai, úm. a Shine–Dalgarno-motívum hiánya, az 5'-metil-guanozin- sapka, a 3'-poliA-farok és a hosszú, akár több száz bázisnyi nem transzlálódó régiók (UTR) a transzlációval összefüggésben vizsgálva nyernek igazi értelmet. A transzláció első fázisában a riboszóma kis alegysége köti a Met-tRNS- t szállító eIF2-t és számos más eIF-t, így létrehozva a 43S iniciációs komplexet. Az iniciációs komplex az eIF4E fehérjével összeálló sapka komplexen keresztül kötődik a 7-metil-guanozinhoz, és ezen keresztül az mRNS-hez. Az így létrejött 48S iniciációs komplex 5' → 3' irányban mozogva az mRNS-en megkeresi és a P-hely kezdeményre illeszti a START AUG kodont (scanning). A nagy alegységet az eIF5B GTP-kötő fehérje szállítja. Az eIF2 és az eIF5B hidrolizálják a GTP-eket GDP + Pi-re. Ekkor az iniciációs faktorok disszociálnak a riboszómától, kezdődik az elongáció.

AZ INÍCIÁCIÓ EUKARIÓTÁKBAN

eIF2: az iniciátor Met-tRNS^{Met} szállítója, GTP-kötő fehérje.

Csak a Met-tRNS^{Met} szállító eIF2 komplex képes a kis alegységhez kötődni mRNS nélkül, további eIF-ek jelenlétében → **43S iniciációs komplex**

eIF4E: az 5' Cap felismerése az mRNS-en → **sapka komplex**



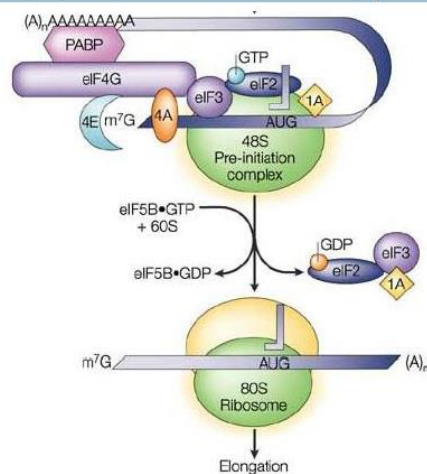
A 48S iniciációs komplex 5' → 3' irányban mozogva az mRNS-en megkeresi és a P-hely kezdeményre illeszti a START AUG kodont: **scanning**. Ez aktív folyamat, ATP hidrolízise adja az energiát.

AZ INÍCIÁCIÓ EUKARIÓTÁKBAN

A nagy alegységet az eIF5B GTP-kötő fehérje szállítja.

Az eIF2 és az eIF5B hidrolizálják a GTP-eket GDP + P_i-re.

Ekkor az iniciációs faktorok disszociálnak a riboszómától, kezdődik az elongáció.



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

Az iniciáció befejeztével a riboszóma mindkét alegységének P helyét f-Met-RNS, ill Met-RNS foglalja el. Az mRNS második kodonjához az aminoacil-tRNS-t a funkcionálisan az eIF2-nek megfelelő EF1 (elongációs faktor-1) szállítja a riboszóma A-helyére. A folyamat az EF1 esetében is egy GTP hidrolízisével jár együtt. (Ez időt ad a helyes kodon-antikodon illeszkedés kialakulásához, ellenőrzéséhez) Az aminoacil-tRNS A-helyre történő kötődését követően a tRNS szára az aminosavval egyetemben áthajlik, a nagy alegység P-helyére, ahol az észterkötéssel tRNS-hez kapcsolt metionin található. Ez a pozicionálás lehetővé teszi, hogy az A-helyről áthajolt aminosav aminocsoportja megtámadja az észterkötést, és ennek nyomán kialakuljon az első peptidkötés, a másodikként érkezett tRNS-hez kapcsoltan egy dipeptid jöjjön létre. A reakció következtében egyúttal az iniciátor tRNS is megszabadul aminosavától, és a 3'-vége a riboszóma nagy alegységének E-helyére kerül.

A transzláció végső szakasza, a termináció akkor veszi kezdetét, amikor a riboszóma a 3 stop kodon valamelyikébe ütközik. A folyamat során egy érdekes molekuláris mimikrit figyelhetünk meg. A stop kodonoknak nincs megfelelő tRNS párja, ehelyett egy a tRNS-hez háromdimenziós szerkezetében nagyon hasonló fehérje, az ún. RF (release factor) fehérje kapcsolódik a stop kodonhoz. Az RF katalizálja a peptidil-tRNS észterkötésének hidrolízisét, így a már teljes aminosav szekvenciát hordozó fehérje kiszabadul, a riboszóma pedig szétesik két alegységére.

A fehérjeszintézis gátlószerei

Prokariótákban: (a mitokondrium saját fehérjeszintézisére is hathatnak!)

- Mupirocin : tRNS^{Ile} szintetáz gátlás
- Tetraciklin : Aminoacil-tRNS kötés gátlás
- Klóramfenikol: Peptidil transzferáz aktivitás gátlás
- Streptomycin: Iniciáció gátlás és mRNS helytelen olvasása
- Kanamicin, neomicin, gentamicin: 30S alegység kötése
- Eritromicin: 50S alegység kötése

Eukariótákban:

- Cikloheximid: Transzlokáció gátlás

Mindkettőben:

- Puromicin: Aminoacil-tRNS mimikri
- Torokgyík
- Ricin

21. Az eukarióta transzláció szabályozásának mechanizmusai.

A korábbiakban már láthattuk, hogy az eukarióta mRNS metil-guanozin sapkája és poliA farka egyfajta minőségi kontrollt is lehetővé tesz. Ezeken túl a sejtmagból kikerülő mRNS első transzlációja során egy olyan típusú ellenőrzésen is átesik, amely biztosítja, hogy csakis a megfelelően hasított mRNS szolgálhasson a fehérjeszintézis templátjaként. Az mRNS érése során az intronok eltávolításra kerülnek, és a két exon határára bekötődik a több fehérjéből felépülő **exon kapcsolódási komplex (exon junction complex, EJC)**. A sejtmagból kijutott mRNS olvasása közben a riboszóma eltávolítja az útjába kerülő EJC-eket, majd a stop kodonnál szétesik két alegységre. Az átvizsgált és EJC mentesített mRNS további riboszómáknak szolgálhat transzlációs templátként. Egészen más lesz az mRNS sorsa, ha a riboszóma úgy ütközik stop kodonba, hogy attól 3' irányba még található EJC. Az ilyen szituáció egyértelműen jelzi, hogy az érési folyamat során az mRNS nem a megfelelő módon vágódott, így hibás fehérje létrejöttét eredményezné a transzlációja. Ezekben az esetekben az mRNS további fehérjék közreműködésével degradálódik. Az mRNS több lépcsős, szigorú minőségi kontrolljának jelentősége könnyen belátható annak tudatában, hogy a fehérjeszintézis a legenergiaigényesebb biokémiai folyamat.

A minőségi követelményeknek megfelelő mRNS sok esetben várakozik a citoplazmában, nem kerül azonnali transzlációra, a fehérjére történő fordítása csak bizonyos feltételek teljesülése esetén következik be. A transzláció szabályozásának legközvetlenebb módja a prokariótáknál látottakhoz hasonlatos, amennyiben az mRNS-hez kötődő regulátor fehérje közvetlenül befolyásolja a fehérjeszintézis sebességét. Jó példa erre a szabályozási módozatra a ferritin szintézisének kontrollja. A szabad vas reaktív gyökök keletkezését katalizálja, így azt a sejtek ferritinhez, vasat tároló fehérjéhez kötve raktározzák. A ferritin mRNS-nek 5'-UTR szekvenciája **hajtű struktúrát hoz létre**, amelyhez vashiány esetén a citoplazmatikus akonitáz vas-kén fehérje kötődik, így gátolva a ferritin transzlációját. Emelkedett vas koncentrációnál az akonitáz a vassal komplexet képez, konformáció változáson megy át, leválik a hajtűről, így módon szabad utat adva a transzlációnak.

A preiniciációs komplexhez a három alegységből álló eIF2 GTPáz szállítja a MettRNS-t. Az iniciáció során GTP GDP-vé alakul, az eIF2 ezáltal inaktiválódik. Az újraaktiválásban, azaz GDP-GTP cserében az eIF2B fehérje működik közre, ez a reaktiválás azonban **fehérje kinázok segítségével gátolható**. Amennyiben az eIF2 a-alegysége foszforilálódik, a csere nem következik be, a hármas komplex GDP kötött formában csapdába esik, és így a továbbiakban nem tud részt venni a transzláció beindításában. Az inhibitor foszforilációt számos, különböző stresszek hatására indukálódó fehérje kináz kivitelezheti. Ezek közül a legismertebbek a virális fertőzés nyomán megjelenő, duplaszálú RNS által aktivált PKR kináz, az aminosavhiány esetén indukálódó GCN2 kináz, a hem hiányában aktiválódó HRI1 és az ER stressz következtében aktívvá váló PER kináz.

A korábbiakban már láthattuk, hogy a metil-guanozin sapka az eIF4E és eIF4G fehérjéken keresztül lép kapcsolatba a preiniciációs komplexszel. Az iniciációnak ez a lépése is

szabályozható foszforiláción keresztül, habár a foszfátcsoport kapcsolásának ebben az esetben transzlációt fokozó hatása van. Az eIF4G kompetícióban van az eIF4E-BP transzlációs represszor fehérjével, mivel mindkettő képes az eIF4E-vel kapcsolatba lépni. **Az eIF4E-BP foszforilációt követően azonban elveszti eIF4E kötő képességét, így lehetővé teszi az eIF4E-eIF4G komplex kialakulását**, ezen keresztül pedig a preiniciációs komplex sapkához történő kötődését. Az eIF4E-BP foszforilációjáért az mTOR kináz felelős.

Gátló hatások (eIF2 foszforilálódik)	Fokozó hatásosok (eIF4E-BP foszforilálódik)
- aminosav hiány (éhezés) - sok félkész fehérje az ER-ben - vírusfertőzés - hem hiány a vörösvértes el	- Jóllakott állapot - Növekedési faktorok hatására

Iniciáció sapka komplex nélkül

Bizonyos esetekben előfordul, hogy a transzláció szabályozása nem az iniciázicós faktorokon keresztül valósul meg :

- mitózis során
- apoptózisban
- vírusfertőzés esetén

Ilyenkor nem a metil-guanozin sapka bekötődése indítja be az iniciációt, hanem az mRNS egy speciális, a start kodon előtt elhelyezkedő több száz bázisból álló szekvencia motívum helyettesíti, az ún. **IRES (Internal Ribosome Entry Site)**. Az IRES bázispárosodásokon keresztül olyan bonyolult másodlagos szerkezetet hoz létre, amelyhez az eIF4G közvetlenül kapcsolódik, így a preiniciációs komplex a metil-guanozin-sapka közreműködése nélkül, a start kodon közelében kötődik az mRNS-hez.

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

Protein sorting (fehérjék szortírozása): Az újonnan szintetizálódott fehérjék funkciójuknak megfelelő sejt-kompartmentbe juttatása.

A fehérjeküldeményre írt speciális, ún. **szignál szekvenciák** döntenek el, hogy a fehérje melyik kompartmentbe kerül. A citoplazmai, a magi, a mitokondriális (amiket nem az mDNS kódol) és a peroxisómális fehérjék a szabad, citoplazmai riboszómákon szintetizálódnak, így a citoplazmai fehérjéken nincs jelzés. A többi fehérje poszt-transzlációs transzporton esik keresztül az aminosav szekvenciák alapján.

Bizonyos citoplazmai fehérjék a **membránokhoz rögzülnek lipid oldalláncok segítségével**, melyeket enzimek kapcsolnak a fehérjék speciális szekvenciáihoz poszt-transzlációs módosítás során:

- Palmitoiláció (peptidláncban lévő Cys-hez vagy Ser-hez)
- Mirisztoiláció (N-terminális Gly-hez)
- Preniláció (C-terminális Cys-hez)

A nukleáris lokalizációs szignál (NLS) jelöléssel és az **IMPORTIN** és a **Ran GTP-áz** enzimek segítségével **kerülnek be a megfelelő fehérjék a sejtmagba**. **A nukleáris export szignál (NES)** jelöléssel és az **EXPORTIN** és a **Ran GTP-áz** enzimek segítségével **kerülnek ki a megfelelő fehérjék a sejtmagból a citoplazmába**.

Az organellek fehérjéinek döntő többsége a citoplazmában szintetizálódik és a transzláció befejeződését követően transzportálódik az organellekbe.

A transzportot biztosító szignál rendszerint a fehérje N-terminális része, amit a transzportot követően a **szignál peptidáz levág**.

A mitokondriumot alkotó fehérjék kisebb része a mitokondriumban, többsége a citoplazmában szintetizálódik. Elhelyezkedésük a mitokondriumban szerepüknek megfelelően szigorúan meghatározott és lehet a külső vagy belső membrán , a két membrán közötti tér, illetve a mátrix.

A mitokondriumba irányuló protein transzport megvalósítói a:

- **TOM**(translocase of the outer membrane): minden mitokondriumba irányuló protein transzportjához kell. Transzport a külső membránon át és külső membránba illesztés.
- **TIM**(... inner ...) : TIM22, TIM23 : transzport a mátrixba és belső membránba illesztés
- **OXA komplexek** :a mitokondriumban szintetizálódott fehérjék beillesztése a belső membránba

A komplexek tartalmazzák a szignál szekvenciát megkötő fehérjéket és a transzlokációs csatornát kialakító fehérjéket. A **TOM** és **TIM** komplexek a két mitokondrium membrán érintkezési pontjainál tartósan együtt fordulnak elő és a transzport a mátrixba egy folyamatban zajlik. A transzporthoz szükséges energiát részben az ATP hidrolízis, részben a belső membrán két oldala között fennálló elektrokémiai proton gradiens biztosítja.

A citoplazmai fehérjék leggyakoribb poszt-transzlációs módosulásai.

Az intracelluláris fehérjék leggyakoribb poszt-transzlációs módosulás a foszforiláció. (A fehérjék 30 %)

?

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

- **A vírus:** fertőzőképes nukleinsavból és az azt körülvevő fehérjeköpenyből (egy vagy kétfajta fehérje, spontán összeálló geometriai alakzat, hengeres, spirális, vagy ikozahedrális) álló részecske. Kizárólag élő sejtekben képesek önmaguk replikációjára, mert energiaszolgáltató és fehérje szintetizáló rendszerük nincsen (abszolút parazita). Burka is lehet, amely az előző gazdasejtől rabolt lipid membránból és a vírus által kódolt glikoproteinekből áll.

- **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.

