



# GYÓGYSZERÉSZI BIOLÓGIA

DUDÁS RÉKA, NAGY LAURA, PANDUR EDINA, POÓR VIKTOR SOMA, SIPOS KATALIN

„Az élettudományi-klinikai felsőoktatás gyakorlatorientált és hallgatóbarát korszerűsítése a vidéki képzőhelyek nemzetközi versenyképességének erősítésére”

TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Gyógyszerészi Biológiai Tanszék – 2015

**SZÉCHENYI** 2020



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

**Európai Unió**  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**

Kézirat lezárva: 2015. október

A kiadásért felel a: Pécsi Tudományegyetem

Felelős szerkesztő: dr. Sipos Katalin

Lektorálta: dr. Dudás Réka, dr. Nagy Laura, dr. Pandur Edina, dr. Poór Viktor Soma, dr. Sipos Katalin

Műszaki szerkesztő: Czulák Szilvia

Terjedelem: 285 oldal

# TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés a Gyógyszerészi biológiába.....	17
2. Pro- és eukarióta sejtek.....	23
2.1. A prokarióta szervezetek besorolása .....	23
2.2. Eukarióta és prokarióta sejtek különbségei .....	23
Sejt szervecskék .....	23
Örökítő anyag.....	23
Transzkripció és transláció.....	24
2.3. Az endoszimbionta elmélet .....	24
2.4. Sejtfa felépítése, típusai .....	25
3. Óssejtek.....	27
3.1. Az óssejtek definíciója.....	27
3.2. Az óssejtek típusai .....	27
3.3. Az óssejtek forrása.....	27
3.4. Az óssejterápia veszélyei.....	28
3.5. Óssejterápia az orvosi gyakorlatban .....	28
4. A sejtek szerkezete .....	29
4.1. Az eukarióta sejt membránjai.....	29
Bevezetés .....	29
A plazmamembrán.....	29
A sejtmag membrán.....	33
4.2. Sejtmag .....	34
Sejtmag .....	34
4.3. Eukarióta sejtalkotók: endoplazmás retikulum, Golgi komplex, vezikulumok, endoszómák, lizoszómák .....	36
Bevezetés .....	36
Az endomembrán rendszer - vezikulumok .....	36
Az endoplazmás retikulum (ER) .....	36
Az ER kémiai összetétele .....	37
Az ER fő típusai .....	37
Az endoplazmás retikulum biogenezise .....	38
A Golgi komplex .....	38
A Golgi komplex szerepe .....	39
Endoszómák .....	39
Lizoszómák .....	39

Mitokondrium.....	40
Egyéb sejtszervecskék .....	41
4.4. A citoskeleton .....	44
Bevezetés .....	44
A citoskeleton funkciója.....	44
A mikrotubulusok szerkezete és szintézise .....	45
Mikrotubulushoz asszociált fehérjék (MAP).....	45
A mikrotubulusok szerepe.....	45
Axonális transzport .....	46
A mikrotubulusok motor fehérjéi .....	46
1. Kinezinek- szerkezet és funkció.....	46
Dineinek- szerkezet és funkció .....	47
Mikrotubulus organizáló központok (MTOC) .....	47
Mikrotubulus nukleáció és szintézis.....	48
Intermedier filamentek .....	48
Mikrofilamentek .....	49
A mikrofilamentek motor fehérjéi .....	49
Aktin-kötő fehérjék .....	50
5. A DNS szerkezete, kromoszóma, kromatin, genom és génexpresszió .....	53
5.1. Bevezetés.....	53
5.2. A DNS szerkezete .....	53
5.3. A DNS bázis összetétele.....	53
5.4. A Watson-Crick modell.....	53
5.5. A DNS feltekeredése (supercoiling) .....	54
5.6. Topoizomerázok.....	54
5.7. Gének és kromoszómák .....	54
5.8. Telomérek .....	55
5.9. Centromér .....	55
5.10. Kromatin .....	55
5.11. A DNS kondenzációja, a kromoszóma képződése .....	56
5.12. A hiszton és nonhiszton fehérjék jellegzetességei.....	56
5.13. A kromatin további kondenzálódása .....	56
5.14. A genom .....	57
5.15. A genom komplexitása.....	57
5.16. Gének, géncsaládok, pszeudogének.....	58
5.17. Genom és gén expresszió .....	58

6. Humán Genom Projekt – A XX. század utolsó évtizedének legnagyobb missziója .....	61
6.1. A kezdetek – a hierarhikus módszer .....	61
6.2. Celera Genomics.....	62
Eredmények: 2001. február .....	62
Eredmények.....	62
„Szemét” DNS .....	64
ENCODE Project: Encyclopedia of DNA Elements – ezeket a szekvenciákat vizsgálja .....	64
7. Replikáció .....	65
7.1. A replikáció tulajdonságai .....	65
7.2. Prokarióta replikáció.....	65
7.3. A prokarióta és eukarióta replikáció közötti különbségek .....	66
7.4. Telomerek és telomerázok.....	66
8. DNS hibajavítás.....	67
8.1. A DNS károsodások típusai .....	67
8.2. Hibajavító mechanizmusok .....	67
8.3. Bázis excíziós repair (Base excision repair (BER)) .....	67
8.4. A DNS hibajavító mechanizmusok orvosi jelentősége.....	68
9. Transzkripció (pro-, eukarióra, szabályozás) .....	69
9.1. Általános jellemzők .....	69
Az RNS típusai.....	69
9.2. Transzkripció a prokariótákban .....	69
RNS polimeráz .....	69
Iniciáció .....	70
Elongáció .....	70
Termináció .....	70
9.3. Transzkripció az eukarióta sejtekben.....	70
RNS polimerázok .....	71
Transzkripció iniciáció.....	71
Elongáció .....	71
Transzkripció termináció .....	72
9.4. RNS processzálas.....	72
Általános jellemzők .....	72
Az mRNS processzállódása .....	73
A riboszomális és transzfer RNS szintézise és processzállódása .....	74

9.5. A transzkripció szabályozása.....	75
Alternatív splicing.....	76
Az RNS-ek félélet-ideje.....	76
Idegen RNS-ek lebontása (RNS interferencia).....	77
10. Transzkripciós faktorok.....	79
10.1. Bevezetés.....	79
10.2. A transzkripciós faktorok osztályozása.....	79
10.3. A transzkripciós faktorok funkcionális osztályozása.....	79
10.4. A transzkripciós faktorok szerkezete.....	80
10.5. Transzkripciós faktorok motívumai.....	80
10.6. A DNS transzkripciót szabályozó régiói.....	81
10.7. Promóter azonosítás.....	81
10.8. Az enhenszerek szerepe.....	81
10.9. Koaktivátorok.....	82
10.10. Poised polimerázok / Részlegesen aktív polimerázok.....	82
10.11. Transzkripciós represszió.....	82
11. Genetikai kód, riboszómák, transláció és szabályozása.....	85
11.1. A genetikai kód.....	85
A genetikai kód jellegzetességei.....	87
11.2. A riboszóma szerkezete és funkciója.....	87
Bevezetés.....	87
Prokarióták.....	88
Az rRNS jelentősége.....	88
Eukarióták.....	88
Riboszóma biogenezis.....	89
A riboszóma típusai.....	90
A riboszóma RNS-kötő helyei.....	90
Transzfer RNS-ek.....	90
Aminosav aktiváció.....	91
11.3. A transláció fázisai és szabályozása.....	91
A fehérje szintézis lépései.....	91
Poliriboszómák.....	92
Prokarióta transláció.....	92
Eukarióta transláció.....	94
Az eIF2-ciklus.....	96

12. Fehérjék típusai és analízise .....	99
12.1. Fehérjék típusai .....	99
Felépítés .....	100
Alak .....	100
Fehérjék oldódása .....	100
Fehérjék csoportosítása.....	101
Peptidek .....	101
Proteinek és proteidek .....	101
Fehérjék és betegségek.....	102
Terápiás fehérjék .....	103
13. Fehérjék módosulásai, degradációja.....	105
13.1. Poszttranszlációs módosulások.....	105
13.2. Fehérjék degradációja.....	107
Proteozomális ubiquitin-függő útvonal .....	108
14. Génreguláció .....	111
14.1. Génszabályozás prokariótákban.....	111
A lac operon .....	111
Trp represszor.....	112
14.2. Génreguláció eukariótákban .....	112
Eukarióta és prokarióta sejtek: különbségek .....	113
Nukleoszóma struktúra és kromatin átrendezés/chromatin remodeling.....	113
Kromatin struktúra, eukromatin, heterokromatin.....	113
Kromatin újrendező komplex: Chromatin remodeling complex (CRC).....	114
Hiszton módosítás .....	114
DNS metiláció .....	115
Génexpresszió a transzkripció során.....	115
Enhancerek .....	115
Silencerek .....	116
Transzkripciós faktorok .....	116
Intronok, splicing, alternatív splicing .....	116
RNS érés – degradációs szabályozás .....	117
RNS érés – RNS editing .....	117
RNS interferencia.....	117
Dicer .....	117
RISC.....	118
RNS interferencia a gyógyászatban .....	118
Fehérje degradáció és poszttranszlációs módosulások .....	118

15. Fehérjék sejten belüli elosztása és transzportja .....	119
15.1. Nukleáris fehérjetranszport .....	119
15.2. Peroxiszómális fehérje transzport .....	120
15.3. Mitokondriális fehérje transzlokáció .....	120
15.4. Fehérje transzport az endoplazmás retikulumba (ER) .....	121
15.5. Endomembrán rendszer, vezikuláris transzport.....	121
A vezikulumok kialakulása .....	122
A vezikulum fúziója a célmembránnal .....	122
A Golgi rendszer .....	122
Endocitózis.....	123
16. Vírusok .....	125
16.1. Felfedezés .....	125
16.2. Tulajdonságok .....	125
16.3. Felépítés.....	126
16.4. Csoportosításuk .....	126
16.5. Fertőzés és reprodukció.....	128
Adszorpció .....	128
Penetráció.....	128
Dekapszidáció (ha szükséges) .....	128
Vírusszintézis .....	129
16.6. Néhány gyógyászatban fontos vírus.....	130
Onkogén vírusok .....	130
AIDS.....	130
Influenza vírus.....	131
Bárányhimlő .....	131
16.7. 7. Védekezés: vaccináció, gyógyszerek, természetes védelem.....	131
Variolizáció.....	131
Védekezés gyógyszerekkel .....	132
16.8. 9. A vírusok genetikai haszna .....	132
17. Antibiotikumok .....	135
17.1. Antibiózis .....	135
17.2. Antibiotikumok.....	135
17.3. Rövid történet – a terápiás antibiotikumok felfedezésének néhány fontos állomása .....	135
17.4. Az első elérhető antibiotikumok .....	138
17.5. Csoportosítás az előállítás módja szerint .....	138
17.6. Antibiogram .....	139
17.7. Pro és kontra.....	139



17.8. Antibiotikum interakciók .....	140
17.9. Rezisztencia .....	140
17.10. Keresztrezisztencia .....	141
17.11. Szuperbaktériumok (=superbug).....	141
17.12. MRSA .....	141
17.13. Kutatások napjainkban .....	142
17.14. Primycin.....	142
17.15. Antibiotikumok használata túl a gyógyszeres felhasználáson .....	142
17.16. Hatásmechanizmus.....	142
17.17. Csoportosítása hatásmód szerint.....	143
17.18. Sejtfa szintézis gátlók.....	143
Béta-laktámok .....	143
Béta-laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia .....	144
Aminglikozid antibiotikumok.....	144
Glikopeptidek .....	145
17.19. Enzim inhibitorok.....	145
Giráz inhibitorok .....	145
Folsavantagonisták .....	145
17.20. Riboszómára ható szerek: fehérjeszintézisgátlók.....	146
Tetraciklinek .....	146
Makrolidok.....	146
Klóramfenikol .....	146
Linkozamidok .....	147
17.21. Membrán funkció gátlók .....	147
Polimixinek.....	147
Polymyxin A,B,C,D,E .....	147
17.22. Összefoglaló.....	148
18. A sejtciklus.....	149
18.1. A sejtciklus definíciója és szakaszai (fázisai).....	149
18.2. A sejtciklus szabályozása: ellenőrző pontok (check points) .....	149
A sejtciklus szabályozása: a ciklin/Cdk komplexek .....	150
A sejtciklus külső aktivátorai .....	151
A sejtciklus szabályozás és a tumorképződés kapcsolata .....	151

19. Mitózis és meiózis .....	153
19.1. Mitózis (számtartó osztódás) .....	153
Hibák a mitózisban.....	154
19.2. Meiózis (számfelező osztódás).....	154
Hibák a meiózis során.....	154
19.3. A mitosis és meiózis rövid összehasonlítása.....	155
20. Jelátvitel.....	157
20.1. Bevezetés.....	157
20.2. A jelátviteli rendszerek elemei.....	157
A jelátvitel típusai az extracelluláris hírvivő molekulák szerint .....	157
A jelátviteli útvonalak főbb típusai- jelátvitel elemei.....	158
A jelátviteli útvonalak főbb típusai- általános jelmegszakító lehetőségek .....	158
Extracelluláris hírvivők .....	159
Receptorok.....	159
Másodlagos hírvivő rendszerek .....	160
20.3. Kommunikáció a jelátviteli útvonalak között.....	161
20.4. G fehérjéhez kapcsolt receptorok .....	162
A GPCR-ek osztályozása .....	163
GPCR-rel interakcióba lépő fehérjék (GIP fehérjék).....	163
G proteinek.....	163
20.5. A G fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztüli jelátvitel .....	166
cAMP és protein kináz A.....	167
Ca-jel.....	168
A GPCR-ek jel terminációja .....	170
Az extracelluláris szignál amplifikálása másodlagos hírvivőkkel.....	171
20.6. Tirozin-kináz receptorok.....	171
Monomer G proteinek .....	172
20.7. Citokin receptorok és JAK-STAT jelátvitel .....	176
20.8. TGF $\beta$ /BMP-Smad jelátvitel.....	177
21. Apoptózis.....	179
21.1. Az apoptózis folyamata .....	180
Iniciáció .....	180
Intrinsic útvonal .....	180
Extrinsic útvonal: Halál receptorok (death receptor=DR) .....	182
p53 .....	183
Effektor fázis .....	184
Endonukleázok.....	184

Transzglutaminázok.....	184
Kaspázok.....	184
Apoptózis inhibitorok: IAP.....	185
Apoptózis vs. sejtosztódás.....	185
22. Tumorok molekuláris biológiája.....	187
22.1. Bevezetés.....	187
22.2. A tumorok csoportosítása.....	187
22.3. A daganatok kifejlődése.....	187
22.4. A rákos sejtek tulajdonságai.....	188
22.5. Rákkeltő hatások.....	189
22.6. A rák genetikája.....	189
22.7. Onkogének.....	190
Példák onkogénekre.....	191
22.8. Tumor-szuppresszor gének.....	191
A tumor-szuppresszor gének csoportosítása.....	192
Példák.....	192
22.9. A rák elleni küzdelem új stratégiái.....	193
Immunterápia.....	193
Rákkeltő fehérjék gátlása.....	194
Új vérerek képződésének (angiogenezis) gátlása.....	194
23. Genetika.....	195
23.1. Bevezetés a genetikába.....	195
A genetikai kód.....	195
A génkifejeződés (génexpresszió) szabályozása.....	195
Alapfogalmak.....	195
Kromoszómák.....	196
Kapcsolt gének.....	196
A humán genom.....	197
A molekuláris genetikai kutatások gyakorlati haszna különböző területeken, és vitatott kérdések.....	197
Genetikai betegségek.....	198
Mutációk.....	200
Szakkifejezések, amiket érdemes tudni genetika tanulásakor.....	201
23.2. Kromoszóma rendellenességek.....	202
Kromoszóma rendellenességek csoportosítása.....	202
Számbeli eltérések: aneuploidiák.....	203
Strukturális abnormalitások.....	206

23.3. Ivari kromoszómák .....	209
Y kromoszóma .....	209
X kromoszóma .....	209
Pseudoautoszómális régiók .....	209
Ivart meghatározó X-Y rendszer .....	209
X kromoszóma inaktiváció .....	210
Az ivari kromoszómák zavara .....	210
Ivari kromoszómán öröklődő genetikai betegségek.....	210
23.4. Mendeli (monogén) öröklődés.....	211
Nevezéktan .....	211
Autoszómális domináns öröklődés .....	211
Autoszómális recesszív öröklődés.....	212
X-kapcsolt recesszív öröklődés .....	213
A Mendeli öröklődés egyéb típusai .....	214
Atipikus Mendeli öröklődés .....	215
Mitokondriális öröklődés .....	216
Genetikai kapcsoltság.....	216
23.5. Mitokondriális betegségek.....	217
Mitokondriális genetikai állomány .....	217
Általános tünetek.....	217
A mutáció lokalizációja.....	217
Példák betegségekre .....	218
Mitokondriális öröklődésmenet .....	218
Kezelés .....	218
23.6. Epigenetika.....	219
Az epigenetika definíciója .....	219
DNS metiláció .....	219
Hiszton módosítás .....	219
microRNS.....	219
X kromoszóma inaktiváció .....	219
23.7. Poligén öröklődés, komplex betegségek.....	220
Alapfogalmak .....	220
Komplex betegségek azonosítása.....	220
Oligogén és poligén öröklődés.....	221
Komplex öröklődés .....	222
A hajlamosító gének keresése.....	222
Példák komplex öröklődésű betegségekre .....	223
Hajlam elemzése komplex betegségek esetében .....	226

23.8. Családfaelemzés.....	227
Bevezetés .....	227
Szimbólumok.....	227
Autoszómális recesszív jellegek .....	228
Autoszómális domináns jellegek.....	229
X-kromoszómához kötött recesszív jelleg .....	230
X-kromoszómához kötött domináns jellegek .....	230
Y-kromoszómához kötött jellegek .....	231
Mitokondriális öröklődés .....	231
Anyai hatás .....	232
Nem által befolyásolt jellegek .....	232
Nem által limitált jellegek .....	233
23.9. Populációgenetika.....	234
Bevezetés .....	234
Az öröklődést befolyásoló faktorok .....	234
Genetikai variáció.....	234
Genotípus gyakoriságok .....	234
Allél gyakoriságok .....	235
A Hardy-Weinberg törvény.....	236
A Hardy-Weinberg törvény kiterjesztései.....	237
Nem véletlenszerű párválasztás .....	238
Nem véletlenszerű párválasztás egy típusa – beltenyésztés .....	238
Természetes szelekció .....	238
Mutáció.....	239
Migráció.....	239
Genetikai sodródás (drift).....	240
23.10. Fejlődésgenetika .....	240
Történelem .....	241
“Unity of type” .....	241
Testterv .....	242
Toolkit gének.....	242
Nemkódoló szakaszok .....	243
Allometrikus növekedés .....	243
Hox gének .....	244
Pozicionális információ .....	244
Fejlődés – sejsintű mechanizmusok .....	244
Sejt specializáció.....	245
Emberi fejlődés .....	245

Homeotikus mutációk.....	246
Atavizmus.....	246
Összefoglaló .....	247
23.11. Génterápia.....	247
Bevezetés .....	247
Módszerek.....	248
A génterápia vektorai .....	248
A génterápia veszélyei.....	249
Génterápia a gyakorlatban.....	249
Függelék (Módszerek).....	251
Nukleinsavak .....	251
Izolálás .....	251
Detektálás .....	252
Nukleinsavak elektroforézise .....	255
Klónozás .....	256
Nukleinsavak analízise .....	259
A nukleinsavak interakciói.....	259
Fehérjék .....	262
Fehérje kivonás (izolálás) .....	262
Elválasztások .....	262
Fehérjék detektálása.....	269
Fehérjék analízise .....	270
Fehérjék interakciói.....	273
Rekombináns fehérjék expressziója .....	275
Modell organizmusok .....	276
Példák modell organizmusokra.....	276
Genetikailag módosított organizmusok (GMO), transzgenikus élőlények .....	277
Képkalkotó módszerek.....	278
Mikroszkóp .....	278
Sejtkultúrák.....	280
Speciális módszerek a genetikában.....	281
Kromoszómaszám és struktúra, jelölési technikák .....	281
Citogenetika .....	282
Kromoszóma morfológia .....	282
Molekuláris citogenetika.....	283

Gyógyszerészeti kutatások speciális módszerei.....	284
Szerkezet alapú gyógyszertervezés .....	284
Kombinatorikus kémia.....	284
High-throughput screening (HTS) = nagy áteresztőképességű szűrés.....	285





# 1. BEVEZETÉS A GYÓGYSZERÉSZI BIOLÓGIÁBA

Ez a tantárgy az élő sejtről, annak felépítéséről, a fő szerkezeti (strukturális) elemeiről és a molekuláris szintű szabályozásáról szolgáltat alapismereteket.

A sejt környezetétől elkülönül, de ugyanakkor azzal folyamatos anyag- és információcserében áll. Az élőlények két nagy csoportja az **egysejtűek és a többsejtű** organizmusok. Az utóbbiak esetében a terminálisan differenciálódott sejtek szöveteket és szerveket alkotnak. A szervezet különböző részei bonyolult információcserében állnak egymással.

A sejtek prokarióták vagy eukarióták lehetnek. Közös jellemzőik a következők:

- *Sejtmembránnal* rendelkeznek, amely molekulák importjára és exportjára képes.
- Az eltérő sejtaktivitásokhoz (szintetikus reakciók, mozgás, reaktivitás, molekulák kiválasztása, más sejtekkel való kapcsolattartás, hogy csak néhány példát említsünk) *energiára* van szükségük.
- A sejt vagy az egész szervezet reprodukciójához szükséges *genetikai információval* rendelkeznek, amely megbízható és szükség esetén a javítás lehetősége fennáll benne.

A sejtek valamely felszínhez, illetve más sejtekhez kapcsolódhatnak, vagy szabadon lehetnek valamely oldatban. Néhány specializált sejtben eltérő funkciók zajlanak a sejt különböző oldalain (apikális-bazális, enterociták, vese sejtek). A prokarióta sejteknek gyorsan és hatékonyan kell reagálniuk a környezeti változásokra. A prokarióta sejtekben nem található meg a legtöbb, eukarióta sejtben fellelhető sejtalkotó (lásd a két sejtípus összehasonlításáról szóló előadást). A **kompartimentalizáció** segíti a molekuláris biológiai és a biokémiai sejt-folyamatok szabályozását.

A **sejtmembrán** sajátos szerkezettel rendelkezik, a legtöbb molekula számára nem átjárható (lásd: Membrán szerkezete és Fehérje transzport előadásokat, valamint biokémiából: Transzporterek és csatornák). A környezettel való anyag kicserélődést speciális transzporter rendszerek segítik. Az extracelluláris (sejten kívüli) térből érkező jeleket a membránban található receptorok érzékelik és sejtben belüli jelátviteli utaknak továbbítják, amelyek révén a sejt reagálni tud ezekre a jelzésekre. Valamennyi felsorolt aktivitás hozzájárul, hogy a sejt belső környezetét stabilan tartsa. A sejt folyamatosan vesz fel **energiát szolgáltató** molekulákat, és bocsát ki bomlástermékeket (ezek az enzimatikus reakciók a Biokémia tárgyát képezik).

A sejt **genetikai információja** a DNS tartalmában rejlik. Eukarióta sejtekben a DNS kromoszómákba organizálódik. A géntermékek fehérjék (proteinek) vagy RNS molekulák. A **gén expresszió regulációja** (szabályozása) határozza meg, hogy egy adott pillanatban a DNS mely szakasza használandó RNS szintézisre. A gén expresszió szabályozásának több szintje van: kromoszóma szerkezete, DNS és hiszton módosítások, transzkripció (RNS szintézis DNS templátról), RNS processzáció (érés), RNS degradáció (lebomlás), transláció (fehérje szintézis), fehérjék poszttranszlációs módosulása és degradációja. Az eukariót sejtek magasabb szintű strukturális rendezettsége (endomembrán rendszer, kompartmentalizáció, transzkripció és transláció elkülönítése) alapot szolgáltat a gén expresszió magas szintű szabályozásához.

Minden sejt ugyanazokat az alap elemeket és építőköveket tartalmazza: víz, szerves makromolekulák, amelyek közös építőkövekből tevődnek össze (lásd: táblázat az előadáson). **A víz** az élő sejt speciális közege, több mint egyszerű oldószer: sajátos szerkezete folytán a sejtben belül nagyrészt organizált formában található, a makromolekulák magasabb rendű szerkezetében játszik szerepet és részt vesz enzimatikus reakciókban is. Poláros szerkezet révén nagyszámú H-kötés kialakítására képes nemcsak más vízmolekulákkal, hanem poláros makromolekulákkal (fehérjék, szénhidrátok) is.

A biológiailag fontos makromolekulák négy fő csoportja:

- Nukleinsavak (DNS, RNS)
- Fehérjék (a sejten belül legnagyobb mennyiségben található)
- Lipidek (méretük alapján valójában nem makromolekulák)
- Szénhidrátok (polisaccharidok).

Ezek a molekulák **kis ismétlődő egységekből** épülnek fel: nukleotidokból, aminosavakból, zsírsavakból, illetve cukrokból (monoszacharidok). Ezen közös alap építőelemek léte miatt feltételezhetjük, hogy létezett a mai sejteknek egy közös őse (**LUCA: last universal common ancestor**).

Ha az élő sejtet felépítő elemeket vizsgáljuk, azt találjuk, hogy a sejt tömegének több, mint 90%-át a H, C, N és O adja. A sejten belül kis mennyiségben fellelhető elemeknek épp olyan fontos szerepük van, mint a dominánsoknak: strukturális komponensek (P), enzimreakciók kofaktorai (Mg, Se), vagy a sejt ionközegének komponensei, amelyek szerepet játszanak az akciós potenciál kialakulásában, az izomkontrakcióban vagy a jelátvitelben (Na, K, Ca).

A sejtet felépítő elemek és molekulák között fellépő erők különböző erősségűek: kovalens és nem-kovalens interakciók. A kovalens kötések sokkal erősebbek, kialakításuk és felbontásuk enzimreakciók eredményei. A nem-kovalens erők:

- Ionos interakciók (sókötés)
- Hidrogén kötés (híd)
- Van der Waals erők.

Ezen biológiailag jelentős erőknek a jellemzése az előadás anyagban található.

A **nem-kovalens erők biológiai jelentősége** az, hogy viszonylag gyenge interakciók, ámde nagy számban erős kötést biztosítanak, míg egyenként könnyen létrehozhatók és felbonthatók. Ez a jellegzetesség nagyon fontos például a replikáció vagy transzkripció során, amikor a DNS kettős hélixet egybetartó hidrogén kötések felbontására kerül sor. A nem-kovalens interakciók másik fontos jellemzője, hogy megfelelően nagy számban, két összeillő felszín között specifikus kötést tud biztosítani.

A **nukleinsavak** (DNS és RNS) **nukleotidokból** épülnek fel: cukor (ribóz), foszfát és szerves bázis. A bázis lehet purin vagy pirimidin bázis: adenin (A), guanin (G), és timin (T – a DNS-ben), citozin (C) vagy uracil (U – RNS-ben). A bázisok glikozidos kötéssel kapcsolódnak a ribózhoz. A nukleotidok foszfodiészter kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, amelyek a ribóz 3'-OH és a másik nukleotid 5' foszfátja között létesül. Egy polinukleotid lánc szekvenciájának jelölése során a bázisok rövidített nevét használjuk az 5' („szabad” foszfát) végtől a 3' („szabad” OH) vég felé (AAGTCCT). A másik **eltérés az RNS és DNS szerkezete** között a ribóz struktúrájában van: a DNS-ben 2' deoxi-ribóz található. Az RNS-ben a 2' oxigén

jelenléte több következménnyel is jár: az RNS nem tud a DNS-hez hasonló szabályos kettős hélixet képezni, bár rendelkezik komplex másodlagos és harmadlagos szerkezettel, amelyeket számos hidrogén kötés rögzít. Emellett az RNS könnyebben bomlik, mint a DNS. Számos RNS molekulában, főként a tRNS és rRNS-ekben bázis módosulatokat találunk. Ezek egy része konzervált, ami azt jelenti, hogy az evolúció során megőrződtek jelentős szerkezeti/funkcionális szerepük miatt.

Említésre méltó, hogy az RNS-nek számos olyan funkciója, jellegzetessége van (öröklődő információ hordozó – vírusokban, enzimaktivitás – ribozimekben, magasabb rendű szerkezet, biokémiai reakciókban szereplő ribonukleotid kofaktorok), amely a kutatókat arra a következtetésre vezette, hogy eredetileg egy **úgy nevezett RNS világ** létezett. Később a DNS kialakulásával (stabilabb hordozója az örökítő anyagnak) és a fehérjék megjelenésével (nagyobb számú molekula a különböző funkciók betöltésére) ezen utóbbi molekulák vették át az RNS szerepeinek egy részét.

A **fehérjék** egymással peptid kötéssel kapcsolódó **aminosavakból** épülnek fel. A peptid kötést alkotó atomok egy síkban helyezkednek el, amely tény az egyik magyarázata a jellegzetes másodlagos és harmadlagos **szerkezetek** képződésének (lásd: Fehérjék típusai). Emlős sejtekben 20 fehérjeépítő aminosav található, amelyek nagymértékű variabilitásra adnak lehetőséget. Az aminosav oldalláncok sokféleképpen módosíthatók, ezek egy része állandó, mások reverzibilisek (lásd: poszttranszlációs fehérje módosítások). A fehérjék nagyszámú **funkciói** közül néhány: enzimek, strukturális elemek a sejten belül és az extracelluláris mátrixban, membrán csatornák és transzporterek, motor fehérjék, immun funkcióval rendelkező fehérjék és a vér komponensei (transzport, ozmotikus nyomás).

A fehérjék speciális strukturális egységei a motívum, a fold és a domén. A **motívumok** kis egységek, amelyekben a másodlagos szerkezetek több fehérjében is hasonló módon rendeződnek, ez általában hasonló funkcióval is jár. A **fold** a motívumokból szerveződik a másodlagos szerkezetek elrendeződésével. A **domén** egy fehérje régió harmadlagos szerkezeti elemeit is tartalmazza, ezen belül önállóan is felveheti a magasabb rendű szerkezetét, speciális funkcióval rendelkezik, és egy adott gén szakasz kódolhatja.

A **cukrok és szénhidrátok** nélkülözhetetlen komponensei a nuklein savaknak (pentóz), glikoproteineknek és glikolipideknek. **Energiaforrásul** szolgálhatnak (glikogén) és **strukturális** elemek lehetnek növényekben (cellulóz) és állatokban (kitin). Lipidekhez és fehérjékhez nagy oligoszacharid egységek csatlakozhatnak, amelyek révén megváltozik a molekula oldékonysága, antigenitása, és specifikus funkcióra tehet szert.

A **lipidek** nem mindig makromolekulák, de sokszor alkotják zsírsavak, egy vázmolekula (glicerín vagy szfingozin), foszfát és valamely alkohol kombinációját. **Energia raktárként** neutrális molekulák (triacil glicerín), de foszfolipidként poláros csoportot is hordoznak, és fontos alkotói a **membránoknak**. A lipidek egyes tagjai a **jelátvitelben** vesznek részt (lásd: Jelátviteli utak). A **koleszterin** is a lipidek csoportjába tartozik. Nélkülözhetetlen alkotója a membránoknak, és számos fontos származéka van (szteroid hormonok, epesavak).

Ez a tantárgy az élő sejtről, annak felépítéséről, a fő szerkezeti (strukturális) elemeiről és a molekuláris szintű szabályozásáról szolgáltat alapismereteket.

A sejt környezetétől elkülönül, de ugyanakkor azzal folyamatos anyag- és információcserében áll. Az élőlények két nagy csoportja az **egysejtűek és a többsejtű** organizmusok. Az utóbbiak esetében a terminálisan differenciálódott sejtek szöveteket és szerveket alkotnak. A szervezet különböző részei bonyolult információcserében állnak egymással.

A sejtek **prokarióták vagy eukarióták** lehetnek. **Közös jellemzőik** a következők:

- *Sejtmembránnal* rendelkeznek, amely molekulák importjára és exportjára képes.
- Az eltérő sejtaktivitásokhoz (szintetikus reakciók, mozgás, reaktivitás, molekulák kiválasztása, más sejtekkel való kapcsolattartás, hogy csak néhány példát említsünk) *energiára* van szükségük.
- A sejt vagy az egész szervezet reprodukciójához szükséges *genetikai információval* rendelkeznek, amely megbízható és szükség esetén a javítás lehetősége fennáll benne.

A sejtek valamely felszínhez, illetve más sejtekhez kapcsolódhatnak, vagy szabadon lehetnek valamely oldatban. Néhány specializált sejtben eltérő funkciók zajlanak a sejt különböző oldalain (apikális-bazális, enterociták, vese sejtek). A prokarióta sejteknek gyorsan és hatékonyan kell reagálniuk a környezeti változásokra. A prokarióta sejtekben nem található meg a legtöbb, eukarióta sejtben fellelhető sejtalkotó (lásd a két sejtípus összehasonlításáról szóló előadást). A **kompartmentalizáció** segíti a molekuláris biológiai és a biokémiai sejt folyamatok szabályozását.

A **sejtmembrán** sajátos szerkezettel rendelkezik, a legtöbb molekula számára nem átjárható (lásd: Membrán szerkezete és Fehérje transzport előadásokat, valamint biokémiából: Transzporterek és

csatornák). A környezettel való anyag kicserélődést speciális transzporter rendszerek segítik. Az extracelluláris (sejten kívüli) térből érkező jeleket a membránban található receptorok érzékelik és sejten belüli jelátviteli utaknak továbbítják, amelyek révén a sejt reagálni tud ezekre a jelzésekre. Valamennyi felsorolt aktivitás hozzájárul, hogy a sejt belső környezetét stabilan tartsa. A sejt folyamatosan vesz fel **energiát szolgáltató** molekulákat, és bocsát ki bomlástermékeket (ezek az enzimatikus reakciók a Biokémia tárgyát képezik).

A sejt **genetikai információja** a DNS tartalmában rejlik. Eukarióta sejtekben a DNS kromoszómákba organizálódik. A géntermékek fehérjék (proteinek) vagy RNS molekulák. A **gén expresszió regulációja** (szabályozása) határozza meg, hogy egy adott pillanatban a DNS mely szakasza használandó RNS szintézisre. A gén expresszió szabályozásának több szintje van: kromoszóma szerkezete, DNS és hiszton módosítások, transzkripció (RNS szintézis DNS templátról), RNS processzáció (érés), RNS degradáció (lebomlás), transláció (fehérje szintézis), fehérjék poszttranszlációs módosulása és degradációja. Az eukariót sejtek magasabb szintű strukturális rendezettsége (endomembrán rendszer, kompartmentalizáció, transzkripció és transláció elkülönítése) alapot szolgáltat a gén expresszió magas szintű szabályozásához.

Minden sejt ugyanazokat az alap elemeket és építőköveket tartalmazza: víz, szerves makromolekulák, amelyek közös építőkövekből tevődnek össze (lásd: táblázat az előadáson). **A víz** az élő sejt speciális közege, több mint egyszerű oldószer: sajátos szerkezete folytán a sejten belül nagyrészt organizált formában található, a makromolekulák magasabb rendű szerkezetében játszik szerepet és részt vesz enzimatikus reakciókban is. Poláros szerkezet révén nagyszámú H-kötés kialakítására képes nemcsak más vízmolekulákkal, hanem poláros makromolekulákkal (fehérjék, szénhidrátok) is.

A biológiailag fontos **makromolekulák négy fő csoportja**:

- Nukleinsavak (DNS, RNS)
- Fehérjék (a sejten legnagyobb mennyiségben található)
- Lipidek (méretük alapján valójában nem makromolekulák)
- Szénhidrátok (poliszaccharidok).

Ezek a molekulák **kis ismétlődő egységekből** épülnek fel: nukleotidokból, aminosavakból, zsírsavakból, illetve cukrokból (monoszacharidok). Ezen közös alap építőelemek léte miatt feltételezhetjük, hogy létezett a mai sejteknek egy közös őse (**LUCA: last universal common ancestor**).

Ha az élő sejtet felépítő elemeket vizsgáljuk, azt találjuk, hogy a sejt tömegének több, mint 90%-át a H, C, N és O adja. A sejten kis mennyiségben fellelhető elemeknek épp olyan fontos szerepük van, mint a dominánsoknak: strukturális komponensek (P), enzim reakciók kofaktorai (Mg, Se), vagy a sejt ionközegének komponensei, amelyek szerepet játszanak az akciós potenciál kialakulásában, az izomkontrakcióban vagy a jelátvitelben (Na, K, Ca).

A sejtet felépítő elemek és molekulák között fellépő erők különböző erősségűek: kovalens és nem-kovalens interakciók. A kovalens kötések sokkal erősebbek, kialakításuk és felbontásuk enzimreakciók eredményei. A nem-kovalens erők:

- Ionos interakciók (sókötés)
- Hidrogén kötés (híd)
- Van der Waals erők.

Ezen biológiailag jelentős erőknek a jellemzése az előadás anyagban található.

A **nem-kovalens erők biológiai jelentősége** az, hogy viszonylag gyenge interakciók, ámde nagy számban erős kötést biztosítanak, míg egyenként könnyen létrehozhatók és felbonthatók. Ez a jellegzetesség nagyon fontos például a replikáció vagy transzkripció során, amikor a DNS kettős hélixet

egybetartó hidrogén kötések felbontására kerül sor. A nem-kovalens interakciók másik fontos jellemzője, hogy megfelelően nagy számban, két összeálló felszín között specifikus kötést tud biztosítani.

A **nukleinsavak** (DNS és RNS) **nukleotidokból** épülnek fel: cukor (ribóz), foszfát és szerves bázis. A bázis lehet purin vagy pirimidin bázis: adenin (A), guanin (G), és timin (T – a DNS-ben), citozin (C) vagy uracil (U – RNS-ben). A bázisok glikozidos kötéssel kapcsolódnak a ribózhhoz. A nukleotidok foszfodiészter kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, amelyek a ribóz 3'-OH és a másik nukleotid 5' foszfátja között létesül. Egy polinukleotid lánc szekvenciájának jelölése során a bázisok rövidített nevét használjuk az 5' („szabad” foszfát) végtől a 3' („szabad” OH) vég felé (AAGTCCT). A másik **eltérés az RNS és DNS szerkezete** között a ribóz struktúrájában van: a DNS-ben 2' deoxi-ribóz található. Az RNS-ben a 2' oxigén jelenléte több következménnyel is jár: az RNS nem tud a DNS-hez hasonló szabályos kettős hélixet képezni, bár rendelkezik komplex másodlagos és harmadlagos szerkezettel, amelyeket számos hidrogén kötés rögzít. Emellett az RNS könnyebben bomlik, mint a DNS. Számos RNS molekulában, főként a tRNS és rRNS-ekben bázis módosulatókat találunk. Ezek egy része konzervált, ami azt jelenti, hogy az evolúció során megőrződtek jelentős szerkezeti/funkcionális szerepük miatt.

Említésre méltó, hogy az RNS-nek számos olyan funkciója, jellegzetessége van (öröklődő információ hordozó – vírusokban, enzimatis aktivitás – ribozimekben, magasabb rendű szerkezet, biokémiai reakciókban szereplő ribonukleotid kofaktorok), amely a kutatókat arra a következtetésre vezette, hogy eredetileg egy **úgy nevezett RNS világ** létezett. Később a DNS kialakulásával (stabilabb hordozója az örökítő anyagnak) és a fehérjék megjelenésével (nagyobb számú molekula a különböző funkciók betöltésére) ezen utóbbi molekulák vették át az RNS szerepeinek egy részét.

A **fehérjék** egymással peptid kötéssel kapcsolódó **aminosavakból** épülnek fel. A peptid kötést alkotó atomok egy síkban helyezkednek el, amely tény az egyik magyarázata a jellegzetes másodlagos és harmadlagos **szerkezetek** képződésének (lásd: Fehérjék típusai). Emlős sejtekben 20 fehérjeépítő aminosav található, amelyek nagymértékű variabilitásra adnak lehetőséget. Az aminosav oldalláncok sokféleképpen módosíthatók, ezek egy része állandó, mások reverzibilisek (lásd: poszttranszlációs fehérje módosítások). A fehérjék nagyszámú **funkciói** közül néhány: enzimek, strukturális elemek a sejten belül és az extracelluláris mátrixban, membrán csatornák és transzporterek, motor fehérjék, immun funkcióval rendelkező fehérjék és a vér komponensei (transzport, ozmotikus nyomás).

A fehérjék speciális strukturális egységei a motívum, a fold és a domén. A **motívumok** kis egységek, amelyekben a másodlagos szerkezetek több fehérjében is hasonló módon rendeződnek, ez általában hasonló funkcióval is jár. A **fold** a motívumokból szerveződik a másodlagos szerkezetek elrendeződésével. A **domén** egy fehérje régió harmadlagos szerkezeti elemeit is tartalmazza, ezen belül önállóan is felveheti a magasabb rendű szerkezetét, speciális funkcióval rendelkezik, és egy adott gén szakasz kódolhatja.

A **cukrok és szénhidrátok** nélkülözhetetlen komponensei a nuklein savaknak (pentóz), glikoproteineknek és glikolipideknek. **Energiaforrásul** szolgálhatnak (glikogén) és **strukturális** elemek lehetnek növényekben (cellulóz) és állatokban (kitin). Lipidekhez és fehérjékhez nagy oligoszacharid egységek csatlakozhatnak, amelyek révén megváltozik a molekula oldékonysága, antigénitása, és specifikus funkcióra tehet szert.

A **lipidek** nem mindig makromolekulák, de sokszor alkotják zsírsavak, egy vázmolekula (glicerín vagy szfingozin), foszfát és valamely alkohol kombinációját. **Energia raktárként** neutrális molekulák (triacil glicerín), de foszfolipidként poláros csoportot is hordoznak, és fontos alkotói a **membránoknak**. A lipidek egyes tagjai a **jelátvitelben** vesznek részt (lásd: Jelátviteli utak). A **koleszterin** is a lipidek csoportjába tartozik. Nélkülözhetetlen alkotója a membránoknak, és számos fontos származéka van (szteroid hormonok, epesavak).



## 2. PRO- ÉS EUKARIÓTA SEJTEK

### 2.1. A PROKARIÓTA SZERVEZETEK BESOROLÁSA

Az élő szervezeteket három nagy rendszertani kategóriába, doménbe sorolhatjuk: archeák, baktériumok és eukarióták. Előbbi két csoportot nevezzük prokariótáknak, sejtmag nélkülieknek. Az archeák közül az extremofilek a legismertebbek, orvosi jelentőségük miatt leginkább csak a valódi baktériumokról, az eubaktériumokról ejtünk szót.

### 2.2. EUKARIÓTA ÉS PROKARIÓTA SEJTEK KÜLÖNBSÉGEI

#### Sejt szervecskék

Az eukarióta és prokarióta szervezetek legfőbb különbsége, hogy előbbiek rendelkeznek endomembrán organellumokkal. Ez alapján képesek elválasztani a sejtek bizonyos területeit, így ott optimális feltételek alakíthatóak ki (pl. lizoszómák). Az organellumok listáját az alábbi táblázat tartalmazza:

	Prokarióták	Eukarióták
Nukleáris membrán	nincs	van
Golgi apparátus	nincs	van
Endoplazmatikus retikulum	nincs	van
Lizoszómák	nincs	van
Citoszkeleton	(nincs)	van
Mitokondrium	nincs	van
Kloroplasztisz	nincs	van/nincs

#### Örökítő anyag

A sejtmag jelenléte mellett még számos különbséget fedezhetünk a fel az eu- és prokarióta szervezetek örökítőanyaga között. A prokarióta, cirkuláris kromoszómából jellemzően egyet találunk sejtenként (haploid élőlények), addig az eukarióták lineáris kromoszómapárokkal rendelkeznek (diploid vagy poliploid). A prokarióta örökítő anyag minimális mennyiségű nem-kódoló DNS szakaszt hordoz. Intronokat nem találunk. Génjeikről történő expresszió jellemzően csoportonként van szabályozva (operonok, lásd prokarióta génexpresszió szabályozása). Az eukarióták genomjában nagy mennyiségű nem-kódoló szakasz található, génjeik kifejeződését génenként szabályozzák.

Az alábbi táblázat foglalja össze a különbségeket:

	Prokarióták	Eukarióták
<b>Sejtmag</b>	nincs	van
<b>Kromoszómák</b>	egy cirkuláris + plazmidok	több, mint egy; lineáris
<b>Ploiditás</b>	haploid	általában diploid
<b>Rekombináció</b>	részleges	meiózis
<b>DNS kötő fehérjék</b>	néhány fehérje	hisztonok
<b>Génexpresszió reguláció</b>	operonként	géneként
<b>Intron</b>	nincs	van
<b>Nem kódoló DNS</b>	kevés	sok

### Transzkripció és transzláció

A legfontosabb különbség, hogy amíg az eukarióták esetében a transzkripció és a transzláció is térben elkülönítve történik (rendre a sejtmagban illetve az endoplazmatikus retikulumban), addig a prokariótáknál nincs sem térbeli, sem időbeli elválasztás. Ennek jelentőségét lásd. a prokarióta transzkripció szabályozása fejezetben.

	Prokarióták	Eukarióták
mRNS érés	nincs	-5' CAP -intron hasítás -polyA farok
riboszómák lokalizációja	szabad	ER + szabad
riboszómák mérete	70S	80S

## 2.3. AZ ENDOSZIMBIONTA ELMÉLET

A legnagyobb sejtszervecskék, a mitokondriumok és a kloroplasztiszok számos tulajdonsága nagy hasonlóságot mutat a prokariótákkal:

Ezen sejtszervecskék saját, cirkuláris DNS-sel rendelkeznek, melyek a prokarióta sajátosságokat viselik magukon. Prokarióta jellegű enzim és transzportrendszerekkel rendelkeznek, továbbá a 70S riboszómák végzik a fehérjék szintézisét.

Mindezt összevetve valószínűsíthető, hogy a mitokondrium és a kloroplasztisz ősi prokarióták részleges bekebelezésével keletkeztek. A kialakuló szimbiózis mind az eukarióta sejtnak, mind az önállóságát elvesztett prokariótának előnyös.



## 2.4. SEJTFAL FELÉPÍTÉSE, TÍPUSAI

Számos pro- és eukarióta sejt veszi körbe magát sejtfallal. Látni fogjuk, hogy az egyes csoportokban a sejtfal felépítése nagyon különböző, ellátott szerepük mégis nagyon hasonló: mechanikai védelem, ozmotikus védelem, megszűri a sejtmembránig eljutó anyagokat.

**Bakteriális sejtfalak:** A bakteriális sejtfalakat nagyon is gyakorlatias módon két fő csoportba oszthatjuk aszerint, hogy a Gram festéssel megfestődnek (Gram-pozitív baktériumok: kékes-lilásan festődnek, Gram-negatív baktériumok: rózsaszínes-pirosas festődést kapnak)

Gram-pozitív baktériumok: a sejthártyát egy vastag peptidoglikán réteg borítja. Ide tartoznak például a *Staphylococcus*, a *Streptococcus* és a *Bacillus* nemzetségek.

Gram-negatív baktériumok: a belső sejthártya után közvetlenül a periplazmikus tér majd egy vékony peptidoglikán réteg következik. Kívülről egy külső sejthártya burkolja a sejtet. A külső hártya fontos a fehérjéi a porinok, amik a megszűrik, mely anyagok juthatnak el a belső membránig. Fontos molekulák még a lipopoliszacharidok (LPS), melyek az immunrendszerünk fontos antigénjei.

**Növényi sejtfalak:** Növényi sejtfalak esetében megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos sejtfalakat. Az elsődleges sejtfal a még osztódó szövetekre jellemző, fő felépítő anyagai a cellulóz, hemicellulóz és a pektin. Másodlagos sejtfal a már nem osztódó szövetekre jellemző, még nagyobb mechanikai stabilitást nyújt (pl. fák törzse). Anyagai: cellulóz, xylán, lignin.

**Gomba sejtfal:** A gombák sejtfalának legjellemzőbb felépítő anyaga a kitin. Gombás fertőzések esetén alkalmazott antibiotikumok többsége a sejtfalszintézis gátlásán alapul.



## 3. ŐSSEJTEK

### 3.1. AZ ŐSSEJTEK DEFINÍCIÓJA

Az őssejtek **tőbbsejtő** őlőlényekben megtalálható sejtek. Mitotikus osztódással képesek számos különböző sejtípusra differenciálódni. Képesek a folyamatos őnmegőjítésre.

Napjainkban az őssejtterápia miatt kerültek a figyelem homlokterébe.

### 3.2. AZ ŐSSEJTEK TÍPUSAI

Az őssejtek célszerű a differenciációs képességük, potenciájuk alapján csoportosítani. Minél potensebb egy sejt, annál több féle sejté tud differenciálódni.

- Totipotens (omnipotens) őssejt: az ősszes (embrionális **és extraembrionális**) szövet és szerv létrehozására képes. Totipotens sejtnek tekintjük a megtermékenyített petesejtet az első néhány osztódásig.
- Pluripotens őssejt: (Plurimus: sok, számos) Csökkent potenciával rendelkező őssejt, mely nem képes extraembrionális szövet létrehozására, de mindhárom csíralemez kialakítására és ivarsejtek képzésére is alkalmas. Ilyen az embrionális-őssejt.
- Multipotens őssejt: Csökkent potenciával rendelkező őssejt, mely nem képes ivarsejt létrehozására, de bármely, egy csoportba tartozó sejtípus kifejlődhet belőle. Ilyenek a szervezet szöveti őssejtjei.
- Unipotens őssejt: egyetlen sejtípust képes előállítani, de képes a megőjülésre, ami megkülönbözteti a nem őssejt testi sejtektől (pl. izom-őssejtek).

### 3.3. AZ ŐSSEJTEK FORRÁSA

Az őssejtek gyógyászatban való felhasználásának egyik legfontosabb kérdése, hogy honnan izolálhatóak őssejtek.

Embrionális őssejtek (ES, embryonic stem cell): Blasztociszta állapotú embrióból izolált őssejtek. (Humán embrióknál ez a megtermékenyítést követő 4.-5. nap) Pluripotens őssejtek.

Szöveti (szomatikus) őssejtek: Felnőtt szervezetből is izolálhatóak őssejtek. Potenciájuk és osztódási képességük alacsonyabb, mint az embrionális őssejteké. Jellemzően multipotens őssejtek. Számuk a szervezet őregedésével csökken.

Kőldökszinórvérből izolált őssejtek: Kőldökszinórvérből is izolálhatóak pluripotens őssejtek, felhasználásukról lásd az előadást.

Indukált pluripotens őssejtek (iPSC): Differenciálódott testi sejtek a megfelelő transzkripciós faktorokkal való kezelés hatására képesek pluripotens őssejteké átalakulni. Az iPSC-k orvosi felhasználása nagyon ígéretes. Shinya Yamanaka és Sir John Gurdon 2012-ben átvehették az Orvosi Nobel díjat felfedezésükért.

A sejtek típusától függetlenül beszélhetünk autológ vagy heterológ őssejtekről: Előbbi is esetben a beteg saját őssejtjei kerülnek beültetésre, utóbbi esetben pedig másból származó sejtek.

### 3.4. AZ ŐSSEJTTERÁPIA VESZÉLYEI

Az őssejterápia hatalmas potenciállal rendelkezik, számos betegség (pl: neurodegeneratív kórképek, gerincvelő sérülések, DM1) gyógyítását ígéri, azonban súlyos veszélyekkel is számolnunk kell.

- Szélhámosság: Mivel a mai napig nincsen elfogadott, működő és biztonságos őssejterápia, ezért a hirdetésekben található kezelések szinte minden esetben átverések.
- Teratóma: A beültetett őssejtek malignus daganatokat is képezhetnek.
- Az eredeti betegség kiújulása: Autológ transzplantációnál a beültetett őssejtek génállománya nem különbözik a testi sejtektől.

### 3.5. ŐSSEJTTERÁPIA AZ ORVOSI GYAKORLATBAN

Számos betegség gyógyításában ígéretes lehet az őssejterápia.

Jelenleg, hazánkban is alkalmazott, őssejterápia a hematopoetikus őssejt transzplantáció, köznapi nevén a csontvelő átültetés. A vérképző szervek kórképei (pl.: leukémia, mielóma multiplex, SCID (lásd: génterápia előadás)) gyógyíthatóak. A vérképző őssejtek leggyakoribb forrása a csontvelő, de származhatnak vérből vagy köldökzsinórvérből is. A kezelés során a donorból izolálják az őssejteket, a recipiens immunrendszerét pedig kemoterápiával vagy besugárzással eradikálják. Ezek után következhet az őssejtek átültetése. Ez a beavatkozás napjainkban sem veszélytelen (extrém fertőzésveszély, graft-versus-host reakció, élethosszig tartó immunszuppresszáns kezelés), ezért kizárólag a súlyos, más módon nem gyógyítható betegeket kezelik ezzel a módszerrel.

## 4. A SEJTEK SZERKEZETE

### 4.1. AZ EUKARIÓTA SEJT MEMBRÁNJAI

#### Bevezetés

A kétrétegű foszfolipid membrán kialakulása elengedhetetlen a sejt kialakulásához. A sejtet körülvevő membrán egy flexibilis lemeznek tekinthető, melyet foszfolipidek és különböző fehérjék alkotnak. A sejtben elhelyezkedő membránok szükségesek a sejtalkotók létrehozásához. Ugyanakkor a membránok alapvető szerepet játszanak a sejtek szétválasztásában és összekapcsolásában is.

1957-ben elektronmikroszkópos vizsgálat során J. D. Robertson írta le először a sejtmembránt. Habár a mikroszkópos képen a lipid membrán háromrétegű struktúrának tűnik, valójában a plazmamembrán kettős lipid rétegű, külső és belső lemezekkel. A két lemez között a lipidek apoláros feji része egy vékony köztes réteget képez (lemezek közti tér, Lásd előadás ábra).

#### A plazmamembrán

##### A plazmamembrán funkciói

1. A plazmamembrán elválasztja egymástól a sejteket, ugyanakkor nélkülözhetetlen a sejtek közötti összeköttetések kialakításában. A plazmamembrán egy *szelektív határt* képez a sejt körül, mely képes elválasztani a töltött molekulákat, ugyanakkor biztosítja a szelektív áramlásukat a lipid kettősrétegen keresztül.
2. A membránon keresztül végbemenő *szelektív molekula transzport* fehérjék által kialakított csatornákon és pórusokon keresztül zajlik. Az anyagok transzportja szigorúan szabályozott, ugyanakkor a molekulák egy része képes passzív transzporttal vagy diffúzió útján átjutni a plazmamembránon. Más molekulák (pl. aminosavak, cukrok) ATP hidrolízisével jutnak át a plazmamembránon. Ezt nevezük aktív transzportnak.
3. A plazmamembrán képes az *extracelluláris*, azaz kívülről jövő *jelekre válaszolni*. Az extracelluláris szignál molekulák speciális membrán fehérjékhez, úgynevezett receptorokhoz kötődnek, majd a receptor fehérjén keresztül jelet továbbítanak a sejten belülre. Így a szignál molekulák képesek megváltoztatni a sejt életét (növekedés, metabolikus aktivitás stb.) A jelmolekulák egy csoportja, apoláros jellegüknek köszönhetően képes átdiffundálni a membránon, így a sejt belsejében fejtik ki hatásukat (citoplazmatikus és sejtmagi receptorokon hatnak). A teljes jelátviteli folyamatot szignál transzdukciónak nevezük (részletek a jelátvitel fejezetben).
4. Habár a plazmamembrán elválasztja a sejteket egymástól, a sejtek képesek kommunikálni egymással szignál molekulákkal vagy más speciális fehérjékkel és lipidekkel, melyek a plazmamembrán külső lemezében helyezkednek el. A sejtek képesek felismerni egymást a sejtfelszíni molekulák révén és jeleket küldenek a szomszédos sejteknek (*intercelluláris interakciók*).
5. Az intracelluláris membránok alapszerkezete megegyezik a plazmamembránéval. Ezek a membránok a citoszól különböző régióit határolják körül, úgynevezett kompartmenteket hoznak létre. A *kompartmentalizáció* eredményeként jönnek létre a citoplazmában a sejtalkotók (sejtmag, mitokondrium, kloroplasztisz-csak növényi sejtekben és néhány baktériumban, riboszómák, endoplazmás retikulum, Golgi komplex, peroxiszómák, növényi vakuólumok).
6. A membránok egymástól jól elkülönülő kompartmenteket hoznak létre, így elválasztják a sejtek eltérő biokémiai aktivitású rendszereit. Tulajdonképpen *védelmet biztosítanak* a re-

akciók számára (az enzimeknek és a szubsztrát molekuláknak), fenntartják a résztvevő molekulák aktív (stabil) formáját.

7. A mitokondrium és a kloroplasztisz membránjai a sejtek *energia transzdukciójában* vesznek részt. Ezek a membránok speciális rendszereket tartalmaznak (transzport molekulák és enzimek), melyek képesek a fényenergiát kémiai energiává alakítani (kloroplasztisz) vagy a kémiai energiát ATP szintézisre felhasználni (mitokondrium).

### A lipid kettősréteg

1970-ben L. D. Frye és Michael Edidin fluoreszcens antitestekkel kimutatta, hogy a plazmamembrán molekulái képesek elmozdulni a membrán egyik pontjáról a másikba, ezzel bizonyítva, hogy a membránok folyékonyak. 1972-ben S. Jonathan Singer és Garth Nicolson leírták a plazmamembrán részletes szerkezetét, ezzel megalapozva egy új modell a *folyékony mozaik modell* elméletét, mely a membrán biológia centrális dogmájaként is ismert. A lipid kettősréteg minden membrán szerkezetére jellemző, habár eltérő mennyiségű és minőségű fehérjét és lipideket tartalmaznak. A membrán folyékony állapotában a lipidek laterálisan mozognak a két lemezben, vagyis a membrán egy dinamikus struktúra, amelyben a különböző molekulák elmozdulhatnak és új kapcsolódási pontokat hozhatnak létre egymás között.

A lipid kettősréteg két lemezből épül fel, a külső vagy extracelluláris illetve a belső vagy intracelluláris lemezekből. A fő alkotóik a foszfolipidek. A foszfolipidek képesek spontán membránokat képezni az aggregációjuk során. A membrán képzés hátterében a foszfolipidek kémiai tulajdonságai állnak. A lipidek amfipatikus molekulák poláros (hidrofil) és apoláros (hidrofób) csoportokkal. Mivel a poláris feji részek vízdékonyak, ezért ezek a membrán lemezből kifelé állnak, míg az apoláros részek a lemezek közötti tér fele fordulnak (lásd ábra).

A membrán külső felszínén glikolipidek és glikoproteinek (lipidek és fehérjék rövid cukor láncokkal kiegészülve) helyezkednek el. Ezek a sejtfelszíni molekulák a jelátvitelben, a felismerésben, az adhézióban vagy csatornaépítésben játszanak szerepet, illetve transzporterként is funkcionálhatnak. A fehérjék egy része apoláros alfa-hélixekkel rendelkezik, melyek átívelnek a membránon, így receptorként vagy transzporterként funkcionálnak.

### Membrán lipidek

(A lipidek szerepéről, szintéziséről a Gyógyszerészi Biokémia tantárgy keretein belül lesz bővebben szó)

A membrán lipidek három fő típusa: foszfoglicerinek, szfingolipidek és koleszterin (lásd előadás ábra).

1. Foszfoglicerinek: foszfát csoportot és glicerin vázát tartalmaznak; A glicerin két hidroxil csoportját észteresíti zsírsav, a harmadik hidroxil csoporthoz a foszfát csoport kötődik észter kötéssel. A foszfoglicerinek alap típusa a foszfatidsav nem található meg a membránokban.  
Foszfoglicerinek típusai (a szubsztituensek alapján):
  - a) foszfatidilkolin- semleges
  - b) foszfatidiletanolamin- semleges
  - c) foszfatidilszerin- negatív töltésű
  - d) foszfatidil inozitol- negatív töltésű
2. *Szfingolipidek*: az alap molekula a ceramid, melyben a szfingozin egy zsírsav molekulával alakít ki kötést. Amfipatikus molekulák, hasonlítanak a foszfoglicerinekhez.  
A szfingolipidek típusai (a szubsztituensek alapján):
  - a) Szfingomielin (foszforilkolin): az egyetlen membrán foszfolipid, ami nem glicerin vázas

- b) Glikolipidek (szénhidrát):
  - cerebrozid: szubsztituens egyszerű cukor
  - gangliozid: szubsztituens egyszerű cukrokból álló csoport
- 3. Koleszterin: A hidrofil feji régió a külső rész fele néz, míg a hidrofób része a membránba ágyazódik.

#### A lipidek szerepe a membránban / A membrán fluiditás

Az eukarióta sejtek membránjainak lipid összetétele igen változatos, mind típusban, mind pedig mennyiségben (lásd táblázat). A lipidek meghatározzák a membránok fizikai állapotát, befolyásolják a fehérjék mozgását és aktivitásukat. A lipidek jelenléte miatt a membrán szerkezete folytonos és flexibilis, képes megváltoztatni az alakját, szerepet játszik a sejt mozgásában. A membránok képesek fuzionálni egymással és vezikulumokat képezni, így a membránoknak fontos szerepe van az anyagok transzportjában.

A membrán két lemezének is eltérő a lipid összetétele. Ezt a tulajdonságot nevezzük lipid asszimetriának, melynek oka a két membrán lemez eltérő funkciója (lásd ábra). A glikolipidek a külső lemezben helyezkednek el, és többnyire receptorok. A foszfatidiletanolamin és a foszfatidilszerin molekulák a belső lemezben helyezkednek el. A foszfatidiletanolamin a membrán fúzióban, míg a foszfatidilszerin a pozitív töltésű aminosavak megkötésével a csatornaképzésben játszik szerepet.

A membránok lipid összetétele nagyban befolyásolja a membránok egyik legfontosabb fizikai tulajdonságát, a fluiditást (viszkozitást). A lipidek felelősek a membránok folyékony állapotának fenntartásáért, azonban ezt a tulajdonságot a hőmérséklet is befolyásolja. Általában (~37°C) a lipidek laterálisan mozognak, vagy rotációs mozgást végeznek a membránban. Ezt az állapotot hívjuk *folyékony kristályos* állapotnak. Ha a hőmérséklet csökken, a membrán lipidek nem képesek továbbiakban mozogni a membránban; a folyékony kristályos állapot *gél állapotba* fordul. Ezt a folyamatot fázis tranzíciónak nevezzük. A hőmérsékleti érték, ahol a tranzíció bekövetkezik *tranzíciós hőmérsékletnek* hívjuk (lásd ábra). A tranzíciós hőmérséklet a *telítetlen zsírsavak* mennyiségétől függ. Minél *több* a telítetlen zsírsav a membránban, annál *alacsonyabb* a gél állapot eléréséhez szükséges hőmérséklet. A koleszterin mennyisége szintén befolyásolja a membrán fluiditását. Mivel a koleszterin szerkezetéből adódóan viszonylag merev molekula, így rigidebbé teszi a membránt és csökkenti a permeabilitását. Ugyanakkor a koleszterin molekulák kapcsolatba lépnek a foszfolipidekkel, csökkentve a mobilitásukat a lipid kettős rétegben. Így elmondhatjuk, hogy a koleszterin a membránok intermedier fluiditását képes fenntartani.

Alapvető kérdés, hogy a sejtek hogyan képesek fenntartani a membrán fluiditást a változó környezetben. A válasz pedig az *átrendeződés* folyamata. A sejtek képesek megváltoztatni a membránok különböző foszfolipid molekuláinak százalékos összetételét, illetve képesek megváltoztatni a zsírsavak szaturációját, vagyis a telített és a telítetlen zsírsavak arányát. Ez utóbbi folyamatban a sejtek a deszaturációval (telítetlenné alakítják) az egyes kötéseket kettős kötéseké alakítják a zsírsavakban, majd újraosztják a zsírsav oldalláncokat, így új telítetlen foszfolipideket hoznak létre. A folyamatot speciális enzimek katalizálják: deszaturázok, foszfolipázok és aciltranszferázok.

#### Membrán fehérjék

A membrán fehérjék típusai és mennyisége a sejt típusától függ. Eltérő sejtekben eltérő mennyiségű és funkciójú fehérjék épülnek be a membránokba. A fehérjék egy része csak a membrán külső felszínén található meg (receptor fehérjék, sejt kapcsoló fehérjék), míg egyes fehérjék csak a membrán belső felszínén található meg (jelet küldenek a citoplazmába). A membrán fehérjéket három csoportba soroljuk:

1. Integráns vagy transzmembrán fehérjék (pl. glikoforin A, lásd ábra):
  - Átívelnek a plazmamembránon
  - Szerkezetük három részből épül fel: extracelluláris domén, transzmembrán domén/domének, (egyszer vagy többször mennek át a membránon) és intracelluláris domén. A transzmembrán régió alfa hélix szerkezeti elemeket tartalmaz.
  - Szerepük: receptorok, csatornák és transzporterek (ion, anyag- és elektron transzfer)
  - Amfipatikus molekulák
  - Közvetlenül kapcsolódnak a foszfolipidekhez (barrier).
  - Mozognak a két lemezben.
2. Perifériális membrán fehérjék:
  - A külső vagy a belső membrán lemezen is megtalálhatók.
  - A membránhoz gyenge elektrosztatikus kölcsönhatással kapcsolódnak.
  - Integráns membrán fehérjéket horgonyoznak ki.
  - Egyéb funkciók: enzimek, jelátvitelben szerepet játszó molekulák
3. Lipid-horgonyzott membrán fehérjék:
  - A membrán külső és belső felszínén is megtalálhatók
  - A membrán egyik lipid molekulájához kapcsolódnak (lipid-horgonyzott)
  - GPI-horgonyzott fehérjék (glikozil-foszfatidilinozitol) a membrán külső felszínén helyezkednek el: receptorok, enzimek, adhéziós molekulák
  - Citoplazmatikus lipid-horgonyzott fehérjék hosszú szénhidrát oldalláncok segítségével ágyazódnak be a membrán belső lemezébe: enzimek, jelátviteli molekulák.

#### A plazmamembrán dinamikus struktúra

A plazmamembrán olyan folyékony membrán, melyben a molekulák (lipidek és fehérjék) mozogni képesek. A fehérjék mobilitása a membrán foszfolipid összetételétől függ, így a lipidek tartják fenn a fluiditást.

1. A lipidek mozgása (lásd ábra):
  - Laterális elmozdulás: a lemezen belül gyorsan diffundálnak laterális irányban
  - Transzverz diffúzió: lassú flip-flop mozgás a két lemez között. A mozgást a flippáz enzimek segítik, specifikus foszfolipidek (foszfatidiletanolamin, foszfatidilszerin) ugrálását katalizálják a plazmamembránban az extracelluláris felszínről a citoplazmatikus lemezbe. A flippázok ATP hidrolízisével biztosítják az energiát a lipidek mozgásához.
2. A membrán fehérjék mozgása (lásd ábra):
  - A membránon belül történő random mozgás közepes sebességgel (csökkent diffúzió).
  - Irányított mozgás a membránban.
  - A fehérjék egy része nem képes mozogni, immobilis.
3. Az integráns membrán fehérjék mozgás mintázata (lásd ábra):
  - Random mozgás/diffúzió
  - Immobilis fehérjék: citoskeletális elemekhez kötődnek
  - Immobilis fehérjék: intermembrán fehérjékhez kötődnek
  - Immobilis fehérjék: a citoskeletális fehérjék szabnak gátat a mozgásnak
  - Immobilis fehérjék: extracelluláris mátrix elemekhez kötődnek
  - Csak egy irányba mozognak a motorfehérjék révén

#### Glikokálix

A glikokálix egy *szénhidrátokban gazdag zóna* az extracelluláris lemez felszínén. A fehérjék egy része glikozilált, a szénhidrátokkal együtt burkolják be a sejtfelszínt. Ezek a szénhidrátok integráns membrán fehérjékhez és lipidekhez kötődnek, glikoproteineket és glikolipideket és *proteoglikánokat* képeznek. A proteoglikánokban a hosszú poliszacharid láncok a központi fehérje részhez kapcsolódnak. A



fehérje központ áthaladhat a plazmamembránon vagy GPI-hez kötődik. Formálisan a glikokálix az extracelluláris mátrix része.

A glikokálix szerepe:

- Védelmet nyújt a mechanikai és kémiai behatásokkal szemben
- Fenntartja a sejtek közötti kapcsolatokat
- A szomszédos sejteket adott távolságban képes tartani egymástól, így gátolva a fehérje-fehérje interakciókat.

#### A foszfolipid kettősréteg permeabilitása

(A transzporterekről, ion csatornákról és a transzport típusairól bővebben a Gyógyszerészi Biokémia tantárgyban lesz szó)

Az eltérő transzport mechanizmusokat az alapján csoportosítjuk, hogy milyen anyagok (ionok, cukrok, aminosavak stb.) haladnak át a plazmamembránon.

1. Diffúzió a lipid kettősrétegen keresztül: A molekula a membránon keresztül mindig a magasabb koncentrációjú helyről az alacsonyabb koncentrációjú hely fele halad.
2. Diffúzió a vizes közegű, fehérjével burkolt csatornán keresztül
3. Facilitált diffúzió: a facilitált transzport fehérje megköti a szállítandó molekulát, konformáció változáson esik át, és segíti a molekula áthaladását a csatornán. A csatorna kivezető oldalán a transzport molekula disszociál a fehérjétől.
4. Aktív transzport: Energiatermelésre alkalmas fehérje szükséges hozzá, mely az energiát az ATP hidrolíziséből nyeri. A felszabadult energiát használja a transzport molekula membránon való átpumpálásához a koncentráció grádiens ellenében. Ebben az esetben a transzportálandó anyagok a magasabb koncentrációjú hely fele mozognak.

#### A sejtmag membrán

Az eukarióta sejtmag kromatinból (kromoszómális DNS), egy vagy több sejtmagvacskából (riboszómális RNS szintézis), nukleoplazmából és a nukleáris mátrixból (fibrilláris hálózat) épül fel.

#### Sejtmag hártya

(lásd ábra)

A sejtmagot a citoplazmától két membrán választja el: a belső sejtmagi membrán és a külső sejtmagi membrán. Mindkét lemez foszfolipid kettősrétegből és a hozzá kapcsolódó fehérjékből épül fel. A két membrán között 10-50 nm szélességű intermembrán tér helyezkedik el, mely folytonos az endoplazmás retikulummal. A nukleáris membrán fő funkciója az ionok, transzport anyagok és makromolekulák szabad áramlásának gátlása.

1. Belső nukleáris membrán: specifikus fehérjéket tartalmaz, melyek kihorgonyozzák a kromatin szálakat és a *nukleáris laminát*.
2. Külső nukleáris membrán: riboszómák találhatóak a felszínén, folytonos az endoplazmás retikulum membránjával.
3. Nukleáris lamina: fehérjehálózat, mely mechanikai támaszt nyújt a maghártjának. *Laminokból* épül fel, melyek citoplazmatikus *intermedier filamentumok*. A laminok összerendezését foszforiláció és defoszforiláció szabályozza.

### Nukleáris pórus komplex

(lásd ábra)

A nukleáris pórusok a sejtmag membránon keresztül folyó anyagtranszportban játszanak szerepet. Ez a transzport mechanizmus jelentősen különbözik a plazmamembránon keresztül történő transzporttól. A nukleáris pórus komplex (NPK) a nukleáris pórusban helyezkedik el, kinyúlik a citoplazmába és a sejtmag plazmájába, szabályozza a póruson keresztüli anyagtranszportot.

#### A nukleáris pórus komplex szerkezete és tulajdonságai

1. Az emlős sejtek 3-4000 NPK-t tartalmaznak.
2. Az NPK 30 különböző NPK fehérjéből épül fel (100 kópia), melyeket nukleoporinoknak nevezünk.
3. Oktagonális szimmetriájúak.
4. Transzport sebesség: 500 makromolekula/sec
5. Transzport iránya: kétirányú, egyidőben történő transzport
6. Egy vagy több vizes csatorna: kicsi, vízdékony molekulák diffúzióval jutnak át.
7. A nukleáris kosarat a nukleoplazmába kinyúló, hosszú filamentumok disztális vége alkotja; a filamenteket egy gyűrű-szerű képlet kapcsolja össze.
8. A citoplazmatikus filamentumok az NPK citoplazmatikus oldaláról nyúlnak a citoplazmába.
9. Proximális filamentumok a központi transzporter fehérjéhez kapcsolódnak és együtt képeznek csatornát.
10. A központi csatorna fenilalanin-glicin ismétlődéseket tartalmazó nukleoporinokból épül fel.
11. Az NPK beágyazódik a sejtmag membránba.
12. A citoplazmatikus és a nukleoplazmatikus gyűrűk tartják az NPK-t a helyén a nukleáris membránban.
13. A külső és belső küllőgyűrűk kötik össze a citoplazmatikus és a nukleoplazmatikus gyűrűket és ezek tartják fenn az NPK szerkezetét.
14. Kicsi (5000 Da-nál kisebb) és vízdékony molekulák diffúzióval mozognak
15. Nagy molekulák (több mint 60000 Da): aktív transzporttal mozognak
16. A riboszómális alegységek, az RNS és a DNS polimerázok (több mint 100000-200000 Da) specifikus receptor molekulák segítségével transzportálódnak

## 4.2. SEJTMAG

### Sejtmag

A sejtmag a legnagyobb sejtszervecske, a sejt genetikai állományát tartalmazza (kromatin). A sejtmagot határoló sejtmagbárta védelmet nyújt a DNS számára, valamint a génexpresszió lépéseinek térbeli szeparációja révén kifinomult génexpresszió-szabályozást tesz lehetővé.

#### A sejtmag szerkezete

(ábra: ld. előadás diasor)

A **sejtmagbárta**, vagy röviden **magbárta** a sejtmagot határoló kettős membránstruktúra. A magpóruskomplexeken (NPC) keresztül történik a nukleocitoplazmatikus transzport (ld. „Sejtmembrán, magmembrán” fejezet).

A **sejtmagvacska** (nukleólusz) dinamikus, membránnal nem határolt, mégis tisztán elkülöníthető struktúra a sejtmagon belül. A telofázis késői szakaszában a magvacska a NOR (Nukleólusz Organizátor Régió) körül épül fel, amely számos rRNS génkópiát tartalmaz. Később, amikor a sejt a

mitózisba lép, a magvacska felbomlik – ezért nevezzük dinamikus struktúrának. A nukleólusz membránnal nem határolt, mégis jól megfigyelhető fáziskontraszt-mikroszkóppal, nagy denzitása miatt. A sejtmagvacska főleg a riboszómális RNS átírásában, és a riboszóma alegységek biogenezisében és összeszerelésében vesz részt. Újabb kutatások fényt derítettek rá, hogy az RNS editing, DNS repair és tRNS processzing folyamataiban is van szerepe a magvacskának.

A **nukleoplazma** a sejtmag alapállománya, a transzkripció és az mRNS érés (pl. splicing) helyszíne. Az érett mRNS a magpórus komplexeken keresztül a citoszólba transzportálódik, ahol a riboszómákon megkezdődik a transláció: az mRNS szekvencia alapján polipeptid-lánc jön létre. A nukleoplazmán belül több különböző membránnal nem határolt szubkompartment található (pl. Cajal-testecske).

A **kromatin** a sejtek genetikai állománya. Elektronmikroszkópos képeken a kromatin két különböző formában van jelen. A **heterokromatin** kondenzált DNS-ből áll, ami nem íródik át aktívan, valamint a laza szerkezetű, **eukromatin** expresszálandó géneket tartalmaz. Az eukromatin dekondezál, hisztonoktól és egyéb fehérjéktől mentes, hogy a DNS az RNS-polimerázok számára elérhető legyen. Az egyes sejttípusok különböző expressziós mintázattal, így más-más kromatin-szerkezettel rendelkeznek.

A **nukleáris lamina** a maghártya alatt elhelyezkedő kétdimenziós hálózatos struktúra, amit lamin fehérjék építenek fel (intermediér filamentum fehérjék). Szerkezeti alátámasztást nyújt a sejtmagnak, valamint a kromatin szerveződést segíti elő, a DNS MAR (matrix attachment region) régiójához kapcsolódva. A sejtciklus szabályozásában is részt vesz. A mitosis profázisában és a prometafázisban a maghártya, a lamina és a magpórusok szétesnek, hogy a mitotikus orsó hozzáférjen a kromoszómákhoz és a kinetokórokhoz kapcsolja őket. A mitózis végén, az anafázisban és a telofázisban a sejtmagi visszarendeződés időben szabályozott. Először a „csontváz” fehérjék rendeződnek vissza a részlegesen kondenzált kromoszómák felszínén, majd a maghártya épül fel. Ezután új magpórus komplexumok alakulnak ki, amelyeken keresztül folyik a lamin fehérjék aktív transzportja. A fehérjetranszport kapcsán ld. „Fehérjék sejten belüli vándorlása” fejezet.

#### A sejtmag szerepe

A sejtmagnak több szempontból előnyös egy sejt számára. A DNS, különösen az eukromatin nagyon érzékeny, és térbeli elszigetelése a sejt anyagcsere folyamataitól további védelmet nyújt a hisztonokon felül. A magpórusok szelektív módon szállítják a nagymolekulákat a maghártyán keresztül, gátat képezve a nem kívánt molekulák számára. Eukariótákban a génexpresszió lépései egymástól térben elhatárolva mennek végbe: a gének transzkripciója mely során mRNS keletkezik, valamint az RNS érése a sejtmagban történik. Az érett mRNS aktív nukleocitoplazmatikus transzport révén a magpórusokon keresztül kijut a citoszólba, ahol megtörténik a transláció: az mRNS-szál mintájára polipeptid lánc képződik a citoplazma riboszómáin. A fehérjék szelektív transzportfolyamatok révén visszajuthatnak a sejtmagba. A riboszóma alegységek a sejtmagban épülnek össze, a magban képződött RNS-ekből és a citoplazmából importált fehérjékből. A kész riboszóma ezután exportálódik a citoplazmába, ahol ellátja feladatát. A génexpresszió lépéseinek térbeli elszigetelése kifinomult génexpresszió-szabályozást tesz lehetővé, amely a prokariótákból hiányzik.

A génexpresszióval és annak szabályozásával kapcsolatban további információért ld. a „Genom és génexpresszió” fejezetet.

### 4.3. EUKARIÓTA SEJTALKOTÓK: ENDOPLAZMÁS RETIKULUM, GOLGI KOMPLEX, VEZIKULUMOK, ENDOSZÓMÁK, LIZOSZÓMÁK

#### Bevezetés

Az 1940-es évek végére (az elektron mikroszkóp kifejlesztését követően) világossá vált, hogy az eukarióta sejt citoplazmája egymástól elkülönülő kompartmentekből épül fel, melyeket membránok határolnak. Ezek a membránnal burkolt kompartmentek a citoplazmában a különböző sejtalkotókat (sejtszervecskéket) hozzák létre. A sejtorganellumok együtt egy ún. endomembrán rendszert képeznek, melyben az egyedi alkotóelemek egy jól szabályozott egység részeként működnek (lásd ábra).

#### Az endomembrán rendszer - vezikulumok

A sejtalkotók egy integrált hálózat részei, melyben az anyagok (fehérjék, lipidek stb.) a transzport vezikulumok segítségével mozognak. A transzport vezikulumok membránnal határolt szervecskék, melyek a donor membrán felszínéről fűződnek le és az akceptor sejtalkotó membránjával fuzionálnak. A transzport vezikulumok lefűződhetnek az ER-ből, a Golgi hálózatból és a plazmamembránból. A membrán összetevők alapján a vezikulumokat három csoportba lehet sorolni:

1. COPI burkolt vezikulumok
2. COPII burkolt vezikulumok
3. Klatrin burkolt vezikulumok

A három eltérő csoportba tartozó vezikulum eltérő irányba képes szállítani a molekulákat. A fehérje burok határozza meg, hogy milyen molekulák szállítódnak a vezikulumban egyik organellumtól a másikig (lásd Fehérje transzport fejezet).

Az eukarióta sejtekben számos biokémiai útvonalat azonosítottak, melyek az anyagok szintéziséért és transzportjáért felelősek (lásd ábra):

1. Bioszintetikus útvonal: fehérjék szintézise, modifikációja és transzportja
2. Szekréciós útvonal: a sejtől leadott fehérjék
  - a) Konstitutív szekréció-folytonos
  - b) Szabályozott szekréció-stimulus hatására történik (további részletekért lásd Fehérje transzport)
3. Endocitikus útvonal: Az anyagok mozgása az extracelluláris térből a korai endoszómába, ahol az osztályozás történik. Az endocitózis két kategóriáját különböztetjük meg:
  - a) *pinocitózis*: folyadékok felvétele
  - b) *receptor mediálta endocitózis*: specifikus extracelluláris ligand felvétele a receptorhoz való kötődése után (lásd Endoszómák és Fehérje transzport további részletekért)

#### Az endoplazmás retikulum (ER)

Az endoplazmás retikulum a legdinamikusabb és morfológiailag változatos membránokból felépülő organellum. Az ER-t a citoszkeletális elemek támasztják, motorfehérjékhez kötődik, és folytonosan átrendeződik, miközben megtartja a funkcionális szerkezetét. Az ER egy folytonos hálózat, mely egymással összekapcsolódó tubulusokból, ciszternákból és jól strukturált lamelláris szerkezeti elemekből épül fel. Ezek a szerkezeti elemek a különböző típusú ER építő egységei. Az ER lehet durva felszínű (DER), sima felszínű (SER), átmeneti/tranzíciós (tER), szarkoplazmás retikulum (SR) és a sejtmaghártya. Az eukarióta sejtekben az ER számos egymással összeköttetésben lévő, elágazó tubuláris

membránokból épül fel, amik a sejtmaghártyából indulnak és a plazmamembrán fele terjednek ki (lásd ábra).

Az ER mérete relatíve konstans, ugyanakkor a lipidek és a fehérjék (újonnan szintetizált membrán- és luminális fehérjék) ki és bevándorolnak a kompartmentbe. A fehérjék a riboszómától az ER-be, majd az ER-ből a többi organellumba vagy a plazmamembrán fele (szekréció) illetve a Golgi apparátustól az ER-be stb. vándorolhatnak (részletekért lásd Fehérje transzport).

### Az ER kémiai összetétele

A fehérje koncentrációja magasabb (60-70%), míg a foszfolipid koncentrációja alacsonyabb (30-40%), mint a plazmamembránnak. Az ER-ben található foszfolipidek nagy része foszfatidilkolin (55%), kisebb része foszfatidiletanolamin (25%), nagyon alacsony koncentrációban szfingomielin (5%).

### Az ER fő típusai

Az endoplazmás retikulum membránja vékonyabb, stabilabb és kevésbé folyékony, mint a plazmamembrán. Az ER két fő alkompartmentre osztható 1) durva felszínű endoplazmás retikulum (DER) és 2) sima felszínű endoplazmás retikulum (SER). Az ER mindkét típusa olyan membrán rendszerből épül fel, mely körbeölel egy bizonyos teret vagy lument, és ez által elhatárolja a citoplazmától az adott teret. A luminális/ciszternális tér összetétele az ER belsejében jelentősen különbözik a citoszól összetételétől. A DER és a SER között számos szerkezeti és funkcionális eltérés figyelhető meg.

Szerkezeti eltérések:

1. Durva felszínű endoplazmás retikulum
  - a) Magas elektronsűrűségű partikulumok, riboszómák találhatóak a membrán citoszólikus felszínén. A riboszómák az ER membrán felszínéhez ún. riboforinokkal kötődnek, növelik a membránok szerkezeti rigiditását.
  - b) Rövid tubuláris szegmensekkel összekapcsolódó, lapos zsákok hálózatából épül fel (lásd ábra)
  - c) A sejtmaghártya külső membránjával folytonos
2. Sima felszínű endoplazmás retikulum:
  - a) Nincsenek a felszínén riboszómák
  - b) A membrán elemek tubulárisak és erősen tekeredett formát vesznek fel. Az elemek összefüggő rendszert képeznek.
  - c) Három speciális formája létezik:
    - Lamelláris forma: membránnal határolt, hosszú, lapos zsákok kiterjedt lemezes forma
    - Vezikuláris forma: kisméretű, kerek, membránnal határolt vezikulumokból épül fel
    - Tubuláris forma: megnyúlt, membránnal határolt tubulusokból épül fel

A SER három formája szabadon átalakulhat egymásba, mely tulajdonság azt bizonyítja, hogy az ER egy dinamikus, pleiomorf organellum. A SER három formája a DER esetében is megtalálható.

Különböző sejttípusok eltérő arányban tartalmazzák az ER két fő formáját. Ez az arány a sejt működésétől függ. Az ER a fő helyszíne a membrán- és szekretoros fehérjék szintézisének, transzlokációjának és érésének a sejtben. Körülbelül a sejt fehérjéinek egyharmada transzlokálódik a membránba és/vagy az ER oxidáló lumenébe. A sejt szükség esetén képes a DER-t SER-ré átalakítani.

Működésbeli eltérések:

1. Durva felszínű endoplazmás retikulum
  - a) plazmamembránban lévő integráns membrán fehérjék
  - b) Szekretált fehérjék
  - c) A sejtalkotók szolubilis fehérjéi  
(A fehérjék egyéb típusai pl. citoszólikus fehérjék, perifériális membrán fehérjék, sejtmagi fehérjék, a kloroplasztiszba, mitokondriumba és peroxiszómába vándorló fehérjék szabad riboszómákon szintetizálódnak.)
2. Sima felszínű endoplazmás retikulum
  - a) A here, a petefészek és a mellékvese szteroid hormonjainak termelése
  - b) Máj detoxifikációja
  - c) Kalcium ionok tárolása és felszabadítása (citoplazmába)

### Az endoplazmás retikulum biogenezeise

A membránok biogenezeise nem *de novo* történik, mindig a már meglévő membránokból épülnek fel az új membránok. A membránok növekedéséhez újonnan szintetizált fehérjéknek és lipideknek kell az ER membránjaiba beépülni. Ahogy a membránok a kompartment között vándorolnak, folyamatosan változik a fehérje és lipid összetételük, illetve enzimatiskus módosításon esnek át. Ezek az enzimek a sejtorganellumokra jellemzőek, annak membránjában találhatóak, ún. rezidens enzimek. Az enzimatiskus módosítások teszik a membránt egyedivé, az organellumra jellemzővé.

A membrán aszimmetria először az ER-ben alakul ki, de a membránok mozgása során végig megmarad (a citoszólikus oldalon lévő domének a citoszólikus oldalon, míg a luminális alkotók a luminális felszínen maradnak a vándorlás során). A legtöbb membrán lipid teljes egészében az endoplazmás retikulumban szintetizálódik, két kivétellel: 1) szfingomileinek és glikolipidek (szintézisük az ER-ben kezdődik, de a Golgiban fejeződik be) és 2) a mitokodriális és kloroplasztisz membrán speciális lipidjeinek egy része (a sejtalkotók membránjában lévő rezidens enzimek szintetizálják őket). Az újonnan szintetizált foszfolipidek a kettősréteg citoszólikus lemezébe épülnek be. Ezt követően a lipidek átvándorolnak a citoszólikus oldalról a luminális lemezbe a flippáz enzimek segítségével. Az ER membrán olyan rezidens enzimeket is tartalmaz, melyek képesek a membránok lipid összetételét megváltoztatni a foszfolipidek konvertálásával.

### A Golgi komplex

A Golgi komplex 3-8 egymásra rendezett lapos ciszternából áll (0,5-1µm átmérőjű), melyeket tubulusok és vezikulumok kötnek össze. A ciszternák lapos szerkezete miatt a Golgi komplexnek magas a felszín/térfogat aránya. Ez a tulajdonság facilitálja a rezidens Golgi enzimek aktivitását. A Golgi komplex az ER és a plazmamembrán közti transzportút között helyezkedik el. A Golgi membrán 7,5 nm vastag, a lamellák között kisebb-nagyobb hézagok találhatóak. Minden lamellában vannak hézagok, kisméretű vezikulumok és tubulusok. A Golgi komplex ciszterna rendszere az emlős sejtekben membrán tubulusokkal kapcsolódik össze, így egy egységes szalagszerű struktúrát hoznak létre a sejtmag közvetlen közelében, azzal folytatódólagosan (lásd ábra).

A Golgi ciszternák cisz-transz polaritással rendelkeznek. Az újonnan szintetizált membrán- és szekretoros komponensek a ciszterna oszlop cisz oldalán épülnek be a membránba (cisz-Golgi). Cisz-Golgi az ER közelében helyezkedik el, a ciszterna mellett hozzá kapcsolódó tubulusokat és vezikulumokat is tartalmaz. A vezikulumok ezt követően a ciszterna hálózat középső részén (középső-Golgi), majd a ciszterna oszlop ellenkező oldalán, a transz oldalon (transz-Golgi) elhagyják a Golgi komplexet (lásd ábra). A Golgi cisz oldalát alakító oldalnak, míg a belső felszínét érési oldalnak nevezik. Az új membrán komponensek az ER-ből az alakító oldalra adódnak át, míg a régi membránok és



vezikulumok az érési oldalról fűződnek le. Jelenleg a Golgi működésének két modellje ismert. Az első a ciszternák érési modellje, mely szerint a ciszternák fizikailag mozognak a cisz oldalról a transz oldalra, vagyis a ciszternák gyakorlatilag „beleérnek” egymásba. A második modell szerint csak az anyagok vándorolnak a Golgi komplexen keresztül transzport vezikulumok segítségével a ciszternák a helyükön maradnak (lásd ábra).

A fehérjék eltérő irányba történő szortírozásban (ER, Golgi, plazmamembrán, lizoszóma) a Golgi komplex két tubuláris szerkezetű része játszik szerepet: cisz-Golgi hálózat és a transz-Golgi hálózat (lásd ábra).

## A Golgi komplex szerepe

(a részletekért lásd fehérje transzport)

1. Fehérje szintézis: A fehérjék az ER-től a Golgi komplex alakító felszínéhez transzportálódnak transzport vezikulumokban.
2. Fehérjék glikozilációja a glikozil transzferázok segítségével történik.
3. Protein transzport: a poszttranszlációban módosított fehérjék más sejtalkotóba szállítódnak membrán burkolt vezikulumok útján.
4. A membrán szintézis folytatódik a Golgiban, az új membránok a plazmamembrán fele mozognak, és azzal fuzionálnak.

## Endoszómák

(részletekért lásd fehérje transzport)

Az endoszómák a plazmamembránból fűződnek le az endocitózis során, mely segítségével a sejt különböző anyagokat vesz fel az extracelluláris térből. Az anyagok felvételét internalizációnak is hívják, mely során a vezikulumok (klatrin burkolt vezikulum) egy tubulusokból és vezikulumokból álló dinamikus hálózatba szállítódnak. A hálózatba tartozó vezikulumokat endoszómáknak nevezzük (lásd ábra). Az endoszómák lumenét kitöltő folyadék savas pH-jú, az endoszómát határoló membránban lévő H-ATPáz (proton pumpa) működése következtében, mely protonokat pumpál a lumenbe.

Endoszómákat két csoportba lehet sorolni:

1. Korai endoszómák: a sejt perifériális régiójában található
2. Kései endoszómák: általában a sejtmaghoz közel helyezkednek el.

A korai endoszómák érésük során folyamatosan kései endoszómává alakulnak. Az érési folyamat során a pH csökken, a membránban lévő fehérjék kicserélődnek (Rab fehérjék) és az endoszóma morfológiája is megváltozik. A kései endoszómát multivezikuláris testnek (MVB, lásd ábra) is nevezük. A kései endoszómák lizoszómális enzimeket vesznek fel a transz-Golgi hálózatból, és elkezdik az anyagok lebontását. Ezt követően a kései endoszóma tartalma egy lizoszómába adódik át. Ha az anyagok között van újrahasznosítható molekula (pl. receptor fehérjék), új vezikula fűződik le a szortírozó kompartmentről (a korai és a kései endoszóma között; lásd ábra). Az újrahasznosító kompartment (vezikula) visszaszállítja ezeket a fehérjéket a plazmamembránba (lásd fehérje transzport) és a sejt újrahasznosítja.

## Lizoszómák

A lizoszóma az eukarióta sejtek „gyomra”. Nagyjából 50 különböző enzimet tartalmaznak, melyek savas hidrolázok, bármilyen típusú biológiai molekulát képesek lebontani (lásd ábra). A lizoszómában lévő enzimek a durva felszínű endoplazmás retikulumban termelődnek, majd a lizoszómába szállítód-

nak membrán burkolt vezikulumokban. A savas hidrolázok csak savas közegben képesek működni. A pH optimumuk 4,6. A savas pH-t a magas proton koncentráció tartja fenn, amit lizoszómális membránban lévő H-ATPáz proton pumpa biztosít. A lizoszómális membránt erősen glikolizált fehérjékből álló védőréteg védi a lizoszómális enzimektől. A lizoszómák alakja és elektron denzitása nagyon változatos, ezért nagyon nehéz azonosítani őket a sejtben (lásd ábra).

A lizoszómáknak speciális szerepe van az organellumok újrahasznosításában. Az organellumok újrahasznosítása tulajdonképpen azok szabályozott lebontása a citoplazmában. Ezt a folyamatot hívjuk autofágiának (lásd ábra).

Az autofágia lépései:

1. Az organellumot egy kettős membrán veszi körül, létrejön az autofagoszóma.
2. Az autofagoszóma egy lizoszómával fuzionál és autofagolizoszómát hoz létre.
3. A lizoszómális enzimek megemésztik az organellumot és a lebontott anyagok ún. reziduális testet képeznek.
4. A reziduális test exocitózissal kiürül vagy lipofuszcín granulámként visszamarad a citoplazmában (öregedés).

Az autofágia miatt az organellumok összetevői elérhetővé válnak a sejt számára (éheztetés), amit a sejt energiaszükségletét biztosítja. Az autofágiának igen fontos szerepe van a neuroprotekciónban. Az autofágia fenntartja a homeosztázist vagy normál funkciót a sejt organellumokból származó fehérjék degradációjával és újrahasznosításával. Az autofágia hiánya az egyik fő oka lehet a sejtkárosodásnak illetve az öregedésnek.

## Mitokondrium

A mitokondriumok **ovális alakú**, 0,5-10 µm méretű sejtstruktúrák. Intenzíven dinamikus sejtalkotók: a sejtben belül képesek mozogni (idegsejt axonok) vagy a citoskeletonhoz rögzítettek (izomsejtek) és hasadásra valamint fúzióra is képesek. A sejtben belüli számuk változik a sejtípustól és a specifikus sejt aktivitásától függően: az érett vörösvérsejtben nincsen mitokondrium, míg a máj-izom – szívizom sejtben százával vagy ezrével található.

**Szerkezet:** a mitokondriumot kettős membránrendszer határolja. A két membrán réteg összetételében és funkciójában is különbözik. A **külső membrán** porinokat tartalmaz és ionok és kis molekulák (5000 Da-nál kisebb) számára szabadon átjárható. Összetétele hasonlít a sejtmembránéhoz. A **belső membrán** krisztákat alkot, a membrán felület növelése érdekében. Átjárhatatlan még a kis töltéssel rendelkező molekulák számára is, de számos transzport rendszert hordoz, amelyek a mitokondriumban lejátszódó biokémiai folyamatokhoz elengedhetetlenek. A két membrán réteg között található az **intermembrán tér**, amelynek, mások mellett az apoptózisban van szerepe (lásd Apoptózis fejezet). A szerkezetet illetően a többi információ (ábrák) az előadás anyagban található.

A mitokondrium **mátrixában** nagy számú enzim helyezkedik el (ezekkel biokémiai tanulmányaink során fogunk megismerkedni). A biokémiai reakciók közül a legjelentősebb az ATP szintézis, amely minden sejt számára az alapvető energiát biztosítja.

A mitokondrium **funkciói:**

- energiaszolgáltatás (citrátkör, zsírsavlebontás, ATP szintézis)
- urea ciklus (nitrogén kiválasztása)
- vas- kén komplexek és hem szintézis
- metabolizmus szabályozásában való részvétel
- apoptózis és sejtihalál.



Az enzimek mellett a mitokondrium tartalmazza **saját genomját**, valamint transzkripció és transláció rendszerét. A mitokondriumban található DNS molekulák száma változó (következményeit lásd: mitokondriális betegségek). A humán mitokondriális genom cirkuláris, 13 mRNS-t, 22 tRNS-t, és 2 rRNS-t kódol. A messenger RNS-ek az oxidatív foszforilációs rendszer különböző, nagyfokban hidrofób alegységeit kódolják (ezek az ATP szintézisben vesznek részt, a molekuláris oxigén felhasználásával).

A humán **mitokondriális genom további jellemzői:**

- kettős szálú L (light) és H (heavy) szállal, 16569 bázispár (bp) tartalommal
- mutációs rátája viszonylag magas (a DNS polimeráz alacsony megbízhatósága, és a DNS javító rendszer alacsony hatékonysága miatt)
- a nem-kódoló DNS szekvenciák csaknem teljes hiánya: szabályozó szakaszok hiánya
- különleges aminosav kodonok

A humán nukleáris és mitokondriális genomok összehasonlítását lásd az előadásanyagban.

A **mitokondriumok korlátozott autonómiája** azt jelenti, hogy a mitokondriális genom nem elegendő ahhoz, hogy az összes nélkülözhetetlen fehérjét előállítsa (enzimek, a transzkripció, transláció, replikáció és a DNS javítás fehérjéi). Emiatt nagyszámú fehérjének és RNS-nek kell a mitokondriumba vándorolnia. Ezeket speciális fehérjék (TIM és TOM) transzportálják a sejtorganelumba, illetve az RNS-ek számára más transzportáló komplexek találhatók. A mitokondriumba történő fehérje transzport egyirányú: a citoszolból az organelumba irányul (a külső, a belső membránba, a mátrixba vagy az intermembrán térbe- lásd: A fehérje irányítása és transzportja fejezetet), kivéve az apoptózis esetében, amikor a citokrom c elhagyja a mitokondriumot. Újabban felfogások szerint a mitokondrium megőrizte azoknak a fehérjéknek a szintézisét, amelyek túl hidrofóbok a citoszolból történő transzporthoz (ezek membránhoz kötött fehérjék, amelyek az oxidatív foszforilációs rendszer alkotói).

Az **endoszimbionta hipotézis**: miután a légkörben megjelent az oxigén, lehetővé vált, hogy két különböző típusú sejt összeolvadjon: egyikük biztosította a sejtmagot, a másik (egy aerob baktérium) lett a mitokondrium forrása. Idővel az utóbbi DNS-ének jelentős részét elvesztette, így a nukleáris genomra kell támaszkodnia, de más biokémiai folyamatok irányítását megszerezte. Ez a folyamat a **kompartimentalizáció** részét alkotja, amely fontos szabályozás nemcsak a celluláris biológiai folyamatok szabályozásában, hanem a metabolizmus regulációjában is.

Az endoszimbionta teória **bizonyítékai:**

- mtDNS szerkezet (alak, hisztonok és intronok hiány)
- mt riboszómák szerkezete
- a transláció *N*-formilmetioninnal kezdődik (lásd: transláció)
- bizonyos antibiotikumokkal szembeni érzékenység (lásd: antibiotikumok)
- a hasadásra és fúzióra való képesség (mindkét mechanizmus a GTP energiáját és a mitokondriális proton koncentráció különbséget igényli).

## Egyéb sejt szervecskék

### Peroxiszómák

#### Szerkezet

A peroxiszómák (mikroszómák) kisméretű, egyetlen membránnal határolt sejt szervecskék, melyek minden eukarióta sejtben megtalálhatók. Alaktanilag a lizoszómákhoz hasonlítanak, de szabad riboszómákon szintetizálódnak és teljes polipeptid láncként a peroxiszómákba szállított proteinekből épülnek fel. Képesek osztódással szaporodni, de saját génállománnyal nem rendelkeznek.

*Szerepük*

A peroxiszómák több mint 50 különböző enzimet tartalmaznak, amelyek különböző biokémiai folyamatban vesznek részt. Nevüket az organellum eredeti feladatáról kapták: olyan oxidációs reakciók végrehajtása, amelyek terméke a hidrogén-peroxid. A hidrogén-peroxid károsítja a sejtet, ezért a peroxiszómák azonnal lebontják **kataláz** enzim segítségével. Számos szubsztrát lebontása történik hasonló oxidatív reakciókban, pl. húgysav, aminosavak, zsírsavak. A zsírsavak oxidációja (**béta oxidáció**) különösen fontos, mivel ez a metabolikus energia legfőbb forrása. Állati sejtekben a zsírsavak oxidációja történhet a mitokondriumokban is, de élesztősejtekben és növényekben a zsírsav-oxidáció a peroxiszómákra korlátozódik.

A peroxiszómák szerepet játszanak a lipid bioszintézisben is: állati sejtekben **koleszterin** szintézis folyik bennük, a májsejtek peroxiszómáiban pedig a koleszterinből epesav képződik. A **plazmalogének**, az agyban és szívbe található fontos membrán foszfolipidek szintéziséért szintén peroxiszomális enzimek felelnek.

A **glioxiszómák** speciális növényi peroxiszómák. Nevüket a sejt szervecské fő funkciójáról kapták, itt folyik ugyanis a **glioxál-ciklus**, a citromsav-ciklus módosulata. A glioxál-ciklusban történik növényi magvakban a zsírsavak átalakítása szénhidrátokká.

Levelekben a fotoszintézis kapcsán a CO<sub>2</sub> szénhidráttá alakul a **Calvin-ciklusban**. E folyamat során alkalmanként egy két szénatomos foszfoglükolát képződhet, amelyet a peroxiszóma enzimeinek segítségével képes visszanyerni a növény (vagyis visszaalakítja 'használható' metabolittá).

**Vakuólumok***Szerkezet*

Vakuólumok főleg növényi és gomba sejtekben találhatók. A sejt szervecskét a **tonoplaszt** vagy vakuoláris membrán veszi körül, benne szervetlen és szerves molekulák – köztük enzimek – vizes oldata található. Alkalmanként bekebelezett szilárd anyagok is lehetnek egyes vakuólumokban. A vakuólumok alakja, mérete és szerkezete változatos, a sejt igényeitől függ. PL. növényi sejtekben lehetnek olyan vakuólumok, amik a sejt térfogatának 80%-át elfoglalják. A vakuólumok vezikulumok

*Szerepük*

A vakuólumok feladata függ a sejt típusától. Fő funkciójuk a tárolás: a káros anyagokat elszigeteli, exportálja a sejtől, a használhatatlan anyagcsere termékeket biztonságosan tárolja. Ezen kívül raktározó feladatot is elláthatnak: vizet és kismolekulákat tárolhatnak. A **fehérjetestecskék** speciális, fehérjetároló vakuólumok, amelyek a magvak csírázásához szükséges fehérjéket tartalmaznak. A vakuólumoknak szerepük van a turgor (hidrosztatikai nyomás) és a pH fenntartásában, valamint a virágok mechanikai támasztásában, amit egy nagy központi vakuólum segítségével valósítanak meg.

**Szintestek (plasztiszok)***Szerkezet*

A szintestek dupla membránnal határolt organellumok, amelyek kizárólag növényi és algasejtekre jellemzők. Fotoszintetikus pigmenteket tartalmaznak, ennek köszönhető a sejtek színe. A sejt által felhasználható molekulák szintézisét és tárolását végzik. A szintestek saját genommal rendelkeznek: cirkuláris, kettős szálú DNS-sel ('ctDNS' or 'cpDNS' vagy '**plasztom**'). A proplasztiszok (a plasztiszok ősei) és a fiatal kloroplasztiszok képesek osztódással szaporodni.

A kloroplaszt legfőbb részei a három membránrendszer (külső és belső membrán, és a tilakoid rendszer), valamint a belső membrán által határolt gélszerű sztróma. A külső-és belső membrán között található az intermembrán tér.

### Külső membrán

Féligáteresztő hártya, mely átengedi a kismolekulákat és –ionokat, de gátat szab a nagyméretű fehérjék szabad áramlásának. A kloroplasztisz polipeptidok a TOC komplexeken (translocases of the outer membrane) keresztül transzportálódhatnak az intermembrán térbe, hasonlóképpen, mint azt a mitokondriumok esetében láttuk.

A kromoplasztiszok és amyloplasztok membránja kitüemkedhet a citoplazma felé, **sztrumulákat** alkotva (sztróma-tartalmú tubulus). Ezek a felszín növelik, vagy összeköthetik a színtestet az endoplazmás retikulummal.

### Belső membrán

A sztrómát határoló hártya, amely szabályozza a színtest molekuláris transzportját. A sztrómába a polipeptidok a TIC komplexeken (translocase of the inner membrane) keresztül transzportálódhatnak. Ezen kívül a belső membránban folyik a zsírsavak, lipidek és karotinoidok szintézise.

### Sztróma

A **sztróma** a belső membránon belül található zselészerű, fehérjedús alapállomány. A sztrómában egy igen fontos biokémiai folyamat játszódik: a Calvin-ciklus (szén beépítése cukor molekulákba). Számos egyéb struktúra lebeg a sztrómában; mint a tilakoidok, riboszómák, nukleoidok, keményítő-szemcsék.

A kloroplaszt riboszómái szintetizálják a színtest fehérjéinek egy részét: átírja a kloroplaszt DNS-ét mRNS-ekre, amiről fehérjék képződnek.

A **keményítőszemcsék** membránnal nem határolt, felhalmozódott keményítőt tartalmazó struktúrák a sztrómában. A szemcsék a cukorképződés alatt növekszenek, éjszaka, a sejtlégzés és a cukortranszport alatt felhasználásra kerülnek.

A **Rubisco** a sztróma legfontosabb fehérjéje. Ez az enzim felelős a CO<sub>2</sub> molekulák cukor molekulákba történő beépítéséért.

### Tilakoid rendszer

A **tilakoidok** a sztrómában található membránnal határolt zsákszerű, klorofill-tartalmú struktúrák, a fotoszintézis fényreakciójának színhelyei. A **gránum tilakoidok** lapos, egymásra fektetett zsákok, amelyeket a helikális **sztróma tilakoidok** kötnek össze. A **gránumok** egyenként 10-20 tilakoidot tartalmaznak, közöttük folytonos tilakoid tér található. A tilakoid membránokba ágyazódnak a fotoszintézis fényreakciójának fontos enzimkomplexei: az **I és II. fotorendszer** (PS II és PS I) fénygyűjtő komplexek, melyek klorofillt és karotinoidokat tartalmaznak. Ezek a komplexek elnyelik a fény energiáját és elektronoknak adják át. Ezeket az elektronokat a tilakoid membrán molekulái arra használják, hogy hidrogénionokat pumpáljanak a tilakoid belső terébe, csökkentve annak pH-ját. Az **ATP-szintáz**, egy nagy fehérjekomplex, ezt a H<sup>+</sup> koncentráció-grádienszt használja ATP molekula szintézisére (ahogy a H<sup>+</sup> a sztrómába áramlik). A fotorendszerek különböző fotoszintetikus pigmenteket tartalmaznak, amelyek a fényelnyelésben és az energiatranszferben vesznek részt. Valamennyi színtestben megtalálható a **klorofill-a**, ám kiegészítő pigmentként más klorofill formák is léteznek (klorofill-b, -c, -d és -f). A **karotinoidok** alkotják a kiegészítő pigmentek másik csoportját, melynek tagja a *fikoeritrin* (a vörös algák színtestének színét adó pigment), mely a többletenergia transzferét és kisugárzását végzi. Más elterjedt karotinoidok pl. a vöröses-narancs színű  $\beta$ -karotin vagy a sárgás *xantofillok*, mint a *zeaxantin*. Harmadik csoportként említhetjük a **fikobilineket**, amelyek között mindenféle színű pigmentek találhatók.

*Szerepük*

A színtestek fő funkciója a fotoszintézis folyamatának kivitelezése. Említhetjük még a keményítő tárolását, vagy a zsírsav szintézist. Számos különböző plasztisz típus létezik, ezek mind a proplasztiszokból differenciálódnak:

1. **Kloroplaszt:** fotoszintézist folytató zöld színtest
2. **Kromoplaszt:** Különböző színű színtestek, pigmenteket szintetizálnak és tárolnak
3. **Gerontoplaszt:** szerepe van a fotoszintetikus apparátus lebontásában szeneszcencia idején
4. **Leukoplaszt:** színtelen színtest, monoterpén-szintézisben vesz részt, vagy specializálódik egyéb plasztisz-típusokká:
  - a) **Amiloplaszt:** keményítő-raktározás
  - b) **Elaioplaszt:** zsírok raktározása
  - c) **Proteinoplaszt:** fehérje raktározás és -modifikáció
  - d) **Tannoszóma:** tannin és polifenol szintézis

*A színtestek genetikai állománya*

A plasztiszok genomja, a „**plasztom**” hossza 75–250 kilobázis. Számos hasonlóság van a plasztom és a mitokondriális genom között: a plasztom cirkuláris DNS molekula, színtestenként változó kópiaszámban van jelen. Kb. 100 génje rRNSeket, tRNSeket kódol, valamint a fotoszintézisben és a plasztid gének transzkripciójában és translációjában részt vevő fehérjéket kódol. Ahogy a mitokondriumoknál is láttuk, a plasztiszok fehérjéinek legnagyobb része nukleáris gének által kódolt, és a plasztid gének expresszióját nagyban befolyásolják nukleárisan kódolt faktorok (ld. „a mitokondriális genom korlátozott autonómiája”, Mitokondrium fejezet). A színtest DNS a **nukleoid** fehérjékhez kapcsolódik, amelyek a külső membrán belső felszínéhez csatlakoznak. Egyetlen nukleoid több, mint 10 DNS kópiát is tartalmazhat. A nukleoid morfológiája, mérete és helyzete megváltozik a színtest fejlődése vagy átalakulása alatt.

## 4.4. A CITOSZKELETON

### Bevezetés

A citoszkeletonnak alapvető szerepe van a sejt támasztásában és mozgásában (csilló, ostor). A citoszkeleton három jól körülhatárolt rostos (filamentekből álló) szerkezeti elemből áll, melyek a mikrotubulusok, intermedier filamentumok és a mikrofilamentumok. Ezek a struktúrák együttesen egy jól kidolgozott interaktív hálózatot alkotnak. A citoszkeletonális elemek fehérje alegységekből állnak, melyek nem-kovalens kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz (lásd táblázat).

1. A mikrotubulusok hosszú, üreges, el nem ágazó csövek, melyek tubulin monomerekből épülnek fel.
2. A mikrofilamentumok tömör, vékonyabb szerkezeti elemek, melyek aktin monomerekből épülnek fel.
3. Az intermedier filamentumok kemény, kötélszerű szálak, melyek sokféle fehérjéből épülnek fel.

### A citoszkeleton funkciója

A citoszkeleton minden eukarióta sejtben megtalálható. A citoszkeleton szerepe a sejt típusától függően változik (lásd ábra).

1. Scaffoldként a sejtvázat támasztja és a sejt alakjának fenntartásában játszik szerepet.

2. Belső hálózatot alkotva a sejtalkotók szerveződésében játszik szerepet.
3. A sejt mozgását, illetve az anyagok sejten belüli mozgását szabályozza.
4. Az mRNS számára kötőhelyet biztosít.
5. Jelátviteli szerepe is lehet.
6. A sejtosztódásért felelős apparátus esszenciális eleme.
7. Erőkifejtésének hatására a sejt mozogni képes (a csilló és ostor mozgatása, helyváltoztató mozgás).

### A mikrotubulusok szerkezete és szintézise

(lásd ábra)

1. Üreges, hengeres elemek
2. Globuláris fehérjékből, tubulin heterodimerekből épül fel ( $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin)
3. A tubulin heterodimerek lineárisan rendeződnek
4. Az  $\alpha$ -tubulin monomer GTP-t köt, ami nem lecserélhető és nem hidrozilálódik.
5. A  $\beta$ -tubulin GDP-t köt, ami a filamentum összeszerelődésekor GTP-re cserélődik
6. Külső átmérője 25 nm
7. Falvastagsága 4 nm
8. A tubulinok először protofilamentekbe tömörülnek.
9. 13 protofilament hoz létre egy mikrotubulust nem-kovalens kötésekkel
10. A protofilament aszimmetrikus
11. A protofilament rendelkezik polaritással
12. Mikrotubulusnak van pozitív és negatív vége

### Mikrotubulushoz asszociált fehérjék (MAP)

A MAP fehérjék egy heterogén fehérjecsoport, melynek tagjai a mikrotubuláris hálózat felépítésében játszanak szerepet. A mikrotubulusok a felszínhez kapcsolódnak, így növelve azok stabilitását és segítik az összeszerelődésüket. A MAP fehérje egyik doménje a mikrotubulus oldalához kötődik, a másik doménje pedig egy rövid filamentumként kinyúlik a mikrotubulus felszínéről (lásd ábra). A MAP fehérjék egy része kereszthidakat hoz létre a mikrotubulusok között, így fenntartják a mikrotubulusok paralell elrendeződését. A MAP fehérjék mikrotubulus-kötő aktivitását az aminosav oldalláncok foszforilált és defoszforilált állapota határozza meg.

A Tau fehérje egy mikrotubulushoz asszociált fehérje, mely a neuronokban található. A fehérje hiperfoszforilálódása miatt a fehérje felhalmozódik a neurofibrilláris kötegekben melynek kulcsszerepe van az Alzheimer-kór kialakulásában. Ezek a hiperfoszforilált Tau fehérjék nem képesek a mikrotubulusokhoz kötődni.

### A mikrotubulusok szerepe

(lásd ábra)

1. a sejt alakjának meghatározása és fenntartása
2. a sejt belső szerveződésének fenntartása (fenntartja a sejtorganellumok elhelyezkedését)
3. axonális transzport
4. axon növekedés az embriogenezis során
5. növényi sejtek: fenntartja a sejtek alakját, befolyásolja a sejtfal szintézisét (a cellulóz és a mikrotubulusok együtt helyezkednek el a sejtfalban)

## Axonális transzport

Az anyagok transzportja a membrán burkolt vezikulumokban a mikrotubuláris hálózat működésétől függ. A neurotranszmitterek az ER-ből és a Golgi komplexből szállítódnak vezikulumokban, a sejttesttől a periféria felé. Az axon a neuron nyúlványa, melynek a neuronok közötti kommunikációban van szerepe (szinapszisok). Az axon citoskeletális elemekből áll: mikrofilament kötegek, intermedier filamentek (neurofilamentek), és mikrotubulusok (lásd ábra). A neurotranszmitterekkel töltött vezikulumok az axon mikrotubulusai mentén vándorolnak a sejttest vagy a periféria felé. Ezeket a mozgásokat elsősorban a mikrotubulusok szabályozzák, melyek a sejtben található különböző motor fehérjék szállító pályájaként funkcionálnak. A motor fehérjék képesek energia felhasználásával a vezikulumok mozgására a sejtben belül (lásd ábra).

A transzport vezikulumok két irányban mozoghatnak. Ha a sejttest felől az axonterminális (szinapszis) fele mozognak, akkor anterográd transzportról beszélünk, ha az axonterminálistól a sejttest fele vándorolnak, akkor retrográd transzportról beszélünk.

### A mikrotubulusok motor fehérjei

A motor fehérjék energiát szolgáltatnak az anyagok transzportjához a mikrotubulusok és mikrofilamentek felszínén. Molekuláris motoroknak is nevezzük őket, mivel képesek a kémia energiát (ATP) mechanikai energiává alakítani. Ennek segítségével képesek erőt generálni, hogy a hozzájuk kötődött anyagokat mozgassák. A motor fehérjék egy irányba képesek mozogni a citoskeletális elemek felszínén, lépésről-lépésre. A motor fehérjéket három csoportba soroljuk:

1. kinezinek- mikrotubulus
2. dineinek- mikrotubulus
3. miozinok- mikrofilament

Jelenleg nem ismert olyan motor fehérje, ami az intermedier filamenteket használná szállításra. A motor fehérjék folyamatos konformáció változáson esnek át, melyek együttesen egy mechanikai ciklust építenek fel. A mechanikai ciklus lépései szorosan kapcsolódnak a kémiai és katalitikus ciklus lépéseikhez. Utóbbiak biztosítják a motoros aktivitáshoz szükséges energiát.

Kémiai ciklus:

- a) egy ATP molekula megkötése
- b) az ATP hidrolízise
- c) ADP+Pi elengedése
- d) új ATP molekula megkötése

### 1. Kinezinek- szerkezet és funkció

Az első kinezint, a kinezin-1-et, 1985-ben Ronald Vale fedezte fel. A kinezin-1 a kinezinszerű fehérjék (KLP) szupercsaládjába tartozik legalább 45 másik KLP fehérjével együtt. A KLP szupercsalád nem minden tagja motor fehérje. Vannak köztük adapter fehérjék is, melyek kapcsolatot biztosítanak a kinezin és a vezikulumok között. A kinezin egy tetramer szerkezetű fehérje, mely két azonos nehézláncból és két azonos könnyűláncból épül fel (lásd ábra). A kinezin molekula tartalmaz két globuláris feji régiót is, amik a mikrotubulus és az ATP megkötésére képesek. A fej vagy motoros domén hidrolizálja az ATP-t, vagyis energiát termel a mozgáshoz. A feji régió egy nyakhoz kapcsolódik, ezt követi egy pálcaszerű összekötő régió majd egy legyezőszerű farki régió. A fark, mely két nehéz és két könnyűláncból épül fel, felelős a szállítmány megkötéséért.

A kinezin pozitív vég fele irányított molekuláris motor, mely azt jelenti, hogy a kinezin a vezikulákat a mikrotubulus pozitív vége fele szállítja, vagyis a plazmamembrán fele. A kinezin a mikrotubulus egyet-

len protofilamentjén mozog. A sebessége egyenesen arányos az ATP koncentrációjával (maximális sebessége 1  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ). A fehérje meghatározott lépéseket tesz a filament felszínén. Minden egyes lépés kb. 8 nm hosszú, ami megegyezik a tubulin dimer hosszával. Egy lépés egy ATP hidrolíziséből származó energiát igényel.

A mozgás processzív, mely azt jelenti, hogy a motor fehérje egyetlen mikrotubulus felszínén nagy távolságot képes megtenni ( $\sim 1\mu\text{m}$ ), anélkül, hogy leesne róla. A kinezin molekula két feje koordináltan dolgozik együtt, így a két fej a kémiai és a mechanikai ciklusokat tekintve mindig más lépésnél tartanak (lásd ábra):

1. az egyik fej a mikrotubulushoz kötődik
2. konformáció változás történik a motor fehérje nyaki régiójában
3. a másik fej előre mozdul a protofilamenten a következő kötőhelyig
4. az első fej megtalálja a pontos kötődési helyet a protofilamenten
5. az egyik nehéz lánc a feji és a nyaki régiója a mikrotubulushoz kötődik
6. az ATP hidrolízise következtében a nyak eltekeredik

### Dineinek- szerkezet és funkció

A dinein volt az első mikrotubulushoz asszociált motor fehérje, amit felfedeztek 1963-ban. Ez a fehérje felelős a csilló és az ostor mozgatásáért. A dinein citoplazmatikus formáját csak 20 évvel később fedezték fel. A citoplazmatikus dinein minden állati eukarióta sejtben megtalálható, a növényi sejtekből azonban hiányzik. A citoplazmatikus dinein egy igen nagyméretű fehérje (1.5 millió dalton), mely két azonos nehézláncból és változatos intermedier valamint könnyűláncokból épül fel (lásd ábra). A nehézláncok egy nagyméretű fejből és egy hozzá kapcsolódó hosszú nyúlványból épülnek fel. A dinein feji régiója a katalitikus központja a fehérjének: megköti és hidrolizálja az ATP molekulát. A fejhez kapcsolódó nyúlvány képes megkötni a mikrotubulust egy speciális, a nyúlvány csúcsán lévő kötőhellyel. A dinein hosszabb nyúlványa a farki régió, mely intermedier és könnyűláncokból áll. Ezek szerepe nem ismert.

A citoplazmatikus dinein a mínusz vég által szabályozott motor fehérje, mely azt jelenti, hogy a vezikulákat a mikrotubulus negatív vége fele szállítja, vagyis a sejtestet vagy a sejtmag irányába. A dineinnek speciális szerepe van a mitotikus orsó, a centroszóma és a Golgi komplex pozicionálásában, a kromoszómák szétválasztásában, és a sejtorganellek szállításában. A citoplazmatikus dinein nem képes direkt összekapcsolódni a vezikulumokkal, szüksége van egy összekötő adapter fehérjére, amit *dinaktinnak* neveznek. A dinaktin szabályozza a dinein aktivitását és segíti a motor fehérje mikrotubulushoz való kötődését (lásd ábra).

### Mikrotubulus organizáló központok (MTOC)

Ezek a központok felelősek a mikrotubulusok nukleációjáért (szintézis inicializálásáért).

1. **Bazális testek:** csak a csillóval vagy ostorral rendelkező sejteknél található meg. Kilenc perifériális mikrotubulus triplet és a középen található ciliáris mikrotubulus pár építi fel. A középen található dimer eltűnik, mikor a csilló a bazális testtel kapcsolódik. Rostkötegek hálózata kapcsolja a bazális testet a citoplazmához.
2. **Centroszóma:** Két hordó alakú centriólumot tartalmaz, melyeket a pericentrioláris anyag (PCM) vesz körül. A centriólumok mindig párban állnak. A centroszóma végzi a mikrotubuláris citoskeleton inicializálását és organizációját. A mikrotubulusok a PCM-ben végződnek. Minden centriólumnak kilenc mikrotubulus tripletje van (A, B és C tubulus), de nincs centrális mikrotubulus pár. A pericentrioláris nyúlványok sugárirányban ágaznak ki a tripletekből (lásd ábra).



A mikrotubulusok polaritása mindig azonos: a mínusz vég asszociálódik a centroszómával, és a plusz vég (növekedő vég) mindig az ellenkező oldalon helyezkedik el (plazmamembrán). A mikrotubulus növekedő vége speciális fehérjéket tartalmaz, amelyek segítik a mikrotubulus kapcsolódását a célhoz, pl. endoszóma, Golgi ciszterna vagy kondenzált kromoszóma az osztódó sejtben.

### Mikrotubulus nukleáció és szintézis

Az MTOC szabályozza a mikrotubulusok számát, a polaritásukat, hány protofilament építi fel a mikrotubulust, valamint az összeszerelődésük helyét és idejét. Minden MTOC tartalmaz egy közös alkotóelemet, a  $\gamma$ -tubulin molekulákat, amelyek együttesen egy gyűrű komplexet alkotnak a PMC-ben (lásd ábra). A PMC oldhatatlan szálai kapcsolódási pontokként szolgálnak a gyűrű komplexeknek, amelyeknek a mikrotubulusokkal megegyezik az átmérőjük (25 nm) és  $\gamma$ -tubulint tartalmaznak. A  $\gamma$ -tubulin gyűrű a mikrotubulus negatív vége.

Mivel a mikrotubulusok több protofilamentből épülnek fel, ezért a végei dinamikusak és a filamentek ellenállnak a hőmérsékletnek. A tubulin dimerek a mikrotubulus pozitív végéhez kapcsolódnak. A tubulin dimer kapcsolódásához egy GTP molekula hidrolízise szükséges. A GTP molekula az  $\alpha$ -tubulin monomerhez kötődik, és a dimer két tubulinja közé szorulva soha nem hidrolizálódik vagy cserélődik le, így a GTP a heterodimer integráns elemévé válik. A  $\beta$ -tubulinon lévő nukleotid, mely lehet GTP vagy GDP kicserélhető. A tubulin dimerek összeépüléséhez egy GTP molekulára van szükség, ami a  $\beta$ -tubulin alegységhez kötődik. A GTP hidrolízise nem feltétele a dimer mikrotubulushoz való bekötődésének. A GTP röviddel a beépülés után hidrolizálódik, a GDP pedig továbbra is a polimerhez kötődik. Amikor a dimer leválik a mikrotubulusról a szétszerelődés során és bekerül a szolubilis raktárba, a GDP egy új GTP-re cserélődik (lásd ábra). Vagyis a tubulin dimer újra felhasználható a mikrotubulusok szintézisében.

A mikrotubulusok szétszerelődését befolyásoló tényezők: hőmérséklet, Ca koncentráció, kémiai anyagok (kolhicin, vinblasztin, vinkrisztin, nokodazol és podofilotoxin). A mikrotubulus dinamikus instabilitása a GDP-GTP cserétől függ. Ha a mikrotubulus záródik, a GDP- $\beta$ -tubulin dimerek a tubulus plusz végén maradnak. A GDP-t kötő tubulinnak tekeredett a szerkezete, így kevésbé tud beilleszkedni az egyenes protofilamentbe. Így a protofilament kifelé tekeredik, majd szétesik (lásd ábra).

### Intermedier filamentek

Tömör, elnemágazó filamentek, átmérőjük 10–12 nm. Intermedier filamenteket eddig csak állati sejtekben azonosítottak. Ezek a filamentek erős, flexibilis, kötélszerű rostok, amelyek mechanikai ellenállást biztosítanak a fizikai stressz ellen idegsejtekben, izomsejtekben és epitélialis sejtekben. Az intermedier filamentek kémiaiilag heterogén csoportot alkotnak, melyeket emberben legalább 70 különböző gén kódol. Az IF-ek polipeptid alegységei öt csoportra oszthatók, az őket tartalmazó sejt típusa alapján (lásd táblázat). Az egyes - és kettes típusú IF-ek a savas és bázikus keratinok, a hármas típusúak a mezenchimális sejtekben, izomsejtekben, idegsejtekben és gliákban találhatóak. A négyes típusú IF-ek csak az idegsejtekben fordulnak elő, ezért ezeket neurofilamenteknek is nevezzük. Az ötös típusú IF-ek a laminok, melyek a nukleáris laminában helyezkednek el.

Minden IF-nek hasonló a szerkezete és a funkciója; mindegyikük tartalmaz egy centrális pálcika alakú,  $\alpha$ -helikális, fibrilláris domént. Ez a centrális domén alapvető szerepet játszik az intermedier filamentek felépítésében.

Az IF-ek összeszerelődése (lásd ábra):

1. Két monomer (egy monomernek két globuláris és  $\alpha$ -helikális doménje van) kapcsolódik egymáshoz paralell orientációban, így dimert képeznek



2. Két dimer antiparalel kapcsolódik egymáshoz, így olyan tetramert képeznek, aminek nincs polaritása
3. Nyolc tetramer laterálisan rendeződik össze egy 60 nm hosszú filamentet képeznek
4. Ezek a 60 nm hosszú egységek egymáshoz kapcsolódva egy polimert hoznak létre, amit intermedier filamentnek nevezünk

Az intermedier filament összeépülése nem energiaigényes (ATP/GTP) folyamat. Az IF-ek kevésbé érzékenyek a kémiai anyagokra, és oldhatatlanok a szerkezetük miatt. Az IF-ek össze – és szétszerelődése az alegységek foszforilált és defoszforilált állapotától függ. Az intermedier filamentek egy dinamikus hálózatot képeznek a sejt citoplazmájában (lásd ábra). Az IF-ek összekapcsolódnak a többi citoskeletális elemmel. A mikrotubulusokkal és a mikrofilamentekkel való kapcsolódást a plakin családba tartozó fehérjék biztosítják, pl. a dimer plektin molekula.

### Mikrofilamentek

Igen hosszú filamentek, 8 nm átmérővel. G-aktin (globuláris aktin) monomerekből épülnek fel, melyek F-aktint (filament) hoznak létre. A mikrofilamentek nehéz meromiozinokkal lépnek interakcióba. A legtöbb sejt cortex része vastag mikrofilament kötegeket tartalmaz. A mikrovillusok és a csillók a sejt felszínén szintén tartalmazznak mikrofilamenteket. A mikrofilamentek abundánsok az izomsejtekben, ahol vékony filamenteknek hívjuk őket és a vastag filamentekkel, a miozinokkal kapcsolódnak, együttesen felelősek az izom összehúzódásért. A mikrofilamenteknek alapvető szerepe van a mozgásban, a csillók és ostorok mozgásában és a sejtosztódásban (lásd ábra).

Az aktin alegység négy domént tartalmaz (lásd ábra). Az ATP kötő zseb minden domén közepén helyezkedik el. ATP jelenlétében az aktin monomerek polimerizálódnak, és egy flexibilis, helikális fonalat hoznak létre. Az alegységek elrendeződése miatt a filament egy kétszálú szerkezetet vesz fel, melyen két helikális árok fut végig. Mivel minden egyes monomernek van polaritása, így a mikrofilament is rendelkezik polaritással. A filament két vége, a plusz és a mínusz vég, eltér szerkezetükben és a dinamikus tulajdonságaiban.

Az aktin filament összeszerelődése (lásd ábra):

1. nukleáció: az aktin monomerek komplexet képeznek, a G-aktin alegységek beépülnek a komplex mindkét végébe. A plusz vég tízszer gyorsabban köti a monomereket, mint a másik vég.
2. elongáció: ha az ATP koncentráció esik, a monomerek csak a filament plusz végéhez kötődnek.
3. A fonalak szétszerelődése mindig a filament mínusz végén történik.

Az *in vitro* összeszerelődés során a polimerizáció és a depolimerizáció elér egy egyensúlyi állapotot (amikor az ATP koncentráció 0,3  $\mu\text{M}$ ). Ilyenkor azonos mennyiségű aktin monomer épül be a filament pozitív végébe, mint amennyi leválik a negatív végétől (lásd ábra). A sejt fenntartja az egyensúlyi állapotot a monomer és a polimer aktin között, így a mikrofilamentek termelése egy dinamikus folyamat.

### A mikrofilamentek motor fehérjei

A miozint először emlős harántcsíktolt izomból izolálták, de megtalálható protisztákban, növényekben, nemizom sejtekben, és a gerinceseknél a szív- és simaizomban. Minden miozin rendelkezik egy motor (fej) doménnel. A fej tartalmazza az aktin kötő helyet és a katalitikus helyet, mely ATP-t köt és hidrolizál, így termelve energiát a mozgáshoz. A fark régiók jelentősen eltérhetnek egymástól: különböző könnyűláncokból épülnek fel. A miozintokat alapvetően két nagy csoportba oszthatjuk:

1. Konvencionális miozinok (II-es típusú):

- a) Energiát termelnek az izomszövetben és néhány nemizom szövetben.
  - b) Minden II-es típusú miozin rendelkezik két nehézlánccal, két könnyű lánccal és két globuláris feji régióval (katalitikus hely)
  - c) Minden motoros aktivitáshoz szükséges komponens a feji régióban helyezkedik el.
  - d) A fark régió teszi lehetővé a filament képzést.
2. Nem konvencionális miozinok (I-es típusú):
- a) Egyetlen feji régióval rendelkeznek és nem képesek filamenteket képezni *in vitro*.
  - b) A miozin I pontos szerepe a sejt működésében nem ismert.
  - c) A miozin V az organellum transzportban játszik szerepet.
  - d) Számos I-es típusú miozin a citoplazmatikus vezikulumokhoz és az organellumokhoz kötődik.

A humán genom 16 különböző II-es típusú miozin nehézláncot kódol, ezek közül három a nem izom sejtekben található. A nem izom sejtekben a miozin alapvető szerepet játszik a sejtostódásban, a fokális adhézióban (melyhez nyomást generál), sejt migrációban, és a növekedési kúpok működésében. A II-es típusú mioziok tartalmaznak egy pár globuláris fejet, melyek a katalitikus helyei a molekulának. Egy pár nyaki régiót, mindegyik egyetlen megszakítatlan  $\alpha$ -hélixből és két asszociált könnyűláncból áll. Valamint egy hosszú, pálcaszerű fark régiót tartalmaz (lásd ábra). A nem konvencionális miozinokat 1973-ban fedezték fel. Habár a miozin I szerepe ez ideig ismeretlen, a miozin V egy speciális motor fehérje, aminek a vezikula transzportban van szerepe. A miozin V egy dimer fehérje két globuláris fejjel, ami progresszíven halad előre az aktin filamenten (lásd ábra). A processzivitását a feji régió aktin filament iránti nagy affinitása okozza. A miozin V-nek egy speciálisan hosszú (23 nm) nyaka van, ami háromszor akkora, mint a miozin II-é. Mivel olyan hosszú a nyaki régiója, ezért nagyon hosszú lépéseket tud tenni az aktin felszínén.

Számos nem konvencionális miozin (I, V, és VI) különböző típusú citoplazmatikus vezikulumokhoz és organellumokhoz kapcsolódik. Néhány vezikulum mikrotubulusra jellemző motor fehérjét (kinezinek, citoplazmatikus dinein) vagy mikrotubulusra jellemző motor fehérjét (nem konvencionális miozinok) is tartalmaznak. A két típushoz tartozó motor fehérjék egymáshoz kapcsolódnak. A citoskeletális elemek kooperálnak egymással. A motor fehérjék képesek átadni a vezikulumot egy másik motor fehérjének, így a transzport folyamatos akár anterográd, akár retrográd irányba zajlik (lásd ábra).

### Aktin-kötő fehérjék

Az aktin filamentek a non-musculáris sejtekben eltérő stuktúrákba tömörülhetnek: kötegek, vékony, két-dimenziós hálózatok, és komplex három-dimenziós géleket alkothatnak. Az aktin filamentek szerveződése és viselkedése több mint 100 különböző aktin-kötő fehérjétől függ, melyek befolyásolják a filamentek összeszerelődését és szétszerelődését, a fizikai tulajdonságukat, illetve egymással és más organellumokkal kialakított kapcsolataikat.

Az aktin-kötő fehérjék fő típusai:

1. Nukleációs fehérjék: segítik az aktin filamentek nukleációját. Arp2/3 komplex két Arp fehérjét tartalmaz, melyek olyan konformációt vesznek fel, ami kiindulási pontot adnak az aktin monomerek beépüléséhez.
2. Monomer szekvesztráló fehérjék: thimozinok olyan fehérjék, amik aktin-ATP monomereket kötnek és gátolják a polimerizációt. Eltolják a monomer-polimer egyensúlyt és meghatározzák, melyik folyamat menjen végbe.
3. Vég-blokkoló (capping) fehérjék: az aktin filamentek hosszát szabályozzák. A filament egyik vagy másik végéhez kötődnek, egy sapkát képezve beburkolják a felszínét, így gátolják az alegységek beépülését és disszociálását.
4. Monomer polimerizáló fehérjék: a profilin egy kisméretű fehérje, ami a G-aktin egyik oldalához kötődve katalizálja az ADP leválását, amit az ATP így helyettesíthet.

5. Aktin filament depolimerizáló fehérjék: kofilin, ADF, és depaktin fehérjék az aktin-ADP alegységekhez kötődnek. Szétbontják az aktin filamenteket, és elősegítik a depolimerizációjukat. Ezek a fehérjék az aktin filamentek gyors átrendeződését okozzák.
6. Keresztbekötő fehérjék: Az aktin filamentek 3-dimenziós organizációját változtatják meg. Ezeknek a fehérjéknek két vagy több aktin-kötő helyük van, így kettő vagy több önálló aktin filamentet képesek összekötni (pl. filamin).
7. Filament törő fehérjék: az aktin filament egyik oldalához kötődnek és kettétörik azt. A törő fehérjék segítik az aktin monomerek beépülését, mivel szabad végeket hoznak létre (pl. gesolin).
8. Membránkötő fehérjék: hozzákötik az aktin filamenteket a plazmamembránhoz a perifériás membrán fehérjéken keresztül. A plazmamembrán együtt mozog az összehúzóerő fonalakkal és a citoskelettonnal (pl. helyváltoztató mozgás, sejt alakja, fagocitózis).



## 5. A DNS SZERKEZETE, KROMOSZÓMA, KROMATIN, GENOM ÉS GÉNEXPRESSIONS

### 5.1. BEVEZETÉS

A 40-es évek végén a kutatók felfedezték, hogy a DNS az a genetikai anyag, mely az öröklődésért felelős. Azonban nagyon nehéz volt azt leírni, hogy a DNS hogyan képes jellegeket örökíteni, ha mindössze négy alegységből épül fel. A röntgen diffrakciós analízis kimutatta, hogy a DNS polimer két láncból épül fel, mely egy hélixet képez. A DNS részletes és pontos leírása azonban csak 1953-ban készült el Watson és Crick által.

### 5.2. A DNS SZERKEZETE

A dezoxiribonukleinsav molekula négy nukleotid bázisból épül fel: adenin (A), timin (T), guanin (G) és citozin (C). Az adenin és a guanin bázisok purin, míg a citozin és a timin bázisok pirimidin bázisok (lásd ábra).

A nitrogén tartalmú bázis egy ribóz molekulával alakít ki kötést. Ezt a molekulát nukleozidnak nevezük. A nukleozid a hozzá kapcsolódó foszfát csoporttal alkotja a nukleotidot (lásd ábra). A nukleotidok speciális összekapcsolódása révén a DNS lánc rendelkezik polaritással. A nukleotid 5' végén elhelyezkedő foszfát csoport a ribóz 3' végén lévő –OH csoportjával alakít ki foszfodiészter kötést.

### 5.3. A DNS BÁZIS ÖSSZETÉTELE

1950-ben Erwin Chargaff írta le felfedezését, miszerint a DNS bázis összetétele és a négy bázis aránya nagyon eltérő a különböző organizmusoknál. Chargaff szabálya szerint az adeninek száma megegyezik a timinek számával, valamint a citozinek száma megegyezik a guaninok számával. Azonban az adeninek és timinek összege nem egyenlő a citozinek és guaninok összegével.

### 5.4. A WATSON-CRICK MODELL

(lásd ábra)

1. A molekulát alkotó nukleotidok két láncot alkotnak.
2. A két lánc egymáson feltekeredve *jobbmenetes hélixet* képez.
3. A kettős hélixet alkotó két lánc ellentétes irányban fut, tehát *antiparalel* lefutásúak. Az egyik lánc 5'-3' irányban áll, míg a másik szál 3'-5' irányba halad.
4. Mindkét lánc cukor-foszfát gerince a molekulából kifelé néz, míg a bázispárok a molekula belseje felé néznek.
5. A foszfát csoportok *negatív töltést* adnak a DNS-nek.
6. A bázisok közötti *hidrofób kölcsönhatások* és *van der Waals kötések* adják a DNS molekula *stabilitását*.
7. A két láncot az egymással szemben álló bázisok közötti hidrogénkötések kapcsolják össze (A=T; G≡C).
8. A DNS gerincének foszfor atomja és a molekula axis (tengely) közötti távolság 1 nm.
9. A kettős hélix 2 nm széles.
10. A pirimidin bázis mindig purin bázissal alkot párt (A-T; C-G).
11. Az egymás mellett lévő fordulatok a hélix felszínén két, eltérő szélességű árkot képeznek: nagy árok és kis árok. A DNS-kötő fehérjék többnyire olyan doménekkal rendelkeznek, melyek ezekben az árokban tudnak a DNS-hez kapcsolódni.

12. A kettős hélix egy fordulatát 10 nukleotid alkotja (3,4 nm).
13. Az egyik lánc nukleotid szekvenciája mindig meghatározza a másik lánc szekvenciáját, a két lánc egymással *komplementer*.

A DNS felelős az öröklődésért. A DNS tartalmazza a genetikai információt és tárolja az aminosavak helyes sorrendjének kódjait is, így meghatározza a fehérjék aminosav szekvenciáját. Ezen kívül a DNS-nek tartalmaznia kell az új DNS szál szintéziséhez szükséges információkat is. A DNS szabályozza a sejt aktivitását, és a genetikai információ kifejeződéséért is felelős.

## 5.5. A DNS FELTEKEREDÉSE (SUPERCOILING)

DNS molekulák a sejtmagban kompakt formát vesznek fel. Ehhez a molekulák saját maguk körül föltekernednek. A DNS-nek ezt a konformációját szuperhelikális szerkezetnek nevezzük. Ebben az állapotban a DNS kompakt, és elfér a sejtmagban, extracelluláris hatásra sokkal gyorsabban mozog (elektromos tér, centrifugális erő).

1. Relaxált DNS: a hélix minden fordulatában 10 bázispár található.
2. Alultekeredett DNS: fordulatonként több mint 10 bázispár található.

A DNS stabilabb a fordulatonként 10 bázispárral, így a DNS fel tud tekernedni és szuperhelikális szerkezetet tud kialakítani. Az alultekeredett molekula spontán negatív szuperhelikális szerkezetet vesz fel (lásd ábra). Így a DNS alultekeredett formája *negatív szuperhelikális*, míg a túltekeredett DNS *pozitív szuperhelikális* szerkezetet vesz fel. A negatív szuperhelikális DNS olyan erőt tud kifejteni, ami segíti a hélix két láncának szétválását, ami alapvetően szükséges a replikációban és a transzkripcióban.

## 5.6. TOPOIZOMERÁZOK

A topozimerázok olyan enzimek, melyek kialakítják vagy megbontják a DNS szuperhelikális szerkezetét. Két típusuk ismert:

1. I-es típusú topozimerázok: tranziens törést okoznak a DNS duplex egyik szálán. Az enzim elhasítja az egyik szálat, így a másik, érintetlen, komplementer szál szabályozott rotáción esik át, a szuperhelikális forma relaxált formává alakul. Ez a szerkezeti átalakulás szükséges a DNS replikációban és a transzkripcióban.
2. II-es típusú topozimerázok: mindkét szálon tranziens törést okoznak. Az enzim működését az előadás ábra mutatja. A topozimeráz II szerepe:
  - a) feltekeredés-relaxáció
  - b) katenáció-dekatenáció
  - c) összekötés-szétválasztás (lásd ábra)

## 5.7. GÉNEK ÉS KROMOSZÓMÁK

(lásd Bevezetés a genetikába fejezetet további részletekért)

Az élőlények tulajdonságainak kialakításáért az öröklődés egységei, a gének felelősek. Minden tulajdonságot egy gén két formája (általában) az allélek határoznak meg. Az allélek lehetnek azonosak, vagy különbözőek. Ha nem azonosak, akkor a domináns allél elnyomja a recesszív allél kifejeződését. A gének a kromoszómákon helyezkednek el. A kromoszómákat először 1880-ban, osztódó sejtekben fedezték fel német kutatók. 1903-ban Walter Sutton írta le, hogy a kromoszómák fizikai hordozói a genetikai faktoroknak. A kromoszómák *kromatin szálakból* épülnek fel. Minden kromoszóma egyetlen, folytonos DNS molekula.

## 5.8. TELOMÉREK

(lásd ábra)

A telomér szekvencia a kromoszóma specifikus régiója mely a DNS molekula végén helyezkedik el. A telomér szekvencia ritka ismétlődő szekvenciából épül fel (500-5000 kópia). A teloméreknek konzervált szerepük van a gerinceseknél. Számos specifikus DNS-kötő fehérje kapcsolódik a kromoszóma telomér szekvenciához. A DNS 3' túlnyúló vége visszafordulva egy hurkot képez a telomer körül, így védve azt (lásd DNS replikáció fejezetet további részletekért). 1984-ben Elizabeth Blackburn és Carol Greider felfedezett egy új enzimet, a telomerázt, mely képes új nukleotidokat adni a telomér 3' végéhez. Így a DNS polimeráz az újonnan szintetizált ismétlődő szekvenciákat templátként használja a komplementer DNS szál 5' végéhez. A telomeráz enzim tulajdonképpen reverz transzkriptáz, mely DNS-t szintetizál RNS templátról. Általában az enzim maga tartalmazza az RNS templátot a szintézishez. A telomér régióknak különböző szerepe van:

1. a kromoszóma teljes replikációja
2. a kromoszóma védelme a nukleázoktól
3. gátolja a DNS molekulák fúzióját

A telomerázok nélkül a telomér régió minden sejtosztódásnál rövidülne. Mivel a telomerázok aktivitása minden sejtosztódás során csökken, a sejt így ténylegesen elér egy kritikus pontot, amikor a telomér szekvencia hossza nem elegendő a következő osztódáshoz, így a sejt elpusztul (öregedés folyamata).

## 5.9. CENTROMÉR

A kromoszóma centromér régiója a DNS azon része, ahol a behúzódnak található (lásd ábra). Középső része tandem ismétlődő (171 bázispár) DNS szekvenciákból (szatelit DNS-lásd Bevezetés a genetikába fejezet) és fehérjékből épül fel, amit kinetochornak hívunk. Az osztódási orsó fonalai (mikrotubulusok) a kinetochor régióhoz kapcsolódnak a mitózis vagy meiózis során.

## 5.10. KROMATIN

(Lásd Bevezetés a genetikába fejezetet további részletekért)

A kromatin a DNS és fehérjék komplexe. A szerkezete folyamatosan változik a sejtciklus különböző szakaszaiban: legkevésbé kompakt a DNS szintézis fázisában (S fázisban), és a legkompaktabb a sejtosztódás fázisában (M fázis). Az interfázisban a kromatin két típusát különíthetjük el: eukromatin és heterokromatin.

1. Eukromatin:
2. aktív DNS
3. transzkripció itt zajlik
4. változó szerkezet: kondenzáció és relaxáció váltja egymást a sejtciklus
5. során
6. Heterokromatin: egyszerű DNS szekvencia
7. centromér és telomer régiók
8. a sejtmaghatárhoz kapcsolódik
9. inaktív DNS/tartósan csendesített
10. konstitutív heterokromatin: soha nem expresszálódik a sejtciklus során
- a) ismétlődő szekvenciák
11. fakultatív heterokromatin: néha expresszálódik
12. inaktivált az életciklus speciális szakaszaiban vagy
13. bizonyos típusú differenciált sejtekben

### 5.11. A DNS KONDENZÁCIÓJA, A KROMOSZÓMA KÉPZŐDÉSE

A kromatin kondenzációja számos specifikus fehérjét igényel. Ezek a fehérjék a *hiszton fehérjék*, amik a kondenzáció alapelemét hozzák létre és a *nonhiszton fehérjék*, melyek a DNS további kompaktálódását segítik. A hiszton fehérjéknek öt fő osztálya van: H1, H2A, H2B, H3, és H4 a méretük és az aminosav összetételük alapján (lásd táblázat). A szerveződés első szintje a *nukleoszóma* (lásd ábra). A nukleoszóma 8 hiszton fehérje komplexe (kettő a H2A, H2B, H3, H4 fehérjékből). Minden nukleoszómának van egy nukleoszóma *központi* része, ami egy 146 bázispárból álló szuperhelikális DNS szekvenciát tartalmaz. A H1 hiszton a nukleoszóma külső részén helyezkedik el, közel a DNS azon részéhez, ahol elhagyja a nukleoszómát. Így a H1 egy összekötő elem a nukleoszóma központi része és az ún. *linker DNS* fragment között, így összeköti az egymás után következő nukleoszómákat. Az összekötő DNS szakasz 53 bp hosszúságú.

### 5.12. A HISZTON ÉS NONHISZTON FEHÉRJÉK JELLEGZETESSÉGEI

1. hiszton fehérjék:
  - a) pozitív töltésűek, bázikusak (lizin és arginin aminosavak)
  - b) abundánsak
  - c) minden sejttípusban megtalálhatók
  - d) konzervált szerepük van
  - e) a kompaktálódás első szintjéhez szükségesek (nukleoszóma)
2. nonhiszton fehérjék:
  - a) a kromoszónával asszociálódnak
  - b) több típusuk van
  - c) mennyiségük a sejttípussal együtt változik
  - d) DNS-sel és más fehérjékkel kapcsolódnak (pl. hisztonok)
  - e) negatív töltésűek, savasak

### 5.13. A KROMATIN TOVÁBBI KONDENZÁLÓDÁSA

A kondenzáció második szintje a „gyöngyök a láncon” konformáció. ebben a szerkezeti elemben a nukleoszómák az összekötő DNS-en keresztül egymáshoz kötődnek. (lásd ábra). Ezt követően a nukleoszómák egy 30nm-es kromatin szállá alakulnak a H1 hiszton segítségével. A H1 fehérje pontos szerepe nem ismert, de a jelenléte szükséges a DNS kompaktálódásához. A nukleoszómák feltekerednek és szolenoidot alkotnak (szolenoid modell). A szolenoid hat nukleoszómát tartalmaz, és három szolenoid képez egy 30 nm-es kromatin szálat (lásd ábra). A linker DNS finoman feltekeredik, ahogy a központi részekhez kapcsolódik, ami egyetlen, folytonos helikális struktúra, mely 6-8 nukleoszómát tartalmaz. A DNS kondenzáció másik elmélete szerint, amit cikk-cakk modellnek hívnak, az összekötő DNS szakasz egyenes, nyújtott állapotú, oda-vissza keresztelkedik az egymást követő központi részek között. A központi rész pedig két különálló nukleoszóma oszlopból épül fel. A kondenzáció a hurok domének kialakulásával folytatódik. A hurok domének egy 300 nm széles kromatint hoznak létre a 30 nm-es szálaból. Egy humán kromoszóma hozzávetőlegesen 2000 hurok domént tartalmaz. A DNS hurok domének a nonhiszton fehérjék alkotta scaffold régióhoz kötődnek. Speciális DNS szakaszok, a mátrixhoz kötődő régiók (MAR) a nukleáris mátrix elemeihez kapcsolódnak (lásd ábra). A II-es típusú topoizomerázok szintén jelen vannak a scaffold rétegben, és a DNS feltekeredését szabályozzák. Amikor a sejtek felkészülnek a mitózisra a hurok domének tovább tömörödnek és létrehozzák a mitotikus kromoszómákat (metafázisos kromoszómák) (lásd ábra).



## 5.14. A GENOM

(Lásd Bevezetés a genetikába fejezetet további részletekért)

## 5.15. A GENOM KOMPLEXITÁSA

A DNS duplaspirál fontos tulajdonsága hogy a szálak szét tudnak válni és szétválás után újra össze tudnak kapcsolódni. A szétválást nevezzük denaturációnak. A DNS olvadása tulajdonképpen a DNS denaturálódása az emelkedő hőmérséklet következtében. A DNS denaturálódása nyomon követhető fotometriáson, 260 nm-es hullámhosszon (lásd ábra). Az a hőmérsékleti érték, ahol az abszorbancia hirtelen változik, és a DNS szálak fele denaturált állapotban van, az olvadási hőmérséklet ( $T_m$ ). Minél magasabb a DNS GC tartalma, annál magasabb a  $T_m$ . A magasabb GC tartalommal rendelkező DNS magasabb stabilitását a bázispárok között kialakuló hármashidrogénhid okozza (AT között csak kettő van).

A DNS másik jellegzetessége, hogy a két szétvált lánc képes újra összekapcsolódni a komplementer bázispárosodás alapján. Ezt a folyamatot renaturálásnak nevezik. A renaturálódást is lehet monitorozni fotometriáson. A DNS-nek ez a tulajdonsága vezetett a hibridizációs technikák kifejlesztéséhez, melyek alapjait képezik olyan módszereknek, mint a szekvenálás, *in situ* hibridizáció, northern blott, southern blott stb.

A genom komplexitását a DNS szálak denaturálódásából és renaturálódásából lehet meghatározni. Ezeket a folyamatokat befolyásolja az oldat ionerőssége, az inkubáció hőmérséklete, a DNS koncentrációja, az inkubáció időtartama és az összekapcsolódó molekulák mérete. Ha különböző organizmusok renaturációs görbéit összehasonlítjuk pl. vírusok és baktériumok, láthatóvá válik, hogy ha a genom nagyobb méretű, akkor a renaturáció több időt vesz igénybe (lásd ábra). Ha a genom kisebb, akkor a renaturálódás gyorsabb.

Az eukarióta sejt genomja komplexebb, mint a prokariótáké. Ha DNS kettős spirált széthasogatjuk és meghatározzuk a renaturációs görbét, láthatjuk, hogy a görbék nem szimmetrikusak csak a prokarióták és a vírusok esetében. Ennek oka az eukarióta DNS-ben eltérő mennyiségben jelen lévő, különböző nukleotid összetételű fragmentek. Az eukarióta genom reasszociációja három elkülönülő lépésből áll, mely a DNS három osztályát alkotja: gyakran ismétlődő frakció, közepesen ismétlődő frakció és nem ismétlődő frakció (lásd ábra).

1. Gyakran ismétlődő frakció:
  - a) szatelit DNS
  - b) miniszatelit DNS
  - c) mikroszatelit DNS
2. közepesen ismétlődő frakció:
  - a) Retrotranszpozonok (RNS)
  - b) DNS transzpozonok
  - c) Ismétlődő DNS szekvenciák kódoló funkcióval (rRNS, hisztonok)
  - d) Ismétlődő DNS szekvenciák kódoló funkció nélkül:
    - SINE (rövid szétszórt nukleáris elemek),
    - LINE (hosszú szétszórt nukleáris elemek),
    - LTR (hosszú terminális ismétlődések)
3. Nem ismétlődő frakció:
  - a) fehérje kódoló gének

## 5.16. GÉNEK, GÉNC SALÁDOK, PSZEUDOGÉNEK

(Lásd Humán genom project és Bevezetés a genetikába fejezeteket további részletekért)

Ha összehasonlítjuk különböző fajokból származó sejtek teljes kromoszómális DNS-ét, nyilvánvalóvá válik, hogy a DNS nagy része nem kódol RNS-t, vagy nincs szabályozási illetve strukturális funkciója. A gének nagy része (90-95%) fehérjét kódol. Rengeteg csak RNS-t kódoló gén található a genomban. A legújabb kutatások szerint az RNS gének sokkal fontosabbak, mint azt korábban gondoltuk. A humán fehérjéket kódoló gének összmennyiségét 30,000–35,000-re becsülik.

1. Egyedi gének: a haploid genomban csak egy példányban fordulnak elő
2. Duplikált vagy szétvált gének különböző géncsaládokban: A géneknek hasonló, de nem azonos az aminosav szekvenciájuk
3. Tandem ismétlődő gének, melyek rRNS, tRNS, snRNS molekulákat és hiszton fehérjéket kódolnak

A *pszudogének* a gének nem funkcionális változatai. Tartalmazzák a funkcionális gén majdnem teljes szekvenciáját, csak stop kodont, kereteltolódást hordoznak a szekvencia középtáján, vagy hiányzik a promóter régiójuk, vagy trunkált változatok, illetve génfragmentek:

1. Nem processzált pszudogének: tandem génduplikáció vagy ugráló elem mozgása során képződnek
2. Processzált pszudogének: mRNS-ből jönnek létre, az RNS reverz transzkripción esik át és random beépül a genomba

## 5.17. GENOM ÉS GÉN EXPRESSZIÓ

(Lásd Humán genom project és Transzkripció fejezetek)

A genom továbbviteléhez (genetikai információ) a sejtnek meg kell kettőznie a teljes DNS állományát, anélkül, hogy hibát ejtene a DNS-ben. A DNS szintézis után a sejtnek szét kell választania a DNS-t az utódsejtekbe. A transzmisszióhoz és a genom fenntartásához számos fehérje és folyamat szükséges: DNS polimerázok, DNS replikáció, replikáció és szegregáció szabályozása a mitózis/meiózis során. A nukleinsavak pontos szétválásához, a DNS-nek fehérjékkel (hisztonok) együtt kromoszómákba kell tömörülniük. A gének lineárisan helyezkednek el a kromoszómákon, köztes DNS elválasztó szekvenciákkal.

Ha a különböző organizmusok genom méretét összehasonlítjuk, láthatjuk, hogy nincs egyszerű korreláció a genom mérete és az organizmus komplexitása között. Ennek oka, hogy relatíve kevés gén kódol számos fehérjét, és a különböző organizmusokban a gének sűrűsége is eltérő (lásd táblázat). Emberben 3 milliárd bázispár kódol 29 ezer gént, míg a rizsben fél milliárd bázispár 59 ezer génhez tartozik.

Amikor a sejtnek szüksége van fehérjékre a metabolikus folyamatokhoz, a fehérje kódoló gének mRNS-sé íródnak. Ez a folyamat a DNS transzkripciója mRNS-sé (lásd ábra). Ezek az RNS molekulák szolgálnak templátként a fehérjék szintéziséhez (transzláció). A genetikai információ áramlása a DNS-ről az RNS-re majd a fehérjére (molekuláris biológia centrális dogmája). Az elmúlt néhány évtizedben kiderült, hogy a fehérjék szintén képesek szabályozni a génexpressziót vagy az mRNS molekulák érési folyamatát (RNS splicing). Ezen kívül léteznek olyan enzimek, melyek képesek visszaírni az RNS molekulákat DNS-sé. Így a genetikai információ áramlása kétirányú. A génexpresszió szabályozása minden szinten lehetséges:

- Kromoszóma
- Transzkripció

- RNS mozgás és processzáció
- RNS élettideje
- Transzláció
- Poszttranszlációs processzáció
- Fehérje élettideje

A gének expressziója időben és térben is szabályozódik a szövetek fejlődése során illetve az eltérő környezet hatására (sejtmag vs mitokondrium).



## 6. HUMÁN GENOM PROJEKT – A XX. SZÁZAD UTOLSÓ ÉVTIZEDÉNEK LEGNAGYOBB MISSZIÓJA

Előzmények:

**1953:** A DNS struktúrájának felfedezése (James Watson és Francis Crick)

**1973:** Az első publikált DNS szekvencia (24 bp, lac operator)

**1982:** A GeneBank indulása

**1983:** PCR kifejlesztése

**1987:** Az első automata szekvenáló

**1990:** A Humán Genome Projekt indulása

A HGP második időszakában vagyunk most. Az első, úgynevezett pregenomiális időszak 2003-ban ért véget az utolsó kromoszóma megszekvenálásával. Most a posztgenomiális periódusban a kapott információkat próbáljuk értelmezni. A program célja az volt, hogy leírják a humán genom 3 milliárd bázispárját (bp) az első kromoszóma rövid karjának telomerjétől az Y kromoszóma hosszú karjának telomerjéig.

A genom a haploid, vagy diploid sejt teljes genetikai állományát jelenti, a teljes DNS állományt, ami a mag és a plasztiszok (mitokondrium, vagy kloroplasztisz) genomját is jelöli, de a célok között nem szerepelt a mitokondrium genomjának megszekvenálása, mivel azt 10 évvel a HGP előtt, 1981-ben elvégezték.

A program 1990-ben indult, abban az időben a kutatók úgy becsülték, hogy 30.000 évre és 3 milliárd dollárra lenne szükség a program befejezéséhez. (1 bp megszekvenálása abban az időben 1 USD volt és évente 100.000 bp-t tudtak megszekvenálni.) A kutatók mégis 15 évre tervezték a projektet, mert belekalkulálták a tudomány fejlődését. (Igazuk lett.)

A fő szponzor az Egyesült Államok Energetikai Hivatala (Department of Energy) és Egészségügyi Hivatala (National Institutes of Health=NIH) voltak. Mellettük voltak más szponzorok is: a WellcomeTrust, francia, német, japán és kínai kutatóközpontok. Kutatók szerte a világból csatlakozhattak pénzzel, vagy munkakapacitással: gépekkel, vagy munkaerővel. Őket nevezték közösen a „konzorcium”-nak

A program első igazgatója az a James Watson volt, aki a DNS kettős hélix szerkezetét írta le.

A projektben 9 ember genomját szekvenálták meg: 8 férfi és 1 nő. Azért csupán 1 nő, mert a nők genomi könyvtára 2 másolatot tartalmaz az X kromoszómáról és nem tartalmaz információt az Y kromoszómáról. Etikai okokból megtiltották, hogy a projekt résztvevői donorok is legyenek.

### 6.1. A KEZDETEK – A HIERARHIKUS MÓDSZER

Elsőként 100-200 bp hosszú marker szekvenciák lettek azonosítva minden 150.000 bp hosszú szakaszon, ezek a marker szekvenciák teljesen egyedi szakaszok kellettek, hogy legyenek, amik csak egyszer fordulnak elő a genomban.

Ezt követően feldarabolták a genomot 150.000 bp méretű, átfedő darabokra. Ezeket a darabokat BAC könyvtárakba klónozták (BAC=bacterial artificial chromosome=mesterséges baktérium kromoszóma). A teljesen identikus/redundáns klónokat szelektálták a többtől. Ezt követően a 150.000 bp hosszú darabokat tovább darabolták és ezeket a darabokat szekvenálták meg.

A darabokat elsőként az átfedő darabok alapján, majd a markerek segítségével állították össze. (A BAC klónok szekvenciáinak helye és elhelyezkedése a marker szekvenciáknak köszönhetően ismert volt.)

1998-ban, a projekt futása közben megjelentek az első nagy-hatékonyságú szekvenálók – ez forradalmasította a szekvenálást.

## 6.2. CELERA GENOMICS

1998-ban megalakult egy privát cég (a Celera Genomics), ami ugyancsak elkezdte a saját „Humán Genom Projektjét”: nem a konzorcium munkáját támogatta, hanem saját kutatást kezdett.

A Humán Genom Projekt kezdetekor a konzorciumnál kikötötték, hogy a projekt nem lehet profitorientált, az eredményeket közkinccsé kell tenni, mindenkinek joga van hozzáférni. Ezzel szemben a Celera a kapott adatokat pénzzé akarta tenni, ha előbb végeznek, mint a konzorcium. Az Egyesült Államok (akkori) elnöke, Bill Clinton is foglalkozott a kérdéssel, hogy mi eladható és mi nem: azt gondolta, hogy a szekvenciákat sosem szabadna pénzért árulni, azokhoz mindenkinek hozzá kellene férnie alanyi jogon.

Craig Venter, a Celera Genomics vezetője 2002-ben bevallotta, hogy a vizsgálatukban használt donork között ő is szerepelt, körülbelül a minták 3/5 részét adta a saját DNS-e.

### Eredmények: 2001. február

Mivel hatalmas verseny volt a konzorcium és a Celera Genomics között, mindkét projekt publikálta a részletes eredményeket. 2 szaklap hozta le az eredményeket, amik körülbelül 95%-os feldolgozottságon álltak. A Nature hozta le a nemzetközi konzorcium adatait, a Science a Celera Genomicsét.

A legérdekesebb kérdés az, hogyan volt képes a Celera Genomics végrehajtani ugyanazt a munkát ennyivel rövidebb idő alatt? (1990-2001 vs 1998-2001) A tudomány fejlődött és a Celera Genomics nem a hagyományos, időigényes hierarchikus módszert használták, hanem az úgy nevezett shotgun módszert: egészen apró darabokra vágták fel a szekvenciát mindkét végéről. Ahelyett, hogy biomarkereket használtak volna, nagy-hatékonyságú bioinformatikát vetettek be, hogy az átfedő darabokat összeillesszék.

A projekt teljes egészében 2003-ban zárult, amikor a konzorcium befejezte a szekvenálást.

Egészen 2013 december 13-ig a konzorcium által ekkor összeállított genomot használták humán referenciagenomnak, ekkor azonban kijött egy új összeszerelt változata, amit a „Genome Reference Consortium” adott ki.

### Eredmények

Az első meglepetés az volt, hogy „csupán” 20-25 ezer gént találtak (Ez is csak tippelt adat, funkció nélküli szekvenciák. A kezdetekben 80.000-re becsülték a gének számát, ma úgy gondoljuk ez olyan 25.000 körüli lehet.) A gének száma csak a kétszerese a Drosophila génjeinek. Az átlagos exon hossza 100-200 bp, az intronok átlagos hossza 1000-4000 bp. Egy átlagos gén 7-9 exont tartalmaz.

A „hasznos” rész az eredmények csupán 10%-a, de a valóban fehérjekódoló rész megközelítőleg 1,5-2%. A különbség 2 ember közöttigen nagy, 0,1%.

Egy átlagos kromoszóma mérete 130 Mbp: 50-250 Mbp közötti, az adott kromoszómától függően. A gének sűrűsége sem azonos a kromoszóma hosszán, sőt, a különböző kromoszómákon is eltérő,

például a génsűrűség a 19. és 22. kromoszómán jóval nagyobb, mint a 4., vagy a 18. kromoszómán. A telomer alatti régiók (a szubtelomerikus régiók) gazdagok génekben, míg a centromer körüli régiók és az Y kromoszóma hosszú karja géntől mentesek.

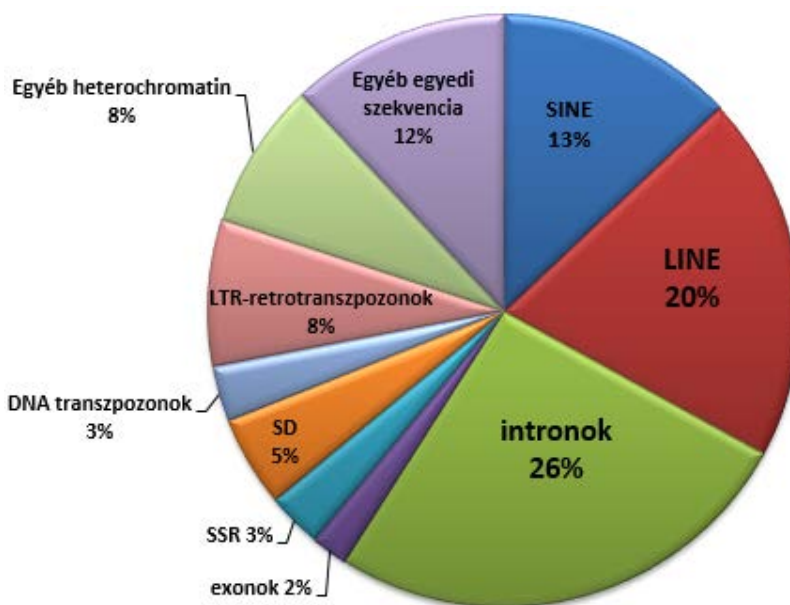
A legismertebb humán gén a disztrofin génje, 2,4 Mb hosszával és 79 exonjával.

Azt találták, hogy sok gén úgy tűnt, mintha duplikálódhatott volna, majd módosult az evolúció során, ezek a gének nagyon hasonlóak voltak, géncsaládokat hoztak létre, pl.: hisztonok, globinok, immunoglobulinok, MHCII fehérjék. Nemkódoló pszeudogének is duplikációkkal terjedtek el a genomban: számos nemkódoló szekvenciát találunk a genomban, ami igen hasonló kódoló régiókhoz. (Egy mutációt követően elveszíthették a funkciójukat.)

A kódoló régiók hosszát általában az intronok hossza határozza meg. Az exon-intron arány változhat a gének között, pl.: az intronok aránya 99,4% a disztrofin génjénél, 77% az ApoB (ApolipoproteinB) génében. Vannak azonban olyan gének a humán genomban is, amik nem tartalmaznak intronokat, például a hisztonok, a legtöbb tRNS, néhány hormon (dopamin, szerotonin,  $\alpha 2$  adrenerg receptor).

A gének közti átlagos távolság 30 Kb (szemben a prokariótákkal, ahol ez csak 1-5 kb).

A genom felépítése: *további részletekért lásd DNS szerkezete, kromoszóma, kromatin, genom fejezet!*



6.1. ábra: A genom felépítése

SINE: short interspersed nuclear elements=rövid közbeiktatott szakaszok; LINE: long interspersed nuclear elements=hosszú közbeiktatott szakaszok; SSR: simple sequence repeats=ismétlődő szekvenciák=mikroszatelliták; SD: szegmentális duplikációk

Transzpozonok=elszórt ismétlődő szekvenciák: képesek az áthelyeződésre, tehát olyan instabil DNS-ek, amik képesek megváltoztatni a helyüket a genomban. Ismétlődő egységeik hossza alapján osztályozzuk őket.

SINE (rövid közbeiktatott szakaszok) jellemzője az ismétlődési egységek igen nagy száma. Pl.: Alu szekvenciák (nevét a felderítésére használt Alu I restrikciós enzimről kapta) kb. 280 bp hosszú, de 700 000 – 1 000 000 kópiában fordul elő a humán genomban.

LINE (=hosszú közbeiktatott szakaszok) 1,4 - 6,1 kb hosszú szakaszok, 60 000 – 100 000 kópiaszámban.

LTR-retrotranszpozonok (=retrovírus-szerű transzpozonok) hosszú terminális repeateket tartalmaznak (long terminal repeats= LTRs), amik reverz transzkriptázt kódolnak és hasonlóak a retrovírusokhoz. Hosszuk: 100bp-5kb, akár félmillió kópia.

Tandem ismétlődő szakaszok: olyan, meghatározott számú ismétlődő bázisokból álló blokkok, amik csak bizonyos kromoszómaregiókban fordulnak elő. 3 csoportjuk van: szatellit DNS, miniszatellit DNS és mikroszatellit DNS.