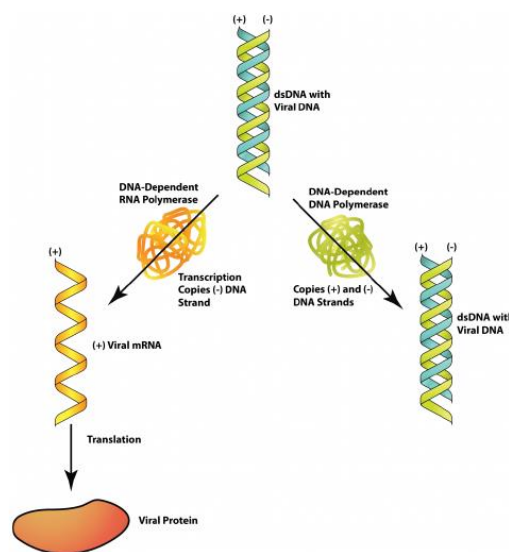
A vírusok replikációs mechanizmusai:

I. Ha a vírus örökítőanyag dsDNS

A gazdasejt enzimjeit használja a vírus a replikáció és transzkripció során:

DNS-függő-RNS polimeráz (transzkripció) → mRNS → transzláció → vírusfehérjék
DNS-függő-DNS polimeráz → replikáció

Kétszálú DNS vírus replikációja: a gazdasejt enzimjeit használhatja



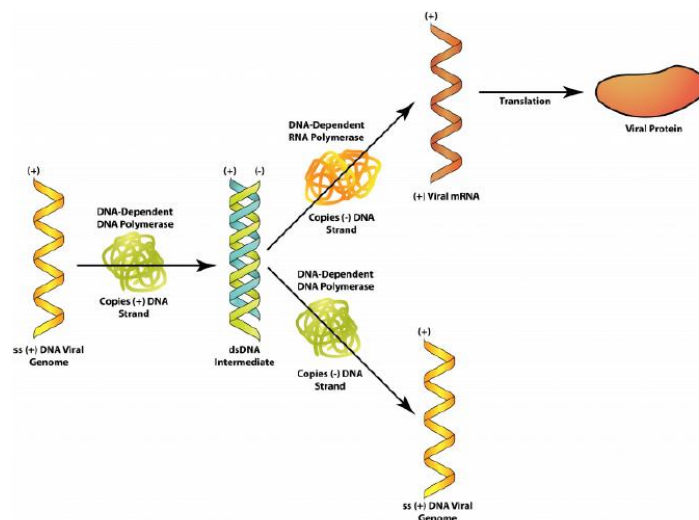
II. Ha a vírus örökítőanyag ssDNS

A gazdasejt enzimeit használja a vírus a replikáció és transzkripció során:

ssDNS → DNS-függő-DNS polimeráz → dsDNS

Ha elkészült a dupla szálú DNS, akkor az előzőhöz hasonló módon replikálódik, illetve transzkriptálódik a genom.

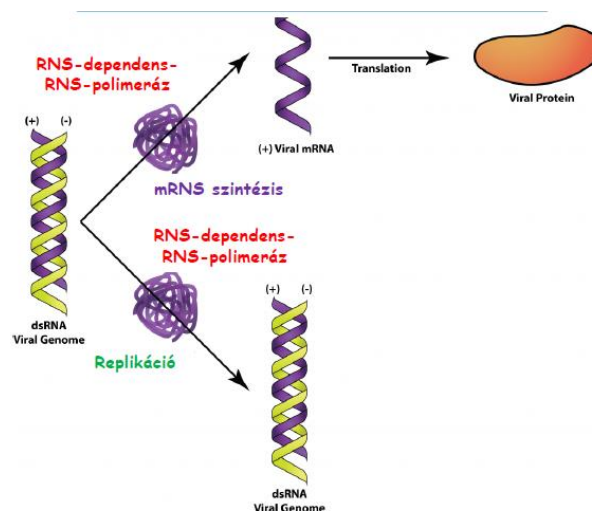
**Egyszálú DNS vírus replikációja:
a gazdasejt enzimeit használhatja**



III. Ha a vírus örökítőanyag tisztán kettősszálú RNS

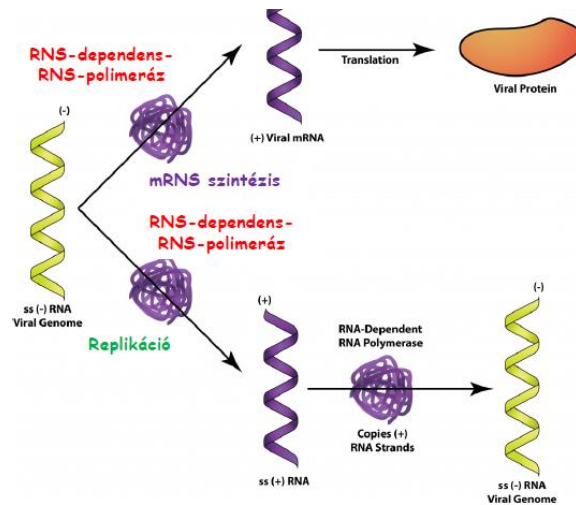
A replikációhoz és az mRNS szintéziséhez is **RNS-dependens-RNS-polimeráz: replikáz** szükséges, amelyet a vírusnak kell magával hoznia.

RNS-dependens-RNS-polimeráz előállítja a dsRNS replikációját és az mRNS transzkriptumot, melyről a transzláció és a vírusfehérjék kifejeződése megkezdődhet.



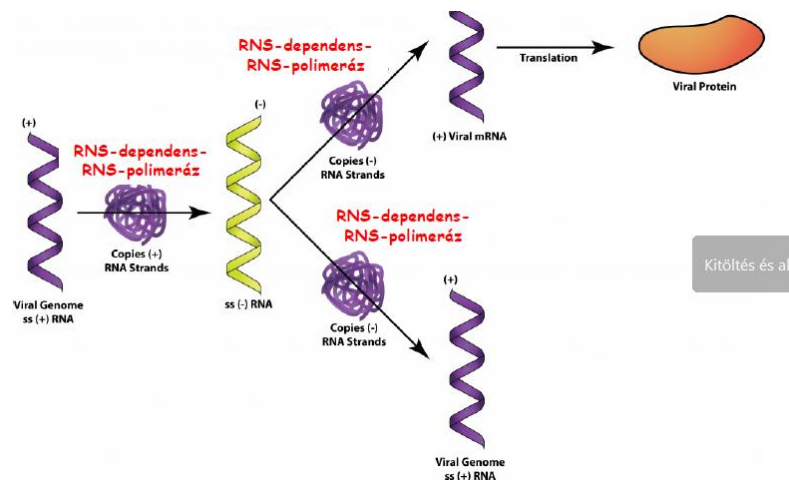
IV. Ha a vírus örökítőanyag tisztán egyszálú, negatív RNS

A replikációhoz és az mRNS szintéziséhez is RNS-dependens-RNS-polimeráz szükséges, amelyet a vírusnak kell magával hoznia.



V. Ha a vírus örökítőanyag tisztán egyszálú, pozitív RNS

A vírus azonnal mRNS-ként funkcionálhat, ezért az RNS-dependens-RNS-polimerázt nem kell magával hoznia, elég kódolnia.

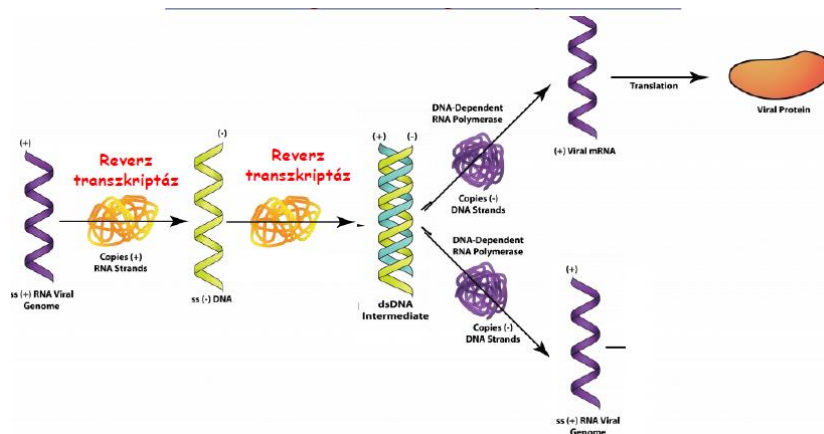


VI. Retrovírusok esetén

Az örökítőanyag egyszálú, pozitív RNS.

A replikációhoz reverz transzkriptáz szükséges, melyet a vírusnak magával kell hoznia.

A vírus örökítőanyaga alapján készült DNS-nek kötelező integrálódnia a gazdasejt DNS-ébe.

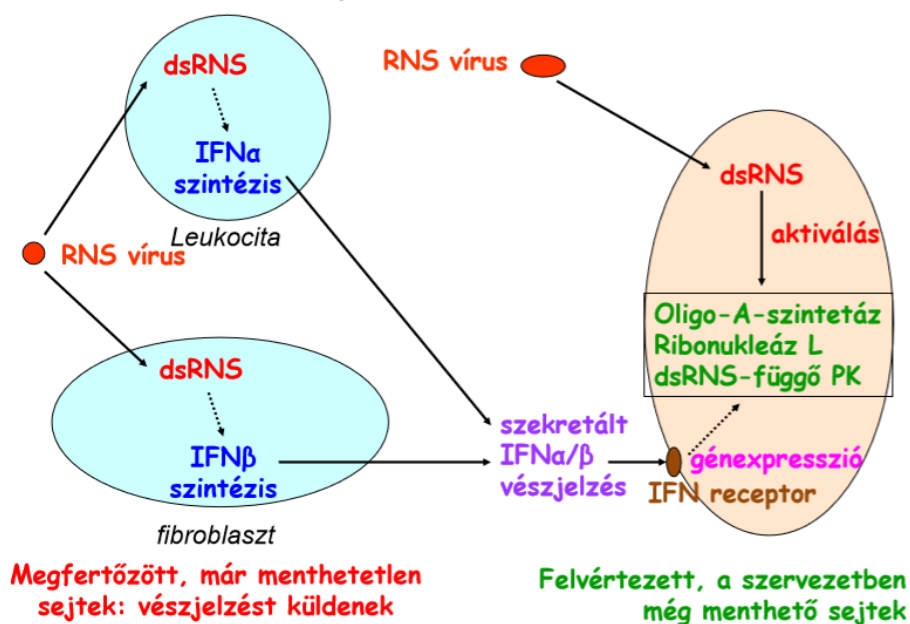


Az alfa és béta interferonok jelentősége.

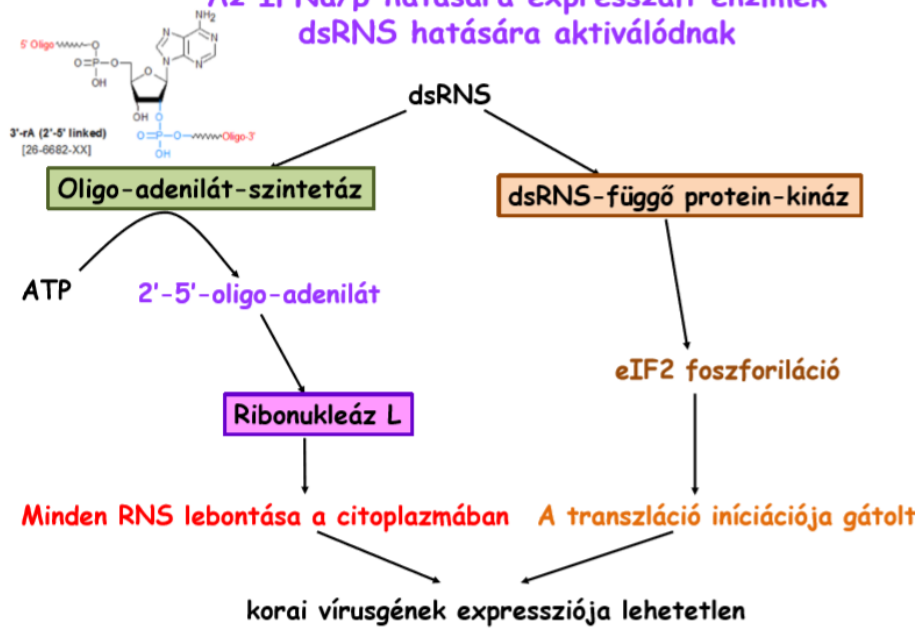
Interferonok: A vírusgenom replikációja közben átmenetileg megjelenik a kettős szálú RNS lánc. Ez a gazdasejtben egy védelmi reakciót indít be, amit a többi sejt felé az interferonok közvetítenek. ▪ A kettős szálú RNS megjelenése után a gazdasejt interferonnak nevezett fehérjét szintetizál és szekretál. ▪ A többi sejtben három enzim szintézisét indukálják: ▪ Ezek a szintézist követően nem aktívak, csak védelmi készségben 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 endonukleázt ▪ 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)

Interferon α és β : RNS vírusok elleni védekezés



Az IFN α/β hatására expresszált enzimek
dsRNS hatására aktiválódnak



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

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 enzimét, ami lebontja a gazdasejt falát ▪ Az összerendeződött T4 fágok a lizozim által készített lyukon át kiszabadulnak, és fertőzőképesek. A baktériumsejt szétesik (bakteriolízis).

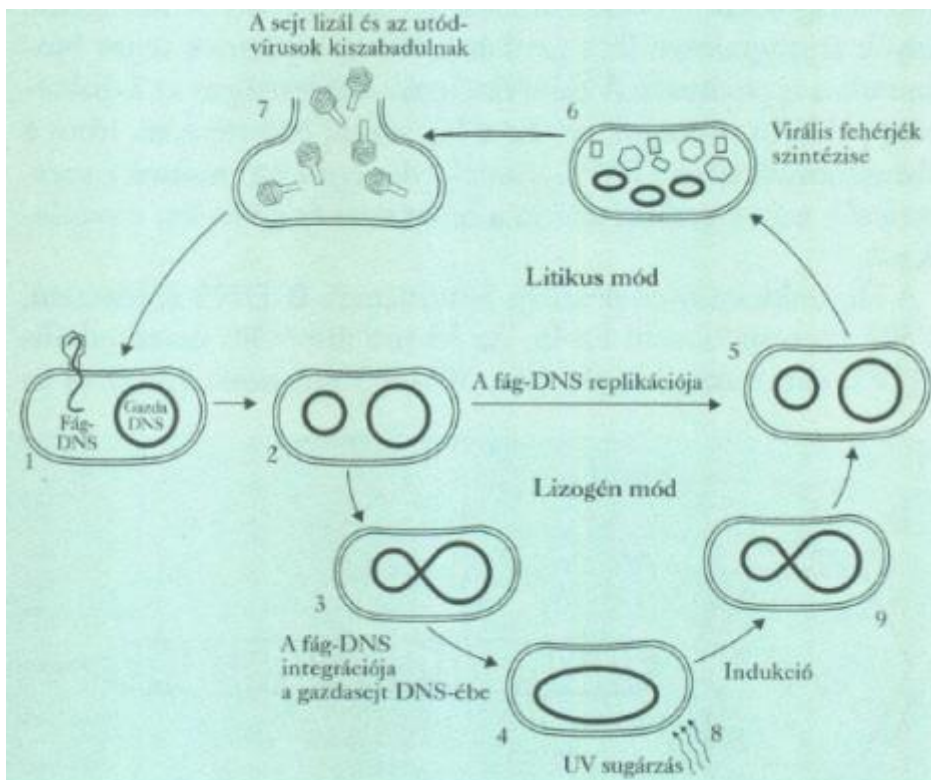
- **Lizogén út:** A gazdasejtet generációkon át nem károsítja. ◦ Cirkuláris vírus DNS: A lineáris DNS vírusgenom a gazdasejtbe jutva cirkuláris DNS-é alakul, és önálló replikációra képes. ◦ Profág: Bizonyos körülmények között a vírus DNS rekombinációval a gazdasejt DNS-ének egy jól meghatározott helyére integrálódik. Ez a profág. ◦ Lizogén baktérium: olyan baktérium, aminek kromoszómája a profágot is tartalmazza. ◦ fág represszor fehérje: A profág kihasítását a baktérium genomából 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 régióihoz 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.