**Szatellita DNS:** nevét onnan kapta, hogy eltérő bázisösszetétele miatt a teljes DNS cézium-klorid gradiens centrifugálásakor a DNS zömétől eltérő, más sűrűségű, kis, azaz szatellita sávban jelent meg. A genomban a szatellita DNS alkotja a nem kódoló heterokromatikus régiók zömét. Az ismétlődő egységek hossza 5 - 171 bp, a teljes blokk mérete 100kb-1Mb. Nem íródnak át. **Fontos szerepük van a sejtsztódás során, a húzófonalak kötődésében a centromernél.**

**Miniszatellita DNS:** nem íródnak át, és többnyire a genomban szétszórva található. Az ismétlődő szakasz hossza csak 6 - 25 bp, míg az ezekből felépülő blokkoké 0,1-20 kb lehet. A telomérákban és a teloméra közeli részekben fordulnak elő elsősorban.

**Mikroszatellita DNS:** 1 - 4 bp hosszú ismétlődő egységei gyakran 150 bp-nál is rövidebb elrendezéseket alkotnak. A tri- és tetranukleotid ismétlődési egységek ritkák, de különösen az előbbiek erősen polimorfak és orvosi jelentőségük igen nagy (trinukleotidrepeat mutációk és betegségek – trinukleotid expantiók). Míg a mononukleotid ismétlődő sorok főleg A vagy T bázisból állnak, s hosszuk akár 10 Mb is lehet, addig a dinukleotidok CT/AG felépítésűek. Egyik mikroszatellita DNS funkcióját sem ismerjük, de sok molekuláris biológiai módszer alapszik felhasználásukon, pl.: a DNS ujjlenyomat, azaz a DNS fingerprinting és a VNTR (VariableNumber Tandem Repeats=változó számú tandem ismétlődések).

### „Szemét” DNS

A HGP első periódusának befejezése után Francis Crick (a DNS szerkezetének leírója) azt mondta, a genom 99%-a csak kicsit jobb, mint a szemét („*little better than junk*” – 2003.)

Ma már tudjuk, hogy ez nagy tévedés volt és mekkora különbségeket alakíthatnak ki ezek a régiók a génexpresszióban. Annak felismerése után, hogy ezek a régiók fontosak, új célok születtek, mely során szeretnénk megérteni ezeknek a szekvenciáknak a szerepét genom-szintű asszociációs vizsgálatokon keresztül.

### ENCODE Project: Encyclopedia of DNA Elements – ezeket a szekvenciákat vizsgálja

Hipotetikus és igazolt funkcióik:

- Génexpresszió szabályozása
- Transzkripció faktorok kötőhelyei
- A genom védelme
- Genetikai „kapcsolók” (a génexpresszióban, mikor és hol)
- Enhancerek
- Silencerek
- Promoterek
- Operatorok
- Insulatorok



## 7. REPLIKÁCIÓ

A replikáció feladata a sejt genetikai állományának megkettőzése a sejtosztódás előtt.

### 7.1. A REPLIKÁCIÓ TULAJDONSÁGAI

- a teljes genomot érinti
- hatékony
- pontos
- szemikonzervatív
- kétirányú

### 7.2. PROKARIÓTA REPLIKÁCIÓ

A replikáció nagyon konzervált folyamat, a pro- és eukarióta replikáció nagyon hasonló. A különbségeket a következő alfejezetben soroljuk fel.

A replikáció a replikációs origónak nevezett AT gazdag szakaszon kezdődik. A bakteriális genom és plazmid origói eltérőek. Origó felismerő fehérjék indítják el a replikációt.

Mivel a kettős szálú és helikális szerkezetű DNS lánchoz a legtöbb fehérje nem képes kötődni, ezért a topoizomeráz I enzim szünteti meg a spirál szerkezetet. Az egyes szálakban keletkező feszültséget a lánchasításával szünteti meg.

A helikáz enzim egy irányba haladva választja el egymástól a DNS molekula két szálát. SSB (Single Strand Binding) fehérjék kapcsolódnak az egyszálú láncokhoz, megakadályozva azok renaturációját.

Mivel az összes ismert DNS polimeráz számára szükséges egy meglévő 3' OH csoport, ezért a primáz enzimnek RNS primereket (oligonukleotidokat) kell kapcsolnia a DNS szálakhoz. A DNS polimeráz III működése miatt a vezető szálra egy, a késlekedő szálra pedig számos RNS primerre van szükség.

Az új DNS láncok szintézisét a DNS polimeráz III nevű, nagyméretű holoenzim kezdi meg. Jellemző tulajdonsága a magas processzivitás (hosszú DNS szakaszokat képes szintetizálni anélkül, hogy leszakadna a templátról), az 5'-3' elongációs aktivitás és a 3'-5' exonukleáz aktivitás. A vezető szálon a DNS szintézis folyamatos és a replikációs villa irányába halad. A késlekedő szálon az ellenkező irányba halad a polimerizáció, ami mindig az előző Okazaki fragmentum RNS primeréig tart.

Az RNS primert a DNS polimeráz I enzim képes lehasítani, mivel rendelkezik 5'-3' exonukleáz aktivitással. Az 5'-3' elongációs aktivitása révén pedig képes DNS szintézis folytatására.

A DNS ligáz kapcsolja össze a szomszédos Okazaki fragmentumokat a hiányzó foszfodiészter kötés kialakításával.

A DNS topoizomeráz II elhasítja a DNS szálakat, ezáltal válik lehetővé a két cirkuláris kromoszóma szétválasztása.

### 7.3. A PROKARIÓTA ÉS EUKARIÓTA REPLIKÁCIÓ KÖZÖTTI KÜLÖNBSÉGEK

- Míg az alapvető folyamatok a replikáción belül nagyon hasonlóak mind a prokariótákban, mind az eukariótákban, számos különbséget találunk a két csoport között:
- A prokarióta genom egyetlen cirkuláris kromoszómából áll, ezért egyetlen replikációs origó a teljes genom megkettőzéséhez. Az eukarióta genom viszont nagyságrendekkel nagyobb, továbbá lineáris kromoszómákból áll, ezért a replikáció sok helyen indul meg egyszerre.
- Az eukarióta replikáció során a hisztonfehérjék számát is meg kell kettőzni.
- A lineáris kromoszómák végein telomer régiók találhatóak.
- Az eukarióta DNS polimerázok nem rendelkeznek 5'-3' exonukleáz aktivitással.

### 7.4. TELOMEREK ÉS TELOMERÁZOK

Az eukarióta kromoszómák lineárisak, a primáz enzim nem képes közvetlenül a DNS lánc 5' végére szintetizálni az RNS primert. Ezért a DNS lánc minden egyes replikáció során megrövidül. Annak érdekében, hogy a kódoló régiók ne sérüljenek, az ezeken a szakaszokon nem kódoló, repetitív szakaszok, úgynevezett telomer szakaszok helyezkednek el. Minden replikáció során ez a telomér régió rövidül. Bizonyos számú osztódás után azonban a teljes telomer szakasz lehasad, az azt követő sejtosztódások során pedig már kódoló szakaszok fognak sérülni, ami végzetes a sejt számára. Ez a folyamat része a természetes öregedésnek, gátat szab a sejtek korlátlan osztódásának.

Az ivarsejtekben és az embrionális őssejtekben azonban a telomeráz nevű enzim aktív és kromoszómák végén kiegészíti a telomer szakaszokat.

Malignus elváltozásoknak egyik közös ismérve, hogy a telomeráz enzim általában patológiusan aktív, ami lehetővé teszi a sejtek korlátlan osztódását.

## 8. DNS HIBAJAVÍTÁS

Genetikai állományunk koránt sem teljesen stabil, folyamatosan változik, ami ellen a sejtek számos DNS hibajavító rendszerrel próbál meg védekezni. DNS károsodást okozhat sugárzás, genotoxikus anyagok, hibák a replikáció során vagy akár DNS spontán módosulása is. A kémiai Nobel díjat 2015-ben Thomas Lindahl, Paul Modrich és Aziz Sancar kapták a DNS hibajavító folyamatok kutatásáért.

### 8.1. A DNS KÁROSODÁSOK TÍPUSAI

**Deamináció:** véletlenszerű deamináció hatására egy citozin nukleotid uracillá alakul. A következő replikáció során az uracil már adeninnel less komplementer, megváltoztatva az eredeti CG bázispárt TA szekvenciára.

**Depurináció:** amennyiben egy nukleotidról lehasad a purin bázis, replikáció során a komplementer szálon véletlenszerű szubsztitúció vagy deléción lesz az eredmény.

**Alkiláció:** amennyiben egy guanin nukleotidhoz egy metil csoport kapcsolódik, O<sup>6</sup>-metil-guanin jön létre. Ez a módosított nukleotid viszont citozin helyett timinnel fog párosodni, ezért a bázispár a replikációt követően GC-ről AT-re változik.

**Pirimidin dimerek:** UV sugárzás hatására létrejövő a károsodás. Az egy DNS láncon található a timin nukleotidok között két kovalens kötés jön létre, ami megváltoztatja a DNS konformációját, lehetetlenné téve a replikációt.

**Kettős szálú DNS törések:** a nagy energiájú gamma vagy ionizáló sugárzásra jellemző DNS károsodás, ahol a mindkét DNS szál töréseket szenved.

**Nem komplementer bázispárok:** replikáció során a DNS polimeráz véletlenszerűen beépíthet egy nem komplementer nukleotidot az újonnan szintetizált szálba.

### 8.2. HIBAJAVÍTÓ MECHANIZMUSOK

**Fotoreaktiváció** Számos prokarióta és eukarióta szervezet képes az UV sugárzás hatására kialakult pirimidin dimereket közvetlenül helyreállítani a fotoliáz enzim segítségével. Csak látható spektrumú, kék fény besugárzás hatására játszódik le a folyamat, innen kapta a fotoreaktiváció nevet is. Emberi sejtekben a fotoliáz enzim nem található meg, timin dimereket a nukleotid excíziós repair folyamat javítja.

### 8.3. BÁZIS EXCÍZIÓS REPAIR (BASE EXCISION REPAIR (BER))

A bázis excíziós repair a módosult, hibás nukleotidok javítását végzi. A hibát jellemzően a DNS kettős spirál szerkezetének torzulása jelzi. Egy DNS glikoziláz enzim felismeri a hibás nukleotidot és lehasítja a bázist a dezoxiribórról. A különböző DNS károsodásokat azokra specifikus DNS glikoziláz enzimek ismerik fel. A bázis lehasítását követően egy endonukleáz hasítja ki a bázist nem tartalmazó nukleotidot. A DNS lánc hiányát egy DNS polimeráz enzim javítja a megfelelő nukleotid beépítésével. A folyamatot egy ligáz enzim fejezi be a hiányzó foszfodiészter kötés létrehozásával.

**Nukleotid excíziós repair (NER)** A NER javítja a több nukleotidot érintő, illetve az olyan hibákat, melyek a DNS szerkezetét nagymértékben megváltoztatják (többek között a pirimidin dimereket vagy a módosult nukleotidokat). A hibák keresése két útvonalon zajlik:

- Transzkripcióhoz kötött útvonal, ami a gyakran átírt (tehát fontos) géneket ellenőrzi.
- Globális útvonal, ami a teljes genomot ellenőrzi, de az egyes szakaszokat csak jóval ritkábban, mint a transzkripcióhoz kötött útvonal.

A folyamat során endonukleázok (ún. excinukleázok) a hibás nukleotidtól bizonyos távolságra elhasítják a DNS szálát. Ezek után helikázok eltávolítják a hibás szakaszt, amit DNS polimerázok szintetizálnak újra, majd egy ligáz fejezi be a javítást a láncvégek egyesítésével.

**Nem komplementer bázisok javítása (mismatch repair (MMR))** A replikáció során a DNS polimeráz időről időre nem komplementer nukleotidot épít be a szintetizált szálba. Ezen hibák számát a proofreading aktivitás nagymértékben csökkenti, de az összes hibát nem tudja kijavítani. A javító rendszer a metilációs mintázat alapján tudja eldönteni, hogy melyik az eredeti, tehát a megfelelő nukleotidot tartalmazó szál. A hibás szakaszt endonukleázok és helikázok távolítják el, majd egy DNS polimeráz szintetizálja meg az új szálát, végül egy ligáz fejezi be a javítást.

**Kettős szálú DNS törés javítása homológ rekombinációval** Amennyiben a sejtben rendelkezésre áll a sérült szakasszal homológ szakasz (diploid sejtekben a homológ kromoszóma). A sértetlen szakasz lesz a templát a törés javításához. A javított szakasz a homológ szekvencia másolata. Gyakorlati felhasználás szempontjából hatalmas potenciál van ezen a mechanizmuson alapuló Crispr/Cas9 rendszerekben, melyekkel lehetséges az irányított „génszerkesztés” (lásd előadás)

**Kettős szálú DNS törés javítása nem homológ láncegyesítéssel** Ha a kettős lánc törés nem lehetséges homológ rekombinációval, DNS ligáz enzimek egyesítik a törött láncvégeket. Ezen folyamat velejárója, hogy mindkét DNS szakaszból lehasítódik néhány nukleotid hosszúságú szakasz, így a javítás nem tökéletesen állítja vissza a törés előtti állapotot.

**SOS válasz** Prokarióta, egysejtű szervezetekben aktiválódik a rendszer olyan esetben, amikor DNS károsodások javítása már nem lehetséges, a cél csupán a replikáció és az osztódás befejezése.

## 8.4. A DNS HIBAJAVÍTÓ MECHANIZMUSOK ORVOSI JELENTŐSÉGE

Ha a hibajavító mechanizmusok egyik eleme maga is mutálódik, az óhatatlanul a mutációs ráta megemelkedésével jár. Ennek egy klasszikus példája a *xeroderma pigmentosum*, ahol a NER egyik eleme sérült. A betegek extrém érzékenyek az UV sugárzásra. Bőrük közvetlen napsugárzás hatására nagyon gyorsan „megég”, illetve a felhalmozódó mutációk következményeképpen a bőrrák kialakulásának esélye is sokkal magasabb, mint az egészséges populációban.

## 9. TRANSZKRIPCIÓ (PRO-, EUKARIÓRA, SZABÁLYOZÁS)

### 9.1. ÁLTALÁNOS JELLEMZŐK

A transzkripció az a folyamat, amely során a DNS-ben a nukleotid sorrendben elraktározott információ RNS molekulákká íródik át. Az RNS ugyanazt a „nyelvet” használja, azaz a nukleotid sorrendet, mint a DNS. Jelentős hasonlóságok és különbségek találhatók a **replikáció (DNS szintézis)** és a **transzkripció** között.

*Hasonlóságok:*

- a templát a DNS
- az RNS polimeráz , amely a transzkripció enzime a DNS polimerázhoz hasonló enzimatis reakciót katalizál
- mindkét polimeráz processzív enzim

*Különbségek:*

- a transzkripcióban csak a DNS egyik szála a templát
- a transzkripció során a DNS-nek csak egyes régiói íródnak át
- az RNS polimeráznak csak korlátozott proofreading aktivitása található
- az RNS polimeráz szerkezete eltér a DNS polimerázétól
- az RNS polimeráz nem igényel primert a szintézishez.

#### Az RNS típusai

Az RNS fő kategóriái: mRNS, rRNS és tRNS. A mRNS (**messenger**) információt hordoz a DNS-től a riboszómákhoz, amely a fehérje szintézis helye (transzláció). A rRNS-ek (**riboszomális**) a riboszómák strukturális és funkcionális nukleinsav komponensei. A tRNS (**transfer**) a mRNS és az újonnan szintetizálódó fehérje aminosav sorrendje között biztosít kapcsolatot.

A transzkripciónak **három szakasza** van: iniciáció, elongáció és termináció. Prokariótákban és eukariótákban ezek a szakaszok hasonló és eltérő jellegzetességeket is mutatnak, a fő eltérések az iniciációs és terminációs jelek felismerésében találhatók. A transzkripció minden sejtben nagyfokban **szabályozott**, különböző szinteken, elsősorban az iniciáció szakaszában.

### 9.2. TRANSZKRIPCIÓ A PROKARIÓTÁKBAN

#### RNS polimeráz

A prokariótákban csak egyetlen fajta **DNS-függő RNS polimeráz** található, valamennyi RNS fajtát ez az enzim állítja elő. Az enzimnek öt alegysége van ( $2\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $1\beta'$ ,  $1\Omega$ ), amelyek a magenzimet alkotják. A magenzim a DNS kettős hélix-szel csak laza kapcsolatot alkot. Szekvencia specifikus, erős interakció a DNS-sel az RNS polimeráz **holoenzim** segítségével jön létre, amelyben a magenzimhez a szigma ( $\sigma$ ) faktor is csatlakozik. A **szigma faktor** feladata a promóter DNS szekvencia felismerése, ahová a holoenzim tud kötődni egy specifikus RNS átírásának kezdetéhez. A szigma faktor más szakaszai megakadályozzák, hogy különálló szigma faktor kötődhessen a DNS-hez. Egy prokarióta sejtben több különböző fajta szigma faktor található, amelyek mindegyike egy adott gén csoport promóterét ismeri fel. Nem minden szigma faktor van jelent a sejtben folyamatosan, szintézisük környezeti faktoroktól függ. A **primér szigma faktor** az úgynevezett house keeping gének promóterét ismeri fel (ezeknek a

géneknek a terméke a sejt mindennapi életében és növekedésében nélkülözhetetlen), míg az **alternatív szigma faktorok** csak megfelelő körülmények hatására szintetizálódnak.

### Iniciáció

A szigma faktorok által felismert promóter szekvenciák a konszenzus szekvenciák közé tartoznak. A **konszenzus szekvencia** egyfajta statisztikai valószínűség, nem egy valójában létező, hanem egy idealizált szekvencia. Minél inkább hasonlít egy valószínű szekvencia a konszenzus szekvenciához, annál erősebb a promóter. Egy erős promótert leginkább úgy definiálhatunk, hogy a transzkripció gyakran indul erről a promóterről, a gén gyakran expresszálódik. A primér szigma faktor által felismert bakteriális promóterek komponensei: -35, -10 és esetenként az UP elemek.

#### Az iniciáció fázisai

**Zárt komplex:** az RNS polimeráz holoenzim hozzákapcsolódik a DNS promóter régióhoz. A kettős szálú DNS felnyílik, a promóter környezetében széttekeredik, így a **nyitott komplexben** az RNS polimeráz szoros kapcsolatba léphet a templát DNS szállal. Az **iniciációs komplexben** rövid RNS szál szintetizálódik, amely egy RNS–DNS hibridet hoz létre. Amikor ez elég hosszú, az RNS polimeráz tovább mozdul a DNS templáton, maga mögött hagyva a promóter szakaszt és elengedve a szigma faktort (**promóter clearance**).

### Elongáció

Az új RNS szintézise során az RNS polimeráz **processzív módon** halad előre, viszonylag nagy sebességgel (20-50 nukleotida /szekundum). Mivel a transzkripció buborék mozog, a DNS –en belül pozitív és negatív feltekeredés alakul ki, amelyeket a **topoizomeráz** enzimek segítenek. A transzkripció komplexet a 10-14 bázispár hosszúságú RNS–DNS hibrid tartja össze, valamint az RNS polimeráz konformációja. Esetenként a DNS-ben vagy az RNS termékben található specifikus struktúrák miatt **transzkripcionális pausing (pihenés) vagy arrest (leállítás)** fordulhat elő, az utóbbi esetében a transzkripció folytatásához járulékos faktorokra van szükség. Ez a két jelenség a gén expresszió szabályozás részét alkotja.

### Termináció

A prokarióta transzkripció terminációs szekvenciák két fő típusba sorolhatók: rho-faktortól függő vagy intrinsic (rho-faktor független). Az **intrinsic terminátor** esetében a DNS templát egy fordított ismételt szekvenciát tartalmaz, amelyet egy sorozat adenozin (A) követ. Ez a szekvencia az új RNS-ben egy **hajtókanyart** hoz létre, egy **sorozat uridinnel (U)**. Ennek a szerkezetnek az eredménye az lesz, hogy az RNS–DNS hibrid megrövidül, míg a sorozat A és U szekvenciák között a lehető leggyengébb bázispárosodás fog kialakulni. Ez a két komponens együttesen a DNS templát és az RNS termék közötti interakció olyan fokú meggyengülését eredményezi, amelynek következtében a két polinukleotid lánc elválik egymástól.

A **rho függő transzkripció terminációjában** egy fehérje faktor (rho) ismer fel az újonnan szintetizáló RNS-ben egy specifikus szekvenciát. A rho fehérje **ATP-áz** aktivitással rendelkezik, amelynek segítségével az RNS szálat elhúzza a templát DNS száltól.

## 9.3. TRANZKRIPCIÓ AZ EUKARIÓTA SEJTEKBEN

Az eukarióta sejtekben zajló transzkripció a prokariótákéhoz hasonló **fázisokkal** rendelkezik: iniciáció, elongáció és termináció. Bár az eukarióta sejtek **három RNS polimerázt** hordoznak, a magenzim struktúrája, valamint az elongáció reakciói nagyon hasonlóak a prokarióta sejtekéhez. Eukarióta sej-

tekben a **kromatin szerkezete** hátráltatja az RNS polimeráz mozgását, így a transzkripció folyamatához a nukleoszóma átalakító enzimek és a hiszton saperonok elengedhetetlenek. Emellett számos hiszton poszttranszlációs módosulás, valamint egyes kovalens DNS módosulatok a gén expresszió szabályozás részét alkotják (lásd eukarióta génexpresszió szabályozás).

### RNS polimerázok

- RNS polimeráz I írja át az rRNS géneket
- RNS polimeráz II szintetizálja valamennyi mRNS-t és a kis szabályozó RNS-eket
- RNS polimeráz III állítja elő a tRNS-eket, 5S rRNS-t és snRNS-eket.

Valamennyi RNS polimeráz nagy, **multisubunit (sok alegységből álló) enzim**, a leginkább ismert közülük az RNS polimeráz II. Ez 12 alegységet tartalmaz, amelyek közül 5 alkotja a magenzimet, hasonlóan a prokarióta polimerázhoz. Az RNS Pol I és III több alegységgel rendelkezik, mint az RNS Pol II, valószínűleg a járulékos polipeptid láncok specifikus funkciókkal rendelkeznek. Az RNS Pol II legnagyobb alegységét **Rpb1**-nek nevezik, ez egy speciális **C-terminális doménnel (CTD)** rendelkezik, amely számos, hét aminosavból álló ismétlődő egységet hordoz. Ezen CTD aminosavak közül sok foszforilálódhat. Ezek az aminosavak különböző időrendi sorrendben megjelenő kináz enzimek szubsztrátjai, amely folyamat a transzkripció szabályozásában (iniciáció- elongáció fázisok átmenete) és az mRNS transzkriptum érésében (cap és poly(A) farok szintézis, valamint splicing) nélkülözhetetlen.

### Transzkripció iniciáció

Az RNS polimerázok járulékos faktorokat is igényelnek a promóter felismeréséhez: ezek az **általános transzkripciós faktorok** irányítják az RNS polimerázt a megfelelő DNS szakaszhoz. Ezek a faktorok a három polimeráz számára eltérőek (jelölésük: TF=transcription factor, a polimeráz száma, és egy azonosító, például: TFIIA), de egy közös alegységgel rendelkeznek, ez a TATA binding protein: TBP (TATA-szekvenciát kötő fehérje). Az RNS Pol II a következő TF-okat igényli: TFIIA, B, D, E, F, H, amelyeknek zöme több alegységgel rendelkezik (lásd az előadás táblázatát). Az RNA Pol II az általános transzkripciós faktorokkal a promóternél komplexet alkotva hozza létre a **pre-iniciációs komplexet (PIC)**. A TBP és az ehhez asszociálódó faktorok (TAF) a TFIID komponensei, ezek kötik a TATA-boxnak nevezett konszenzus szekvenciát. A polimeráz II egyéb promóter szekvenciái lehetnek a **BRE elemek** (a TFIIB által felismert szekvencia), az **iniciátor elemek (INR)** és a **downstream promóter elem (DPE)**, az utóbbi kettőt a TFIID ismeri fel.

TFIID a kezdő komponens a PIC összeállításában, a következő a TFIIB, amely a BRE szakaszt köti és biztosítja, hogy a DNS-hez való kapcsolódás elég erős legyen. TFIIA kötődése után a TFIIF szállítja a mag RNS polimerázt a komplexhez. TFIIE és TFIIF az utolsó faktorok, amelyek a PIC-hez csatlakoznak. A TFIIF alegységeinek számos kiemelkedően **fontos funkciója** van: helikáz aktivitás révén a kettős szálú DNS széttekerésében vesz részt; más hatása folytán részt vesz a DNS javításban; ciklin és Cdk alegységek (lásd sejt ciklus) illetve kináz aktivitás segítségével az Rpb1 (RNS Pol II nagy alegysége) CTD részének szabályozó foszforilációját végzi. Az általános transzkripciós faktorok általában nem elegendőek egy gén transzkripciójának szabályozásához, **aktivátoroknak és represszoroknak** is van hatása a mediátornak nevezett nagy fehérje komplexen keresztül, akárcsak a kromoszóma remodellálásnak és a hisztonmódosító enzimeknek.

### Elongáció

A **promóter clearance** („kitisztulás”) lépését követi az elongáció fázisa. Az Rpb1 CTD szakasza a TFIIF által foszforilálódik, az RNS polimeráz konformációja megváltozik, a DNS templátot szorosan tartja, és az általános transzkripciós faktorok leválnak. A DNS templát és az RNS transzkriptum meg-



határozott szerkezeti interakciói miatt transzkripció **pausing** („pihenés”) következhet be. Ebből a polimeráz egyedül is kiszabadulhat, de előfordul, hogy **elongációs faktorok** segítségére szorul. A transzkripció **arrest** („megállás”) nem oldható meg elongációs faktorok nélkül. Ez a jelenség a génexpresszió szabályozó rendszer része.

Az Rpb1 CTD foszforilációja jel a **cap struktúrát szintetizáló enzimek** számára, ezalatt negatív elongációs faktorok átmeneti megállást (pausing) okoznak. Az elkészült 5' cap struktúra más kinázokat vonz, amelyek a CTD további foszforilációját végzik: ennek hatására az elongáció újból folytatódik és más processzáló enzimek odavonzása is történik. A polimeráz leállása során (pausing és arrest) **hasító faktorok** (TFIIS) segíthetik az elongáció folytatódását. Az elongáció során a nukleoszómák szétválnak és újra összeszerelődnek a hiszton saperonok segítségével. Az elongáció folyamán a topoizomerázok funkciója a DNS feltekeredésének (supercoiling) megszüntetése a szintézist végző polimeráz előtt és mögött (upstream és downstream).

### Transzkripció termináció

Az RNS polimeráz I számára a terminációs jel U-ban gazdag szekvencia, de a folyamatban DNS kötő fehérjék is részt vesznek. Az RNS polimeráz II terminációja a **3' poliadenilációhoz** kötött. Amint a primér transzkriptum hasítása után a poli(A) farok szintézise megkezdődik, ez jelzésként szolgál a terminációhoz is. Az **alloszterikus modell** szerint a hasítás az RNS polimerázban konformációs változást idéz elő, amely a templát elengedéséhez és a komplex disszociációjához vezet. A másik **modell (torpedó)** szerint a hasítás után az RNS nem válik le a polimerázzal. Míg a polimeráz folytatja a szintézist, egy 5'-3' exonukleáz kezdi emészteni az RNS láncot, amíg el nem ér az RNS polimerázhoz és nem készíti azt a DNS-ről történő leválásra (ábrákat lásd az előadásanyagban).

## 9.4. RNS PROCESSZÁLÁS

### Általános jellemzők

RNS processzálás (érés) alatt értjük valamennyi folyamatot, amelyek során a **primér RNS transzkriptum, vagy prekursor RNS, vagy pre-RNS** (tRNS, rRNS és mRNS) módosulásokon esik át, amelyek eredményeképpen érett, végső termék képződik belőle. **Ezek a lépések** a következők lehetnek: a pre-RNS hasítása a végeken, vagy intronok (nem kódoló szakaszok) kihasítása; az RNS termék editálása („szerkesztése”) inszerció, deléció vagy nukleotid módosítás révén; mRNS esetében 5' cap és 3' poliadenilát szintézis. Ezeknek a processzáló lépéseknek **több funkciója is van**: sebességük és hatékonyságuk hozzájárul a *gén expresszió szabályozáshoz* – az RNS termék csak akkor használható a sejt számára, ha szintézise teljesen befejeződött. A fent felsorolt módosítások az RNS számára védelmet biztosítanak a *degradációval* (lebontás) szemben – az RNS fél-életideje szintén jelentős szabályozási lehetőség. A processzálódás során lehetőség van a *diverzitás fokozására*: az alternatív splicing vagy az RNS editing például biztosítja, hogy egy mRNS-ről több fehérje termék íródjon át. Az érés folyamata jól definiált *minőségi ellenőrzésre* ad lehetőséget: csak a megfelelően processzálódott RNS molekulák juthatnak el a sejtben a végső felhasználás helyére. A többi RNS, akárcsak a kívülről a sejtbe jutott RNS-ek egy része lebomlik (lásd: RNS interferencia és Gén expresszió szabályozása).

Az érési reakciók nagy részében **ribonukleoprotein (RNP)** komplexek vesznek részt a folyamatokban. Az RNS szerepe ezekben a komplexekben lehet katalitikus (ribozimek) vagy irányító: a tényleges katalitikus komponenst vezetik a megfelelő helyre bázispárosodás segítségével. A processzálásban részt vevő nagy komplexek sokszor szoros kapcsolatban állnak egymással, mivel egyik lépés követi a másikat és közben ellenőrzik is egymást. Ezt a **kooperációt** segíti a komplexek elhelyezkedése is, mivel szorosan kapcsolódnak egymáshoz a sejtben (nukleusz) vagy a sejtmagvacskában (nukleólusz) például.



A következőkben az mRNS meglehetősen bonyolult érési folyamatát tárgyaljuk. A primér tRNS és rRNS processzáció a tRNS és rRNS transzkripció fejezetben található.

## Az mRNS processzációja

### 5' cap struktúra szintézise

A pre-mRNS 5' vége a következőképp módosul: az 5' foszfátot egy *foszfatáz* lehasítja, majd a *guanil-transzferáz* egy GMP molekulát köt egy szokatlan 5'-5' kötéssel. Végül a hozzákapcsolt guanin *metilálódik*, akárcsak a 20-30 nukleotid hosszúságú új transzkriptum második és esetleg harmadik nukleotidjának 2' oxigénje. Ez a cap struktúra a transzkripció elongációjában és terminációjában is rendelkezik funkcióval, akárcsak az RNS további processzációiban, a nukleo-citoplazmikus RNS transzportban és a transláció iniciációjában. Emellett a cap exonukleázok elleni védelmet is biztosít.

### 3' poliadeniláció

Minden mRNS legalább egy poliadenilációs hellyel rendelkezik, de némelyik transzkriptumban több is található, amely lehetőséget ad egy mRNS-ről több fehérje szintézisére. A poliadeniláció lépései a következők: a mRNS specifikus szekvenciájánál történő **hasítás**, amelyet a **poli(A) polimeráz** aktivitása követ, amely révén hosszú (kb. 200 nukleotid) poli(A) fark szintetizálódik. A poli(A) szakasz poli(A) kötő fehérjékkel borított. A poli(A) fark funkciói: exonukleázok elleni védelem és részvétel a transláció iniciációjában.

Az 5' cap struktúra, a poli(A) fark szintézise valamint az intronok kihasítása (splicing) **térben és időben összehangolt folyamatok**, amelyben az RNS polimeráz II nagy alegységének (Rpb1) foszforilált C-terminális doménje (CTD) aktívan részt vesz. A processzált, érett mRNS elhagyja a sejtmagot, mivel a transláció a citoplazmában zajlik. A poliadenilációt követően a sejtmagban maradó fehérjék megfelelő jelzés hatására elhagyják az mRNS-t. Más fehérjék az mRNS-hez kapcsolódva maradnak, és követik azt a citoplazmába. Az mRNS 3' végén ún. **lokalizációs elemek** helyezkedhetnek el, amelyek biztosítják, hogy az RNS a citoplazma specifikus régiójába vándoroljon, ahol a transláció fog zajlani (pl. egyes neuronális fehérjék szintézise a szinapszis közelében történik). Ezek a lokalizációs elemek fehérjéket kötnek, amelyeknek a translációban is szerepe van.

### RNS splicing (intron kihasítás)

Minden pre-RNS típusban (transzfer, riboszomális, messenger) található intronok. Bár ezeknek az intronoknak az eltávolítása különböző mechanizmusokkal történik, az alap reakciók ugyanazok: több **transz-észterezés**. Az intronok zöme nem kódol, a splicing-ot követően lebomlik. Néhány mRNS intron kivétel, mert snoRNS-t, vagy miRNS-t (lásd később) kódolnak. A magasabb rendű élőlényekben gyakoribb az intron splicing. Az intronok megjelenése és a következményes lehetőség az exonok keverésére (exon shuffling) illetve az alternatív splicing-ra fontos szerepet töltött be az evolúcióban, és abban, hogy eukariótákban megemelkedett a fehérje termékek száma.

Az intron splicing alapja két transz-észterifikálási reakció. Ebben a tekintetben az ATP energiájára a reakcióhoz nincs közvetlenül szükség, és a reakció reverzibilis (intronok illesztése a kettős szálú DNS-be). Eukariótákban az intron splicing RNP (ribonucleoprotein: RNS-t és fehérjét tartalmazó) partikulumok komplexe segítségével történik, de alacsonyabb rendűekben két fajta **self-splicing** (önhasítási folyamat) történik. Ezeket I. és II. csoportú intronoknak nevezzük. Az **I. csoportban egy szabad guanozin** vesz részt a 3'-exon 5'-intron csatlakozás hasításában, ezt követően az exon szabad 3'-OH csoportja elindítja a második transz-észterifikálási reakciót, amelynek eredményeképp a két exon összekapcsolódik és az intron kihasad. A **II. csoportba tartozó intronok** annyiban különböznek ettől, hogy az első hasítási reakció nem igényel külső faktort, hanem egy, az intronon belül található kitüntetett A (**elágazási pont adenozin**) 2'-OH csoportja vesz részt a hasításban. Ennek eredménye-

ként lasszó alakú intron szabadul ki. A II. csoportú intronok mobilis genetikai elemként viselkedhetnek, képesek önmagukat beilleszteni a dsDNS-be (kettős szálu DNS).

A magasabb rendű eukarióták mRNS-eiben az intronok mérete általában nagyobb, mint az exonoké. Az mRNS processzálódása során az intronok kihasítását és az exonok összekapcsolását nagy RNP komplexek, a **spliceoszómák** végzik. A reakció emlékeztet a II. csoportú intronok kihasítására, mivel itt is az intronban található specifikus adenzin reagál, és **lasszó struktúra** képződik.

A hatékony intron kihasítás érdekében legalább három szekvencia felismerése szükséges: az 5' és a 3' hasítási helyek, valamint az intron elágazódási nukleotidja (a többi szekvencia szakasz szerepét a Transzkripció szintű szabályozás fejezet taglalja).

A spliceoszómát **öt kis nukleáris RNP** (small nuclear RNP: snRNP – U1, U2, U4, U5, U6) alkotja, mindegyik egy rövid RNS-t (snRNS) és számos fehérjét hordoz. A snRNP-k RNS komponensei az mRNS-hez és egymáshoz történő bázispárosodással segítik a hasítási helyek lokalizálását. Más szekvenciákat fehérje faktorok ismernek fel, ismét más fehérjék saperonként működve biztosítják az egész komplex megfelelő konformációját. Járulékos fehérjék ATP hidrolízis révén biztosítják az energiát a **komplex szerkezeti felépítéséhez**, illetve a spliceoszóma megfelelő elhelyezkedéséhez. Fontos megjegyeznünk, hogy valamennyi processzálódási lépés egymással és a transzkripció folyamatával is szoros tér- és időbeli kapcsolatban áll. Az 5' cap struktúra szintézise nélkülözhetetlen az elongációhoz, míg a 3' poliadeniláció a transzkripció terminációjának a jele. A splicing folyamata az RNS szintézis folyamán zajlik. Ezen folyamatok szervezője az RNS polimeráz II **Rpb1 alegységének C-terminális doménje (CTD)**.

A teljesen érett mRNS egy minőségi ellenőrzési lépés után a citoplazmába transzportálódik, ahol a transláció zajlik. A fehérjék közül, amelyek az mRNS-hez kötődnek egyesek kísérik az RNS-t a citoplazmába, így a poli(A)-kötő fehérjék, exon csatlakozási komplex és a cap-kötő fehérjék. Ezeknek a fehérjéknek szerepe van a translációban is.

### A riboszomális és transzfer RNS szintézise és processzálódása

Az eukarióta sejtek **három RNS polimeráz** típusal rendelkeznek. Az RNS polimeráz I szintetizálja a nagyobb méretű rRNS-eket (28S, 18S és 5,8S). Az RNS Pol II termékei az mRNS-ek, snRNS-es és számos miRNS. A tRNS-ek, az 5S rRNS és néhány snRNS az RNS Pol III által gyártódnak. A sejtben található mennyiségüket figyelembe véve az rRNS-ek és a tRNS-ek adják a ribonukleinsavak zömét (80%). Mindhárom RNS polimeráz rendelkezik egy, a prokariótákéhoz hasonló, öt alegységből álló **mag enzimmel**. A polimeráz I és III több alegységgel rendelkezik, mint a Pol II, a „többlet” alegységek specifikus funkciókkal rendelkeznek. Ebben a fejezetben az rRNS és tRNS szintézis mRNS szintézistől való eltéréseit összegezzük.

Mind a polimeráz I, mind a polimeráz III **különböző promóter szekvenciákat** ismer fel, a polimeráz II-től eltérő transzkripció faktorok segítségével. Ám van ebben a lépésben egy közös vonás: mindhárom enzim promóter felismerő komplexe tartalmazza a **TBP-t** (TATA-binding protein: TATA-szekvenciát kötő fehérje). A polimeráz III promóterei szokatlan jellegzetességgel bírnak: néhány alap promóter régió a transzkripció kezdő helytől downstream helyezkedik el.

A polimeráz I és III számára a **transzkripció termináció** jele egy sorozat U az RNS-ben, de járulékos fehérjék is szükségesek.

### A pre-rRNS processzálódása

Az RNS polimeráz I egy hosszú primér transzkriptumot állít elő, amely tartalmazza a 28S, 18S és az 5,8S rRNS-eket. Ilyen módon garantálva van ezeknek az rRNS-eknek a sejtben belüli azonos aránya. A pre-rRNS-t az RNáz III **hasítja**, majd exonukleáz emésztést követően az rRNS-ek elnyerik végső mé-

retüket. Alacsonyabb rendű élőlényekben néhány rRNS intront hordozhat, amely self-splicing révén távolítódik el (ribozimek). Az érett rRNS-ek nagy számban hordoznak **módosult nukleotidokat**, amelyek közül a metilribóz és a pszeudouridin a leggyakoribb. Ezek a módosulások azokban a régiókban helyezkednek el a molekulán belül, amelyekben fontos riboszomális funkciót töltenek be. A fenti módosulásokat enzimek hajtják végre, amelyeket a kis **nukleoláris ribonukleoprotein (snoRNP: small nucleolar RNP) komplexek** irányítanak a megfelelő szekvenciákhoz. A komplexek RNS komponensei az rRNS célregióival bázis párosodás révén találkoznak.

#### A tRNS transzkriptumok processzálódása

A tRNS-ek hosszabb prekurzorok formájában szintetizálódnak. A 3' véget az **RNáz D**, míg az 5' véget az **RNáz P** endonukleáz hasítja. Az utóbbi RNS komponens is tartalmaz, amely baktériumokban ribozimként tud működni. A számos tRNS-ben található **intron** ATP igényes splicing lépés révén távolítódik el. A tRNS 3' vége egy **CCA szekvenciát** vesz fel, amely lépés templátot nem igényel. Ez az univerzális szekvencia köti meg az aminosavakat a transláció folyamán. A tRNS-ek nagyszámú **módosított nukleotidot** hordoznak. Ezeknek a módosult nukleotidoknak a szerepe egyrészt a tRNS szerkezeti stabilitásának növelése, másrészt a transláció során a tRNS más molekulákkal, köztük az mRNS-sel való interakciójának segítése.

## 9.5. A TRANZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSA

A transzkripció szabályozása része a gén expresszió szabályozásának. A transzkripció regulálásával a sejtben egy adott időben meghatározott típusú és mennyiségű RNS íródik át, a sejt fejlődési stádiumától, környezeti faktoroktól és a jelátviteli utak aktivitásától függően. A transzkripció minden fázisa szabályozódhat, beleértve az iniciációt (a leginkább kontrollált lépés), elongációt, terminációt, az RNS-ek érését, citoszolba történő transzportját és degradációját. A prokariótáknak és az eukariótáknak eltérő transzkripciós szabályozási mechanizmusai vannak.

A **promóter erőssége** meghatározza, hogy egy gén milyen gyakran íródik át. Minél jobban hasonlít egy promóter a konszenzus szekvenciához, annál erősebb. A szabályozás másik lehetősége a promóter és reguláló szekvenciák **egymáshoz viszonyított távolsága**. A regulátor (szabályozó) szekvenciák **aktivátorokat és represszorokat** kötnek (egy adott promoterről a transzkripció gyakoriságát növelik vagy csökkentik). Ha egy aktivátor a promóterhez megfelelő távolságban be tud kötni a DNS-hez, segíti a transzkripció iniciációt. Ha a regulátor szakasz a promoterral átfedésben van, az általa kötött fehérje (represszor) gátolja a transzkripció iniciációt. Ezek a típusú szabályozások főként prokariótákban ismertek.

A transzkripció elongációban a **pausing (pihenés) és az arrest (megállás)** okoz késedelmet. Ezeknek az akadályoknak a leküzdésére elongációs faktorokra lehet szükség. Az eukarióta sejtekben csak a megfelelően processzált RNS-ek használhatók. A **processzálódás sebessége** is lehet szabályozott. Az **RNS szerkezete** segítheti vagy gátolhatja az RNS polimeráz haladását. Járvékos (fehérje) faktorokra lehet szükség az RNS szerkezetének módosításához.

Eukariótákban az **enhancer („erősítő”) szekvenciák** szabályozó fehérjéket kötnek. Ezek a szekvenciák a promóter régióhoz viszonyítva upstream vagy downstream is elhelyezkedhetnek, akár nagyobb távolságra is. Ebben az esetben DNS-hez azt hurok alakban meghajlító fehérjék kötődnek, ezáltal a **szabályozó fehérje** a transzkripciós iniciációs komplexhez tud kötődni. A szabályozó (regulátor) fehérjék nem önmagukban fejtik ki hatásukat: járulékos (**ko-aktivátor, ko-represszor**) faktorokat vonzanak. A regulátor molekulák alloszterikusan (kis molekulák kötődnek az alloszterikus kötőhelyhez, amely eltér a regulátor aktív helyétől) és kovalensen (amely egy jelátviteli kaszkád végeredménye lehet) **módosulhatnak**. Mindkét esetben a módosulás eredményeként a regulátor fehérje konformációja (3D szerkezet) megváltozik, amely hatással van az aktivitására is (DNS kötés vagy más fehérjével való interakció).

A regulátor és ko-regulátor fehérjék **nagy komplexek** alkotói, amelyek a promóter szakasz körül gyűlnek össze. Ezekben a komplexekben található egy több alegységből álló **mediátor**, amely az RNS polimeráz II számára nélkülözhetetlen egy adott gén nagy gyakoriságú transzkripció iniciációjához. Ez a komplex hoz létre kapcsolatot aktivátorok, ko-aktivátorok, transzkripció faktorok, RNS polimeráz, sőt még kromoszóma remodelláló és modifikáló komplexek között is (gén expresszió szabályozás kromoszóma módosulások révén: lásd Génszabályozás eukariótákban fejezet). Egy aktivátor a **következő módokon** befolyásolhatja a transzkripciót: segíti más aktivátorok kötődését; segíti az RNS polimeráz promóter kötődését; serkenti az RNS polimeráz promóter elhagyását (promoter clearance) és az elongációt. Egy represszor versenghet az aktivátorral a kötőhelyért; gátolhatja az aktivátor bekötődését; közvetlenül kötődhet a transzkripció faktorokhoz; vagy indirekt módon befolyásolhatja a kromatin szerkezetét.

### Alternatív splicing

Ahogy korábban megjegyeztük, a humán genomban viszonylag kisszámú gén található, de az aktív fehérjék száma ehhez viszonyítva magas. A transzkripció és a transláció folyamán több lehetőség is van diverzitás biztosítására. Az alternatív splicing és az RNS editing ezek közé sorolható.

**Az alternatív splicing** módot ad az exonok különböző eloszlására egy adott pre-mRNS esetében, aminek eredményeként egyetlen primér transzkriptumból több különféle mRNS képződhet. Léteznek konstitutív (az érett mRNS-ben mindig jelen lévő) és szabályozott (regulált: az mRNS-ben csak meghatározott körülmények között jelen lévő) exonok. A különböző variánsok kialakulásához **alternatív 3' vagy 5' hasítási helyeket** (splice sites) kell a spliceozómának felismernie. Alternatív transzkripció kezdőhelyek vagy alternatív poliadenilációs helyek léte a végső géntermékek számát tovább növelheti. Az mRNS variánsok nagy száma egy adott génről megfigyelhető például az emlősök központi idegrendszere esetében. A splicing ellenőrzésére két teória létezik: az exon és az intron meghatározási teória. Az ismert, hogy a splicing helye a transzkripció folyamán (ko-transzkripcionálisan) kerül felismerésre. **Fehérje faktorok jelölik meg** a splicing helyét (SR fehérjék az exonokban) vagy fedik le a rejtett splicing helyeket (hnRNP komplexek). A splicing helyének kiválasztásában az RNS polimeráz II nagy alegység CTD-je és a splicing komplex snRNP komponense is részt vesz. A pre-mRNS-ben splicingot serkentő vagy gátló szekvenciák találhatóak, amelyek hatásukat specifikus fehérjék kötésén keresztül fejtik ki. A splicing lezajlása után az exon-exon kapcsolódási szekvenciát protein komplexek jelölik meg (**EJC: exon junction complex**). Ez a lépés nélkülözhetetlen az mRNS sejtmagból a citoplazmába történő transzportjához, akárcsak az eredményes transláció iniciációhoz.

Az **RNS editing** az a folyamat, amikor a már érett mRNS-ben nukleotid módosítás, deléció (törlés) vagy inszerció (beillesztés) történik. Egyes editing folyamatok gyakoribbak, mások ritkábban fordulnak elő. Előfordulhat, hogy egyes mRNS-eknek csaknem a fele szekvenciája editingen esett át, más esetekben csak egy vagy néhány nukleotid változik. A két leggyakoribb nukleotid módosítás **deamináció** eredménye: adenozinból inozin keletkezik, amely guanozinnal tud bázispárt alkotni, citidinből pedig uridin képződik. Az előbbi a gyakoribb reakció. Az utóbbira példa az apolipoprotein B mRNS-nek editing reakciója a bélhámsejtekben. Egy meghatározott citidin deaminációja révén stop kodon keletkezik, ezáltal a bélhámsejtekben a májsejthez viszonyítva rövidebb apolipoprotein B fog szintetizálódni (részleteket lásd az előadásanyagban). Uridinek hozzáadása vagy törlése **irányító RNS-ek** segítségével történik.

### Az RNS-ek félélet-ideje

A gén expresszió szabályozás egyik eleme az mRNS-ek degradációja. A sejtben a különböző mRNS-eknek eltérő félélet-idejük van, ami azonban mindíg rövidebb, mint az rRNS-eké. Azok a tényezők, amelyek meghatározzák egy RNS stabilitását a következők: 5' cap struktúra jelenléte, a 3' poli(A) farok, valamint az RNS szerkezete (kettős szálú régiók és hajtúkanyar). Az **ARE (AU-rich element)**: AU-ban gazdag elemek) szakaszok jelenléte a 3' UTR-ban (untranslated region: át nem íródó sza-

kasz) egyes mRNS-ek esetében növeli a molekula instabilitását (példát lásd az előadás anyagban). Egy eukarióta mRNS lebontása általában a következő módon történik: többnyire a poli(A) farok lebontásával indul (**deadeniláz**), amit egy 3'-5' **exonukleáz** (része az exoszóma komplexnek) követ. Vagy, a deadenilációt követően egy **decapping** enzim eltávolítja az 5' cap struktúrát, így az 5'-3' exonukleáz szubsztrátja lesz az mRNS. Az RNS lebontás során felszabaduló ritka nukleotidok ismét felhasználásra kerülnek.

### Idegen RNS-ek lebontása (RNS interferencia)

A sejtben lejátszódó védekezés aktiválására a jel többnyire egy **kis kettős szálú RNS**. Egy **Dicer** nevű enzim hasítja ezt kis kettős szálú darabokká (siRNA: short interfering RNA – kis interferáló RNS-ek). Ez utóbbiak egy fehérje komplexhez csatlakoznak (**RISC: RNA induced silencing complex** – RNS által indukált csendesítő komplex; ebben található az Argonaute fehérje is).

Hasonló mechanizmussal hatnak a gén expressziót **szabályozó mikroRNS-ek (miRNS)** is, de ebben az esetben egyes szálú pri-miRNS szintetizálódik, amely hajtúkanyar szerkezetet ölt. A Dicer hasítása után a keletkezett rövid dsRNS egyik szála (passanger: utazó) eltávolítódik, míg a másik (guide: vezető) szál a cél RNS-hez fog hibridizálni és gátolja annak transzlációját.





## 10. TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK

### 10.1. BEVEZETÉS

A génexpressziót specifikus fehérjék, ún. transzkripciós faktorok szabályozzák. Az eukarióta sejtek génexpresszió szabályozása három elkülönülő szinten zajlik (lásd Eukarióta transzkripció fejezetet további részletekért):

1. Transzkripciós szintű szabályozás
2. Processzáldás szintű szabályozás
3. Transzlációs szintű szabályozás

A transzkripciós szintű szabályozásban számos fehérje, transzkripciós faktor vesz részt. A transzkripciós faktorok lehetnek *transzkripciós aktivátorok*, melyek stimulálják a transzkripciót és *transzkripciós represszorok*, melyek gátolják a transzkripció folyamatát.

A génexpresszió szabályozása függ a transzkripciós faktorok speciális DNS szakaszokhoz való affinitásától, a kötési képességtől, és más fehérjéhez való kötődéstől. Egy transzkripciós faktor képes különböző géneken hatni azonos DNS felismerési szekvencián és különböző transzkripciós faktorok képesek ugyanazon génre hatni. A humán gének hozzávetőlegesen 5-10%-a kódol transzkripciós faktorokat. A különböző transzkripciós faktorok expressziója változó az eltérő típusú sejtekben, szövetekben, a fejlődés eltérő stádiumaiban.

### 10.2. A TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK OSZTÁLYOZÁSA

(lásd ábra)

1. Általános transzkripciós faktorok: segítik az eukarióta RNS polimeráz pontos bekötődését a promóter régióhoz, segítik a két DNS szál szétválasztását, így a transzkripció iniciációját. Részt vesznek a preiniciációs komplex létrejöttében (TFIIA, TFIIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, and TFIIH).
2. Upstream transzkripciós faktorok: az iniciációs helytől fölfele (upstream) kötődnek, így stimulálják vagy gátolják a transzkripciót
3. Specifikus transzkripciós faktorok: a gén közelében lévő felismerési szekvenciához kötődnek

### 10.3. A TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK FUNKCIONÁLIS OSZTÁLYOZÁSA

1. *Folyamatosan/konstitutívan aktív transzkripciós faktorok*: Minden sejtben, minden időpillanatban jelen vannak; általános transzkripciós faktorok Sp1, NF1, CCAAT
2. *Kondicionálisan aktív transzkripciós faktorok*: aktivációt igényelnek
  - a) *Fejlődési vagy sejt specifikus transzkripciós faktorok*: az expressziójuk precízen szabályozott, de ha egyszer expresszálnak, további aktiválódást nem igényelnek, GATA, HNF, MyoD, Hox
  - b) *szignál függő transzkripciós faktorok*: külső jelet igényelnek az aktivációjukhoz
    - *extracelluláris ligand* (endokrin vagy parakrin) *függő transzkripciós faktorok*: sejtmagi receptorok
    - *intracelluláris ligand* (autokrin) *függő transzkripciós faktorok*: Kis intercelluláris molekulák aktiválják; SREBP, p53

- *sejtmembrán receptor-függő transzkripció faktorok*: másodlagos hírvívvel működő jelátviteli kaszkádok, melyek a transzkripció faktorok foszforilációjával végződnek
  - (1) *rezidens nukleáris faktorok*: az aktivációs állapotuktól függetlenül a sejtmagban vannak; CREB, AP-1, Mef2
  - (2) *késői citoplazmatikus faktorok*: inaktív formában a citoplazmában vannak, aktiválás után a sejtmagba transzlokálódnak, STAT, R-SMAD, NF- $\kappa$ B, Notch

#### 10.4. A TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK SZERKEZETE

Számos DNS kötő fehérje 3D szerkezetét röntgen kristallográfiával és NMR spektroszkópiával határozták meg. Ez alapján kiderült, hogy a transzkripció faktorok eltérő doméneket tartalmaznak, melyek a fehérjék különböző funkcióihoz kapcsolódnak. A transzkripció faktorok tipikusan három domént tartalmaznak (lásd ábra):

1. DNS-kötő domén a DNS specifikus szekvenciáihoz kapcsolódik, amit reszponzív elemnek nevezünk.
2. Az aktivációs domén más fehérjékkel kapcsolódik, így szabályozza a transzkripciót. Számos transzkripció faktor rendelkezik olyan régióval, ami segíti a más fehérjékkel való interakció kialakítását. A kapcsolódó fehérje azonos vagy hasonló szerkezettel rendelkezik, dimert képez a transzkripció faktorral.
3. Jelérzékelő domén a külső jeleket érzékeli és továbbítja a transzkripció komplex többi részéhez.

#### 10.5. TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK MOTÍVUMAI

A fehérje DNS-hez való kötődését a különböző kötések, van der Waals kölcsönhatás, ionos kötések és hidrogén kötések kombinációja biztosítja az aminosav oldalláncok és a DNS különböző részei között. A transzkripció faktorok általában a DNS spirál nagy árkához kapcsolódnak. A DNS-kötő fehérjékben található leggyakoribb motívumok az 1. cink ujj, 2. hélix-hurok-hélix, 3. leucin zipzár.

1. Cink ujj motívum:
  - a) Az emlős transzkripció faktorok legnagyobb csoportja
  - b) Minden ujjon lévő cink iont két cisztein és két hisztidin tart a helyén (lásd ábra)
  - c) Az ujjak egymástól függetlenül képesek működni
  - d) Elsőként felfedezett cink ujj fehérje a TFIIIA, melynek kilenc cink uja van (lásd ábra)
  - e) A motívum megfelelő szerkezetet biztosít az aminosav szekvenciáknak, hogy számos eltérő DNS szekvenciát ismerjenek fel és kapcsolatot alakítsanak ki velük
2. Hélix-hurok-hélix motívum (HLH)(lásd ábra):
  - a) A motívumot két  $\alpha$ -helikális szegmens alkotja, melyeket egy közbeékelts hurok választ el
  - b) A HLH domén bázikus aminosavak csoportjából áll, melyeknek a pozitívan töltött oldalláncaik kapcsolódnak a DNS-hez és meghatározzák a transzkripció faktor szekvencia specifikusságát
  - c) A bázikus HLH (bHLH) doménnel rendelkező fehérjék mindig dimert alkotnak (MyoD)
  - d) A dimer két alegységét eltérő gének kódolják, vagyis a fehérje heterodimer
  - e) Kulcsszerepet játszanak a szövetek differenciációjában
  - f) Részt vesznek a sejtosztódás szabályozásában
3. Leucin zipzár motívum (lásd ábra):
  - a) Az  $\alpha$ - hélix minden hetedik aminosava leucin
  - b) A polipeptid láncból kinyúló leucinok ugyanabba az irányba néznek
  - c) Két  $\alpha$ - hélix összezipzározódik és feltekeredik (coiled coil).



- d) Dimert alkotnak
- e) A leucin tartalmú  $\alpha$ - hélix egyik oldalán bázikus aminosavak találhatóak
- f) A leucin zipzár bázikus szegmensét bZIP motívumnak nevezik
- g) A kinyúló bázikus aminosavak segítik, hogy a fehérje felismerje a DNS specifikus nukleotid szekvenciáit
- h) AP-1 egy heterodimer, aminek a két alegységét (Fos és Jun) két gén kódolja: FOS és JUN.
- i) Mindkét gén fontos szerepet játszik a sejtosztódásban
- j) A génekben bekövetkező mutációk gátolják a dimer képződést és a DNS-hez való kötődését

## 10.6. A DNS TRANSZKRIPCIÓT SZABÁLYOZÓ RÉGIÓI

(Lásd Eukarióta transzkripció fejezetet további részletekért)

TATA box a promóter fő eleme, mely upstream helyezkedik el a kódoló résztől és a transzkripció iniciációját szabályozza. A TATA box-tól a transzkripció start helyig tartó szakaszt *központi promóter* régióknak nevezzük. A központi promóteren épül össze a preiniciációs komplex, ami az RNS polimeráz II-t és számos általános transzkripció faktorot tartalmaz. A két másik promóter szekvencia a CAAT box és a GC box, szintén upstream helyezkedik el. A CAAT és a GC box transzkripció faktorokat köt, és a génexpresszió gyakoriságát szabályozzák. A TATA, CAAT, és GC box a transzkripció start helytől 100-150 bp távolságra upstream helyezkedik el.

## 10.7. PROMÓTER AZONOSÍTÁS

(lásd Molekuláris biológiai módszerek fejezetet)

1. Deléciós térképezés
2. DNS footprinting
3. Genom szintű lokalizációs analízis/ Kromatin immunprecipitáció

## 10.8. AZ ENHENSZEREK SZEREPE

(lásd Eukarióta transzkripció)

Az enhenszerek olyan DNS elemek, amik a gének expresszióját szabályozzák. Egy enhenszer tipikusan 200 bp hosszúságú és számos kötőhellyel rendelkezik a szekvencia specifikus transzkripció aktivátorok számára. A DNS molekulán belül egyik helyről a másikra tud mozogni, vagy képes megfordulni anélkül, hogy befolyásolná a transzkripció faktorok kötési képességét és hatását. Egy enhenszer deléciója csökkentheti a transzkripciót. Az enhenszerek szétszórva helyezkednek el a DNS-ben és különböző transzkripció faktorokat képesek megkötni.

A promóteren speciális DNS szekvenciák szabályozzák a transzkripció faktorok enhenszerhez való kötődését. Ezek a DNS elemek az inzulátorok, melyek képesek a nukleáris mátrix fehérjéihez kapcsolódni. A DNS szegmensek az inzulátorok között a hurok domének (lásd ábra). Az inzulátorokat enhenszer blokkoló elemeknek is nevezik.

## 10.9. KOAKTIVÁTOROK

A koaktivátorok nagyméretű komplexek, melyek számos alegységből épülnek fel. Két csoportra oszthatók:

1. azok, amik az alap transzkripció apparátus elemeivel kapcsolódnak: olyan elemeket építenek bele az alap transzkripció komplexbe, amelyek szükségesek a transzkripció folyamatához
2. azok, amik a kromatinon hatnak: hiszton acetiltransferázok (HATS, CPB) vagy kromatin átrendeződésért felelős komplexek (*kromatin remodeling komplex*) (SWI/SNF)

A transzkripció faktorok a DNS-hez kötődnek, majd odavonzzák a koaktivátorokat, amelyek facilitálják a transzkripció preiniciációs komplex összeszerelődését. A hiszton acetiltransferáz (koaktivátor) hozzákötődik a rezponzív elem-transzkripció faktor komplexhez. Az enzim acetil csoportokat transzferál az acetil KoA-ról a lizin oldalláncok amino csoportjára. A nukleoszóma hisztonjai a TATA box-tól mind upstream mind pedig downstream irányban acetilálódnak. Az acetilált hisztonok megkötik az SWI/SNF komplexet, ami a kromatin átrendeződésért felelős komplex. A két koaktivátor megváltoztatja a kromatin szerkezetét, egy nyitottabb, elérhetőbb formává. Így az alap transzkripció faktorok és a TATA-kötő fehérje képes csatlakozni a komplexhez a relaxált DNS szakaszon. A koaktivátorok és az általános transzkripció faktorok megbontják a további nukleoszómák szerkezetét, így indítják el a transzkripciót. A promóter további nukleoszómái acetilálódnak a hiszton acetiláz által és az RNS polimeráz hozzákötődik a promóterhez, elindulhat a transzkripció (lásd ábra).

## 10.10. POISED POLIMERÁZOK / RÉSZLEGESEN AKTÍV POLIMERÁZOK

RNS polimerázoknak két kritikus foszforilációs helyük van, ami szabályozza az aktivitásukat, mindkét hely tartalmaz szerin aminosavat. Teljesen aktív állapotban mindkét szerin, a szerin-2 és szerin-5 is foszforilált. Amikor csak a szerin-5 foszforilált, a polimeráz „poised” állapotban van, inaktív, de kész a DNS-hez kötődni. Az RNS polimeráz képes transzkripciósan inaktív génekhez is hozzákötődni, elindítani a transzkripciót. Azonban nem képesek a transzkripciót az elongációs fázisba tolni, így teljes hosszúságú elsődleges transzkriptum nem képződhet. A részlegesen aktív polimerázok további aktiválást igényelnek ahhoz, hogy a transzkripció végbemenjen és a teljes gén átíródása megtörténjen. A részlegesen aktív polimerázoknak szerepük lehet a gének gyors aktiválásában.

## 10.11. TRANSZKRIPCIÓS REPRESSZIÓ

Bizonyos enzimek képesek az acetil csoportok hisztonokról való eltávolítására. Az acetil csoportok eltávolítását a hiszton deacetilázok (HDAC) végzik. A hiszton acetiltransferáz a transzkripció aktiváció esetén működik, a hiszton deacetiláz pedig transzkripció represszió során aktív.

HDAC enzimek nagyobb komplexek alegységeiként működnek. Ezek a komplexek a korepresszorok. A korepresszorok hasonlóak a koaktivátorokhoz, azzal a kivétellel, hogy akkor kapcsolódnak a DNS-hez ha a transzkripció represszorok már előzőleg bekötődtek a megfelelő helyre. Együttesen a célgén csendesítését, a transzkripció gátlását okozzák.

Amikor egy represszor hozzákötődik a felismerési szekvenciához az aktív promóteren, a korepresszor hozzákötődik a represszorhoz. A HDAC enzim eltávolítja az acetil csoportokat a hiszton fehérjéről. Egy önálló fehérje, mely hiszton metiltransferáz aktivitással rendelkezik, metil csoportokat köt a K9-es oldallánc H3-as hisztonjához. Az acetil csoportok leválása és a metiláció együttesen kromatin inaktivációhoz és géncsendesítéshez vezet (lásd ábra).

A transzkripció represszió másik lehetséges módja a DNS metiláció (lásd Epigenetika fejezet). A metilációt a DNS metiltransferázok végzik. A kémiai módosítás mindig a cisztein 5-ös szénatomján

következik be. A metiláció egy epigenikus marker, mely alapján a DNS bizonyos régiói felismerhetők és más régióktól eltérően használhatók. A metiláció nagy valószínűséggel inaktív állapotban tartja ezeket a DNS elemeket. Az abnormális DNS metilációs mintázat sokszor összeköthető betegségekkel. DNS metilációt nem találtak még élesztőkben és fonálférgekben. A növényi DNS gyakran erősen metilált, és a növényi sejt kultúrák vizsgálata során kiderült, hogy a DNS metiláció csakúgy, mint az állati sejteknél a gén inaktivációját okozza.

A gének egy része imprintingen esik át a szülői eredettől függően. Az imprinting is egy epigenikus jellegzetességnek tekinthető, mivel az allélok közti eltérések a szülőktől származnak, de nem a DNS szekvencia különbözőségén alapulnak (lásd Epigenetika fejezet). Az emlős genom legalább 80 imprintált gént tartalmaz, melyek számos független klaszterben jelennek meg a kromoszómákon. A gének úgy válnak imprintálttá, hogy a DNS metiláció szelektíven csak az egyik allélon megy végbe. Az imprintált gének aktív illetve inaktív változatai különböznek a metilációs mintázatukban. Számos ritka genetikai rendellenesség hátterében az imprinting zavara áll.



# 11. GENETIKAI KÓD, RIBOSZÓMÁK, TRANSZLÁCIÓ ÉS SZABÁLYOZÁSA

## 11.1. A GENETIKAI KÓD

A hírvivő (messenger) RNS egy köztes molekula a DNS-től a fehérjéig tartó információáramlásban. A genetikai kód tulajdonképpen a DNS nukleotid bázis szekvenciája (és a transzkripció során képződő mRNS szekvenciája), mely a szintetizálódó fehérje aminosav szekvenciájára fordítódik le a transláció folyamán.

Először George Gamow írta le feltételezését, hogy a polipeptidben lévő egyes aminosavakat három egymást követő nukleotid kódolja. Más szóval a kódszavak, vagyis a **kodonok, nukleotid tripletek**. A genetikai kód triplet természetét 1961-ben bizonyította számos genetikai kísérlettel Francis Crick és Sydney Brenner. A kísérletekben T4 bakteriofágokkal és azok rIIB génjével foglalkoztak. A kísérlet során kiütöttek vagy beépítettek 1-4 nukleotidot a vad típusú génbe (frameshift mutáció- lásd Bevezetés a genetikába című fejezetet). A fehérje csak akkor maradt aktív, ha a módosítás három nukleotidot érintett a DNS szekvenciában. Ezzel bebizonyosodott, hogy a genetikai kód három **nukleotid bázisból** áll, mely **egy aminosavat** kódol.

Az aminosavak kodonjai **nem átfedő nukleotid tripletek**, vagyis egy triplet csak egy aminosavat kódol. A kód degenerált, egy aminosavat több triplet is kódolhat. A kód degeneráltságának hipotézise Francis Crick nevéhez fűződik. Crick leírta, hogy az eltérő baktériumok DNS-ének bázisösszetétele igen tág határok között mozog. A genom guanin, citozin tartalma 20 és 74 százalék között mozgott, míg ugyanazon organizmusok fehérjéinek aminosav összetétele csak kis variációt mutatott. Ez alapján feltételezhetjük, hogy egy aminosavat több különböző bázis szekvencia kódolhat, így a kód degenerált.

A kodonok azonosítását Marshall Nirenberg és Heinrich Matthaei kezdte el. Munkájuk során kifejlesztettek egy **sejtmentes rendszert** *E. coli* baktérium sejtek lizálásával. Ez a rendszer képes volt fehérjék felépítésére az aminosav komponensekből. Az első triplet, amit teszteltek, tisztán uridinből álló poliribonukleotid molekula volt. A molekulát így poli(U)-nak nevezték el. Egy csőben összekeverték a 20 aminosavat és a fehérje szintézishez szükséges minden anyagot tartalmazó baktérium kivonatot és a poly(U) molekulákat. A rendszer által felépített polipeptidet a szekvencia vizsgálat során polifenilalaninként azonosították (a fenilalanin aminosavak polimerje). Vagyis az UUU triplet fenilalanint kódol (lásd előadás ábra).

A riboszóma kötési esszé kidolgozását 1964-ben Nirenberg és Leder végezte el. Ebben a módszerben nagyon rövid (3 nukleotid) hosszúságú mesterséges RNS szekvenciákat használtak a sejtmentes rendszerben. A kidolgozott rendszer lehetővé tette, hogy a riboszóma kötődjön ahhoz a tRNS-hez, amely komplementer a kodonnal. A kísérletben egyszerre egy aminosavat jelöltek (radioaktívan), majd a keveréket egy filteren eresztették át. A filteren a szabad tRNS-ek átjutottak, azonban a riboszóma, a hozzá kötődött triplettel már fennmaradt a filteren. Ha radioaktivitást detektáltak a filteren, akkor a megfelelő aminosavat adták a rendszerhez. Ennek a módszernek a segítségével lehetővé vált az mRNS tripletek által kódolt aminosavak meghatározása (lásd előadásábra).

Az univerzális kódszótár tartalmazza mind a **64 lehetséges mRNS kodont** és a hozzájuk tartozó aminosavakat. Ha a kódszótárban pl. az UGC kodont szeretnénk lefordítani, akkor először az első betűt kell megkeresni (U) a bal oldali sorban. Ezután követni kell sort jobbra, amíg el nem érjük a második betűt (G), amit a felső sor jelöl. Ezt követően meg kell keresni az aminosavat, ami a harmadik betűhöz (C) tartozik (lásd előadásábra). Hasonló aminosavakat hasonló kodonok kódolnak, így a hasonló tulajdonságokkal rendelkező aminosavak csoportokba rendeződnek a szótárban (bázikus, sa-

vas, hidrofób, poláros). Általában az első két betű elegendő az aminosav meghatározásához. A genetikai kód ezen tulajdonságát tRNS lötyögésnek nevezzük (lásd tRNS-ek további részletekért).

First letter \ Second letter	U	C	A	G	Second letter \ Third letter
U	phenylalaline (UUU)	serine (UCU)	tyrosine (UAU)	cysteine (UGU)	U
	phenilalaline (UUC)	serine (UCC)	tyrosine (UAC)	cysteine (UGC)	C
	leucine (UUA)	serine (UCA)	STOP (UAA)	STOP (UGA)	A
	leucine (UUG)	serine (UCG)	STOP (UAG)	tryptophan (UGG)	G
C	leucine (CUU)	proline (CCU)	histadine (CAU)	arginine (CGU)	U
	leucine (CUC)	proline (CCC)	histadine (CAC)	arginine (CGC)	C
	leucine (CUA)	proline (CCA)	glutamine (CAA)	arginine (CGA)	A
	leucine (CUG)	proline (CCG)	glutamine (CAG)	arginine (CGG)	G
A	isoleucine (AUU)	theorine (ACU)	asparagine (AAU)	serine (AGU)	U
	isoleucine (AUC)	theorine (ACC)	asparagine (AAC)	serine (AGC)	C
	isoleucine (AUA)	theorine (ACA)	lysine (AAA)	arginine (AGA)	A
	methione (AUG) START CODON	theorine (ACG)	lysine (AAG)	arginine (AGG)	G
G	valine (GUU)	alanine (GCU)	aspartate (GAU)	glycine (GGU)	U
	valine (GUC)	alanine (GCC)	aspartate (GAC)	glycine (GGC)	C
	valine (GUA)	alanine (GCA)	glutamate (GAA)	glycine (GGA)	A
	valine (GUG)	alanine (GCG)	glutamate (GAG)	glycine (GGG)	G

A gének és a fehérjék kolinearitását Charles Yanofsky fedezte fel. Yanofsky a triptofán szintáz enzimet vizsgálta, mely a triptofán aminosavat szintetizálja. Ez az enzim esszenciális a baktériumok növekedéséhez Trp mentes környezetben. A vizsgálathoz szubsztitúciós mutánsokat (auxotrófok) készített, melyek növekedéséhez Trp szükséges. A genetikai rekombináció segítségével (lásd Meiózis fejezet) elkészítette a mutációk genetikai térképét (lásd előadására). Az 1950-es években már elérhető új technikák révén meghatározta a mutáns fehérjék szekvenciáját, hogy meghatározhassa, hogy a DNS szekvenciában lévő mutáció, hogyan érinti az aminosav szekvenciát. Az eredmények azt mutatták, hogy a változások kolineárisak. Minden mutáció egyetlen aminosav változást okozott, vagyis minden nukleotid csak egy kodonhoz tartozik: a genetikai kód nem átfedő. Az eltérő pont mutációk ugyanabban a pozícióban más-más aminosavakat eredményezhet a termékben.

### A genetikai kód jellegzetességei

1. **Specifitás:** a genetikai kód specifikus, mivel egy specifikus kodon mindig ugyanazt az aminosavat kódolja
2. **Univerzalitás:** a genetikai kód univerzális, mivel minden organizmus, prokarióták és eukarióták egyaránt ugyanazokat a kodonokat használják (kivételeket lásd a csillagozás alatt\*).
3. **Degeneráltság:** a genetikai kód degenerált, mivel minden kodon csak egy aminosavat kódol, viszont egy aminosavat több kodon is kódolhat pl. az argininnek 6 különböző kodonja van.
4. **A kód triplet:** minden három nukleotidból álló kodon az mRNS-ben kódol egy aminosavat.
5. **Vessző mentes:** az mRNS-t a riboszóma három bázisonként olvassa le, anélkül, hogy kihagyna egyetlen bázis is.
6. **Nem átfedő/egyértelmű:** minden nukleotid csak egy triplet tagja és csak egyszer olvassa le a riboszóma a transláció során.
7. **A kódok között van start és stop szignál is:** az AUG az általános start kodon, ami a szabad leolvasási keretet jelöli ki.
8. **A stop szignálok olyan kodonok, melyekhez nem tartoznak tRNS molekulák:** nonszensz vagy lánc terminációs kodonok; általában három stop kodon létezik: UAG, UAA, and UGA

## 11.2. A RIBOSZÓMA SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓJA

### Bevezetés

A citoplazmában vagy a durva felszínű endoplazmás retikulum felszínén található riboszómák az mRNS aminosavakra történő translációját, a fehérjék szintézisét végzik. A riboszómák RNS molekulákból és fehérjékből épülnek fel. Az RNS molekulák meghatározott minőségben és mennyiségben kapcsolódnak különböző fehérjék csoportjához. Minden riboszóma két, eltérő méretű alegységből épül fel.

---

\* Univerzalitás

Az első kivételeket az univerzalitás alól a mitokondriális mRNS-ben találták meg. A humán mitokondriumban például az UGA kodon triptofánt kódol a stop kodon helyett, az AUA izoleucin helyett metionint kódol, valamint az AGA és az AGG kodonok stop kodonként funkcionálnak és nem arginint kódolnak (lásd előadás ábra). A növények genetikai kódjai univerzálisak, azonban találtak kivételeket a protiszták és a gombák nukleáris DNS-ében. Ezekben az organizmusokban a start kodon lehet más is, mint AUG, de az első aminosav mindig metionin (lásd előadás ábra).

## Prokarióták

A baktériumok nagy (50S) riboszómális alegysége két RNS molekulából és hozzávetőlegesen 34 különböző fehérjéből épül fel. A bakteriális sejtek kis riboszómális alegysége (30S) egy RNS molekulát és 21 különböző fehérjét tartalmaz (lásd előadás ábra). A riboszóma alegységek szedimentációs koefficiensét Svedberg egységben (S) adjuk meg. A szedimentációs állandó egy komponens centrifugálás során történő ülepedését mutatja, mely egyaránt függ a molekula tömegtől és a komponens 3D szerkezetétől. A prokarióta riboszóma szedimentációs koefficiense 70S.

rRNS típusa	Nukleotidok száma	Alegység elhelyezkedése
16S	1,542	30S
5S	120	50S
23S	2,904	50S

Funkcionális 30S bakteriális riboszóma alegységet *in vitro* lehet készíteni a kis alegységben található riboszómális RNS és a 21 tisztított fehérje összekeverésével. A kis alegység komponensei tartalmazzák az összes olyan információt, ami az alegység összeszereléséhez szükséges. A kis alegység legalább egy fehérjéjének egyetlen feladata a riboszóma összeszerelésének irányítása. Ennek a fehérjének a hiányában az összeszerelési folyamat lassul a reakció elején, de nem gátolja a teljesen funkcionális riboszómák képződését. A bakteriális riboszóma nagy alegységét szintén fel lehet építeni *in vitro* az alkotóelemeiből. Az *E. coli* baktériumnak hét rRNS génre van szüksége, hogy a sejt számára megfelelő mennyiségű riboszómát tudjon felépíteni.

### Az rRNS jelentősége

A riboszómális RNS-eket kódoló gének a legjobban konzervált gének közé tartoznak minden sejtben. A prokarióta és az eukarióta riboszómák közötti különbségek lehetővé tették, hogy olyan antibiotikumokat állítsunk elő, melyek megszüntetik a bakteriális fertőzést, anélkül, hogy a fertőzött személy sejtjeit károsítanák (Lásd Antibiotikumok fejezetet további részletekért).

## Eukarióták

Az eukarióta sejtek több millió két alegységből álló riboszómát tartalmazhatnak. A nagy alegység, a 60S alegység 49 riboszómális fehérjéből, és a 28S rRNS valamint, 5,8S rRNS molekulákból épül fel. A kis alegység, 40S, 33 riboszómális fehérjéből valamint 18S rRNS molekulákból áll (lásd előadás ábra). A riboszómák száma olyan magas az eukarióta sejtekben, hogy az RNS molekulák több mint 80%-a rRNS. Az rRNS-t kódoló DNS szekvenciák több százszor ismétlődnek a genomban. A humán sejtek hozzávetőlegesen 200 rRNS gént tartalmaznak a haploid genomban, melyek kisméretű klaszterekbe rendeződnek öt különböző kromoszómán. A riboszóma összeszerelődése az rRNS molekulák szintézisétől és érésétől függ (lásd Transzkripció fejezetet további részletekért). A riboszómális RNS-t kódoló DNS, az rDNS a genomban egy vagy néhány régióban csoportosul. A humán genomban öt rDNS klaszter található. Ezek a klaszterek a sejtmagi struktúrákban tömörülnek, melyeket sejtmagvacskának (nukleólusz) nevezünk. A sejtmagvacska nagy része naszcens riboszómális alegységekből áll, ezek okozzák a magvacska granuláris megjelenését.



rRNS típusa	Nukleotidok száma	Alegység elhelyezkedése
18S	1,900	40S
5S	120	60S
5.8S	156	60S
28S	4,700	60S

Az 5S rRNS 120 nukleotid hosszúságú és a 60S alegység része. Az eukariótákban az 5S rRNS molekulákat nagyszámú azonos gén kódolja, melyek elkülönülten helyezkednek el a többi rRNS géntől a nukleóluszon kívül. Az 5S rRNS a nukleóluszbba transzportálódik, ahol a többi komponenssel együtt felépül a riboszóma alegység. Az 5S rRNS géneket az RNS polimeráz III írja át. Ez a polimeráz egyedi a három polimeráz között, mivel képes a célgén belső promóteréhez kötődni (a promóter az átírandó szakaszban helyezkedik el) (lásd Transzkripció fejezet).

Az eukarióta riboszómát nem lehet a komponenseiből *in vitro* előállítani. Ez azt jelenti, hogy az összeszereléshez szükséges információk az érett riboszóma komponenseiben már nem elérhetők. Csak a prekursor rRNS molekulák tartalmazzák a szükséges információt.

### Riboszóma biogenezis

A riboszóma rRNS molekulákból és fehérjékből épül fel. A riboszóma fehérje komponensei a citoplazmában szintetizálódnak. A fehérjék innen szállítódnak a sejtmagba a nukleáris pórusokon keresztül, majd a nukleóluszbba vándorolnak, ahol az érett rRNS molekulákkal kapcsolódva létrehozzák a riboszóma alegységeket. A riboszómális RNS-ek a nukleóluszbban íródnak át, kivételt képez az 5S rRNS, ami a sejtmagban szintetizálódik. A szintézist követően az 5S rRNS molekulák a magvacskába szállítódnak. A naszcens RNS transzkriptumok egyéb részecskékkal asszociálódnak. Ezek a partikulumok RNS-ből és fehérjéből felépülő komplexek, amik a rRNS prekursorok átalakítását segítik a végső, érett formává, és összeszerelik őket alegységekké. A riboszómális RNS először egy 45S pre-rRNS-ként szintetizálódik a magvacskában, belső és külső átírt szétválasztó szakaszokkal (ITS/ETS) (lásd előadás ábra). A következő lépésben az RNS módosító enzimek a felismerési szekvenciákhoz kötődnek az irányító RNS-ek segítségével (RNS-RNS duplex jön létre). Ezek az irányító RNS-ek az ún, kis nukleoláris RNS-ek (snoRNS), melyek fehérjékkel komplexet képezve hozzák létre a kis nukleoláris ribonukleoprotein komplexeket (snoRNP). Az RNS-hez kötődött snoRNS az RNS-hez irányítja a módosító enzimet (metiláz vagy pszeudouridiláz) és létrehozza az snoRNP-t, így módosítva egy meghatározott nukleotidot a pre-rRNS-ben. Hozzávetőlegesen 200 különböző snoRNS létezik, egy minden módosítandó pontra a pre-rRNS-ben, ami vagy metilálódik vagy pszeudouridilálódik (lásd Transzkripció fejezet). A riboszóma alegységek a sejtmagban épülnek fel, majd a citoplazmába exportálódnak. A riboszóma alegységei (kis,- és nagy) a citoplazmában kapcsolódnak össze.

## A riboszóma típusai

(lásd *Sejtorganelumok és Fehérje transzport fejezeteket*)

1. Szabad riboszóma:
  - csak a citoplazmában mozoghatnak
  - a szabad riboszómákon termelődő fehérjék a citoplazmába kerülnek és a sejten belül használódnak fel
  - a diszulfid hidakat tartalmazó fehérjéket szabad riboszómák nem tudják létrehozni (a citoszól redukáló környezet)
2. Membránhoz kötött riboszóma:
  - Durva felszínű ER
  - a polipeptid láncok ER-be irányító szignál szekvenciával rendelkeznek
  - a felhasználás helyére transzportálódnak (organelumok, plazmamembrán)
  - a fehérjék exocitózison esnek át- szekretálódhatnak (szekretoros útvonal)

## A riboszóma RNS-kötő helyei

A riboszóma négy kötőhellyel rendelkezik az RNS-ek számára: egy az mRNS-t köti, három pedig a tRNS-eket, ezek az A-hely (aminoacil), P-hely (pepidil) és az E-hely (exit) (lásd előadás ábra). A tRNS molekula csak akkor tud szorosán kötődni az A és P helyekhez, ha az antikodon bázisai komplementerek az mRNS kodonjának bázisaival. Az A és P hely elég közel helyezkedik el egymáshoz ahhoz, hogy a hozzájuk kötődött két tRNS molekulát az mRNS egymás melletti kodonjaihoz kösse. A riboszóma ezen tulajdonsága tarja fenn a helyes leolvasási keretet az mRNS molekulán.

A riboszóma A helye egy aminoacil-tRNS-t köt meg (egy aminosavhoz kötődő tRNS). Az új aminosavat hordozó aminoacil-tRNS NH<sub>2</sub> csoportja megtámadja a peptidil-tRNS (P helyen lévő tRNS) karboxil csoportját. A peptidil-tRNS hordozza a növekedő peptidlánc utolsó aminosavát. A két aminosav között lezajló reakciót peptidil transzferáz reakciónak hívjuk. Az utolsó aminosavon lógó tRNS az E helyre vándorol, az A helyen lévő aminoacil-tRNS pedig a P helyre (lásd *Traszláció fejezet*).

## Transzfer RNS-ek

(lásd *Transzkripció és RNS processzáldás fejezeteket*)

A tRNS molekulák szállítják az aktivált aminosavakat a riboszómához. A riboszóma azt a tRNS-t köti meg, aminek az antikodona komplementer az mRNS kodonjával.

1. A transzfer RNS molekulákat ismétlődő DNS szekvenciák kódolják (egy típusú tRNS-t számos, a kromoszómákon szétszórt gén kódol).
2. A humán genom kb.1300 tRNS gént tartalmaz.
3. Ezek a gének kis klaszterekben tömörülnek szétszórva a genomban.
4. Egyetlen klaszter, különböző tRNS-ek több kópiáját tartalmazza, az adott tRNS-t kódoló DNS szekvencia több klaszterben is megtalálható.
5. A tDNS hosszú, át nem íródó elválasztó szakaszokat tartalmaz a kódoló szekvencia elemei között.
6. A tRNS-eket az RNS polimeráz III írja át (belső promóter).
7. A tRNS elsődleges transzkriptuma hosszabb, mint a végleges termék (tRNS érés).
8. Számos bázis módosul. Ritka bázisok: pszeudouridin, ribotimidin, metilinozin, inozin, dimetilguanozin, metilguanozin, dihidouridin.
9. pre-tRNS processzáldás: endonukleáz enzim, ribonukleáz P
10. Az aminosav a tRNS 3' végéhez kapcsolódik
11. A tRNS hossza 73 és 93 nukleotid között mozog.

12. A ritka bázisok enzimatikus módosítások útján jönnek létre a négy standard nukleotidból (poszttranszkripció módosítás).
13. A tRNS molekulákban vannak olyan szekvencia részletek, melyek komplementerek a molekula más részeivel → a másodlagos szerkezet egy lóheréhez hasonlít (lásd előadás ábra).
14. Minden tRNS-nek van egy CCA tripletje a 3' végén.
15. Eukariótákban a CCA triplet enzimatikusan adódik a 3' véghez.
16. A tRNS harmadlagos szerkezete L-alakú (lásd ábra).
17. Az antikodon a tRNS középső hurkán található (lásd előadás ábra). A középső hurok hét nukleotidból áll; a középső három az antikodonon. Az aminosav a tRNS ellenkező végéhez kötődik.
18. tRNS lötyögés: a tRNS képes felismerni az eltérő harmadik bázissal rendelkező kodonokat is (több kodon képes így ugyanazt a tRNS-t használni; kevesebb tRNS molekula szükséges a 61 különböző kodonhoz- lásd előadás ábra).

### Aminosav aktiváció

Az aminosavak kovalensen kapcsolódnak a megfelelő tRNS-ek 3' végéhez. Ezt a kovalens kötést az aminoacil-tRNS szintetáz enzim (aaRS) hozza létre (lásd előadás ábra). A humán sejtekben 20 eltérő aminoacil-tRNS szintetáz enzim található, minden aminosavra egy. Minden szintetáz a megfelelő aminosavat kapcsolja a tRNS-hez. Az aminoacil-tRNS szintetáz képes felismerni az összes tRNS-t, és kizárja a többi aminosavhoz tartozó tRNS-t. A kötési folyamat első lépése egy ATP hidrolízise, ami aktiválja az aminosavat, úgy hogy létrehoz egy adenilált aminosavat, ami képes az enzimhez kötődni. A második lépés az aminosav tRNS 3' végéhez való szállítása. Az első reakcióban létrejött PPi Pi-vé hidrolizálódik, ami a reakciót az S aminoacil-tRNS és az AMP termelése fele tolja. Az aminosav aktiváció specificitása kritikus pontja a transláció pontosságának, a megfelelő antikodonnak kell a kodonhoz kapcsolódnia. Ennek oka, hogy a riboszóma csak a tRNS antikodonját „látja” a transláció során. Így a riboszóma nem képes különbséget tenni az azonos antikodonnal rendelkező, de eltérő aminosavval kapcsolódó tRNS-k között. Ha a tRNS a nem megfelelő aminosavat hordozza, akkor is beépül a növekvő aminosav láncba, úgy mintha a megfelelő lenne (mivel az antikodon komplementer a kodonnal).

## 11.3. A TRANSLÁCIÓ FÁZISAI ÉS SZABÁLYOZÁSA

### A fehérje szintézis lépései

#### Iniciáció

- Az mRNS a 30S alegységhez kapcsolódik.
- Az első tRNS a riboszómához érkezik és az mRNS-hez kapcsolódik a komplementer kodonnál.
- A kötődés váltja ki az 50S alegység 30S alegységhez kötődését.

#### Elongáció

- Az első tRNS az A helyhez kapcsolódik.
- A következő tRNS érkezésekor az A helyen lévő tRNS a P helyre vándorol
- A második tRNS az A helyre kötődik.
- Kialakul a peptidkötés a tRNS-ek által szállított két aminosav között.
- A második tRNS a P helyre vándorol.
- A riboszóma kész a következő tRNS fogadására és a folyamat folytatódik.
- Minden tRNS egy újabb aminosavat ad a növekvő peptid lánchoz.

### Termináció

- A riboszóma végighalad az egymás után következő nukleotid tripletéken.
- Amikor a riboszóma eléri a stop kodont, a peptid lánc szintézise befejeződik.
- Az utolsó tRNS leválik a riboszómáról, elkészült a polipeptid lánc.

### Poliriboszómák

A riboszómák és a mRNS komplexét poliriboszómának vagy poliszómának nevezzük (lásd előadás ábra). Minden egyes riboszóma az alegységeiből összeszerelődik a start kodonnál, majd végigmegy az mRNS-en a molekula 3' vége fele, amíg eléri a stop kodont. Amikor a riboszóma a második kodon fele mozdul az mRNS-en, akkor egy másik riboszóma kapcsolódik az iniciációs kodonhoz (AUG) és elkezd a transzlációt. A poliriboszómák növelik a fehérjeszintézis rátáját, mivel egy mRNS molekulát szimultán egyszerre több riboszóma ír át fehérjévé. A poliszóma az ER membrán felszínén jön létre hurok vagy spirál alakzatban.

### Prokarióta transzláció

A fehérje szintézis a legkomplexebb folyamat a sejtben. Az mRNS-ben tárolt információkat a transzfer és a messenger RNS bázispárjai által létrehozott komplementer szekvenciái dekódolják. A fehérje szintézishez szükséges molekulák a tRNS, mely aktivált aminosavat szállít (aminoacil-tRNS), riboszóma, mRNS, különböző faktorok (fehérjék), kationok és GTP molekulák, melyek energiát szolgáltatnak a transzlációhoz.

### Iniciáció

- A transzláció az iniciációs kodonnál, AUG, kezdődik, ez helyezi a riboszómát a megfelelő leolvasási keretbe.
- A kis alegység (30S) ismeri fel a start kodont, az AUG-t az mRNS-en.
- A Shine-Delgarno szekvencia segít a start kodon felismerésében.
- A Shine-Delgarno elem a prokarióta policisztronos mRNS iniciátor AUG kodonjának 5' végén helyezkedik el. Ez az elem komplementer a prokarióta riboszóma 16S rRNS 3' végének közelében lévő szekvenciával (lásd előadás ábra).
- Az AUG az egyetlen metionint kódoló triplet.
- Mindig a metionin az első aminosav a naszcens polipeptid lánc N-terminálisán.
- Baktériumokban az iniciációs metionin formilált metionin, amit N-formilmetioninnak nevezünk. A formil csoport a metionin amino csoportjához adódik hozzá. Ezt a folyamatot a metionil-tRNS formiltranszferáz katalizálja. A módosítás csak azután következik be, hogy a metionin hozzákötődik a tRNS<sup>fMet</sup> molekulához, amit az aminoacil tRNS szintetáz katalizál.
- Az első aminosav enzimatikusan lehasítódik a fehérjéről. A hasítást a metionin aminopeptidáz enzim végzi.
- Két metionint szállító tRNS molekula van, az egyik csak a formilmetionin számára, egy pedig a láncközi metionin számára.
- Az iniciációhoz ún. iniciációs faktorok (IF) szükségesek.
- A prokarióta sejtek három különböző iniciációs faktoral rendelkeznek: IF1, IF2 és IF3.
- IF-ok a 30S alegységhez kapcsolódnak.
- IF1 indítja el a 30S alegység mRNS-hez való kötődését, és gátolja az aminoacil-tRNS hibás helyhez való kötődését.
- IF2 egy GTP-kötő fehérje, ami az első aminoacil-tRNS bekötődéséhez szükséges.
- IF3 gátolja a nagy alegység (50S) idő előtti kapcsolódását a 30S alegységhez.

## Az iniciáció folyamata

(lásd előadás ábra)

1. A 30S riboszómális alegység az mRNS AUG iniciációs kodonjához kapcsolódik, ehhez szükséges az IF1 és IF3.
2. IF2-GTP hozzákapcsolódik a kis alegységhez.
3. A formilmetionin-tRNS<sup>fMet</sup> hozzákötődik az mRNS-hez az IF2-GTP-n keresztül.
4. Az 50S alegység csatlakozik a komplexhez, az IF1 és IF3 leválik, a GTP hidrolizálódik, végül az IF2-GDP is elhagyja a komplexet.
5. Az iniciátor tRNS a riboszóma P helyére kötődik.
6. A következő tRNS az A helyhez kapcsolódik.

## Elongáció

(lásd előadás ábra)

- Az iniciátor tRNS a P helyhez kötődik.
- A riboszóma kész a következő aminoacil-tRNS fogadására az üres A helyen.
- Két elongációs faktor szükséges a folyamathoz: EF-Tu és EF-G, mindkettő GTP-kötő fehérje.
- EF-Tu-GTP irányítja az aminoacil-tRNS-t az A helyre a riboszómán.
- A riboszómában történő konformáció változás következtében a tRNS továbbra is kötődik az mRNS-hez a fordító központban.
- A GTP hidrolizálódik és a Tu-GDP komplex felszabadul a riboszómáról.
- A peptidil-transzfer helyen belül az A és a P hely egymáshoz nagyon közel helyezkedik el (lásd előadás ábra).
- Kialakul a peptidkötés a két aminosav között (A és P hely).
- Az A helyen lévő aa-tRNS amin nitrogénje nukleofil támadást végez a P helyen lévő tRNS-hez kötődő aminosav karbonil szénatomján
- A peptidkötés kialakulása spontán, energia felhasználása nélkül megy végbe.
- A reakciót a peptidil transzferáz enzim katalizálja, mely a nagy alegység egyik komponense.
- A tRNS deacetilálódik a P helyen.
- A riboszóma három nukleotidonként halad előre az mRNS-en 5'→3' irányba.
- EF-G-GTP a nagy alegységhez kötődik.
- A GTP hidrolizálódik.
- A dipeptid transzlokálódik: a deacetilált tRNS és a peptidil-tRNS az E és a P helyekre vándorol.
- A riboszóma az mRNS második kodonjához kapcsolódik hidrogén-kötésekkel.
- EFG-GDP leválik a riboszómáról.
- A deacetilált tRNS leválik a riboszómáról és az új aminoacil-tRNS belép az A helyre a következő elongációs ciklusban.
- A naszcens polipeptid a nagy alegységben lévő kijárat csatornán keresztül hagyja el a riboszómát (lásd előadás ábra).

## Termináció

(lásd előadás ábra)

- A riboszóma eléri a stop kodont (UAA, UAG vagy UGA)
- A stop kodonnak nincs tRNS megfelelője.
- „Felszabadító” faktorok (RF-release factor) szükségesek a folyamathoz.
- Ezeket a faktorokat két csoportba lehet sorolni: I-es típusú RF-ek felismerik a stop kodont az A helyen; II-es típusú RF-ek GTP-kötő fehérjék.

- A baktériumoknak két I-es típusú RF-je van: RF1 az UAA és az UAG stop kodonokat ismeri fel, az RF2 az UAA és az UGA stop kodonokat ismeri fel.
- RF1 vagy 2 belép a riboszóma A helyére és közvetlen kapcsolódik a stop kodonhoz.
- A tRNS-t a naszcens polipeptid lánchoz kötő észter kötés hidrolizálódik.
- A kész polipeptid lánc leválik.
- A II-es típusú GTP-kötő RF3 hidrolizálja a GTP-t ezáltal az I-es típusú RF leválik az A helyről.
- A deacetilált tRNS elhagyja a P helyet.
- Az mRNS disszociál a riboszómáról.
- A kis- és nagy alegységek szétválnak a folyamat végén.

### Eukarióta transzláció

Az eukarióta transzláció komplexebb folyamat, mint a prokarióták esetében. Több szabályozó faktort igényel, ezáltal a teljes folyamat sokkal precízebben megy végbe.

#### Iniciáció

- Az első kodon az mRNS-en metionint kódol (AUG).
- Az eukariótáknál az iniciátor metionin általában az első AUG, amit a riboszóma felismer.
- Általában specifikus szekvencia határolja az AUG kodont, ami segíti a riboszómát az AUG kodonok diszkriminációjában.
- Ez a szekvencia az A/GCCA/GCCAUGA/G a legtöbb mRNS-ben.
- Az első aminosavat az ún. iniciátor tRNS szállítja, ami különbözik a láncközi metioninokat szállító tRNS-től.
- Az iniciátor tRNS a kis alegységhez kötődik.
- Az eukarióta sejtek legalább 12 iniciációs faktort igényelnek, ezek közül néhány eIF (pl. eIF1, eIF1A, eIF5 és eIF3) a 40S alegységhez kötődik, ami ez által képes az mRNS megkötésére (lásd lenti táblázat).

Iniciációs faktor	Aktivitás
eIF-1	a met-tRNS pozicionálása, az mRNS kötés elősegítése
eIF-2	heterotrimer G-fehérje $\alpha$ , $\beta$ és $\gamma$ alegységekből áll; hármass komplex létrehozása: eIF2-GTP + iniciátor metionin tRNS (met-tRNS <sub>met</sub> ); AUG-dependens met-tRNS <sub>met</sub> kötődés a 40S alegységhez
eIF-2B (GEF-nek is nevezik) guanin nukleotid kicserélési faktor, 5 alegységből épül fel: $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$	GTP/GDP kicserélődés az eIF-2 újrahajszosításakor; az alegységeket kódoló gének: EIF2B1–EIF2B5, bármelyikben bekövetkező mutáció súlyos autoszómális recesszív neurodegeneratív betegséget okoz: leukoenkefalopátia-fehérállomány degeneráció
eIF-3, 13 alegységből épül fel	Riboszóma alegység disszociáció a 40S alegységhez való kötődését követően; eIF-3e és eIF-3i alegységek overexpressziójuk során transzformálják a normál sejteket, eIF-3A overexpressziót számos humán rákban kimutattak



Iniciációs faktor	Aktivitás
Iniciációs faktor komplex, gyakran eIF-4F-ként emlegetik, 3 elsődleges alegysége van: eIF-4E, eIF-4A, eIF-4G és legalább két további faktor: PABP, Mnk1	mRNS kötése a 40S alegységhez, ATPáz-dependens RNS helikáz aktivitás, kapcsolat a poliA fark és a sapka struktúra között
PABP: poliA-kötő protein	Megkötí a poliA farkat az mRNS-en, és kapcsolódási pontot ad az eIF-4G-nek
Mnk1 és Mnk2 eIF-4E kinázok	eIF-4E foszforilációja növeli az asszociációt a sapka struktúrával
eIF-4A	ATPáz-dependens RNAS helikáz
eIF-4E	5' sapka felismerés; gyakran overexpresszált humán rákokban, eIF-4E gátlása az anti-tumor terápiák egyik fő célpontja
4E-BP (PHAS) 3 ismert forma	Amikor a defoszforilált 4E-BP az eIF-4E-hez kötődik, gátolja annak aktivitását, 4E-BP foszforilációja általában valamilyen növekedési stimulus hatására következik be, ez pedig az eIF-4E felszabadulásához és emelkedett transláció iniciációs rátához vezet
eIF-4G	Scaffoldként szolgál az eIF-4E és -4A összekapcsolódásához az eIF-4F komplexben; interakció a PABP-vel lehetővé teszi az mRNS 5'- és 3'-végeinek interakcióját
eIF-4B	Helikáz stimulálása, szimultán kötődik az eIF-4F-hez
eIF-5	eIF-2 és eIF-3 felszabadítása, riboszóma-dependens GTPáz
eIF-6	Riboszóma alegység disszociáció

- Az iniciátor tRNS belép a P helyre az eIF2-GTP-vel asszociálódva
- A kis riboszómális alegység az iniciációs faktorokkal (eIF1, 2 és 3) és a töltött tRNS-sel alkotja a 43S preiniciációs komplexet
- A preiniciációs komplex találja meg az mRNS 5' végét.
- Az mRNS az iniciációs faktorokkal együtt szintén komplexet képez: az eIF4E hozzákötődik az mRNS 5' sapka struktúrájához; az eIF4A (helikáz) végigmegy az mRNS 5' végén, megszüntetve a kétszálú régiókat, amik ellenkező esetben gátolnák a preiniciációs komplex mozgását az mRNS-en; az eIF4G összekötő fehérje az 5' sapka és a 3' poliadenilált fark között (lásd előadás ábra).
- A 43S komplex ismeri fel az AUG iniciációs kodont.
- Az eIF2-GTP hidrolizálódik.
- Az eIF2-GDP a többi iniciációs faktorttal együtt leválik a kis alegységről.
- A nagy alegység (60S) kapcsolódik a kis alegységgel (eIF5)
- Az eIF3 komplex felelős a hármass komplex kialakításáért (eIF-2-GTP-met-tRNAimet) és a 43S preiniciációs komplex (PIC) kialakulásáért.
- A 80S iniciációs komplex kialakulásához szükséges energia az eIF2-höz kapcsolódó GTP hidrolíziséből származik → eIF2-ciklus

### Az eIF2-ciklus

(lásd előadás ábra)

- A ciklus részei a GTP-t kötő eIF2 regenerációja az iniciációkor bekövetkező GTP hidrolízis után
- A GTP hidrolízise biztosítja az energiát a teljes riboszóma összeszereléséhez.
- Minden egyes iniciációs lépésben az eIF2-höz kötött GDP-t GTP-re kell cserélni.
- A cserét az eIF-2B végzi, amit guanin nukleotid kicserélő faktornak (GEF) is nevezünk.
- A ciklus foszforiláció útján szabályozódik (eIF2 $\alpha$  kinázok)
- A kinázok foszforilálják az eIF-2  $\alpha$ - alegységét.
- Amikor az eIF-2 foszforilált a GDP-t kötő komplex stabil állapotban van, és GTP csere gátolt (iniciáció gátlódik).
- Az eIF-2B szorosabban kötődik a foszforilált eIF2A-hoz, így lassítja a nukleotid kicserélődést
- Az emlős sejtekben négy eIF-2 $\alpha$  kináz van.
- Minden eIF-2 $\alpha$  kináz tartalmaz egyedi regulátoros doméneket, amik számos indukáló ágenssel képesek kapcsolatba lépni, melyek különböző stressz kiváltó folyamatok során (endoplazmás retikulum stressz, tápanyag stressz, vírus infekció, és eritrocitáknál pl. hem deficiencia) keletkeznek.
- Ezek a kinázok szabályozzák az eukarióta sejtek globális transzlációját.

### Elongáció

- Az iniciátor tRNS a P helyhez kötődik.
- A riboszóma kész a második aminoacil-tRNS fogadására a felszabadult A helyen.
- Két elongációs faktor szükséges a folyamathoz, eEF1 és eEF2, mindkettő GTP-kötő fehérje.
- Az elongáció ciklikus folyamat.
- Minden beérkező aminoacil-tRNS-t egy eEF1 $\alpha$ -GTP komplex kíséri.
- A tRNS az A helyre kapcsolódik, a GTP hidrolizálódik és az eEF1 $\alpha$ -GDP komplex leválik.
- GDP-nek mindenképpen GTP-re kell cserélődnie, melyet az eEF1 $\beta\gamma$  katalizál.
- A P helyen a tRNS-hez kapcsolódó aminosav áthelyeződik az A helyen lévő aminoacil-tRNS amino csoportjára
- A peptidkötés kialakulását a peptidil transzferáz enzim katalizálja, a reakciót transzpeptidációnak nevezzük.
- Az A helynek fel kell szabadulnia ahhoz, hogy a következő aminoacil-tRNS-t fogadhassa.
- A transzlokációt az eEF2 katalizálja GTP hidrolízisével (konformáció változást okoz a faktorban).
- A riboszóma tovább mozdul az mRNS-en a következő kodonra.
- A transzlokációt követően az eEF2 felszabadul a riboszómáról.
- A transzlokációt az eEF2 foszforilációja szabályozza. Ha foszforilált, akkor az enzim inaktív.
- Az eEF2 foszforilációját az eEF2 kináz enzim végzi el (eEF2K).
- Az eEF2K enzimek szintén foszforilációval szabályozódnak, de ebben az esetben a foszforiláció aktiválja az enzimet (kináz  $\rightarrow$  aktív eEF2K  $\rightarrow$  eEF2 inaktív)
- Az eEF2K kinázok: mTOR (mammalian target of rapamycin), AMPK (AMP-aktivált protein kináz)
- Minden elongációs ciklusban legalább két GTP molekula hidrolízise zajlik: egy az aminoacil-tRNS szelekciójakor, és egy a transzlokáció során.
- Utolsó lépés: A deacetylált tRNS leválik a riboszómáról (szabad E hely).

### Termináció

- „Felszabadító” faktorok szükségesek hozzá.
- Az eukariótáknak csak egy darab I-es típusú RF-je van, az eRF1, ami mind a három stop kodont felismeri (lásd prokarióták a további részletekért).



- Az eRF1 belép az A helyre és közvetlenül kapcsolódik a stop kodonhoz.
- A tRNS-t a naszcens polipeptid lánchoz kötő észter kötés hidrolizálódik.
- A kész polipeptidlánc leválik.
- A II-es típusú RF, az eRF3, GTP- kötő fehérje; a GTP hidrolízise után az eRF1 leválik az A helyről.
- A deacetilált tRNS elhagyja a P helyet.
- Az mRNS disszociál a riboszómáról.
- A kis- és nagy alegységek szétválnak a folyamat végén.

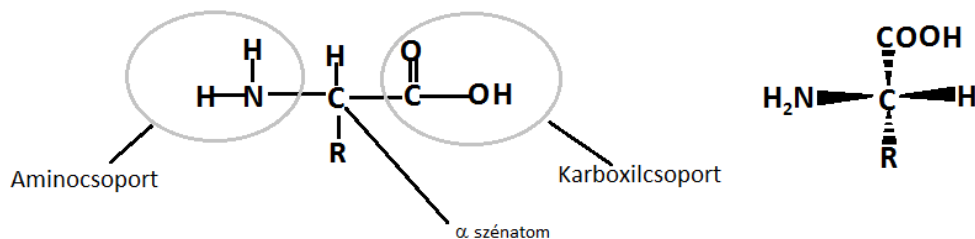


## 12. FEHÉRJÉK TÍPUSAI ÉS ANALÍZISE

### 12.1. FEHÉRJÉK TÍPUSAI

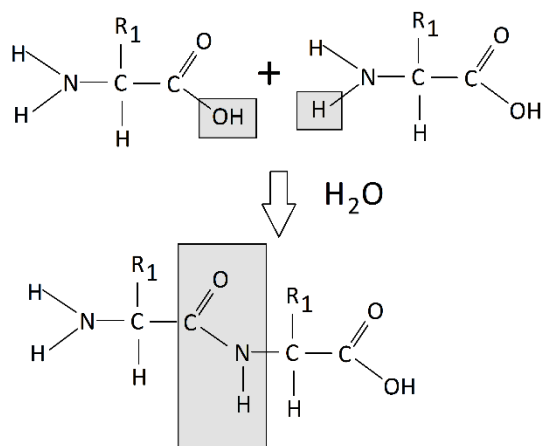
A fehérjék  $\alpha$ -aminosavakból állnak (azok polimerjei). Az élő szervezetekben 25 féle aminosavat találunk, ebből 20-at a szervezet nem képes de novo előállítani (esszenciális).

Felírható egy általános képlet az aminosavakra: ahol egy  $\alpha$  szénatomo, karboxil csoportot, egy aminos csoportot és egy R-rel jelölt szénhidrát oldalláncot találunk. Az aminosavak ebben az R oldalláncban térnek el egymástól.



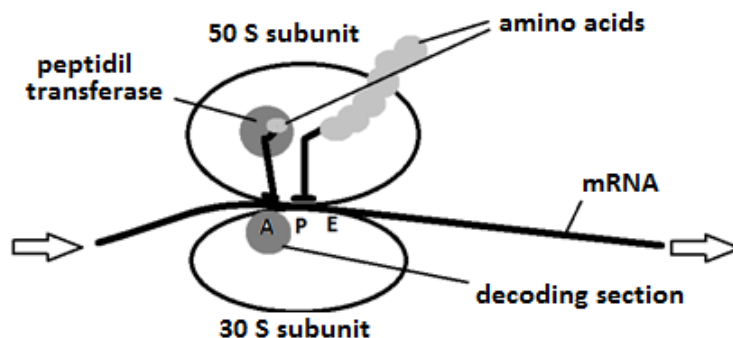
Minden amino- és karboxil csoport protonálódhat és deprotonálódhat. Az aminosavak ezek miatt a csoportok miatt rendelkeznek amfoter tulajdonságokkal, ez azt jelenti, hogy savakkal szemben gyenge bázisként, bázisokkal szemben gyenge savként viselkednek. Azt a struktúrát, amikor mind a karboxil-, mind az aminos csoport töltött, „ikerionos” szerkezetnek nevezzük.

Az aminosavak peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz: egy vízmolekula kilépése közben.



A sejtekben ez a kötés a riboszómákon jön létre. RNS molekulák képesek enzimekként viselkedni (ribozimek), riboszómákban peptidiltranszferáz RNS enzimek hozzák létre a peptid kötést. (Néhány antibiotikum ezeket az enzimeket képes gátolni baktériumokban, pl.: makrolidok, vagy klóramfenikol.)

A prokarióták 50S alegységében található 23S rRNS-e, az eukarióták 60S alegységének 28S rRNS-e rendelkezik ribozim funkcióval.

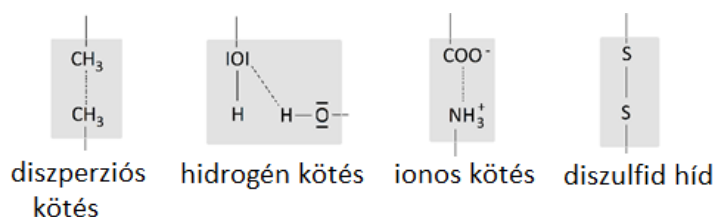


## Felépítés

Elsődleges szerkezet: az aminosavak szekvenciája

Másodlagos szerkezet: a polypeptidek adott szakaszának általános 3-dimenziós szerkezete:  $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő,  $\beta$ -kanyar, random szakaszok.

Harmadlagos szerkezet: a polypeptid lánc háromdimenziós struktúrája. (Ez írja le az atomok pontos pozícióját a 3D térben.) A harmadlagos szerkezetet különböző kötések stabilizálják:



A legerősebb kötés a diszulfid híd.

Negyedleges szerkezet: csak abban az esetben beszélhetünk róla, ha több polypeptid lánc építi fel a fehérjét. Ez írja le a kapcsolódó polipeptid láncok relatív pozícióját.

## Alak

(Emlékeztető: a harmadlagos szerkezet jelenti a fehérje geometrikus alakját.)

Globuláris fehérjék: (közel) gömb alakú fehérjék, a polipeptid lánc(ok) összegömbölyödtek, főleg enzimek és transzportfehérjék rendelkeznek ezzel a morfológiával, pl. hemoglobin globulinja.

Fibrilláris fehérjék: megnyúlt alakúak, kettesével, illetve hármassával alkotnak fonalakat. Inkább statikus funkciókat töltenek be, szerkezeti merevítést szolgálnak, alakot adnak a sejteknek, illetve mechanikai védelmet biztosítanak. Pl.:  $\alpha$ -keratin a körömében, hajban, bőrben, tollban, patában; a kollagén az inakban; vagy a fibroin a selyemszálakban. A fibrilláris fehérjék általánosan rosszul oldódnak vízben.

## Fehérjék oldódása

A fehérjék oldódása az aminosavak R oldalláncától függ a fehérje felületén: a hidrofób és hidrofil oldallándok eloszlása és mennyisége határozza meg ezt a tulajdonságot. A felületükön több hidrofób csoportot tartalmazó fehérjék kevésbé oldódnak jól vízben, míg a töltött és poláris csoportok növelik a fehérje vízzoldékonyságát. A magas oldékonyságú/oldott fehérjék nagy mennyiségben találhatóak a

vérben, például fibrinogén (ez az a molekula, ami a fibrin szálakat építi fel). Az oldhatatlan fehérék főleg fibrillárisak, például a fibrin szálak.

Proteomika: leíró tudományág, arra hivatott, hogy leírja a fehérjék expresszióját, lokalizációját, funkcióját, minőségét és interakcióit a vizsgált, adott korú és állapotú sejtben az adott körülmények között. (lásd omikák!)

Proteom: az adott állapotú és korú sejt, vagy élőlény teljes fehérjetartalma meghatározott körülmények között.

### Fehérjék csoportosítása

Csoportosítás az R oldallánc töltése szerint. (Képleteket lásd az előadási diákon!)

A glicin az apoláris és poláris csoportba is tartozhat.

Apoláris aminosavak hidrofób oldallánccal: az oldallánc szénhidrát csoporttal végződnek

Töltéssel nem rendelkező aminosavak poláris oldallánccal: ezek oldallánca részt vehet hidrogénkötések kialakításában.

Negatívan töltött aminosavak savas oldallánccal: carboxil csoportot tartalmaznak az R oldalláncukban

Pozitív töltésű aminosavak bázikus oldallánccal: amino csoportot tartalmaznak az R oldalláncukban

### Peptidek

A gyakorlatban általában akkor nevezzük fehérjének a polipeptideket, ha az aminosavak száma eléri a 100-at.

Dipeptidek: 2 aminosav egyetlen peptid kötéssel

Tripeptidek: 3 aminosav, 2 peptid kötés

Tetrapeptidek: 4 aminosav

Oligopeptidek: kevesebb, mint 10 aminosavból álló peptidek

Polypeptidek: több mint 10 aminosavból álló peptidek

A kis molekulák biológiai hatása is nagy lehet, pl. az aszpartám (mesterséges édesítő) egy dipeptid, a glutation (antioxidáns) és a melanosztatin (agyalapi hormon) tripeptidek.

### Proteinek és proteidek

Egyszerű fehérjének (=proteineknek) nevezzük azokat a fehérjéket, amik kizárólag aminosavakból épülnek fel, azaz kizárólag aminosavakra hidrolizálhatók.

Az összetett fehérjék (=proteidek) az aminosavak mellett más alkotókat is tartalmaznak (emlékeztető: ezeknek a fehérjéknek van negyedleges szerkezete). Csoportosíthatjuk őket az egyéb alkotó szerint:

Metalloproteinek: fém iont tartalmaznak, pl.: a citokróm  $\text{Cu}^{2+}$  ionokat, az alkohol dehidrogenáz  $\text{Zn}^{2+}$  ionokat tartalmaz

Heme proteinek: vas-porfirin részt tartalmaznak, pl.: hemoglobin, myoglobin, citokróm-c

Foszfoproteinek: foszfát csoportot tartalmaznak, pl.: kazein

Lipoproteinek: lipid részt tartalmaznak, pl.: trigliceridek és koleszterin

Glikoproteinek: szénhidrát régiót tartalmaznak, pl.: globulinok

Flavoproteinek: flavinnukleotid régiót tartalmaznak, pl.: szuccinát dehidrogenáz

Nukleoproteinek: nukleinsavat tartalmazó fehérjék (lásd vírusok), pl.: Dohány Mozaik Vírus, vagy riboszómák

## Fehérjék és betegségek

### Prion

A prion betegséget kialakító fehérje, ami nagyon hasonló a vírusos fertőzésre. A név a „protein” és „infection” szavak kombinációjából ered, illetve a „proteinaceous infectious particle” (=fehérje eredetű fertőző részecske) fogalom rövidített változata. Az emlősökben minden ismert prion betegség a központi idegrendszeret érinti és jelenlegi ismereteink szerint mindig halálos. A prion egy „hibásan” feltekeredett fehérje molekula, ami képes a helyesen feltekeredett fehérjéket a saját állapotába konvertálni, mintegy templátként viselkedve. A rosszul feltekeredett fehérjék extrémén stabilak, aminek felfedezésével a fertőtlenítő eljárások is változtatásra szorultak.

A prionok úgynevezett amiloid plakkokat (aggregátumokat) hoznak létre a központi idegrendszerben, ami tönkre teszi és elpusztítja a normál szöveti struktúrát.

Nohány humán prion betegség: Creutzfeldt-Jakob kór, variáns Creutzfeldt-Jakob kór, Kuru, örökletes halálos álmatlanság (Fatal Familial Insomnia). Néhány fontos állati megbetegedést okozó prion: szarvasmarha szivacsos agyvelőgyulladás, krónikus idegsorvadásos betegség, Surlókkór.

Creutzfeldt-Jakob kór: ritka, halálos kimenetű, ismeretlen eredetű, központi idegrendszeri sorvadás, ez a szarvasmarhák „kergemarha-kórjának” embereknél előforduló formája. Sajnos későn fedezték fel, hogy fertőző, addig öröklődő okokra vezették vissza, több műtét során derült ki, hogy sajnos átvitték egyik betegről a másikra a kórt. Ebben az esetben maga a „fertőző” fehérje alkot aggregátumokat.

### Fehérje aggregátumok

Fehérjeaggregátumok nem csak prionok hatására alakulhatnak ki. Fehérjeaggregátumnak nevezünk két, vagy több hibásan feltekeredett fehérje monomer rendellenes összekapcsolódásának eredményeként keletkező nagyobb fehérje egységet. Kialakulásának oka lehet a génben kódolt fehérjestruktúra, vagy a fehérje közege. Ezeknek a fehérjéknek így lecsökken a natív, biológiailag aktív mennyisége, ezért IS okozhat gondot. Lerakódhatnak a különböző sejtalkotókban, illetve szövetekben, ezzel is problémát okozva.

Fontos ezek detektálása és vizsgálata, mivel részt vesznek számos betegség kialakításában, felismerésük diagnosztikus, pl.: Huntington kór, Parkinson kór, Alzheimer kór és számos neurodegeneratív betegség.

Betegség	Fehérje aggregátum
Alzheimer-kór	$\beta$ -amiloid (plakkok), tau fehérje (neurofibrilláris kötegek)
Parkinson-kór	$\alpha$ -synuclein/ubiquitin
Lewy-testes demencia	$\alpha$ -synuclein
Huntington-kór	Poli-glutamin/ubiquitin
Creutzfeld-Jakob-kór	Prion fehérje
Pick-betegség	Tau (Pick-testecskék)

Alzheimer kór: két fehérjét érintő folyamat is nagyon fontos az Alzheimer kórban. Béta-amiloid fehérjék csomószerűen lerakódnak az agyban és így egyes hipotézisek szerint az idegsejtek pusztulását okozzák, így felelősek a memóriazavarokért és az Alzheimer-kórral járó egyéb mentális problémákért. A tau-fehérje (ami minden idegsejtben jelen van és a mikrotubulusokat hivatott stabilizálni) egy kóros megcsavarodott formájának megjelenésével, pedig összeomlik a sejtek számára életfontosságú mikrotubuláris rendszer, a sejt pedig elhal. A tau-hipotézis szerint nem is kell amiloid a betegség kialakulásához, elég egyedül a tau fehérje. Ha a folyamat beindul, jelenlegi tudásunk szerint nem lehet leállítani, a sejtek egymást „fertőzik meg”.

Parkinson-kór: az alpha-synuclein génjében mutáció található (ezt diagnózisra is használják), ez a mutáció rendellenes szerkezetű fehérjét eredményez, ez a rendellenes fehérje pedig hajlamos az összezsapzódásra, az így kialakuló aggregátumok pedig elpusztítanak bizonyos agysejteket. Amikor az agyat vizsgálják, ott alpha-synucleint tartalmazó úgynevezett Lewy-testek jelennek meg.

Lewy testes demencia: Férfiakban gyakoribb. A mikroszkóppal kimutatható változások eltérnek az Alzheimer-kórban látottaktól, ebben a kórképben az idegsejtekben kóros struktúrák, ún. Lewy-testek képződnek. Ilyenek Parkinson-kórban is előfordulnak, azonban az Alzheimer kórban csak az agy egy részén találhatóak, míg Lewy-testes demenciában az agy minden területén fellelhetőek.

A tünetek nagyon hasonlítanak az Alzheimer-kórban tapasztaltakhoz. Mégis a Lewy-testes demenciában szenvedők hajlamosabbak hallucinációkra, amelyek rendszerint gyakran komplex, részletgazdag látomások. A panaszok kezdetétől a várható élettartam 6-12 év.

A Huntington kór esetén a poliglutamin halmozódik fel. (Megjegyzés: poliglutamin halmozódik fel egyébként a törékeny-X szindróma, a kisagyi mozgáskoordinációs zavar és bizonyos izomsorvadásos betegségek – ezek az ún. poliglutamin betegségek)

Pick betegség: homlok- és halántéklebenyek degenerációja, az idegsejtek folyamatosan pusztulnak és helyükön ún. tau fehérjéket tartalmazó Pick-testek maradnak vissza.

### Terápiás fehérjék

A terápiás fehérjék olyan fehérjék, amiket gyógyászati célokra tervezünk laboratóriumokban. Az első piacra került terápiás fehérje az inzulin volt 1920-ban.

Ma különböző sejt kultúrákban állítunk elő terápiás fehérjéket (baktériumok, élesztő, emlős sejtek) rekombináns technikákkal.

Az első rekombináns fehérje gyógyszer egy Escherichia colik által előállított inzulin volt, amit ma már élesztőkben termeltetünk meg.

A fehérjék megtervezése során nem feltétlenül a természetes változatot kezdjük el megtermeltetni, változtathatunk a szerkezetén, hogy nagyobb választ érjünk el, vagy csökkentjük a mellékhatásokat. Így alkották meg például az inzulin analóg molekulákat az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség kezelésére. Az E. coliban előállított inzulin lispro néhány fontos módosítást tartalmazott: a lizin és prolin a B lánc C terminális végén fel van cserélve, ez az inzulin dimerek és hexamerek kialakulását gátolja, de nincs hatása a receptorkötődésre. A változás miatt több aktív molekula lesz az injekcióval bevitt gyógyszerben.

#### Fontos rekombináns terápiás fehérjék

Insulin: 1. Hunalog (piaci név) : E. coliban termeltetett

Erythropoietin: Epreo (piaci név), VVT képzést indukál: veseproblémákkal küzdők kapják és doppingra is sokszor próbálják használni.

Növekedési hormonok: korábban egy növekedési hormonhiánnyal született gyerekek 18 halott agyából kivont mennyiségre volt szükség, ez számos morális kérdést is felvetett, valamint sok ember nem engedhette meg magának a kezelést, azonban ma a rekombináns technikákkal sokkal biztonságosabb és olcsóbb módon elérhető a kezelés.

Interferonok: vírusfertőzés ellen, vírusindukálta tumorok ellen

Vakcinák: rekombináns technikákkal előállíthatunk biztonságos vakcinákat különböző patogének ellen, ilyen lehet például a kolera elleni védőoltás (Dukoral: rekombináns kolera toxin B inaktivált teljes baktériummal), a Diphtheria elleni védőoltás, a Hepatitis B (1981 óta ennek felszíni fehérjéit élesztőben állítják elő), Tetanus.

Antitoxinok: „antiszérumok”: például kígyóméreg ellen, kísérletek zajlanak botulin antitoxinokkal.

Antitestek: néhány fontos példa: Avastin: az érépződést gátolja, így a tumorok rosszindulatúvá válása gátolható vele (anti-VEGF antitest). A Remacade és Humira fontosak a Crohn betegek kezelésében, krónikus gyulladós betegségek kezelésében, valamint rheumatoid arthritis kezelésében (TNF-blokkolók). A Lucentist makuladegeneráció ellen használjuk.



# 13. FEHÉRJÉK MÓDOSULÁSAI, DEGRADÁCIÓJA

## 13.1. POSZTTRANSLÁCIÓS MÓDOSULÁSOK

A riboszómán képződő fehérjék nagy része nem működőképes nyers polipeptid formájában. Ezek a transláció után **posztranszlációs módosuláson** esnek át. A posztranszlációs modifikáció célja:

- a megfelelő aktív konformáció kialakulása (fehérjetekeredés - folding) → dajkafehérjék
  - aktivitás szabályozás (a fehérje akkor és ott legyen aktív, ahol és amikor szükséges)
  - degradáció/stabilizálás (rosszul tekeredett fehérjék bontása, koncentráció egyensúlyban tartása)
1. Proteolitikus módosítás  
A **proteolízis** a polipeptid lánc hasítása meghatározott helyen, proteolitikus enzimek, pl. proteázok és peptidázok által. A proteolitikus módosítás szerepe:
    - a) Az N-terminális aminosav lehasítása: Transzláció után a legtöbb fehérje rendelkezik egy N-terminális Met aminosavval, amit le kell hasítani a fehérje érési folyamatának kezdetén.
    - b) Szignál szekvencia lehasítása: Amikor a fehérje a felhasználásának helyére érkezik, a szignál szekvenciára tovább nincsen szükség.
    - c) Prekurzor fehérje aktiválás (konverzió): Számos fehérje nem-funkcionális pro- vagy pre-pro formában hagyja el a riboszómát. Ezek proteolitikus hasítása révén jön létre az aktív forma. Pl. a pankréász sejtek által termelt inaktív kimotripsinogén a bélben hasítás révén nyeri el aktív formáját, így jön létre a kimotripszin.
  2. Dajkafehérjék (molekuláris chaperonok)  
A dajkafehérjék (chaperonok), pl. hőszokk-proteinek (Hsp), amelyek segítik a frissen szintetizált polipeptidláncok megfelelő térszerkezetének kialakulását nem kovalens módon:
    - a) Megfelelő időzítés (megakadályozzák a korai foldingot)
    - b) Helyes tekeredés (polipeptid védelme a környezeti hatásoktól)
    - c) Hibásan tekeredett fehérjék javítása: kitekerik a helytelenül feltekeredett fehérjéket, esélyt adva az újbóli, helyes foldingnak
    - d) Megakadályozzák a fehérjék aggregálódását (neurodegeneratív betegségek elleni védelem)A chaperonok felismerik a fehérjék hidrofób oldalláncait, és megvédik azokat a folding során, amíg a stabil szerkezetű fehérje belsejébe kerülnek. A hőszokkproteinek nevüket arról kapták, hogy képesek megvédeni a fehérjék denaturációját magas hőmérsékleten, és újra feltekerik a denaturálódott (kitekeredett) vagy hibásan tekeredett fehérjéket.
  3. Diszulfid híd  
A diszulfid hidak kovalens kötések révén stabilizálják a térszerkezetet. A diszulfidhidak kéntartalmú Cys oldalláncok között jönnek létre, általában szekretált fehérjékre jellemzően. A kovalens diszulfidhidak az ER-ben, oxidáló közegben szulfhidril oxidáció révén jönnek létre (de novo diszulfid híd képződés). A citoplazma redukáló környezetében diszulfid híd izomerizáció révén a kötések a megfelelő helyre kerülhetnek, hogy a fehérje elnyerhesse stabil, feltekeredett formáját. Eukarióta sejtekben valamennyi folyamatot Protein Diszulfid Izomeráz enzimek végzik (PDI).
  4. Glikoziláció  
Ha egy fehérjéhez kovalensen szénhidrát lánc (glikán) kapcsolódik, az így képződő molekulát **glikoproteinnak** nevezzük. A glikánok komplexitása széles skálán mozog a monoszacharidoktól egészen a több száz molekulából álló egyszerű vagy elágazó lánc-

kig. A glikoproteinek szinte kivétel nélkül Eukariótákban fordulnak elő, komplexitásuk az evolúciós fejlettségi szinttel növekszik.

A szénhidrátok a fehérje külső felületén található hidrophil környezetben. Számos szekretált és membránkapcsolt fehérje tartalmaz kovalensen kötött glikánláncot.

A glikoziláció szerepe:

- a) sejten belül a fehérje vízdékonysága fokozódik (aggregáció megelőzése)
- b) kis molekulák: intracelluláris jelátvitel
- c) szekretált fehérjék védelme a lebontástól
- d) a fehérje-fehérje interakciók specificitásának biztosítása
- e) a sejt felszíni adhézió (más sejtek általi felismerés) javítása (pl. fehérvérsejtek kitapadása a gyulladás helyszínén; az influenza vírus szialsavhoz köt a gazdasejt felszínén → a gazdasejt bekebelezi a vírust).
- f) molekula térfogatának növelése

A glikoziláció két fő típusa az N-glikoziláció, amikor a szénhidrátok a fehérjéhez egy nitrogén atomon keresztül kapcsolódnak, illetve az O-glikoziláció, ahol egy oxigén atom a kovalens linker.

- a) N-glikoziláció: A szénhidrátlánc egy aszparaginból származó N-atomhoz kapcsolódik az endoplazmás retikulumban. A prekursor egy oligoszacharid (tartalmaz glukóz, mannóz és N-acetil-glükózamin cukrokat). Az oligoszacharid lánc a fehérjén található glikozilációs szignál szekvenciához kötődik. A folyamatban a hordozómolekula a dolichol pirofoszfát (DPP). A folyamatokban részt vevő 15 gén bármelyikében bekövetkező mutáció fejlődési rendellenességekhez vezet.
- b) O-glikoziláció: A prekursor molekula, az N-acetil-galaktózamin (NAG), egy szerin/threonin aminosavból származó O-atomhoz kapcsolódik a Golgi készülékben. Az O-kapcsolt szénhidrátok kevésbé összetettek az N-kapcsolt szénhidrátokkal összehasonlítva. O-glikoziláció tipikusan az extracelluláris mátrixra, a szekretált fehérjékre (mucus), valamint az IgA1 és IgD molekulákra jellemző.

A citoplazmatikus és nukleáris fehérjék körében létezik egy másik típusú, reverzibilis O-glikoziláció, amit O-GlcNAc modifikációnak nevezünk. Ez a fehérje módosulás szerepet játszhat a foszforiláció szabályzásában, mivel a két modifikációs folyamat azonos szakaszt érint. Ily módon az O-GlcNAc módosítási folyamat gátolni képes a foszforilációt és az acetilációt.

Az O-glikoziláció donormolekulája az UDP-GlcNAc, aminek a szintjét a sejt tápláltsági foka befolyásolja. A reverzibilis monoglikoziláció a tápláltsági állapotra válaszol a fehérjefoszforiláció szabályozásán keresztül.

## 5. Kis csoportok reverzibilis kötése

Ebbe a tág csoportba tartozik pl. a foszforiláció, metiláció és az acetiláció. A reverzibilis és gyors folyamatok révén a sejt képes hatékonyan reagálni a változásokra és ingerekre: ezek a módosulások szerepet játszanak az enzimaktivitás szabályzásban, a jelátvitelben és a kromatin szerkezeti változásokban. A különböző modifikációk képesek ugyanazon fehérje funkcióját különbözőképpen módosítani, így módon egy fehérje **többféle funkció** ellátására is képes. Mivel reverzibilis folyamatokról van szó, két enzimszisztéma végzi az ellentétes irányú modifikációkat, a fehérjék képesek **kémiai kapcsolókként** működni.

### a) Foszforiláció / defoszforiláció

Ezeket a folyamatokat protein kinázok és foszfatázok katalizálják. A foszfátcsoportok donormolekulája az ATP, az érintett aminosavak: Ser, Thr, Tyr. A foszfátcsoport negatív töltése révén megváltozik a fehérje konformációja, ami pedig hatással van az aktivitására. Ezen kívül a foszforiláció új felismerő/kötőhelyeket hozhat létre, amelyek a fehérje kötések szempontjából fontosak. Ld. Jak-STAT jelátviteli útvonal.

### b) Acetiláció / deacetiláció

A folyamatban acetyl transzferázok acetyl-CoA donor segítségével acetilcsoportokat kapcsolnak egy N-terminális Lys aminosavhoz. A tubulin fehérje neuronok axonjaiban

acetilálódik, aminek hatására megnő a fehérje élettartama a citoplazmatikus fehérjéhez képest. Hisztonfehérjék acetilációja kulcsfontosságú a gének kifejeződés szabályozásában a kromatinszerkezet megváltoztatásával.

c) Metiláció / demetiláció

A metiláció során metil (CH<sub>3</sub>) csoportok kapcsolódnak Arg vagy Lys oldalláncokhoz. A folyamatot metiltranszferázok katalizálják, a donormolekula az S-adenosine-methionine (SAM). A foszforilációval ellentétben az oldallánchoz több metilcsoport is kapcsolódhat. A metilcsoportok kémiaiilag stabilak, a folyamat főleg hisztonfehérjékre jellemző (epigenetikai szabályozás, a DNS metilációval nem összekeverendő!).

6. Inaktív prekursor fehérjék aktiválása

Sok polipeptid prekursor formában hagyja el a riboszómát. Ezeket aktiválni kell, hogy képesek legyenek a feladatuk elvégzésére. Ez sok esetben proteolitikus módosítások révén megy végbe (ld. fentebb a Proteolitikus módosítás bekezdést).

- a) Enzim aktiválás: pl. a gyomor fősejtjei pepszinogént termelnek, ami egy autokatalitikus folyamat során aktiválódik, amikor a gyomor savas közegébe lép, ahol kitekeredik és önmagát hasítva aktív pepszint hoz létre.
- b) Prohormon-hormon átalakulás: pl. az inaktív preproinzulin hordoz egy szignálszekvenciát, amire az ER-be való transzporthoz van szükség. Az ER-be érve, az aktivációs folyamat első lépéseként a szignálszekvencia lehasítódik. Ezt követően három diszulfidhíd jön létre. Az így létrejött proinzulin átesik egy újabb aktivációs lépésen, három proteáz hasítja a prohormont, melynek következtében kialakul az inzulin végleges, aktív formája. Hasonló példaként szolgálhat a hepcidin
  - preproinzulin - inzulin
  - prohepcidin - hepcidin
- c) Retrovirális poliprotein hasítás: Számos retrovírus esetében, beleértve a HIV vírust, első lépésben poliproteinek képződnek. Ezeket retrovirális gének által kódolt proteázok hasítják, hogy létrejöhessenek az aktív fehérjék. A gyógyszerészetben ezeket gyógyszer-célpontként alkalmazzák antiretrovirális terápiákban.

## 13.2. FEHÉRJÉK DEGRADÁCIÓJA

A fehérjék élete irreverzibilis degradációval végződik. Ha egy fehérjére a továbbiakban nincs szükség, a sejt a protein lebontásával szabadul meg tőle. A hibásan feltekeredett (misfolded), illetve sérült fehérjék is degradáció révén eliminálódnak. A sejten belüli anyagcsere szabályozása történhet az enzimmagtár egy részének lebontása révén is. Számos esetben az aktív fehérje egy prekursor protein hasítása révén jön létre. A felsoroltakon kívül, új fehérjék felépítésének előfeltétele a szabad aminosavak jelenléte, ami részben más fehérjék lebontása során keletkezik a sejtben. A sejtben a fehérjebontó rendszerek szigorú szabályozás alatt állnak.

A fehérje degradáció tehát röviden az alábbi célokat szolgálja:

- Hibásan feltekeredett és sérült fehérjék eltávolítása
- Sejten belüli anyagcsere szabályozása (enzimhatás csökkentése)
- Aktív fehérjék létrehozása (prekursor hasítása)
- Aminosav újrahasznosítás

A fehérje degradáció két módon mehet végbe:

- Lizoszomális proteolízis: nem szelektív (kivéve éhezés esetén). Ld. Lizoszómák (Citoplazmatikus organellek fejezet)
- Proteoszomális ubiquitin-függő útvonal: Ub-jelölt fehérjék szelektív lebontása

## Proteoszomális ubiquitin-függő útvonal

### A proteoszómák szerepe

A lebontás első lépése a protein „kitekerése”, ami energiafüggő folyamat. A proteolitikus rendszerek (gépezetek) – a proteoszómák – két fő funkciója az ATP bontása (ATPáz), ami az energiát szolgáltatja, és a peptidáz enzimaktivitás. Az eukarióta proteoszómák kb. 30 különböző polipeptidból felépülő, hordóalakú struktúrák, amelyek belső tere aktív proteáz aktivitással rendelkezik. Baktériumsejtek a fehérjék lebontására egyszerűbb gépezettel rendelkeznek. ATP szükséges a célfehérjéknek a proteoszóma belső terébe juttatásához, ahol a lebontás gyorsan megtörténik. 30 – 80 ATP molekulára van szükség egy kb. 100 aminosav hosszúságú fehérjelánc denaturációjához. A proteoszóma 5 – 20 aminosav hosszúságú peptidokra bontja a fehérjeláncokat. Esetleges további hasítási lépések után rövid peptidfragmensek hagyják el a proteoszómát.

### A lebontandó fehérjék felismerése

A fehérje degradáció erősen szelektív, a sejtnak pontosan fel kell ismernie a lebontásra váró fehérjéket.

Baktériumokban különféle jelölők/címkék segítségével történik a szubsztrátok felismerése. A címkék strukturálatlan peptidok, ám létezik egy elsődleges felismerő szekvencia, ami a fehérjék N-és C-terminálisán található. Ún. adaptor fehérjék is segíthetik a szubsztrát kötődését a degradációs gépezethez.

Eukariótákban a lebontandó fehérjék felismerését az ubiquitináció segíti. Az ubiquitin egy 76 aminosavas peptid, amely a fehérjék Lys oldalláncjaihoz kovalens módon képes kötődni. Az egyes ubiquitin molekulán túl, teljes ubiquitin láncok képesek hozzákötődni a fehérjékhez. Az ubiquitinálás legfontosabb szerepe az így módosított fehérje irányítása a lebontás útjára. Ezt a folyamatot „death tagging” vagy „death ticketing” néven említik (ami kb. halál címkézést jelent). Az ubiquitináció visszafordítható folyamat, a deubiquitinációt deubiquitináló enzimek végzik. Az ubiquitinálás háromlépcsős folyamatában három enzim vesz részt:

- E1 – Ub aktiváló enzim (az Ub C-terminális régiója kovalensen bekötődik az enzim aktív centrumában található Cys-hez) ATP-igényes folyamat
- E2 – Ub konjugáló enzim (E1-Ub kölcsönhat az E2-vel, Ub áthelyeződik az E2 aktív centrumában található Cys-re)
- E3 – Ub-protein ligáz (Ub áthelyezése az E2-Ub-ról a célfehérje Lys oldalláncának aminosoportjára)

Az E3 képes egy Ub-t hozzákapcsolni egy másik Ub-re, aminek következtében polyubiquitin lánc ön létre. Ha tudjuk, hogy az Ub 7 Lys oldalláncot tartalmaz, képzeljük el milyen sokféle, változatos polyubiquitin láncok jöhetnek létre. Ezeket a különböző E3 típusok hozzák létre, mivel az egyes típusok hajlamosak mindig egy bizonyos oldallánchoz kötni az Ub-t.

### A fehérjék lebontásának sebessége

A proteolízis sebessége a fehérje típusától függően eltér. A hibás fehérjék gyorsan degradálódnak, míg a normál fehérjék féleletideje széles skálán mozog: 11 perctől akár 1 hónapig. Az N-vég szabálynak megfelelően, egy fehérje életidejét az N-terminális aminosav minősége szabhatja meg (pl. Val → 100 h, Gln → 0.8 h emlősökben). A fehérjebontás sebessége a sejtben megváltozhat fiziológias hatásokra, pl. éhezés esetén a fehérjebontás felgyorsul, hogy szabad aminosavakat biztosítson a sejt számára.

### Unfolded Protein Response (UPR) – „Nem feltekeredett fehérje válasz”

Az UPR a sejt egyik stressz válasz mechanizmusa. Ha nagy mennyiségben vannak jelen rosszul-vagy nem feltekeredett fehérjék az endoplazmatikus retikulumban, az egyensúly visszaállítása érdekében a sejtben leáll a transzláció, a fehérjebontás felgyorsul, a chaperonok száma pedig megnő. Ha ez nem jár sikerrel, megkezdődik az apoptózis folyamata. Az UPR-ben fellépő hibák tehetők felelőssé olyan betegségek kialakulásáért, mint a Creutzfeld-Jakob kór, az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór vagy a Huntington-kór.

### A fehérjebontáshoz kapcsolódó betegségek

A normálistól eltérő proteozomális működés hibás fehérjék felhalmozódását okozhatja, amelyek összecsapódva zárványokat, plakkokat képezhetnek. Ezek olyan betegségek kialakulásáért felelősek, mint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór vagy az ALS.



## 14. GÉNREGULÁCIÓ

### 14.1. GÉNSZABÁLYOZÁS PROKARIÓTÁKBAN

A centrális dogma szerint a gének először átíródnak mRNS-ekre, amik lefordítódnak polipeptididekre, amik – poszttranszlációs módosítások után – enzimekként vagy struktúrfehérjékként látják el feladataikat a sejtben. Ezt a folyamatot **génexpresszió**nak nevezzük. A folyamat számos ponton módosítható – csendesíthető vagy erősíthető. Az ilyen szabályozási folyamatokat együttesen génexpressziós szabályozás, vagy rövidebben **génszabályozás** néven említjük.

Baktériumokban a gének lehetnek folyamatosan expresszáltak, vagyis mindig aktívak, illetve indukálhatóak, ami azt jelenti, hogy a génkifejeződés elindításához ún. inducerekre van szükség. A fehérjetermelés a sejtben található anyagokat és energiát használja fel, érhető tehát, ha a sejt arra törekszik, hogy elkerülje az olyan fehérjék szintézisét, amelyekre pillanatnyilag nincs szükség. Mégis kulcsfontosságú a génkifejeződés lehetőségének fenntartása arra az esetre, ha a környezeti vagy fiziológiai körülmények megváltoznak.

Általánosságban a **transzkripcionális regulátorok** lokalizálják a célszekvenciát a genomban, amelyek baktériumokban a promoter régió közelében helyezkednek el. A szabályozó fehérjék a tőlük *downstream* elhelyezkedő gének transzkripcióját képesek módosítani. A génexpressziót növelő regulátorokat **aktivátorok**nak nevezzük, míg az expresszált fehérje szintjét csökkentő szabályozók a **represszorok**. Baktériumokban számos mechanizmus fejlődött ki a transzkripció iniciációjának szabályozására. Közülük néhányat alább példákkal szemléltetünk:

#### A lac operon

**Operonnak** nevezzük a gének olyan csoportját, amely egy egységként íródik át (és szabályozódik). A lac operon ún. indukálható operon, amelyet a glükóz és a laktóz relatív hozzáférhetősége modulál. Az *E. coli* a glükózt részesíti előnyben energiaforrásként, de laktózt is képes használni. A lac operon tartalmazza a laktóz lebontásban szerepet játszó géneket. Ezek a gének (és így az operon) represszáltak, ha a glükóz szabadon hozzáférhető, mivel nincs szükség a laktózbontó enzimekre. Ha azonban a glükóz szintje szuboptimális, és elegendő laktóz áll a sejt rendelkezésére, a laktózt metabolizáló gének expressziója indukálódik.

Az egymással szomszédos, laktóz-metabolizmusban részt vevő gének:

- *lacZ*:  $\beta$ -galaktozidázt kódol (laktózt vágó enzim)
- *lacY*: laktóz permeázt kódol (laktóz-felvételért felelős)
- *lacA*: galaktozid O-acetiltransferáz (védelem toxikus  $\beta$ -galaktozidok ellen)

A laktóz metabolizmusban részt vevő gének "előtt", upstream irányban található a *lacI* gén, amely a **Lac represszor** fehérjét kódolja. Ez a rendszer egyik effektora, hozzáköt a lac operátor szakaszhoz, amely a struktúrgénekhez képest upstream helyezkedik el, és represszálja, elnyomja a transzkripciót. Mindez allolaktáz hiányában igaz, az allolaktáz ugyanis a lac represszorhoz kötődve inaktíválja azt, aminek következtében a struktúrgének transzkripciója aktiválódik. Allolaktáz akkor van jelen, ha aktív laktóz-metabolizmus folyik a sejtben. A rendszer másik effektora a **CAP** (catabolyte gene-activator protein), amely cAMP receptorként működik. cAMP csak alacsony glükóz-szint esetén jelenik meg. A CAP az ún. CAP operátor szakaszhoz kötődik, ami a promotertől upstream található, és a laktózt metabolizáló enzimek átírását aktiválja. Az egy operon génjeiről származó transzkriptumot "policisztronikus mRNS"-nek nevezzük.

A rendszer működése:

*Normál esetben* a glükóz szintje magas, a laktózé alacsony. A magas glükóz-koncentráció miatt cAMP nincs jelen, tehát a CAP inaktív, nem aktiválja az átírást. Az alacsony laktóz szint miatt az allolaktáz szintje is alacsony, így a lac represszor fehérje hozzákötődik a lac operátor szakaszhoz, blokkolva a laktóz metabolizmusában szerepet játszó gének kifejeződését.

A *glükóz szintjének csökkenésével* cAMP jelenik meg a sejtben, ami a CAP bekötődését okozza a CAP operátor szakaszhoz, amely a génexpressziót aktiválja. Laktóz jelenlétében allolaktáz is megjelenik, amely a lac represszorhoz kötve meggátolja annak kötődését a lac operátor szakaszhoz. A lac operátor felszabadul a gátlás alól, a transzkripció így elkezdődhet.

Jacob és Monod 1965-ben Nobel-díjat kaptak az operon modell leírásáért.

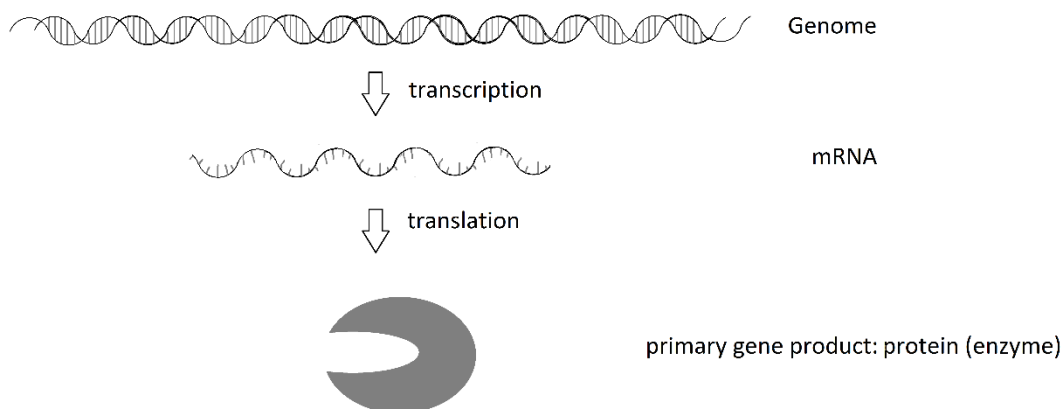
### Trp represszor

Az *E. coli* képes triptofánt szintetizálni, az ehhez szükséges gének pedig egy operont alkotnak. Ha a környezetben a Trp szintje optimális, nincs szükség annak szintézisére, tehát normál körülmények között az operon átírása gátolt. Az operátor szakasz a promotertől downstream helyezkedik el, azzal átfedésben. A triptofán a **trp represszor** fehérje allosztérikus effektora. Ha a környezetben a Trp jelen van, beköt a trp represszor proteinhez, aktiválva azt. Az aktív represszor beköt az operátor szakaszhoz, blokkolva az RNS polimeráz enzim bekötődését a promoterhez. Így módon a transzkripció nem indul el.

Triptofán hiányában a Trp represszor fehérje inaktív, nem kötődik az operátorhoz, következésképpen az RNS polimeráz hozzá tud kötődni a promoter régióhoz, és megkezdni az operon átírását. Az így létrejövő policisztronikus mRNS translációja során olyan fehérjék képződnek, amelyek a sejt túlélésében kulcsfontosságú triptofán szintézisét végzik.

Prokariótákban a transláció közvetlenül a transzkripció után elindul, mivel a két folyamat térben nincs elhatárolva. Ez a prokarióta és eukarióta transláció legfőbb különbsége.

## 14.2. GÉNREGULÁCIÓ EUKARIÓTÁKBAN



Minden sejt tartalmazza a teljes genomot és minden fehérjéire vonatkozó információt. Mégis igen nagy különbségeket találunk neuronok és fehérvérsejtek között. A gének nem folyamatosan fejeződnek ki, erős kontroll alatt és különböző mintázatok szerint fejeződnek ki. A génexpressziós mintázat specifikus és karakterisztikus; a sejt típusától, korától és állapotától függ. A gének kifejeződésének szabá-



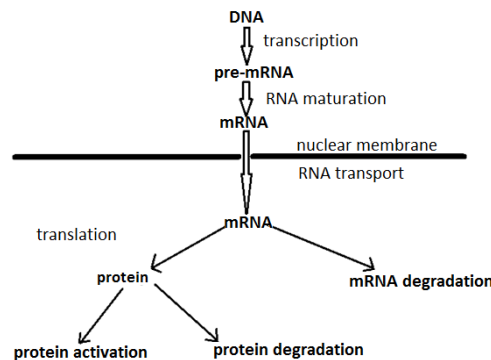
lyozása fontos a sejt sorsában és fejlődése során és hogy a sejtek megfelelő választ tudjanak adni a különböző környezeti hatásokra.

### Eukarióta és prokarióta sejtek: különbségek

Elnagyoltan azt lehet mondani, hogy a prokariótákban a gének általában expresszáltak (kifejeződnek) és a szabályozó mechanizmusok a gének kifejeződését gátolják (represszálják), míg az eukariótban éppen az ellenkezőjét tapasztalhatjuk. Az eukarióta szervezetekben a gének általában nem íródnak át (ez az alap állapot), a génexpresszió szabályozói főként a gének kifejeződését segítik különböző szinteken.

Ezek a különbségek főként azért alakultak ki, mert a prokarióták egysejtű szervezetek, minden kódolt sejtmechanizmusra egyetlen sejtben van szükség. Ezzel szemben a komplexebb többsejtű organizmusokban a sejtek megosztják a funkciókat, ezért van szükség génregulációra.

A prokarióta és eukarióta sejtek közötti különbségek miatt új módok nyílnak a génregulációban az eukariótáknál. A génexpresszió szabályozása a fehérjeszintézis minden szintjén működik a DNS-től az aktív fehérjéig.



Új lehetőségek az eukarióta génexpresszió szabályozásában:

A prokarióta szervezetek többsége nem rendelkezik hisztonokkal, így a kicsomagolódás új lehetőségeket nyújt a génexpresszió szabályozásában. Az eukarióta transzkripció és transláció külön térben zajlik, az mRNS szállítás újabb szabályozható lépés. A prokarióta gének operonokba rendeződnek, míg az eukarióta sejtek minden génjének saját promotere van. A prokarióták csupán egy, vagy néhány kromoszómával rendelkeznek, amelyen a gének nem rendelkeznek intronokkal (nem kódoló szakaszokkal), folytonosak, szemben az eukariótákkal, ahol fajspecifikus számú kromoszómákkal rendelkezünk, amik nem kódoló szakaszokat is tartalmaznak.

### Nukleoszóma struktúra és kromatin átrendezés/chromatin remodeling

A kromoszómák struktúrája befolyásolja a gének funkcionalitását az eukariótákban. A kondenzált kromatin struktúra megakadályozza a gének kifejeződését, mivel a transzkripciós faktorok, aktivátorok és RNS polimerázok nem férnek hozzá a DNS szálhoz. Helyi fellazulás szükséges a transzkripció megkezdése előtt.

### Kromatin struktúra, eukromatin, heterokromatin

*Lásd előadás diák! Lásd "DNS szerkezete, kromoszóma, kromatin, genom" fejezetben részletesebben!*

Míg a heterokromatin erősen kondenzált forma, az eukromatin lazán csomagolt kromatin struktúra. Az eukromatin régiók gazdagok génekben, sokszor aktív transzkripció alatt állnak. Az eukromatin és heterokromatin régiókat barrier szekvenciák választják el, amik a gének kifejeződésének folytatódását gátolják meg.

A hiszton oktamerek H2A, H2B, H3 és H4 hisztonokat tartalmaznak (mindegyikből 2). Ezek az oktamerek DNS szállal burkoltak (147 bp), a strukturát egy H1 hiszton stabilizálja. A hisztonok N terminális farkai kilógnak az oktamerből. Míg a DNS negatívan töltött, a hisztonfarkak alapvetően pozitív töltésűek, így elektrosztatikus kölcsönhatások stabilizálják, vagy destabilizálják a nukleoszóma szerkezetét.

### **Kromatin újrendező komplex: Chromatin remodeling complex (CRC)**

Az ATP-függő chromatin-remodeling complex a génexpresszió szabályozásában vesz részt azzal, hogy mozgatja, átalakítja a nukleoszómát, eltávolít belőle fehérjéket. ATP-t hidrolizálva nyer energiát a nukleoszóma átrendezésekhez a DNS mentén (csúsztat, csavar, hurkol), eltávolít hisztonokat, illetve kicserél különböző hiszton variánsokat, így hozva létre nukleoszóma-mentes régiókat a DNS mentén a transzkripcióhoz.

### **Hiszton módosítás**

#### **Kovalens módosítások**

A hisztonok N-terminális farkának kovalens módosításai a töltésmintázatot megváltoztatva befolyásolják a nukleoszóma stabilitását. Ezek a módosítások elsősorban acetilációt, metilációt, foszforilációt és ubikvitinációt jelentenek.

#### **Hiszton acetiláció**

Hiszton acetiltranszferáz enzimek (HAT) acetyl csoportot kötnek a hisztonokon (lizin aminos csoportokhoz). Az acetiláció a pozitív töltést csökkenti a hiszton farkakon, így a kromatin kondenzáltságát csökkenti. A gén kifejeződésének valószínűsége megnő, mivel a nukleoszóma zártsága fellazul, könnyebben alakít ki eukromatin strukturát. Az acetyl csoportokat deacetiláz enzimek távolítják el.

Néhány transzkripció faktor rendelkezik saját acetiltranszferáz aktivitással, míg mások acetiltranszferázokat képesek megkötni (pl. a CBP HAT enzimeket tud megkötni a promotereknél).

#### **Hiszton metiláció**

Hiszton metil-transzferázok (HMT) metil csoportot képesek kötni a hisztonfarkakra, általában a lizin amino csoportokhoz. (Típusosan a H3 hiszton 4. lizinjéhez, ennek rövidítése H3K3me3).

A metilált hisztonok transzkripció startpontjai közelében fordulnak elő nagyobb gyakorisággal. A módosítás gátolja a nukleoszóma relaxálódását, így hatva a géne expressziója ellen.

#### **Hiszton kód hipotézis**

A hiszton kód hipotézis szerint a hiszton kód a hisztonok kovalens módosításai által kialakított mintázat (például acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció, poliriboziláció), ami specifikus jelentéssel bír.

Az elmélet szerint a módosítások mintázata képes arra, hogy aktiválja, vagy gátolja a transzkripciót. Ezen a módon igazán kis változások hatalmas biológiai hatással rendelkeznek. A hiszton kód öröklő-

dik. A változások megváltoztatják a génexpressziót, azonban nem a gének által kódoltak. (Epigenetika)

### DNS metiláció

A magasabbrendű eukariótákban (mint az ember) a metiláció az egyetlen kovalens módosítás, ami közvetlenül a DNS szálát érinti. Ebben az esetben a citozin pirimidin gyűrűje metilálódik. A metil csoport szinte kizárólag a CpG dinukleotid szekvenciához kapcsolódik a szomatikus sejtekben.

A korai embrionális sejtekben számos metilálatlan CpG mellett metilált CpA dinukleotidot is találunk, melynek okai még ismeretlenek.

A metilált régiók kevésbé kifejeződő génekben találhatóak, a metiláció valószínűleg gátolja a transzkripciót.

Az inaktív X kromoszóma számtalan metilált CpG szigetet tartalmaz.

### Génexpresszió a transzkripció során

*Csak összefoglaló jellegű, több információért lásd: transzkripciós faktorok és transzkripció szabályozása című részeket!*

Az eukarióta RNS polimeráz II nem elegendő ahhoz, hogy önmaga megindítsa a transzkripciót, az iniciációhoz további fehérjék szükségesek, ezek az ún. Transzkripciós faktorok.

Létezik egy minimál eukarióta promóter, ami önmagában elég gyenge önállóan, így további aktivátorok szükségesek a transzkripcióhoz:

A minimál eukarióta promóterek (core promóterek):

- TATA box és iniciátor régió (INR), VAGY
- INR and DPE (downstream promoter element).

Az aktivátor szekvenciák megtalálhatóak a promotertől "felfelé", 5' irányban a TATA boxtól 100-200 bp távolságon belül:

- CAAT-box: az első ismert aktivátor szekvencia, non-specifikus, a promóter hatékonyságát növeli
- GC-box: GGGCGG szekvencia, gyakran több másolatban (fordított orientációban is hatásos)

A transzkripcióra ható szabályozó elemek két csoportját különítjük el:

1. Cisz-regulátor elemek: specifikus (nem-kódoló) DNS szekvenciák meghatározott helyeken, amik kizárólag közeli génekre hatnak
2. Transz-regulátor elemek: olyan DNS szekvenciák, amik transzkripciós faktorokat kódolnak, így távoli gének expressziójára is hatással lehetnek.

### Enhancerek

Az enhancerek olyan rövid DNS régiók (50-150 bp), amikfehérjéket képesek megkötni (transzkripciós faktorokat) és képesek megemelni a gének transzkripciójának szintjét.

Az enhancerek elsősorban cisz-hatású elemek, azonban előfordulhatnak mindhárom roientáciban:

- 5' irányba a géntől (a promotertől)

- A génben
- A gén után 3' irányban

A génektől távol (kilobázisokra) is képesek hatni, ellentétben a core promotertől, ami relatívan fix pozíciót foglal el a gén közelében. Szekvenciáik konzerváltak, hatásuk azonban független az orientációtól. Több szekvenciárészlet fontos, mint a core promoter szekvencia esetén.

### Silencerek

A silencer olyan DNS szekvenciák, amik represszorok (transzkripciós faktorok) megkötésére képesek. Amikor egy represszor kötődik a silencer régióhoz, az RNS polimeráz nem tud kapcsolódni a promoter régióra (ezzel blokkolja a transzkripciót), így ellentétben az enhancerekkel, a silencerek negatív hatással vannak a transzkripcióra.

### Transzkripciós faktorok

A transzkripciós faktorok olyan DNS kötő fehérjék, amik a gének szabályozásában vesznek részt. Aktivátor, vagy represszor funkcióval is rendelkezhetnek.

3 alapvető egység építi fel őket: DNS kötő domain (ez kötődik a specifikus DNS szekvenciához), transz-aktiváló domain (ez köt meg egyéb fehérjét, például koregulátorokat) és szignál-jelző domain (ez képes up-, vagy downregulálni a génexpressziót a külső szignálok szerint).

Néhány fontos transzkripciós faktor család a DNS kötő domain szerint:

#### Helix-turn-helix fehérjék

- 3 nagy  $\alpha$ -helikális régió (hélix) alakítja ki a kötő régiót, ezek kisebb, flexibilis (turn) régiókkal válnak el egymástól
- Fontosak az egyedfejlődés bizonyos szakaszaiban, mint homeotikus gének (más géneket szabályozva)

#### Cink-ujj fehérjék

- A DNS-kötő régió olyan hurkokat tartalmaz, amik egy kesztyű ujjaira hasonlítanak
- Dimerekként kapcsolódnak a felismerőhelyhez
- Ilyen fehérjerészletet tartalmaznak a szteroid receptorok is

#### Amfipatikus hélixfehérjék

- Nevüket a dimerizált domnjükről kapták
- A leucin cipzár ebbe a csoportba tartozik

### Intronok, splicing, alternatív splicing

Az aukarióta genomban a kódoló szakaszokat (gének) intronok szaktják meg, amik az mRNS érése során kivágódnak. Az mRNS éréshez szükségesek bizonyos konszenzus szekvenciák, például az 5' és 3' helyen és az elágazási pontoknál.

A prekursor mRNSből kialakulhatnak különböző variációk, ha több splicinghoz szükséges konszenzus szekvencia is található az adott szakaszon. A különböző variációk megjelenése az alternatív splicing. A folyamat szabályozott és azt eredményezi, hogy egyetlen gén többféle fehérjét is kódolhat. Néhány variáció abnormalisnak nevezhető és részt vehet betegségek kialakításában, például különböző típusú rákokban.

Az alternatív splicing során kivágódhatnak exon szekvenciák a pre-mRNSből, intronok maradhatnak a végleges szekvenciákban, vagy a meglévő exonok kombinálódhatnak különbözőképpen.

### RNS érés – degradációs szabályozás

Az mRNS degradációja ellen az eukariótákban érés zajlik: CAP-et és polyA-farkat kapnak.

Az mRNS koncentrációját a citoplazmában nem csak az befolyásolja, hogy milyen gyors annak szintézise, de az is, hogy mennyire stabil. A polA fark nélkül az mRNS gyorsan degradálódik. Speciális esetekben más faktorok is befolyásolják az mRNS stabilitását, például hormonok, kismolekulasúlyú komponensek, 3'-UTR (untranslated) szekvenciák.

### RNS érés – RNS editing

Az RNS érés során bizonyos nukleotidok másikké alakíthatók. A változás kihatással lehet az aminosavszekvenciára, új STOP kodon jöhet létre, vagy új hasító hely. Citidin (C) alakítható át uridinná (U) és adozin (A) inozinná (I).

#### Példák

*C->U*

Az Apo B100 és az Apo B48 ugyanarról a énről expresszálódik, azonban a belekben a gén mRNSe editingen megy keresztül, specifikus citidinek deaminálódnak, így egy CAA szekvencia UAA szekvenciává alakul, így kialakítva új STOP kodont. Így a gén rövidebbé válik.

*A->I*

Másik példa az adozin deaminációja, ami az RNS editing legfőbb folyamata az emlősökben. Az inozin képes guanozinként (G) viselkedni. Ez a konverzió lehet specifikus (csak adott adozin alakul át), vagy nem specifikus (ahol az A akár 50%-a is átalakulhat). A folyamat fontos a neuronokban.

Megjegyzés: Léteznek olyan kémiai ágensek, amik gátolják a translációt, például neomicin (antibiotikum), ricin (toxin), vagy cikloheximid (baktériumok által termelt fehérje).

### RNS interferencia

Az RNS interferencia egy olyan folyamat, ahol az átírt mRNS degradálódik szekvenspecifikus módon. Egy enzim és egy enzimkomplex szükséges a folyamathoz.

#### Dicer

A dicer egy enzim Rnáz III aktivitással, ami duplaszálú RNSeket képes felismerni és feldarabolja azokat kicsi (21-22 nukleotig hosszú) darabokra: siRNSt (small interfering RNA) létrehozva. Ezek a kis darabok kicsavarodnak, 2 részre válnak: egy vezető és egy követő RNS szárra. A követő szál degradálódik, a vezető szál pedig beépül az ún. RISC komplexbe.

A dicer egyik fele felismeri a duplaszálú RNSt, míg a másik darabolja azt. A két rész közötti távolság határozza meg az siRNS hosszát.

## RISC

Egy enzim komplex, az ún. RISC komplex (RNA-induced silencing complex), ahogy korábban olvasható volt, beépíti a dicer által felhasított siRNS vezető szálát. Ezt követően az RNSt is tartalmazó komplex képes megkötni olyan RNSeket, amik komplementerek a beéptett szállal. A RISC degradálja a megkötött RNS szálát. (A RISC nem degradál DNS szálát!)

## RNS interferencia a gyógyászatban

Képesek vagyunk gyártani duplaszálú RNSeket, így kiváltva az RNS interferencia jelenségét és a géncsendesítést. Létrehozhatjuk a folyamatot egy egyes szálú RNSsel, vagy speciális kis RNSekekkel, amik duplaszálú szakaszokat tartalmaznak, például small hairpin RNSt (shRNS), vagy microRNSt (miRNS). Ha ezek az RNSekek tartalmaznak komplementer szekvenciát egy kiválasztott célgénnel, az csendesíthető (expressziója csökkenthető) ilyen módon. Használhatjuk ezt a technikát abnormális szerkezetű fehérjék ellen neurodegeneratív betegségekben (az aggregátumok kilakulásának megelőzésére), vagy vírus fehérjék ellen is. (Minden vírus létrehoz RNSt valahol a szaporodása során (lásd vírusok lecke) így létrehozhatunk ezek ellen is antisense RNSekeket.)

## Fehérje degradáció és poszttranszlációs módosulások

A génexpresszió szabályozható akár a fehérjeszintézist követően is. A legtöbb fehérje átesik poszttranszlációs módosulásokon, hogy azok elérjék funkcionáló formájukat. Ezek nélkül a fehérje nem "hasznos".

Ha a fehérjére már nincs szükség, vagy sérült, a sejt megjelölheti azt egy hozzáadott ubiquitin molekulával, ami aktiválni fogja a fehérje degradációját.

Poszttranszlációs módosulások típusai:

- Foszforiláció
- Glikoziláció
- Ubiquitináció
- S-Nitroziláció
- Metiláció
- N-acetiláció
- Lipidáció

## 15. FEHÉRJÉK SEJTEN BELÜLI ELOSZTÁSA ÉS TRANSPORTJA

Két fő fehérje transzportáló útvonal létezik:

- a sejtől kifelé/sejtbe befelé
- a sejtben belül.

Minden fehérje a citoszolban a riboszómákon szintetizálódik. Ha a fehérje szekvenciája nem hordoz külön irányító jelet, akkor a citoszolban marad. Ha a fehérje tartalmaz **irányító (vagy jelző: szignál, vagy elosztó: sorting) szekvenciát**, akkor végső céljukhoz transzportálódnak, valamelyik sejtorganelumba: mitokondrium, sejtmag, peroxiszóma vagy endoplazmás retikulum (ER). Az ER-ba került fehérjék sorsa többféle lehet: maradhatnak az ER-ban, átkerülhetnek a Golgiba, a lizoszómákba transzportálódhatnak, membránba épülhetnek, vagy kikerülhetnek a sejtől (szekrécio). A megfelelő fehérjemozgáshoz a szignál szekvencia megléte **elengedhetetlen és elegendő**. Vannak fehérjék, amelyek több irányító szekvenciával is rendelkeznek. Az irányító szekvenciát felismerő receptor számára az irányító szekvencia térbeli szerkezete vagy fizikai tulajdonságai fontosabbak, mint az aktuális aminosav sorrend.

A **fehérjék mozgásai** lehetnek kapuzott (gated), transzmembrán, vagy vezikuláris transzport, lehet egy- vagy kétirányú. Valamennyi fehérjetranszport facilitált/receptor által mediált (közvetített), a felhasznált energia nem közvetlenül a transzportra irányul. A translációhoz való viszonyt és a transzportált (szállított) fehérje magasabb rendű szerkezetét tekintve a transzport lehet ko- vagy poszttranszlációs (transzláció folyamata alatti vagy utáni), és a szállított fehérje lehet folded (megfelelően csomagolt) vagy unfolded (nem csomagolt) állapotban. A szignál szekvencia a fehérjén maradhat a transzportot követően (sejtmagba – ingázó fehérjék), vagy lehasíthat a cél elérése után (mitokondrium, ER).

A sejtben belül minden transzmembrán fehérje mozgás **alap strukturális komponensekkel** rendelkezik: a fehérje irányító szekvenciája; a szekvenciára specifikus receptor; sejt organelumtól függő transzporter (translocon) (sejtmag, mitokondrium, peroxiszóma, ER). Fontos megjegyeznünk, hogy az intracelluláris vezikuláris transzportot megelőzően (lizoszómákba, sejtmembránba, Golgiba, szekréciohoz) a fehérjének először transzmembrán transzporttal az ER-ba kell jutnia.

### 15.1. NUKLEÁRIS FEHÉRJETRANSPORT

A nukleáris (sejtmagi) fehérjetranszport **fő jellemzői**: kétirányú; poszttranszlációs; a fehérjék csomagolódva (folded) szállítódnak; az irányító szekvencia nem hasad le (irányító szekvenciákra példák az előadásban); kapuzott. A fehérjék a nukleáris pórus komplexeken (NPC) keresztül szállítódnak (NPC szerkezetét lásd: Membránok). Kis molekulák passzívan át tudnak diffundálni a NPC-on. Nagy molekulák irányító szekvenciának kell lenni, amit specifikus import vagy export receptorok ismernek fel. Egyes molekulák oda-vissza ingáznak a citoplazma és a sejtmag között. A gén expresszió szabályozás egyik fajtája, amikor a fehérje módosítása a receptor számára elérhetővé teszi az irányító szekvenciát. Az RNS-es a sejtmagból a citoplazmába vándorolnak. Receptorok felismerhetik az RNS-t kötő fehérjéket, vagy specifikusan az RNS-eket (lásd: Transzkripció illetve Transzláció – riboszóma biogenezis).