4.4. A bakteriofágok

Bakteriofágoknak a baktériumokat fertőző vírusokat nevezzük, melyek átprogramozzák a gazda-baktériumsejt teljes bioszintetikus apparátusát. A bakteriofágok tulajdonságait az λ -bakteriofág példáján mutatjuk be. Ez a fág sokkal összetettebb, mint a dohánymozaik-vírus (TMV). Ennek ellenére sokat tudunk a szerkezetéről, mivel gyakori alanya a biokémiai és genetikai vizsgálatoknak.

A λ -fág a nyúlványa révén a *E. coli* sejt maltóz transzportfehérjéjéhez kötődik. Ezután a virion DNS-e a nyélen keresztül beinjektálódik a baktériumba. A λ -fág DNS-e 12 nukleotid hosszú egyes szálú komplementervégeket tartalmaz. Ennek révén cirkularizálódik a λ -DNS (kohézív végek) kettős szálúvá (DNS-ligáz segítségével), és végül szuperhelikálódik a DNS-topoizomeráz közreműködésével (4.9. ábra).

4.9. ábra. A λ -fág „életciklus” variációi. 1. A λ -fág specifikusan kötődik a *E. coli*hoz és bejuttatja abba a DNS-ét. 2. A lineáris kettős láncú DNS ezután cirkularizálódik. 3. A lizogén útvonal során a fág DNS-e integrálódik a gazda sejt DNS-ének adott helyére (profág). 4. A gazda sejt kromoszóma ezután az integrálódott λ -DNS-el együtt replikálódik. 5. A fág fertőzés után a litikus útvonal is lehetséges, ilyenkor a fág DNS a saját replikációját irányítja. 6. A fág DNS felszaporodása után megtörténik a fág fehérjék szintézise is. 7. A fág részecskék összeállása után a gazda sejt feloldódik és mintegy 100 új részecske szabadul ki. 8. A lizogén útvonal úgy fog új részecskék szintéziséhez vezetni, hogy a DNS-ből valamilyen hatásra, pl. hőmérséklet emelkedés vagy UV sugárzás hatására kiszabadul a fág DNS, majd a szokásos módon (5, 6, 7) így is fágpartikulumok képződnek.

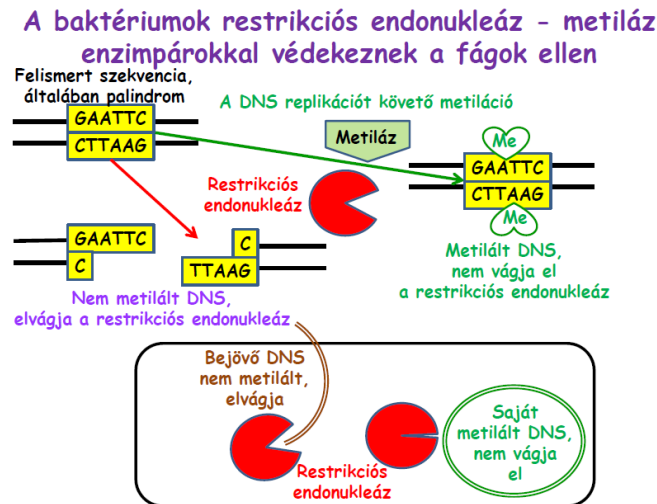


Ezután a λ -fág kétféle „életstílust” választhat. Az egyik a litikus útvonal, ahol a fág-DNS irányításával azonnal sok fágészecske képződik. A másik a lizogén út, amikor a fág-DNS profágként integrálódik a gazdasejt genomjába, avval együtt szaporodik, és csupán valamilyen indukció hatására (pl. hőmérséklet-emelkedés) szabadul ki abból és irányítja új fágészecskék szintézisét (4.9. ábra). A lizogén útvonalat követő fágot temperált, míg a litikus útvonalat követőt virulens fágnek nevezzük..

Restrikciós endonukleázok:

Több fajtájuk van, de számunkra csak azok fontosak, amelyek a DNS-specifikus szekvenciákat ismerik fel és hasítják azokat, pl **a DNS palindrom** (oda és visszafelé olvasva is ugyanaz) szekvenciát ismeri fel és hasítja a megfelelő helyen.

A sejt a saját DNS-ét nem hasítja, mivel azon DNS-szekvenciák, amelyeket a saját restrikciós endonukleázok felismernének, **már metilálva vannak** az ún. „modifikációs metilázok” által.



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

A transzformáló DNS vírusok (bizonyos HPV, Herpes, Polyoma) lítikus ciklussal szaporodnak az ezt megengedő, permisszív gazdasejtekben (olyan sejt, amelyben a vírus teljes genomja tud replikálódni). A nem permisszív gazdasejtekben nem képesek szaporodni, azonban ritkán, kis valószínűséggel integrálódhatnak a gazdasejt genomjába véletlenszerű helyen: provírus. (Esetenként csak a vírus DNS egy része integrálódik.) **Ezek az életben maradt, transzformált sejtek.**

Az integrálódott provírus nem szaporodik a hagyományos módon (nem képződnek virionok), **de DNS-éről olyan fehérjék fejeződnek ki, amelyek a Rb (retinoblasztóma) és a p53 fehérje működését gátolják.**

A Rb és a p53 a sejtciklus G1/S kontroll pontját ellenőrző fehérjék, biztosítják, hogy a sejt ne oszódjon felszólítás nélkül és/vagy sérült DNS-sel. Nagyon súlyos DNS sérülés esetén a p53 a sejtet apoptózisra (öngyilkosságra) bírja.

Az ilyen, a sejtosztódást lassító, ellenőrző, adott esetben apoptózist kiváltó fehérjék a tumor szupresszor fehérjék, génjeik **a tumor szupresszor gének.**

A tumor szupresszor fehérjék gátlása miatt a fertőzött sejt gyakrabban osztódik, ami a vírus számára előny (nem a hagyományos értelemben, de szaporodik). Ugyanakkor a gyakori, kontroll nélküli osztódások miatt a provírusal transzformált **sejt utódai könnyebben szenvednek mutációkat és válnak daganatsejtekké.**

Hepaszitisz B vírus daganatképző hatása:

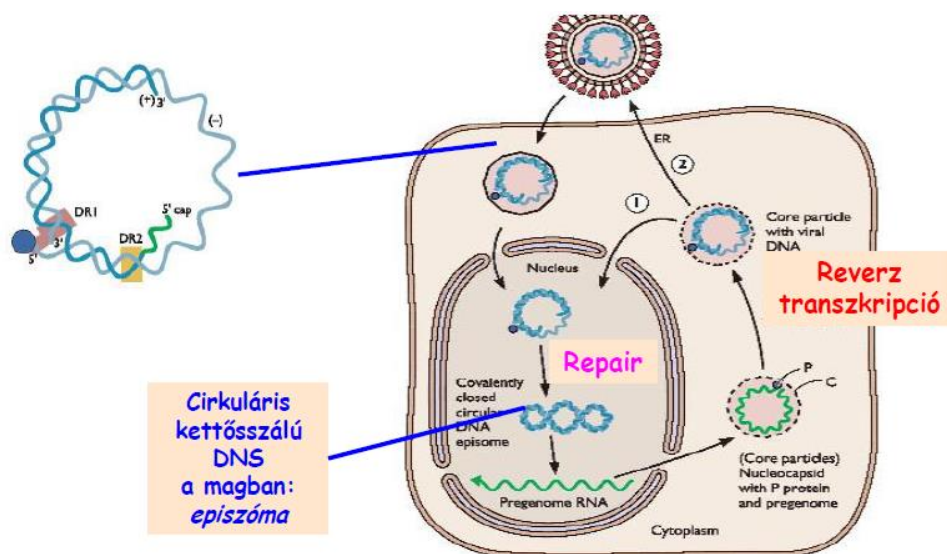
A Hepatitis B vírus örökítő anyaga cirkuláris molekula, nagy része kettősszalú DNS, de nick-et, gap-et és egy kis RNS-t is tartalmaz:

Ezt reverz transzkriptáz készíti RNS-ből a kapszidon belül a vírus érésekor.

A sejtbe jutott örökítőanyagát a repair enzimek cirkuláris DNS-sé alakítják: episzóma.

Nem retrovírus, de **esetenként integrálódhat a gazdasejt DNS-ébe.**

A p53 fehérje működést gátolja: transzformációt okozhat!



28. A retrovírusok replikációja, a reverz transzkriptáz.

A vírus genom replikációja A DNS vírusok általában közvetlenül DNS-sé, az RNS vírusok pedig közvetlenül RNS-sé másolják magukat. Van azonban kivétel a fenti szabály alól: **a retrovírusok RNS genomukat reverz transzkriptáz enzim segítségével DNS-sé alakítják. Az elkészült DNS-nek kötelező integrálódnia a gazdasejt DNS-ébe a vírus szaporodásához.**

A reverz-transzkriptáz működése:

1. A retrovírus örökítőanyaga mRNS jellegű, mindkét végén egy R szekvenciával. **A reverz transzkriptáz DNS-polimeráz: primert igényel! A primer egy részben kitékert tRNS 3' vége, mely a pbs szekvenciával komplementer.**
2. A reverz transzkriptáz elkezdi a negatív DNS lánc szintézisét, közben az RNS mintát is bontja maga mögött.
3. Az mRNS végén, és a szintetizálódó új DNS lánc végén lévő R szekvenciák egymással komplementerek, így összeilleszkednek
4. A reverz transzkriptáz folytatja a negatív DNS lánc szintézisét, miközben az RNS mintát is bontja maga mögött, de a ppt szekvencia ellenáll.
5. A ppt szekvencia a primer a pozitív DNS lánc szintéziséhez, amelyhez a pbs szekvencia végéig van minta. Elfogy a negatív lánc mintája is.
6. Minden RNS lebomlik, miután a reverz transzkriptáz átírta DNS-re. A pbs szekvenciák összeilleszkednek.
7. A reverz transzkriptáz befejezi a negatív DNS láncot a már elkészült pozitív DNS szakasz alapján, közben a pozitív láncot elválasztja a negatív lánc 5' végétől.
8. A reverz transzkriptáz befejezi a pozitív DNS láncot a negatív alapján. A reverz transzkripció eredményeként a DNS mindkét végén megtalálható az U3-R-U5 szekvencia = LTR.

A reverz transzkripció során az U5 és U3 az R szekvenciák segítségével megduplázódnak az elkészült DNS mindkét végén: LTR (Long Terminal Repeat). Az integrálódást az LTR szekvenciák irányítják, és részt vesznek a vírusgenom transzkripciójának szabályozásában is. A vírus gyártása a virion alkotórészeinek alacsony expressziója miatt általában nem pusztítja el a gazdasejtet. Az integrálódott retrovírus a gazdasejt osztódásakor öröklődik.

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

Egyes állati retrovírusok azonnal daganatot okoznak: **ezek onkogéneket is hordoznak**. A retrovírusok onkogénjei által kódolt fehérjék **külső növekedési jelet szimulálnak folyamatosan: gyorsabban osztódik a fertőzött gazdasejt**.

Protoonkogének (c-onc gének): Ép sejtekben található, a sejtosztódást szabályozott módon elősegítő fehérjéket kódoló gének

Onkogének: A sejt mutációt szenvedett protoonkogénjei (c-onc), amelyekről vagy túl sok, vagy állandóan aktív fehérje szintetizálódik, szabálytalan sejtosztódáshoz vezetve (proliferáció).

Tumor szupresszor gének : A sejt olyan génjei, amelyek ép sejtekben a proliferációt gátló, bizonyos körülmények között apoptózist, esetenként differenciálódást elősegítő fehérjét kódolnak. Funkciójuk kiesése, például mutáció következtében a sejt kontroll nélküli proliferációjához vezet. Ehhez általában mindkét allél mutációja szükséges.

A szabályozatlan proliferációhoz, a rosszindulatú daganat kialakulásához több tumor szupresszor gén kiesése (általában mindkét allélon) és több protoonkogén onkogénné mutálódása vezet.

A klasszikus, **Vogelstein-modell** szerint bizonyos mutációk követik egymást a tumor kialakulásában: APC inaktiváció, KRAS aktiváció, TGF β útvonal aktiválódása, p53 inaktiválódása.

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

Kromatográfiás eljárásoknak nevezzük azokat a szeparációs eljárásokat, melyek **során egy mozgó fázisban levő oldott keveréket egy álló fázison (hordozó) visznek át** és ennek során a keverék komponensei – legalábbis részben – elválaszthatók egymástól.

- **gélkromatográfia (eltérő molekulaméret alapján)**
Ezt a jelenséget először speciális dextrángéleken használták fel, ezért gélkromatográfiának, vagy gélszűrésnek is hívják, de ma már jóval korszerűbb folyadékkromatográfiás változatait használják.
- **adszorpciós kromatográfia**
ekkor a keverék komponensei eltérő mértékben kötődnek a hordozóhoz, a kötődő molekulákat különböző módszerekkel lehet leoldani a hordozóról, ami további szeparáció lehetőségét rejti magában
- **megoszlási kromatográfia (eltérő oldhatóság különböző oldószerekben)**
Ha egymással nem elegyedő poláros és apoláros oldószerek keverékét használjuk poláros és apoláros vegyületek elválasztására, ezek a megfelelő karakterű oldószerekben fognak jól oldódni, és egymástól ennek alapján elválaszthatók.
- **ioncserélő kromatográfia (töltéssel rendelkező molekuláknál)**
Töltéssel rendelkező molekulák esetében – megfelelő tulajdonságú hordozó (ioncserélő gyanta) felhasználásával – a megoszlási és adszorpciós különbségek mellett a töltések különbsége is szolgálhat elválasztás alapjául, ezt a módszert ioncserélő kromatográfiának hívják.
- **affinitáskromatográfia (biospecifikus adszorpció alapján)**
előzetes tisztítási lépéseket követően használják a legspecifikusabb kromatográfiás módszert, az affinitás-kromatográfiát. Ez ún. biospecifikus adszorpción alapul. Megfelelő hordozón kémiai módszerrel megkötnek egy olyan molekulát (ligand), amely teljesen specifikusan kötődik az általunk tisztítani kívánt vegyülethez (pl. fehérje antigénhez, hormonreceptorhoz). Ezen a kezelt hordozón átfolyatva a keverékünket, abból csak az az egyetlen molekula kötődik meg, amely specifikus kötődésre képes a hordozóra kötött ligandummal.