A nukleáris fehérje transzport **alap komponensei**: fehérje a lokalizációs jellel (NLS: nuclear localisation signal – mag lokalizációs jel importhoz; NES: nuclear export signal – mag export jel a magból történő kiszállításra); Ran: kis GTP-kötő fehérje (GTP-kötött formában aktív); Ran-GAP: GTPase activating protein – GTPáz aktiváló fehérje a citoszolban (Ran-GTP-ből Ran-GDP képződése); Ran-GEF: guanine exchange factor – guanin kicserélő faktor a magban (Ran GTP kötött formáját hozza létre); NTF2: Ran-GDP visszaszállítása a magba. A GAP és GEF faktorok eltérő elhelyezkedése miatt a Ran-GTP koncentrációja sokkal magasabb a magban, mint a citoszolban.



Az NLS-t hordozó fehérjéket a citoszolban az **importin**, egy szolubilis NLS receptor köti meg. Az importin a NPC egyes komponenseit is felismeri és megköti, így a receptor-szállítandó fehérje komplexe a magba jut. Ebben a mozgásban a **nukleoporinok** FC (fenilalanin-glicin gazdag) régiói fontos szerepet játszanak (lásd: Nukleáris membrán). A sejtmagban a **Ran-GTP** magas koncentrációja az importin-fehérje komplex disszociációját idézi elő. Az importin Ran-GTP kötött formában a citoplazmába tér vissza, ahol a Ran-GAP hatására a GTP GDP-vé hidrolizál.

Az előzőkkel ellentétesen a magas nukleáris Ran-GTP koncentráció a fehérjék NES szekvenciájának és receptorának (**exportin**) asszociációját segíti elő, a Ran-GTP-vel komplexet alkotva a citoszolba transzportálódnak. A citoszolban a Ran-GAP a GTP hidrolízisét okozza, ennek hatására az exportin és az exportált fehérje leválik a komplexről. Az exportin visszatér a magba.

## 15.2. PEROXISZÓMÁLIS FEHÉRJE TRANSZPORT

A peroxiszómába történő fehérjetranszport hasonlít a nukleárishoz: a fehérjék poszttranszlációsán és csomagolódva vándorolnak. A fehérjék mozgása azonban itt csak egyirányú: a citoszolból (a szintézis helye) a végső célba (peroxiszóma). A két fő típusú **peroxiszómális targeting szekvenciát** (PTS1 és PTS2) különböző **receptorok** (Pex5p és Pex7p) ismerik fel, amelyek a peroxiszóma membránjában található lehorgonyzó komplexet is megkötik. A lehorgonyzó komplex egyéb asszociált membrán fehérjékkel (RING komplex) együtt segítik a fehérje transzlokációját a peroxiszómába. A folyamat végén a PTS receptorok visszatérnek a citoszolba.

## 15.3. MITOKONDRIÁLIS FEHÉRJE TRANSZLOKÁCIÓ

A mitokondriális fehérje transzport **fő jellemzői**: poszttranszlációs; a fehérje nem csomagolt (unfolded) állapotban transzlokálódik; az irányító szekvencia lehasadhat (matrixba) vagy nem hasad le (külső membránba történő vándorlás). A fehérjének több irányító szekvenciája is lehet, attól függően, hogy az organellumban végül hol fog elhelyezkedni (matrix, belső vagy külső membrán, intermembrán tér), és hogy milyen típusú a fehérje mozgása (lásd később).

A mitokondrium külső és belső membránjában több típusú transzlokáz komplex található, amelyek magukba foglalják az irányító szekvenciát felismerő receptort és a transzlokátort is. A legfontosabbak a **TOM** (translocase of the outer membrane: a külső membránban lévő transzlokáz) és **TIM** (inner membrane – belső membrán) **komplexek**. Más komplexeknek meghatározott szerepük van a fehérjék mozgásában: a SAM komplex segíti a fehérje megfelelő elhelyezkedését a külső membránban, míg az OXA komplex a mitokondriálisan szintetizált fehérjék belső membránba illesztését segíti. A citoszolból a fehérjék **csomagolás nélkül (unfolded)** transzportálódnak, citoszolikus saperonok (Hsp 70 család tagjai) segítik a fehérjét az unfolded konformáció megőrzésében. Ez a lépés, valamint a fehérje eleresztése a saperon által, akárcsak az irányító szekvencia membrán receptorral való megkötése az ATP hidrolízis energiáját igényli. Amint az irányító szekvencia átjut a TOM komplex transzlokátorán, a TIM komplexhez kötődik. A TIM komplexen való átjutás az elektron transzport rendszer által létrehozott membrán potenciált igényli a belső membrán két oldalán (lásd a biokémia tanulmányokban). A membrán potenciál a belső membrán mátrix felőli oldalán negatív töltést alakít ki, így a szignál szekvenciában található pozitív aminosav oldalláncok átjutását segíti. Amint a fehérje a mitokondriális mátrixba jut, a **szignál peptidáz** lehasítja az N-terminális irányító szekvenciát. A maradék polipeptid láncot a mitokondriális Hsp70 és Hsp60 saperon fehérjék kötik, ezzel biztosítva a fehérje végső konformációját. Ezek a lépések ATP hidrolízis energiáját igénylik.

**Összefoglalva:** a mitokondrium mátrixába irányuló fehérje transzport komponensei a következők: irányító szekvenciát hordozó fehérje; citoszolikus és mitokondriális saperonok; TOM és TIM komplexek receptorokkal és transzlokátorokkal; ATP energiája (csak indirekt módon); és membrán potenciál



jelenléte. A fehérjék irányítása a mitokondriális membránokba és az intermembrán térbe négy különböző mechanizmus révén történhet (részleteket lásd az előadás anyagban).

#### 15.4. FEHÉRJE TRANSZPORT AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUMBA (ER)

Ennek a transzport rendszernek a **fő jellemzői** a következők: ko-transzláció; a fehérjék unfolded állapotban vannak; egyirányú (kivétel, ha a fehérje nem csomagolódik megfelelően az ER-ban). A szállítandó fehérje az N-terminális végén irányító szekvenciát hordoz. Amint ez a szekvencia felismerhetővé válik, azonnal megköti a receptora, az **SRP (signal recognition particle – jel felismerő partikulum)**, egy GTP-kötő polipeptid-RNS komplex. Az irányító szekvencia és az SRP interakciója lelassítja a szállítandó fehérje transzlációját. Az SRP-fehérje-riboszóma komplex az SRP receptorhoz kapcsolódik, amely két alegységből álló, GTP-kötő fehérje az ER membránjába ágyazva. Az SRP receptor funkciója, hogy a szállítandó fehérjét a transzlokon (csatorna) fehérjéhez juttassa, míg az SRP és **SRP receptor** által kötött GTP molekulák GDP-re és foszfátra hidrolizálódnak, és az SRP komplexből való disszociációját idézik elő. Amint az irányító szekvencia és a transzlokon csatorna aminosav oldalláncai érintkezésbe lépnek egymással, a fehérje transzlokációja megkezdődik. Egy szignál peptidáz az ER lumenében lehasítja az irányító szekvenciát, a kész fehérje végül becsomagolódik, módosulásokon esik át, és a transzlációt végző riboszóma ledisszociál az ER membránról.

Azok a fehérjék, amelyek az **ER membránjába** lesznek illesztve, egy lehorgonyzást jelző szekvenciát hordoznak. Ez a szekvencia nem hasítódik le, és a transzlokon csatornában felismerésre kerül. A szintetizálódó fehérje transzlokációjának orientációját az érett fehérje membránban való elhelyezkedése determinálja (részleteket lásd az előadásban).

Az ER lumenében a fehérjék számos **poszttranszlációs módosuláson** eshetnek át, amibe beletartozik a folding, a diszulfid hidak kialakítása, glikolizáció (lásd: Fehérjék poszttranszlációs módosulásai). A módosult, csomagolódott fehérjék minőségi ellenőrzésen esnek át, és csak a megfelelően processzált fehérjék hagyhatják el az ER-t. A nem megfelelően csomagolódott vagy túl nagy mennyiségben szintetizált fehérjék egy úgy nevezett unfolded protein response (válasz) kialakulását idézik elő. Ebben az esetben a transzláció általában csökken, bár a saperonok mennyisége megnő, így próbálja a sejt korrigálni a hibát. Abban az esetben, ha a folding vagy a módosítások hibái nem javíthatók, a hibás fehérjék a citoszólba transzlokálódnak vissza, ahol a proteaszóma rendszer által lebontásra kerülnek (ERAD: ER-assisted degradation – ER által segített degradáció).

#### 15.5. ENDOMEMBRÁN RENDSZER, VEZIKULÁRIS TRANSZPORT

A **sejtmembrán** szemipermeábilis hártya, amely a hidrofób és kis molekulák számára (oxigén, széndioxid) szabadon átjárható, részlegesen a víz számára is, de átjárhatatlan ionok, poláros szerves molekulák és nagy molekulák (pl. fehérjék) számára. Ahogy láttuk, a fehérjék a sejtmagba a nukleáris pórus komplexeken át közlekednek, a mitokondriumba transzlokátorok, az ER-ba transzlokonok révén jutnak be. Ezek a mozgások mind receptorokat és specifikus irányító szekvenciákat használnak.

A fehérjék az endoplazmás retikulumból a Golgi rendszerbe és a lizoszómákba vezikulum segítségével jutnak el. Az exocitózis és az endocitózis is **vezikuláris transzport** révén zajlik. A vezikulumok lumenében található fehérjék vagy kikerülnek a sejtől (exocitózis) vagy az ER, a Golgi vagy a lizoszómák lumenébe transzportálódnak. A vezikulumok membránjában ülő fehérjék vagy a sejtmembránba kerülnek, vagy az endomembrán rendszer valamelyik komponensébe. Vezikuláris transzport révén nemcsak fehérjék szállítódnak, hanem membrán szakaszok is, így a transzport nem lehet egyirányú.

### A vezikulumok kialakulása

A vezikulum a **donor kompartmentről válik** le (lefűződés), és a recipiens (akceptor) kompartmenthez irányul és azzal fúzionál. A szállított fehérjék vagy a vezikulum lumenében vannak, általában a vezikulum membránjában ülő receptorhoz kötve, vagy a membránban helyezkednek el, és a recipiens (befogadó) membránban maradnak. Ez igaz az exocitotikus vezikulumokra is, amelyek esetében a membránban elhelyezkedő fehérjék végső célja a sejtmembrán, míg a lumenben szállított fehérjék szekretálódnak a sejtből. A **szekrétációs útvonal** lehetnek konstitutív (folyamatos kiválasztás – pl. az albumin szekréciója a májban) vagy szabályozott (a vezikulum fúziója specifikus jel hatására következik be – például az inzulin vagy a neurotranszmitterek kibocsátása). **Az endocitózis** útvonala a sejtmembránban indul, és az endoszómákon keresztül halad a lizoszóma felé.

Egy vezikulum komponensei a következők: coat („kabát”, burok) fehérjék – COPI, COPII, clathrin, adapter fehérjék (kapcsolat a burok és a receptor/szállított fehérjék között), szállított fehérjék (szolubilis vagy transmembrán). (A vezikulumok alkotóinak és szerkezetének részleteit lásd az előadásanyagban.)

Egy adott membránszakaszban a vezikulum képződéséhez a membrán **foszfolipid** szerkezete megváltozik. Ez a változás a membránhoz kötött GEF (GTP exchange factor – GTP kicserélő faktor) aktiválását idézi elő, amely faktor szubsztrátja egy szolubilis **kis GTPáz fehérje**. Ez a fehérje aktiválódik GTP kötésre és a membránhoz kapcsolódik. Ezen membránban történő változások hatására **adapter és burok fehérjék** gyűlnek az alakuló vezikulum (membrán görbülni kezd) területére a szállítandó fehérjékkel együtt. Amikor a vezikulum elnyeri végső alakját, elválik a donor membrántól – lefűződés (a vezikulum képződés többi részletét lásd az előadásanyagban).

### A vezikulum fúziója a célmembránnal

A vezikulum **mozgása** a cél membrán felé a burok fehérjék leválása után (ezek a fehérjék újra felhasználásra kerülnek) és a sejt mirotubuláris rendszerének segítségével történik. Különböző faktorok segítik a vezikulumnak megtalálni a megfelelő **fúziós helyet** a befogadó (recipiens) membránban: kis GTP-kötő fehérjék (Rab) a vezikulumhoz és/vagy a célmembránhoz kötődve; Rab effektor fehérjék (motor és pályvázó fehérjék); SNARE komplexek (v-vezikuláris, t-target).

#### Vezikuláris transzport lépései:

- A szállítandó fehérjék kiválasztása (membrán vagy szolubilis fehérjék).
- A vezikulum képződése és lefűződése.
- A burok fehérjék leválása és a vezikulum mozgása a sejtben.
- A cél membránhoz való kipányvázás, lehorgonyzás és fúzió a cél membránnal.
- A SNARE komplexek szétesése.

### A Golgi rendszer

A durva felszínű endoplazmás retikulumon szintetizálódó fehérjék ko-transzlációsan **lépnek be az ER**-ba. Az ER lumenében számos **módosulás** történik az újonnan szintetizálódó fehérjével: az irányító szekvencia lehasítása (szignál peptidáz); a fehérje glikolizációja (*N*-oligoszacharid transzferáz); másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulása és egyéb poszttranszlációs módosulások (saperonok, transzamidázok, PDI – protein diszulfid izomeráz). Természetesen nem minden módosulás történik minden fehérjével, csak azok, amelyekre a fehérje szekvenciája utasításokat hordoz.

További mozgással a fehérje a **Golgi rendszerbe** jut COPII burkolt vezikulumok által (a Golgi apparátus szerkezetét lásd az Endomembrán rendszer fejezetben). A Golgi rendszer számos enzimmel rendelkezik, amelyek a fehérjéken **további módosításokat** tudnak végrehajtani, elsősorban

oligoszacharid komplexek hozzáadását vagy eltávolítását végzik. A fehérjék közül azok, amelyeknek a Golgi rendszer a végcélja, ott maradnak, de vannak olyan proteinek, amelyek COPI burkolt vezikulumok segítségével visszavándorolnak az ER-ba. Ezeknek a fehérjéknek egy része véletlenül került a Golgi apparátusba; más fehérjék módosulásokon estek át a Golgi rendszerben és vissza kell jutniuk végső helyükre (az ER-ba való visszaszállítás részleteit lásd az előadásanyagban).

A fehérjék zöme a *transz*-Golgi hálózatból (TGN: transz Golgi network) **osztályozás után elvándorol**: visszafelé a Golgi rendszerben; a lizoszómákba; a sejtmembránba. Az osztályozás alapját képező jel lehet valamely poszttranszlációs módosulás, fehérje aggregáció vagy a TGN membránban lipid raftok jelenléte. A sejtől szekretált fehérjék a sejtet exocitózis útján hagyják el.

### Endocitózis

Az endocitózis folyamatának **több funkciója** is van: egyes esszenciális anyagok felvétele (pl. vas), a sejt környezetéből káros vagy toxikus anyagok eltávolítása, a sejt szükségleteinek megfelelően a sejt felszínének megváltoztatása. A szállítandó anyag receptorhoz kötődik, majd adapter fehérjék és **clathrin** segítségével vezikulum képződik. A burokfehérjék leválása után a vezikulum endoszómával fuzionál. A membrán receptorok megemésztődhetnek, vagy újra felhasználásra kerülnek. A szállított molekula és a receptor elválasztása az endoszómában, annak alacsony pH-jú bennékében történik. Az endoszóma lumenének pH-ja változik, ennek alapján különböztetünk meg **korai, késő endoszómákat és lizoszómákat**.

A lizoszómák nagyszámú savi hidroláz enzimet tartalmaznak, amelyek szinte bármilyen komplex molekula megemésztésére képesek. Fontos tudni, hogy ezek a specifikus enzimek az ER-ból transzportálódnak a lizoszómába. Ezeknek a fehérjéknek az irányító szekvenciája egy specifikus **mannóz -6-foszfát (M6P)** csoport, amely a Golgi rendszerben szintetizálódik, receptor által kötődik és clathrin burkolt vezikulumok révén a lizoszómákba transzportálódik.



## 16. VÍRUSOK

### 16.1. FELFEDEZÉS

A „vírus” szó latin eredetű, azt jelenti: mérge. 1982-ben Dimitry Ivanovsky bizonyította kísérletes úton Dohány Mozaik Vírussal, hogy a vírusok nem mérgek, hanem valamilyen baktériumnál kisebb fertőző ágensek.

1899-ben Martinus Beijerinck úgy írta le a vírusokat, mint „*olyan kórokozók, amik átjutnak a baktérium-szűrőn*”

Végül a vírusok akkor lettek pontosan leírva és jellemezve, mikor felfedezték az elektronmikroszkópot.

1953-ban Salvador Luria és kollégái azt írták, hogy „*a vírusok olyan organizmusok, amelyek mikroszkóppal nem láthatók, élő sejtet fertőzni és abban reprodukálódni képesek.*”

1967-ben Luria és Jim Darnell azt jegyezték fel, hogy „*a vírusok olyan szervezetek, amelyek nukleinsavval rendelkeznek (DNS-sel, vagy RNS-sel), replikálódni képesek élő sejtekben, közvetlenül felhasználva annak folyamatait saját partikuláik felépítésére, ami szintén tartalmazza a virális genomot és így fertőzhet meg egy másik sejtet.*”

### 16.2. TULAJDONSÁGOK

Élő, vagy élettelen? Folyamatos és visszatérő kérdés a vírusok kapcsán, mivel gyakorlatilag „csupán” nukleoproteidok (nukleinsav+fehérje) és a gazdasejt nélkül nem képesek szaporodni. A vírusok nem rendelkeznek saját riboszómákkal: így nem képesek replikálni magukat, szükségük van a gazdasejtre ezekhez a folyamatokhoz, ezért a vírusok intracelluláris parazitaként foghatók fel.

A vírusok átlagos mérete 20-300 nanométer (nm) közötti: a legkisebb ismert vírusok a Parvovírusok (20 nm), a legnagyobbak a Poxvírusok (400 nm). A Filovírusok hossza eléri a 10.000 nm-t, azonban átmérőjük ehhez a hosszhoz csak 80 nm. A vírusok általában haploid (n) genomot tartalmaznak, ez alól kivételt képeznek a Retrovírusok, amik diploidok (2n). A nukleinsavtartalom lehet cirkuláris, vagy lineáris is. A nukleinsav lehet szegmentált, azaz jelen lehet feldarabolva is a vírusban, szegmentáltan tartalmazza például RNS genomját az Influenza vírus: 8 darabban.

Minden vírus kizárólag egy típusú nukleinsavat tartalmaz, azonban annak bármelyik típusát megtalálhatjuk a vírusokban: (ds=double stranded=duplaszálú; ss=single stranded=egyszálú; RT=reverz transzkriptáz):

- dsDNS: pl. Herpeszvírusok, Poxvírusok, Adenovírusok
- ssDNS: pl. Parvovírusok, Cirkovírusok
- dsRNS: pl. Reovírusok
- (+) ssRNS: pl. Enterovírusok, Rhinovírusok, Hepatovírusok, Cardio vírusok
- (-) ssRNS: pl. Paramyxovírusok, Rhabdovírusok, Filovírusok, Delta vírus, Bunyavírus, Hantavírus, Influenza A, B, C
- ssRNS (retroviruses=RT)
- dsRNS RT

A virális genom mérete hozzávetőlegesen 100-1000 kb. A legkisebb genommal az MS2 bakteriofágok rendelkeznek, mindössze 4 kb-on 4 gént kódolnak. A vírusoknak kétirányú promóterük is lehet (pl. Geminivírusok), így mind az 5'-3' irány, mind a 3'-5' irány is értelmes, olvasható lehet.

A duplaszálú DNS-sel rendelkező vírusok genomja is lehet lineáris (Adenovírusok, Herpeszvírusok és számos fág), vagy cirkuláris (Baculovírusok, Papovavírusok).

### 16.3. FELÉPÍTÉS

A vírusokat elektronmikroszkóp alatt, legalább 1000x-es nagyításon tudjuk vizsgálni.

3 részük:

- **Core:** nukleinsav mag: tartalmaz egyféle aminosavat
- **Kapszid:** tok
  - 2 része:
    - Nukleokapszid: a maghoz szorosan kapcsolódik
    - Külső tok homológ fehérje-építőkövekből
- **Burok (=envelop, peplon):**
  - Lipidek (a gazdasejtől)
  - Fehérjék (a vírustól)

A kapszidot kapszomer alegységek (monomerek) építik fel, ami a vírus fehérje köpenye. Ez a kapszomer nukleinsavval együtt alkotja a nukleokapszidot. A vírusok rendelkezhetnek burokkal (=peplonnal), azonban nem mindig, ez a peplon egy kettős foszfolipid membrán, ami a gazdasejtől származik. A kettős membránra virális fehérjék kapcsolódhatnak.

### 16.4. CSOPORTOSÍTÁSUK

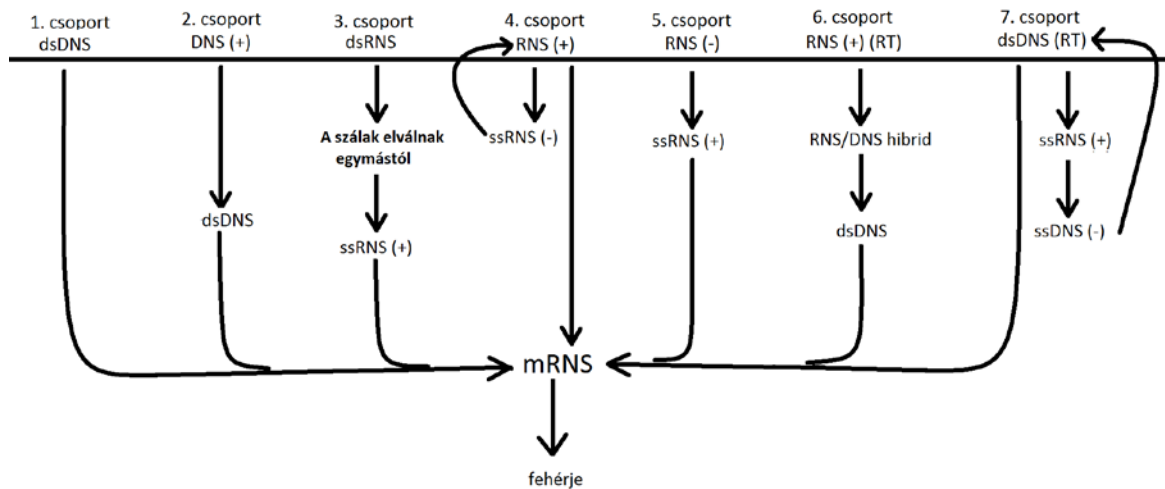
1. A vírusok életformája szerint:
  - a) **Virion:** a vírusok extracelluláris (sejten kívüli) életformája. Ebben a fázisban a vírusok nem mutatnak „életjeleket”. Megfelelő körülmények közé kerülve fertőzőképességük visszatér.
  - b) **Vegetatív vírus:** a vírusok intracelluláris életformája, a gazdasejten belül. Ebben a fázisban a vírusok képesek a szaporodásra, ekkor tekintünk rájuk „élőként”.
  - c) **Provírus = integrálódott vírus:** akkor jön létre, ha a vírus DNS-e (vagy genomjának DNS átírat) beépül a gazdasejt genomjába. Nem minden vírus képes erre, kizárólag a retrovírusok. (Bakteriofágok esetén a beintegrálódott bakteriofágot profágoknak nevezük.)

A nukleinsav típusa szerint:

Baltimore osztályozás

1. csoport: dsDNS vírusok
2. csoport: ssDNS vírusok: pozitív szál (=sense=vezető szál)
3. csoport: dsRNS vírusok
4. csoport: (+)ssRNS vírusok: pozitív szál (=sense)
5. csoport: (-)ssRNS vírusok: negatív szál (=antisense)
6. csoport: ssRNS-RT vírusok: pozitív RNS szál, DNS intermedierrel az életciklus során: Retrovírusok

## Baltimore csoportosítás



## 2. Szimmetria szerint

A különböző formákat a vírusok virion állapotai közben tudjuk megkülönböztetni.

## a) Helikális: altípusai:

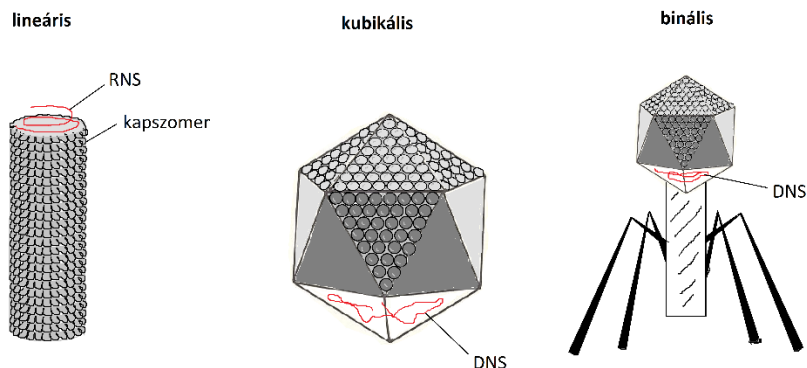
- Pálcika alakú: pl.: Dohány Mozaik Vírus (TMV)
- Lövedék formájú: pl.: Lyssavírus
- Fonalszerű: pl.: Filovírus

b) **Kubikális, vagy ikozahedrális:** pl.: Herpeszvírusok, Adenovírusok

20 egyenlő oldalú háromszög alkotja: 30 éle és 12 csúcsa van, a háromszögek csúcsain lévő alegységeket pentamerek, a lapjain lévőket hexamereknek nevezzük, ezeket 5, illetve 6 szomszédos kapszomer veszi körül.

c) **Binális:** pl.: Bakteriofágok

A helikális és a kubikális szimmetria kombinálódása révén jön létre: a feji rész kubikális, a farki rész helikális..

d) **Pleomorf:** a vírus körül egy kettős foszfolipid membránból és a hozzá kapcsolódó fehérjékből álló burok található.e) **Komplex:** azok a vírusok, amik egyik feljebb felsorolt csoportba sem tartoznak, ide sorolhatók. Pl.: Poxvírusok ( a Poxvírusok tojásdad formájúak, himlőt okozhatnak), ide sorolják a HIV-et is.

## 3. A gazdaszervezet szerint

## a) Növényfertőző vírusok: Dohány Mozaik Vírus (TMV), Karfiol Mozaik Vírus (CMV)

## b) Bakteriofágok: T2 bakteriofág, T4 fág, P1 fág, P22 fág

c) Állatokat (és embereket) fertőző vírusok: Varicella, Rubella, száj és körömfájás

## 16.5. FERTŐZÉS ÉS REPRODUKCIÓ

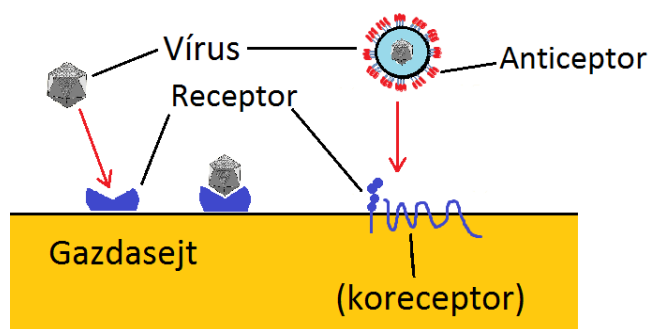
Nagy különbségek vannak a vírusok között fertőzés és reprodukció tekintetében, azonban van néhány olyan jellemző fő lépés, ami a legtöbb vírusra jellemző.

### Adszorpció

A vírusok adszorpciója többféleképpen történhet:

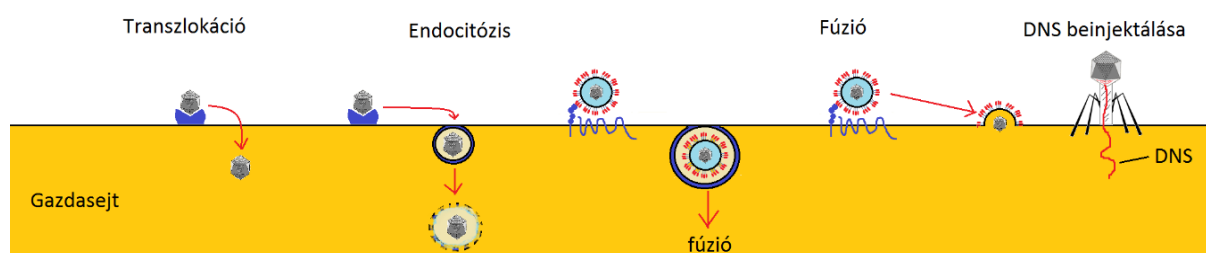
- Ionos kapcsolattal: duplán pozitív ionok (pl.:  $Mg^{2+}$ ) szükségesek hozzá
- Receptor-anticeptor kötődés: a vírus a gazdasejt receptorára kötődik a saját anticeptorával

A receptor változása meggátolhatja a kötődést (pl.: CCR5 (a CD4 koreceptorra a T- helpereken) HIV „rezisztenciát” alakíthat ki.)



### Penetráció

A vírus ebben a fázisban jut át a membránra. Az átjutás módja lehet **transzlokáció**, **endocitózis**, vagy **fúzió** a vírus burka és a gazdasejt plazmamembránja között.



### Dekapszidáció (ha szükséges)

A dekapzidáció a kapszid leválásának folyamata. Ez is többféleképpen mehet végbe. A kapszid kapcsolódhat a penetráció során, de akár a vírusgenom is maradhat és elkísérheti azt a mag membránjáig, ahol segíthet a nukleinsavnak átjutni a nukleáris pórusokon és csak ezt követően degradálódik. Vannak olyan esetek, amikor a kapszid egy része kapcsolódik le (pl. Reovírusok) és néhány esetben enzimek emésztik le a kapszidot (pl. Poxvírusok).



## Vírusszintézis

### A nukleinsav átírása

Ebben a fázisban megtörténik a nukleinsav replikálódása: mindegyik nukleinsav saját típusa szerint (ssDNS, ssRNS, ...)

### mRNS átírása

„mRNS” szintézise a virális genomról. (Valójában mRNS-ként viselkedni képes RNS átírásáról van szó, lásd a képet a Baltimore osztályozásnál.)

### Transzláció

Elsőként az ún. „korai fehérjék” átírása történik, amik fontosak a reprodukcióban. Ezeket követik a „késői fehérjék”, amik főként struktur fehérjék. Ezek mennyisége is jóval nagyobb, mint a korai fehérjéké.

### Összeszerelődés/Összeépülés

A nukleinsav replikációját és a strukturális fehérjék expresszióját követően a vírusrészecskék összeszerelődnek. Ha több vírus fertőz egy adott sejtet, előfordulhat, hogy a vírus nukleinsavtartalma nem a megfelelő kapszidba csomagolódik. (Ha a genom nem szegmentált és a teljes genom csomagolódott be rosszul, a leszármazottak ismét a régi kapszidot fogják előállítani, így nincs hosszútávú változást.)

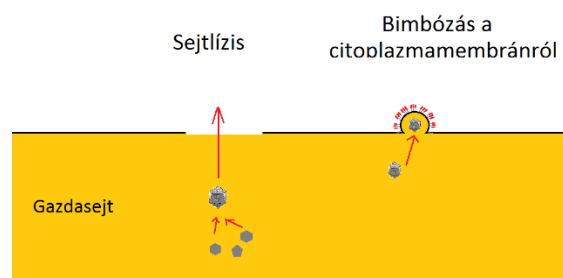
A kubikális vírusok esetén a kapszidok összeszerelődnek üresen (nukleinsav nélkül), mivel a nukleinsav nem vesz részt annak felépítésében, csak ezt követően csomagolódik a kapszidba.

A helikális vírusoknál ezzel szemben a nukleinsav és a kapszomer együtt alakítja ki spontán módon a viriont, így a helikális vírusok nem képesek létrehozni üres kapszidokat.

### Kiszabadulás

A köpeny, vagy peplon megléte, típusa szerint többféleképpen szabadulhatnak ki a vírusok a gazdasejtből.

- Vírusok peplon nélkül: a sejt lizál, így a vírusok kijutnak
- Vírusok peplonnal: bimbózással: a peplomerek a sejtmembránba épülnek, a nukleokapszid ehhez kapcsolódik, majd lefűződve jutnak ki a kész vírusok: ez a típus nem okozza a sejt lízisét.
- Herpeszvírusok: kivételt alkotnak, a nukleokapszid a magban épül fel, az érés és a peplonképződés a belső magmembránon történik, innen lefűződik és a citoplazma-retikulumba kerülve fűződik le, így kerül ki a környezetbe.



## 16.6. NÉHÁNY GYÓGYÁSZATBAN FONTOS VÍRUS

### Onkogén vírusok

Ritkán esik szó az onkogén vírusokról, pedig nagy szerepük van a különböző rákos, rosszindulatú daganatos megbetegedésekben. Néhány kutató azt vallja, a tumorok akár 40%-át is vírusok okozhatják.

Az első bizonyítékok a humán vírusok és a rák kapcsolatára a Denis Burkitt, brit sebészről 1956-58 között elnevezett Burkitt limfóma kapcsán kerültek elő. A főként afrikai gyermekeket érintő, igen rosszindulatú, elsősorban a fej-nyak területén előforduló, a nyiroksejtekből kiinduló daganat vírusos eredetét Sir Michael Anthony Epstein és Yvonne M. Barr igazolták 1964-ben, vizsgálatikkal azt találták, hogy egy Herpesz vírus alakítja ki a betegséget. A vírust később a ké kutatóról nevezték el.

Ma szélesebb körben ismert rákkeltő vírusok:

- A Hepatitis B és C májrákot indukálhat;
- Az Epstein-Barr vírus vér- és nyirokdaganatok képzésében vehet részt
- A Human Papilloma Vírus Merkel-sejtes bőrrákot alakíthat ki
- Az XMRV prosztaták kialakításában játszik szerepet
- Ismerünk rákkeltő retrovírusokat is: pl.: HTLV-1, ami felnőttekben alakíthat ki T-sejtes limfómát.

A Hepatitis B-vel történt kísérletek megváltoztatták az orvosi eszközök fertőtlenítését: kiderült, hogy vírus sokkal rezisztensebb a hővel és fertőtlenítőszerrel szemben és könnyen terjed akár tűkkel is sebészeti beavatkozásoknál, drogfüggők között, vagy tetoválásokon.

### AIDS

AIDS=Acquired Immune Deficiency Syndrome=szerzett immunhiányos tünetegyüttes, amit a HIV vírus alakít ki (=Human Immunodeficiency Virus=emberi immunhiány vírus)

1981-ben azonosították, a betegség azonban már jóval korábban ismert volt. A HIV retrovírus, így élethosszig tartó fertőzést alakít ki. 100%-ban halálos.

A virion átmérője 100 nm, komplex szimmetriájú. Genomja pozitív szálú egyszálú RNS, 9200 bp hosszú, a virális géneket 3 csoportban tartalmazza. Elsősorban a T-limfocitákat támadja, a CD4 receptorra kötődik, illetve annak 2 koreceptorához képes kötődni: a CCR5 és a CXCR4 koreceptorokhoz. Elsősorban a CCR5 koreceptorhoz kötődnek, csak speciális törzsek kötődnek a CXCR4 koreceptorhoz (X4 vírus). A fertőzés inkubációs ideje általában 5 év, néha több. A fertőzött, de tünetmentes emberek ez alatt az inkubációs időszak alatt is képesek fertőzni.

Jelenleg nincs gyógymód, de antivirális szerekkel drasztikusan le lehet csökkenteni a tünetek és a betegség kifejedését.

Mutáció megvédhet a HIV fertőzésétől, delta 32 mutációnak hívják. Ez a mutáció a CCR5 koreceptor kódoló génben található, meggátolja a vírus kötődését az anticeptorával (a koreceptor hiányozni fog). A mutációsráta 0,2-11% között változik a kaukázusi populációban és csak 2% az afrikai populációban.

A vírus szülés közben, vagy akár szoptatás alatt is megfertőzheti a csecsemőt.

## Influenza vírus

Az influenzának 3 típusát ismerjük: A, B és C.

Genomja szegmentált, negatív szálú, egyszálú RNS, 8 darabból=szegmensből áll.

Rendelkezik lipid envelppal, ebből neuraminidáz (NA) és haemagglutinin (HA) glikoproteinek lódnak ki. (Ezt a két anyagot ismeri fel a gazda immunrendszere, ezért fontosak a vakcinagyártásban.) Csoportosíthatjuk és elnevezhetjük a törzseket ezek alapján a molekulák alapján: a hemagglutininnak 16 altípusa van (H1-H16), míg a neuraminidáznak 9 (N1-N9). Például a H1N1 azt jelenti, hogy a vírus a H1 típusú hemagglutinint és az N1 típusú neuraminidázt tartalmazza.

Ha a felszíni glikoproteinek változnak, az immunrendszer nem ismeri már fel őket: ezért kell mindig új vakcinákat készítenünk és ezen molekulák fontossága miatt nevezzük el a vírusokat a glikoproteintartalom leírásával.

Új vírusok létrejöhetnek pontmutációk révén (antigén drift), vagy több vírus egyidejű fertőzése során rekombinálódva (antigén shift – a szegmentált genom keveredhet a részek összeszerelődése közben, így új variációk jöhetnek létre).

A 2009-es pandémiás H1N1 vírus sertés-, madár-, és emberi vírusból is tartalmazott szegmenteket (antigén shifttel keletkezett).

## Bárányhimlő

A betegséget kialakító vírus neve Varicella simplex vagy Varicella-zoster vírus (VZV vagy HHV-3). Besorolását tekintve egy Herpes vírus. Egyszer tud fertőzni, de előtörhet és övsömört alakíthat ki a következő alkalommal. Ma már létezik ellene vakcina, amit akár felnőttek is kaphatnak. A vakcinát 1988-ban fejlesztették ki Japánban, Magyarországon 1998 óta használjuk, így a lakosság nagy része még nem kapta meg. A vakcina élő attenuált (legyengített) vírus.

Fontos! Bárányhimlő esetén nem ajánlott az aszpirin-tartalmú szerek használata 18 éves kor alatt, mivel ez megnövelheti a Reye szindróma esélyét (ez egy életveszélyes állapot, amely során gyulladás és duzzanat alakul ki az agyban, mindemellett májbetegséget is okoz).

## 16.7. 7. VÉDEKEZÉS: VACCINÁCIÓ, GYÓGYSZEREK, TERMÉSZETES VÉDELEM

### Variolizáció

Variolisation or variolation

A immunizálás története messze nyúlik vissza a történelemben: az első lejegyzett variolizáció az 1. századi Kínában volt. Bárányhimlő leszáradt, kiszáritott pörkeit szívták fel az orrukba. A módszer igen sokáig volt használatban, még Európába is eljutott. Az Egyesült Államokban 1790-ben írták le a technikát.

Edward Jennert tekintjük a variolizáció atyjának, ő fedezte fel, hogy a tehénhimlő védettséget alakít ki a feketehimlő ellen is. A „vakcina” szó ezekből a kísérletekből ered, azt jelenti: tehénből való. Jenner felfedezte, hogy azok az emberek, akik áttestek a tehénhimlőn (fejőasszonyok), immunissá váltak a feketehimlő ellen is. A felfedezése után egy szolgájának 8 éves gyerekén, James Phippsen tesztelte az elméletet. (Működött, a diú nem betegedett le a feketehimlőtől.) Ezt követően Jenner több gyereken is elvégezte a tesztet, beleértve a saját 11 hónapos fiát is. Jenner saját magát is tesztelte.

Vírusellenes vakcinák típusai:

- Élő attenuált=legyengített vakcina (LAV) (pl.: polio, sárgaláz, bárányhimlő): betegségkókozó, patogén vírus gyengített változata. Nem alakítanak ki betegséget, vagy csak nagyon enyhe formában.
- Inaktivált/elölt vírus vakcina (pl.: influenza, kolera, Hepatitis A és B): kémiai, vagy fizikai úton elpusztított vírusokat tartalmaz, pl. formaldehiddel kezelt vírusszuszpenzió (a kész vakcina csak nyomokban tartalmaz formaldehidet). Ezek a vakcinák nem képesek betegség kialakítására, így biztonságosabbak és stabilabbak, mint az élő attenuált vakcinák, de kisebb immunválaszt generálnak, mint az élő vakcinák.
- Alegység vakcinák: a vírusproteinek egy alegységét tartalmazzák, amik ki lettek vonva és finomímitották pket, vagy rekombináns technikákkal termelték őket (amiket genetikailag módosított organizmusok állítottak elő). Az alegységvakcinák gyengén immunizálnak, azonban sok esetben ez a legbiztonságosabb megoldás.

**Védekezés gyógyszerekkel**

Mivel a vírusok nem rendelkeznek saját metabolizmussal, nem vesznek fel a környezetből más anyagokat (pl. gyógyszereket, antibiotikumokat, vagy más anyagokat), ezért sokáig nem volt hatékony gyógyszer, amivel a vírusok ellen harcolhattunk volna. Ma már számos antivirális készítmény létezik és számuk folyamatosan nő. A legszélesebb körben használt szer az acyclovir: ami egy szelektív antivirális szer, ami csak a fertőzött sejtekben aktiválódik, annak virálimidin kináz (TK) enzime által, foszforiláció során.

Néhány ma használatos antivirális szer: acyclovir (pl.: Virokill, Herpesin, Aciclosan, Virolex, Zovirax, Ciklovir, Telviran, Aciclovir AL), ribavirin (Rebetol, Virazole), ganciclovir (Cymevene), famciclovir (Famvir), valacyclovir (Valtrex), valganciclovir (Valcyte), foscarnet (Foscavir), ritonavir (Norvir), didanosine (Videx), stavudine (Zerit), lamivudine (Zeffix), zanamivir (Relenza Rotadisk), oseltamivir (Tamiflu), nevirapine (Viramun), inosine, pranobex, isoprinosine, indinavir (Crixivan), emtricitabine (Emtriva)

A vírusok ellen interferonokat használunk még: a XX. Század második fele óta folyamatosan folynak kísérletek a szerrel, de komoly mellékhatásai vannak. (Interferonokat a szervezet magától is termel a fertőzött sejtekben, hogy a környező sejtek fertőzését meggátolja.)

**16.8. 9. A VÍRUSOK GENETIKAI HASZNA**

„Vektorok”, ami azt jelenti, hogy génekbeszítő organizmusok. Számos vírust használunk gének bevitelére egy célsejtbe. Használhatunk a genomba beépülő retrovírusokat is, de más virális vektorok is elterjedtek. A virális genomot specifikus endonukleázokkal hasítjuk (minden restriktív endonukleáz specifikus DNS szekvenciáknál hasít), majd ligázok segítségével a számunkra fontos géneket inszertáljuk a genomba.

Természetes genetikai mérnökök:

- **SV40 vírus vektor** (Simian vacuolating virus 40): 5243 bp, cikluláris DNS genommal rendelkezik.
- **Adenovírusok:** nagyon enyhe lefolyású betegséget okoz emberekben, így biztonságosnak mondhatóak. (1999-ben egy 18 éves fiú meghalt egy adenovírus fertőzésbe a génterápiája során. Ez az egyetlen máig igazolt haláleset a génterápiá történetében.) Az adenovírusok nem integrálódnak a genomba, de magasabb expressziót biztosítanak a bevitt géneknek, ezért kedvelt eszköze a humán génterápiáknak.
- **Vaccinia=tehénhimlő vírus:** relatívan nagy DNS régiót képes a gazdasejtbe juttatni.

- **Különböző retrovírusok:** A szaporodó sejteket gyakorlatilag 100%-os hatékonysággal képesek fertőzni. Beintegrálódnak a gazdasejt genomjába.

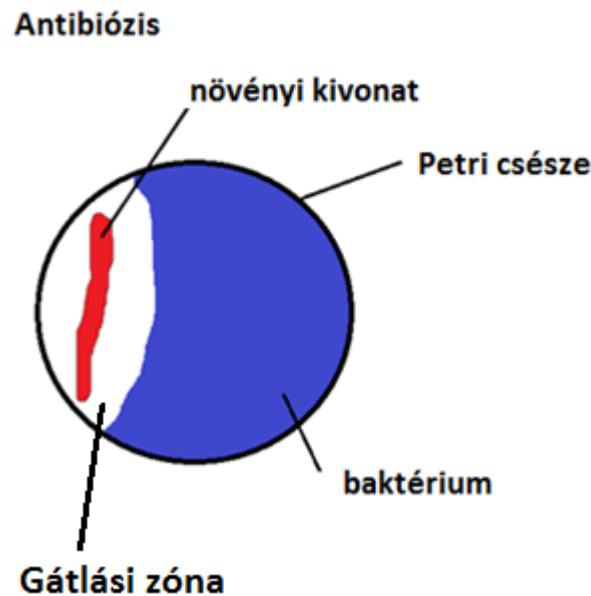
Általánosságban megállapítható, hogy a DNS vírusok nagyobb DNS darabot képesek bevinni a sejtbe, azok a gazdasejt citoplazmájában, a kromoszómáktól távol, episzómként fognak replikálódni, teljesen függetlenül a kromoszómáktól, vagy a sejtmagtól. Kizárólag néhány vírus képes integrálódni a gazdasejt genomjába, ezek a retrovírusok.



## 17. ANTIBIOTIKUMOK

### 17.1. ANTIBIÓZIS

Egy olyan biológiai interakció két, vagy több mikroorganizmus között, ami legalább az egyik fél számára kedvezőtlen; **ez az antagonista kapcsolat létrejöhet például egy organizmus és egy másik orgnizmus anyagcsereterméke között.** A jelenség megfigyelhető növényeknél, gombáknál, baktériumoknál, algáknál és koralloknál. (Ugyanezt a jelenséget láthatjuk antibiotikumok és baktériumok között is.)



### 17.2. ANTIBIOTIKUMOK

*W. Pschyrembel* német nyelven íródott „*Klinikai Szótár*”-a alapján: „gyűjtőfogalom, penészgombák, *Streptomyces* vagy baktériumok anyagcseretermékei, és ezek félszintetikus származékai (...) amelyek gátolják a vírusok, baktériumok, gombák, protozoonok és esetenként a testi sejtek szaporodását, vagy ezeket el is pusztítják. Szűkebb orvosi értelemben azonban csak azokat a hatóanyagokat nevezzük antibiotikumoknak, amelyek baktériumok ellen hatnak, és amelyek vírusok és gombák ellen általában hatástalanok.”

Ma már az antibiotikum szót csak anti-bakteriális szerekre használjuk, valamint a teljesen szintetikus termékeket is ide soroljuk (azokat korábban külön kategóriaként, kemoterapeutikumként tartották számon). A vírusokkal szemben hatásos gyógyszereket antivirálisnak, a gombák ellen hatásos gyógyszereket antimikotikumnak nevezzük. A fertőtlenítő szereket nem soroljuk az antibiotikumok közé!

### 17.3. RÖVID TÖRTÉNET – A TERÁPIÁS ANTIBIOTIKUMOK FELFEDEZÉSÉNEK NÉHÁNY FONTOS ÁLLOMÁSA

Már korábban is ismert volt több olyan növényi anyag a népi gyógyászatban, ami baktériumok ellen hatásos volt fertőzések esetén (pl. kamilla).

Sir Alexander Fleminget tartjuk számon, mint az első antibiotikum felfedezőjét (1945-ben munkájáért Nobel díjat kapott Ernst Boris Chainnel és Sir Howard Walter Floreyval), azonban nem ő volt

az első, aki leírta az antibiózis jelenségét, sőt, a penészgombák baktériumellenes hatékonyságát sem ő jegyezte le először.

A kalsszikus antibiotikumok (amiket gombákból és baktériumokból állítunk elő) sem olyan újak, már négyezer évvel ezelőttről is vannak feljegyzések Kínából, hogy penészes szójababot használtak bőrfertőzések kezelésére. Az amerikai indiánok penészes kukoricából készítettek pasztát hasonló célokra.

1867-ben Joseph Lister antiszeptikus karbolsavas sprayt ajánlott sebész kollégáinak. Sokáig ez a karbolsavas oldat állt az antibakteriális kutatások központjában.

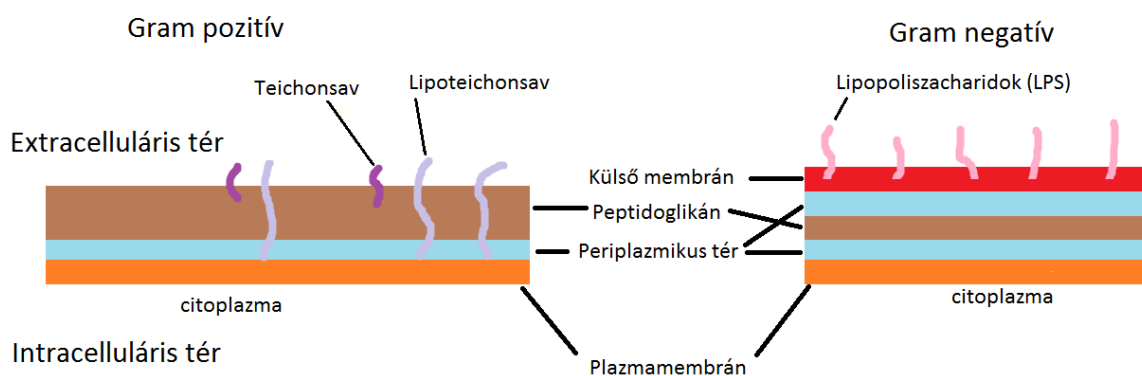
Robert Koch írta le a mikroorganizmusok tenyésztésének módját: ő használt először alga kivonatot (agart). Rendszerezte és csoportokba rendezte az általa tenyésztett baktériumokat (amiket különböző szövetmintákból, vérmintákból, vizeletmintákból, nyálból tudott kitenyészteni). Felfedezte, hogy a baktériumok képesek olyan anyagok előállítására, amik más baktériumok növekedését gátolni képesek. (Emlékeztető: ez az antibiózis jelensége.)

John Tindall 1875-ben leírta néhány gomba anti-bakteriális hatását.

1880-ban Paul Ehrlich (aki a hízósejteket is felfedezte) olyan festékek és festési eljárások után kutatott, amik specifikusak a baktériumokra, így keresett olyan szereket, amiket specifikusan baktériumokhoz tud kötni. Elsősorban szerves anyagokkal dolgozott. Munkája során fedezte fel a Salvarsant, ami az első szintetikus antibiotikum, eredményeiért a kemoterápia atyjaként tartjuk számon. (Az általa felfedezett szert ma is megtaláljuk Arzefamin néven.) Gyógyszere 1910-ben jelent meg a piacon és hatásos volt szifilisz kezelésére is.

1884-ben Hans Christian Gram megalkotta a Gram festést (ezzel a baktériumokat 2 csoportba sorolta festődésük alapján: Gram+ és Gram- baktériumokra).

#### A sejtfal felépítése: Gram pozitív és Gram negatív baktériumok



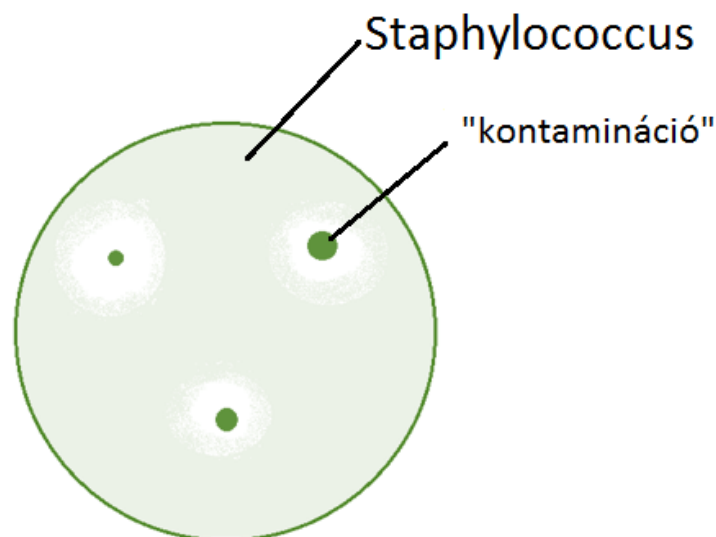
1896: egy francia orvostanhallgató, Ernest Duchesne élesztőket vizsgálva leírta, hogy azok olyan anyagokat képesek előállítani, amik képesek elpusztítani a baktériumokat. Doktori értekezést is írt a jelenségről, sőt, állatkísérleteket is végzett (tengerimalacokkal)! Elsősorban Penicillium törzsekkel kísérletezett, de a munkáját nem fogadták el, doktori címet sem kapott érte.

1893: Bartolomeo Gosia mikofenolsavat kristályosított Penicillium gombákból: felfedezte, hogy ez gátolja a *Bacillus anthracis* növekedését, azonban az ő kísérleteit sem fogadták el, nem kapott érte elismerést.



Sir Alexander Fleming: az 1. világháborúban aszisztensként dolgozott Alm-roth Wright orvosi csapatában. Katonák sebeiből nyert baktériumokat tenyésztettek agaron (amit Koch fejlesztett ki) és azok ellen kerestek hatásos antibakteriális szereket. Különböző fertőtlenítőszereket próbáltak ki, azonban a legjobban ismert, Lister által használt karbolsavas fertőtlenítő toxikus volt és a leukocitákat is pusztította (gyorsabb ütemben, mint a patogént), szóval ezek a módszerek sokszor a katonák életébe kerültek. 1921-ben Fleming felfedezte a lizozimet, ami a baktériumok sejtfalát károsítja. (Ma is használjuk, pl. fogkrémekben.) Kísérletezett a szerrel, de az nem volt alkalmazható megfelelő koncentrációban. Ez volt Fleming tudományos karrierjének kezdete.

Tíz évvel az 1. világháború után (a legenda szerint) Fleming nyaralásra indult 1928-ban és vétett egy hibát indulása előtt a laboratóriumban: nem zárt le megfelelően egy *Staphylococcus* tartalmazó petricsészét. Ahogy visszatért, azt találta, hogy a csésze befertőződött a levegőből, egy másik mikroorganizmus is nőtt a táptalajon. A kontamináció elpusztította a baktériumot (*Staphylococcus*) maga körül, az azonban a csésze távolabbi részein megfelelően tudott növekedni. Fleming felfedezte, hogy a fertőzés egy penészgomba volt: *Penicillium notatum* (= *Penicillium chrisogenum*), így a baktériumot elpusztító anyagot penicillinnek nevezte el. Kísérleteket kezdett a penészgombával és megpróbálta leírni a penicillin hatékonyságát.



Howard Florey, Ernst Chain és Norman Heatley oxfordi kutatók azt kezdték vizsgálni, hogyan lehetne a penicillinből gyógyszert készíteni: kifejlesztettek egy izolálási módszert 1940-41 között, azonban a világháború idején az erópai gyógyszergyárak nagy része le let rombolva. A gyógyszeripari termelés 1942-ben kezdődött meg az Egyesült Államokban.

Érdekesség, hogy a gyógyszergyártás kezdetkor igen nehéz volt megtalálni a megfelelő és elég antibiotikumot termelő törzset. Hogy a keresést felgyorsítsák, az Egyesült Államok több kutatóállomása a lakosság segítségét kérte: bárki beküldhette a penészes ételeit a laboratóriumokba, ahol az azon növekvő törzsetek megvizsgálták. A "nyertes" egy idős hölgy volt, aki egy penészes sárgadinnyét küldött be Illinois-ból.

1945-ben Sir Alexander Fleming, Ernst Boris Chain és Sir Howard Walter Florey Nobel díjat kaptak a penicillinnel végzett kutatásaikért.

## 17.4. AZ ELSŐ ELÉRHETŐ ANTIBIOTIKUMOK

A lejjebb ismertetett évszámok a piacra bocsátás évét jelölik. Ahogy látszik is, a Salvarsannak 20 évébe került, hogy megjelenjen a piacon, míg a Prontosilnek csak 3-ba.

**Salvarsan** (Paul Ehrlich) – 1910: hatásos a szifilisz ellen, ma is megtalálható Arzefamin néven, hatásos spirochéták ellen is. Ma már más szereket használunk a szifilisz kezelésére.

**Prontosil** (Gerhard Domagk et al.) – 1935 (Bayer): 1939-ben Domagk Nobel díjat kapott a Prontosillal folytatott munkájáért: hatásos a Gram + cocci igen nagy részével szemben, de nem hatásos az *Enterobacteraceae* ellen.

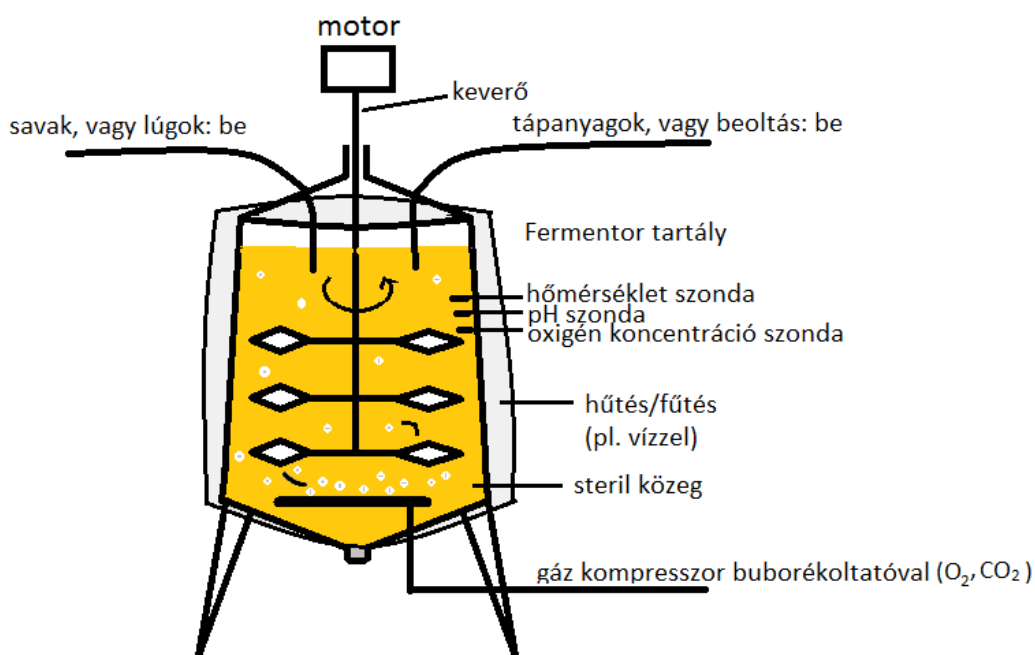
**Gramicidin** (Rene Dubos): az első forgalomban kapható antibiotikum a 2. világháború idején, 1939-40 (más antibiotikumok addig csak kórházakban voltak fellelhetőek).

**Penicillin** (Alexander Fleming) – 1942: csak a brittek és szövetségeseik jutottak hozzá a világháború alatt

## 17.5. CSOPORTOSÍTÁS AZ ELŐÁLLÍTÁS MÓDJA SZERINT

1. **Fermentációval előállított szerek:** mikroorganizmusok (baktériumok, gombák) állítják elő, mint másodlagos anyagcseretermékeket. (Emiatt gyakran hívjuk őket természetes antibiotikumoknak.) Az előállító szervezeteket folyékony tápközegben növesztjük nagy tárolókban (fermentorokban). A körülmények (oxigén és széndioxid koncentrációja, pH, hőmérséklet, tápanyagok mennyisége) monitorozottak és állíthatók ezekben a rendszerekben az optimális növekedés és antibiotikumtermelés érdekében. A különböző baktériumok általában gyorsabban tudnak rezisztenciát kialakítani ezek ellen a szerek ellen, mivel ezekkel a természetben korábban már találkozhattak. Ezek az antibiotikumok gyakrabban toxikusak, mint a szintetikus társaik.

### Egy átlagos fermentor felépítése

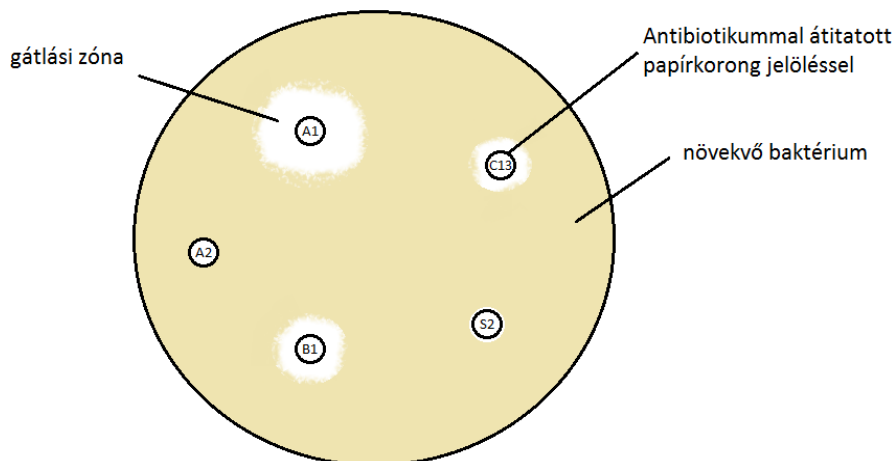


2. **Félszintetikus szerek:** kémiaiilag módosított fermentációval készült szerek, tehát ugyanúgy baktériumok, vagy gombák állítják elő (pl. Smicillin=semi-szintetikus Penicillin származék). Ezeket a szereket azért hozzák létre, hogy a természetes szerek toxicitását csökkentsék, gátolják a rezisztencia lehetőségét, vagy növeljék az antibiotikumok hatékonyságát.
3. **Kemoterápiás szerek / kemoterapeutikumok:** kémiai úton szintetizált antibiotikumok. Ezeknek a szerekeknek megvan az az előnyük, hogy a baktériumok korábban nem találkozhattak az adott szerrel, így a megjelenés előtt nem alakíthattak ki rezisztenciát ellük. Ezeket a szereket a jobb hatékonyság és a kisebb toxicitás elérésére tervezik.

## 17.6. ANTIBIOGRAM

Az antibiogram egy antibiotikumérzékenységi teszt, amivel a leghatékonyabb antibiotikumot tudjuk kiválasztani az adott páciensnek. A páciens mintájából nyert baktériumokat agaron tenyésztjük (vérminta, seb, nyál, ...) és antibiotikummal átitatott papírkorongokat helyezünk a táptalaj felszínére. Minden papírkorong más antibiotikumot tartalmaz. A tenyésztést/felnövesztést követően gátlási zónákat figyelhetünk meg a korongok körül. Ezek méretét lemérve választhatjuk ki a megfelelő antibiotikumot. Ez a teszt főleg akkor fontos, ha az antibiotikumterápia nem hatékony a páciensnél. Mivel a tenyésztés és a teszt sokáig tarthat (napok-1 hét), fontos új technikák fejlesztése is (a páciens ez alatt az idő alatt meg is halhat). A megfelelő kezelés eldöntéséhez gondolnunk kell az adott szerek mellékhatásaira, valamint az árára is. Ha szűk spektrumú antibiotikumot választunk, az nagy valószínűséggel kevésbé fogja pusztítani a természetes flórát.

Ezzel a módszerrel figyelemmel kísérhetjük a baktériumok rezisztenciáinak evolúcióját is, hogy hatékonyabban tudjuk kezelni a pácienseket. (Időben észleljük, ha elterjedten alkalmazott antibiotikumok elveszítik a hatékonyságukat új rezisztenciák megjelenése miatt.)



## 17.7. PRO ÉS KONTRA

Antibiotikumok használata nélkül számos betegség halálos lenne, vagy súlyos komplikációkkal járna. (Akár egy foggyulladás is!) Ma egyre több kutatás mutatja, hogy bakteriális fertőzések okoznak, vagy vesznek részt bizonyos ráktípusok, gyomorfekély, gyomorrák, különböző szívkoszorúér betegségek kialakításában, így felkínálkozik a lehetőség, hogy ezeket a betegségeket antibiotikumokkal megelőzzük.

Egyre több a rezisztens törzs: ez egy verseny a baktériumok és a kutatók/gyógyszergyártók között.

Az antibiotikumok felboríthatják a baktériumok természetes egyensúlyát a szervezetben.

## 17.8. ANTIBIOTIKUM INTERAKCIÓK

Fontos tudni, hogy néhány anyag megnövelheti az antibiotikumok szervezetben eltöltött idejét vagy koncentrációját nem engedve lebomlani őket. Más anyagok befolyásolhatják az antibiotikumok adszorpcióját és kiválasztását is. Néhány toxikus antibiotikum, mint a tetracycline komoly problémákat okozhat (akár halált is!), ha mennyisége valamilyen egyéb hatás miatt megnövekedik a vérben. Más anyagok az antibiotikumok metabolizmusát növelik meg. (Gyorsan ürülnek a szervezetből, így nem tudják megfelelően kifejteni a hatásukat.)

Néhány antibiotikum növeli a koffein által kifejtett hatásokat (szívdobogást, szédülést és fejfájást okozva. Ezt a hatást úgy érik el, hogy az antibiotikumok egy igen széles csoportja nem engedi a koffein kiürülését a szervezetből, így annak folyamatos, hosszabb hatása van a sejtekre. Éppen ezért az antibiotikumterápiák során nem ajánlott koffein tartalmú ételek és italok fogyasztása. Mivel a koffein megnöveli néhány fájdalomcsillapító (pl. paracetamol) hatását, így néhány gyártó koffeintartalmú fájdalom- és lázcsillapítókat is gyárt. Ezek használata az antibiotikumterápia során nem ajánlott. (Pl. Béres Trinell Pro)

A kalcium ronthatja néhány antibiotikum felszívódását, pl.: Ciprofloxacin, and Doxycylin, Norfloxacin, míg nem lép kölcsönhatásba más antibiotikumokkal, mint a Penicillinnel és az Erythromycinnel.

Minden betegájékoztató tartalmazza, hogy antibiotikumok szedése mellett tartózkodni kell az alkohol fogyasztásától. Az alkohol és az antibiotikumok egymás degradációs rátáját csökkenthetik. Ilyen kölcsönhatásban vesznek részt pl.: Metronidazole, Tinidazole, Cephmandol, Latamoxef, Cefoperazone, Cefmenoxim és Furazolidone. Az alkohol csökkenti az a Doxycycline és az Erythromycin hatását.

A tetracyclin komplexet képezhet számos molekulával, így például nem szedhető együtt magnesium-, vas és alumínium tartalmú szerekkel, savlekötőkkel.

Néhány antibiotikum csökkenti a fogamzásgátlók hatását. Összességében elmondható, hogy a természetes bélflóra pusztulása rontja más anyagok felszívódását az antibiotikumterápia során és azt követően, amíg az egyensúly helyre nem áll.

## 17.9. REZISZTENCIA

Számos antibiotikumot olyan baktériumok állítanak elő, amik a saját antibakteriális anyagokkal szemben természetesen rezisztenciával rendelkeznek. (Ezzel csökkentik más törzsek növekedését a környezetükben: antibiózis.) Rezisztenciát egy baktérium távoli rokonaitól is szerezhet konjugáció révén (horizontális géntranszfer).

Néhány random mutáció egy receptoron kötő antibiotikum esetén léghet a rezisztencia kialakítására. Az újonnan megjelent rezisztencia hirtelen problémát okozhat már ismert törzsek esetén: a patogén felfedezése esetén nem találjuk azonnal a megfelelő, hatásos szert, a páciens akár meg is halhat, mire az antibiogram eredménye megérkezik.

A rezisztencia mindezek ellenére jelenthet hátrányt is a baktériumnak, amennyiben az többletenergiát igényel (például egy extra fehérje termelését). Ebben az esetben, ha az antibiotikum nincs a környezetben, a szensitív baktériumok gyorsabban szaporodhatnak. (A rezisztens törzs eltűnhet.)

Amennyiben nem fedezünk fel folyamatosan új antibiotikumokat, a jövőnkugyanolyan, vagy rosszabb lehet, mint az antibiotikumok felfedezése előtt, nem tudnánk védekezni a baktériumok ellen és halálos lehet egy kisebb vagy nagyobb sebészeti beavatkozás, vagy akár a gyerekszülés.

## 17.10. KERESZTREZISZTENCIA

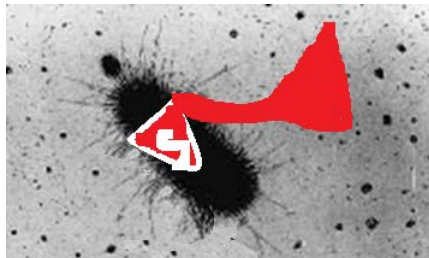
Ha egy rezisztencia kialakul, a tulajdonság, ami megvédi a baktériumot az antibiotikum hatásától, hatá-  
sos lehet más hasonló antibiotikumokkal szemben is: ez a jelenség a keresztrezisztencia.

Kémiailag hasonló anyagok esetén a rezisztencia nem csak egy adott hatóanyag ellen, hanem a ha-  
sonló szerek ellen is kialakulhat, vagy akár egy egész molekulacsoport ellen. A keresztrezisztencia a  
hasonlóan ható szerek ellen alakul ki.

Ha a rezisztencia egy egész antibiotikumcsoport ellen kialakul, akkor „teljes keresztrezisztenciáról”  
beszélünk. Amennyiben ez csak a csoport egy része ellen alakul ki, „részleges keresztrezisztenciá-  
nak” hívjuk a jelenséget.

## 17.11. SZUPERBAKTÉRIUMOK (=SUPERBUG)

Szuperbaktérium: olyan patogén baktériumtörzs, ami rezisztenciát alakított ki az ellen az antibioti-  
kum(ok) ellen, ami alapvetően hatásos lenne a baktérium ellen.



A multirezisztens törzsek száma folyamatosan nő, aminek az oka főként az, hogy a baktériumok kon-  
jugáció során géneket képesek cserélni. A folyamat során a genetikai anyag (plazmid) direkt sejt-sejt  
kapcsolat, vagy híd-szerű kapcsolaton keresztül jut át egyik baktériumból a másikba. A gének külön-  
böző törzsek között is átadódhatnak így. Ez is úgynevezett horizontális géntranszfer. (A baktériumok  
úgynevezett plazmidokkal rendelkezhetnek (cirkuláris DNS), ez tartalmazza főként a rezisztenciagé-  
neket.)

Mindezek mellett a baktérium a környezetéből is felvehet DNS-t, ez azonban csak akkor marad fenn a  
baktériumban, ha homológ szakaszokkal be tud integrálódni a genomba. (A genom tartalmazhat bein-  
tegrálódott bakteriofágokat is.)

## 17.12. MRSA

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*): ez felelős a legtöbb multirezisztens fertőzésért  
(2015-ben). Ez a baktérium egy átlagos *S. aureus* leszármazottja, ami alapvetően kezelést sem igény-  
lő problémákat okozhat. Ez a rezisztens baktérium gyakran okoz fertőzést kórházakban olyan pácién-  
seknél, akiknek legyengül az immunrendszerük (intenzív osztály, sebészet). (A kórházi fertőzéseket  
nozokomiális fertőzésnek nevezzük.) Elsősorban bőrbetegségeket alakít ki, ami halálossá válhat.

Gyakran leírt jelenség, hogy strandhomoktól elkapható a fertőzés, mivel az kitűnő közeg a baktérium  
szaporodásához.

Az MRSA több halállal járó fertőzést okoz ma az Egyesült Államokban, mint az AIDS.

### 17.13. KUTATÁSOK NAPJAINKBAN

Egyre kevesebb új antibiotikum jelenik meg, részben a keresztrezisztens törzsek miatt, ezért kell új támadáspontú baktériumokat találnunk. Új kutatások folynak például a bakteriális aminosavsintézis és zsírsavsintézist célzó szerekkel. Másik fontos kutatási téma a baktérium-gazdasejtek kapcsolata.

Egyre jobban elfogadott vélemény, hogy könnyebb és közepesen erős fertőzések esetén csak bakteriosztatikus szereket kellene használnunk, így kevesebb multirezisztens baktérium alakulna ki.

Sok kutatás szentel figyelmet a szervezet immunrendszerének támogatására is. Folyamatban vannak bakteriofágokkal végzett kísérletek is.

### 17.14. PRIMYCIN

(Számos néven megtalálható a piacon, pl. Ebrimicin gél)



Mostanáig az egyetlen antibiotikum, amit itt fedeztek fel és izoláltak Magyarországon. 1949-ben fedezte fel Vályi-Nagy Tibor. A hatóanyagot a *Thermopolyospora galeriensis* gombafaj termeli, több kutatás folyik ezzel a szerrel jelenleg is a Pécsi Tudományegyetemen. A szer a makrolid antibiotikumok közé tartozik, baktericid hatása van.

Spektruma igen tág: hatásos a Gram-pozitívok (és a Mikobaktérium törzsek) ellen. Van hatása az élesztők és fonalagombák, vibriok, néhány algafaj, protozoák és makrovírusok ellen is. Nagyobb koncentrációban hatásos Gram-negatív baktériumtörzsek ellen is, beleértve több rezisztens és polirezisztens törzset is. Mivel nem szívódik fel a bőrrel, vagy a bélből, ezért helyileg használhatjuk.

### 17.15. ANTIBIOTIKUMOK HASZNÁLATA TÚL A GYÓGYSZERES FELHASZNÁLÁSON

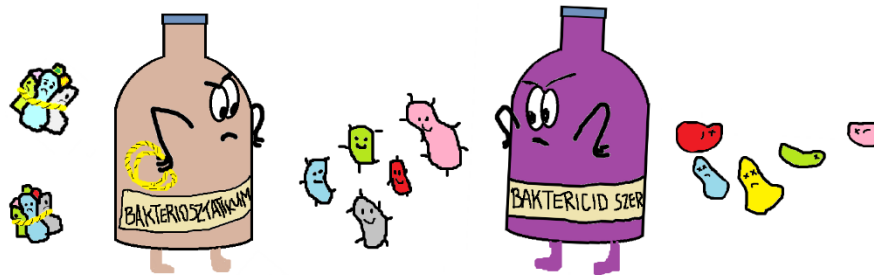
A molekuláris biológiában és a genetikai kutatások során szelekciós markerként használunk antibiotikumokat. Például: klónozást tudunk ellenőrizni egy rezisztenciagénnel. A rezisztenciagént egy általunk bevinni kívánt génnel együtt integrálunk a genomba. A klónozást követően a baktériumot antibiotikumos táptalajon neveljük: a rezisztenciagént tartalmazó baktériumok lesznek képesek növekedni. Ha plazmidon visszük be a gént, az antibiotikumos közeg meggátolja azoknak a sejteknek a növekedését, amikből „kikopik” a plazmid, így folyamatos szelekciós nyomást fejt ki.

### 17.16. HATÁSMECHANIZMUS

A legfontosabb alapelv: minél specifikusabb hatás elérése a patogénon, minél kisebb hatás a human (vagy állati) sejten.

Megkülönböztetünk **bakteriosztatikus** szereket, amik gátolják a baktériumok növekedését és **baktericid** vegyületeket, amik elpusztítják a baktériumokat.

A key principle: the more specific effect of the drug is on the pathogen, the smaller is the effect on humans (or other animals). (Néhány baktérium mindkét hatással rendelkezik, például koncentrációfüggő módon: nagyobb dózisban baktericidek. Néhány baktérium különböző törzseken másként hat.)



## 17.17. CSOPORTOSÍTÁSA HATÁSMÓD SZERINT

Általánosságban van néhány olyan kritikus pontja a bakteriális metabolizmusnak, amiket támadáspontként tudunk használni:

**Sejtfalszintézis gátlók:** osztódásban lévő sejtekre hat, pl.  $\beta$ -laktámok (penicillinek, cefalosporinok, carbapenemek), glikopeptid antibiotikumok. Ezek az antibiotikumok a sejtal felépülését gátolják az osztódás során. Megfelelő sejtal nélkül a baktériumsejtek kevésbé rezisztensek az ozmotikus hatásokkal szemben. (Jó szelektív target: a human sejtek nem rendelkeznek peptidoglikán sejtfallal.)

Ezek a sejtfalszintézis inhibitorok elpusztíthatják a Gram-pozitív patogéneket, de nem hatásosak a Gram-negatívokkal szemben, ennek oka az eltérő sejtalstruktúra.

**Enzim inhibitorok:** metabolikus folyamatokat és a nukleinsav replikációját gátolják, pl. DNS giráz gátlók.

**Riboszómára ható szerek:** fehérjeszintézisgátlók: pl. aminoglikozidok, makrolidok, klóramfenikol, tetraciklinek. Ezek a szerek hatással vannak a human riboszómákra is, hozzákötődnek azokhoz is, azonban általában kisebb effektivitással. A legtöbb emberi sejt kisebb ütemben szintetizálnak fehérjéket, mint a baktériumok, azonban mivel ez egy közös folyamat, több toxikus mellékhatása van ezeknek a szereknek.

**Membránfunkció gátlók:** néhány antibiotikum (pl. polymixinek) detergensként hatva feloldják a baktériumok membránjait.

## 17.18. SEJTFAL SZINTÉZIS GÁTLÓK

### Béta-laktámok

A sejtalal károsítják (meggátolják a szintézisét): a sejtalal támadják, ami az emberi sejtekre nem jellemző, így ebből adódóan meglehetősen kevés mellékhatása van. Elsősorban a penicillin-kötő fehéréhez kötődnek és ezzel gátolják a peptidoglikán szerkezetének kialakítását, így kizárólag az osztódásban lévő sejtekre hatnak. **Baktericidek**, azaz baktérium-ölő szerek.

A penicillinek és cefalosporinok is ebben a csoportba tartoznak.

Hátrányuk: az inaktív baktériumok túlélnek a baktériumterápiát, így később a páciens visszaeshet a betegségbe. Nem hatásosak az intracelluláris patogének ellen (mert nem jutnak be a human, vagy állati sejtekbe).



Gyorsan ürülnek a szervezetből, ezért több dózisban kell bevinni (pl. 3-6 adabna egy nap).

### Penicillinek

A bakteriális transzpeptidáz enzimhez kötődnek, így gátolják meg a sejtfallszintézist. Nem toxikusak. (Ez nem azt jelenti, hogy nincsenek mellékhatásaik! Súlyos mellékhatások igen ritkák ezeknél az antibiotikumoknál.)

Relatív széles spektrumúak, elsősorban fül-, orr-, garat-, nyelőcső- és légzőszervrendszeri megbetegedések esetén használjuk őket.

### Cefalosporinok

A cefalosporinok is a transzpeptidáz enzimhez kapcsolódnak. Kevésbé érzékenyek a hagyományos  $\beta$ -laktamázokkal szemben. Légzőszervrendszeri fertőzések, vese, húgyúti fertőzések esetén és különböző sebelfertőzések esetén használjuk őket. Sokszor alkalmazzuk, ha a páciens allergiás a penicillinre. Relatív kevés akut mellékhatásuk van, ritka az allergiás reakció, vagy a vesekárosodás. Véraladási zavarok azonban kialakulhatnak idősebb pácienseknél. Nem toxikusak, de természetesen kialakulhat allergia ezek ellen a szerek ellen is. Gram-negatív baktériumokkal szemben hatékonyak.

### Béta-laktám antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia

A baktériumok termelhetnek béta-laktamáz enzimet, ami az antibiotikumot (a  $\beta$ -laktám gyűrűt) hasíthatja. A  $\beta$ -laktamáz természetesen is előfordul baktériumokban, de mennyiségük és aktivitásuk is különböző lehet. A  $\beta$ -laktámok a penicillinkötő receptorra bekötődve inaktívvá válhatnak a  $\beta$ -laktamáz termelését, ezért inhibitorokat kell használnunk, amik a hasító enzim aktivitását csökkentik le. Ezeket a  $\beta$ -laktamáz inhibitorokat (BLI) antibiotikum segédanyagként használhatjuk: klavulánsav (Amoxicillinben, Ticarcillinben), szulbaktám (Amoxicillinben), tazobaktám (Piperacillinben).

A rezisztencia másik formája, ha a sejtfal struktúrája úgy változik, hogy a béta-laktám nem tud átjutni rajta (a sejtfelszínre kiválasztott fehérje, vagy mucinózus réteg miatt).

### Aminglikozid antibiotikumok

Magas hatékonyságú antibiotikumok, elsősorban súlyos fertőzések esetén használjuk őket. Baktericid és bakteriosztatikus hatásuk is van: elsőként a baktérium felszínére tapadnak, ez megzavarja a permeabilitást, majd a sejtbe bejutva a fehérjészintézist is gátolja, ahogy irreverzibilisen kapcsolódik a riboszómákhoz. A kettős effektivitás miatt egyaránt sorolhatuk őket a sejtfallszintézisgátlók és a riboszómára ható szerek közé is.

A 30S riboszóma alegység S12 fehérjéjéhez kapcsolódik, így gátolva az N-formil-metionin kötődését, így a fehérjészintézis nem tud megindulni a riboszómákon (mivel ez az első bekötődő aminosav!).

Elsősorban injekció formájában használjuk, valamint kenőcsökben szájon belül, illetve külső bőrfelületeken és szemcseppekben (mivel igen rosszul szívódik fel az emésztőszervrendszerből).

Relatívan magas kockázatot jelent szív, vese és neurológiai betegségekre, amennyiben injekció formájában juttatjuk be. Meningitis (agyhártyagyulladás) esetén nem jut eé a központi idegrendszerbe, így annak kezelésére nem alkalmas.

Terhes nők nem szedhetnek aminglikozidokat, mivel az embrió idegrendszerét károsítja.



## Glikopeptidek

A glikopeptid antibiotikumok a sejtfal szintézisét is gátolhatják, valamint a ribonukleotid szintézist. Gran-pozitív baktériumok ellen hatásosak. Baktericidek (szóval baktériumpusztító hatásúak).

Nem tudnak felszívódni a béltraktusból, így szinte kizárólag infúzió formájában használjuk. Szövetirritálók, ezért csak lassan adhatók be. Intramuszkuláris injekcióként szöveti nekrozist okoz. Vese- és halláskárosodást okozhat.

Normál esetben nem jut át az agyhártyán, azonban agyhártyagyulladás esetén átkerülhet a liquorba.

Rezisztencia: amennyiben a kötőhely (receptor) változik (pl. mutációval), az antibiotikum nem lesz képes kötődni, így nem lesz hatékony.

## 17.19. ENZIM INHIBITOROK

### Giráz inhibitorok

A giráz inhibitorok specifikusan bakteriális DNS giráz enzimeken hatnak, így gátolva a sejtosztódást. Általában azoknál a pácienseknél használjuk őket, akik más antibiotikumokra allergiásak.

Különösen hatásosak a húgyúti fertőzésekkel szemben, vagy a légzőszervrendszeri és bőrfertőzések esetén. Még a *Helicobacter pylori* is elpusztítják, aminek fontos szerepe van a gyomor-bélrendszeri fekélyes megbetegedésekben.

Mellékhatások: hényinger, hasi fájdalom, hasmenés. Ritkán, de kialakulhat súlyos fejfájás, szédülés, depresszió, álmatlanság és nyugtalanság.

Nem alkalmazható terhesség, szoptatás és a növekedés befejezte előtt, mert csont és ízületi fejlődési rendellenességeket okozhat.

### Folsavantagonisták

A csoport legjobban ismert képviselője a Sulfonamide. Az 1935-ben piacra került Prontosil is ebben a csoportba tartozik.

Bakteriosztatikus hatásuk van. Felépítésük hasonlít a para-amino-benzoészavnak, így ennek a molekulának a beépülését gátolják meg a sejtfalba, ezzel a folsavszintézis és a sejtfalszintézis gátlódik. A folsav szintézisét több ponton is gátolhatják, többféle módon.

A folsav esszenciális az adenin és a timin szintéziséhez (nukleinsavak!). (Humán szervezetben nem történik folsavszintézis, ezért ez egy jó szelektív támadáspont.)

Nem használjuk őket gyakran, mert túl sok a rezisztens törzs, főleg trachoma esetén (ami egy speciális szemfertőzés). Kombinált terápiában gyakran szerepel tüdőgyulladás, toxoplazmózis, vagy akár malária kezelésére.

## 17.20. RIBOSZÓMÁRA HATÓ SZEREK: FEHÉRJESZINTÉZISGÁTLÓK

### Tetraciklinek

Bakteriosztatikus hatásuk van, a baktériumsejtek szaporodását gátolják. A 30S alegységhez kötődve gátolják a bakteriális aminoacil-tRNS kötődését a riboszóma-mRNS komplexen.

Relatívan kevés mellékhatásuk van, de nagy mennyiségben toxikusak! Jól felszívódnak a béltraktusból, így tablettá formájában jól alkalmazhatóak.