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, de ez fehérjék esetén is elérhető, ha a töltéseket egyenlővé tesszük (SDS-kezeléssel).

Makromolekulák szintézisének mérése radioaktív prekursorokkal

Sejtes vagy sejtmentes rendszerben is felhasználhatók a fehérjék és nukleinsavak radioaktívan jelzett prekursorai ezek szintézisének mérésére.

Radioaktív megjelölést használó módszerek:

- **Maxam-Gilbert módszer:**

Polinukleotid-kinázzal 3'-végén ^{32}P -vel jelzett DNS-lánc hasítása preferenciálisan hasító kémiai módszerekkel. Elektroforetikus szétválasztáskor a legkisebb nukleotidok vándorolnak a leggyorsabban, így a bázissorrend a foltok sorrendjéből leolvasható. Max. 150 tagú nukleotidokat lehet így szekvenálni.

- **Sanger módszer:**

DNS-polimeráz I-gyel egyszálú DNS szintézise primer jelenlétében; az 5'-véget radioaktívan jelölik, a terméket négy részre osztják. Mindegyikhez hozzáadják a négy dNTP-t és az egyiknek a 2'-3'-didezoxi változatát is, ennél a lánc megszakad. A didezoxi- nukleotid statisztikus valószínűséggel épül be az új láncba, amelyből különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek. Ezeket elektroforézissel szét lehet választani és a hosszuk szerint megállapítható, milyen pozíciókban van jelen az adott bázis.

DNS-szintézis kvantitatív mérése - jelzett ^3H vagy ^{14}C -timidint adunk a sejtekhez, 30-60 percig hagyjuk beépülni, majd a sejteket kicsapjuk (1 M perklórsavval), utána 0.5 M perklórsavval hidrolizáljuk és a centrifugálás utáni oldatból folyadék-szcintillációs módszerrel mérjük a radioaktivitást. DNS kvantitatív mérés: a dezoxiribóz fotometriásan meghatározható.

RNS-szintézis kvantitatív mérése: a fentiekhez hasonlóan, de ^3H - vagy ^{14}C -uridin beépülését kell mérni és a ribózt kell meghatározni

Fehérjeszintézis mérése: ^3H vagy ^{14}C -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.

Enzimek a diagnosztikában.

Az enzimológiát az orvosi gyakorlatban diagnosztikai célokra is használják. Ennek az az oka, hogy a különböző sejteket, szöveteket – eltérő anyagcseréjük miatt – bizonyos enzimek jellemzik, így egy szerv betegsége esetén az elpusztult sejtekből ezek az enzimek a vérbe kerülnek és a szokásos alacsony szérumszint és aktivitás sokszorosa is mérhető.

Mérési módszerek: a keletkező termék mérése spektrofotometriával, spektrofluorimetriával
radioaktivitás mérés: jelzett szubsztrátból jelzett termék mérése alapján

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

Western blot- az expresszált fehérje azonosítása

A fehérjekeverék komponenseit SDS-gélelektroforézissel szétválasztjuk, ez csak a méret alapján szeparál. Ezután transzferáljuk a szétválasztott komponenseket nitrocellulóz membránra. Ott egy blokkolást követően a keresett fehérjére specifikus antitestet adunk hozzá (primer antitest), majd ezt követően egy második, az első anti- testtel reagáló, enzimmel (peroxidáz, alkalikus foszfatáz) kapcsolt anti- testtel reagáltatjuk. Végül egy, az adott enzimmel reagáló jelzett (pl. fluoreszkáló) szubsztátot adunk hozzá és a jelet röntgenfilmen tesszük láthatóvá. Molekulatömeg-standard illetve pozitív kontroll segítségével azonosítjuk.

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Fehérjék, közvetve RNS expressziójának kvantitatív meghatározására alkalmas módszer. Elve: egy polisztirol lemez 96 lyukába egy adott fehérje ellen termelt („capture”) antitestet rögzítenek. Ehhez adják a mintát, amelyből az adott fehérje megkötődik a lyukakban. Ezután egy második, biotinnal konjugált antitestet kötnek rá, majd streptavidin-peroxidáz konjugátummal kezelik, amely kötődik a biotinhoz. Végül peroxidáz szubsztátot adunk a rendszerhez, ebből színes (zöld) termék keletkezik, amely savas közegben sárga színűvé válik és spektrofotometriásan mérhető.

AlphaLISA módszer

Alpha" = Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay

Nincs szükség radioaktivitásra, két gyöngy közötti energia átvitelt lehet detektálni lumineszcens vagy fluoreszcens vizsgálattal.

Donor gyöngy: fotoszenzitivizáló ftalocianint tartalmaz, amely a normál oxigénből gerjesztett, reaktív szinglet oxigént állít elő, ha 680 nm-en gerjesztik. Nem gyök, csak egy gerjesztett elektront tartalmaz; élettartama rövid (4 µsec félidő), ezalatt kb. 200 nm-re diffundál oldatokban.

Akceptor gyöngy: ha megfelelő közelségben van a donorhoz, a szinglet oxigén átadja az energiáját az akceptor gyöngy tioxin származékának, amely 615 nm (AlphaLISA) tartományban fényt sugároz ki. Ha nincs a közelben akceptor gyöngy, a szinglet oxigén visszaesik alapállapotba és nincs jel.

Az AlphaLISA sandwich assay (Perkin-Elmer) alapelve:

A donor gyöngyöket streptavidinnal vonják be, ezzel azok képessé válnak biotinilált antitestek megkötésére. A biotinilált antitest egy adott epitopra specifikus, amely a vizsgálandó molekulán található. Egy másik, ugyancsak a vizsgálandó molekulán levő epitopra specifikus másik antitestet az akceptor gyöngyre kötnek. A vizsgálandó molekula ezáltal szoros közelségbe (< 200 nm) 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.

Az aptamerek olyan 15-60 tagú egyszálú DNS, RNS vagy peptidmolekulák, amelyek specifikusan képesek egy fehérje- vagy DNS-szakaszhoz, sőt kismolekulájú ligandumokhoz is hozzákötődni. Specifitásuk vetekszik az antitestekével, de velük szemben számos előnyük van:

1. Szintézisük teljes mértékben in vitro történik, a kémiai szintézis viszonylag olcsó
2. Toxikus vagy nem-immunogén célmolekulához is hozzákötethetők
3. Alacsony az immunogenitásuk
4. Szobahőmérsékleten tárolhatók
5. Nagy affinitásúak (pM-nM tartományban hatásosak)
6. Nagyfokú a specifitásuk (pl. már egy plusz metilcsoportot is megkülönböztetnek egy kismolekulán), nagy felületen kapcsolódnak, hatékonyak
7. Stabilitásuk oldatban gyorsan felveszik és megtartják a konformációjukat
8. Mivel nukleinsavak, nem toxikusak

Az aptamerek specifitása felhasználható egy, az ELISA-hoz hasonló, nukleotid-alapú analitikai módszerhez is. **Ezt ELONA-nak – Enzyme Linked Oligonucleotide Assay – nevezik.** Annyiban különbözik az ELISA-tól, hogy a microplate edénykéibe a befogó antitest helyett aptamereket rögzítenek és ezekhez adják a vizsgálandó anyagokat. A mintákban levő ligandum specifikusan kötődik az aptamerhez és megváltoztatja annak konformációját. A konformációváltozást az aptamerhez kötött fluorogén molekula segítségével több módon is lehet – fluoriméterrel kvantitatíve is - detektálni. Az aptamerek nagy specifitása és érzékenysége miatt ezzel a módszerrel – megfelelő aptamer – ligand pár megtalálása esetén - az ELISÁ-nál érzékenyebb, olcsóbb kvantitatív mérés válik lehetségessé.

Detektálási lehetőségek ELONA-val:

1. A ligand kötődése megváltoztatja a konformációt és a fluoreszcenciát
2. A ligand/nukleotid kötődése megszünteti a FRET hatást, a fluoreszcencia nő
3. A ligand kötődése nyomán szétválik a kettős lánc, a FRET megszűnik, fluoreszcencia nő
4. A ligand által okozott konformáció-változás miatt az F2 nem tud energiát átadni F1-re, fluoreszcencia csökken

A spiegelmer technika

Az RNS-aptamerek stabilitása nem megfelelő a mindenütt jelenlevő RN-áz enzimek miatt. Ezért dolgozták ki a tükörképi viszonyokon alapuló spiegelmer technikát, ami az enzimek sztereospecifitásán alapul. Az RN-ázok nem ismerik fel az L-ribózt tartalmazó nukleotidokat. Először egy target-enantiomert hoznak létre D-aminosavakból és erre optimalizálják a D-ribózt tartalmazó oligonukleotidot. Ezt Selex-módszerrel feldúsítják, tisztítják, majd szekvenálják. A szekvenciának megfelelő L-ribózt tartalmazó aptamert szintetikusán állítják elő – „spiegelmer” – ez viszont az L-aminosavakból álló „igazi” célfehérjét ismeri fel. Az így előállított spiegelmerhez terápiás kismolekulák köthetők, amelyeket a vérplazma RN-áza nem képes lebontani.

33. Az áramlási citometria elve és felhasználása.

Sejtbiológiai módszer, de bizonyos molekuláris biológiai vizsgálatokra is alkalmas.

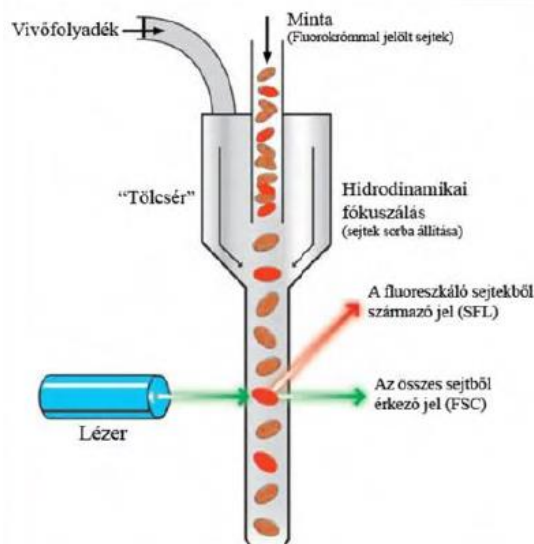
Gyors, objektív vizsgálat, automatizálható.

Alkalmas a sejt méret meghatározására; a sejtek eloszlásának meghatározására; funkcionális állapotának követésére; a sejtekben levő makromolekulák detektálására és mérésére; sejtek egymástól történő elválasztására

Detektálás: fény szórás, illetve fluoreszcencia mérése alapján

A lamináris áramlást biztosító, tölcser alakú kamrában kétféle folyadék áramlik párhuzamosan: az egyik a tölcser belső fala mellett, amely egy folyamatosan áramló, ugyancsak cső alakú folyadékköpenyt hoz létre a kamrán belül. Ez lesz a vivőfolyadék, amely a tölcser szűkületénél sorba kényszeríti a sejteket. Így a tölcser alsó, csőszerű részén ennek a vivőfolyadék-palástnak a közepén fog áramlani a másik, sejteket szállító folyadék-oszlopocska, amelynek éppen akkora az átmérője, hogy egyszerre csak egy sejt férjen el benne. A vivőfolyadék lamináris áramlása fenntartja az egyes sejtek közötti távolságot, ilyen módon akadályozva meg azok összetapadását.

A „kicsöpögő” sejtek a fluoreszcencia alapján elektromosan feltölthetők és a töltés alapján szeparálhatók, illetve a fluoreszcens jelek alapján analizálhatók. A fluoro-krom valamilyen sejtfelszíni antigénhez, vagy intracelluláris makromolekulához kötődő specifikus monoklonális antitest, vagy nukleinsav-festék.



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

A Maxam-Gilbert módszer

A kettős láncú DNS-t két különböző restrikciós endonukleázzal hasítják és a kihalított darabot két részre osztják. Az egyik mintában az egyik szálat, a másikban a másik szálat a 3'-végén egyegy radioaktív (^{32}P) nukleotiddal meghosszabbítják polinukleotid-kináz enzim segítségével. Mindkét mintát négy további részre (aliquotra) osztják és mindegyik aliquotban más-más bázisra specifikus kémiai hasítási módszert alkalmaznak (G, A+G, C és C+T mellett), majd a két láncot denaturációval elválasztják. A hasítás eredményeképpen különböző hosszúságú darabok hasadnak ki, ezek 3'-vége ismert és jelzett, az 5'-végeken pedig a specifikus hasításnak megfelelő bázis áll. Elektroforetikus szétválasztáskor a legkisebb nukleotidok vándorolnak a leggyorsabban, így a bázissorrend a foltok sorrendjéből leolvasható. Max. 150 tagú nukleotidokat lehet így szekvenálni.

Sanger módszer

DNS-polimeráz I-gyel egyszálú DNS szintézise primer jelenlétében; az 5'-véget radioaktívan jelölik, a terméket négy részre osztják. Mindegyikhez hozzáadják a négy dNTP-t és az egyiknek a 2'-3'-didezoxi változatát is, ennél a lánc megszakad. A didezoxi- nukleotid statisztikus valószínűséggel épül be az új láncba, amelyből különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek. Ezeket elektroforézissel szét lehet választani és a hosszuk szerint megállapítható, milyen pozíciókban van jelen az adott bázis. Az utóbbi időben a ^{32}P -jelzés helyett 4 különböző fluoreszcens festék jelzi a didezoxi-nukleotidokat, így nem kell négy külön vizsgálatot végezni, ráadásul a radioaktivitás használata is elkerülhető.

Ion félvezetős szekvenálás(IonTorrent)

Elvi alapja: az új nukleotidnak a növekvő lánchoz kapcsolódásakor pirofoszfát- és hidrogén-ionok (protonok) keletkeznek. Az előbbi az ún. piroszekvenálást teszi lehetővé, utóbbi pedig az ion-félvezetős módszert. A keletkezett protonok csökkentik a pH-t, ami szelektív szenzorral detektálható.

A templáthoz jelzetlen dNTP-eket adva csak akkor szabadul fel proton, ha az új nukleotid komplementer a templát soron következő nukleotidjával. Ha nincs reakció – nincs proton felszabadulás. Ha van reakció, a pH-csökkenés detektálható. Egymást követő azonos nukleotidok esetén a pH-csökkenés többszörös, nagyobb jelet ad.

Piroszekvenálás

Az egyes dezinukleozid-trifoszfátok hozzáadása során a DNS-polimeráz a templátnak megfelelő dezinukleotidot építi be a láncba. A beépítéssel egyidőben pirofoszfátionok szabadulnak fel, amelyeket adenzin-5-foszfoszulfáttal (APS) reagáltatnak ATPszulfuriláz enzim jelenlétében. Ekkor ATP és szulfát-ionok szabadulnak fel, a keletkező ATP pedig D-

luciferinnel reagál, és luciferáz enzimmel végtermékként oxiluciferint, AMP-t és széndioxidot képez, miközben fotonokat emittál. Ezeket fotomultiplikátorral detektálni lehet és a fényfelvillanások jelzik, ha az adott nukleozid-trifoszfát beépült az új láncba, amiből a komplementaritás alapján a szekvenált templát szekvenciája meghatározható.