Eredetileg igen széles spektrumban voltak hatásosak, azonban a rezisztens törzsek számának növekedésével ez jelentősen csökkent.

Elsősorban bronchitisben (hörghurut), pneumonia (tüdőgyulladás) és krónikus bőrgyulladások esetén használjuk.

Mellékhatások: fejlődő gyerekek fogainak elszíneződése, ritkán májgyulladás. (Elsősorban a májban és az epében választódnak ki.)

### Makrolidok

Eredetileg *Streptomyces erythreus* termelte őket.

A fehérjeszintézist gátolják: az 50S riboszómaalegységre kötődnek reverzibilisen. Bakteriosztatikusak, de koncentrációtól függően baktericidok is lehetnek, illetve származékaik lehetnek baktericidok.

Ebbe a csoportba tartozik az Erithromycin, amit sokszor használnak penicillinek és cefalosporinok kiváltására (amennyiben a páciens allergiás rájuk).

Elsősorban tüdőbetegségeknel használjuk őket, amikor más antibiotikumok már nem hatásosak.

Alkalmazhatóak Toxoplazmózisban is (ez egy idegrendszeri parazita, ami elsősorban újszülötteket és magzatokat fertőz, a makrolidok a terhesség második felében már alkalmazhatóak, az idegrendszeri krosodások elkerülésére).

Mellékhatások: májműködési zavar és halláscsökkenés. (Elsősorban az epében választódik ki, így nagy mennyiségben halmozódik fel a májban, ezért jól használható májat támadó fertőzések esetén.)

Rezisztencia: lecsökkent permeabilitás miatt, receptorok változása miatt, illetve a riboszómák inaktivitása esetén.

### Klóramfenikol

A fehérjék előállítását zavarják meg a baktériumokban, de beleszólnak a humán fehérjeszintézisbe is: az 50S bakteriális riboszómára kötődnek reverzibilisen és így gátolják a fehérjeszintézist. Az humán sejtekben a 80S alegységhez, illetve a mitokondrium riboszómájához is kötődnek, igaz, kisebb hatékonysággal.

Általában bakteriosztatikus hatásuk van, néhány esetben alakul csak ki baktericid hatás (pl. *Nisseriával* és *Streptococcus pneumoniaevel* szemben).

Jól felszívódik a béltraktusból.

Átjukt a gerincvelői folyadékba is (azonban koncentrációja itt csak a szérumban mérhető koncentráció felét éri el).

Van néhány súlyos mellékhatása, ami miatt csak bizonyos esetekben használjuk őket: hastífuszban, vagy akkor, ha más szer nem alkalmazható (elsősorban a csontvelőt és a vérképző szerveket károsítja). Nem használhatóak újszülöttek terápiája során.

### Linkozamidok

Lincomycin és a 10x erősebb Clindamycin a legjobban ismert tagjai ennek a csoportnak.

A többi antibiotikumnál erősebb mértékben károsítják a természetes bélflórát, számos esetben okoznak súlyos gyulladást, csak ritka esetekben használjuk őket, amennyiben más szerek már nem hatások, genitáliák és ízületek fertőzéseinél.

Bakteriosztatikusak, az 50S alegység 23S részéhez kapcsolódnak a bakteriális riboszómán, így gáolva a fehérjeszintézist. (Hatásosak a malária és a toxoplazmózis ellen is.)

Használjuk őket az úgynevezett „toxikus sokk szindróma” kezelésére is, mivel a bakteriális „M proteint” gátolják.

Rezisztencia: hasonlóan a makrolidokhoz: a kötőhely változásával alakulhat ki.

A makrolidokkal antagonisták, így együtt nem használhatjuk őket.

## 17.21. MEMBRÁN FUNKCIÓ GÁTLÓK

### Polimixinek

#### Polymyxin A,B,C,D,E

Ezek a gyógyszerek a membránhoz kötődnek és kationos detergensként pozitívan töltött aminocsoportjaival kölcsönhatásba lépnek a lipopoliszacharidokkal és a foszfolipidekkel és növelik a permeabilitást. Mivel a sejt membránjának integritása sérül, makromolekulák és ionok jutnak ki a sejtől, ez a sejt sérülését, vagy halálát okozza. (Néhány gombaellenes szer is ebbe a csoportba sorolható, mivel ugyanezzel a hatásmechanizmussal működnek: poliének.)

Mindegyiknek baktericid hatása van.

Eredetileg a *Bacillus polymyxa* termelte.

All have bactericidal effects

Hatásosak Gram-negatív pálcikákkal szemben (pl. *Pseudomonas aeruginosa*)

## 17.22. ÖSSZEFOGLALÓ

<b>Sejtalszintézis gátlók</b>	Béta-laktámok
	Aminglikozidok
	Glikopeptidek
<b>Enzim inhibitorok</b>	Giráz inhibitorok
	Folsav antagonisták
<b>Riboszómára ható szerek: fehérjeszintézisgátlók</b>	Tetraciklinek
	Makrolid antibiotikumok
	Klóramfenikol
	Linkozamid
	(Aminglikozidok)
<b>Membránfunkció gátlók</b>	Polimixinek

Antibiotikum csoport	Hatásmechanizmus 1	Hatásmechanizmus 2
Béta-laktámok	Sejtalszintézis gátlók	baktericidok
Aminglikozidok	Sejtalszintézis gátlók és riboszómára ható szerek	baktericidok (sejtfalszint. gátlók) és bakteriosztatikusak (riboszómára hatók)
Glikopeptidek	sejtalszintézis gátlók, (ribonukleotid szintézis gátlók)	baktericidok
Tetraciklinek	riboszómára ható szerek	bakteriosztatikusak
Makrolid antibiotikumok	riboszómára ható szerek	bakteriosztatikusak (származékaik, és magas koncentrációjuk lehet baktericid)
Giráz inhibitorok	enzim inhibitorok	baktericidok
Folsav antagonisták	sejtalszintézis gátlók	bakteriosztatikusak
Klóramfenikol	riboszómára ható szerek	bakteriosztatikusak (néhány törzssel szemben baktericidok)
Linkozamid	riboszómára ható szerek	bakteriosztatikusak
Polimixinek	membránfunkciógátlók	baktericidok

## 18. A SEJTCIKLUS

### 18.1. A SEJTCIKLUS DEFINÍCIÓJA ÉS SZAKASZAI (FÁZISAI)

Egy új sejt csak egy létező sejt osztódása révén keletkezhet. A **sejtciklus** az eseményeknek azon szabályozott sorozata, amely révén a sejt anyagainak megkettőződése és elosztása következik be, két azonos sejtet eredményezve (egy szülő sejtől két utódsejt lesz). Ennek a folyamatnak a primér eseménye a sejt genetikai anyagának (DNS) pontos megkettőzése és egyenlő elosztása az utódsejtek között.

Az egysejtű élőlényekben ez a folyamat az élőlény megkettőzését jelenti. A **többsejtűekben** a folyamat bonyolultabb: nagyszámú, szabályozott sejtosztódás vezet egy új organizmus kialakulásához. A kifejlődött többsejtű élőlényekben egyes sejtek nem osztódnak többé, mások csak bizonyos körülmények között osztódnak (például külső ingerek hatására), míg ismét mások megőrzik képességüket a folyamatos osztódásra.

A sejtciklus fázisokra osztható. **Öt fázist** különböztetünk meg: G1, S, G2 (ezt a hármat együtt **interfázisnak** is nevezzük), M és G0 (null). Minden fázisnak megvannak a jellegzetességei és a szerepe. A G (gap – szünet) fázisokban elsősorban szintetikus folyamatok (fehérje, membrán szintézis) zajlanak. A két nagyszabású változásokkal járó fázis az S (DNS szintézis), amelyben a genetikai anyag (DNS) replikációja zajlik, illetve az M fázis, amely mitózist jelent, nukleáris és citoplazmatikus osztódással. Ezeknek a fázisoknak az időtartama változó, attól függően milyen organizmusról/szövetről van szó, de általában az emlős sejtek ciklusa 24 órás, amelyben 10-12 óra az S, és egy óra az M fázis.

A G1 és G2 fázisok az M és az S (G1), illetve az S és az M (G2) fázisok között találhatóak. A **G fázisokban** nemcsak növekedés történik, hanem ellenőrző folyamatok is: a sejten belüli és kívüli körülmények felmérése annak eldöntésére, hogy a folyamat haladhat-e tovább (lásd később: a sejtciklus **ellenőrző** pontjai). A **G0 fázis nyugvó állapot**, amely lehet átmeneti bizonyos körülmények miatt, vagy végleges, ha a sejt többé már nem osztódik. A sejt újból beléphet a G1 fázisba a körülmények változása következtében vagy specifikus jel hatására (lásd később: mitogének). Természetesen a sejt a G0 fázis alatt is ellátja alapvető funkcióit.

Bár a sejtciklus fázisainak hossza és eseményei eltérhetnek az egyes organizmusok között, az alap szabályozási folyamatok igen hasonlóak, és ennek a szabályozásnak a fehérje komponensei konzerváltak. Ez a fő oka annak, hogy a sejtciklus szabályozási folyamatai jól tanulmányozhatók számos **modell organizmusban**, kezdve az egysejtű eukarióta élesztőtől a légyen át a békáig. A humán sejt-kultúrák is számos információt szolgáltatnak a sejtciklus folyamatairól. Fontos megjegyeznünk, hogy számos esetben a tumorok kialakulásának a sejtciklus kontroll folyamatainak hibája az oka (lásd: Tumorok biológiája).

### 18.2. A SEJTCIKLUS SZABÁLYOZÁSA: ELLENŐRZŐ PONTOK (CHECK POINTS)

A sejt meglehetősen sérülékeny a sejtciklus egyes folyamatai alatt: a sejt gömbölyűvé válik, elveszti a kontaktust a többi sejtrel, a DNS tartalom szorosan összecsomagolódik és nem alkalmas transzkripcióra, és fontos, hogy a teljes DNS állomány replikációja során számos fehérjének kell meghatározott rendben működnie.

A **sejtciklus ellenőrző rendszere** a ciklusból magából kap jeleket. A ciklus csak akkor haladhat előre, ha az egyes fázisok teljesekek, és a folyamatot az ellenőrző rendszernek késleltetnie kell, ha javításra van szükség. Meghatározott pontoknál (**ellenőrző vagy check pontok**) sokszor a fázisok közötti fontos átmenet található. Ezeknek az átmeneteknek a **főbb jellemezői**:

- a ciklus előre halad vagy nem halad tovább (on/off), irreverzibilis módon
- az ellenőrző rendszer megbízható és hatékony
- a rendszer külső vagy belső jelekre reagál.

A négy fő szabályozó átmeneti pontja (**check pontok**) a sejtciklusnak:

- restrikciós pont (élesztőben: start pont) a késői G1-ben
- S fázis ellenőrző pont
- G2/M átmenet
- metafázis/anafázis átmenet.

Ezeknél a pontoknál a sejtciklus ellenőrző rendszer döntéseket hoz, vajon indít-e esszenciális folyamatokat a ciklusban vagy sem – miután figyelembe vette a sejt állapotát és a környezetből érkező jeleket. A **restrikciós pont** a sejtciklus kezdetének döntő szakasza; ez után a pont után a sejtnek végig kell vinnie az egész sejtciklust, csak átmenetileg állhat le, ha probléma adódik, amíg azt meg nem tudja oldani.

### A sejtciklus szabályozása: a ciklin/Cdk komplexek

A **ciklinek azok a fehérjék**, amelyeknek szintje a sejtciklus folyamán változik. A **Cdk-k (ciklin dependens kinázok)** mennyisége állandó, de aktivitásuk változik a ciklinek és más szabályozó fehérjék mennyiségétől függően (lásd később: Cdk aktivitás szabályozása). Emberben 4 osztálya van a ciklineknek, és több mint 20 típusa a Cdk fehérjéknek. Az egyes ciklinek (D, E, A, B) a sejtciklus meghatározott fázisaiban jelennek meg: G1/S, S, M és G1 ciklinek (lásd ábrát az előadás anyagban). A ciklinek speciális Cdk-khoz kötődnek és azokat aktiválják. Az egyes ciklinek bizonyos fokig tudják egymást helyettesíteni. Emberben legalább 12 különböző ciklin/Cdk komplex képződik. Amikor egy ciklin Cdk-hoz kötődve azt aktiválja, akkor a Cdk, **kináz aktivitásának köszönhetően** a fehérjék egy adott csoportját foszforilálja, elindítva ezzel a sejtciklus adott fázisára jellemző eseményeket és aktivitásokat. Ez történhet poszttranszkripcionálisan, de a sejtciklus szabályozása folyhat a transzkripció szintjén is. Egy foszforilált fehérje megváltoztathatja az aktivitását, vagy szubsztrátja illetve célja lehet egy másik fehérje aktivitásának.

#### A Cdk aktivitás szabályozása

Általában a ciklin Cdk-hoz kötődése elengedhetetlen, de nem elegendő lépés a Cdk teljes aktivitásának eléréséhez. Ez különösen a restrikciós ponton való áthaladás szabályozására igaz, amelynek során a döntő lépés többszörösen is kontrollált.

A Cdk aktiválás egyéb lehetőségei:

#### 1. Foszforiláció

- aktiváló hatású foszforiláció a Cdk-aktiváló kinázok (CAK) révén
- gátló hatású foszforiláció (pl. Wee1)
- foszfatázok (Cdc25 eltávolítja a Wee1 gátló hatású foszfát csoportját – M-Cdk aktivitás kontrollja)

#### 2. Gátló fehérjék kötődése

- Cdk gátló fehérjék (CKI): Cdk-hoz vagy ciklin-Cdk komplexhez kötődnek (G1/S és S-Cdk aktivitás szabályozása)

#### 3. Intracelluláris lokalizáció (elhelyezkedés)

- A ciklinek és a Cdk-k is a citoszolban szintetizálódnak és a magba kell jutniuk, hogy kapcsolatba lépjenek (a G2/M ellenőrző pontban foszforilált ciklin B a sejtmagban fel- szaporodik).

#### 4. Fehérje lebomlás (degradáció)

- Az ubiquitin kapcsolódása révén valósul meg. A cél fehérje lehet ciklin, Cdk, gátló (inhibitor) fehérje vagy más funkciójú fehérje. Egy példa a mitózis metafázis/anafázis átmenet szabályozása. A két fő mód, ahogy a fehérje lebomlás részt vesz a sejtciklus szabályozásában a következő: vagy az E3 ubiquitin ligáz cél fehérjéje foszforilálódik, vagy az ubiquitin ligáz foszforilálódik és aktiválódik ilyen módon.

#### A sejtciklus külső aktivátorai

**Mitogének és növekedési faktorok** képesek elindítani a sejtciklust olyan változások előidézésével, amelyek segítségével a sejt túljut a restrikciós ponton. Az említett faktorok a sejtre a jelátvitel utakon keresztül hatnak. A legtöbb jelátviteli aktivitás a G1 fázisban zajlik le (lásd a Jelátvitelről szóló fejezetet a részletekért). A legtöbb útvonal ezek közül magába foglalja a MAPK aktivitást, és a transzkripció célok között számos sejtciklus szabályozó géntermék van (pl. ciklinek).

#### A sejtciklus szabályozás és a tumorképződés kapcsolata

Számos lehetőség van arra, hogy a sejtciklus szabályozás zavara kóros sejtburjánzáshoz vezessen:

- külső jelátviteli út kontroll nélküli aktiválódása
- mutációk: proliferatív jel aktiválódása, vagy fehérje degradáció elmaradása (ciklinek)
- szabályozó mechanizmusok elvesztése. (Lásd: Tumorképződés fejezet)

A tumor szuppresszor gének szerepére a sejtciklus szabályozásában példák találhatók az előadásanyagban (p53 és Rb fehérje).

Egyéb példák a sejtciklus szabályozó mechanizmusaira: a prereplikatív komplex aktiválása; sejtciklus szabályozás és DNS repair (javítás) kapcsolata; anafázis promotáló komplex (APC) szabályozása.





## 19. MITÓZIS ÉS MEIÓZIS

Mind a mitózis, mind a meiózis a replikációt követi (lásd sejtciklus és replikáció)

### 19.1. MITÓZIS (SZÁMTARTÓ OSZTÓDÁS)

A mitózis az eukarióta sejtekre jellemző folyamat, mely során a sejt kettő, azonos utódsejtté osztódik.

**Profázis** során a laza kromatin állomány kromoszómákba kondenzálódik. A nukleóusz eltűnik.

A centroszómák a sejt ellentétes pólusaiba vándorolnak. A centroszómák az interfázis során kettőződtek meg.

**Prometafázis** során a nukleáris membrán teljesen fragmentálódik (nyitott mitózis).

Az osztódási orsó a prometafázis során formálódik a citoskeletonból. Az osztódási orsó a két centroszómából és az azokhoz kapcsolódó mikrotubulusokból áll, szerepe a kromoszómák mozgatása és a citokinézis. A mikrotubulusok egyik vége mindig a centroszómához kapcsolódik.

- Kinetokór mikrotubulusok: a kromoszómák kinetokór régióhoz kapcsolódnak, azok mozgásáért felelősek.
- Interpoláris mikrotubulusok: a két centroszómát kötik össze.
- Asztrális mikrotubulusok: a sejt poláris régiójához kapcsolódnak.

A kromoszómák centromér régióján kialakuló fehérje komplexek a kinetokór régiók. Szerepük, a mikrotubulusok megkötése és azok stabilizálása.

**Metafázis** Az osztódási orsó kialakulása a metafázisban fejeződik be. A kromoszómákat a kinetokór mikrotubulusok a sejt egyenlítői síkjába rendezik.

Osztódási orsó ellenőrzési pont (mitotic spindle checkpoint vagy spindle assembly checkpoint (SAC)). Az SAC fehérjék ellenőrzik a megfelelő kinetokór-kinetokór mikrotubulus kapcsolódás létrejöttét. Amennyiben akár egyetlen kinetokór régió is szabad marad, az ellenőrzési pont fehérjei megállítják a mitózist az MPF szint magasan tartásával.

**Anafázis** során két, egymással párhuzamos folyamat játszódik le:

Anafázis A: A testvér kromatidákat összetartó fehérje komplexeket, kohezineket speciális proteázok, a szeparázok hidrolizálják. Az elválasztott testvér kromatidákat a megrövidülő mikrotubulusok húzzák szét egymástól. A mikrotubulusok megrövidülése elsősorban a felépítő egységek depolimerizációjának köszönhető.

Anafázis B: A centroszómák még inkább a poláris régiók felé mozdulnak el, egyrészt az interpoláris mikrotubulusok meghosszabbodása és egymáson való elcsúszása, másrészt az asztrális mikrotubulusok megrövidülése következtében.

**Telofázis** a metafázisban és profázisban léterjött változások visszaalakítása. A pólusok tovább távolodnak egymástól. A maghártya újraalakul. A nukleólusok újrendeződnek. A kondenzált kromatin állomány dekonzenzációzik. Újraszerveződik a Golgi complex és az ER.

**Citokinézis** a telofázissal egy időben indul. A két állati utódejtet egy kontraktilis aktin-miozin gyűrű választja el.

### Hibák a mitózisban

A mitózis hibái ritkák, mert egyrészt nagyon szigorúan szabályozott folyamat, másrészt a hibák általában végzetes következményekkel járnak az osztódó sejtre nézve.

Kromoszóma nondiszjunkció: a testvér kromatidák nem válnak el egymástól ami aneuploiditáshoz vezet.

Celluláris nondiszjunkció: citokinézis hibája két sejtmaggal rendelkező sejtekhez vezet.

## 19.2. MEIÓZIS (SZÁMFELEZŐ OSZTÓDÁS)

A meiózis egy speciális sejtosztódás, mely folyamánaképp az utódsejtek kromoszómaszáma feleződik. A meiózis haploid gamétákat generál, melyek emberekben a petesejtek és spermiumok 23 kromoszómával.

A mitózishoz hasonlóan a meiózis előtt is megkettőződik a sejt genomialis DNS állománya a replikáció során.

A meiózis folyamata két nagy lépésre osztható, melyek a meiózis I (profázis I, metafázis I, anafázis I és telofázis I) illetve a meiózis II (profázis II, metafázis II anafázis II, telofázis II és citokinézis). Fontos azonban észben tartani, hogy a hasonlóságok ellenére nem két mitózis játszódik le egymás után! A következőkben csak a legfontosabb részekre térünk ki, a részletekért lásd a vonatkozó előadást.

Profázis I: A homológ kromoszómák egymás mellé rendeződnek. A párosodott kromoszómák között a homológ szakaszok kicserélődhetnek, mely folyamatot crossing overnek vagy genetikai rekombinációnak is hívunk. A rekombináció fontos mechanizmusa a genetikai diverzitás fenntartásának, mert segítségével az allélok új kombinációjai alakulhatnak ki.

Metafázis I: A homológ kromoszómapárok az egyenlítői síkba rendeződnek a kinetokór mikrotubulusok segítségével.

Anafázis I: A kromoszómapárok elválnak egymástól, de a testvérkromatidák nem! Az anyai és apai kromoszómák megoszlása a két létrejövő utódsejtben véletlenszerű, ami hozzájárul az utódok genetikai variabilitásához.

Telofázis I: A kromoszómák elérik a pólusokat, ahol dekonzenzálódnak. Kialakulnak a sejtmagburták.

A meiózis II a DNS megkettőződése nélkül követi a meiózis I-et.

Profázis II: Eltűnik a sejtmagburtája és nukleóluszok. A kromatin állomány kondenzálódik.

Metafázis II: A kromoszómák (nem kromoszómapárok!) az egyenlítői síkba rendeződnek.

Anafázis II: A kohezinek elhasításával a testvérkromatidák elválnak egymástól. A kinetokór mikrotubulusok a pólusok felé húzzák őket.

Telofázis II és citokinézis: Kialakul a sejtmagburtája, a kromatidák dekonzenzálódnak. Az utódsejtek elválnak egymástól.

### Hibák a meiózis során

A meiózis során fellépő hibák közül a legjelentősebb a kromoszómák nem elválása (nondiszjunkció). Részletekért lásd a kromoszóma rendellenességek fejezetet!

**19.3. A MITOSIS ÉS MEIÓZIS RÖVID ÖSSZEHAJONLÍTÁSA**

	Mitózis	Meiózis
Sejtosztódások száma	1	2
Utódsejtek száma	2	4 (1)
Kromoszómaszám	$2n \rightarrow 2n$	$2n \rightarrow 1n$
Homológ rekombináció	nem	Igen
Utódsejtek azonosak	Igen	nem



## 20. JELÁTVITEL

### 20.1. BEVEZETÉS

A sejtek az extracelluláris jeleket közvetítő molekulákat képesek felismerni a sejtfelszínen specifikus receptorok segítségével vagy, kisméretű és hidrofób hírvivő molekula esetén, a plazmamembránon átjutva intracelluláris receptorok révén. Ezt a mechanizmust nevezzük jelátvitelnek, mely során a sejtek képesek a külső ingerekre adekvát módon reagálni. Ez a folyamat tarja fent a sejtek aktivitását, így a sejtek képesek túlélni a változó körülmények között is.

### 20.2. A JELÁTVITELI RENDSZEREK ELEMEI

#### A jelátvitel típusai az extracelluláris hírvivő molekulák szerint

A sejtek extracelluláris hírvivő molekulákkal kommunikálnak egymással. Ezek az extracelluláris hírvivő molekulák egy része csak rövid távolságot tud megtenni, ezért azokat a sejteket tudják stimulálni, amelyek közel vannak a hírvivő forrásához, másik részük képes az egész szervezetben vándorolni, így eléri a nagy távolságban lévő sejteket is és stimulálja azokat (lásd előadás ábra).

1. Autokrin jelátvitel: a sejt az általa termelt molekulákat az extracelluláris térbe juttatja. A hírvivő molekulák a kibocsátó sejt membránján lévő receptorokhoz kötődnek, ezáltal a hírvivőt kibocsátó sejtek saját magukat stimulálják.
2. Parakrin jelátvitel: egy sejtcsoport által termelt hírvivő rövid távolságot tesz meg az extracelluláris térben, így a közelben lévő sejtek (általában egyazon szervben belül) működését képes befolyásolni. Ezek a molekulák általában instabilak, vagy enzimatikusan lebomlanak illetve az extracelluláris mátrixhoz kötődnek.
3. Endokrin jelátvitel: a hírvivő molekulák a vérbe szekretálódnak és a vér útján szállítódnak a célszervbe. Így hosszú utat tesznek meg a keletkezés helyétől a felhasználás helyéig. Az endokrin hírvivőket hormonoknak is nevezik.
4. Juxtakrin jelátvitel: A sejt egy membránhoz kötött hormon prekuzort (inaktív molekula) termel, ami a szomszédos sejt felszínéhez kötődik. A molekula a szomszédos sejt receptorához való kötődést követően aktiválódik és jelet továbbít a célsejt citoplazmájába.
5. Neurokrin jelátvitel: Hasonló a parakrin jelátvitelhez, de ebben az esetben neuronok között megy végbe. A jelemolekulák a neuronok által szekretált neurotranszmitterek. A neurotranszmitterek keresztül vándorolnak a szinaptikus résen és a poszt-szinaptikus membránon lévő specifikus receptoraikhoz kötődnek.
6. Intakrin jelátvitel: egy endokrin inaktív prekuzor (Hi) egy szervben termelődik és felszabadul. Miután eléri a célszervet endokrin aktív hírvivővé alakul (Ha) és kifejti hatását a célsejten.
7. Kriptakrin jelátvitel: Hasonló a parakrin jelátvitelhez. A jelátviteli molekula egy zárt térbe szekretálódik a sejtek között, így nem tud eldiffundálni és csak a téren belüli sejteken tudja a hatását kifejteni.
8. Ferokrin jelátvitel: kémiai hírvivők, a feromonok, melyek a környezetbe szekretálódnak és az azonos fajhoz tartozó egyedekre hatnak. Szerepük van a párválasztásban és a szaporodásban.

9. Fotokrin jelátvitel: a fény befolyásolja a szem működését (retina) és a jeleket az agyba továbbítva szabályozza a szervezet napi ritmusát.

### A jelátviteli útvonalak főbb típusai- jelátvitel elemei

A jelátviteli utak mindig egy hírvivő molekula felszabadulásával kezdődnek. Ez az extracelluláris térből érkező molekula az **elsődleges hírvivő**. A sejtek felszínén található receptorok képesek felfogni ezeket az extracelluláris molekulákat/stimulusokat és ezáltal képesek választ is generálni. A receptorok felismerik és megkötik a ligandokat, azonban egy receptor csak egy fajta ligand megkötésére képes, vagyis specifikus az adott molekulára. A receptorhoz kapcsolódó ligand általában **konformáció változást** okoz a receptoron, így a jel továbbítódik a plazmamembránon keresztül a receptor intracelluláris része fele.

**Két fő útvonal** van, melyen keresztül az extracelluláris jel a sejt belsejébe továbbítódik, ahol is a sejt feldolgozza és a megfelelő módon válaszol rá (lásd előadás ábra).

1. Az extracelluláris ligand, az elsődleges hírvivő a receptorhoz kötődik, mely kötődés a receptor intracelluláris részének konformáció változásához vezet. A receptor maga, **nem rendelkezik enzimatis aktivitással**, így az aktív receptor magához vonz egy **jelátviteli molekulát (G fehérje)**, ami aktivál egy **effektor molekulát**. Az effektor molekula általában egy enzim, mely aktiválódást követően ún. **másodlagos hírvivőket** termel. A másodlagos hírvivők különböző jelátviteli molekulákat aktiválnak, melyek lehetnek enzimek pl. kinázok, vagy lehetnek transzkripciós faktorok. Az aktív enzim elindít egy aktivációs kaszkádot, mely több fehérjéből épül fel. Ez a kaszkád rövid vagy hosszú távon képes megváltoztatni a sejt aktivitását (pl. transzkripció, túlélés, fehérje szintézis, mozgás, metabolikus változások).
2. Az extracelluláris ligand, az elsődleges hírvivő a receptorhoz kötődik, így a receptor intracelluláris részének konformáció változását okozza. Az intracelluláris domén egy **enzim**, általában kináz, ami először saját magát foszforilálja specifikus aminosavakon (**autofoszforiláció**). A foszforilált aminosavakhoz ezt követően **jelátviteli fehérjék** kapcsolódnak. Az aktivált jelátviteli fehérjék jelátviteli kaszkádot alkotnak, melynek végén citoplazmatikus enzimek vagy transzkripciós faktorok aktiválódnak. A célfehérjék vagy a citoplazmában (rövid távú változás pl. emelkedett enzimaktivitás) vagy a sejtmagban fejtik ki hatásukat (hosszú távú hatás pl. különböző gének transzkripciós rátája változik meg).

A sejt és a jel típusától függően a célfehérjék által generált válasz érintheti a génexpressziót (transzkripció), megváltoztathatja a metabolikus aktivitást, a citoskeleton átszerveződését okozhatja, ezáltal megváltoztathatja a sejt mozgását, megváltoztathatja a membrán permeabilitását, aktiválhatja a DNS szintézist vagy akár sejthalált is okozhat.

Egy jelátviteli útvonal fehérjék sorozatából áll. Amikor a célfehérje aktiválódik, az megváltoztatja a sorban következő fehérje **szerkezetét**. A konformáció változást általában a **foszforiláció** váltja ki. A célfehérjék az aktivált receptortól kapják a jeleket, majd megváltoztatják a célsejt aktivitását. A teljes folyamatot, mely magába foglalja az extracelluláris hírvivőt, a receptort, jelátviteli fehérjéket (effektor), másodlagos hírvivőket (ha termelődnek) és a célfehérjéket, együttesen **jelátvitelnek** nevezzük.

### A jelátviteli útvonalak főbb típusai- általános jelmegszakító lehetőségek

1. A jel megszüntetésének egyik lehetséges módja az extracelluláris hírvivő molekula enzimatis lebontása **extracelluláris enzimekkel**.
2. A receptor kináz defoszforilálása gátolja a jeltovábbító fehérjék receptorhoz való kötődését.

3. A receptor **internalizálódhat** az ubikvitin ligáz hatására. Az enzim ubikvitin molekulákat köt a receptor intracelluláris részére. Az ubikvitiniláció hatására a receptor klatrin burkolt vezikulumban a sejtbe kerül. Ezt követően e burok leválik és az endoszóma egy lizoszómával egyesül. A receptor fehérje bizonyos esetekben recirkularizálódik a plazmamembránba, a ligand pedig lebontódik a lizoszómában.
4. A foszforilációs kaszkádot a **foszfatázok** tudják leállítani. Míg a kinázok egyetlen alegységből álló fehérjék, addig a foszfatázok általában rendelkeznek egy katalitikus és egy szabályozó alegységgel, ez utóbbi felelős a szubsztrát specificitásért (vagyis egy foszfatáz csak egy bizonyos kinázt tud inaktiválni, míg a kinázok több különböző fehérjét képesek aktiválni) (lásd előadás ábra).

### Extracelluláris hírvivők

Számos extracelluláris molekula működhet extracelluláris hírvivőként (elsődleges hírvivő) a célsejten a sejtfelszíni vagy az intracelluláris receptorokon (citoplazmatikus/sejtmagi) keresztül.

1. Kismolekulák, mint pl. az **aminosavak** és a származékaik, amelyek neurotranszmitterek vagy hormonok (dopamin, adrenalin, noradrenalin, acetilkolin, tiroid hormonok). A tiroid hormonok citoplazmatikus receptorokkal rendelkeznek, mivel képesek átjutni a plazmamembránra.
2. **Gázok, mint pl.** NO vagy CO. A gázok képesek átdiffundálni a plazmamembránra, így intracellulárisan hatnak. Gyorsan eldiffundálnak az extracelluláris térből, így csak parakrin úton hatnak.
3. **Szteroidok**, amelyek koleszterinből szintetizálódnak (pl. mineralokortikoszteroidok, glükokortikoszteroidok és androgének, ösztrogének). A szteroidok szintén képesek átjutni a plazmamembránra, mivel hidrofób molekulák. A szteroidok a nukleáris membránra lévő nukleáris szteroid receptorokhoz kötődnek.
4. **Polipeptidok és fehérjék**, mint a szekretált fehérjék, membrán fehérjék, az extracelluláris mátrix komponensei.
5. **Eikozanoidok** 20 szénatomos molekulák, melyek zsírsav oldalláncokat tartalmaznak (arachidon sav származékai). Szerepük van a gyulladási folyamatokban, fájdalomérzékelésben, vérnyomás szabályozásban és a véralvadásban.

### Receptorok

A receptorok megtalálhatók a sejt felszínén illetve a sejt belsejében is. A receptorok fő feladata az extracelluláris ligandok megkötése és a jel továbbítása a sejtbe. Ezt követően a sejt adekvát módon válaszol aktivitásának megváltoztatásával.

1. **GPCR-ek (7-TM (transzmembrán) fehérjék)** - G fehérjéhez kapcsolt receptorok: A receptor egy speciális GTPáz fehérjéhez kapcsolódik, ami képes az effektorot aktiválni. Az effektor enzim másodlagos hírvivőket termel, amelyek a jelet továbbítják a jelátviteli fehérjék felé.
2. **Enzim kapcsolt receptorok:** Ezek a receptorok a sejt extracelluláris felszínén találhatók, három doménből állnak: extracelluláris ligand kötő domén, transzmembrán domén, és intracelluláris domén, mely általában enzimaktivitással rendelkezik.
  - a) **RTK-Receptor protein tirozin-kináz** (vagy tirozin-kináz receptorok): A receptor jelátviteli fehérjéket gyűjt maga köré (dokkoló és adapter fehérjék), amiket a receptor kináz

doménje aktivál. Az adapter fehérjék további jelátviteli fehérjéket kötnek meg, amik továbbítják a jelet a célfehérjék felé foszforiláció útján.

- b) **Tirozin-kináz asszociált receptorok:** nincs saját enzimaktivitásuk, hanem citoplazmatikus tirozin-kinázokat kötnek meg a jeltovábbításhoz.
  - c) **Receptor szerin/treonin kinázok:** közvetlenül foszforilálnak szerin és treonin aminosavakat saját magukon és az asszociált késői génszabályozó fehérjéken.
  - d) **Hisztidin-kináz-asszociált receptorok:** két komponensű jelátviteli utat aktiválnak, amely során a kináz saját magát foszforilálja a hisztidineken, majd rögtön átadja a foszfát csoportokat egy második jelátviteli fehérjére.
  - e) **Receptor guanilát ciklázok:** közvetlenül katalizálják a ciklikus GMP termelődését a citoszólban.
  - f) **Receptorszerű tirozin foszfatázok:** specifikus intracelluláris jelátviteli fehérjéről távolítják el a tirozinokon lévő foszfát csoportokat. Azért „szerű” fehérjék, mert tényleges ligandjuk még nem ismert.
3. **Ligand-függő csatornák:** Ionok szállítását végzik a plazmamembránon (pl. cGMP függő kationcsatorna) vagy az endomembrán rendszerben (pl. IP<sup>+</sup>-függő Ca<sup>2+</sup> csatornák). Képesek megváltoztatni a membrán potenciált (depolarizáció vagy hiperpolarizáció) vagy megváltoztatják bizonyos citoplazmatikus enzimek aktivitását (CaM kinázok).
  4. **Szteroid hormon receptorok** (ligand-szabályozott transzkripció faktorok): A szteroid hormonok képesek átdiffundálni a plazmamembránon, mivel apoláros molekulák. A receptoraik a sejtmag membránjában található. A receptor-hormon komplex a sejtmagba transzlokálódik és specifikus hormon reszponzív elemekhez (HRE) kötődik bizonyos gének promóter szekvenciáján. A receptor-hormon komplex megváltoztatja bizonyos gének transzkripció rátáját (növeli vagy csökkenti). Ezeknek a géneknek főként a szénhidrát metabolizmusban, a nátrium és kálium ionok kiválasztásában, terhesség során és a nemi differenciáció során van szerepük.
  5. **B-sejt és T-sejt receptorok:** Egyedi módon hatnak, mivel az immunrendszerben van szerepük és a fertőzésekkel szembeni küzdelemben vesznek részt. Képesek idegen antigéneket felismerni és citoplazmatikus protein tirozin kinázokkal kapcsolódni.

### Másodlagos hírvivő rendszerek

A másodlagos hírvivő molekulákat receptor aktivált enzimek termelik. Az aktivációjuk indirekt folyamat, mivel egy G fehérje továbbítja a jelet az aktív receptortól az effektor enzimhez. A másodlagos hírvivőket három fő csoportba lehet sorolni:

1. Hidrofil molekulák:
  - a) vízdékvonyak
  - b) a citoszólban található
  - c) cAMP, cGMP, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>
2. Hidrofób molekulák:
  - a) vízben nem oldódnak
  - b) a plazmamembrán intracelluláris lemezéhez kapcsolódnak
  - c) vagy a membrán lemezek közé diffundálnak
  - d) DAG-diacilglicerol
  - e) PI-Foszfatidilinozitolok



3. Gázok:
  - a) átdiffundálnak a plazmamembránon
  - b) a citoszólban is diffúzióval vándorolnak
  - c) NO, CO, H<sub>2</sub>S

Az eukarióta sejtekben öt másodlagos hírvivő rendszer működik (lásd GPCR-ek további részletekért).

1. **cAMP rendszer:**
  - a) ligandok neurotranszmitterek (adrenalin, acetilkolin) és hormonok
  - b) (ACTH, ANP, FSH, glukagon)
  - c) továbbító molekulák: stimulátoros G fehérje és inhibitoros G fehérje
  - d) effektor enzim: adenilát cikláz
  - e) másodlagos hírvivő: cAMP
  - f) másodlagos effektor: protein kináz A
2. **cGMP rendszer:**
  - a) ligandok gázok (NO) illetve hormonok (ANP) vagy a fény (foton)
  - b) továbbító molekulák: Gt-transzducin (retina)
  - c) effektor enzim: guanilát cikláz
  - d) másodlagos hírvivő: cGMP
  - e) másodlagos effektor: protein kiáz G, cGMP-dependens kation
  - f) csatorna
3. **Tirozin kináz rendszer:**
  - a) ligandok növekedési faktorok (PDGF, EGF, IGF) vagy
  - b) hormonok (inzulin)
  - c) továbbító molekula: a receptor tirozin kináz doménje
  - d) másodlagos hírvivő: protein foszfatázok
4. **Foszfoinozitol rendszer:**
  - a) ligandok neurotranszmitterek (acetilkolin, adrenalin)
  - b) hormonok (TRH, GHRH, Oxitocin)
  - c) továbbító molekula: G<sub>q</sub>
  - d) effektor enzim: foszfolipáz C
  - e) másodlagos hírvivő: IP3 (inozitol-trifoszfát) és DAG
  - f) (diacilglicerol)
  - g) másodlagos effektor: Ca<sup>2+</sup> and protein kináz C
5. **Arachidonsav rendszer:**
  - a) ligand: hisztamin
  - b) továbbító molekula: G protein
  - c) effektor: foszfolipáz A
  - d) másodlagos hírvivő: arachidonsav
  - e) másodlagos effektor: lipoxigenáz, cikloxigenáz

### 20.3. KOMMUNIKÁCIÓ A JELÁTVITELI ÚTVONALAK KÖZÖTT

A jelátviteli utak konvergálhatnak, divergálhatnak, és keresztezhetik egymást, így szabályozhatják egymást a közös jelátviteli komponenseken keresztül. **Konvergencia** során különböző sejt felszíni receptorok szabályozzák ugyanazt az effektor molekulát a sejtben. Egyazon ligandtól érkező jelek **divergálhatnak**, így különböző effektorokat, ezáltal pedig különböző jelátviteli utakat aktiválhatnak. A különböző jelátviteli utak nagyszámú jelátviteli fehérjét aktiválnak, mellyel hosszú vagy rövid távú változást okoznak a sejtben. Mivel a jeleket a sejt oda-vissza szállíthatja az utak között, így **keresztezhe-**

**tik** egymást. Az eltérő utakban jelen levő jeltovábbítók szabályozzák vagy befolyásolják az effektor enzimek aktivitását, az intracelluláris hírvivők szintézisét és a jelátviteli fehérjék aktivitását.

A konvergenciára egy nagyon jó példa a GPCR és az RTK közötti kommunikáció a sejt felszínén. A GPCR egyik típusa aktiválódik ligand kötés által, így aktiválódik a hozzá kapcsolódó Gq fehérje. A Gq fehérje a foszfolipáz C effektor enzimet aktiválja, így az két különböző másodlagos hírvivőt termel, az IP<sub>3</sub>-at és a DAG-ot. Az IP<sub>3</sub> molekulák az IP<sub>3</sub> receptorokhoz kötődnek a sima felszínű endoplazmás retikulumon, és kinyitják a Ca<sup>2+</sup> ion csatornákat, ezáltal növelik a citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> koncentrációt. A DAG a protein kináz C-t aktiválja. A ligand által aktivált RTK konformáció változáson esik át, így aktiválódik az intracelluláris kináz doménje. A receptor különböző effektor fehérjéket aktivál (divergencia). Az egyik ilyen effektor a foszfolipáz C ugyanazokat a másodlagos hírvivőket termeli, mint a GPCR által aktivált effektor (lásd előadás ábra).

Egy másik példa a konvergenciára három különböző receptor (integrin, GPCR, RTK) aktivációja három eltérő ligand kötődése által. Az aktív receptorok ugyanannak a dokkoló fehérjének, a Grb2-nek biztosítanak kötőhelyeket. Ez a fehérje az Sos/GEF adapter fehérjét köti meg, ami a Ras GTPáz aktivációjáért felelős (lásd előadás ábra).

A divergencia során egyetlen jel képes több, különböző jelátviteli útvonalat aktiválni. Az IP<sub>3</sub>-kináz PIP<sub>2</sub> molekulákat foszforilál a plazmamembránban, így PIP<sub>3</sub> molekulákat generál, melyek kapcsolódási pontok a PH (pleckstrin homológia domén) doménnel rendelkező fehérjék számára. A PDK-1 (fodzfadil dependens kináz-1) és a PKB/Akt (protein kináz B) képes a PIP<sub>3</sub> molekulákhoz kötni. A PDK-1 foszforilálja a PKB molekulát, majd a PKB fehérje autofoszforilálja a kináz doménjét. A foszforiláció a PKB aktiváció feltétele. A PKB különböző folyamatokat szabályoz a sejtben pl. fehérjeszintézis, glikogén szintézis, glükóz felvétel.

A cAMP molekulát használó útvonalak keresztezik egymást (lásd előadás ábra). Az epidermális növekedési faktor receptort az EGF kötődés aktiválja. A receptor kináz doménje a konformáció változás következtében autofoszforilálja a tirozin aminosavait. A foszfortirozinok megkötik a Grb2-Sos/GEF fehérje komplexet. Az Sos aktiválja a Ras-MAP kináz kaszkádot, ami végső soron foszforilálja a CREB transzkripciós faktort a szerin oldalláncokon. Az aktív transzkripciós faktor a DNS láncok specifikus helyeihez kötődik. A ciklikus AMP a cAMP függő kinázt, a PKA-t aktiválja, így gátolja a jelátvitelt a Ras és a Raf fehérjék között, így inaktívódik a MAP kináz kaszkád. Ugyanakkor a PKA képes ugyanazt a CREB transzkripciós faktort aktiválni foszforiláció útján. Így a két útvonal összekapcsolódik egy fontos effektor molekula útján, a CREB transzkripciós faktoron keresztül.

## 20.4. G FEHÉRJÉHEZ KAPCSOLT RECEPTOROK

A GPCR elnevezés a receptor és a heterotrimer G fehérje közötti kapcsolatból származik. A receptor önmaga nem rendelkezik enzimatisz aktivitással. A G fehérje szerepe a receptor és az effektor közötti kapcsolat megteremtése. Több mint 700 humán GPCR ismert, egerekben pedig még ennél is több, 1000 található. Minden GPCR-nek hasonló a szerkezeti felépítése. Az alap GPCR tartalmaz egy extracelluláris, egy transzmembrán és egy intracelluláris domént. A receptor extracelluláris része három hurokdoménből áll, melyek együttesen alkotják a ligand kötő helyet. A GPCR-ek egyik fő típusa hét transzmembrán doménnel (TM) rendelkezik. Ezek a TM domének  $\alpha$ -hélixek. A ligandkötést követően a TM domének közelebb kerülnek egymáshoz, így megváltozik az intracelluláris hurokdomének elrendeződése. Ez a konformáció változás szükséges a G fehérje kötődéséhez.

## A GPCR-ek osztályozása

A GPCR-ek osztályozása a szekvencia homológia és az evolúciós kapcsolatok alapján történik. A GPCR-eket hat csoportba soroljuk:

- A osztály: Rodopszin-szerű receptorok (pl. szagló receptorok, vizuális rodopszin, prosztaglandin receptor, amin receptorok (adrenalin, szerotonin, dopamin), melatonin receptor és tachikininek)
- B osztály: Szekretin-szerű receptorok (pl. szekretin, glukagon, növekedési hormon releasing hormon (GHRH), vazóaktív intesztinális peptid (VIP))
- C osztály: Glutamáthoz kötődő receptorok
- D osztály: Gomba feromon receptorok
- E osztály: cAMP receptorok
- F osztály: Archeák (archeabaktériumok) opszin receptorok

Az utolsó három osztály az emlős sejtekben hiányzik, de ezekben a sejtekben további két receptor család is megtalálható, amik az előző csoportosításba nem férnek bele:

1. Adhéziós receptor család
2. Íz érzékelő receptor család

## GPCR-rel interakcióba lépő fehérjék (GIP fehérjék)

Ezek a fehérjék képesek **módosítani a receptor funkcióját** azáltal, hogy megváltoztatják a szerkezetét vagy a ligand kötő helyet:

- a ligand kötő helyhez kapcsolódva megváltoztatják a ligand affinitását
- gátolják a receptor dimerizációját vagy oligomerizációját
- szabályozzák a receptor elhelyezkedését, beleértve a plazmamembránba való bejutását vagy eltávolítását onnan
- olyan jelátviteli fehérjék kapcsolódását segítik, amik gátolják a receptort a G fehérjéhez való kötődésében

## G proteinek

A G fehérjék két fő típusa a heterotrimer G fehérjék és a monomer G fehérjék (lásd később a tirozin kináz receptoroknál). A heterotrimer G fehérjék obligát mediátorai a GPCR-n keresztüli jelátvitelnek, ezek a fehérjék továbbítják a jelet a receptorról az effektor enzimre.

### A heterotrimer G fehérjék tulajdonságai

(lásd előadás ábra)

- Három alegységből állnak:  $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$
- Mindhárom alegység a plazmamembránhoz kötődik
- Az  $\alpha$  alegység a katalitikus alegység, GTPáz aktivitással (megköti és hidrolizálja a GTP-t GDP-re+Pi-re)
- A  $\beta\gamma$  alegységek a regulátoros alegységek
- Amikor a regulátoros alegységek megkötik a GDP-t hordozó  $\alpha$  alegységet a G fehérje inaktív állapotban van
- A  $G\alpha$  alegység nukleotid kötő helye hurokdoménekből áll, melyek a hat  $\beta$ -lemez széléről ágaznak le
- Három kapcsoló domén és további öt G régió elmozdulása szükséges ahhoz, hogy a GDP GTP-re cserélődjön.

- G-1 régió magába foglal egy glicinben gazdag foszfát kötő helyet (P-hurok) és egy konzervált lizin aminosavat, amit egy szerin követ
- G-2 régió az I-es kapcsoló doménben található. Rendelkezik egy központi treoninnal, melynek a GTP hidrolízist követő szerkezeti visszarendeződésben van szerepe
- G-3 régió a II-es kapcsoló domén része. A konzervált glicin amidja koordinálja a  $\gamma$ -foszfátot
- G-4 régió részben felelős a guanin bázis megkötéséért
- G-5 régió segíti a guanin bázis felismerését és megkötését
- A GTP hidrolízishez egy vízmolekula nukleofil támadása szükséges a GTP terminális foszfátján (lásd előadás ábra)
- II-es kapcsoló domén ( $G\alpha$ ) tartalmaz egy konzervált glutamint, ami segíti a vízmolekula támadását az aktív helyen
- III-as kapcsoló domén stabilizálja a II-es kapcsoló domén kinyúló hélixét a GTP kötő konformációban. A GTP kötő konformációban a III-as kapcsoló domén oldalláncai a II-es domén megfelelő oldalláncaival alakít ki kapcsolatokat.
- A  $\beta$  alegység tartja fenn a G fehérje stabilitását
- A  $\beta$  alegység rendelkezik egy speciális  $\beta$ -propeller szerkezeti elemmel, ami ismétlődő szekvenciákból ún. WD-ismétlődésekből épül fel (lásd előadás ábra)
- A  $\beta$ -propeller gyakori szerkezeti motívum a fehérje-fehérje interakciókban szerepet játszó doménekben

#### A heterotrimer G fehérjék működése

(lásd előadás ábra)

1. GPCR megköti a ligandját és aktiválódik
2. G fehérje az aktív receptor intracelluláris részéhez kötődik
3. az  $\alpha$  alegység felszabadul a regulátoros alegységekről
4. az  $\alpha$  alegység kicseréli a GDP-t egy új GTP-re és aktiválódik
5. az aktív katalitikus alegység az effektor enzimhez kötődik és aktiválja azt
6. az effektor enzim másodlagos hírvivőket termel, amíg az  $\alpha$  alegység hidrolizálja a GTP-t
7. az  $\alpha$  alegység elhasítja a GTP-t és leválik az effektorról
8. az effektor enzim inaktiválódik
9. az  $\alpha$  alegység visszakötődik a regulátoros alegységekhez
10. a heterotrimer G protein kész a következő aktivációs ciklusra

### Heterotrimer G protein izoformák

A heterotrimer G proteineknek öt fő családja létezik: Gs, Gi, Gq, G<sub>12</sub>, G<sub>βγ</sub>. További csoportosításuk az α alegység aktivitásán alapszik: Gs, Golf, Gi, Go, Gt, Gq, G<sub>12</sub> a legfontosabb típusok (lásd táblázat).

Család	Alegység izoforma	Szöveti elrendeződés	Effector enzimek és csatornák
Gs	α <sub>s</sub>	Általános	Adenilát cikláz ↑
	α <sub>olf</sub>	Agy/szagló neuronok	Adenilát cikláz ↑
Gi	α <sub>i</sub>	Széles elterjedés, neuronokban is	Adenilát cikláz ↓ Ca <sup>2+</sup> csatornák ↓ K <sup>+</sup> csatornák ↑
	α <sub>o</sub>	Neuronok, agy, szív	Adenilát cikláz ↓ Ca <sup>2+</sup> csatornák ↓ K <sup>+</sup> csatornák ↑
	α <sub>z</sub>	Mellékvese kromaffin sejtjei, neuronok, vérlemezkék	Ca <sup>2+</sup> csatornák ↓ K <sup>+</sup> csatornák ↑
	α <sub>t</sub>	Retina	cGMP foszfodiészteráz ↑
Gq	α <sub>q</sub>	Általános	foszfolipáz Cβ ↑ p63-RhoGEF ↑ Tirozin kináz ↑ K <sup>+</sup> csatorna ↑
	α <sub>11</sub>	Általános	p63-RhoGEF ↑
	α <sub>14</sub>	Sztóma, epitéliális sejtek	Tirozin kináz ↑
	α <sub>15</sub>	Mieloid sejtek	K <sup>+</sup> csatorna ↑
	α <sub>16</sub>	Mieloid sejtek	
G <sub>12</sub>	α <sub>12</sub>	Általános	foszfolipáz D ↑
	α <sub>13</sub>	Általános	foszfolipáz Cε ↑
Gβ/γ			foszfolipáz Cβ2 Adenilát cikláz ↑

### G fehérje szabályozók

(lásd előadás ábra)

Számos fehérje képes a G fehérjékhez kötődni. Ezek között vannak olyanok, amik aktiválják és olyanok, amik gátolják a G fehérjéket.

1. RGS/GAP: G fehérje jelátvitelt szabályozók (Regulators of G protein signaling) vagy GTPáz aktiváló fehérjék (GTPase activating proteins) negatív regulátorai a G fehérjéknek. Amikor a G fehérje GDP-t köt akkor inaktív, ha GTP-t köt, akkor aktív. A GAP fehérjék növelik a GTP hidrolízist, ezáltal gyorsítják a G fehérje inaktivációt. A GAP fehérjék specifikusak az α alegységre. A humán genomban kb. 25 RGS fehérje kódolt, mindegyik meghatározott G fehérjékkel tud csak kapcsolódni. Gyakran egy (+) töltésű **arginin** a GAP fehérjé-

ből a katalitikus alegységbe épül és segíti a tranzíciós átmenet stabilizálását. Ebben a folyamatban az arginin a GTP hidrolízis során annak terminális foszfátcsoportjában lévő negatív töltésű **O atomokkal** lép interakcióba.

2. GEF: Guanin nukleotid kicserélő faktorok segítik a GDP/GTP kicserélődést. Így a GEF fehérjék pozitív szabályozói a G fehérjéknek. A GEF faktoroknak köszönhetően a G fehérjék gyorsabban le tudják cserélni a GDP-t, így a fehérje aktív marad. GEF faktorok általában indirekt hatnak: összekötik a G fehérjét az aktív receptorral. A GEF fehérjéknek kulcsfontosságú szerepe van a monomer G fehérjék aktivációjában (lásd később).
3. AGS: G fehérje jelátvitel aktivátorok (Activators of G protein signaling) a GPCR-től függetlenül hatnak a G fehérjékre. A fehérjék egy részének GEF aktivitása van.

## 20.5. A G FEHÉRJÉHEZ KAPCSOLT RECEPTOROKON KERESZTÜLI JELÁTVITEL

1. Gs- A ligand (pl katekolaminok, glukagon) a receptorhoz kötődik, a receptor intracelluláris része konformáció változáson esik át. A Gs-protein hozzákötődik a receptorhoz és az  $\alpha$  alegység leválik a regulátoros alegységekről. Az  $\alpha$  alegység lecseréli a GDP-t egy GTP-re, majd az effektor enzimhez, az adenilát cikláshoz kötődik. Az **adenilát cikláz** egy nagyméretű, több transzmembrán doménnel rendelkező fehérje, melynek a katalitikus doménje a plazmamembrán citoszólikus oldalán. Az emlősökben nyolc izoforma létezik, ezek többsége G fehérjék és  $\text{Ca}^{2+}$  által szabályozott. Az enzim **cAMP** másodlagos hírvivőt termel ATP-ből. A cAMP molekulák a **protein kináz A** másodlagos effektort aktiválják (lásd később), ami foszforilálja a citoplazmatikus enzimeket és a sejtmagban lévő transzkripciós faktorokat.
2. Gi- A G fehérjék ezen típusa gátolja az adenilát cikláz aktivitását, ezáltal csökkenti a citoplazma cAMP koncentrációját. Az inhibitoros G fehérje regulátoros alegységei közvetlenül szabályoznak kation csatornákat a plazmamembránban. Például a nervus vagus által kibocsátott acetilkolin csökkenti mind a szívritmust mind pedig az összehúzódás erősségét. Ezt a hatást a muszkarinos acetilkolin receptorok (GPCR) váltják ki a Gi fehérjék aktiválásával. A  $\beta\gamma$  alegységek a szívizomsejtek plazmamembránjában lévő káliumcsatornákhöz kötődnek és nyitják őket. A csatornák nyitása nehezíti a sejt depolarizációját, így hozzájárulnak az acetilkolin szívizomra gyakorolt gátló hatásához.
3. Gq- A receptorok, melyek a Gq fehérjével működnek az inozitol foszfolipid jelátviteli utat aktiválják (lásd előadás ábra). A Gq aktiválja a **foszfolipáz C- $\beta$**  enzimet, ami két különböző hatású másodlagos hírvivőt generál: **inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP3)** és **diacilglicerol (DAG)**. Mindkettő a PIP2 (foszfatidil inozitol 4,5 biszfoszfát) hasításával keletkezik. Az IP3 vízoldékony molekula, kis intracelluláris mediátorként hat. Elhagyja a plazmamembránt és átdiffundál a citoszólón. Amikor eléri az endoplazmás retikulumot, akkor az **IP3-függő kalcium csatornákhöz** kötődik (IP3 receptorok). Az ER-ben tárolt  $\text{Ca}^{2+}$  ionok kiáramlanak a csatornán a citoszólóba. A citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció-emelkedés jelet generál, azáltal, hogy megváltoztatja a  $\text{Ca}^{2+}$  szenzitív fehérjék aktivitását (lásd később). A DAG a plazmamembránban marad és aktiválja a kalcium-függő **protein kináz C (PKC)** molekulákat. A PKC molekulák transzlokálódnak a citoszólóból a plazmamembrán citoszólikus oldalára. A PKC molekulák a kalcium, DAG és a membrán foszfolipid, a foszfatidilszerin molekulák aktiválhatják. A PKC a sejtípustól függően különböző célfehérjéket foszforilálhatnak. A PKC-nak három fő osztálya létezik: **konvencionális PKC** molekulákat  $\text{Ca}^{2+}$  és DAG aktiválja, **új PKC enzimek** DAG által aktiváltak, illetve az **atipikus PKC** molekulák, amiknek a  $\text{Ca}^{2+}$  és DAG molekulákon kívül egyéb molekulák is aktiválják. A PKC enzimek horgonyzó vagy védőfehérjékhez kapcsolódnak a sejt különböző kompartmentjeiben. Ezek a fehérjék határozzák meg, hogy mely szubsztrátokat foszforilálja a PKC. Általános célmolekulái a



glukagon receptorok, EGF receptor, inzulin receptor,  $\beta$ -adrenerg receptor stb.. A DAG molekulák tovább hasadhatnak arachidonsavvá, ami jelátviteli molekulaként vagy más kisméretű szignál lipidek szintézisére használódik fel, mint az eikozanoidok (pl. prosztaglandinok).

4. Gt- A transzducin egy speciális G fehérje, ami csak a retinában található meg, és kulcsfontosságú a látás folyamatában. A transzducin receptora (GPCR) a rodopszin. A rodopszin két részből áll: cisz-retinal és opszin. A rodopszin ligandja nem egy molekula, hanem a fény, a fotonok. Egy foton megkötése után a cisz-retinal transz retinallá alakul, ami az opszin konformáció változásához vezet. Ezt követően a receptor TM doménjei között található ionos kötések felhasadnak. A TM domének átrendeződése az intracelluláris hurkok konformáció változását okozza, így a receptor kész a transzducin megkötésére. A transzducin  $\alpha$  alegysége aktiválja a ciklikus GMP foszodiészterázt, ami hidrolizálja a ciklikus GMP-t, így a citoszól cGMP szintje csökken. Ez a cGMP koncentrációesés csökkenti a **cGMP-kapuzott kation csatornákhöz** kötődő cGMP mennyiségét, így a csatornák zárulnak. A csatornák záródása a plazmamembrán hiperpolarizációjához vezet. A vizuális válasz a *leggyorsabb* G fehérje mediálta válasz a gerincesekben. A fototranszdukciós apparátus a pálcikák (fekete-fehér látás) külső szegmensében található, ami korongok oszlopából áll, mindegyiket membrán határolja, amiben beágyazva található a fényérzékeny rodopszin molekula. A külső szegmens körüli membrán tartalmazza a cGMP-függő kation csatornákat (lásd előadás ábra). Ezek a csatornák a citoszólikus cGMP koncentráció közvetlen szabályozása alatt állnak. A cGMP koncentráció függ a transzducin és a ciklikus foszfodiészteráz aktivitásától. A **hiperpolarizáció** a korong membránjában lévő rodopszin molekulák fény-indukálta aktivációjától függ, a csökkenő cGMP koncentráció zárja a kation csatornákat a környező plazmamembránban. A vizuális válasz negatív visszacsatolással szabályozódik. A **rodopszin kináz** (RK) foszforilálja az aktív rodopszin citoszólikus végén lévő szerin aminosavakat, mely folyamat részben gátolja a transzducin aktiválását. **Arresztin** molekulák kötődnek a foszforilált rodopszinhoz és elindítja az internalizálását. **Az RGS fehérje** szintén képes az aktív rodopszinhoz kötődni és gyorsítani a GTP hidrolízist, így a rodopszin inaktiválódik. Végül a kation csatornák, amik a fény hatására záródnak, nemcsak nátriumra, hanem **kalciumra** is permeabilisek. Amikor a csatornák záródnak, a normál kalcium beáramlás gátolt, így a citoszól kalcium koncentrációja csökken. Ez stimulálja a **guanilát ciklázt**, hogy újra szintetizálja a cGMP molekulákat. A guanilát cikláz aktiválásában egy specifikus kalcium szenzitív fehérje (nem a kalmodulin!) vesz részt. Ez a fehérje inaktív, mikor kalciumot köt, aktív mikor nem. Így akkor aktiválja az enzimet, amikor a kalcium szintje esik a fotoreceptor citoszóljában.
5. Golf- specifikus GPCRek a szagló receptorok (neuronok), amik képesek szaganyagokat felismerni. Ezek a receptorok csak a sejt felszínéről kinyúló csillók felszínén találhatóak meg (lásd előadás ábra). A receptorok egy szaglás specifikus G fehérjével, a Golf fehérjével működnek. Ez a G fehérje aktiválja az adenilát ciklázt, ami növeli a cAMP szintet. A cAMP nyitja a **cAMP-függő kation csatornákat**, így a nátrium ionok beáramlanak a sejtbe ezzel depolarizálják a szagló neuront és idegi impulzust generálnak (akciós potenciál). Az idegi impulzus végigfut az axonon az agyba.

### cAMP és protein kináz A

A cilikus AMP (cAMP) kis, intracelluláris hírvivő molekula mind a prokarióta, mind pedig az eukarióta sejtekben. A normál szintje a citoplazmában  $10^{-7}$  M, azonban egy extracelluláris jel a GPCR-en keresztül akár húszszorosára is emelheti másodperceken belül (lásd előadás ábra). A ciklikus AMP ATP-ből keletkezik a plazmamembránhoz horgonyzott **adenilát cikláz** enzim működése következtében, **ciklizációs reakcióban**. A cAMP gyorsan és folyamatosan bontódik le a **cilikus AMP foszodiészteráz** enzim által katalizált reakcióban: hidrolizálja a cAMP molekulákat **adenozin 5'**-

**monofoszfáttá** (5'-AMP) (lásd előadás ábra). A ciklizációs reakció során két foszfát csoport távolítódik el, ezt nevezzük **pirofoszfátnak**. A **pirofoszfátáz** enzim pedig hidrolizálja a pirofoszfátot foszfáttá. Tehát a cAMP instabil molekula és specifikus foszfodiészteráz enzimek bontják le. Eltérő sejtípusok különböző módokon reagálnak az emelkedő cAMP koncentrációra. A sejtválasz függ az aktivált GPCR-től (lásd táblázat). A pillanatnyi cAMP szint a sejtben az aktív Gs és Gi fehérjék számától függ, mivel a Gs aktiválja, a Gi pedig gátolja az adenilát cikláz (lásd előadás ábra).

A cAMP az általa aktivált **cAMP-függő protein kináz A** (PKA) enzimen keresztül hat a sejtben. Ez a kináz enzim a célfehérjék szerin és treonin aminosavait foszforilálja. Ezek a fehérjék lehetnek jelátviteli és effektor fehérjék is. A célfehérjék sejtípusonként változnak, ez a fő oka, hogy a cAMP eltérő módon hathat a sejtekben. Inaktív állapotban a PKA két katalitikus és két regulátoros alegységből (RI és RII) épül fel. Az inaktív PKA holoenzim szubcelluláris elhelyezkedése is eltérő lehet. Az RI alegységeket tartalmazó PKA többnyire citoszolikus elhelyezkedésű, míg az RII tartalmú PKA molekulák nagy része membránokhoz és sejtalkotókhoz kötődik. A cAMP kötődése a regulátoros alegységekhez megváltoztatja azok szerkezetét, így képesek leválni a komplexről (lásd előadás ábra). A felszabadult katalitikus alegységek pedig aktiválódnak és a célfehérjéket foszforilálják. Az RII regulátoros alegységek (A-kináz) határozzák meg az enzim elhelyezkedését a sejtben. A ciklikus AMP-függő protein kináz horgonyzó fehérjék (AKAP) membránokhoz, mikrotubulusokhoz és más subcelluláris elemekhez kapcsolódnak, így összekötik a regulátoros alegységeket a citoskeletális elemekkel, illetve a sejtalkotók membránjaival (lásd előadás ábra). Néhány AKAP fehérje képes más jelátviteli fehérjékhez kötődni, így részt vesz a jelátvitelben. Az RII-típusú PKA sokkal hatékonyabb, mivel közelebb helyezkedik el a szubsztrátokhoz, illetve az AKAP képes a **foszfodiészterázokat** is megkötni, így gyorsan eliminálni tudja a cAMP molekulákat és megállítja a jelátvitelt. Így módon a cAMP-re adott válasz erős, rövid és lokális PKA aktiváció. Az RII-PKA molekuláknak kisebb a cAMP affinitása, mint a RI-PKA-nak. A RI-PKA 2-8-szor kisebb cAMP szint hatására is aktiválódik, mint a RII-PKA. Ennek oka, hogy a RII tartalmaz egy autofoszforilációs pszeudoszubsztrát összekötő szekvenciát a dimerizációs domén és a cAMP modul között. A katalitikus alegységek foszforilálják az RII doméneket, így azok nem képesek visszakötődni a PKA-hoz, csak akkor, ha előbb defoszforilálódnak.

#### A szomatosztatin hatása a transzkripcióra –példa a PKA aktivitásra

(lásd előadás ábra)

Egy extracelluláris hírvivő molekula kötődése a megfelelő GPCR-hez aktiválja az adenilát cikláz enzimet a stimulátoros G fehérjén keresztül, és növeli a cAMP koncentrációt a citoplazmában. A cAMP szint emelkedése aktiválja a PKA enzimet, majd a felszabaduló katalitikus alegységek bejuthatnak a sejtmagba, ahol aktiválják a CREB transzkripció faktorát. A foszforilált **CREB** koaktivátorokat, CBP fehérjéket gyűjt maga köré, így stimulálja a transzkripciót. A szomatosztatin gén szabályozó régiója tartalmaz egy rövid felismerési szekvenciát, cAMP reszponzív elemet (CRE), mely egyébként számos más gén szabályozó régiójában is jelen van. A CREB felismeri ezt a szekvenciát a promóter régió és hozzá kötődik. Így a CREB képes átalakítani a rövid cAMP jelet egy hosszú távú változássá a sejtben. Ez a folyamat pl. az agyban fontos szerepet játszik a tanulásban és a memória kialakulásában.

#### Ca-jel

A Ca jelet az **IP3** másodlagos hírvivő hozza létre. Ez a molekula a PIP2 hasításával jön létre a plazmamembránban. Mivel az IP3 vízoldékony, a plazmamembránról leválva átvándorol a citoplazmán és az ER IP3 receptoraihoz kapcsolódik. Az **IP3 receptorok** kalcium csatornák, amikor nyitva vannak a Ca ionok kijutnak az ER-ből a citoszólba, így Ca jelet hoznak létre. A Ca<sup>2+</sup> ionok jelként hatnak, mivel a koncentrációjuk a citoplazmában nagyon alacsony (~10<sup>-7</sup> M), míg az extracelluláris térben (~10<sup>-3</sup> M) és az ER belsejében magas. Így egy nagy Ca **grádiens** jön létre a citoszól és plazmamembrán külső felszíne valamint az ER között. Az emelkedő Ca szint a citoszólban aktiválja a **Ca<sup>2+</sup>-reszponzív fehérjéket**.



Az IP<sub>3</sub> receptorok mellett a Ca<sup>2+</sup> ionok a **rianodin receptorokon** (elnevezésük a növényi alkaloiddal, a rianodinnal szembeni érzékenységükből származik) keresztül is bejuthatnak a citoszólba. A rianodin receptorokat a Ca<sup>2+</sup> ionok kötődése nyitja, így erősítik a Ca jelet. A Ca<sup>2+</sup> ionok szintén aktiválják az IP<sub>3</sub> receptorokat, de csak IP<sub>3</sub> jelenlétében, vagyis a Ca szignál rendelkezik **pozitív visszacsatolással**, ami tovább növeli a citoszólikus Ca koncentrációt. A nagyon magas Ca szint inaktíválja a receptorokat/csatornákat, így megállítja a Ca ionok további kiáramlását az ER-ből.

Számos mechanizmus létezik, amellyel a sejt fenntartja az alacsony citoszólikus Ca<sup>2+</sup> koncentrációt (lásd előadás ábra):

1. **Ca<sup>2+</sup>-pumpa** a plazmamembránban ATP hidrolíziséből származó energiát használja fel a Ca<sup>2+</sup> ionok citoszólból történő kijuttatásához.
2. Az izom és idegsejtek rendelkeznek további Ca<sup>2+</sup> transzport fehérjével. Ez a Na<sup>+</sup> által hajtott Ca<sup>2+</sup> kicserélő csatorna a plazmamembránban helyezkedik el, Ca<sup>2+</sup>-ot juttat ki és Na<sup>+</sup> ionokat szállít a sejtbe.
3. A **Ca<sup>2+</sup> pumpa** az ER membránban: ez a csatorna lehetővé teszi, hogy az ER nagy mennyiségű Ca<sup>2+</sup> iont vegyen fel a citoszólból a koncentráció grádiens ellenében, akkor is, ha a citoszól Ca<sup>2+</sup> koncentrációja nagyon alacsony.
4. **Alacsony affinitású, nagy kapacitású Ca<sup>2+</sup> pumpa:** a mitokondrium belső membránjában található, melynek fő szerepe a Ca<sup>2+</sup> szignál limitálása és megszüntetése.
5. **Kalciumkötő fehérjék:** Ca<sup>2+</sup> ionokat kötnek meg és továbbítják a jelet a célfehérjékhez.

Ha a sejt citoszólikus Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának változását figyelemmel kísérjük, akkor látható, hogy a kezdeti Ca jel kicsi és csak egy vagy néhány helyre korlátozódik a sejtben belül. Ezeket a Ca csúcsokat az ER Ca csatornáinak lokális nyitása okozza. Ha az extracelluláris jel elég erős és folytonos, akkor a lokális válasz szétterjed a citoszólban. Egy Ca<sup>2+</sup> csúcsot gyakran több másik csúcs követ. A Ca<sup>2+</sup> **oszcilláció** addig marad fenn, amíg a receptorok aktívak a sejt felszínén. Az oszcillációk az **IP<sub>3</sub> receptorok** és a **rianodin receptorok** Ca<sup>2+</sup> kötésétől függenek. A felszabadult Ca<sup>2+</sup> ionok további Ca felszabadulást okoznak mindkét receptoron keresztül, egészen addig, amíg a Ca szint olyan magas lesz, ami már gátolja a további Ca<sup>2+</sup> felszabadulást (lásd előadás ábra). A Ca<sup>2+</sup> oszcilláció frekvenciája tükrözi a stimulus erősségét, ez a frekvencia tulajdonképpen a sejt frekvencia-függő válasza (lásd előadás ábra).

A citoszólikus Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjék továbbítják a Ca-jelet a célfehérjékhez. A legfontosabb ezek közül a **kalmodulin**, ami minden eukarióta sejtben megtalálható, a mennyisége elérheti az összfehérje mennyiség 1%-át. A kalmodulin egy többfunkciós intracelluláris **Ca<sup>2+</sup> receptor**. Egy erősen konzervált, polipeptidláncból áll, négy nagy affinitású Ca<sup>2+</sup>-kötő hellyel (lásd előadás ábra). A molekula súlyzó alakú, két globuláris fejjel rendelkezik, amelyek számos célfehérjéhez képesek kapcsolódni. A globuláris feji régiókat egy hosszú α-hélix köti össze, ez a hélix felelős a különböző konformációk kialakításáért, attól függően, hogy milyen célfehérjéhez kötődik a molekula. Mindkét feji résznek két-két Ca<sup>2+</sup>-kötő doménje van. Amikor Ca<sup>2+</sup>-ot kötnek, konformáció változáson esnek át. Mivel a fehérje a Ca-szint emelkedésére válaszol, így legalább két Ca<sup>2+</sup> ion szükséges a szerkezeti változáshoz. **Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin** fehérjének nincs enzimatis aktivitása, így a hatását más fehérjéken a kapcsolódás révén fejt ki. Az aktív Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin a célfehérjéhez köt, majd a kalmodulin szerkezete ennek hatására tovább változik. A kalmodulin enzimeket és membrán fehérjéket szabályoz (pl. Ca<sup>2+</sup>-pumpa a plazmamembránban).

Mivel a kalmodulin nem rendelkezik enzimatis aktivitással, a szerepe a Ca-jelátvitelben **indirekt**. A Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin aktiválja a szerin/treonin protein kinázokat, az ún. **Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependens kinázokat** (CaM-kinázok). Néhány CaM-kináz génszabályozó fehérjéket (pl. CREB) foszforilál, így aktiválja vagy gátolja bizonyos gének transzkripcióját.

A CaM-kináz II a legtöbb emlős sejtben megtalálható, de nagy mennyiségben főként az idegrendszerben lokalizálódik. Az egyes területeiben az összfehérje mennyiség akár 2%-át is eléri, magasan koncentrált a szinapszisokban. A CaM-kináz II-nek két fő funkciója ismert:

1. Molekuláris memóriában résztvevő fehérje. Aktív állapotba kerül, amikor a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin hozzá kötődik, és a kalcium szignál lecsengése után is aktív marad.
2. Az enzim képes az ún. intrinszik memóriáját használni a Ca-oszcillációk frekvenciájának dekódolására. Ez a tulajdonság nagyon fontos a szinapszisokban. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintek emelkedése a poszt-szinaptikus sejtben a neuronális aktivitás következménye, ami hosszútávú változáshoz vezethet a szinapszis működésében.

A CaM-kináz II egy nagyméretű fehérje, mely 12 alegységből épül fel. A  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin hiányában az enzim inaktív. Ebben az állapotban az enzim katalitikus doménjéhez a fehérje inhibitoros doménje kapcsolódik (lásd előadás ábra). A CaM-kináz a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin kötődése után **foszforilálja** magát (autofoszforiláció) az **inhibitoros doméne**n, így az nem képes a katalitikus doménhez kapcsolódni, még akkor sem, ha a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin leválik a fehérjéről. Az enzim akkor is aktív marad, ha nincs  $\text{Ca}^{2+}$  ( **$\text{Ca}^{2+}$  független forma**), így növelve az aktív állapot időtartamát. Az enzim mindaddig aktív, amíg a **szerin/treonin fehérje foszfatáz** defoszforilálja és inaktíválja a kinázt (lásd előadás ábra). A CaM-kináz II-nek fontos szerepe van a gerincesek memória kialakulásában és a tanulás folyamatában.

A CaM-kináz II frekvencia dekóderként is működik. Alacsony frekvenciájú  $\text{Ca}^{2+}$  csúcsok esetén az enzim inaktívódik minden csúcs után, mivel az enzimaktivitás nem elég hosszú ahhoz, hogy az autofoszforiláció megtörténjen. Magasabb frekvenciánál az autofoszforiláció fenntartja az enzim aktivitását a két  $\text{Ca}^{2+}$  csúcs között is.

### A GPCR-ek jel terminációja

A túlaktiválás elkerüléséhez a receptorok aktivitását kell megszüntetni, így nem képesek további G fehérjéket aktiválni. Az extracelluláris hírvivőkkel szembeni érzékenység megőrzéséhez a receptoroknak, a G fehérjének és az effektoroknak is vissza kell térnie inaktív állapotukba.

1. **Deszenzitizáció** (lásd előadás ábra): ez a folyamat gátolja, hogy az aktív receptorok további G fehérjéket aktiváljanak. Az aktív GPCR citoplazmatikus doménjét egy specifikus kináz, a G protein kapcsolt receptor kináz (GRK) foszforilálja. A GRK egy szerin/treonin protein kináz, ami csak az aktivált GPCR-eket ismeri fel. A foszforilációt követően egy specifikus fehérje, az arresztin kötődik a GPCR-hez és gátolja a G fehérje kapcsolódást. Az arresztin kötése véd a további G fehérje aktivációtól. Az arresztin molekulák képesek klatrin molekulákat megkötni, így elősegítik a foszforilált GPCR internalizációját, **endocitózissal** (klatrin burkolt vezikulumban). A receptor az endoszómából visszakerülhet a plazmamembránba defoszforilációt követően, vagy lebontódik a lizoszómában. A  $\beta$ -arresztin képes citoszólikus foszfodiészterázokat is megkötni, így az enzim közel kerül a cAMP képződési helyéhez, gyorsítva a jel lecsengését.
2. A  $\text{G}\alpha$  **hidrolizálja** a GTP molekulát GDP + Pi-re (GTPáz). A  $\text{G}\alpha$  alegység gyenge GTPáz aktivitással rendelkezik, mely lehetővé teszi a GTP lassú hidrolízisét és az inaktíválódást. A válasz gyorsabb lecsengését a G fehérje jelátvitelt szabályozó fehérjék (RGS) segítik. Az RGS fehérje kötődése gyorsítja a GTP hidrolízist a katalitikus alegységen. A GDP jelenléte a  $\text{G}\alpha$  alegységen a regulátoros alegységekhez való visszakötődést segíti.
3. **A protein foszfatázok** A foszfát csoportok eltávolítását katalizálják (hidrolízis) az aktív fehérjéről (előzőleg a PKA foszforilálta őket). A jelátviteli fehérjék inaktíválása a jelátvitel leállítását eredményezi.

4. **A foszfodiészterázok** az arresztin molekulák nélkül is aktiválódnak és elhasítják a CAMP molekulákat 5'AMP molekulákká, így gátolják meg a PKA további aktiválódását.

### Az extracelluláris szignál amplifikálása másodlagos hírvivőkkel

A jelerősítés első lépése az aktív receptor és a G fehérjék között létrejövő kapcsolat, illetve a G fehérjék kapcsolódása az effektor enzimekkel, az adenilát ciklázal. A stimulátoros G fehérje relatív enzimaktivitását figyelembe véve 15 másodperc alatt az aktivált adenilát cikláz 225 cAMP molekulát termel mielőtt a Gs hidrolizálja a GTP-t. Egyetlen GPCR aktiválásakor 10000-szeres jelamplifikáció történik a sejtben.

A vizuális jelátvitelben egyetlen aktivált rodopszin molekula több száz transzducin molekulát aktivál, nagyjából 1000 molekula/másodperc sebességgel. Minden egyes transzducin molekula aktivál egy cGMP foszfodiészteráz enzimet, mindegyik enzim 4000 cGMP molekulát hidrolizál másodpercenként. Ez a cGMP koncentráció csökkenés több száz kation csatorna záródását eredményezi. Vagyis egyetlen pálcika egyetlen fotonra oly módon reagál, hogy az megváltoztatja a fotoreceptortól az agyba érkező jeleket (lásd előadás ábra). Az inozitol foszfolipid jelátvitelben az extracelluláris jelben bekövetkező nanomoláris változás mikromoláris változást okozhat az intracelluláris mediátorok koncentrációjában. Egyetlen extracelluláris hírvívő molekula több ezer fehérje működését képes megváltoztatni a célsejtben az amplifikációs kaszkád során.

## 20.6. TIROZIN-KINÁZ RECEPTOROK

Az enzim-kapcsolt receptorok három doménből épülnek fel: extracelluláris ligandkötő domén, transzmembrán domén és intracelluláris domén, amely enzimaktivitással rendelkezik. A receptor tirozin kinázok sokkal diverzebb csoport, mint a GPCR-ek. A leggyakoribb szignál továbbítási módszerük az **oligomer szignál transzdukciós partikulumok** létrehozása az aktivált RTK dimeren. A RTK-k lehetnek epidermális növekedési faktor receptorok (EGFR), vérlemezke-derivált növekedési faktor receptorok (PDGFR), fibroblaszt növekedési faktor receptorok (FGFR), hepatocita növekedési faktor receptor (HGFR), inzulin receptor, inzulinszerű növekedési faktor receptor (IGF1R), vaszkuláris endotéliális növekedési faktor receptor (VEGFR), makrofág kolonizációt stimuláló faktor receptorok (MCSFR), efrin receptorok és neurotrofinok, beleértve az idegi növekedési faktort (NGF), ami szintén RTK-hoz kötődik.

A humán genomban hozzávetőlegesen 60 gén kódol receptor tirozin kinázt. Ezeket a receptorokat több mint 16 szerkezeti alcsaládra lehet osztani (lásd előadás ábra). A funkcionális szerkezeti domének általában a ciszteinben gazdag, immunglobulin-szerű, fibronektin-III-as típusú, EGF domén, leucinban gazdag domén, kadherin, diszkoidin, krigle domén, tirozin-kináz és SAM (S-adenozilmetionin) domének. Néhány RTK tartalmaz egy hosszú inszertet a tirozin-kináz doménben (pl. PDGFR).

A jelátviteli folyamatban az RTK extracelluláris ligandja a ligand kötő helyhez kapcsolódik, ami megindítja a receptor **dimerizációját** vagy **oligomerizációját** és konformáció változást okoz az intracelluláris doménben. A tirozin-kináz domén aktiválódik, majd foszforilálja a tirozin oldalláncokat a receptoron, majd azokon a jelátviteli fehérjéken, amik a receptor foszfortirozinjaihoz kötődnek. A dimerizáció után a két kináz domén közelebb kerül egymáshoz, aktiválódnak és keresztfoszforilációt végeznek a másik tirozinjain. Ez a folyamat a transzautofoszforiláció (lásd előadás ábra). A tirozinok foszforilációja a kináz doménben növeli a kináz aktivitását és a további tirozinok foszforilálását teszi lehetővé a kináz doménen kívül, így nagy affinitású dokkoló helyek jönnek létre az intracelluláris jelátviteli fehérjék számára. Különböző jelátviteli fehérjék képesek a foszfortirozinokhoz kötődni speciális foszfortirozin-kötő doménekkel (SH2, PTB domének, lásd később). A transzautofoszforiláció elősegíti az intracelluláris jelátviteli komplex összeszerelődését, ami továbbítja a jelet a sejt különböző régióiba

(lásd előadás ábra). Mivel az eltérő RTK-k különböző kombinációban aktiválják a jelátviteli fehérjéket, így eltérő válaszokat is aktiválnak.

Erősen konzervált foszfortirozin-kötő domének:

1. **SH2** domén: Src homológia régió, SH2-t tartalmazó fehérjék nem kovalens komplexeket képeznek a tirozin-foszforilált fehérjékkel. Az SH2 fehérjék egy részének nincs enzimatis aktivitása, ezek az ún. adapter fehérjék. Az SH2 domének a foszfatidilinozitolok foszfát csoportjához is képesek kapcsolódni a plazmamembránban.
2. **PTB** domén: foszfortirozin-kötő modul, konzervált arginineket tartalmaz, hogy semlegesítse és koordinálja a negatív töltésű foszfortirozinokat. Például IRS-1, inzulin receptor szubsztrát egy dokkoló fehérje, melynek nincs enzimaktivitása.

Néhány jelátviteli fehérje csak SH2 és SH3 doménekből épül fel és kizárólag **adapter** fehérjeként működnek. Fő szerepük a foszfortirozinnal rendelkező fehérjék megkötése és olyan jelátviteli fehérjékkel való összekapcsolásuk, amelyek nem rendelkeznek SH2 doménekkal (lásd előadás ábra). Például az **inzulin receptor** megköti a ligandját, az aktivált receptor foszforilálja a tirozinjait. A foszfortirozinok megkötik az **IRS-1 dokkoló fehérjét** a **PTB** doménjén keresztül. Az IRS1 másik speciális doménje a **PH domén** a plazmamembrán belső felszínén elhelyezkedő foszfoinozitidekhez kapcsolódik. Az aktív receptor az IRS-1 tirozinjait is foszforilálja, ezek közül egy megköti a **Grb2 adapter fehérjét**, annak SH2 doménjén keresztül. A Grb2 az egyik **SH3** doménjével a monomer **GTPáz aktiváló fehérje**, az Sos prolinban gazdag régiójához kötődik (lásd előadás ábra). Az Sos szintén a plazmamembrán foszfoinozitidjeihez kötődik a PH doméneken keresztül. A Grb2 képes ún. **scaffold fehérjéket** megkötni az **SH3** doméneken keresztül. A scaffold fehérjék továbbítják a jelet az aktív inzulin receptortól a citoszólikus jelátviteli fehérjékhez.