35. Restrikciós endonukleázok jellemzői. DNS fragmentek elektroforézise. Restrikciós térképek készítése.

Restrikciós enzim: olyan endonukleáz (belülről hasítja a nukleinsav-láncot), amely specifikus (legtöbbször palindrom, mindkét szálon 3' 5' irányban olvasva ugyanaz) szekvenciáknál (4-10 tag) hasítja a DNS-t.

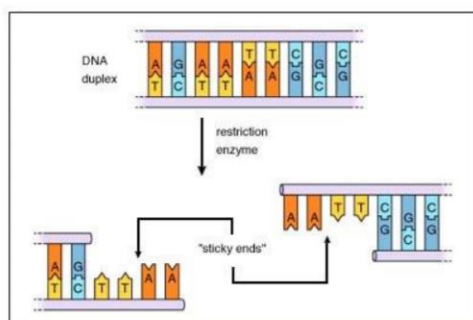
Az endonukleáz aktivitás után kétféle hasítási mintázat alakulhat ki, ragadós és tompa végek. Ragadós végek esetén egy komplementer véggel „összeragad” és a DNS-ligáz befoltozza a hiányt. Ezt nevezzük rekombináns DNS-molekulának.

– Ragadós vég

GAATTC
CTTAAG

– Tompa vég

CCCGGG
GGGCCC



Restrikciós térkép - ismert specifitású restrikciós enzimekkel feldarabolható a DNS, különböző átfedő szekvenciák lehetővé teszik rövidebb szakaszok alapján a DNS szekvenálását. A 150-200 nukleotidos szekvenciák sorrendje megállapítható és az átfedések segítségével a teljes nukleotid-sorrend összeállítható.

A restrikciós emésztéssel előállított DNS fragmentumokat gélelektroforézissel lehet szeparálni és a méretüket is meghatározni. A kétszálú lineáris DNS fragmentumok vándorlási sebessége fordítottan arányos a bázispárok (pontosabban a nukleotidok) számának logaritmusával.

36.Hibridizációs módszerek – Southern blot, Northern blot, in situ hibridizáció

Hibridizáció: kettős DNS-szál létrehozása a bázis-komplementaritás alapján, mesterségesen előállított DNS-próbák segítségével.

Southern-blot: az egyszálú DNS-szakaszokat elektroforézissel méretük alapján szétválasztjuk. Ezután a gélről egy ahhoz hozzátapadó nitro- cellulóz membránra elektromos térben átmossuk a szeparálódott DNS- mintákat (ez a blottolás, vagy transzferálás). A keresett szakasznak megfelelő radioaktívan vagy fluoreszcensen jelzett DNS-próbákat hozzáadjuk, ahol megfelelően hosszú komplementer szakasz található, ott létrejön a hibridizáció. A kötődött radioaktív nukleotid röntgenfilmen nyomot hagy, így a kérdéses DNS-szakasz helye, mérete autoradiográfiával azonosítható.

Northern-blot: a fenti módszer alkalmazásával egyszálú RNS-szakaszok is azonosíthatók, a próba itt is jelzett DNS-szál. Problémát okoz az RNS bomlékonysága (RN-áz szennyezés mindenütt van) - sterilitás szükséges.

Az in situ hibridizáció - immunhisztokémiai vizsgálat

Számos esetben izolálás nélkül, a sejtben kell azonosítani egy fehérje vagy nukleinsav jelenlétét. Ilyenkor jelzett komplementer DNS-t vagy antitestet használnak (pl. kémiai jelzett DNS, FITC-antitest) Az előzetesen fixált sejt-preparátumhoz hozzáadott próba kötődik és a helye és a kötődés mértéke mikroszkóppal (festődés vagy fluoreszcencia alapján) meghatározható.

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

Vektorok – DNS-darabok átvitelére alkalmas virális vagy bakteriális eredetű DNS-szakaszok.

Prokariota gazdasejtbe: plazmidok és bakteriofágok

Eukariota gazdasejtbe: vírusok

Plazmid, mint vektor

A plazmidok, mint extrakromoszomális cirkuláris DNS-ek, a baktériumok védekezéséhez szükséges információkat, pl. antibiotikum-rezisztencia géneket hordoznak. Ha egy plazmidot ugyanolyan restrikciós endonukleázzal hasítunk, mint az átvenni kívánt DNS szakaszt, akkor ragados végek keletkezése esetén az átvenni kívánt DNS-darab beilleszkedik a plazmidba, DNSligázal integrálható és a plazmidban levő antibiotikum-rezisztencia gén segítségével antibiotikumot tartalmazó táptalajon kisselektálhatók a túlélő baktériumok (klónok), amelyek a plazmidban az átvitt DNS-t is tartalmazzák.

A fág, mint vektor

Maga a λ -fág egy kettős szálú DNS-ből és az azt becsomagoló fehérjékből áll. A fág DNS-ének restrikciós enzimekkel történő hasítását követően a λ -karok közé az általunk beépíteni kívánt DNS ugyanazon restrikciós enzimekkel való hasítást követően beépíthető, az inzertet tartalmazó fág-DNS pedig in vitro a fágfehérjékkel „becsomagolható”. A fággal ezután megfertőzik az E. coli tenyészetet és ahol tarfoltok keletkeznek, ott a fág elbontotta a baktériumokat. Ilyen módon fágokból különböző DNS-szakaszok inzertálásával a teljes genom könyvtára létrehozható.

Cosmidok, mint vektorok

A **cosmidok (mesterséges plazmid)** a λ -fág cos szekvenciájának egy plazmidba építésével jönnek létre, ezekbe 40 kb hosszúságú szekvencia illeszthető be és a cos szekvencia jelenléte miatt λ -fágba csomagolható. Baktériumba juttatva azonban plazmidként szaporodik tovább.

YAC és BAC, mint vektor

Nagyságrendileg hosszabb, 200–2000 kb hosszúságú DNS-szakaszok inzertálhatók a mesterséges bakteriális illetve élesztő kromoszómákba (Bacterial Artificial Chromosome, BAC és Yeast Artificial Chromosome, YAC).

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.

A génkönyvtár olyan génkollekció, amelyben különböző gének vektorokhoz kapcsolva fordulnak elő. Ez jelentheti egy faj teljes genomját, de jelentheti azoknak a kódoló szakaszoknak megfelelő DNS-vektorokat is, amelyeket a kódoló fehérjéknek megfelelő mRNS-szakaszokról másolnak át. Ez utóbbi könyvtár, amely nem tartalmaz intronokat, a komplementer **cDNS könyvtár (mRNS-sel komplementer)**, a másolást **reverz transzkriptáz** végzi, **melynek primere oligoT**. A teljes genomot tartalmazó génkönyvtárat leggyakrabban vérsejtekből készítik, mivel a DNS-állomány minden sejtben azonos. A cDNS könyvtárak azonban szövetenként eltérők lehetnek, mert a különböző szövetekben nem fejeződik ki a teljes genom.

???

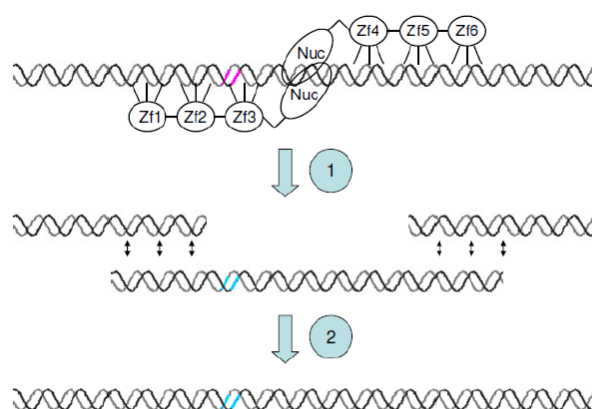
39. Helyspecifikus nukleázok (cinkujj- és meganukleázok)

Restriktációs enzimek hátránya – ott bontanak, ahol ők akarnak Célzott DNS-bevitelre ez általában nem alkalmas.

Cinkujj-nukleázok

Előállításuk során egy DNS-kötő cinkujj-domént kapcsolnak egy DNS-hasító doménhez. A cinkujj-domént úgy hozzák létre, hogy abban a cél-DNS szekvencia specifikus részeihez kötődő fehérjeszekvencia legyen, így a cinkujj-nukleáz igen szűk szubsztrátspecifitással rendelkezik, a DNS-nek egy egyedi szakaszához kötődik. Ez tehát egy előzetesen tervezett domén. Ennek révén a majdani ragadós végek helye igen pontosan meghatározható. A nukleáz nem-specifikus DNS-hasító doménje a Fok I 2-es típusú restriktációs endonukleázból származik. Ezt a domént dimer formába kell hozni ahhoz, hogy aktív legyen, így egy pár ZFN szükséges ahhoz, hogy megtalálja a nem-palindrom hasítási helyet. A hasító domént általában a cinkujj-domén C-terminálisára helyezik.

A cinkujj-nukleázok által elérhető irányított DNS-beépítés



1. lépés: a cink-ujj nukleáz dimer a DNS molekulán lilával jelölt hibahely közelében elhasítja a DNS láncot.
2. lépés: a sejt javító mechanizmusa az eredeti DNS-sel homológ végeket tartalmazó templát jelenlétében a (világoskékkel jelölt) helyes szekvenciát építi be az eredeti DNS-be.

Cinkujj-nukleázok gyakorlati alkalmazási lehetőségei

1. Allél-gyengítés – heterozigóta domináns hatások elnyomása – betegségek
2. Triplet ismétlődések javítása – betegségek
3. Allél-szerkesztés – szekvenciák átírása homológ rekombinációval
4. Génterápiás felhasználások – saját őssejtek átszerkesztése

A gyakorlati felhasználás problémái

Hibás hasítás – a cinkujjak számának növelésével csökkenthető

Immunogenitás – a rövid expressziós idő miatt nem nagy probléma

Meganukleázok

Az ugyancsak a restrikciós endonukleázok közé tartozó meganukleázok már a cinkujj-nukleázok előtt ismertek voltak, természetes változataik azonban csak korlátozottan voltak használhatók. A hosszú felismerő szakasz miatt ezt tartják a legpontosabb hasítási módszernek. A módosított ún. hibrid meganukleázok használatára különböző szabadalmaztatott génmódosító módszerek épülnek.

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

A CRISPR (kiejtése „kriszper”) a Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats rövidítése. Ezek a prokariota DNS rövid ismétlődő szakaszai, amelyeket egy rövid kitöltő ún. „spacer DNS” követ, amely egy korábbi vírus vagy plazmid maradéka. A rendszer biológiai funkciója a prokariota védelme idegen genetikai elemek (pl. plazmidok, fágok) ellen. A CRISPR kitöltő elemei felismerik és kivágják az idegen elemeket. A CRISPR-hez asszociálódott géneket Cas (CRISPR-associated) géneknek hívják. Ezek a gének nukleáz és helikáz fehérjéket kódolnak. A Cas fehérjék a CRISPR-ek közötti helykitöltők alapján felismerik a baktériumsejtbe behatoló idegen nukleinsavakat és darabokra vágják őket.

Génszerkesztés a CRISPR/Cas rendszerrel

A CRISPR/Cas9 génszerkesztés egy II. típusú CRISPR-rendszert használ, melynek része a Cas9, a CRISPR-RNS (crRNS), a transzaktiváló crRNS (tracrRNS) és egy opcionális DNS-repair templát, amely vagy nem-homológ végkapcsolást (NHEJ: Nem igényel templátot, összefűzi a túlnyúló kompatibilis végeket), vagy homológ irányítású repairt (HDR) használ

Komponens	Funkció
crRNS	a Cas9 által használt RNS-t tartalmazza, amely a cél-DNS megfelelő helyére irányít egy olyan régióval, amely a tracrRNS-hez kötődik (hajtű formában), a Cas9-cel aktív komplexet képez
tracrRNS	a crRNS-hez kötődik és aktív komplexet képez a Cas9-cel
sgRNS	single guide RNS, egy tracrRNS-ből és legalább egy crRNS-ből áll
Cas 9	egy DNS módosításra képes fehérje, amely crRNS-t használ irányítónak; Különböző változatai vannak, amelyek egy vagy mindkét láncon képesek hasítani, ami a Cas9 DNS-felismerő funkciójához kötődik és független a két DNS-hasító doméntól
Repair templát	Egy olyan DNS-szakasz, ami a sejt repair folyamatait irányítja és lehetővé teszi egy specifikus DNS-szekvencia beépítését

A CRISPR/Cas9 célsejtbe juttatásához (transzfekció) gyakran plazmidot használnak. A crRNS-t minden alkalmazáshoz külön meg kell tervezni, mert ezt a szekvenciát használja a Cas9 a felismeréshez és a sejt DNS-éhez kötődéshez. A crRNS csak a kívánt helyre kötődhet. A repair templátot ugyancsak meg kell tervezni, mert ennek a hasítás mindkét oldalával átfedést kell biztosítani, és kódolnia kell a beépítendő szekvenciát. Egy sgRNS-be több crRNS-t és egy tracrRNS-t lehet becsomagolni.

Ha a konstrukciót beépítették egy plazmidba és transzfektálták a sejtekbe, akkor a Cas9 fehérje a crRNS segítségével megtalálja a megcélzott szekvenciát és – a Cas9 variánstól függően – egy egyszálú, vagy kétszálú hasítást idéz elő. A megfelelő egyszálú hasítások homológia-irányított repairt indítanak el, amely kevésbé téveszt, mint a nem homológ végkapcsolás, amely a kettős lánchasítást szokta követni. Egy DNS-repair templáttal lehetővé válik egy specifikus DNS szekvencia beépítése a genomba egy pontosan megtervezett helyen.

Gene-drive

Egy faj egyedeibe olyan gént visznek át, ami a nőstényeket szaporodásra képtelenné teszi. Több generáció után a terméketlen egyedek száma nő, és végül a populációban elhanyagolhatóvá válik a termékeny állatok száma - a populáció kihal.

Zárt populációban maláriát terjesztő szúnyogokkal a kísérlet működött. A beépített endonukleáz gén a heterozigóta utódban elvágja a másik kromoszóma azonos helyén a DNS t és

1. vagy HDR-rel átmásolja saját magát
2. NHEJ-vel kiesik a DNS-szakasz, mutáns vágóhely keletkezik
3. Nem történik vágás, heterozigóta marad ivarsejteken esetén terméketlen homozigóták keletkeznek

Problémák:

A.) működik-e nyitott (vad) populációban?

B.) etikai kérdés: Van-e jogunk egy faj önkényes kiirtására; milyen ökológiai következményei lesznek?

41. Prokarióta expressziós vektorok, fúziós fehérjék, biológiailag aktív anyagok (inzulin, hormonok, véralvadási faktorok) előállítása géntechnológiával

Rekombináció során új DNS-molekula képződése történik különböző eredetű DNS-darabokból. A két alkotórészt vektornak és inzertnek nevezzük. A rekombináns DNS-ek gyakori alkalmazási területe az expressziós rendszerek.

Expressziós vektor: Olyan vektorok, amelyeket a célorganizmusba juttatva ott a számunkra előnyös fehérje termelhető.

A humán gén előkészítése a prokarióta expresszióhoz

- csak exonok lehetnek benne (cDNS)
- bakteriális promoter szükséges
- bakteriális riboszóma kötőhely szükséges

Az idegen fehérje expressziójának ki/be kapcsolása

A lac-operon jól alkalmazható – IPTG állandó jelleggel indukál (IPTG = laktóz-analóg, de a β -galaktozidáz nem tudja lebontani)

Tiszta emberi inzulin rekombináns géntechnológiával állítható elő. Ehhez meg kellett ismerni az inzulin szerkezetét, beleértve aminosav-sorrendjét (Sanger 1958), majd a hatvanas években megfejtett genetikai kód alapján vissza kellett következtetni a nukleinsavszekvenciára. Az inzulin két láncból áll, ezért mindkét láncot külön kell megszintetizálni, ezek utólag spontán összekapcsolódnak a diszulfidhidak segítségével. A viszonylag rövid bázisszekvenciát mesterségesen meg lehet szintetizálni és az ismert inzertálási módszerekkel úgy illesztik bele a vektorba, hogy a lac-operon β -galaktozidáz génje után épüljön be. Ez azért célszerű, mert a lac-operon jól ismert szabályozási modellje révén a mesterséges inzulin-gén szabályozhatóan fog expresszálni. A vektor egy ampicillin-rezisztencia gént is tartalmaz, ami lehetővé teszi az expresszálnó klónok kisselektálását. Az E. Coli lac-operonja a bakteriális kromoszóma által termelt represszor-fehérjéje miatt nem kezdi expresszálni a β -galaktozidázt. Ha azonban izopropil-tiogalaktozidot (IPTG), az operon induktorát adjuk a közegbe, ez megköti a represszort és beindítja az expressziót (részletesen: Ádám V. Orvosi Biokémia) és a β -galaktozidázzal együtt az inzulin is szintetizálódni fog. Az így keletkező ún. **fúziós fehérje (bakteriális fehérje + inzulin)** a baktériumok lízise után izolálható, tisztítható.

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

A polimeráz láncreakció elve

Célja kevés DNS-ből analizálható mennyiség előállítás. Elvileg akár egyetlen DNSmolekulából is sok kópia állítható elő. DNS-forrásként általában vérminta, nyálkahártya-minta, vagy hajhagyma szolgál. Az amplifikációt követően a keletkezett reakciótermékeket elektroforetikus szétválasztjuk, optikai módszerrel detektáljuk, majd a kapott eredményt kiértékeljük, következtetünk a genotípusra.

A polimeráz láncreakció során két primerrel (egyszálú oligonukleotidok, oligók) kijelöljük a sokszorozandó szakasz két végét.

Az ún. termociklus **első lépésében** a hőmérsékletet 95–96 °C-ra emelik, ekkor a kettős láncú templát láncai szétválnak. **A következő lépésben** 40–70 °C-ra csökkentik a hőmérsékletet, ekkor **a primerek a DNS-szálakhoz kötődnek („anneálás”)**. Végül **a harmadik lépésben általában 72 °C-on történik a polimerizáció (extenzió)**, melynek során a Taq polimeráz létrehozza az új DNS-szálakat. Egy teljes ciklus kevesebb, mint 10 percet vesz igénybe, így a folyamat rendkívül gyors.

Restrikciós fragmentum hosszúság-polimorfizmus (RFLP)

Sarlósejtes vérszegénységet egy Glu–Val csere okozza a hemoglobin β -láncában. Ennek okaegy timin-adenin (T-A) csere a génben. Kimutatása úgy történik, hogy a vizsgálandó egyénekből vett vérmintából izolált DNS-t PCR-rel amplifikálják, majd a DNS-szakaszokat egy olyan restrikciós enzimmel kezelik, amely csak a normális allélnél képes bontani, a mutánsnál nem. Ezért az egészséges egyénekből származó mintákban két rövid DNS-fragmentumot találunk, a betegekben egy hosszút, a heterozigótákban (pl. a beteg egyén szüleiben) pedig három eltérő méretű DNS mutatható ki: a két rövid és a hosszú. A kimutatáshoz etidium-bromidos kezeléssel kombinált agaróz gél-elektroforézis használható.

Allél-specifikus amplifikáció (ASA).

Ez a módszer azon alapul, hogy ha a PCR-amplifikációhoz olyan primert választunk, amely 3' végén a mutáció helyét tartalmazza, akkor normál primerrel csak a „vad” típusú, mutáns primerrel pedig csak a mutáns DNS-szálról készül kópia.

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

Orvosi-diagnosztikai alkalmazás a már említett RFLP, mely során mutációk határozhatók meg. Monogénis betegségek pedig ASA módszerrel mutathatók ki. (Fenolketonúria, cisztás fibrózis)

Markerek szerepe a betegségek diagnózisában

Markerek: polimorf szekvenciák
 SNP (egy nukleotidos polimorfizmus)
 VNTR (változó számú ismétlések)

Nem maga a betegséget okozó polimorfizmus, hanem egy olyan, amelyik bizonyítottan asszociált a betegséggel.

Mivel a polimeráz láncreakció személyazonosításra is alkalmas, főleg az igazságügyi gyakorlatban használják fel. Ezek az azonosítások is a rövid ismétlődő szekvenciák vizsgálatán alapulnak, mert bár ezek mintázata mindenkinél egyedi, de másokkal összevetve rokonsági fok megállapítására is alkalmasak. Maximum 300 bázispár hosszúságúak (short interspersed nuclear elements, SINE), nagyon ritkán kapcsolódnak betegségekhez, általában nem kódoló régiókban helyezkednek el. Fő alkalmazási területük a kriminalisztika, „DNS-ujjlenyomat”-nak is hívják és a bűnelkövetők azonosítására használják, hiszen gyakorta egy hajszál vagy vérnyom is elegendő a mintavételhez.

A rokonsági fok vizsgálata azon alapul, hogy milyen mértékű átfedések találhatók két személy DNS-ujjlenyomatában. Az igazságügyi orvostan főleg apasági keresetekben használja bizonyítékként, mert sokkal egyszerűbb és megbízhatóbb, mint a vércsoport-vizsgálatok.

Az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a PCR élelmiszerbiztonsági alkalmazása is. Ezzel a módszerrel lehetett bizonyítani 2013-ban a hírhedtté vált lóhússal készült lasagnehamisítást, vagy ugyanebben az időszakban az Egyesült Államokban számos étteremben és szupermarketben hamisított halak árusítását. Bár ezekben az esetekben „csak” a fogyasztók durva becsapásáról volt szó (drágábban árusítottak olcsóbb termékeket), az ilyen hamisítások akár súlyos mérgezésekhez is vezethetnek. A higiéniai előírások mellőzése által okozott fertőzések is kimutathatók a PCR-módszerrel: a patogén baktériumok idegen DNS-ének megjelenése bizonyítja az élelmiszerek bakteriális szennyezését.

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

A real time PCR esetén nincs szükség külön elektroforetikus elválasztásra, mert a termékek fluoreszkálóvá tehetők. Ennek két fő módja van: vagy a DNS-be interkalálódó festékeket (pl. SYBR Green) vagy fluoreszcensen jelölt hibridizációs próbát (pl. Taqman próba) alkalmaznak. Fő előnyei: a gyorsaság (1–1,5 óra), a sok analizálható minta, az érzékenység (3 pg DNS már detektálható), a széles tartomány (10-1000 kópia), a magas reprodukálhatóság, a mennyiségi analízis lehetősége, a szoftver-vezérlés és a kis szennyeződési kockázat. Hátránya, hogy igen drága infrastruktúrát és magas technikai képzettséget igényel, továbbá a jelenlegi szinten csak két szekvencia egyidejű vizsgálata lehetséges. A kötődő festék jelet bocsát ki, ez arányos a képződő termék mennyiségével, a DNS-szintézis a PCR során így „valós időben” („real-time”) követhető, ami kvantitatív meghatározásra pl. génexpresszió mérésre is alkalmas. Az alapelv, hogy a PCR-termék képződésével arányos intenzitású fluoreszcencia keletkezik, amit a gép folyamatosan, ciklusonként detektál. Az **abszolút kvantifikálás** esetén ismert DNS-ből hígítási sort készítenek, a kalibrációs görbe küszöbértékeiből leolvasható a minta DNS-koncentrációja. **A relatív kvantifikálás** gyakoribb, ilyenkor kezeletlen és kezelt szövetek mRNS-tartalmát mérik a róluk készült cDNS mennyisége alapján. Egy konstitutív gén és a vizsgált gén expressziójának viszonya alapján meghatározható, változott-e az adott gén expressziója. A fő alkalmazási területek: génexpresszió vizsgálata, genomban többször előforduló gének számlálása, SNP-k genotipizálása, új polimorfizmusok kimutatása (Light Cycler).

A TaqMan® próbával történő detektálás a Taq DNS-polimeráz 5'–3' exonukleáz aktivitásán és a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) jelenségén alapszik. A FRET azért alakul ki, mert a riporter festék (R) emissziós spektruma átfed a quencher (Q) abszorpciós spektrumával, és térben közel helyezkednek el egymáshoz. A detektálás során a fényforrással gerjesztett fluoreszcens riporter festék gerjesztődik, így energiát ad át az akceptor quencher molekula felé. Intakt próba esetén az így keletkező többlet energiát a közeli quencher elnyeli, így a készülék nem detektál fluoreszcens jelet. A polimeráz láncreakció során viszont az 5' exonukleáz aktivitású Taq DNS-polimeráz lehasítja maga előtt a minta-DNS-hez bekötődött, fluoreszcens festékkel jelölt próbát. A próba elhasításával a riporter és a quencher térbeli közelség megszűnik, így a kioltás már nem érvényesül, ezért a riporter által kibocsátott jel (λ_2) intenzitása megnő, amit a berendezés detektál.

Rekombináz polimeráz amplifikáció (RPA)

Az RPA a polimeráz láncreakció egyszerű, izoterm alternatívája. Egy reverz transzkriptáz enzim hozzáadása révén akár RNS akár DNS szakaszok is felismerhetők, így nincs szükség cDNS előzetes elkészítésére az amplifikáció előtt. Izoterm jellege miatt, a PCR-től eltérően jóval egyszerűbb műszeres háttérrel igényel, nincs szükség a hőmérséklet programozott változtatására. Az optimális hőmérsékleti tartomány 37-42°C között van, de kisebb sebességgel szobahőmérsékleten is működik. A folyamathoz három alapvető enzimre van szükség. A rekombináz képes arra, hogy primereket kapcsoljon egy kettős szálú DNS molekulához. Az egyszálú DNS-kötő fehérje (single-stranded DNA-binding protein, SSB) szerepe, hogy elválasztva tartja a két DNS-szálat, ezzel megakadályozza a primerek leválását. A harmadik enzim, a láncszétválasztó polimeráz kezdi meg az új DNS-szálak szintézisét a primerek kapcsolódási helyénél. Két megfelelő primer használatával a PCR-hoz hasonlóan exponenciális DNS-amplifikáció indul meg.

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

Az eljárás a már jól bevált hibridizációs technikán alapszik. Az újdonságot az jelenti, hogy egyszerre több, egymástól különböző (akár százezer!) próbaként használt oligonukleotidot hibridizáltathatunk a mintával. A vizsgálat időtartama mindössze néhány perc. Mivel a próba-oligonukleotidokat mi tervezzük meg, lehetőségünk van elméletileg minden ismert és ismeretlen mutációt kimutatni a segítségével, ezért egyesek már a diagnosztika forradalmáról beszélnek. A DNS-chipek viszonylag kicsi (0,8–1,5 cm széles négyzet) szilárd hordozóra (szilíciumlapka, speciális műanyag) felvitt próba oligonukleotidokból állnak. A hordozót kisebb négyzetekre bontják, gyakorlatilag ezeknek a kisebb négyzeteknek a száma határozza meg, hogy hányféle próbát vihetünk fel egy-egy chipre.

Technika: fotolitográfia -a chip felszínén nukleotidokkal reagáló csoportok vannak, ezeket védőcsoportokkal védik. Gyártáskor megvilágítás hatására lehasad a védőcsoport és a nukleotid 3'-vége fog reagálni a lapkával. Az 5'-vég is védve van, ez is csak megvilágítás hatására fog tovább reagálni. A négy nukleotidot külön-külön viszik fel, 1-1 „emelet” tehát 4 lépésben készül el. Ehhez maszkok is kellenek, amelyeket akkor távolítanak el, ha a kérdéses nukleotidot adják hozzá a rendszerhez. Így 4 maszkkal elkészül az első emelet, majd újabb maszkokkal emeletenként építik fel a chipet. Minimum 8 tagú, de a gyakorlatban 18-30 tagú oligonukleotidokat építenek rá a chipre. A chiptérképet számítógéppel tervezik meg, elvileg bármilyen mutációt lehet keresni egy génszakaszban.

Vizsgálat: először PCR-ral amplifikálják a DNS-vagy RNS-mintát, a DNS-t közben fluoreszkáló vegyülettel megjelölik. Denaturáció után hagyják reagálni, ha csak 1-2 helyen is hibás a bázispárosodás, nincs hibridizáció. A felesleges DNS lemosható, a fluoreszcencia vizsgálható, sötét és fényes helyek váltakoznak. Egyéb jelölés: biotin, ehhez fluoreszcensen jelölt streptavidint kell adni (mint ELISA-nál). A minta nukleotidsorrendjét a számítógépes térkép alapján kapjuk meg. Ha a szkanner a jel intenzitását is méri, akkor kvantitatív különbségek is nyerhetők -pl. homozigóta (erősebb jel), heterozigóta (gyengébb jel).

Két-szín analízis-mutáns és normál DNS összehasonlítására: a PCR-amplifikációnál a vad és mutáns mintát két különböző színben fluoreszkáló vegyülettel kezelik (zöld/piros). Két chipen végzik el a vizsgálatot, az eredményt a számítógép egymásra vetíti. Ahol azonos a nukleotid, ott sárgakeverékszín ad, a többinél marad az eredeti szín. Így az eltérések könnyen azonosíthatók.

Eddigi felhasználások:

- BRCA-génekkimutatása (emlőrák, tumorok)
- fertőző mikroorganizmusok kimutatása (gyors eredmény)
- AIDS -HIV-vírusok közötti differenciálás (terápia-tervezés)
- p53 gén mutációi (daganatos betegségek, a p53 szupresszorgén)
- CF-gén, globinthalassemiagén stb.

47. A mutagenézis főbb lehetőségei, kémiai mutagenézis, random és irányított mutagenézis

A mutagenézis olyan mutációk létrehozását jelenti, amelyek nem maguktól, véletlenszerűen alakulnak ki, hanem a kutató vagy más szakember szándékosan, ha lehetséges, ellenőrzött módon és helyen hozza létre őket.