### Monomer G proteinek

A monomer G fehérjék csak **egyetlen alegységből** épülnek fel, ez az  **$\alpha$ -alegység**, ami homológ a heterotrimer G fehérjék  $\alpha$ -alegységével. A monomer G proteinek GTPázok, aktívak ha GTP-t kötnek és inaktívak GDP kötése esetén. A GTPázok Ras-szerű szupercsaládjá szerepet játszik a jelátvitelben. A monomer kis G fehérjék öt alcsaládba sorolhatók:

1. Ras csoport (Ras, Rap, Ral): a mitogén válasz szabályozói, génexpressziót és kemotaxist szabályoznak
2. Rab csoport (több mint 60 tag): a vezikuláris transzport szállítást szabályozzák
3. Rho család (Rho, Rac, Cdc42): az aktin citoszkeletont és a transzkripciót szabályozzák  
Ran csoport: mikrotubulus szabályozók, illetve a nukleocitoplazmatikus fehérjék szállítását szabályozzák
4. Arf csoport (Arf1-6, Arl1-7, Sar): endocitózis és vezikuláris transzport szabályozók

### Ras-GTPázok

Az emberben három fő Ras fehérje működik: H-, K- és N-Ras. Ezeknek a GTPázoknak különböző a funkciójuk, de ugyanúgy működnek és ugyanaz a hatásuk a jelátviteli útb tartozó célfehérjéken. A Ras GTPázok egy vagy több kovalensen kapcsolt **lipid csoportot** tartalmaznak, melyek segítenek a fehérjét a membrán citoplazma felőli oldalához horgonyozni. A fehérjék a membrán felől érkező jelet továbbítják a sejt más részei fele. A Ras gyakran szükséges a **sejtosztódás** vagy a **differenciálódás** stimulálásához.

A Ras fehérjék aktív jelátviteliek, de csak akkor működnek, ha GTP található a guanin nukleotid kötéshelyükön. A Ras GTPázoknak nagyon alacsony az enzimatis aktivitása. A működésükhöz szükségesek kiegészítő fehérjék, **GTPáz aktivátor fehérjék (GAP)** és **guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF)**.

1. **GAP:** A GAP fehérjék kapcsolódása alapvetően fontos a jel leállításában. **Növeli** a GTP hidrolízis sebességét, ezáltal inaktiválja a Ras-t.
2. **GEF:** lehetővé teszi a Ras-GDP számára, hogy összekapcsolódjon az adapter fehérjével (Grb2/Sos), ami esszenciális a Ras **aktivációjában**, segítve a GDP-GTP cserét.
3. **GDI:** guanin nukleotid disszociációt gátló fehérje a Rho és Rab fehérjéken fejt ki a hatását. GDI fehérje segíti a G fehérje leválását a membránról, ami ezt követően a citoszólban vándorol. Ezen kívül gátolják a GDP lecserélődését GTP-re, vagyis inaktiválják a G fehérjét.

A monomer G fehérjéknek egy katalitikus helyük és felszíni kötőhelyeik vannak a regulátorok és effektorok számára. A **G-domén** (G-boxok vagy G-régiók) erősen konzervált és kulcs aminosavakat tartalmaz a GTP hidrolízishez. Az N-terminális régió szorosan tekeredett szerkezettel rendelkezik, benne hat  **$\beta$ -lemez** körülveve öt  **$\alpha$ -hélix**-szel. A  $\beta$ -lemez és az  $\alpha$ -hélixek tíz polipeptid hurokkal kapcsolódnak. Öt hurok alkotja a katalitikus központot, és itt aktiválódik a kapcsoló mechanizmus is.

**G-1 régió** tartalmazza glicinben gazdag pirofoszfát-kötő hurkot (**P-hurok**) és tartalmaz egy konzervált lizint és egy konzervált szerint. A glicinben gazdag rész lehetővé teszi, hogy a hurok a foszfátok köré tekeredjen, és az amid nitrogének pozitív töltésű teret adnak, a negatív töltésű foszfátok mellett. A konzervált lizin segíti a tranzíciós állapot stabilizálását a GTP hidrolízise alatt, semlegesítve a  $\gamma$ -foszfát negatív töltését.

**G-2 régió** az **I-es kapcsoló domén**, az első  $\alpha$ -hélix és a második  $\beta$ -lemez közötti hurokban helyezkedik el. A G-2 box tartalmaz egy esszenciális treonint, ami koordinálja a GTP hidrolízishez szükséges **Mg<sup>2+</sup> iont**. Az I-es kapcsoló (akár a II-es) **mobilis elem**, melynek a szabályozók és effektorok megkötésében van szerepe.

**G-3 régió** A második  $\alpha$ -hélix N-terminális részén található és a **II-es kapcsoló domén** egyik részét képezi minden G fehérjében (monomer és heterotrimer) része. Egy állandó aszpartát koordinálja a magnézium iont egy vízmolekulán keresztül, és a konzervált glicin irányítja a  $\gamma$ -foszfátot. A teljes II-es kapcsoló domén a harmas  $\beta$ -lemeztől a negyedik hurokon keresztül a második  $\alpha$ -hélixig tart.

**G-4 régió** az ötödik  $\beta$ -lemez és a negyedik  $\alpha$ -hélix közötti hurokban helyezkedik el, a guanidin bázis megkötésében van szerepe.

**G-5 régió** a hatodik  $\beta$ -lemez és az ötödik  $\alpha$ -hélix között fut és segíti a guanidin bázis felismerését és kötését.

A kapcsoló mechanizmus tulajdonképpen egy hidrolízis által hajtott konformáció változás a Ras fehérjében. A konformáció változást a GTP  $\gamma$ -foszfátja, a magnézium ion és a kapcsoló régiókban lévő kulcs oldalláncok kapcsolódása okozza (lásd előadás ábra).

*A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád*

A tirozin foszforiláció és a Ras aktiváció is aktivált RTK által katalizált és általában gyorsan lecseng. Ahhoz, hogy a sejtet osztódásra vagy differenciálásra készítsük, a rövid távú hatást, hosszú távú hatássá kell alakítani a sejtben, így a jel eljut a sejtmagba, ahol megváltoztathatja a génexpresszió mintázatát. A **mitogén-aktivált protein kináz modul** (MAP kináz modul) képes fogadni, fenntartani és továbbítani a jelet az aktív receptortól a sejtmag fele. A rendszer három komponense együtt alkot egy funkcionális jelátviteli modult (lásd előadás ábra).

A növekedési faktorok jelátviteli útjainak jellegzetességei közé tartozik a kinázok aktiválása. Ezek a **MAP kináz kináz kináz** (MAPKKK) pl. Raf, ami **MAP kináz kinázt** (MAPKK) aktivál foszforilációval. A MAPKK-ok célfehérjéi a **MAP kinázok**, amik citoplazmatikus szerin/treonin fehérje kinázok. Ezek aktivációt követően a sejtmagból a citoszólba transzlokálódnak, ahol **transzkripcis faktorokat** aktiválnak.

Az emlős Ras-MAP-kináz jelátviteli útban, az alábbi három kináz vesz részt: **Raf** (MAPKKK), **Mek** (=MAPKK) és **Erk** (MAPK). Az Erk MAP kináz belép a sejtmagba és foszforilálja a génszabályozó komplex egy vagy több elemét. Ez elindítja számos azonnali, korai gén transzkripcióját. Ezek a gének olyan génszabályozó fehérjéket kódolnak, melyek további géneket aktiválnak (lásd előadás ábra). A Raf a legelső fehérje a MAPK kaszkádban, és az elsődleges effektor enzime a Ras fehérjének. A Raf egy szerin/treonin kináz, amelynek három humán izoformája létezik részben átfedő funkciókkal:

1. általános Raf-1 vagy C-Raf
2. A-Raf
3. B-Raf: a neuronális szövetekben magas, máshol alacsony a szintje

Mind a három izoforma rendelkezik konzervált régiókkal: CR1, CR2 és CR3. A fehérje C-terminális része tartalmaz egy **szerin/treonin kináz domént**, ami megegyezik a CR3 régióval. Az N-terminális fele a fehérjének egy komplex szabályozó régiót alkot, mely tartalmazza a CR1-et. A CR1 tartalmazza a **Ras-kötő domént** és egy ciszteinben gazdag domént, ami egy **cink-ujj motívum**. Nyugalmi állapotban a Raf citoszólikus elhelyezkedésű és csak a Ras-GTP megjelenésének hatására mozdul a membrán fele. A CR1 és CR2-ben lévő szerin foszforilációs helyek gátolják, míg a CR3 régióban lévő foszforilációs helyek aktiválják a Raf fehérjét. A CR1 és CR2 szerineket a PKA vagy az Erk foszforilálja.

A klasszikus elképzelés a MAP kináz kaszkád enzimek aktiválásáról, az, hogy az elemek interakcióba lépnek egymással diffúzió és ütközés által. A MAPK útvonal enzimeit két-három elemből álló kazettákat alkotnak. Így a Ras–MAP-kináz jelátviteli út a jeleket a sejt felszínéről a sejtmagba továbbítja, ahol megváltoztatja a génexpressziós mintázatot

Számos faktor befolyásolhatja a válasz **időtartamát**, köztük **pozitív és negatív visszacsatolások**, amiben további MAP kinázok is részt vesznek. Ezek a kinázok kombinálódhatnak, ezáltal megváltoztathatják a válasz típusát: fokozatos, ki-be kapcsolható, rövid vagy hosszú időtartamú.

A MAPK enzimeknek öt családja létezik, mindegyiket kettős foszforiláció aktiválja a tirozin oldalláncokon:

1. Extracelluláris jel által szabályozott kináz (Erk1 és Erk2)
2. Stressz-aktivált protein kináz (SAPK), más néven c-Jun N-terminális kináz (Jnk1, Jnk2 és Jnk3)
3. p38 kináz homológok (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  és p38 $\delta$ )
4. Erk3/4
5. Erk5

#### *Scaffold*

Az eukarióta sejtekben háromkomponensű MAP kináz jelátviteli modulok működnek. A különböző modulok eltérő választ váltanak ki ugyanabban a sejtben. Ezek a MAP kináz modulok egy vagy több azonos kinázt használnak, különböző effektor fehérjéket, így eltérő válaszokat váltanak ki. Egyik lehetőség a különböző, párhuzamosan futó jelátviteli útvonalak közötti kommunikáció kivédésére az ún. scaffold fehérjék felhasználása (lásd előadás ábra). Scaffold mechanizmusok működnek az élesztőkben is. A sarjadzó élesztők legalább hat háromkomponensű MAP kináz kaszkáddal rendelkeznek. A szaporodási válasz és a magas ozmolaritású környezetre adott válasz ezekben a sejtekben két különböző scaffold fehérjével történik, így elkerülük a keresztreakciót. A szaporodási válasz akkor indul el, amikor egy ellentétes típusú élesztő szaporodási faktora a másik élesztősejt megfelelő GPCR-hez

kötődik. Ez aktiválja a G fehérjét, amiről a regulátoros alegységek aktiválják a MAPKKK-t (kináz A). A Kináz A továbbviszi a választ. Egy másik MAP kináz (kináz C) számos fehérjét aktivál foszforilációval, amelyek kiváltják a szaporodási választ, mely során az élesztősejt osztódása leáll és felkészül a fúzióra. Ebben a modulban három különböző kináz található, ami az 1-es scaffold fehérjéhez kapcsolódik. Amikor az élesztősejt magas ozmolaritású közegbe kerül, glicerint kezd el szintetizálni, hogy növelje a saját belső ozmolaritását. Ezt a választ egy ozmolaritás receptor váltja ki, ami eltérő MAP kináz kaskádót aktivál egy másik scaffold fehérjével. Még ha a két útvonal ugyanazokat a MAP kináz kinázokat is aktiválja, nincs kommunikáció a két útvonal között az eltérő scaffold fehérjék miatt. A scaffold fehérjék az összes vagy néhány kinázhoz kapcsolódnak minden MAP kináz modulban, komplexet képeznek és így segítenek fenntartani a válsz specifikusságát.

Az emlős sejtek szintén ezt a **védelmi mechanizmust** használják a MAP kináz modulok közötti kommunikáció elkerülésére. Legalább öt párhuzamos MAP kináz modul működik az emlős sejtekben. Ezek a modulok 12 MAP kináz, 7 MAP kináz kináz, és 7 MAP kináz kináz kináz fehérjéből épülnek fel. Két modult JNK és p38 kaskádoknak nevezik, amelyeket különböző stressz folyamatok, mint UV sugárzás, hő sokk és ozmotikus stressz, gyulladásos citokinek (lásd előadás ábra) indítanak el. A scaffold stratégia csökkenti annak a lehetőségét, hogy a jel megsokszorozódjon és átterjedjen a sejt többi részébe.

#### *PI3-kináz útvonal*

A **foszfoinozítid 3-kináz** (PI3-kináz) a plazmamembránhoz kötődik és RTK vagy GPCR egyaránt aktiválhatja. Ez a kináz enzim inozitol foszfolipideket foszforilál nem pedig fehérjéket. Fontos szerepet játszik a sejt túlélésében és növekedésében.

A **foszfatidilinozitol** (PI) egy membrán lipid, ami képes reverzibilis foszforiláción átvenni az inozitol feji régiójában lévő foszforilációs helyeken, így jönnek létre a foszforilált lipidek, a foszfoinozitidek (lásd előadás ábra). Aktivált állapotban a PI-t foszforilálja a **PI kináz**, az így keletkezett **PI(4)P**-t a **PIP kináz** foszforilálja és **PI(4,5)P<sub>2</sub>** jön létre. Ez utóbbi molekulát a PI3 kináz foszforilálja az inozitol gyűrű harmadik pozícióját, így **PI(1,4,5)P<sub>3</sub>** molekula képződik (lásd előadás ábra). A PI(4,5)P<sub>2</sub> molekulát a PLCβ vagy a PLCγ elhasítja. Az előbbi enzim GPCR és Gq fehérje által aktivált effektor enzim, az utóbbit RTK aktiválja. Az aktivációt követően a PLC szolubilis IP<sub>3</sub> és membrán-kötött DAG molekulákat generál. A PI(3,4,5)P<sub>3</sub> nem hasítódik, a plazmamembránban marad, amíg egy specifikus foszfoinozítid foszfatáz (pl. PTEN foszfatáz) defoszforilálja. A PI(3,4,5)P<sub>3</sub> molekulák dokkoló helyként szolgálnak az intracelluláris jelátviteli fehérjék számára. Az I-es osztályú PI3-kinázok heterotrimerek, melyek egy katalitikus és különböző regulátoros alegységekből épülnek fel. A regulátoros alegység adapter fehérjeként működhet, ami az aktivált RTK két foszfortirozinjához kötődik a két SH2 doménon keresztül. A GPCR-ek által aktivált PI3-kinázok általában a G fehérje regulátoros alegységeihez kötődnek.

A PI(3,4,5)P<sub>3</sub> dokkoló helyekhez specifikus **PH doménnel** rendelkező célfehérjék kapcsolódnak. A PH doménnel hozzávetőlegesen 200 humán fehérje rendelkezik, egy közülük a már korábban említett Ras-GEF/Sos.

#### *Akt/Protein kináz B*

A legfontosabb PH-domént tartalmazó fehérje a **szerin/treonin protein kináz** az **Akt**. Ez a fő jelátviteli útvonal, amit az **inzulin** aktivál. Az Akt útvonal fontos szerepet játszik a túlélés és a növekedés szabályozásában, számos sejtben.

Az extracelluláris ligandok az RTK-khoz kapcsolódnak, ezek aktiválják a PI3-kinázt, ami PIP<sub>3</sub> molekulát termel. A PIP<sub>3</sub> molekulák két protein kinázt vonzanak a plazmamembránhoz, amik a PH doménjeikkel kapcsolódnak: Akt vagy PKB és a foszfoinozítid-függő fehérje kináz-1 (PDK1). A PIP<sub>3</sub>-hoz kapcsolódó Akt a fehérje aktivációjához vezet. A PDK-1 szintén képes foszforilációval (szerin aminosavakon) aktiválni az Akt-t. Az Akt számos fehérjét foszforilál a plazmamembránban, a



citoszóiban és sejtmagban (lásd előadás ábra). Az Akt hatása a legtöbb ismert célfehérjéjén, azok **inaktiválása** foszforiláció útján.

A PIP3-kináz-Akt útvonal hatása a sejtben egy nagyméretű, szerin/treonin fehérje kináztól, a **TOR** (rapamicin célfehérjéje) fehérjétől függ. Az emlős sejtekben ezt a fehérjét mTOR-nak hívják. A Tor két eltérő funkcionális multiprotein komplexként működik. Az **mTOR komplex 1** tartalmazza a **raptor** fehérjét. Ez a komplex érzékeny a rapamicinre, stimulálja a sejt növekedését, a fehérje szintézis serkentésével. Az **mTOR komplex 2** egy másik fehérjét, a **riktort** tartalmazza, ez utóbbi nem érzékeny a rapamicinre. Segíti az Akt aktivációt, illetve a Rho GTPázok szabályozásával irányítja az aktin citoszkeletont (lásd előadás ábra). Az mTOR komplex 1-et növekedési faktorok aktiválják a PI3-kináz-Akt útvonalon keresztül. Az Akt foszforilációval aktiválja az mTOR komplex 1-et, illetve gátolja a Tsc2 GAP fehérjét. A Tsc2 a monomer Ras-szerű GTPáz-on a Rheb fehérjén fejt ki hatását, inaktíválva azt. A Rheb aktív állapotban az mTOR aktivátora. Az Akt szintén aktiválja az mTOR-t és elősegíti a sejt növekedését.

### Rho GTPáz

A Rho családba tartozó monomer GTPázok az aktin és mikrotubulus citoszkeletont szabályozzák. Szabályozzák a sejt alakját, polaritását, motilitását és adhézióját, valamint szabályozzák a sejtciklust, gén transzkripciót és a membrán transzport folyamatokat. A Rho család három legjobban körülírt tagja a **Rho**, **Rac** és **Cdc42**. Ahogy a Ras-MAP kináz kaszkádnál is láttuk, GEF fehérjék aktiválják és a GAP-ek inaktíválják a Rho GTPázokat. A GEF és GAP fehérjék egy része specifikus a Rho család egy-egy tagjára, a többi pedig kevésbé specifikus. Az inaktív Rho GTPázok gyakran guanin nukleotid disszociációs inhibitorokhoz kötődnek (GDI) a citoszóiban, ezek gátolják a Rho-GEF kapcsolódást a plazmamembránban.

**Az Efrin receptor** tirozin kináz a motor neuronok sejt felszínén található és az axon csúcsának (növekedési csúcs) mozgását irányítja a célsejt fele (lásd előadás ábra). A sejt felszíni efrin fehérje az efrin receptorhoz (EphR) kapcsolódik, így a növekedési csúcs összeesését okozza. A válasz egy GEF fehérjétől függ, amit **efexinnek** neveznek. Ez a fehérje az Eph receptor citoszólikus farkához kapcsolódik. Amikor az efrin aktiválja az Eph receptort, a receptor aktiválja a **citoplazmatikus tirozin kinázt**, ami foszforilálja az efexint a tirozin aminosavakon. Így az efexin képes már aktiválni a Rho fehérjét, a **RhoA**-t. Az aktív RhoA GTP-t köt a katalitikus helyén, majd effektor fehérjék szabályozásával a növekedési csúcs összeesését okozza: stimulálja a miozin-függő aktin citoszkeleton kontrakcióját. Amikor az efrin nem kapcsolódik a receptorhoz, az efexin a Rho család három tagját egyaránt aktiválja (Cdc42, Rac és RhoA), így segítve elő a növekedési csúcs megnyúlását.

## 20.7. CITOKIN RECEPTOROK ÉS JAK-STAT JELÁTVITEL

A citokin receptorok lokális mediátorokat **citokineket** és **hormonokat** kötnek meg (pl. prolaktin, növekedési hormon). Ezek a receptorok nem rendelkeznek enzimaktivitással, ezért **citoplazmatikus tirozin kinázokkal** kötődnek, ezek a **Janus kinázok** (JAK). A Janus kinázok foszforiláció útján aktiválnak génszabályozó fehérjéket, **jeltovábbító és transzkripció aktivátorok (signal transducers and activators of transcription, STAT)**. A STAT fehérjék citoszólikus, késői génszabályozó fehérjék. Csak a sejtmagba tudnak vándorolni és aktivált állapotban bizonyos gének transzkripcióját szabályozzák.

A citokin receptorok dimerek vagy trimerek és stabilan asszociálódnak egy vagy két JAK fehérjével a négy közül (JAK1, JAK2, JAK3, és Tyk2). A citokin kötődése megváltoztatja a receptor intracelluláris részét és a konformáció változás következtében a két JAK molekula közelebb kerül egymáshoz, így **transzfoszforilálhatják** egymást. Ezt követően a Jak fehérjék foszforilálják a tirozineket a citokin receptoron, ezzel **foszfortirozin dokkoló helyeket** hoznak létre a STAT fehérjék számára (lásd előadás ábra). Az emlős sejtekben leglább hat STAT fehérje található. Mindegyik rendelkezik **SH2** doménnel,



melyen keresztül a foszfortirozin helyekhez tud kötődni a receptoron. A JAK fehérjék foszforilálják a STAT fehérjéket a tirozin aminosavakon, ezáltal a STAT fehérjék leválnak a receptorról. A felszabadult STAT molekulák egymáshoz kapcsolódnak az SH2 doméneken keresztül és **heterodimereket** alkotnak. A **STAT dimerek** a sejtmagba vándorolnak, ahol más szabályozó faktorokkal együtt specifikus DNS elemekhez kötődnek a promóter régiókban, aktiválva ezen gének transzkripcióját. Különböző citokinek és receptorok különböző kombinációjú JAK-STAT fehérjéket aktiválhatnak, ezáltal eltérő sejtválaszt válthatnak ki (lásd táblázat). A JAK-STAT jelátvitel szabályozása negatív visszacsatolással szabályozódik:

1. A STAT dimerek olyan géneket aktiválnak, melyek gátló fehérjéket kódolnak, ezek leállítják a választ.
  - a) az inhibitoros fehérjék képesek a foszforilált JAK molekulákhoz kötődni és inaktiválni őket és az aktív receptorokat is
  - b) más inhibitoros fehérjék a foszforilált STAT dimerekhez kötődnek, és gátolják azok DNS-hez való kötődését
2. A JAK és a STAT fehérjéket a foszfortirozinek defoszforilációja inaktiválja. Ezt a reakciót protein tirozin foszfatázok katalizálják. Ezeknek a foszfatázoknak egy része kettős specificitású, a célfehérjék szerin és treonin aminosavairól is el tudják távolítani a foszfát csoportot. A foszfatázoknak köszönhetően a tirozin foszforiláció csak rövidtávú.

## 20.8. TGF $\beta$ /BMP-SMAD JELÁTVITEL

A transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) szupercsalád két családot tartalmaz a **TGF $\beta$ /aktivin** családot és a nagyobb **csont morfogén fehérjék** (bone morphogenetic protein, BMP) családot. Ezek a molekulák hormonként vagy lokális mediátorként is működhetnek így szabályozhatják pl. a mintázat képződést, osztódást, specifikációt, differenciációt, az extracelluláris mátrix komponenseinek termelését vagy a sejthalált. Szerepük van a szöveti regenerációban és az immunszabályozásban. A receptoraik enzim-kapcsolt receptorok, amelyek egyetlen transzmembrán régióval rendelkező fehérjék **szerin/treonin kináz** doménnel a plazmamembrán citoszólikus oldalán. A receptoroknak két típusa ismert, **I-es és II-es típusú**. A TGF $\beta$  és a BMP receptorokat ez a két típus eltérő kombinációban alkothatja (dimerek). A dimerek létrejötte a kináz doméneket közelebb hozza egymáshoz, így az I-es típusú receptor foszforilálja és aktiválja a II-es típusú receptort. A receptor dimerek aktív **tetramer receptor komplexet** képeznek.

Az aktivált II-es típusú receptor közvetlenül megköt és foszforilál késői génszabályozó fehérjéket, **Smad** családba tartozó fehérjéket (Sma in *C. elegans* and Mad in *Drosophila*). A TGF $\beta$ /aktivin receptorok a Smad2 vagy Smad3 fehérjéket foszforilálják, a BMP receptorok pedig inkább a Smad1, Smad5 és Smad8 fehérjéket aktiválják. Az aktivált Smad fehérjéket **R-Smad**-nak nevezzük. A foszforilációt követően leválnak a receptorról. Az aktív Smad fehérje a Smad4-hez (**ko-Smad**) kötődik. A Smad4 bármelyik R-Smad molekulával képes komplexet képezni. A Smad komplex a sejtmagba vándorol, ahol specifikus gének transzkripcióját szabályozza (lásd előadás ábra).

A jelátviteli útvonalat negatív visszacsatolós mechanizmusok szabályozzák:

1. A receptor inaktiválása **ubikvitinizációval**, majd internalizálása és degradálása a sejtben.
2. Szekretált **gátló fehérjék** a jelátviteli molekulákhoz kötődnek, így gátolják a célsejt receptorainak aktiválódását. Például noggin és chordin gátolják a BMP-eket, míg a follisztatin gátolja az aktivineket.

3. Az inhibitoros Smad-ok, Smad6 vagy Smad7 az aktív receptorhoz kötődnek és gátolják a jeltovábbítást:
  - a) **versengenek** az R-Smad molekulákkal a receptor kötésért
  - b) egy **ubikvitin ligázt**, a Smurf enzimet vonzzák a receptorhoz, ez az enzim ubikvitinálja a receptort, mely a receptor internalizációjához és degradációjához vezet
  - c) **protein foszfatázokat** vonzanak a receptorhoz, melyet defoszforilálnak, így inaktíválnak
  - d) a gátló Smad molekulák a ko-Smad-hoz (Smad4) is képesek kapcsolódni, ezáltal gátolják, hogy az R-Smad-ok komplexet hozzanak létre a Smad4-gyel valamint serkentik a **Smad4 ubikvitinilálódását és degradációját**

## 21. APOPTÓZIS

A többsejtű élőlények fejlődése és fenntartása nem csak a sejtek osztódásának ütemén múlik, hanem éppúgy azok specifikus pusztulásától is. Egy átlagos felnőtt szervezetben a sejtek ugyanolyan rátával pusztulnak el, ahogy szaporodnak. Sejtek pusztulnak el valamilyen bántalom, vagy fertőzés esetén is, hogy az szervezet egészségét fenntartsák. Ezeknek a sejteknek a halála nem random folyamat, molekuláris események jól programozott sora, mely során belülről pusztítják el magukat, végül a környező sejtek falják fel őket, nyomot nem hagyva. Az „apoptózis” görög eredetű szó, jelentése: „falevelek hullása”.

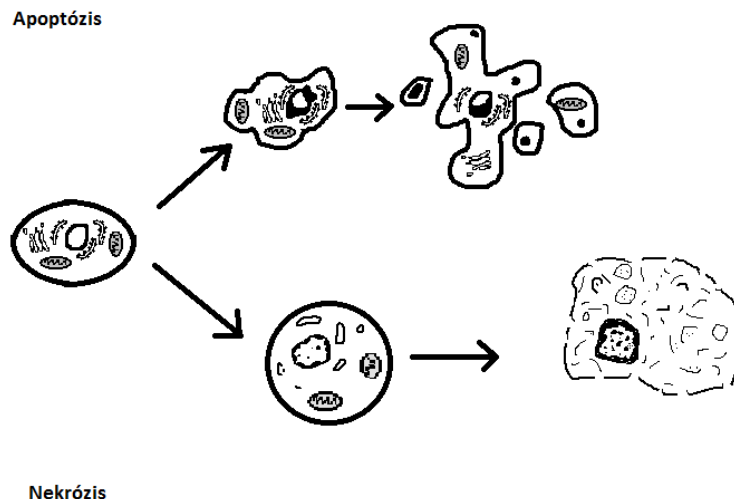
Az apoptózis szót gyakran használják a programozott sejthalál szinonimájaként, a két szó azonban nem jelenti ugyanazt: az apoptózis csupán egyetlen módja annak, ahogy a sejtek kontrollált módon elpusztulhatnak. Az apoptózis volt az elsőként leírt programozott sejthalál folyamat, azonban ma már több ide tartozó más mechanizmust is ismerünk.

Az apoptózis jelenségét elsőként a *Cenorhabditis elegans*-ban fedezték fel, amikor annak fejlődését vizsgálva azt találták, hogy a hermafrodita féreg fejlődése végére 1090 sejt alakul ki, de mindig ugyanaz a 131 sejt pusztul el, ahogy a kis féreg fejlődése végére érkezik (a kifejlett hermafrodita féreg így 959 sejtet tartalmaz). A fejlődés leírása után született a gondolat, hogy ez a halál mechanizmus nem egy random esemény.

Az „apoptózis” szót először John F. Kerr és munkatársai használták 1972-ban.

Azért, hogy összehasonlíthassuk az apoptotikus folyamatot a „random” sejthalállal, fontos a nekrozis fogalmát ismernünk. A nekrozis olyan sejthalál, amit súlyos fizikai, vagy kémiai hatás volt ki. A morfológiai változások tipikusak, a sejt megduzzad, a kromatin kondenzálódik a sejtmagban és szétszórta csomókba rendeződik. A membrán sérül, így sejtalkotók szivárognak az extracelluláris térbe, ími gyulladást indukál: makrofágok érkeznek a területre és fagocitálják a sérült sejteket.

Az apoptózis morfológiai változásai több ponton eltérnek a fent leírt folyamattól. Belső, illetve külső faktorok is elindíthatják a folyamatot (lásd később). Elsőként a sejt vizet veszít és zsugorodni kezd. A mag kromatinja kondenzálódik a magmembrán alatt és DNS endonukleázok hasítják a genomot apró darabokra. Enzimek károsítják a citoskeletot, ami így összeesik és a külső sejtfelszín hullámossá válik, fodrozódni kezd, hólyagok képződnek (blebbing) majd úgynevezett apoptikus testek válnak le a sejtről. A szomszédos sejtek fagocitálják az apoptotikus testeket. Ebben az esetben makromolekulák, vagy sejttörmelék nem jut ki a környezetbe, így ez a folyamat nem indukál immunválaszt. Az egyik legkorábbi jel az apoptózis indukciójára, hogy foszfatidilszerin rendeződik át a belső membránokból a külsőbe, ami aztán a többi sejt fagocitózisát indítja be.



Nekrozis

## 21.1. AZ APOPTÓZIS FOLYAMATA

### Iniciáció

Az apoptózis biztosítja a felesleges sejtek halálát, így az apoptózisnak köszönhetően a sejtek csak addig élnek, amíg hasznosak. A sejtek elpusztulhatnak, mert valami változott bennük (pl. sérült a DNS-ük), vagy mert nem szükségesek többé az organizmusnak és az megvonja tőlük a túlélési faktorokat (pl.: növekedési faktorokat, vagy hormonokat). Ezek a túlélési faktorok óvják meg a sejteket a saját öngyilkos mechanizmusaitól, ezek nélkül a sejt apoptózis útján elpusztul.

A folyamatot megindító szignálokat 2 csoportba soroljuk:

Külső stimulusok:

- Halál receptorok (pl.: tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) receptor)
- Túlélési faktorok megvonása (pl.: növekedési faktorok, hormonok)

Belső stimulusok:

- DNS károsodás (sugárzás, kémiai módosító anyagok)
- Intracellulárisan ható mérgek és gyógyszerek

Két útvonal:

1. Mitokondium eredetű (=intrinsic út)
2. Halál ligandok által indukált (=extrinsic út)

### Intrinsic útvonal

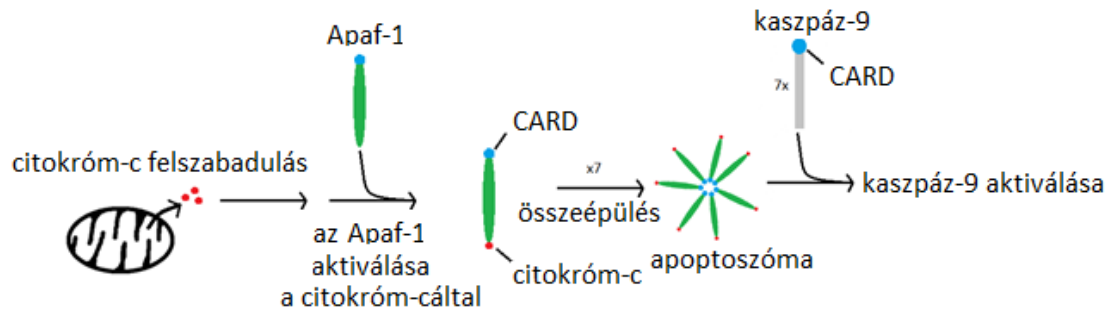
#### Mitokondrium-eredetű útvonal

Van néhány olyan molekula a mitokondrium belsejében, ami apoptózist képes indukálni, amennyiben felszabadul a mitokondriumból és kijut a citoplazmába, pl.: citokróm-c, SMAC molekulák. Ezek az anyagok akkor juthatnak ki a citoplazmába, ha a mitokondrium membránja permeábilisabbá válik, vagy specifikus membrán csatornák nyílnak meg. A molekuláris mechanizmusok elindítója egy belső szignál, vagy a sejt sérülése.

#### Citokróm-c

A citokróm-c intracelluláris apoptotikus stimulus hatására szabadul fel a citokrómból. A citokróm-c az Apaf-1 adaptor fehérjével aktiválni képes a kaspáz kaskádát, ami aktiválja a kaspázok effektor mechanizmusait, végül a sejt apoptotikusan elhal. Az Apaf-1 fehérje részlegesen szétnyílik, ahogy a citokróm-c aktiválja. 7 aktivált Apaf-1 fehérje alkotja az úgynevezett **apoptoszómát**. Ez az apoptoszóma képes megkötni kaspáz-9 molekulákat, az úgynevezett CARD (caspase recruitment domain) segítségével (minden Apaf-1 molekula megköt egy kaspáz-9 molekulát). A kaspáz-9 ezzel aktiválódik és megindítja a kaspáz kaskádát.

Specifikus fehérjék befolyásolják a mitokondrium permeabilitását a citokróm-c-re nézve (pl.: a Bcl-2 csökkenti a permeabilitást).



## SMAC

Az SMAC egy fehérjecsoport neve, jelentése: „second mitochondria-derived activators of caspases”=kaspázok második mitokondrium-eredetű aktivátorai. Ha a SMAC molekulák felszabadulnak a mitokondriumból és kijutnak a citoplazmába, hozzá kötődnek az apoptózis-inhibitor-fehérjékhez (IAP) és gátolják azok munkáját.

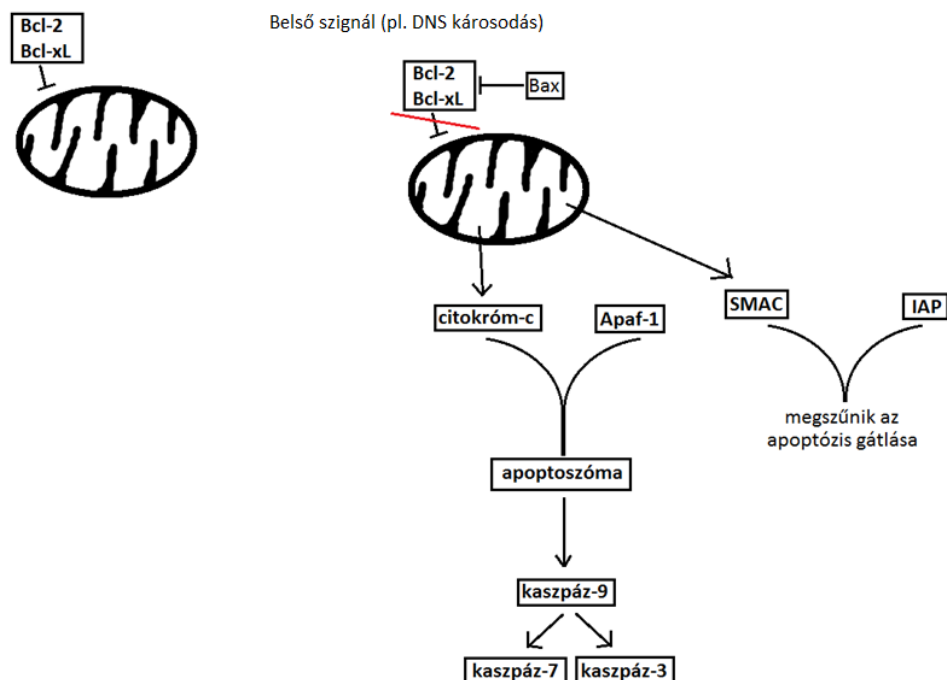
## Bcl-2

A Bcl-2 név egy fehérjecsoportot jelöl, ami az apoptózist gátolja, néhány képviselője a folyamat elindulását akadályozza meg, mások akár a folyamat megállítását is elérhetik. (A legfontosabb képviselőik a Bcl-2 és Bcl-x<sub>L</sub> fehérjék)

A Bcl-2 és Bcl-x<sub>L</sub> fehérjék a mitokondrium külső membránjában helyezkednek el és specifikus csatornafehérjéken hatnak: gátolják a citokró-m-c kiáramlását a mitokondriumból.

A sejt sérülése esetén proapoptikus BAX fehérjék gátolják a Bcl-2 és Bcl-x<sub>L</sub> fehérjék működését: így nem tudják megakadályozni a molekulák kiáramlását a mitokondriumból. A citokró-m-c kijutva a citoplazmába apoptoszómát hoz létre az Apaf-1 fehérjével. Az apoptoszóma pedig aktiválja a kaspáz kaszkádot: elsőként a kaspáz 9-et, ami aktiválja a kaspáz 7-et és 3-at. Ez utóbbi 2 lesznek a folyamat effektor=kivégző kaspázai.

## Összefoglaló

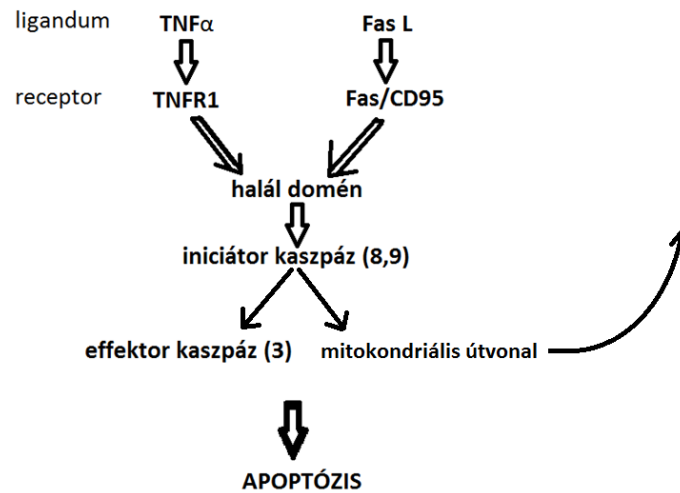
**Extrinsic útvonal: Halál receptorok (death receptor=DR)**

Az apoptózis úgynevezett halál-receptorokon keresztül is aktiválható (Fas, TNF $\alpha$ R, DR3, DR4, és DR5). A halálreceptorok általában oligomerizálódnak, ha a megfelelő ligand kötődik, ez specifikus adaptor fehérjék kötődését indítja meg, majd ez aktiválja a kaspáz kaszkádot. Ezen a módon ölik meg a T sejtek a fertőzött sejteket is (Fas-FasL)

A FasL (=Fas Ligand) a Fas, a TNF $\alpha$  a TNFR1 trimerizációját indukálja, ami a kaspáz-8 és 9 iniciátor kaspázok aktiválását indítja meg adaptor fehérjéken (úgynevezett halál domaineiken) keresztül. A kaspáz-8 és 9 2 folyamatot aktivál:

1. Indukálja a citokróm-c felszabadulását a mitokondriumból (ezzel beindítja az intrinsic útvonalat is)
2. Aktiválja a kaspáz-3-at, ezzel a kaspáz-kaszkádot.

Ajánlott videó: <https://www.youtube.com/watch?v=9KTDz-ZisZ0>



### p53

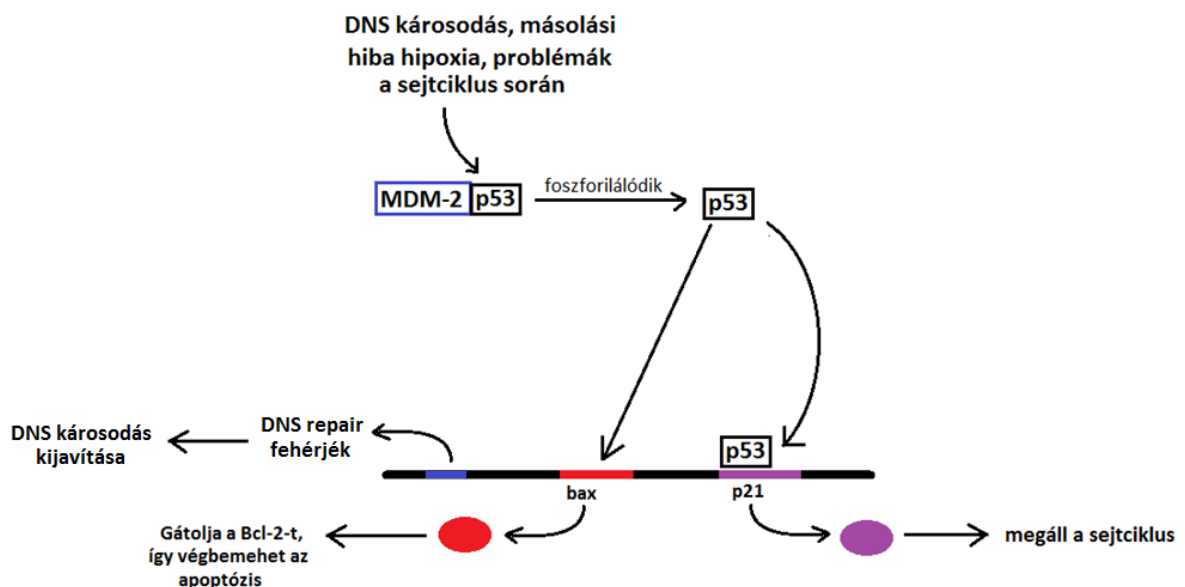
A p53 fehérje molekulasúlyáról kapta a nevét. A p53 egy ellenőrzőpont a G1/S fázis között a sejtciklus során. Ha a DNS károsodik, vagy hiba lépett fel a másolás során, a p53 foszforilálódik, lekapcsolódik az MDM-2 fehérjéről, ami így más gének transzkripcióját képes megindítani, transzkripció faktoroként viselkedve.

A p53 fehérje indukálhatja a p21 fehérje átírását: a p21 a ciklineket és a ciklin dependens kinázok aktivitását gátolja, amik fontosak lennének a sejtciklus folytatása során. Ennek eredményeképpen a sejtciklus leáll, a sejt nem örökíti tovább a rossz, sérült DNS-t.

A p53 ugyancsak elindíthatja a sérült DNS kijavítását, repair fehérjék átírásának indukálásával. Amennyiben azonban a sérülés túl nagy, a folyamat az apoptózis irányába fog eltolódni.

Apoptózis indukálása: a p53 fehérje a BAX fehérje promoteréhez kötődik, segíti annak átírását. Az átírt BAX fehérje a Bcl-2 működését fogja gátolni (lásd intrinsic útvonal).

Amennyiben a p53 fehérje mutálódik és a fehérje nem képes működni, korlátlan osztódás jöhet létre és tumor képződhet. (A tumorok több, mint felében a p53 fehérje nem aktív, vagy nincs jelen.)



Tehát a p53 megállítja a sejtciklust és több útvonalat aktiválhat: a DNS károsodás kijavítható, vagy apoptózis indul.

### Effektor fázis

Ebben fázisban az effektor molekulák (enzimek) létrehozzák az apoptózisra jellemző morfológiai változásokat, például az effektor kaspázok feldarabolják a fehérjéket, az endonukleázok a DNS-t, mi ahhoz vezet, hogy a sejtmag felbomlik, a DNS fragmentálódik, a kromatin pedig kondenzálódik. A sejt elkezd zsugorodni, a membrán fodrozódik és apoptotikus testek kapcsolódnak le róla.

Részvevő enzimek

- endonukleázok
- transzglutaminázok
- kaspázok

### Endonukleázok

Az endonukleázok  $\text{Ca}^{2+}$ -függő enzimek, megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  szint aktiválhatja őket. A legfontosabb funkciójuk a DNS fragmentálása 2 lépésben: elsőként 50-300kbp hosszú darabokra, majd 180 bp hosszú darabokra vágja fel a genomot. Az apoptózis folyamatának megindulását ezeknek a rövid DNS szakaszoknak a detektálásával is felismerhetjük (pl.: gélelektroforézissel, Tunel reakcióval, ami a szabad DNS végeket festi).

### Transzglutaminázok

A transzglutaminázok keresztkötéseket hoznak létre fehérjék között, így fehérje-aggregátumok jönnek létre. Ezek a keresztkötések irreverzibilisek. Ezek az enzimek is  $\text{Ca}^{2+}$ -függők.

(A transzglutaminázok fontosak más folyamatokban is, pl.: a koaguláció során a fibrin szálakat is transzglutaminázok kötik össze., fontosak a keratinociták elszarusodásában is.)

### Kaspázok

A kaspázok proteázok, amik ciszteint tartalmaznak a szerkezetükben (az aktív régiójukban) és a célfehérjét specifikusan aszparaginsavnál hasítják; ezért hívjuk őket kaspázoknak (caspases: c a ciszteinből és asp az aszparaginsavból).

A kaspázoknak 2 családjuk van, egyiknek van csak szerepe az apoptózisban (Ced-3), a másik (ICE) a gyulladási folyamatokban vesz részt. A hasító kaspázok is tartalmaznak aszparaginsavat a szerkezetükben, egymást hasítva aktiválnak más kaspázokat, ezzel egy egyre erősödő proteolitikus kaspázkádót hoznak létre. Ez a kaspáz-aktiváló folyamat az úgynevezett kaspáz kaspázkád.

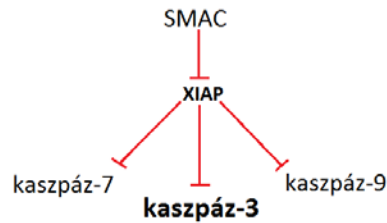
Iniciátor kaspázok indítják meg a folyamatot (kaspáz-2, 8, 9, 10). A folyamat végén vannak az effektor=kivégző kaspázok (kaspáz-3, 6, 7), amik a fehérjéket hasítják. Az effektor kaspázokat az iniciátor kaspázok aktiválják. Az effektor kaspázok aktiválása univerzális. Az iniciátor kaspázok aktiválása ezzel szemben specifikus. (Az apoptotikus útvonalak egymástól eltérhetnek, azinban a végső effektor kaspázáltalánosan a kaspáz-3.)



### Apoptózis inhibitorok: IAP

Elsősorban azokat az enzimeket gátolják, amik részt vesznek az apoptotikus útvonalban (endonukleázokat, transzglutaminázokat). Vírusok is rendelkezhetnek apoptózis inhibitorokkal, amik felsőbbrendű élőlényekből származnak: egy fertőzés során a sertőzött sejt elpusztíthatatlanná volik.

XIAP: a leghatékonyabb ismert inhibitor csoport, ami az iniciátor és az effektor kaszpázokat is gátolja.



### Apoptózis vs. sejtosztódás

Az apoptózis normál esetben nem ártalmas folyamat, fontos szerepe van a normál egyedfejlődésben és más pozitív folyamatokban (lásd előadás diák).  $10^{11}$  darab sejtposztul el minden nap egy felnőtt emberben (nem szükséges sejtek, autoreaktív T-sejtek, ...). Az apoptózisnak szerepe van a normál sejtszám fenntartásában. A korlátok nélküli sejtosztódás a sejtek normális halála nélkül abnormális folyamatokat indít. A sejtosztódás és az apoptózis egyensúlyban kell hogy működjön, szabályozott módon az emberi szervezetben. Mivel az apoptózis túl- és alulműködése is súlyos betegségeket okozhat (pl.: autoimmun betegségek, tumorképződés), fontos, hogy hatásos és biztonságosan használható apoptózis indukálókat és inhibitorokat találjunk terápiás célokra.



## 22. TUMOROK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

### 22.1. BEVEZETÉS

A rákos megbetegedések egy szomatikus sejtben fellépő génmutáció eredményeképpen jönnek létre. A mutáció miatt megváltozik az érintett gén kifejeződése (génexpresszió). A rákos sejtekre jellemző a **kontrollálatlan proliferáció**, amely rosszindulatú daganat képződéséhez vezet. Amíg a daganat szolid jellegű (lokalizált), a rák sebészeti úton eltávolítható. A rosszindulatú daganatok hajlamosak áttéteket létrehozni (**metasztázis**, másodlagos daganatok létrejötte). Az ilyen esetek hatékony kezelése nehéz (a műtéti megoldás nem elegendő, mivel csírasejtek áramlanak a testben, amelyek szinte bármely szervben képesek daganat létrehozására).

A rák napjaink központi kutatási témája, a kutatók hatékony megoldásokat keresnek a betegség kezelésére, valamint a rákos folyamatok mind jobb megismerésére törekcszenek.

### 22.2. A TUMOROK CSOPORTOSÍTÁSA

Elsősorban az érintett szövet eredete alapján csoportosítjuk a daganatokat (szöveti típusok):

- Carcinoma: a leggyakoribb típus, endo- vagy ektodermális szöveti eredetű (tűrő, vastagbél, emlő, prosztata, gyomor, hasnyálmirigy, bőr)
- Sarcoma: mezodermális eredetű szövetet érint
- Leukémia és lymphoma: vérképző (hemopoiotikus) sejtek rosszindulatú proliferációja
- Leukémia: egy sejtől indul ki
- Lymphoma: nyirokszövet rosszindulatú túlszaporodása

### 22.3. A DAGANATOK KIFEJLŐDÉSE

A rák többlépcsős folyamat eredményeképpen jön létre, számos lépés genotipikus és fenotipikus változással jár. A lépéseket értelmezhetjük úgy is, hogy a betegség áttöri a szervezet rák elleni védekezőrendszerének egy-egy elemét. A mutációt okozhatják mutagén ágensek, vagy egyéb környezeti tényezők. A daganatok kialakulásának lépéseit az alábbiakban foglaljuk össze:

1. **Onkogén aktiváció:** A **proto-onkogének** a normál sejtosztódásban töltenek be szerepet. Prot-onkogént érintő mutáció esetében onkogének jönnek létre, a proliferáció felgyorsul, annak ellenére, hogy a sejtek az adott körülmények között nyugalomban kellene lennie.
2. **Tumor-szuppresszor gén aktiváció:** A tumor-szuppresszor gének **osztódást gátló** szignálként működnek. Ha egy mutáció inaktíválja ezeket a géneket inaktíválja, a sejt felszabadul a gátlás alól, növekedésnek, osztódásnak indul. Ez hozzáadódik az onkogén aktiváció hatásához.
3. **Programozott sejthalál (apoptózis) gátlása:** Az apoptózis szoros szabályozás alatt álló folyamat, amely során a szervezet megszabadul a szokatlan viselkedésű sejtektől. Sikeres ráksejtekben az apoptotikus folyamat kikapcsolt állapotban van, így a sejt képessé válik malignus leánysejtek létrehozására. Az apoptózis "kikapcsolásának" lépései:
  - a) pro-apoptotikus gének aktiválása
  - b) apoptotikus szignálok figyelmen kívül hagyása
  - c) a túlélési szignálok hiányának figyelmen kívül hagyása
4. **Angiogenezis:** a tumorok fejlődésük során képessé válnak rá, hogy stimulálják véredények kialakulását a tumorszövetben. Ezáltal növekszik a tumorszövet oxigén- és táp-

anyagellátása, ami elősegíti tumorszövet terjedését. Az angiogenezis kezdeti szakaszában a tumorsejtek **angiogén faktorokat** szekretálnak.

5. **Immortalizálódás:** Az egészséges sejtek szaporodási képessége limitált, a sejteknek van egy maximális élettartama. Ez a jelenség a minden sejtciklusban rövidülő telomerek révén szabályozódik, amely során ún. krízis után apoptózis következik be (telomer: bizonyos kromoszómák végein található régió). A rákos sejtekre jellemző a **telomeráz enzim kifejeződése**, ami differenciált sejtekben hiányzik. A telomeráz a ráksejtekben a telomer szakaszokat meghosszabbítja, így azok "mentesülnek" a generációs óra hatásai alól, esetükben az apoptózis nem következik be.
6. **Invázió – metasztatikus gének aktiválása:** Az elsődleges tumorok évekig növekedhetnek egyazon szerv területén belül, ám amint a sejtek áttörik a gátat és bekerülnek a véráramba, más szervekbe is vándorolhatnak és ott kolonizálódnak. Ez a **metasztázis**, a rákbetegség legveszélyesebb folyamata.
7. Az immunrendszer elkerülése – **blokkolás és rejtőzés**

## 22.4. A RÁKOS SEJTEK TULAJDONSÁGAI

- **Növekedési kontroll hiánya**  
A rákos sejtek nem válaszolnak olyan hatásokra, amelyek egészséges sejtekben a növekedési és osztódási folyamatok leállításához vezetnek. Növekedési és osztódási sebességük a normál sejtekéhez hasonló, de az egészséges sejtekkel ellentétben a ráksejtek növekedési faktorok hiányában és környező sejtekkel való kapcsolódás nélkül is képesek növekedni.
- **Réteges növekedés**  
Az egészséges sejtekből álló tenyészetek egy rétegben nőnek, a rákos sejtek azonban több-rétegű csomók formájában. A tumorsejtek képesek növekedni anélkül is, hogy valamilyen alapra kitapadnának.
- **Számbeli kromoszomális eltérések (aneuploidia)**  
A normál sejtek diploidok, a rákos sejtek azonban genetikailag instabilak és gyakran eltérő kromoszomaszámokkal rendelkeznek. Ezek létrejöhetnek a mitózis ellenőrzési pontjában keletkezett hiba vagy az abnormális számú centromér jelenlétének eredményeképpen.
- **Apoptózis hiba**  
Amikor egy egészséges sejt kromoszómakészlete zavart szenved, az apoptózis folyamata aktiválódik. Rákos sejtekben az apoptotikus sejtválasz hibás, vagy hiányzik.
- **Magas metabolikus követelmények**  
A ráksejtek gyakran függenek a glikolízis folyamatától, ami anaerob útvonal. Ez jelezheti a tumorsejtek magas anyagcsereigényét, és a tumor rossz vérellátottságát. Hypoxia esetében (csökkent  $O_2$ -szint) a ráksejtekben aktiválódik a HIF transzkripció factor, amely serkenti új véredények kialakulását és növeli a sejtek vándorlási képességét. Ezek hatására a tumor növekszik és terjed.

## 22.5. RÁKKELTŐ HATÁSOK

- Karcinogének: rákkeltő ágensek: DNS-t károsító ágensek
  - Kémiai mutagének (nagy mennyiségben vannak jelen cigarettában, koromban)
  - Ionizáló sugárzás (röntgen, UV)
- DNS és RNS tumor vírusok: olyan géneket hordoznak, amelyek terméke részt vesz a sejt-osztódás szabályozásában
  - DNS vírusok: polyoma vírus, simian vírus 40 (SV40), adenovírus, herpes-szerű vírusok
  - RNS vírusok (retrovírusok): szerkezetük a HIV vírushoz hasonló
- A legtöbb rákos megbetegedés oka máig ismeretlen
- A táplálkozási szokások befolyásolják a rák kockázatát
  - Pl. a zsír és az alkohol növelik a kockázatot
  - gyümölcsök, zöldségek számos összetevője csökkentik a kockázatot
  - egyes gyógyszerek megelőző hatása igazolt (aspirin, indomethacin)

## 22.6. A RÁK GENETIKÁJA

A rosszindulatú daganatok kialakulása (**tumorigenezis**) többlépcsős folyamat. A tumorigenezis minden lépése genetikai okokra vezethető vissza, tehát a folyamat értelmezhető úgy is, mint genetikai eltérések halmozódó sorozata. A rák egyetlen sejt kontrollálatlan osztódásának következtében jön létre, úgy mondjuk, a rák **monoklonális**.

Az emberi testben sejtek milliárdjai osztódnak nap mint nap. Ezek a sejtek hordozzák annak lehetőségét, hogy tumorsejteké mutálódjanak. A tumorigenezis azonban csak a teljes populáció egyharmadában játszódik le életük folyamán, mivel a rosszindulatú transzformációhoz egyetlen genetikai eltérés nem elegendő. Vannak azonban olyan öröklődő mutáció típusok, amelyek az egyént a rák kialakulására fogékonyabbá teszik. Az öröklött gének (**csíravonal mutáció**) hatással bírnak a rák kialakulásának kockázatára, de a legjelentősebb tényezők az egyedi élet során bekövetkező mutációk (**szomatikus mutáció**).

A rákhoz vezető genetikai változások **fokozatosan** következnek be, így a vonalon belüli sejtek:

- egyre kevésbé reagálnak a szabályozásra
- és egyre inkább alkalmasak betörni normál szövetekbe

Ennek megfelelően a tumorigenezishez szükség van egy sejtre, amely a rák iniciációjáért felelős. Ez a sejt nagyszámú sejtosztódás kivitelezésére képes. Ez a követelmény felhívta a figyelmet azokra a sejtípusokra, amelyek hordozzák a daganatsejtté válás lehetőségét.

Az első lépés a **jóindulatú daganat** kialakulása: kontrollálatlan szaporodású sejtömeg, amely nem metasztatizál (nem képez áttétet).

A karcinogenezisben részt vevő gének általában az alábbi folyamatokért felelősek:

- a) sejtciklus szabályozás
- b) adhézió (tapadás)
- c) DNS repair

A génmutációk sorozata befolyásolja a rák kifejlődését.

- Genetikai mechanizmusok: Pontmutáció / Transzlokáció / Amplifikáció → Abnormális kontroll → Növekvő proliferációs ráta → Tumor
- Nem-genetikai mechanizmusok: Protoonkogének funkcionális eltérései specifikus faktorok (gyulladás vagy vírusinfekció) vagy epigenetikai folyamatok hatására

## 22.7. ONKOGÉNEK

Az onkogének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek elősegítik a növekedési kontroll elvesztését, és a sejt átalakulását malignus állapotba. A legtöbb onkogén gyorsítja a sejtproliferációt, genetikai instabilitáshoz vezet, gátolja az apoptózist, vagy elősegíti a metasztázist. Az onkogének **domináns** módon hatnak. Transzformáló vírusok genomjában fedezték fel őket elsőként, mint a tumorigenezisért felelős géneket. A vírusok által hordozott onkogéneket **virális onkogéneknek** nevezzük (*v-onc*). Néhány transzformáló vírus és onkogénjeik:

- Rous sarcoma vírus - RSV (onkogén: src)
- Humán papilloma vírus - HPV (onkogének: E6, E7)
- Epstein-Barr vírus - EBV (onkogén: LMP1)
- Kaposi sarcoma-asszociált herpesz vírus - KSHV (onkogén: FGF4)

A retrovirális onkogének gazdasejt-eredetű proto-onkogénekből származnak (*c-onc*), mint az RSV esetében (ezért megkülönböztetünk *v-src* és *c-src* onkogéneket). Amikor a vírus a gazdasejttel találkozik, igyekszik azt megfertőzni. Ilyenkor létre jöhet *termékeny fertőzés* – a gazdasejtet ilyenkor permisszív sejtnak nevezzük: a gazdasejt a lítikus ciklusban elpusztul. A vírus DNS-e replikálódik a citoszolban, az új vírusdarabok összeszerelődnek és a sejt halálával az új vírusrészecskék kiszabadulnak. A transzformáció ritkábban, ún. nonpermisszív gazdasejtben történik: *abortív infekció* révén a virális DNS a gazdasejt genomjába integrálódik. Ez a genetikai változás fenotipikus – pl. alaki és méreti – változásokat idéz elő a sejtben. A vírus genom integrációja véletlenszerű folyamat, és ha pl. egy proto-onkogénben okoz változást, az onkogén aktiválódhat és ezzel a tumorigenezis első lépése befejeződik.

A **sejtes onkogének** normál sejtes, ún. **proto-onkogénekből** származnak, amelyek a normális sejtosztódásban vesznek részt, amelyek nem rendelkeznek ismert funkcióval. Alább található néhány, ismert funkciójú **proto-onkogén**:

- Növekedési faktorok
- Növekedési faktor receptorok
- Jelátviteli fehérjék
- Transzkripciós faktorok
- Sejtciklust szabályozó fehérjék
- MicroRNSEk

Bármely proto-onkogén esetében fellépő **szerkezeti eltérések** onkogéneket aktiválhatnak:

- a) strukturális mutációk
- b) regulációs mutációk
- c) epigenetikai eltérések

A proto-onkogén aktiváció különböző **útvonalai**:

1. **A normál funkció hiánya:** A génmutáció következtében a géntermék olyan mértékű eltérése, amelynek hatására a géntermék nem képes a feladatát ellátni.
2. **Gén amplifikáció** (erősítés): A gén egy vagy több alkalommal is duplikálódik, a kódolt fehérjéből többlet termelődik.
3. **Kromoszóma átrendeződés** következtében távoli DNS szakaszok közel kerülhetnek egy proto-onkogénhez, amelynek hatására a génkifejeződés, vagy a géntermék természete (szerkezete, működése) változhat.

Ahhoz, hogy egy sejt malignussá váljon, egy tumorszuppresszor-gén mindkét alléljának ki kell esnie, és egy proto-onkogén aktiválódásának is meg kell történnie.

### Példák onkogénekre

Különböző típusú tumorokban különböző onkogének aktiválódnak, amely a különböző sejttípusok jelátviteli folyamatainak sokféleségét tükrözi.

1. **Növekedési faktorok** és azok receptorai:
  - Simian sarcoma virus: A **sis** onkogént tartalmazza, amit egy sejteredetű génből származik (PDGF kódoló gén). A PDGF overexpressziója összefüggésbe hozható különböző agytumorok (gliómák) kialakulásával.
  - A madár eritroblasztózis vírus onkogénje, az **erbB** egy hibás EGF receptor kialakuláért felelős, amely a sejtet EGF jelenlétében stimulálja. A megváltozott receptor állandó stimuláció alatt tarja a sejtet, a növekedési faktor jelenlététől függetlenül.
  - Néhány rákos sejt a normál sejtekhez képest sok **sejtfelszíni receptorral** rendelkezik, ami érzékenyíti őket az alacsony koncentrációban jelenlévő növekedési faktorokkal szemben → a sejtosztódás túlzott stimulációja.
2. Citoplazmatikus **protein kinázok**:
  - **Raf** szerin-threonin kináz (MAP kináz kaszkád része). Mutáció → onkogén → az enzim mindig „bekapcsolt” állapotban.
  - **Src** tirozin kináz → jelátviteli fehérjék foszforilációja → citoskeleton, sejtes adhézió kontrollja.
3. Nukleáris **transzkripció faktorok**:
  - **Myc** fehérje: a sejtek a G<sub>0</sub> szakaszból visszatérnek a sejtciklusba. Overexpresszió → kontrollálatlan proliferáció
4. **Apoptózist** befolyásoló faktorok:
  - A **Bcl-2** gén túltermelődése → apoptózis elnyomása → abnormális sejtproliferáció → tumor kialakulása

## 22.8. TUMOR-SZUPPRESSZOR GÉNEK

A tumor-szuppresszor gének által kódolt fehérjék többsége a **sejtosztódás negatív regulátora** (fék funkció), amelyek kiesése kontrollálatlan proliferációhoz vezet. Ezen kívül részt vesznek a genetikai stabilitás fenntartásában is. Ez felel a rákos sejtekben megjelenő aberráns kariotípusok megjelenéséért.

Az onkogének proto-onkogénekből alakulnak ki, funkciónyeréses (gain-of-function) mutációk nyomán. Új funkcióval rendelkező géntermék jelenik meg, amely részt vesz a rák kialakulásában. A tumor-

szuppresszor gének ezzel szemben **funkcióvesztéssel mutácó** és/vagy **epigenetikus inaktiváció** eredményeként nem képesek a sejtnövekedés gátlására. Az onkogének a sejtproliferáció gázpedáljaként, a tumor-szuppresszor gének fékpedálként működnek. Az onkogénekkal ellentétben a tumor-szuppresszor gének mutációi recesszív módon öröklődnek (mindkét kromoszómán jelen kell lennie a mutációnak a hatás kifejeződéséhez).

#### A tumor-szuppresszor gének csoportosítása

1. Sejtfelszíni molekulák (TGF $\beta$  receptor, DCC)
2. Jelátviteli fehérjék (NF-1, GAPs, APC)
3. Transzkripció faktorok (RB, p53)
4. DNS repair gének (BRCA1, BRCA2, XP gének)
5. MicroRNSeK

#### Példák

##### Intracelluláris jelátviteli fehérjék

*Neurofibromatosis: NF-1*

→ Ras GTPáz aktiváció, proliferáció gátlása

*Adenomatosis polyposis coli (APC)*

→  $\beta$ -catenine degradáció serkentése; a  $\beta$ -catenine serkenti a sejtosztódást

##### Transzkripció faktorok

*Retinoblastoma*

Az RB gén volt az elsőként felfedezett tumor-szuppresszor gén. Kapcsolatban áll egy ritka gyermekkori szemet érintő rákos megbetegedés, a retinoblastoma kialakulásával. A betegség lehet öröklődő vagy sporadikus. Öröklött retinoblastoma esetében a családban halmozottan megjelenő jelleg a betegség kialakulására való hajlam, genotipikusan az egyik RB génkópia deléciós mutációja. A betegség fenotipikus megjelenéséhez azonban szükséges mindkét kópia hiánya vagy megváltozása. Tulajdonképpen egy második sporadikus mutáció lesz a betegség megjelenésének végső oka. Öröklött retinoblastomában szenvedő betegekben fennáll életük során más rákos megbetegedések kockázata, főleg lágy-szöveteket érintő sarcomák (inkább mesenchymális mint epiheliális eredetű tumorok kialakulásának veszélye áll fenn). Ilyen tumorsejtek in vitro „kezelhetőek” vad típusú RB gének bevitelével, amely képes elnyomni a rákos fenotípust. Ez bizonyítja, hogy a génfunkció kiesése lényegesen hozzájárul a rák kialakulásához. Az RB gén által kódolt fehérje (pRB) a sejtciklusban a G<sub>1</sub> → S átmenetet szabályozza. A pRB az E2F család transzkripció faktorait célozza. A G<sub>1</sub> fázisban az E2F fehérjék normálisan kötődnek a pRB-hez, ami megakadályozza, hogy aktiváljanak olyan géneket, amelyek az S-fázis működéséhez szükségesek (pl. ciklin E és DNS polimeráz). Ha egy sejt elveszti pRB aktivitását a RB mutációjának hatására, elvész az E2F inaktiválásának képessége, és vele az S-fázisba lépés bizonyos korlátai. A sejtciklus G<sub>1</sub> nyugalmi szakaszban tartása (amit a pRB irányít), szükséges a normál sejt differenciálódásához.

*A p53 fehérje*

A p53 fehérjét emlegetik úgy is, mint a „genom őrzője”, mivel a tumorok kialakulását gátolja és fenntartja a genetikai stabilitást. A p53 gén talán a legfontosabb tumor-szuppresszor gén a humán genomban (A TP53 a leggyakrabban mutálódott gén humán rákos szövetekben). A p53 transzkripció faktorként működik, genetikai sérülés esetében gátolja a G<sub>1</sub>-S átmenetet annak érdekében, hogy a sejt időt



nyerjen a DNS repair folyamatok elvégzéséhez. Ezen kívül a p53 képes beindítani az apoptózis folyamatát annak érdekében, így távolítva el a genetikailag sérült sejteket. A DNS repair hibás működése esetében abnormális sejtek jönnek létre, amelyekben potenciálisan rákos folyamatok indulhatnak be. A p53 fehérje megfelelő működése nagyon érzékenyen reagál az aminosav szekvencia kismértékű változására is.

### Egyéb tumor-szuppresszor gének

Néhány ráktípusban kimutatható az RB-n és p53-n kívül más tumor-szuppresszor gének hatása.

1. Vastagbélrák: Az APC tumor-szuppresszor gén öröklött deléciója.
2. Öröklött emlőrák: a BRCA tumor-szuppresszor géncsalád egy tagjának mutációja (A BRCA transzkripció faktoraként működik, a DNS repairben van szerepe).

### MicroRNSEk: új játékosok a rák genetikájában

A microRNSEk (miRNS) rövid RNS molekulák, amik egy cél mRNS expresszióját negatívan szabályozzák. Néhány miRNS proto-onkogéneket kódoló mRNS-t gátol. A miRNS hiányában az onkogén fehérje nagy mennyiségben termelődik, ami a rák kialakulásának kedvez. Mivel ezek a miRNSek gátolják a tumorigenezist, tumor szuppresszoroknak nevezhetők. Egyes miRNSek inkább onkogénként működnek, pl. egy miRNS géncsoport nagy mennyiségben expresszálódik egyes limfómák esetében. A miRNSek megváltozott expressziója vélhetően a tumorsejtek invazív természetével és az áttétképződéssel is összefüggésbe hozható.

## 22.9. A RÁK ELLENI KÜZDELEM ÚJ STRATÉGIÁI

A hagyományos rákellenes terápiák mellékhatása a tumorsejteken túl az egészséges sejtek elpusztítása. Folyamatban van olyan új terápiás megoldások kidolgozása, a korábbi módszerek leváltása. Az ún. **célzott kezelések** kidolgozásakor felhasználják eddigi ismereteinket a rákos folyamatok molekuláris alapjairól, amelyek a kutatások nyomán egyre bővülnek. Egy kezelés akkor tekinthető célzottnak, ha kizárólag a rákos sejteket támadja, az egészségesekre viszont nincs hatása. Más szavakkal: a kezelés olyan fehérjét céloz, amelyek inaktiválása a rákos sejtek túlélését vagy növekedését gátolja. A kezelés célzottan irányulhat egy bizonyos beteg rákos sejtjeire a szomatikus mutációk egyedi mintázatának alapján. Számos új és újonnan fejlesztett kezelés igen hatékonyan bizonyult célzott terápiában, így az ilyen irányú kutatások igen népszerűek.

Új stratégiák:

1. Antitestek tumorsejtek ellen.
2. Rákos folyamatot elindító fehérjék gátlása.
3. A rákszövet táplálásáért felelős vérerek növekedésének gátlása.

### Immunterápia

#### Passzív immunterápia

A passzív immunterápia mesterséges környezetben (laboratóriumban) termelt antitesteket alkalmaz, amelyek a betegbe juttatva védettséget adnak a betegség ellen. A passzív immunterápia a vakcináktól eltérően hat, vagyis nem a szervezet immunrendszerének aktív válasza serkentése a cél. Általában **monoklonális antitesteket** használnak, amely egyetlen, ráksejt-specifikus célponthoz kötődik, vagy tumor-specifikus enzimet/fehérjét céloz meg. Ezért ezt célzott terápiának tekintjük. Az antitest kötődése apoptotikus folyamatot indít el a rákos sejtben.

- Herceptin: növekedési faktorokat célzó ellenanyag (emlőrák sejtek proliferációját stimuláló faktorok elleni antitest) – az emlőrákos esetek 25%-a érzékeny erre a kezelésre
- Rituxan: non-Hodgkin limfómában B-sejtek sejtfelszíni fehérjéihez kötődik (95%-ban sikeres kezelés)
- Vectibix: vastagbél daganatos esetekben EGF receptorok ellen irányuló kezelés
- Arzerra: krónikus limfocitás leukémia lehetséges kezelésére
- Fejlesztés alatt: radioaktív atom vagy toxikus vegyület hozzákapcsolása az antitesthez – szelektív kötődés és a célzott sejt elpusztítása.

### Aktív immunterápia

Az **aktív immunterápia** serkenti az immunrendszert, hogy harcoljon a rákos sejtek ellen. A rákellenes vakcinák főleg megelőzésre szolgálnak, azaz a betegség megjelenése előtt alkalmazhatók. A terápiás vakcinákat – pl. prosztatatarák ellen – már kialakult betegségben szenvedőknek adják be. A rákellenes vakcinák szintén célzott kezelések, mivel hatásukra az immunrendszer a ráksejteket támadja, egy vagy több specifikus tumor antigén felismerése révén.

- Dendritikus sejtek (immunsejtek) rákos betegből → kényszerítik rákos fehérjék bemutatására → vissza a betegbe → a tumor megállítható
- Más megközelítés: telomeráz elleni vakcina kifejlesztése
- Más személyre szabott kezelések fejlesztése

### Immuntoxinok

Az **immunotoxinok** olyan mesterséges fehérjék, amelyekben egy antitesthez egy toxin kapcsolódik. A toxin felelősíti az antitest hatását, az antitest pedig a kezelés specifitását adja. A fehérje beköt a (rákos) sejt felszínére → endocitózis → a toxin elpusztítja a sejtet. Az immunotoxinok nem okoznak allergiás reakciót, a célsejt elleni toxicitás azonban megtartott. Összefoglalva, az immunotoxinok kizárólag a cél (rákos) sejtet pusztítják el, mellékhatás nélkül. Két példa olyan toxinokra, amelyeket ilyen terápiában antigénekhez lehet kapcsolni:

- ricin: a ricinus (*Ricinus communis*) magjának olaja
- mellitin: a méhek fullánkjában található mérgező komponense

### Rákkeltő fehérjék gátlása

A rákos sejtek viselkedéséért az abnormális koncentrációban jelen lévő, vagy a normálistól eltérő aktivitású fehérjék felelősek. Más szóval, a tumorsejtek **onkogén-függők**: a mutáns fehérjék folyamatos aktivitásától függenek. Az ilyen fehérjék blokkolása elpusztíthatja a rákos sejtet, vagy megállíthatja annak növekedését, csökkentheti invazív tulajdonságát. A kutatók olyan kis molekulású vegyületek egész arsenáljára tettek szert, amelyek az abnormális fehérjék működését gátolják. Májig az eredmények mérsékelt sikert mutatnak, vélhetőleg azért, mert a vegyületek a tumoron belül nem a megfelelő sejteket célozzák.

### Új vérerek képződésének (angiogenezis) gátlása

A tumorok fejlődése során megtörténhet az ún. „angiogén váltás”, amikor a gyógyulási esélyek jelentős csökkenése figyelhető meg a metasztázis kialakulásának veszélye miatt. Az ún. angiogenezis inhibitorok gátolják a tumor számára a tápanyagokhoz és oxigénhez jutást, így ezek az anyagok használhatóak a rák elleni harcban (pl. Avastin, a VEGF növekedési hormon gátlószere).

## 23. GENETIKA

### 23.1. BEVEZETÉS A GENETIKÁBA

#### A genetikai kód

A genetikai információ áramlása a sejt genetikai anyagával, a DNS-el kezdődik, amely 4 különböző nukleotidból épül fel. Első lépésben a DNS nukleotidokat az RNS polimerázok átírják rövidebb, komplementer RNS molekulákra (transzkripció). A második átalakulás az RNS kodonok lefordítása peptidekre a riboszómákon (transzláció), amelyek polipeptid-láncokat építenek fel. Erősen leegyszerűsítve:



#### A génkifejeződés (génexpresszió) szabályozása

A génexpresszió szabályozása több szinten lehetséges.

1. Transzkripció szintjén
  - a) Az egyes gének a genomban több példányban is jelen lehetnek, nagyobb **kópiaszám** erősebb génkifejeződést eredményez.
  - b) A transzkripció megkezdéséhez szükséges bizonyos transzkripciós faktorok kötődése a promoter régióhoz, a **promoter aktivitás** megváltozása a génexpressziót befolyásolja.
  - c) Hasonlóképpen, az ún. **upstream szabályozó szakaszokhoz** (enhancerek, silencerek) kapcsolódó faktorok megváltoztatják a gén kifejeződését.
  - d) A **DNS metilációja** szintén hatással van a génexpresszió szintjére.
2. Transzláció szintjén
  - a) Az **mRNS molekulák élettideje** hatással van a génexpresszióra: hosszabb élettidő magasabb expressziót eredményez.
  - b) A **kodonhasználat** befolyásolja a génkifejeződést (a genetikai kód degenerált, ld. „A genetikai kód”).
  - c) **Alternatív splicing** következtében egy génről több különböző mRNS transzkript származhat, ld. „mRNS érés”.
  - d) **RNS interferencia** léphet fel, kis RNS-ek csendesíthetik az mRNS-t azzal, hogy hozzájuk kötődnek, és így azok nem transzlálódnak.
3. Poszt-transzlációs modifikációk
  - a) **Kémiai modifikáció** módosíthatja a fehérje funkcióját. Lokalizációját target szekvencia hozzáadása segítheti, diszulfid-hidak képződése pedig a megfelelő tekeredésben (folding) lehet fontos. Az aminosavak hidroxilációja vagy foszforilációja is szükséges lehet egyes fehérjetermékek funkciójának betöltéséhez.
  - b) A **protein turnover** a fehérje működését befolyásolja.
  - c) **Inhibíció vagy allosztérikus változások** befolyásolhatják a fehérje működését.

#### Alapfogalmak

- A **genom** egy élőlény teljes öröklődő genetikai állománya (DNS).
- A **gén** az öröklődés alapegysége, általánosságban egy gén egy géntermék (polipeptid vagy RNS) létrehozásához szükséges információt hordozza. Ezért a géneket a genetika alapegységének is nevezik.

- A **kariotípus** a fajspecifikus kromoszómák számát és morfológiáját jelenti (más néven kromoszóma mintázat).
- A **géntérkép** a gének elhelyezkedését mutatja a kromoszómákon.
- A **citogenetika** a kromoszómák szerkezetét és öröklődését tanulmányozza.
- A **szomatikus sejtek** diploidok, vagyis két teljes kromoszómakészlettel rendelkeznek (emberben ez 46 kromoszómát jelent), amelyből 22 pár autoszóma, és egy pár nemi kromoszóma vagy alloszóma, X és Y (férfiakban XY, nőkben XX).
- A **csíravonal sejtek** monoploidok: egy kromoszómaszettel rendelkeznek (22 autoszóma és egy nemi kromoszóma – X vagy Y).
- Homológ kromoszómák vagy **homológok**: egy kromoszómapár tagjai, amelyek azonos szakaszokon (**lókusz**) ugyanazt a **gént**, annak különböző formáit (**allélek**) hordozzák.
- A **fenotípus** a megfigyelhető jellemzők (**jellegek**) összessége, a **genotípus** pedig az egyed génjeinek összességét jelöli.
- A **homozigóta** egyedek két azonos alléllal rendelkeznek az adott lókuszon, míg a heterozigóták különböző allélt hordoznak a homológok adott lókuszán.

### Kromoszómák

A humán kariotípus 46 kromoszómából áll, amelyből 44 autoszóma és 2 ivari kromoszóma (X és Y). A kromoszómák morfológiailag a **centromer** helyzete alapján írhatók le (az a szakasz, ahol a testvérkromatidák a mitózis metafázisában összekapcsolódnak). Ez alapján meghatározható a karok relatív hossza (p jelzi a rövid kart, q a hosszút). A **metacentrikus** kromoszómák esetében a centromer középen helyezkedik el, tehát a karok hossza egyezik. Az **akrocentrikus** kromoszómák centromerje az egyik kar végén van, az egyik kar tehát igen rövid, a másik hosszú. **Szubmetacentrikus** kromoszómák képezik a kettő közötti átmenetet, egy rövidebb és egy hosszabb karral.

A kromoszómákat hosszuk és a centromer pozíció alapján 7 csoportra osztjuk.

Giemsa festést követően **kariogramot** hozhatunk létre a kromoszómák párba állításával és méret szerinti számozásával. Az **idiogram** a kariogram sematikus ábrázolása, amely a karakterisztikus G-sávozás mintázatát is tartalmazza, és ahol egy sáv kb. 50 gént fed le. A sávok számozása a centromertől kifelé növekszik, az első szám a régiót jelzi, a második a sávra vonatkozik, amely után egy harmadik, al-sávot jelző szám is lehet. Pl. a humán fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) lókusza a 6. kromoszóma rövid karján, a 6p21.3 ("hat pé kettő egy pont három").

### Kapcsolt gének

(ld. „Genetikai kapcsoltság”)

A meiózis profázis I alatt átkereszteződések, ún. **crossing overek** történhetnek (genetikai anyag kicserélődése) a kromoszómapárok között, amelynek eredményeképpen **rekombináns kromoszómák** jönnek létre. Amikor összetartozó kromoszómális régiók (természetesen a homológokon) eltörnek, a másik kromoszómával összekapcsolódhatnak. Két közeli lókusz nagy valószínűséggel ugyanazon a testvérkromatidán lesz megtalálható. Annak valószínűsége, hogy egy crossover a két lókusz között történik, a gének (lókuszok) távolságának függvénye. Az egymáshoz közelebb elhelyezkedő gének nagyobb valószínűséggel öröklődnek együtt. Két gén távolságát **centimorgan**-ban fejezzük ki (cM – Thomas Hunt Morgan genetikus iránt való tiszteletből). Megjegyezzük, hogy a genetikai "távolság" nem valódi fizikai távolságot fejez ki.

## A humán genom

A humán genom 46 sejtmagi kromoszómából áll (ezen felül rendelkezünk az ún. mitokondriális genommal, ld. „Mitokondriumok” fejezet): 22 pár autoszóma és egy pár alloszóma (nemi kromoszóma). A petesejtek és spermiumok genomja haploid, 3 milliárd bázispárnyi DNS-ből áll. A diploid testi sejtek genomja 6 milliárd bázispárnyi genetikai információt tartalmaz. A különböző humán genomok közötti különbség a 0,1% tartományban mozog, míg a humán genom eltérése legközelebbi rokonunk, a csimpánz genomjától 4% körüli érték. A humán genom szekvenciájának felfedésére nagy erőfeszítéseket tesz a tudomány: 2012-ben a Human Genome Project human genomok ezreinek bázissorrendjét határozta meg. További információért a Human Genome Project kapcsán ld. a „Humán Genom Projekt” fejezetet, ill. előadás anyagot.

A humán genom 20.000-25.000 fehérjekódoló gént tartalmaz, ami csak egy kis, 1,5%-os hányadát adja a teljes genomnak. A maradék **nem-kódoló DNS**, mely az alábbiakat tartalmazza:

- nem-kódoló RNS-ek génjei (pl. tRNS és rRNS)
- **pszeudogének**
- **intronok**
- mRNS-ek át nem íródó szakaszai
- szabályozó DNS szakaszok
- ismétlődő DNS szakaszok
- mozgó genetikai elemekhez kapcsolódó szakaszok

A **pszeudogének** nem-kódoló gének, amelyek az evolúció során duplikációk és divergencia útján jelentek meg. Egyesek szabályozó szerepet töltenek be (promoterek, splicing helyek), mások funkciójukat elvesztették, nem expresszálódnak a sejtben. A pszeudogéneknek közös őse van egy funkcionális génnel, így használhatók evolúciós összefüggések vizsgálatára. Elhelyezkedésük összefügg az egyedfejlődés során megfigyelhető expressziós mintázattal. Pl. az alfa-globin gén exon-intron mintázata számos gerinces fajban konzerválódott (a humán és növényi globin gének egyaránt 3 intront tartalmaznak). Az egyedfejlődés során való kifejeződés sorrendje ismétli az evolúciós sorrendet.

A **gén családok** hasonló gének csoportjai, amelyek az eredeti gén duplikációja révén jelentek meg. Például a humán hemoglobinnal kódoló tíz gén két, külön kromoszómán elhelyezkedő klaszterben helyezkedik el: az alfa-globin és a béta-globin lokuszokon.