Mutagenézist a kódoló és a nem kódoló, szabályozó régiókban is létre lehet hozni, természetesen ennek eltérő következményei vannak. A mutációk érinthetnek egy nukleotidot (**szubsztitúciók**), egy hosszabb szakaszt (**kereteltolódási mutációk: deléció, inzerció**). Más szempontból osztályozva **lehetnek helyspecifikusak** (site-directed mutagenézis), oligonukleotid-irányított mutagenézis, vagy **random mutációk**.

Random mutagenézis formái

1. Misinkorporációs mutagenézis

Ilyenkor a 4 nukleotid közül az egyikből nagyon keveset teszünk a reakcióelegybe, ezért az „éhező” DNS polimeráz a másik három nukleotidból fog beépíteni a hiányzó helyére. Ez a mutáció csak akkor marad meg, ha a DNS polimeráz rossz vagy hiányos hibajavító képességű (pl. Klenow-fragment vagy Taq polimeráz).

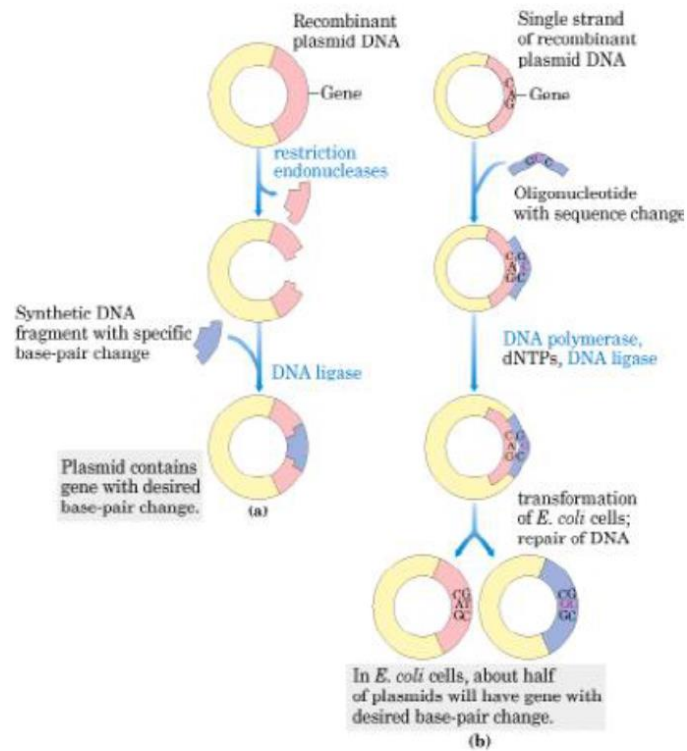
2. Kémiai mutagenézis

Kémiai mutagének segítségével az NH₂-csoportot tartalmazó három bázis (adenin, guanin, citozin) dezaminálható és ilyenkor az aminocsoport helyén hidroxilcsoport jelenik meg, ami a keto-enol tautomer egyensúly következtében rögtön ketocsoporttá izomerizálódik. A ketocsoport a hidrogénkötésben „akceptor” jellegű, eltérően a „donor” aminocsoporttól, ezért ezeken a helyeken a replikációt követően az eredetitől eltérő bázispárosodás jelenik meg. Hasonló dezamináló hatása van a hidroxilaminnak, biszulfid-ionnak, a hidrazin pedig a pirimidin gyűrűket bontja le, a keletkező üres hellyel szemben bármilyen nukleotid beépülhet a replikáció során.

- a random mutagenézis legjobb hatásfokú fajtája
- általában max. 200 bp mutagenézisére használják

3. Kazetta-mutagenézis

Szintetikus oligonukleotidokkal tetszőleges mutációkat hozhatunk létre a klónozott génben, és az általa kódolt fehérjében. A baloldali séma szerint a mutáltatni kívánt szakaszt restrikciós endonukleázzal kivágjuk és egy új, mutáns szekvenciát tartalmazó kis kétszálú szintetikus oligonukleotiddal helyettesítjük. Ez a „kazetta” a jobboldali séma szerint M13 fágból, egyszálú formában izolált génhez mutációs oligonukleotidot hibridizálunk, és in vitro DNS szintézissel mutáns második szálát hozunk létre. Ezzel a „diploid” DNS-sel transzformálunk sejteket. Az utód plazmidok egy része a mutáns szekvenciát fogja hordozni. Ezeket szekvenálással azonosíthatjuk.



Helyspecifikus (site-directed mutagenesis)

1. Oligonukleotid tervezése és szintézise (kémiai úton)
2. Oligonukleotid hibridizációja az egyszálú DNS plazmidhoz
3. A komplementer DNS lánc szintézise az oligonukleotid primer és DNS polimeráz közreműködésével, a 4 dNTP felhasználásával
4. Az új DNS lánc „körösítése” DNS ligáz segítségével
5. Kompetens baktériumok transzfekciója (DNS bevitelle)
6. A mutáns plazmidot hordozó baktérium telepek azonosítása
7. A mutáns DNS izolálása a baktériumokból
8. A mutáns DNS megerősítése DNS szekvenálás segítségével (a mutáció kimutatása a szekvenciában)

A mutációk révén megváltozott tulajdonságú fehérjék hozhatók létre, melyek valamilyen szempontból előnyösebbek lehetnek számunkra, mint az eredeti forma. Például a mosóporokban használt fehérjebontó.

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

Az idegen gének (transzgének) átvitele szomatikus sejtekbe általában valamilyen vírussal lehetséges, az egész élőlényt érintő génbevitelt pedig az ivarsejtekbe speciális módszerekkel lehet elérni. A **szomatikus sejtekben csak ideiglenes (tranzients) expresszió lehetséges**, mert a bevitt gén csak a sejtek egy részében és azok utódaiban jelenik meg, ezek pusztulása után már nem fog expresszálni. Ezt nem integrálódó vírus vektorral (adenovírus) érik el, amelynek előnye, hogy nem transzformálja a sejtet. **Az idegen gén stabil integrálódását a megtermékenyített petesejtbe történő mikroinjektálással érik el**, ilyenkor a bevitt gén stabilan beépül a genomba, de random módon. Ezzel olyan transzgén egyedek hozhatók létre, melyeknek általában egy adott génje hiányzik, vagy egy – idegen – génnel többet tartalmaznak.

Riporter gén: olyan DNS szakasz, amelyet a humán génnel együtt építünk be egy vírus vektor konstrukcióba, és ezzel fertőzzük meg az eukariota sejtet. A riporter gén a plazmid vektorokban levő marker-géneket (pl. antibiotikum-rezisztencia gén) helyettesíti, expresszió esetén valamilyen egyszerűen kimutatható fehérjét termel.(pl. B-galakozidáz, luciferáz)

Idegen gének – általában vektorok segítségével történő – bevitelével egy megtermékenyített petesejt genomjába **transzgén(ikus) állatok vagy növények állíthatók elő**. A transzgén tehát egy fajidegen gén. Előállításuk lépései:

1. Mikroinjektálás (több száz petesejt, mikromanipulátor)
2. Beültetés ál terhes nősténybe
3. Az utódok ellenőrzése (PCR a farokból vett vérből)
4. Pároztatás
5. Beltenyésztés -Klónozás?

A knock-out élőlények előállítása során a megtermékenyített petesejtbe egy adott gén hibás változatát viszik be, ez rekombinációval kicserélődhet és **amennyiben a génhiba az élettel összeegyeztethető, akkor a knock-out (KO) élőlény jön létre**. Ezzel tanulmányozhatóvá válik, hogy egy gén hiánya milyen hatással jár a szervezet egészének működésére.

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

A miRNS szintézise, szerepe a génexpresszió szabályozásában

A miRNS-ek olyan 20–24 nukleotidból álló egyszálú RNS-ek, amelyek döntően a **transzláció szintjén szabályozzák a génexpressziót** argonauta fehérjék segítségével. A miRNS-eket kódoló DNS-szakaszok lehetnek önálló miRNS gének, amelyek legtöbbször csoportosan fordulnak elő a genomban. Sokszor egy promoter régió mögött több miRNS szekvenciája is megtalálható. Érdekes azonban, hogy a miRNS-ek közel felének (kb. 40%-ának) a DNS szekvenciája fehérjét kódoló gének intronikus régiójában helyezkedik el, amely az intronok kivágása során nyer önálló életet.

Az önálló miRNS gének elsődleges **transzkriptumát** legtöbbször az **RNS-polimeráz-II készíti el** – a fehérje kódoló gének átírásához hasonlóan – sőt, az 5'-sapka és a poliA-farok is elkészül. Erre az ún. primer miRNS (pri-miRNS) közti termékre jellemzőek a hajtű-szerkezetek, melyek megfelelnek a kettős szálú RNS kritériumának. Így a **Drosha** nevű, kettős szálú RNS-re specifikus endoribonukleáz hozzákapcsolódik, és levágja a kettős szálú RNS-régió túllogó szekvenciákat, beleértve az 5'-sapkát és 3'-poliA-farkat is.

Ezt követően a pre-miRNS-ek a citoszólba kerülnek, ahol a **Dicer** nevű enzim (endoribonukleáz+helikáz) tovább hasítja. Az érési folyamat végén a kivágott kettős szálú RNS argonauta fehérjékhez kötődik, létrehozva a Dicer-rel és más specifikus RNS kötő fehérjékkel az ún. **RISC komplexet** (RNA-induced silencing complex). A komplex helikáz aktivitása szétválasztja a kettős szálú miRNS-t, melyből csak az egyik szál fog a komplexhez kötve maradni. Így a RISC komplex részévé vált miRNS a komplementaritás elve alapján képes hozzákapcsolódni a cél mRNS 3' UTR részéhez.

A miRNS-ek gátló hatása leggyakrabban a fehérjeszintézis csökkenésével jár, ezt a folyamatot **átíródás utáni géncsendesítésnek (post-transcriptional silencing)** nevezzük.

A létrejött komplex mechanizmusai:

- deCapitálás (5' sapka eltávolítása), deAdenilálás (poli-A farok levágása)
- Transzláció gátlása
- Hasítás a komplementer szekvenciánál

Mikro-RNS-t mesterségesen, egy adott szekvenciához tervezni is lehet, ebben az esetben ezt kell az argonauta fehérjéhez kötni, amely felismeri a cél-mRNS-t, hozzákapcsolódik, lebontja, a fehérje reciklálható (6-5. ábra). Így tetszés szerinti RNS-szakaszok transzkripciója gátolható, és ennek megfelelően adott gének expressziója csökkenthető.

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.

A Humán Genom Projekt 1989-ben indult amerikai állami programként és kb. másfél évtized alatt sikerült befejezni. A projekt – melynek első vezetője James Watson, a DNS kettős spirál egyik felfedezője volt – a teljes emberi genom 3×10^9 bázispárjára irányult, és bázispáronként 1 \$ költséggel számolt. A kezdeti időszakban viszonylag lassú volt a haladás az állami szerepvállalás elégtelensége miatt. Ezért Craig Venter irányításával a kutatók egy csoportja magánbefektetőkön keresztül (Celera) versenyt támasztott a HGP-nek. Ez egyfelől jelentősen felgyorsította a projekt haladását, másfelől azonban a magántőke bevonása miatt komoly politikai problémát is előidézett. A két csoport eltérő stratégiával közelítette meg a problémát, 2001-re alakult ki a végső eredmény. A teljes projekt befejezését hivatalosan 2003-ban jelentették be.

A HGP stratégiája egy „hierarchikus” megoldáson alapult. Először kromoszómasávokra bontották a genomot, ezt térképezték tovább, úgy, hogy különböző restriktáz enzimekkel részben átfedő szakaszokra bontották, azokat térképezték, majd az átfedő szakaszok alapján sorrendbe rakták. A stratégia lényege tehát tradicionális volt: az alacsonyabb felbontástól a nagyobb felbontás felé haladt.

Első célként kisebb, jellegzetes markereket kerestek meg, amelyek 100–200 bázispárt tartalmaztak és kb. 100–150 ezer bázispár átlagos távolságban voltak egymástól. Ennek eredménye kb. 30 000 marker lett. Az izolált kromoszómákat ritkán vágó restriktáz endonukleázokkal kb. 150 000 bázispárt tartalmazó darabokra vágták, és BAC vektorokba klónozták. Így az emberi genom sorba rendezett könyvtárához jutottak. Ezután a markerek alapján megkeresték ezeknek a daraboknak az átfedő részeit és sorba rendezték ezeket, így eljutottak egy minimális BAC kromoszómát tartalmazó sorba rendezett BAC-könyvtárig. A BAC könyvtárak további darabolásával 1500 bp hosszúságú darabokhoz jutottak, ezeket fágkönyvtárba építették és hosszabb-rövidebb végeiket megszekvenálták. Az átfedő darabokból megállapították az 1500 bp hosszú darabok sorrendjét, majd ezek sorrendje alapján a teljes kromoszómák DNS-bázissorrendjét. A projekt során több ember genomját vizsgálták, hogy az esetlegesen eltérő allélok által okozott különbségeket figyelembe tudják venni.

A Craig Venter által irányított Celera magáncég kutatói eleve jóval kisebb, 2000–10000 bp hosszúságú darabokra bontották a kromoszómákat, ezeknek a szakaszoknak mindkét végét szekvenálták és így keresték meg az átfedéseket („géppisztoly módszer”). Ennek a stratégiának – kisebb alapossága miatt – sokkal nagyobb a tévedési kockázata, amelyet erős informatikai háttérrel tudtak kompenzálni.

HapMap Projekt (2002) legalább 1 % os gyakoriságot elérő SNP polimorfizmusokra koncentráló, tömeges vizsgálatok.

1000 genom projekt (2008) 30 millió dolláros költséggel 6 trillió (6×10^{18}) DNS nukleotid vizsgálata, Afrika, Ázsia, Európa és Amerika mintáiból Cél: 1 % nál nagyobb arányban

előforduló polimorfizmusok (nemcsak SNP !) katalógusának összeállítása betegségek pontosabb diagnosztizálásához

Egészséges emberek közt is előfordul, hogy egy gén (kromoszómadarab) kiesik, egy gén különböző példányszámban van a különböző emberekben, vagy egy gén helye megváltozik. A mutációk és polimorfizmusok közötti különbséget az alábbi táblázat szemlélteti:

	polimorfizmus	mutáció
Gyakoriság	> 1 %	< 1 %
Hatás	semleges, vagy rizikófaktor	Betegség

A polimorfizmusok tehát egyenként kis hatásúak, de széles körben előfordulnak, az elterjedt népbetegségek poligénes hátterét jelentik, míg a mutációk kevésbé terjedtek el, mert egyenként is erős hatásúak (monogénes betegségek).

A Humán Genom Projekt eredményeinek hosszú távon egyik fő haszonélvezője a gyógyszeres terápia és ennek nyomán a gyógyszeripar lehet. A bioinformatika fejlődése nyomán lehetővé válik új gyógyszer-támadáspontok predikciója. Ha ismerjük egyes molekulák célfehérjéit, akkor a hasonló szekvenciák alapján más célpontok is szóba jöhetnek, amelyet tovább bővíthet a háromdimenziós szerkezetek szaporodó adatbázisa.

A humán genom megismerése elvben lehetővé teheti az egyénre szabott orvoslást

1. a gének betegségekkel való asszociációinak felderítése
2. az ismert gyógyszertámadáspontok alapján újabb támadáspontok felfedezése
3. az ismert támadáspontokhoz új gyógyszerek tervezése

A probléma: a humán genom óriási diverzitása (biológiai előny, de terápiás hátrány); ha csak a 20 25 000 kódoló génre 1 1 mutációval számolunk, és ezek lehetséges kombinációit csak egy 10 milliós országra vonatkoztatjuk elképesztően magas a változatok száma. A legtöbb betegségnél nem egy gyógyszer, hanem gyógyszerek kombinációi szükségesek, ezek eleve számos mellékhatást is hordoznak. Már a genetikai vizsgálat is jelentős összeg + az egyedi gyógyszerkombináció ára. Az egyénre szabott orvoslásra lehet törekedni, de a reálisan várható eredmények igen szerények, és magasak a költségek; gazdaságosan ez a koncepció tömegesen nem valósítható meg a technológia nem mindenható !

Az egyéni genetikai adatok védelmének jelentősége. ?

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

A génterápia a páciens sejtjeinek genetikai módosításán alapuló terápia. **A klasszikus génterápia** során a célsejtekbe juttatjuk a gént és expressziót idézőnk elő. Így pótoljuk a hiányzó aktivitást, vagy szelektíven megöljük a hibás target sejteket, vagy ez utóbbi célra mozgósítjuk az immun-rendszert. **A nem-klasszikus génterápia** alkalmazásakor a cél az adott gén expressziójának gátlása, a mutáció „kijavítása”. Humán vonatkozásban törvényes körülmények között ma csak szomatikus génterápia végezhető.

A génterápiás eljárásoknál leggyakrabban virális vektorokkal viszik be a géneket az emberi sejtekbe. A virális vektorok alkalmazásának fontos feltétele, hogy a fertőzőképesség megőrzése mellett a patogenitást csökkenteni kell, vagy fertőző, immunogén, de nem patogén vírust kell használni, továbbá biztosítani kell a ki- és bekapcsolás lehetőségét. A vírusok általában random módon integrálják a bevitt gén(ek)e)t. Ezeknek a feltételeknek legjobban az adenovírusok felelnek meg. Előnyük, hogy tranziens vektorok, gyenge természetes patogének, nem okoznak súlyos betegséget. Osztódó sejtekben retrovírusokat is lehet használni, ez integrálja a bevitt szekvenciát a genomba, azonban az ezzel kapcsolatos tapasztalatok kedvezőtlenek.

A vírusokon kívül használják **a génpuskát** (nagynyomású hélium sugár „lövi be” a gént), vagy csupasz DNS injektálását izomba. Egyes esetekben (pl. légúti sejteknél, cisztikus fibrózisnál) ígéretes lehet a liposzómákba zárt DNS bevitele aeroszól formájában.

A NeoRez-TIL géntranszfer

Ez volt az első engedélyezett humán génterápiás próbálkozás. Kérdéses volt, hogy a tumort specifikus limfociták pusztítják-e el. A tumorból tumor infiltráló limfociták (TIL) izolálhatók. Ezeket felszaporították, tumor nekrosis faktor (TNF- α) génjét inzertálták és neomicin rezisztencia génnel jelölve visszainjektálták a betegbe. A limfociták egy része visszatalált a tumorba, de ez nem volt elegendő a gyógyuláshoz.

Az adenzin-dezamináz (ADA) hiány génterápiája

Az ADA-hiányt „nem-HIV AIDS-nek” is nevezik, egy súlyos immundeficienciával járó örökletes betegség. Az enzim hiánya miatt felszaporodó adenzin dATP-vé foszforilálódik és gátolja a ribonukleotid-reduktázt, ennek következtében a DNS-szintézist és a sejtosztódást is. A limfociták osztódásának gátlása vezet az immundeficienciához. A terápiás próbálkozást 1990-ben kezdték. Egy 4 éves ADA-hiányos beteg kislány véréből Tlimfocitákat izoláltak, melyekbe retrovirális vektorral vitték be az ADA génjét. Felszaporítás után a limfocitákat visszainjektálták a beteg vérébe. A terápia hatásosnak bizonyult ugyan, azonban a limfociták rövid életideje miatt rendszeres ismétlésre van szükség.

Cisztikus fibrózis aeroszolos génterápiája

A cisztikus fibrózis esetében megkönnyíti a terápiát, hogy a légutakba aeroszól formájában is bevihető a kijavított génszakaszt tartalmazó konstrukció. Ehhez a DNS-t kationos liposzómába kell zárni, melynek mesterséges membránja képes fuzionálni a légutakban levő egyes sejtek membránjával és így azokba bejuttatni a DNS-darabot.

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

A szintetikus biológia lényege, hogy – eltérően az eddigi vektor-konstrukcióktól, ahol a beépítendő gént valamilyen természetes forrásból izolálták restriktációs enzimekkel történő kivágással, a szintetikus biológia az integrálandó DNS-t teljesen szintetikusan állítja elő. Így elvileg bármilyen DNS-szekvenciát beépíthetne egy vektorba, függetlenül attól, hogy annak van-e „értelme”, tehát kódol-e bármilyen fehérjét, vagy szabályozza-e bármilyen fehérje expresszióját.

Egy teljesen mesterségesen megszintetizált *Mycoplasma mycoides* genomot sikerült először egy YAC vektorba, majd az élesztőből egy saját genomjától megfosztott *Mycoplasma capricolum* baktériumba átvinni. Az így átprogramozott baktérium nem csupán túlélte az „operációt”, de osztódni is tudott és utódsejteket hozott létre és a *M. mycoides* fehérjeit szintetizálta.

1. Pénzügyi támogatás megszerzése 40 millió USD !
2. > 1000 db 1080 bázisból álló DNS szekvencia megvásárlása -átfedő szakaszokat is tartalmaznak
3. Számítógépes tervezés a sorrendbe rakáshoz
4. Először 10 kb hosszúságú darabok összerakása
5. YAC kromoszómákba való beépítés és felszaporítás élesztőben
6. 100 kb hosszúságú darabok összerakása 10 kb darabokból
7. YAC kromoszómákba való beépítés és felszaporítás élesztőben
8. A teljes 1078 kb méretű genom összerakása

Szinte beláthatatlanok jó és rossz értelemben véve is !

Craig Venter reklámhadjárata eltúlzott várakozások, szabadalmi hajsza-üzlet mindenek előtt

Üzemanyag mesterséges előállítása, olaj és gázkészletek kímélése; de: nem lenne természetes korlátja az üvegházhatású gázok kibocsátásának !

Mikroorganizmusok beprogramozása különféle anyagok termelésére

Biológiai hadviselés veszélye ,új baktériumok, ismeretlen betegségek ! – nincs immunvédekezés !

Véletlen balesetek baktériumok kiszabadulhatnak a laboratóriumból

Lehetséges védekezés: xenonukleinsavak beépítése, így nem jöhetne létre hibridizáció a „természetes” DNS-sel

Xenonukleinsav: az 5 „természetes” bázistól eltérő bázisokat tartalmaz

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

Az a tény, hogy a tRNS-ekben többféle ritka nukleotid fordul elő, amelyek egy része képes a DNS-t alkotó négy nukleotiddal párokat alkotni, számos kutatót sarkallt arra, hogy olyan DNS-t állítson elő, amelybe bizonyos helyeken a természetben nem létező bázisokat tartalmazó nukleotidokat építenek be, és megvizsgálják, hogy az így kialakuló tripletok milyen aminosavakat kódolnak. Ezek a próbálkozások azonban újabb problémákat vetnek fel, hiszen a DNS-ben levő tripletok az mRNS-en keresztül kódolják az aminosavakat, ahhoz pedig a tRNS-ek jelentik a fordítókulcsot. A megbízható kódolás miatt a tRNS-ek rendkívül specifikusak a megfelelő aminosavakra, amelyet az aminoacil-tRNS szintetáz enzimek garantálnak, melyek affinitása a megfelelő aminosav-tRNS párra átlagosan 4 nagyságrenddel nagyobb, mint a többi párra. A természetben nem létező nukleotidoknak/tripleteknek megfelelő tRNS-eket, sőt, elvileg a megfelelő specifikus enzimeket is meg kell tervezni, méghozzá a kódolandó aminosavhoz.

1. Új, egymással komplementer, de az eddigiekkel nem komplementer bázisok (deoxiribonukleotidok, dNTP-k) felfedezése, előállítása (DNS szint)
2. A kapott, új bázisokat tartalmazó kód átírása ribonukleotidokba (mRNS szint)
3. Az új, komplementer ribonukleotidok beépítése tRNS-be, az antikodon hurokba (transzlációs szint)
4. A tRNS-ek módosítása az enzimfelismerő helyen a beépítendő aminosavra specifikus aminoacil-tRNS szintetázra (transzlációs szint)
5. A riboszómák esetleges módosítása az újfajta mRNS-ek megkötésére, a tRNS-ek riboszóma felismerő helyének módosítása

Az első sikeres mesterséges nukleotid pár, amely DNS-be építhető, majd replikálható volt: d5SICS-dNaM (2014)

A két gyűrűt (naftalin/izokinolin) nem hidrogénhidak, hanem apoláros kölcsönhatások tartják össze, a DNS-láncok között ezek nem egy síkban vannak, hanem részben átfedve, egymás felett helyezkednek el.

A KlenTaq polimeráz működése során a d5SICS-dNaM párt a Watson-Crick-féle B-DNS-nek megfelelő 11 Å távolságra állítja be, így a DNS-replikáció zavartalanul folyhat. Mivel a DNS-polimerázok dNTP-ket igényelnek, megszintetizálták a megfelelő trifoszfátokat, ezeket bizonyos transzporterek a baktériumsejtekbe juttatják. Az E. Coli hibajavító rendszere nem távolítja el az újfajta nukleotidokat.

A transzláció azonban több szinten is nagyon specifikusan regulált folyamat:

1. Az aminoacil-tRNS szintetáz erősen specifikus a megfelelő aminosav-tRNS-párokra
2. Az antikodon két nukleotidja a komplementaritás alapján specifikusan kapcsolódik, a lötyögő 1. bázis csak bizonyos aminosavak esetén okoz tévedést
3. A tRNS-nek riboszóma felismerő helye (is) van
4. Eukariótákban már a transzkripció szintjén is probléma lehet (intron kivágások pontossága)
Teljesen mesterséges, az új bázisokra/aminosavakra specifikus tRNS-t pusztán az antikodon

megváltoztatásával nem lehet létrehozni, ehhez új, specifikus aminoaciláló enzimeket is kellene konstruálni.

Eddigi stratégiák újabb aminosavak beépítésére fehérjékbe:

- 1. A stop kodonok és ritkán használt kodonok jelentésének megváltoztatása**
Az E. Coli az UAG („amber”) stop kodont ritkán, és mindig az RF 1 terminációs faktorral együtt használja. Egy archea tirozil tRNS szintetáza E. Coliban UAG kodon esetén O metiltirozint épít be (UAC és UAU Tyr kodonok). Ez azonban hibás terminálásokhoz és ezzel a baktérium pusztulásához vezethet, ezért az RF 1 faktort eltávolították, vagy más stop kodont is használtak. Más ritkán használt redundáns kodonokat is használtak hasonló célokra, pl. a AGG Arg kodont egy E. Coli törzsben 6 N alliloxi karbonil lizin kódolására kényszerítették.
- 2. Két lépéses szelekció ortogonális tRNS-szintáz párokkal**
Az ortogonális tRNS-ek egy része az endogén, másik része a nem természetes aminosavval képes olvasni a stop kodont. A szelekció kloramfenikol acetiltranszferázzal (CAT) történik, a korai stop kodon miatt endogén aminosavval a CAT nem expresszálódik, a baktérium elpusztul. A nemtermészetes aminosavval stop kodonon túllép a sejt, a CAT expresszálódik, a sejt túlél. A 2. lépésben az endogén aminosavval a toxikus barnáz enzim expresszálódik, a sejt elpusztul. Csak azok a sejtek maradnak életben, amelyekben a nem természetes aminosavat kódoló tRNS-ek maradtak meg.
- 3. Ortogonális riboszómák és ortogonális tRNS-enzim pár készletek**

Ortogonális riboszómák:

Képesek a természetestől eltérő mRNS-ek illetve tRNS-ek megkötésére, sőt, kvadruplet(négy bázisból álló kodonok felismerésére is optimalizálhatók).

Pl. a mRNS felismerő Shine Dalgarno szekvencia illetve a kis riboszóma alegységein levő, ezt felismerő komplementer szekvencia módosítása. Az egyik stop kodon (UAG) szupresszállására optimalizált riboszóma, amely kevésbé köti az RF 1 terminációs faktort. A nagyobb riboszóma alegység optimalizálása a módosított kis alegységhez; a nagy alegység peptidil transzferáz egységének módosítása (ez hozza létre a peptid kötetést)

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

A bioinformatika a biológia és a számítástechnika határán elhelyezkedő rendkívül széles terület, számítógépes technikák alkalmazása az exponenciális mértékben növekvő biológiai információk tárolására és analizálására. Ez magában foglalja az adatbázisok létrehozását és fenntartását, az adatok olyan módon történő rendezését, hogy a kutatók könnyen hozzáférjenek az információkhoz és újabbakat is hozzátehessenek.

Az alábbiakban – a teljesség igénye nélkül – felsorolunk néhány, gyakran használt olyan adatbázist, amely kifejezetten a fehérjék bioinformatikai vizsgálatához alkalmazható:

1. **EXPASY** – Az Expert Protein Analysis System szerverhez kapcsolódik, amelyen számos proteomikai adatbázist és online programot (DNS→fehérje transzláció, molekulatömeg és izoelektromos pont számolás, motívum és poszttranszlációs módosítások keresése, szerkezeti predikciók stb.) lehet elérni.
2. **UNIPROT** (korábban SwissProt) – az Expaty-val kapcsolatban álló, annotált aminosavszekvencia-adatbázis
3. **BRENDA** – az egyik legteljesebb enzim-adatbázis, amelyben számos szempont szerint lehet keresni (elnevezés, reakció, funkcionális paraméterek, izolálás, szerkezeti sajátosságok, betegségekkel való kapcsolat, mérnöki vonatkozások)

KEGG (A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

Olyan adatbázisok gyűjteménye, amely genomokra, biológiai útvonalakra, betegségekre, gyógyszerekre és vegyi anyagokra vonatkoznak. A KEGG hasznosítható a bioinformatikai kutatásban és oktatásban, beleértve az adatok elemzését is a genomikában, metagenomikában, metabolomikában és más omikai vizsgálatokban tanulmányok, biológiai rendszerek modellezésében és tanulmányozásában transzlációs kutatásokban vagy gyógyszerek kifejlesztésében.