## A molekuláris genetikai kutatások gyakorlati haszna különböző területeken, és vitatott kérdések

**Molekuláris medicina:** Egy egyén DNS-szekvenciájának ismerete számos betegség **diagnózisát** elősegíti, akár a betegség súlyosságát is tesztelhetjük. A Huntington-kór jó példa erre. A neuronális diszfunkció oka a betegségben a kórosan meghosszabbodott huntingtin protein darabolása során képződő toxikus fragmentek felhalmozódása. A fehérje hossza egy kórosan nagy számú CAG triplet ismétlődés (triplet repeat expanzió) miatt nő meg: 10-35 a normál ismétlődés-szám; a 36-39 repeat-tel rendelkezők esetében előfordulhat, hogy a betegség tünetei nem jelennek meg, ám 40-120 közötti ismétlés esetében szinte mindig manifesztálóik a betegség fenotípusa. 60 feletti repeat-szám esetében a betegség korai kezdetű formája mutatkozik, 60 alatti számnál időskori megbetegedés a jellemző.

A **farmakogenomika** ún. „egyedi gyógyszerek” kifejlesztésével foglalkozik, az egyén genetikai profiljának vizsgálatából szerzett adatok alapján. Rizikóbecslés is végezhető hasonló tesztek kiértékelésével azok számára, akik sugárzásnak vagy rákkeltő anyagoknak, illetve toxinoknak lehetnek kitéve.

A **bioarcheológia, antropológia, evolúció-kutatás és humán migráció** területén a genomika az **evolúciós** (leszármazási vonalak csírvonal-mutációinak vizsgálata) és **népvándorlási** folyamatok (anyai

öröklődés vizsgálata) megértésében segíthet. Az Y kromoszóma mutációinak vizsgálatával követhetjük a férfiak leszármazási vonalait és vándorlását.

DNS-alapú személyazonosítás: az **igazságügyben** összevethetik a gyanúsított DNS-ét a bizonyítékkal, esetleg felmenthetnek addig tévesen elítélt személyeket, bűntények és katasztrófák áldozatait azonosíthatják, vagy apasági és egyéb rokoni kapcsolatot igazolhatnak genomikai módszerek alkalmazásával.

Ökológiában a molekuláris genetika módszerei alkalmazhatók veszélyeztetett vagy védett fajok azonosítására, vagy szennyező mikroorganizmusok azonosítására.

Szervátültetést megelőzően a molekuláris genetika megkönnyítheti a donorok utáni kutatást. A lehetséges donorok köre kibővíthető, mivel a családtagok nem minden esetben alkalmasak, viszont rokonságban nem álló személyek is megfelelhetnek, ami genomikai módszerekkel gyorsan tesztelhető.

A mezőgazdaság és a bioprocesszálas területén a molekuláris genetika eredményei segíthetnek a költségek csökkentésében, táplálékos és peszticid-mentes élelem termelésében, a hozam növelésében és a hulladék mennyiségének csökkentésében. Vakcinák termeltethetők takarmánynövényekben, így a vadállományt immunizálhatjuk bizonyos patogének ellen. Olyan alternatív alkalmazási területeket fejleszthetnek ki, mint pl. annak a genetikailag módosított dohánynövénynek az esetében, amely egy bakteriális eredetű enzimet termel, ami képes az olyan robbanószer-maradványok lebontására, mint a TNT vagy a nitroglicerin.

A mikrobiális genomika gyors és hatékony megoldást kínál patogének kimutatására, valamint új energiaforrások (bioüzemanyagok) termelésére. Genetikailag módosított baktériumok apró bioüzemekként termelhetnek gyógyszereket, detergenset, vagy akár műanyagot is.

A genetikai kutatás haszna mellett azonban felvet bizonyos kérdéseket is. Ezek között vannak a genetikai információ személyes jellegére vonatkozó kérdések, az információkon alapuló diszkrimináció lehetősége is fennáll. Ezen kívül, mivel a genetikai tesztek is magukban hordoznak egy minimális tévedési esélyt, a tesztek megbízhatósága 100% alatt marad. További kérdéseket vet fel a tesztek, mint termékek piacra kerülése, az üzleti kérdés.

A reproduktivitás kérdése szerint bizonytalan, hogy a szülők megértik-e a genetikai technológia korlátait és veszélyeit, ami alapján helyes döntést hoznak az egyébként megbízható, de mégsem 100%-os eredmények ismeretében.

Klinikai irányelvek szerint a tesztek pontosságát és megbízhatóságát ki kell értékelni, valamint az egészségügyi dolgozókat fel kell készíteni az új módszerek alkalmazására. Ezen kívül itt is jelen van a betegek számára elérhető és elegendő információ kérdése, a helyes döntéshozatali képesség bizonytalansága.

Filozófiai kérdések is akadnak, az emberi felelősség, szabad akarat, genetikai determinizmus témakörében.

Végül, egészséget és környezet/természetvédelmet érintő problémák merülhetnek fel azt illetően, hogy a genetikailag módosított élelmiszerek biztonságosak-e az ember és a környezet számára.

## Genetikai betegségek

A genetikai betegségek olyan rendellenességek, amelyek háttérben genetikai eltérések/mutációk (is) állnak. A veleszületett rendellenességek születéskor jelen vannak, mások az élet folyamán később jelentkeznek (akár öregkorban, mint az Alzheimer-kór). Ha a betegség háttérben egy vagy több kromoszóma rendellenessége áll, **kromoszómális rendellenességről** beszélünk. Egyes betegségeket tisztán genetikai tényezők határoznak meg, mások a genetikai háttérrel felül nem-genetikai trigger



hatására alakulnak ki (**multifaktoriális** betegségek). Egyetlen gén hibájára visszavezethető rendellenességeket **monogénes** betegségeknek nevezzük, míg azok, amelyek több gén mutációjának hatására fejeződnek ki, ún. **poligénes** betegségek.

A **kromoszómális rendellenességeket** az érintett kromoszóma, illetve a tüneteket okozó mutáció természete alapján osztályozzuk. Ld. „Kromoszómarendellenességek” fejezet.

1. Az **autoszómális aneuploidia** szindrómák autoszómát érintenek, az adott kromoszóma a normálistól (2) eltérő számban van jelen, leggyakoribbak a következő triszómiák: Down-szindróma (21. triszómia), Patau-szindróma (13. triszómia), Edwards-szindróma (18. triszómia).
2. Az **ivari kromoszómát érintő aneuploidia** szindrómák alloszómát érintenek, amely számbeli eltérést mutat. Az eltérés származhat egy, a meiózis során létrejövő anyai nondiszjunkcióból. A Turner-szindrómás nők egyetlen X kromoszómával rendelkeznek (45,X), míg egy két X és egy Y kromoszómával rendelkező férfi Klinefelter-szindrómában szenved (47, XXY).
3. **Ivari kromoszómát érintő triploidia** felelős a tripla X szindróma tüneteért (47, XXX).
4. A gyakori **deléció szindrómákat** egy kromoszóma egy részének hiánya okozza, ami létrejöhet a meiózis során egy hibás crossover nyomán. Az ilyen eltéréseket kariotipizálással lehet detektálni. Az 5. kromoszóma rövid karjának részleges deléciója okozza a Cri-du-chat tünetegyüttest (macskanyávogásos betegség).
5. A **mikrodeléció szindrómákat** olyan rövid kromoszómális deléciók okozzák, amelyek kariotipizálással nem detektálhatók, vizualizálhatóak azonban FISH technikával (Fluoreszcens In Situ Hibridizáció). Angelman-szindrómában az anyai eredetű 15. kromoszóma géneinek deléciója vagy inaktivációja okozza a tüneteket, míg az apai eredetű kópia az imprinting miatt csendesítés alatt áll. Prader-Willi szindrómában hasonlóan az apai eredetű gén hiányzik, és anyai imprinting figyelhető meg.
6. **Triplet repeat expanszió** esetében instabil bázishármas ismétlődés figyelhető meg. A jelenség áll a Huntington-kór hátterében, ha a triplet ismétlődések száma 35 fölötti. Az abnormális HTT protein okozza a tüneteket. Fragilis X szindróma esetében, egy 200 feletti ismétlődés-szám az FMR1 gén promoter régiójának metilációját okozza, a gént ezzel lecsendesítve. A géntermék a normális idegi fejlődéshez elengedhetetlen.

A **monogénes (Mendeli) öröklődésű betegségeket** egyetlen génben fellépő mutáció okozza. Részletekért ld. a “Monogénes (Mendeli) öröklődés” c. fejezetet.

1. **Autoszómális domináns** öröklődésű betegségek: A heterozigóták is érintettek (betegek), vagyis már egyetlen mutáns allél is tüneti megjelenéshez vezet. Pl. achondroplasia, Huntington-kór, Marfan-szindróma.
2. **Autoszómális recesszív** öröklődésű betegségek: Csak homozigóták lesznek érintettek, a tüneti megjelenéshez két mutáns allél szükséges. Pl. alkaptonuria, cisztás fibrózis. Ha mindkét allél mutáns, de a két mutáció különbözik, az egyedet összetett heterozigótának nevezzük: mint például a b-thalassemia bizonyos eseteiben. Ha egy egyén két mutációt hodosz különböző lókuszon, dupla heterozigótának nevezzük.
3. **X-kapcsolt recesszív** öröklődésű betegségek hátterében egy X-kromoszómán található gén mutációja áll. Többségében kizárólag férfiakat érintenek ezek a betegségek, egy női vonalon keresztül, pl. Duchenne-izondisztrófia, hemofília (vérzékenység), Vörös-zöld színvesztés.

**Poligénes öröklődés, komplex betegségek:** Nem csak egyetlen gén felelős a betegség megjelenéséért. Sokszor számos gén (poligénes), vagy akár környezeti tényezők (komplex) együttes hatására alakul ki a betegség. Ld. a „Poligénes öröklődés, komplex betegségek” fejezetet. Néhány példa az Alzheimer-kór, Diabétesz mellitusz, magas vérnyomás.

**Mitokondriális öröklődés** alatt olyan atipikus mendeli öröklődésmintázatot értünk, ami megfigyelhető olyan betegségeknél amiket mitokondriális génmutáció okoz. Ezeket a betegségeket tisztán anyai (maternális) öröklődésmintázat jellemzi, mint pl. a Leber-féle öröklődő optikus neuropátia (LHON) esetében megfigyelhető. A mitokondriális öröklődést ld. a „Mitokondriális öröklődés”, és a „Mitokondriumok” fejezetben.

## Mutációk

A mutáció a DNS szerkezeti változása, ami a leánysejtekbe továbböröklődik. Az érintett sejtek arányának függvényében megkülönböztetünk szomatikus és csíravonal mutációkat. A **csíravonal** mutációk ivarsejtekben jönnek létre, így a megtermékenyítés után a teljes utódszervezet hordozza a mutációt. **Szomatikus** mutáció egy szervezet egyedfejlődése során alakul ki egyetlen sejtben, így csak a sejtek egy része hordozza azt.

A mutációk csoportosítása szerkezeti vagy funkcionális alapon történhet.

Szerkezeti csoportosítás:

1. Kromoszóma mutációk: egy kromoszóma részének vagy egészének megváltozása
2. Génmutációk: a genomiális DNS rövid szakaszának megváltozása

a) Pontmutáció = nukleotid szubsztitúció: egyetlen nukleotid megváltozása

A szubsztitúció típusa alapján tovább csoportosítható:

- (1) Tranzíció: purin→purin (A→G vagy G→A) változás, vagy pirimidin→pirimidin (C→T vagy T→C)
- (2) Transzverzió: purin→pirimidin, vagy pirimidin→purin változás

A fehérjetermékre kifejtett hatása alapján tovább csoportosítva:

- (1) Silent (csendes) mutáció: a kódolt aminosav nem változik (a genetikai kód degenerált)
- (2) Missense mutáció: aminosav-változást okoz
  - (a) Konzervatív: nincs hatása a fehérje funkciójára
  - (b) Non-konzervatív: a fehérje működése változik (pl. A→T sarlósejtes vérszegénységet okoz Glu→Val szubsztitúció)
- (3) Nonsense mutáció: új STOP kodon jön létre, korai terminációt okozva
- (4) Szabályozási mutáció = transzkripció mutáció: regulációs szakaszt érintő mutáció, ami megváltozott mRNS átírást okoz
- (5) RNS processing mutáció: az mRNS processzálást érintő mutáció (splicing, 5'-sapaképződés vagy 3' poliadeniláció)
  - (a) A splicing hely mutációi egy intron elején vagy végén jelenhetnek meg, exon skipping (exon deléció) jön létre (a splice acceptor szakasz mutációja)
  - (b) Kriptikus splicing hely aktiválódás történhet egy egyébként csndesített splicing hely mutációja révén, rövidült exont eredményezve



b) Deléció/inszerció: több nukleotid hiány/többlet, ide tartozik a duplikáció is.

- (1) Kis deléciók/inszerciók: néhány nukleotid törlődése/inszerciója, eredhet “csúszásból” (slippage): Replikáció során mispairing (hibás bázispárosodás) történik a komplementer szálak között.
  - (a) Frameshift (keret-eltolódási) mutáció: A törlődött/inszertált nukleotidok száma nem 3-al osztható, a mutáció megzavarja a leolvasási keretet, rövidült fehérjeterméket eredményezve.
  - (b) In-frame (keretmegtartó) mutáció: A mutálódott nukleotidok száma 3 többszöröse, a leolvasási keret tehát sértetlen marad.
- (2) Nagy deléciók/inszerciók: 22 bp - 10 Mb fragment hosszúságú szakasz kiesése/inszerciója. Az ennél nagyobb mutációk fénymikroszkóppal vizsgálhatók, azokat a kromozómamutációk közé soroljuk.
  - (a) Egyenlőtlen crossing-over: Ha közeli homológiával rendelkező közeli szakaszok között hibás kapcsolódás jön létre, az ezek közötti egyenlőtlen átkereszteződés az egyik kromatidán deléciót, a másikon duplikációt okoz.
  - (b) Retrotranszpozíció: Ritkán, a nagy inszerciókat olyan “ugráló” genetikai elemek hozzák létre, mint a SINES vagy a LINES (short és long interspersed sequences), amik egyik genomi szakaszból (deléció) a másikra helyeződnek át (inszerció).
- (3) Instabil triplet repeat expanziók: Bázishármas ismétlődések számának egy kritikus határ fölé növekedése okozhat génszupressziót (Fragilis X szindróma), vagy hibás fehérje termeléshez vezethet (Huntington-kór).

Funkcionális csoportosítás:

1. Funkcióvesztés: Loss-of-function (LOF). A géntermék mennyisége vagy aktivitása csökkent. Autoszomális recesszív öröklődésű állapotok esetében a heterozigóta hordozó egészséges, mivel a normál géntermék 50%-a elegendő a normál funkció betöltéséhez. Autoszomális domináns esetben a normál géntermék 50%-a nem elegendő a feladat betöltéséhez, ezt a jelenséget nevezzük **haploinsufficienciának**.
2. Funkciónyerés: Gain-of-function (GOF). A mutáció eredményeképpen a géntermék aktivitása vagy mennyisége megnövekedett, vagy a géntermék új funkciója jelenik meg. Tipikusan a Huntington-kór hátterében domináns öröklődésű funkciónyeréses mutáció.
3. Domináns negatív hatás: A mutáns allél terméke interferál a normál allél termékével, végső soron csökkentve a fehérje hatékonyságát.

### Szakkifejezések, amiket érdemes tudni genetika tanulásakor

Mozaikosság (mozaicizmus): Az olyan egyént/egyedet, ami több, genetikailag különböző sejtvonalból áll, mozaiknak nevezzük. A sejtvonalak mutációja a korai egyedfejlődés során alakult ki. A szervezet sejtjeinek egyik része tehát különböző genommal rendelkezik.

Genomiális imprinting (bevésődés): génexpressziós különbségek a szülői eredet alapján.

Epigenetikai hatás: Olyan génexpressziós eltérés, amelyet nem mutáció okoz.

Homozigóta: olyan egyén, aki a két homológon azonos alléleket hordoz.

Heterozigóta: olyan egyén, aki a két homológon különböző allélekkel rendelkezik.

Összetett heterozigóta: olyan egyén, aki két különböző mutáns allélt hordoz a homológokon. Gyakori cisztás fibrózisban és b-thalassemia esetében.

Hemizigóta: olyan egyén, aki egyetlen alléllal rendelkezik (vagy érthetjük kromoszómára is – tipikusan féfiakban).

Pleiotrópia: Egy gén több olyan jellegre van hatással, amelyek látszólag egymástól függetlenek. Például fenilketonuriában (PKU), amit a fenilalanin hidroxiláz génjének mutációja okoz, jellemzők mind mentális tünetek, mind pigmentációs és testmagasság-beli eltérések.

## 23.2. KROMOSZÓMA RENDELLENESSÉGEK

A kromoszóma mutációk a kromoszómákon létrejövő változások. A változásokat gyakran a meiózis során kialakult problémák, vagy mutagének idézik elő (pl.: vegyszerek, sugárzás). Kromoszóma mutációk okozhatnak eltérést a **kromoszómák számában** és a **kromoszómák struktúrájában**. A változások hatása az egyénre gyakran megjósolhatatlan.

A lejjebb sorolt kromoszóma mutációkat a citogenetika eszköztárával vizsgáljuk (lásd „Speciális módszerek a genetikában” fejezet.)

### Kromoszóma rendellenességek csoportosítása

Csoportosíthatjuk őket a változás természete szerint: így lehetnek **számbeli eltérések (aneuploidiák)**, vagy a **kromoszóma strukturális eltérései**. Csoportosíthatjuk őket aszerint is, hogy mely kromoszómákat érintik, ez alapján megkülönböztetünk **szex kromoszómát érintő** és **autoszómát érintő abnormalitásokat**.

A kromoszóma rendellenességek lehetnek **öröklöttek**, vagy kialakulhatnak „**de novo**”. Egészséges szülők is továbbörökíthetnek betegségeket, például triszómiát kialakíthat egy teljesen egészséges szülő transzlokációja.

A fejlődés során létrejött kromoszóma rendellenességek többsége már a petesejtben, vagy a spermiumban jelen van. Néhány abnormalitás azonban csak a megtermékenyítést követően alakul ki, így mozaicizmust eredményez, ahol a sejtek egy része tartalmazni fogja a változást, míg mások nem.

A kromoszóma rendellenességek rizikója az anya életkorával nő. A jelenség magyarázható azzal a ténnyel, hogy a nők petesejtjeikkel együtt születnek, így egy 30 éves nő 30 éves petesejtjeikkel rendelkezik. A genetikai mutációk és problémák felhalmozódhatnak az évek során. Az **anya életkora** mellett a **környezeti tényezők** fontosak még, mint a sugárzás és a kémiai mutagén ágensek. Vannak tanulmányok, amik az apa életkorával is összefüggést mutatnak, azonban ennek jóval kisebb hatása van a rizikófaktorokra.

Az anya életkora	Down szindróma rizikója	Más kromoszóma-rendellenesség rizikója
20	0,060%	0,190%
22	0,070%	0,200%
24	0,080%	0,210%
26	0,085%	0,210%
28	0,095%	0,230%
30	0,105%	0,260%
32	0,130%	0,310%
34	0,200%	0,420%
36	0,340%	0,641%
38	0,571%	0,980%
40	0,943%	1,515%
42	1,563%	2,381%
44	2,632%	3,846%
46	4,348%	6,250%
48	7,143%	10,000%

Az adatok forrása: Hook EB: Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstetrics and Gynecology* 58:282-285, 1981; and Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM: Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *Journal of the American Medical Association* 249(15):2003-2038, 1983.

### Számbeli eltérések: aneuploidiák

Aneuploidia: eltérés a normál kromoszóma számtól

Ha szeretnénk leírni a kromoszómaszámot, a „ploidia” szóval képzünk összetételt. Ez a szó meghatározza, hány másolatban található a kromoszómák az adott sejtekben. Emberben az ettől való eltérés súlyos betegségeket okozhat, vagy letális lehet. Ezzel szemben ismerünk több olyan organizmust, ami képes különböző ploid állapotokban élni (főleg növények és rovarok) és ismerünk néhány hasznos aneuploidiát is a természetben.

Poliploidia: 2, vagy több másolat a kromoszóma szettből.

Számos hasznos poliploid organizmust láthatunk a környezetünkben: több termesztett növényünk poliploid. (A triploid görögdinnye magnélküli, a boltban kapható banánok triploidok, a perzsa lime triploid, az eper lehet tetraploid, de akár oktaploid is. *Több példáért lásd előadás diák!*)

A monoszómia egy kromoszóma hiányát jelenti az emberben (1 példány egy kromoszómából). Az emberben egyedül az X kromoszóma hiánya összeegyeztethető az élettel (Turner szindróma); de

részleges monoszómiákat=deléciós szindrómákat ismerünk autoszómák esetén is. (Ekkor csak a kromoszóma egy része van jelen egyetlen példányban.)

A deléciós szindrómák tüneteit a haploinsufficiencia, vagy haploid elégtelenség jelensége alakítja ki, mely jelenség azt mondja ki, hogy egy gén egyetlen példánya nem képes kialakítani a vad fenotípust.

Néhány fontos deléciós szindróma:

- 1q21.1 deléciós szindróma=TAR szindróma
- Wolf-Hirschhorn szindróma
- Cri du chat
- Williams szindróma
- Jacobsen szindróma
- Miller–Dieker szindróma
- DiGeorge szindróma

*(Több részletért lásd előadás dia.)*

**Triszómia: 3 kópia egy adott kromoszómából**

Általában a triszómia azt jelenti, hogy egy adott kromoszómából 3 másolat található a sejtben. Azonban vannak más olyan jelenségek is, amik kialakíthatnak triszómiás tüneteket, így ide soroljuk azokat a kórképeket is, amikor a kromoszómának csak egy darabja van jelen 3 másolatban.

Ilyen módon a triszómia 3 típusát tudjuk leírni, 3 olyan jelenséget, ami triszómiás tüneteket hoz létre: teljes triszómia, mozaikos triszómia és transzlokációs triszómia. A teljes triszómia esetén a sejtekben egy extra kromoszóma található meg. A mozaikos forma esetén a szervezet sejtjeinek egy része fog csak tartalmazni egy extra kromoszómát. A transzlokációs forma során a kromoszómának csupán egy része található meg 3 másolatban. A tünetek és azok erőssége különböző az érintett szervek/szövetek/testrészek, illetve az érintett kromoszómarész és mennyiség szerint.

Néhány fontos triszómia:

- Down szindróma
- Edwards szindróma
- Patau szindróma
- 9-es triszómia
- 8-as triszómia=Warkany szindróma
- 22-es triszómia=Cat eye szindróma
- 16-os triszómia

*(Több részletért lásd az előadás diákat..)*

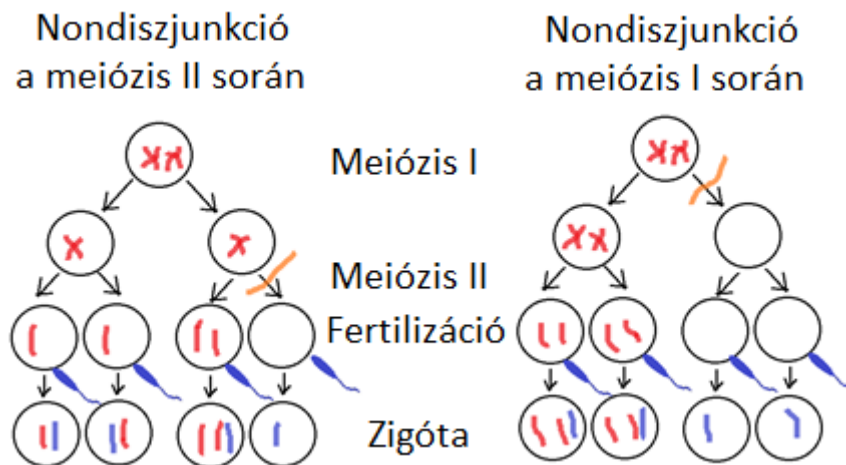
Tetra- és pentaszómiák nagyon ritkák autoszómák esetén az emberben; de szex kromoszómáknál leírtak már példákat XXXX, XXYY, sőt XXXXX, XXXXY és YYYYY kromoszómaszerelvényekre is.

Aneuploidiák okai:

- Nondiszjunkció
- Anafázis késés
- Endoreplikáció/endoreduplikáció

A **nondiszjunkció** egy olyan folyamat, ahol a testvér kromatidák, vagy homológ kromoszómák nem válnak el egymástól a sejtosztódás során. Az oka lehet egy random hiba, a húzófonalak képződésének hibája, vagy más probléma (indukálhatjuk mesterségesen kolhicinnel).

A nondisjunkció helye szerint eltérő utódsejtek keletkezhetnek.

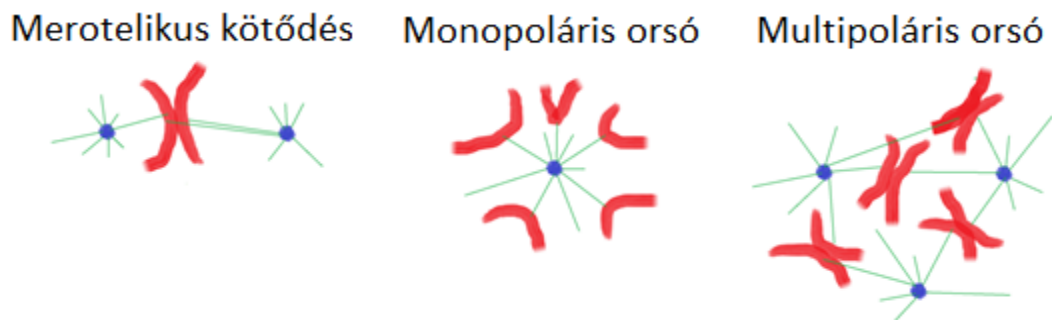


Nondisjunkció több módon történhet: ha az ellenőrzőpont gyengül, az eredményezhet problémát a kromoszómák szétválásában. A helytelen kötődés, vagy orsók ugyancsak okozhatnak nondisjunkciót (merotelikus kötődés, monopoláris, vagy multipoláris orsók).

A merotelikus kötődés azt jelenti, hogy az egyik kinetochore több mitotikus orsóhoz is kapcsolódik (több pólushoz).

Multipoláris orsó: több mint 2 pólus képződik az orsókból.

Monopoláris orsó: egyetlen pólus formálódik. Ennek eredményeképpen egyetlen leánysejt képződik megduplázott kromoszómaszámmal.



Az **anafázis késés** az a folyamat, amely során a kromoszómák vándorlása lelassul az anafázisban, ennek eredményeképpen kromoszómák záródhatnak ki a keletkező leánysejtekből.

Az **endoreplikáció** a DNS tartalom replikációját jelenti (az S fázis alatt) citokinézis (a sejtek elválása) nélkül.

A nem megfelelő elválás mikronukleosz képződéséhez vezethet: mely során a genetikai anyag egy része kizáródva a magból egy új magot formál.

### Mozaicizmus

A mozaik, vagy mozaicizmus a genetikában azt jelenti, hogy egy egyetlen megtermékenyített petesejtből kifejlődött szervezet kettő, vagy több genotípussal rendelkezik. (A mozaicizmus nem

kimériszmus, ahol a 2, vagy több genotípus több megtermékenyített zigóta fúziójából önlétre az embri-onális fejlődés korai szakaszában.)

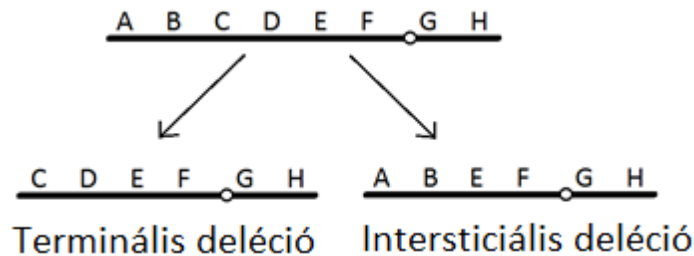
Mozaicizmus több módon is kialakulhat, például megjelenik egy új mutáció egy sejtben és a fejlődés során elterjed. Nondiszjunkció is kialakulhat a megtermékenyítést követően, így létrehozva mozaicizmust.

**Strukturális abnormalitások**

**Deléció:** a kromoszóma egy részének deléciója, vagy eltűnése

Csoportosíthatjuk a deléciókat helyük és méretük szerint:

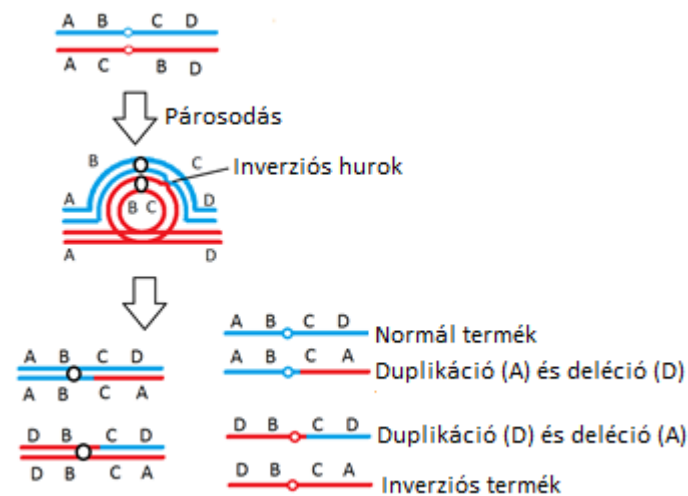
Helyük szerint megkülönböztetünk intersticiális és terminális deléciókat, míg méretük szerint beszélhetünk intragenikus és multigenikus mutációkról



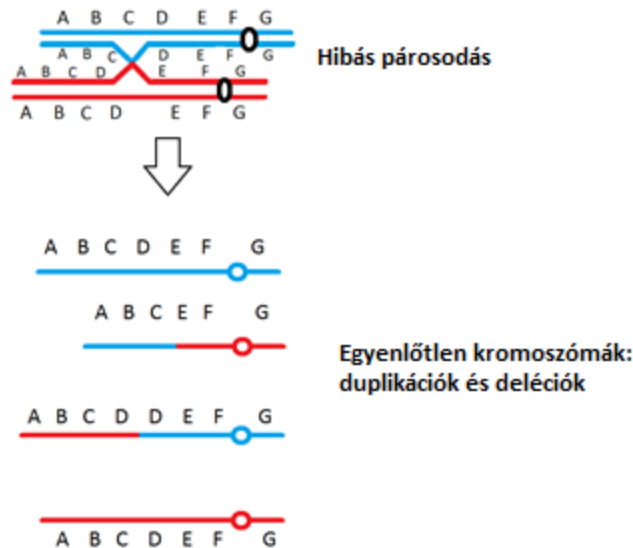
Néhány deléció kapcsolatba hozható tumorok képződésével: neurpblasztóma specifikus eseteiben, melanómában és tüdő kissejtes karcinóma során (lásd előadás diák).

Deléció kialakulhat törés és újraegyesülés során, transzlokáció során bekövetkező elveszéssel, crossing over során kromoszómális inverzióban, vagy egyenlőtlen crossing over során.

A kromoszómális inverziók megnehezítik a crossing overt, a keletkező új szálak új variációkat fognak tartalmazni, lásd lejjebb. (Az inverziók duplikációkat és deléciókat hoznak létre a crossing over során.)



Deléciók egyenlőtlen crossing overek során is létrejöhetnek, ahol a homológ szekvenciák nem megfelelően állnak párba.



**Duplikáció:** A kromoszóma egy darabjának megkettőződése (extra genetikai anyag).

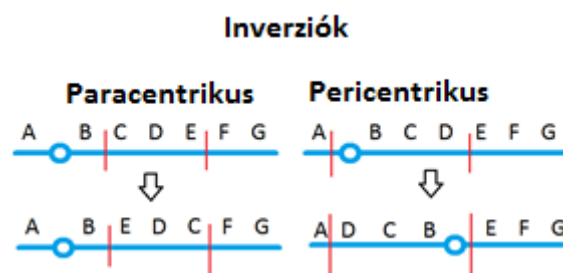
Kétféle duplikációt ismerünk az új genetikai anyag iránya szerint: tandem és reverz duplikációkat.



Duplikációk keletkezhetnek a feljebb ismertetett módon egyenlőtlen crossing overek során, vagy kromoszómális inverziókban létrejövő crossing overek során.

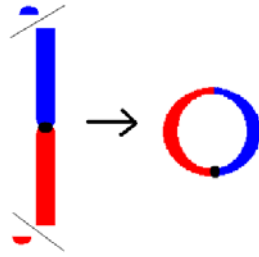
**Inverziók:** a kromoszóma egy része kihasad, majd fordított irányban visszaépül eredeti helyére.

A törés helye alapján 2 típusát különítjük el. Ha az inverzió a centromeren kívül esik, akkor azt paracentrikus inverzióknak nevezzük, ha az inverzióban a centromer is érintett, akkor pericentrikusnak.



Ahogy az korábban bemutatásra került, az inverziók további más kromoszómális átrendeződést válthatnak ki crossing over során.

**Gyűrű képződés:** A kromoszóma egy darabja kitörik, majd gyűrűvé záródik. A gyűrűképződés során általában mindkét vég elveszik, de előfordulhat csupán az egyik vég elveszése is. Gyűrű kromoszómák szinte az összes kromoszómából képződhetnek, létrejöttük még összeegyeztethető lehet az élettel. Egy emiatt kialakuló betegség tünetei attól függenek, mekkora rész veszett el a kromoszómából. Sok esetben csak nagyon enyhe problémákat okoznak.



**Izokromoszómák:** olyan kromoszómák, amik elveszítették egyik karjukat, majd a hiányt a megmaradt kar másolata pótolta, így az eredmény egy kromoszóma 2 teljesen egyforma karral. Az izokromoszómáknak szerepük van speciális tumorok, vagy akár Turner szindróma kialakításában is.

**Transzlokáció:** a kromoszóma egy darabja áthelyeződik egy másik kromoszómára.

Kétféle transzlokációs formát különböztetünk meg:

Reciprok tanszlokációt: ami 2 kromoszóma közti genetikai anyag cseréjét jelenti (kölcsonös).

Robertsoni transzlokációt: ami akkor alakul ki, ha 2 kromoszóma fúzionál a centromernél, így létrehozva transzlokációt. Csak bizonyos kromoszómák (akrocentrikus kromoszómák) képesek részt venni ebben a folyamatban – emberekben a 13, 14, 15, 21 és 22-es kromoszómák. A robertsoni transzlokációk hordozói egészségesek, azonban gyerekeik különböző aneuploidiákat örökölhetnek, mivel ezek a kromoszómák nem képesek elválni egymástól a petesejt, vagy a spermium képződése során.

A transzlokáció során gének sérülhetnek a törések mentén. Több tanulmány rámutatott, hogy bizonyos transzlokációknak szerepük van különböző tumorok képzésében. *(lásd előadás diák)*

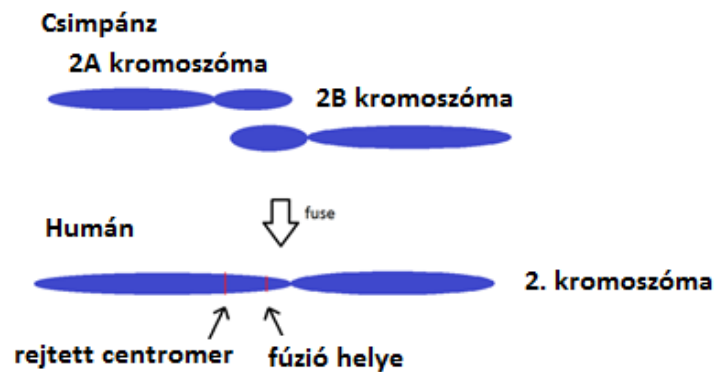
A kromoszómális átrendeződések lehetnek **kiegyensúlyozottak**, amennyiben a változás érinti a gének sorrendjét, vagy helyét, de nem történik változás a genetikai anyag mennyiségében (deléció, vagy duplikáció). Ha az átrendeződés megváltoztatja a gének/DNS mennyiségét, **kiegyensúlyozatlan** átrendeződésről beszélünk.

Kiegyensúlyozott transzlokációk normál fenotípust alakíthatnak ki a hordozó szülőkből, azonban a szülők genetikai hiányt, vagy extra genetikai anyagot örökíthetnek tovább a gyerekeikbe, ezzel triszómiás, vagy deléciós szindrómákat okozva *(lásd előadás dia)*.

#### Evlúció – kromoszóma szint

Az egér és az ember kromoszómaszerelvénye egymásba átépíthető deléciók, inverziók, transzlokációk segítségével, mintha csak legóznánk *(lásd előadás dia)* és ez igaz minden emlős élőlényre (természetesen, csak ha áttekintően, kromoszóma szinten nézzük). Például a legnagyobb különbség az humán és csimpánz kromoszómaszerelvénye között egy kromoszómafúzió, ami bennünk emberekben jött létre.





### 23.3. IVARI KROMOSZÓMÁK

Az X és Y kromoszómák (ún. alloszómák) a szomatikus kromoszómákkal (autoszómák) ellentétben különböznek egymástól. Szerepük fontos az emlősök és madarak biológiai nemének meghatározásában.

#### Y kromoszóma

Az X kromoszóma mellett található másik ivari kromoszóma (alloszóma). Mérete jóval kisebb a X kromoszómánál (59 millió bázispár). Körülbelül 200 gént tartalmaz, melyek 72 fehérjét kódolnak. A leggyorsabban mutálódó kromoszóma. Emberben (és a legtöbb emlősben) az Y kromoszóma jelenléte vagy hiánya határozza meg a biológiai nemet (lásd biológiai nem kialakulása). Patrilineáris öröklődésű, az apa örökíti a fiúra.

#### X kromoszóma

Az X kromoszóma körülbelül 153 millió bázispár alkotja, nagyjából 2000 gén található rajta. Nőknél két X kromoszóma található a testi sejtekben, ezekből egyről alig történik transzkripció (lásd X kromoszóma inaktiváció). A férfi testi sejtek egyetlen X kromoszómát tartalmaznak, mely anyai öröklődésű.

#### Pseudoautoszómális régiók

Az X és az Y kromoszóma valószínűleg egy pár autoszómából alakult ki. Az Y kromoszóma evolúciója során azonban annyira megváltozott, hogy a két ivari kromoszóma között gyakorlatilag nem játszódik le rekombináció. Kivételek alól a telomér régióhoz közel megtalálható pseudoautoszómális szakaszok (pseudoautosomal region, PAR). Ezek a homológ szakaszok megtalálhatóak a Y és az X kromoszómán is. Lehetővé teszik a mitózis során az ivari kromoszómák párba állását és szegregációját.

#### Ivart meghatározó X-Y rendszer

Az ember biológiai nemét az Y kromoszóma jelenléte vagy hiánya fogja eldönteni. A kulcs az SRY (sex-determining region Y) gén által kódolt TDF (testis-determining factor) transzkripciós faktor, ami további transzkripciós faktorok aktivitását szabályozza. A TDF hatására a differenciálatlan gonád sejtjei Sertolli sejtekké alakulnak.

### X kromoszóma inaktiváció

Mivel a férfi sejtekkel ellentétben a női sejtek két X kromoszómát tartalmaznak, dóziskompensáció szükséges. Emberi sejtekben ezt a folyamatot X kromoszóma inaktivációnak nevezzük. A folyamat eredményeképpen a sejtben az egyik, véletlenszerűen kiválasztott X kromoszómáról való transzkripció gyakorlatilag megszűnik (lásd előadás: teknőctarka macska foltjai).

Az egyik X kromoszómáról nagy mennyiségben átíródik egy hosszú, nem kódoló RNS (Xist). Ez az RNS molekula szorosan beburkolja az adott X kromoszómát, ezzel az inaktiválódik (Xi), míg a másik kromoszóma transzkripció szempontjából aktív marad (Xa).

Az inaktivált kromoszóma erősen kondenzált heterokromatint alkot, ami a sejtmaghártáéhoz tapad. Ezek a kondenzálódott, ún. Barr testecskék mikroszkóppal könnyen megfigyelhetők, ezért sokáig a Barr testek detektálásán alapult a biológiai nem megállapítása (lásd előadás: Olimpiák és nemek).

A pszeudoautoszomális régió mindkét X kromoszómán aktív marad.

### Az ivari kromoszómák zavara

#### Ivari kromoszómák számbeli eltérése

Mint azt korábban láthattuk, egy kromoszóma elvesztése vagy nyerése általában katasztrofális hatással van a sejtire. Autoszómák esetében kevés kivételtől eltekintve (pl. Down kór, rákos sejtek) ezek a sejtek életképtelenek. Ivari kromoszómák esetében azonban több aneuploiditásra visszavezethető szindróma is ismert:

Klinefelter szindróma (XXY): Az érintett férfiak sejtjeiben található egy számon felüli X kromoszóma. Tünetek: általában magas termet, nőies jellegek, ritkás testszőrzet, a férfi nemi hormonok alacsony szintje, terméketlenség.

Turner szindróma (X0): Az érintett nőkben az egyik X kromoszóma (és ezáltal a Barr testecske) is hiányzik. Tünetek: alacsony termet, alacsony tarkótáji hajvonal, kétoldali nyakredő, széles mellkas, vastag kezek és lábak. További problémák: tanulási nehézség és fejletlen petefészkek. Utóbbi okozhat menstruációs zavarokat vagy akár meddőséget is.

Tripla X szindróma (XXX): X triszómia. Az érintettek magasabbak lehetnek az átlagnál, de más jellegzetes külső tünetről nem beszélhetünk. Előfordulhat még ciklus zavar, korai menopauza.

XYY szindróma: A hordozó férfiak sejtjeiben számon felüli Y kromoszóma található. Jellegzetes fizikai tünetei nincsenek, bizonyos esetekben előfordulhatnak tanulási nehézségek.

Az utóbbi két szindróma nem is valódi szindróma, hanem állapot, mert az érintettek fenotípusa normális.

### Ivari kromoszómán öröklődő genetikai betegségek

#### Y kromoszómához kapcsol genetikai betegségek

Mivel az Y kromoszómán nincsenek vitális gének, ezért súlyos betegségeket okozó mutációkat sem hordoz ez a kromoszóma. (Kivétel: SRY mutációi, lásd előadás)

#### X kromoszómához kapcsolt genetikai betegségek

Lásd: Genetikai betegségek fejezet

## 23.4. MENDELI (MONOGÉNES) ÖRÖKLŐDÉS

Több mint 12000 olyan humán jelleget és rendellenességet ismerünk, melyek egyetlen génhiba következményeként alakultak ki. A XIX. század végén Gregor Mendel hatalmas, 8-éves vizsgálatsorozatot vitt véghez, amelyben különböző növények öröklődési mintázatait figyelte meg. Az ő eredményei vezettek az öröklődés alapvető törvényeinek megalkotásához. A *szegregáció törvénye* kimondja, hogy az egyed jellegeit meghatározó két génje közül csak egyet örökít át utódjába. A *független öröklődés törvénye* szerint a különböző gének kópiái egymástól függetlenül öröklődnek. A "Mendeli" kifejezést az egygénés öröklődésre alkalmazzuk, a cseh tudós munkájának tisztelegve.

### Nevezéktan

Az **autoszomális gének** az autoszómákon található gének (vagyis nem ivari kromoszómákon). Az autoszómák esetében a kromoszómák párban vannak, vagyis a gének (illetve azok kópiái) párokban vannak. Az **X-csatolt** vagy **Y-csatolt gének** ivari vagy szexkromoszómákon találhatóak (alloszómák).

A **genotípus** a genetikai összetételre utal, míg a **fenotípus** az egyeden észlelhető jelleget jelenti.

A **lókusz** a génnek a kromoszómán elfoglalt pozíciója. Az **allélek** egy adott gén alternatív formái.

**Heterozigóta** egyedben adott lókuszon különböző allélek találhatóak, míg a **homozigóta** adott lókuszon azonos alléllal rendelkezik.

A **heterogenitás** a diverzitás szinonimája, **lókusz heterogenitás** esetén a kérdéses jelleget különböző lókuszok génjeiben fennálló mutáció okozhatja, míg az allélikus heterogenitás több különböző, ugyanazon lókuszt érintő mutáció által létrejött jelleget jelez.

Domináns fenotípus az olyan jelleg, amelyet egyetlen abnormális génkópia eredményez. A recesszív fenotípus megjelenéséhez szükséges mindkét kópia mutáns jellege.

A családfa-analízis technikáját genetikai tanácsadásokon alkalmazzák. Az érintett egyén(ek) családfájának elemzése segít a betegség öröklődési mintázatának megállapításában.

### Autoszomális domináns öröklődés

Egy gén egyik kópiájának hibája elegendő a betegség megjelenéséhez, vagyis az egyén egyetlen mutáns kópiával is érintett lesz az adott betegségben (a másik kópia normál is lehet). Az érintett egyének gyermekei 50% eséllyel öröklik a mutáns allélt. Mivel a mutáns kópiát öröklő utódban megjelenik a betegség, a teljes esély a betegség továbbörökítésére 50%. Az autoszomális domináns öröklődés jellegzetességei:

- A heterozigóták érintettek (a homozigóták is).
- Mindkét nem érintett, és ugyanúgy továbbörökíti a jelleget bármilyen nemű utódaiba.
- Az érintett egyén utódainak az esélye a jelleg öröklésére 50%.
- A jelleg (betegség) végigkövethető a családon, vagyis **vertikális öröklődést** mutat.

Példák autoszomális domináns öröklődést mutató betegségekre: Huntington-betegség, retinoblastoma, familiáris hypercholesterolemia, Marfan-szindróma.

### Változó expresszivitás (kifejeződés)

Egyes autoszomális domináns betegségekre jellemző, hogy a betegség súlyossági foka változik az érintett családon belül. Ez azt jelenti, hogy a tünetek súlyossága nem azonos minden érintett személynél. Például az 1. típusú neurofibromatosisos családban egyaránt vannak enyhe tünetekkel,

gyermekkori pigmentált őrfelületekkel (café-au-lait foltokkal) rendelkező betegek, de más érintetteknel előfordulnak olyan tünetekkel rendelkező családtagok is, mint a scoliosis vagy akár a terméketlenség.

### Csökkent penetrancia

Előfordul, hogy egy autoszomális domináns öröklődésű betegség családfája egyes generációkban nem tartalmaz érintett egyéneket. Ezt a jelenséget non-penetranciának nevezzük. A **penetrancia** a tüneteket mutató heterozigóták aránya (1 arányában vagy százalékban kifejezve). A retinoblasztóma esetében pl. a penetrancia értéke 90%-os.

### Homozigócia

Autoszomális domináns rendellenességek esetében ritkán homozigóták is megjelenhetnek, akik tünetei súlyosabbak, mint az szokásosan, heterozigótáknál látható. Erre példa lehet a korai koronáriabetegség egy, a familiális hipercholesterolaemiára homozigóta egyén esetében. Heterozigóták házassága az utód homozigóciáját okozhatja. Kivételként a Huntington-betegség említhető, amelynél a homozigóták tünetei nem súlyosabbak a heterozigótáknál látott tüneteknél.

### Kodominancia

Ha két allél egyformán expresszáldik, kodominánsnak nevezzük őket. Például az ABO vércsoport öröklődésénél egy AB vércsoportú utódban az A és B fenotípusok egyformán kifejeződnek (és mindkét allél domináns a 0 fölött).

### Autoszomális recesszív öröklődés

Az olyan jelleget vagy rendellenességet, amely csak akkor fejeződik ki, ha az egyén homozigóta genotípussal rendelkezik (azaz két mutáns allélja van), autoszomális recesszívnek nevezzük. Mindkét allélt egy heterozigóta (hordozó) szülőtől örökölte az utód. Ha két heterozigóta hordozónak gyermeke születik, átlagosan 50%-uk hordozó, 25%-uk egészséges homozigóta, 25%-uk pedig érintett homozigóta lesz. Az autoszomális recesszív öröklődés jellegzetességei:

- Csak a homozigóták érintettek (és az összetett heterozigóták – ld. lejjebb), a heterozigóták pedig hordozók.
- Mindkét nem érintett.
- **Horizontális öröklődési** mintázat: egy testvérközösség tagjai érintettek.
- Heterozigóták házassága esetén a testvér érintettségének esélye 25%.
- Heterozigóták házassága esetén egy tervezett testvér esélye arra, hogy hordozó legyen 50%, míg az egészséges meglévő testvér esélye arra, hogy hordozó, 67%.

Számos betegség mutat autoszomális recesszív öröklődést, mint pl. a cisztás fibrózis, galaktozémia, fenilketonuria (PKU), sarlósejtes anémia és a thalasszemiák.

### Roknházasság

Ha egy szülőpár tagjai közös őssel rendelkeznek, **rokházasságról** beszélünk. Az utódaik nagyobb eséllyel rendelkezhetnek autoszomális recesszív rendellenességgel, a normál populációhoz viszonyítva. A veszély a szülők rokonsági fokának függvényében növekszik. A legtöbb egyén hordoz legalább egy autoszomális recesszív mutációt, de míg ezek heterozigóták formában maradnak, nem jelennek meg fenotípusosan. Unokatestvérek közös gyermeke 1,5% eséllyel lesz homozigóta a nagyapja mutáns alléljára. Ugyanez igaz a nagyanya mutáns alléljára, tehát összességében 3% az esély egy autoszomális recesszív rendellenesség megjelenésére. Elsőfokú rokonságban álló személyek házasságának extrém (és illegális) esetében az ilyen rendellenességek megjelenésének esélye 50%!

### Pszudodomináns öröklődés

Időnként a kiterjesztett családfa sok autoszomális recesszív öröklődésű rendellenességet hordozó egyént tartalmaz, tehát sok házasság történik heterozigóták és homozigóták között. Ez azt okozhatja, hogy egy autoszomális recesszív öröklődésű betegség autoszomális domináns mintázatot mutat a családfán. Ez a jelenség leginkább kis belterjes közösségekben jellemző, vagy ún. asszortatív párválasztás eredményeképpen (amikor a partnert a hozzá hasonló tulajdonságai – akár fogyatéék – alapján választja az egyén).

### Összetett és dupla heterozigóták

Ha egy autoszomális recesszív rendellenesség a két allélt érintő mutációjának következménye, az érintett egyént **összetett heterozigótának** nevezzük. A jelenség előfordul cisztás fibrózis és b-thalasszémiás esetekben. Az említett betegségek allélikus heterogenitást mutatnak, mégis recesszív öröklődésűek.

**Dupla heterozigótának** nevezzük az olyan egyént, aki egyszerre két különböző autoszomális recesszív rendellenesség hordozója. Ezek a személyek nem mutatják egyik betegség jeleit sem (de hordozzák mindkét mutációt), míg az összetett heterozigóták mutatják a betegség tüneteit.

### X-kapcsolt recesszív öröklődés

Az X-kromoszómán elhelyezkedő génekben fellépő mutációk X-kapcsolt recesszív öröklődésű rendellenességekhez vezetnek, és általában kizárólag a férfiakat (fiúgyermeket) érintik. A hímeket **hemizigótának** nevezzük, ami arra utal, hogy csak egyetlen X kromoszómával rendelkeznek (így tehát az említett gének egyetlen kópiájával). Ha csak egyetlen, mutáns alléllal rendelkeznek, érthető, hogy a betegség tünetei kifejeződnek bennük. A nők két X kromoszómával, így 2 génkópiával rendelkeznek, és az egészséges kópia kompenzálja a mutáns kópia hatásait. A nők (láánygyermek) tehát ritkán mutatják a betegség tüneteit, de a fiú utódaik 50%-ában manifesztálódik a rendellenesség, leány utódaik pedig a rendellenesség génjét hordozzák majd. Egy érintett hímnemű egyed továbbörökíti a betegséget valamennyi nőnemű leszármazottjába (akik biztos hordozók lesznek), de nem örökíti a fiúgyermekbe (mivel az Y kromoszómán nem található meg az említett allél). Az X-kapcsolt recesszív öröklődés jellegzetességei:

- Kizárólag a közvetlen rokonságban álló férfiak érintettek, egy női vonal közvetítésével.
- Hordozó nő fiúgyermek 50% eséllyel lesz érintett, leánygyermek 50% eséllyel lesz hordozó.
- Érintett férfi valamennyi lánya hordozó, valamennyi fia egészséges.
- Nincs apa-fiú öröklődés.
- A betegség tüneteit mutató lány utódok igen ritkák, (csak abban az esetben jöhet létre, ha a hordozó anyától és beteg apától is mutáns allélt örököl a leánygyermek).

Több mint 200, X-kapcsolt recesszív öröklődésű rendellenesség ismert, mint az androgén inszenzitívitas, Duchenne izomdisztrófia, különböző hemofiliák és a vörös-zöld színtévesztés.

### X-kromoszóma inaktiváció

Mivel a férfiaknak egy X-kromoszómájuk van, a nőknek pedig kettő, a nőknek elméletileg az X-kromoszómán kódolt fehérjéket tekintve kétszeres mennyiséggel kellene rendelkezniük. Ez nem így van, a fehérjeszintek megegyeznek, amiért a **dóziskompenzáció** a felelős (a férfi és női X-kromoszóma aktivitása megegyezik). Az 1-2 hetes leány-embriókban az egyik X-kromoszóma inaktiválódik. Ezt a Xist inaktivációs szignál okozza (X inactivation specific transcript), ami csak az egyik X-kromoszómán fejeződik ki. Az inaktivációs szignál a gének 5' régiójának metilációja, amely

blokkolja a gén kifejeződését. Az inaktiváció alól kivételt képez a **pseudoautoszomális régió**, ami a rövid kar csúcsán található rövid szakasz.

Az X-kromoszóma inaktiváció minden sejtben véletlenszerűen jön létre: a leány embrió átlagosan felében az anyai X-kromoszóma génjei fejeződnek ki, másik felében az apai X génjei. Ezeknek az embriósejteknek a lánysejtjei megöröklik az anyasejt inaktivációs mintázatát, következésképp a felnőtt nőtény egyedben az anyai X-kromoszóma fejeződik ki, másik felében az apai X-kromoszóma. Ezt a folyamatot **lyonizációként** is említik, a jelenséget elsőként leíró Dr. Mary Lyon után.

A Női interfázisos sejtek magjában látható az ún. **Barr-testecske**, ami az inaktiválódott X-kromoszómára utaló kis szexkromatin-tömeg.

Megj.: Ha egy nő három X-kromoszómával rendelkezik (47,XXX), akkor ezek közül kettő inaktiválódik (és két Barr-testecske látható), valamint a két X-kromoszómával rendelkező férfiak esetében (47,XXY), az egyik X-kromoszóma inaktivációja figyelhető meg (az ilyen férfi sejtjeiben Barr-testecske figyelhető meg).

### Nők érintettsége X-kapcsolt recesszív rendellenességben

Igen ritka esetben az X-kromoszómához kapcsolt recesszív betegségek nőket is érinthetnek. Az említett különleges esetek okai az alábbiakban keresendők:

#### *Homozigócia*

Abban a ritka esetben, ha egy nő homozigóta egy recesszív mutációra, hasonlóan érintett lesz, mint a hemizigóta férfi betegek. A heterozigóta leány vagy mindkét szülőtől mutáns allélt örökölt, vagy az egyik szülőtől örökölte a mutáns allélt, a másik allélon pedig keletkezhetett egy új mutáció. Egy viszonylag gyakori példa a vörös-zöld színtévesztés esete (1/12 fiúknál és 1/144 lányoknál).

#### *Turner-szindróma*

A második nemi kromoszóma hiánya (45,X0) a Turner-szindróma néven említett tünetegyüttes. Ha egyetlen (mutáns) allél fejeződik ki az egyetlen X-kromoszómán, az hasonló rendellenességhez vezet, mint ami érintett, normál kromoszómaszerkezetű férfiak (46,XY) esetében megjelenik, mivel mindkét esetben hiányzik a normál homológ allél.

#### *Androgén inszenzitivitás*

A tesztoszteronra való érzékenység hiánya egy rendkívül ritka rendellenesség, amely egy kromoszomális nemét tekintve férfi, ám női fenotípusú egyénhez vezet. Egy ilyen „nő” rendelkezhet X-kapcsolt recesszív mutációval, amelynek hatásai a férfiakat érintő mutációhoz hasonlóak.

#### *Aszimmetrikus X-kromoszóma inaktiváció*

Az X-kromoszóma inaktiváció véletlenszerű folyamat, amely ritkán eltérhet a megszokott 50:50 százalékos aránytól. Ha ilyen esethez egy recesszív mutáció társul az egyik kromoszómán, az adott nő a férfiakra jellemző betegség fenotipikus jegyeit mutathatja. Az aszimmetria lehet az abnormális alakú X-kromoszómák preferenciális inaktivációjának következménye.

## A Mendeli öröklődés egyéb típusai

### X-kapcsolt domináns öröklődés

Léteznek olyan X-kromoszóma mutációk, amelyek heterozigóta nőtény egyedekben fenotipikusan megjelennek. Ilynek pl. az incontinentia pigmenti, a Rett-szindróma, a fragilis X-szindróma. Az X-kapcsolt domináns öröklődés jellegzetességei:



- Mindkét nem érintett, általában a nők súlyosabban (mozaikos megjelenés, ha a bőr érintett).
- Érintett anya gyermeke 50% eséllyel lesz érintett. Néhány rendellenesség fiúkban letális (csak az egészséges fiúk élnek túl, tehát az érintett anya gyermekeinek nemi aránya eltolódik: 2:1 lány:fiú, a lányok fele érintett).
- Nincs apa-fiú öröklődés, az érintett apa valamennyi lánya érintett, valamennyi fiúgyermeke egészséges.

Igen ritkán az érintett nők terméketlenek, pl. Rett-szindrómában, vagyis az érintett nők izolált, elszigetelt esetek.

### Y-kapcsolt öröklődés

A **holandrikus** rendellenességek kizárólag apáról fiúra öröklődnek, mivel az Y-kromoszómán található gének mutációjáról van szó. Ezen gének többsége a férfi nem meghatározásában és a spermatogenezisben játszik szerepet. Ha egy Y-kromoszómán található gén mutációja terméketlenséget okoz, az minden fiúgyermekbe és következő generációs hímneműbe átöröklődik.

### Pszudoautoszomális öröklődés

A pszeudoautoszomális régió génjeinek mutációja **részleges nemhez kötöttséget** eredményez. Ezek között a régiók között átkereszteződés (crossover) történhet, így a betegség a családfa egyes részei alapján X-csatoltnak, más részek szerint Y-kapcsoltnak tűnik. Példaként említjük a Leri-Weil szindrómát, amit a SHOX gén mutációja okoz, amely mutáció alacsony növést és csontelváltozásokat eredményez.

### Atipikus Mendeli öröklődés

Bizonyos egygénes rendellenességek váratlan öröklődési mintázatot mutathatnak. Az alábbiakban említünk néhány mechanizmust, amelyek az ilyen eltérésekért felelősek lehetnek.

#### Anticipáció

Egyes monogénes öröklődésű rendellenességek esetében az egymást követő generációkban egyre korábban vagy egyre súlyosabb formában jelennek meg a tünetek. Ha a háttérben triplet repeat mutáció áll, és ezek generációról generációra egyre jobban kiterjednek, az magyarázza a jelenséget. A triplet repeatek lehetnek rövidek, mint a Huntington-kór esetében, vagy hosszabbak, pl. a fragilis X szindrómában.

#### Új mutációk, csíravonal mozaikosság

Ha egy egyénről a családon belül kiderül, hogy egyedi esetként monogénes betegségben szenved, a rendellenesség egy új mutáció következménye. A mutáció a gametogenezis bármelyik lépésében bekövetkezhetett, és mivel a mutáció ideje nem állapítható meg, ez megnehezíti egy testvér tervezésekor a genetikai tanácsadást. Ha a mutáció a késői mitózis során, vagy a meiózisban lépett fel, a tervezett testvér esélye a kérdéses betegség kialakulására igen alacsony, de ha a mutáció a mitózis korai szakaszában lépett fel egy csíravonal őssejtben, akkor nagy valószínűséggel a szülő más, mutációt hordozó gamétákat is termelt (**csíravonal mozaikosság**).

#### Kétegés és háromallélos öröklődés

Néhány betegség csak akkor jelenik meg, ha két mutáció is jelen van egyidejűleg, amelyek additív hatása felelős a tünetek kialakulásáért. Például a retinitis pigmentosa esetében, ha az egyénben a ROM1 és peripherin gének mutációja együttesen jelen van, az komoly látásvesztéshez vezet, míg a csak az egyik mutációt hordozó egyén tünetmentes marad. Ha a betegség megjelenése három mutá-

ciót igényel (egy domináns érzékenyítő mutációt, és egy másik lókuszt recesszív mutációt), a jelenséget háromallélos vagy **triállélikus öröklődésnek** nevezzük.

### Genomiális imprinting

A mendeli szabály ellenére, amely kimondja, hogy az azonos allélek egyenlően fejeződnek ki, egyes gének más expressziós mintázatot mutatnak. A **genomiális imprinting** során ezek a gének a meiózis során molekuláris jelölőt kapnak (attól függően, melyik szülőtől származnak). A folyamat része a transzkripciót szabályozó régiók metilációs inaktiválása, és mivel ez a génexpressziós eltérés nem változtatja meg a gén szerkezetét, ezt **epigenetikai** jelenségnek nevezzük. A szülői imprint (bevésődés) a replikáció és a sejtosztódás során nem változik (vagyis az élet során változatlan), de a gametogenezis során a jelölés eltávolításra kerül, majd újra végbemegy.

### Uniparentális diszómia

Mendel szegregációs törvénye, mely szerint a kromoszómák függetlenül válnak szét, általában igaz, de bizonyos esetekben az egyén mindkét homológ kromoszómáját ugyanattól a szülőtől öröklő. Az **uniparentális diszómia** (UPD) az egyik szülőben a meiózis során fellépő nondisjunkcióból eredeztethető, ami diszómikus gamétát eredményez. Ha ilyen diszómikus gaméta egy normál gamétával megtermékenyül, triszómikus zigóta jön létre. Ezután a három közül az egyik kromoszóma elvesztése nyomán a zigóta életképes marad (**triszmia mentés**).

**Uniparentális heterodiszómia** esetén a meiózis I során nondisjunkció történik, így mindkét szülői kópia jelen van. **Uniparentális izodiszómia** akkor áll fenn, ha az egyik szülői kromoszóma két kópiája van jelen, ami arra utal, hogy a meiózis II során lépett fel a nondisjunkció.

Az UPD lehet fedett (fel nem ismert), ha az érintett kromoszóma nem hordoz semmilyen recesszív mutációt. Ha az UPD olyan szakaszt tartalmaz, ami genomiális imprinting alatt áll, olyan betegségek jelenhetnek meg, mint az Angelmann-, vagy a Prader-Willi-szindróma.

### Mitokondriális öröklődés

A citoplazmában található mitokondriumon tartalmaznak DNS-t, amit mitokondriális DNS-nek nevezünk. Minden egyén a mitokondriumait az anyától öröklő kizárólag, mivel a hímivarsejtek kevés mitokondriuma a megtermékenyítés során eliminálódik. A mitokondriális gének mutációjának következtében kialakuló betegségek anyai öröklődésűek, és **anyai öröklődési mintázatot** mutatnak. Ezt nevezzük **citoplazmatikus** vagy **mitokondriális öröklődések**. Két példája a **MELAS** (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) és a Leber öröklődő optikus neuropátia (LHON).

Az utódok rizikóbecslése nehéz, mert nem tudjuk, hogy csak néhány, vagy sok mitokondrium hordozza-e a mutációt. Ez a **heteroplazmia** és **homoplazmia** jelensége. Ezek magyarázzák az ilyen típusú betegségek nagy variabilitását. A mitokondriális öröklődéshez ld. még a Mitokondrium fejezetet.

### Genetikai kapcsoltág

Számos megfigyelés szerint a közeli lókusztok alléljai gyakrabban öröklődnek együtt, mint az véletlenszerűen várható. Ez a genetikai kapcsoltág jelensége. A meiózis során crossover (átkeresztződés) történhet a homológok között. Távoli allélok között a crossover esélye nagy. Közeli lókusztok között kisebb valószínűséggel történik átkeresztződés. Egy kromoszóma azonos szálon lévő alléljai **csatoltak**, míg a másik kromoszóma alléljaival **taszítják** egymást.

A két lókuszt közötti crossover gyakoriságát a **rekombinációs frakció** fejezi ki, amit  $\Theta$ -val jelölünk (görög téta). Értéke a családban előforduló genotípusok vizsgálatával állapítható meg. Ha 10-ből 1



utód rekombináns kromoszómát örököl, a rekombinációs frakció értéke 0,1. Egy 0,5-ös érték véletlenszerű szegregációt jelez, vagyis a lókuszok nem kapcsoltak. A 0,5 alatti értékek két vagy több allél kapcsoltságát mutatják.

#### Kapcsoltság és fizikai távolság

Két gén genetikai távolságán a gének közötti rekombináció (crossover) valószínűségét értjük. Mértékegysége a **centimorgan** (cM), vagy térkép egység. 1 cM azt jelenti, hogy 100 meiózis során 1 rekombináció történik az adott gének közötti szakaszon. Tehát a 0,01 rekombinációs frakció egyenlő 1 cM-al. A genetikai távolság nem egyenesen arányos a fizikai távolsággal. Utóbbit bázispár egységekben mérjük, és az összefüggés nem lineáris, mivel az ún. rekombinációs forrópontok területén a crossoverek gyakorisága nagyobb.

#### A LOD score

A LOD pontszám jelentése „log of the odds”, az esély 10-es alapú logaritmus. Ennek kiszámítása segítséget nyújt két lókusz kapcsoltságának bizonyítására. Ha értéke 3 fölötti, a kapcsoltság bizonyított, ha viszont  $-2$  alatti, a két lókusz bizonyítottan nem kapcsolt.

#### Kapcsoltsági egyenlőtlenség (Linkage disequilibrium)

Kapcsolt allélok társulása elméleti úton kiszámítható. A és B kapcsolt lókuszra, ha mindkettő két alléllal rendelkezik (A1, B1 és A2, B2), mindkét allélra a gyakoriság 0,5. Valamennyi lehetséges haplotípus gyakorisága várhatóan 0,25 (A1B1; A1B2; A2B1; A2B2 0,5 x 0,5 gyakorisággal). Ha a vizsgált populáció ezeket az értékeket mutatja, azt mondjuk, a lókuszokra kapcsoltsági egyenlőség jellemző. Ha viszont egy populáció esetébe az elvártól különböző értéket tapasztalunk, kapcsoltsági egyenlőtlenséggel van dolgunk.

## 23.5. MITOKONDRIÁLIS BETEGSÉGEK

### Mitokondriális genetikai állomány

*Lásd idevonatkozó fejezetek*

### Általános tünetek

Mint ismert, a mitokondriumok fő feladata a sejt energiaszükségletének fedezése, ezért a mitokondriumok hibájának fő következménye a rendelkezésre álló ATP hiánya.

Az érintett szervek, szövetek jellemzően magas energiafelhasználásúak, pl. szívizom, harántcsíkt izom, retina, központi idegrendszer.

A mitokondriális eredetű betegségek diagnózisát megnehezíti, hogy a tünetek nem specifikusak, számos más okra is visszavezethetőek lehetnek. A tünetek közül jellemző: ataxia, miopátia, szívizom elégtelenség, görcsrohamok, látás- és halláskárosodás, laktát acidózis.

### A mutáció lokalizációja

A mitokondriális génbetegségeket megkülönböztethetjük a mutáció helye szerint:

- A mutáció a mitokondriális DNS-ben található. Ebben az esetben a betegség mitokondriális öröklődés menetet mutat.

- Homoplazmia: a sejtben található összes mtDNS szekvenciája megegyezik. Kóros mutáció esetén a betegség mindenképpen jelen van.
- Heteroplazmia: a sejt mtDNS állománya szekvencia alapján több populációra osztható. Esetünkben bizonyos kópiák hordozzák a mutációt, míg a többi mtDNS molekula vad típusú lesz. A betegség csak akkor manifesztálódik, ha a hibás kópiák aránya átlép egy bizonyos küszöböt.
- A mutáció a genomiális DNS-en található. Ebben az esetben a betegség a Mendeli szabályok szerint öröklődik.

### Példák betegségekre

- Leber-féle öröklött optikus neuropátia (LHON): Az elsőként leírt mitokondriális génbetegség, mely a NADH dehidrogenáz kódoló gének mutációjára vezethető vissza. Jellemzője a fiatal felnőttkorban fellépő kétoldali, folszerű látásvesztés, mely kiterjedhet a teljes látótérre.
- Rojtos-vörös mioklonusos epilepszia: A tRNS-Lys gén mutációja okozza. Jellegzetes fizikai tünetei a mioklonusos epilepszia, a hallásvesztés és a laktát acidózis. Nevét az izomrostok jellegzetes szövettani képéről kapta, ahogy a funkcióképtelen mitokondriumok felhalmozódnak a szubsarkolemmális régióban.
- Leigh-szindróma: Heterogén hátterű nekrotizáló encefalomielopátia, mely visszavezethető lehet mtDNS és nukleáris DNS mutációjára is. Az első tünetek nagyon fiatalon megjelennek (3 hónap - 2 év): mozgáskoordinációs zavarok, rohamok, laktát acidózis. A betegség gyors lefolyású és tragikus lefolyású.

### Mitokondriális öröklődésmenet

A mitokondriális génbetegségek öröklődésénél is két csoportra kell bontanunk a betegségeket, attól függően, hogy a mitokondriális vagy a nukleáris genom érintett:

- Mitokondriális genom: öröklődés anyai ágon. Az érintett anya minden gyermeke (fiú és lány is) örökli a mutációt.
- Nukleáris genom: az öröklődés a Mendeli szabályokat követi (*ld.: Mendeli öröklődés*)

### Kezelés

Sajnos jelenleg a kezelés kimerül a tünetek enyhítésében. Pontos diagnózis a megfelelő génszakaszok megszekvenálása után lehetséges.

Gyógyszerészként fontos tudni, hogy több gyógyszerhatóanyag is károsítja a mitokondriális DNS-t, például a Retrovir néven forgalmazott azidotimidin (AZT). Az AZT volt az első elfogadott gyógyszer az AIDS ellen, mivel szelektíven gátolja a HIV vírus reverz transzkriptáz nevű enzimét. A nem kívánt mellékhatások közül számos visszavezethető a mitokondriumok károsodására. Napjainkban a kombinált gyógyszereknek hála az AZT-t alacsony koncentrációban alkalmazzák, így a mellékhatások is mérséklődtek.

Bár gyógyítani nem lehetséges ezeket a betegségeket, pronukleáris transzfúzióval mégis elkerülhető, hogy egy beteg nőnek beteg gyermeke szülessen. Ezen eljárás során a beteg petesejtjéből eltávolítják a sejtmagot, amit beültetnek egy egészséges donortól származó, enukleált petesejtbe. Így a mitokondriális DNS nem öröklődik tovább, a születendő gyermek pedig három biológiai szülővel fog rendelkezni. (*Bővebben lásd az előadást*)

## 23.6. EPIGENETIKA

### Az epigenetika definíciója

Az epigenetika olyan jelenségek összessége, melyek megváltoztathatják a génexpressziót, de a DNS molekula szekvenciáját nem. Ezek a változások öröklődhetnek.

A fő epigenetikai szabályzó mechanizmusok:

- DNS metiláció
- hiszton fehérje módosulások
- mikroRNS
- X kromoszóma inaktiváció

### DNS metiláció

A leggyakoribb DNS metiláció a citozin 5. szénatomjának metilációja. Ezt a módosítást a DNS metil transferáz (DNA-methyl-transferase, DNMT) enzimek végzik. A metilált nukleotid a 5'-metil-cisztein. Leggyakrabban a guanin nukleotidoktól upstream citozinok metilálódnak (CpG). A promóter régiók környékén a CpG-k nagy koncentrációban fordulnak elő, ezek az úgynevezett CpG szigetek (CpG islands). Ezek a szigetek szabályozzák a génexpressziót. Ezen régiók hipermetilációja csökkenti a génexpressziót, azáltal, hogy Methyl CpG Binding protein (MeCP2) kötődik a hipermetilált DNS szakaszokhoz, gátolva a transzkripciót.

A DNS metilációs mintázat sejtosztódás során öröklődik az utódsejtekbe. Röviddel a replikáció után a DNS metiltransferáz enzimek átmásolják az "eredeti" szál mintázatát az újonnan szintetizált szálra. Ez a folyamat létfontosságú a mismatch repairben (MMR, lásd DNS hibajavítás fejezet).

Genetikai bevésődésnek, imprintingnek nevezzük az a folyamatot, amely során az egyik szülőtől örökölt bizonyos allélok csendesítettek. A csendesítés általában metiláció, a genetikai állomány szekvenciájában nem történik változás. Bizonyos betegségek esetében a tünetek manifesztációjában döntő szerepe van a genetikai bevésődésnek (lásd: Angelman szindróma/Prader-Willi szindróma előadás).

### Hiszton módosítás

A hiszton fehérjék számos poszttranszlacionális módosítást "sz szenvedhetnek el", többek között metilálódhatnak, acetilálódhatnak, foszforilálódhatnak vagy ubikvitinálódhatnak. Ezek a módosítások aktívan megváltoztatják a nukleoszóma szerkezetét, megváltoztatva azon gének expresszióját, melyek az adott hiszton fehérjén fekszik.

### microRNS

A microRNS-ek (miRNS) olyan rövid, nem kódoló RNS szakaszok, melyeknek fő feladatuk az mRNS csendesítés (silencing). A miRNS hozzákapcsolódik a vele komplementer mRNS-hez, ezáltal az mRNS degradálódik, csökken a stabilitása vagy csökken a transzláció hatékonysága.

### X kromoszóma inaktiváció

*Lásd az ivari kromoszómák című fejezetet!*

## 23.7. POLIGÉNES ÖRÖKLŐDÉS, KOMPLEX BETEGSÉGEK

### Alapfogalmak

A mendeli öröklődés fejezetben a monogénes öröklődés jellemzőit tárgyaltuk. A **nem-mendeli öröklődés** témakörébe tartoznak az oligo- és poligénes öröklődésű jellegek. A multifaktoriális (komplex) betegségek kialakulásáért a poligénes öröklődésű hajlamosító géneken túl környezeti tényezők (faktorok) is felelősek.

A gyakori vagy **komplex betegségek** nagy része **családi halmazódást** mutat (Diabétesz mellitusz, Alzheimer-kór stb.), amely nem magyarázható mendeli öröklődéssel. Az ebbe a csoportba tartozó betegségek diagnosztizálása kihívást jelent, ezért ez a téma mára a genetikai kutatás kedvelt területévé vált.

A **multifaktoriális** jelleget (és betegségeket) több, különböző lókuszon található gén hatása alakítja ki, a környezeti faktorok (születés előtti vagy utáni) hatásával együtt. Ha csak néhány gén vesz részt az adott betegség kialakításában, akkor **oligogénes öröklődésről** beszélünk. Ha sok gén hatása játszik közre a folyamatban, **poligénes öröklődésű** betegséggel van dolgunk. **Komplex betegség** esetében a genetikai faktorokon túl környezeti tényezők is befolyásolják a betegség megjelenését.

A komplex betegségeket alapvetően a betegség kialakulásának ideje szerint csoportosíthatjuk: egyesek születéskor már jelen lehetnek (pl. Hirschprung-betegség), mások megjelenése kitolódhat akár az időskorra is (pl. Alzheimer-kór).

### Komplex betegségek azonosítása

Ezek a betegségek nem a mendeli szabályok szerint öröklődnek, ezért családfaelemzés segítségével a komplex öröklődés nem bizonyítható. Ha bizonyítani akarják, hogy egy betegség kialakulásáért genetikai és környezeti hatások együttesen felelősek, a kutatóknak az alábbi módszereket kell segítségül hívniuk:

#### Családkutatások

A vérrokonok génállománya részleges egyezést mutat, aminek mértéke a rokonság fokától függ (pl. az elsőfokú rokonok génállománya 50%-ban egyezik, a másodfokú rokonok génjeinek 25%-a azonos, stb.). Ha egy bizonyos jelleg komplex módon öröklődik, a családtagok elméletileg a genetikai hasonlóságuk arányában mutatják az adott jelleget.

Családkutatás során olyan családokat vizsgálnak, amelyekben egy vagy több személy érintett egy bizonyos betegségben. Az elemzés során megvizsgálják a betegség előfordulási gyakoriságát a többi családtag körében, majd meghatározzák a **relatív kockázat** értékét:  $\lambda_R$  az R családtagra nézve a betegség kialakulásának kockázata a teljes populáció kockázati értékéhez viszonyítva. Például ha  $\lambda_T$  értéke 10, akkor a testvér esélye a betegség kialakulására 10-szerese a teljes populációra vonatkozó kockázat értékének.

Egy betegség családi halmazódásának megállapítása önmagában nem elegendő a komplex öröklődés bizonyításához. Egyes betegségeket tisztán környezeti hatások, vagy közös szokások is okozhatnak (táplálkozás, fertőzés, stb.).

#### Ikertanulmányok

Az ikerpárok konkordanciájának összehasonlításával vizsgálják a betegséget előidéző genetikai és környezeti faktorok eloszlását. **Konkordáns** ikerpár mindkét tagja érintett a betegségben, **diszkordáns** az ikerpár, ha az egyikük érintett, a másik nem. Az egypetéjű ikrek azonos génállomány-

nyal rendelkeznek, míg a kétpetéjűek génjeinek átlagosan 50 %-a egyezik meg, éppúgy, mint a testvérek esetében.

- Ha a vizsgált jelleget 100%-ban genetikai faktorok határozzák meg, a konkordancia egypetéjű ikrek esetében 100%, kétpetéjűeknél jóval alacsonyabb.
- Ha a betegség vagy jelleg komplex, az egypetéjűek konkordanciája magasabb, mint a kétpetéjűeké, de nem éri el a 100%-ot (mivel még az egypetéjű ikrek esetében sem lehet mindig azonos a környezet!).
- Amennyiben a betegséget kizárólag környezeti hatások idézik elő, az egypetéjű és kétpetéjű ikrekre vonatkozó konkordancia értéke nagyjából megegyezik.

Az ikerkísérletek fő korlátozó tényezője az ikrek alacsony száma a populációban. Hátrány továbbá az is, hogy betegség esetén a konkordancia megállapítása sokkal biztosabb, mint a diszkordanciáé, valamint, az egypetéjűek környezeti faktorai nagyobb egyezést mutatnak, mint a kétpetéjűeké. Ezen problémák egy részét megoldhatnák az olyan tanulmányok, amelyekben **születéskor elválasztott ikreket** vizsgálnak, de az ilyen esetek száma meglehetősen alacsony.

### Örökbefogadott gyermekek vizsgálata

Adott betegséget okozó környezeti és genetikai tényezők elkülönítésére adoptált gyermekekkel végeztek kutatásokat három különböző stratégia alapján:

- Érintett biológiai szülő gyermekét adoptálták (környezeti változás, gének az érintett szülőtől) → a betegség előfordulását vizsgálják a gyermekben.
- Gyermeket adoptálják, és ezt követően az új környezetben jelentkezik a betegség → a biológiai szülők és családtagok vizsgálata.
- gyermek érintett biológiai szülőktől egészséges családba vs. 2. gyermek egészséges biológiai szülőktől érintett családba adoptálva → a betegség előfordulásának összehasonlítása a két gyermekben.

A vérrokonokra kapott magasabb előfordulási arány (a vérrokonságban nem álló adoptáló családban mért arányhoz viszonyítva) a genetikai faktorok erőteljes hatását jelzi. Ha a harmadik típusú tanulmány magasabb arányt ad a 2. gyermekre (aki egészséges családból lett érintett környezetbe adoptálva), az egyértelműen környezeti faktorok jelenlétére utal.

### Oligogén és poligén öröklődés

#### Folyamatos fenotípus

Számos emberi tulajdonság, mint a magasság, bőrszín, vérnyomás és intelligencia, **normál eloszlást** követ. Ha veszünk egy populációt, és ábrázoljuk azoknak a számát, akik egy bizonyos kvantitatív értékkel rendelkeznek, ún. „haranggörbét” kapunk, amely a Gauss-eloszlásra vagy normál eloszlásra jellemző. A normál eloszlású tulajdonságokat **folyamatos fenotípusoknak** nevezzük. A **kvantitatív genetika** az ilyen folyamatos jellegekkel foglalkozik, valamint a hozzájuk rendelhető lókuszekkel, amelyeket **kvantitatív jelleg lókuszeknek** nevezünk.

#### Oligo- és poligén öröklődés

A **poligén öröklődés** fogalma alapján a kvantitatív jellegeket változó számú gének (poligének) additív hatása okozza. Az **oligogén öröklődés** szerint más kvantitatív jellegekért viszonylag kis számú gén összjátéka felelős, valamint előfordulhatnak olyan gének, amelyek erősebb hatást fejtenek ki a fenotípus kialakításában, mint mások. Az ilyen gének lókusztát nevezik **fő hajlamosító lókusznak**, ami domináns hatást fejt ki az oligogén háttér felett, befolyásolva más gének kifejeződését. Ez az **episztázis** jelensége.

### Heritabilitás

A **heritabilitás** megadja a genetikai hatások additív részvételét a jelleg kialakításában.  $H$ -val jelöljük és 1 hányadaként (pl. 0,7), vagy százalékban fejezzük ki. A magas  $H$  érték arra utal, hogy az adott jelleg kialakulásában nagy arányban vesznek részt genetikai faktorok.

### Komplex öröklődés

A legtöbb komplex öröklődésű betegség diszkrét (azaz nem folytonos) fenotípusként jelenik meg (ti. beteg vagy nem), annak ellenére, hogy a fogékonyság folytonos eloszlású. A jelenségre a „**liabilitás-küszöb modell**” segítségével adunk magyarázatot. A **liabilitás**, vagyis az érzékenység - amely genetikai hajlamot és környezeti faktorokat is magában foglal - normál eloszlású, így Gauss-görbével leírható. A görbe jobb oldalán a liabilitás egy küszöbértéket érünk el, amely fölött minden egyed érintett. Ha a vizsgált populáció kizárólag az érintett személyek rokonságából áll, a görbe jobbra tolódik (mivel a rokonok génjei és környezete is több egyezést mutat, mint egy normál populációban). A küszöbérték fölötti egyedszám, vagyis a rokonok esélye a betegségre növekszik.

### A hajlamosító gének keresése

Napjaink egyik legintenzívebb kutatási területe a komplex betegségekre hajlamosító gének azonosítása. A felnőtt lakosságot érintő komplex betegségekre való hajlamot befolyásoló gének felismerése segíthet a betegség biokémiai alapjainak megértésében. Akár a korai felismerést segítő tesztek kifejlesztése, a megelőzés és kezelés új megközelítése is lehetővé válhat. Sajnálatos módon a folyamat igen lassú, és ezidáig kevés hasznosítható eredményt hozott. A következőkben összefoglaljuk a fő stratégiákat:

#### Kapcsoltság vizsgálata (Linkage analysis)

A genetikai kapcsoltság (ld. „Mendeli öröklődés”) vizsgálata során testvérek genomjában keresnek olyan szakaszokat, amelyek az érintett testvéreknél gyakrabban azonosak, mint azt véletlenszerűen várnánk. A vizsgálatba bevont szakaszok a polimorf mikroszatelliták és SNP-k közül kerülnek ki. Ez a módszer hatékony a hajlamosító gének lókuszeit tartalmazó nagyobb szakaszok detektálásában. Ezek a szakaszok túlságosan nagyok, így a konkrét gének azonosítása nem lehetséges ezzel a módszerrel. Ezért a kapcsoltsági vizsgálatokat követően a következő vizsgálatok (egyik vagy mindkettő) elvégzése javasolt.

#### Asszociációs elemzés

Egy bizonyos allél gyakoribb megjelenése az érintett egyéneknél, mint a kontroll populációban, az adott allélnak a betegséggel való összefüggését (asszociációját) jelzi. Az így elemzett szakaszok lehetnek mikroszatelliták, SNP-k; a vizsgálatot gyakran microarray technikával végzik. A módszer előnye, hogy olyan családok is vizsgálhatók, amelyekben csak egy érintett személy van. Fő hátránya viszont, hogy az összefüggés nem feltétlenül releváns, ezért további, kapcsoltsági egyenlőtlenégi (linkage disequilibrium) vizsgálatok elvégzése javasolt.

#### Kapcsoltsági egyenlőtlenég (linkage disequilibrium) vizsgálata

Definíció szerint a kapcsoltsági egyenlőtlenég „specifikus allélek megjelenése kapcsolt lókuszon a statisztikailag várhatótól eltérő gyakorisággal”. A legtöbb érintett egyén a hajlamosító allélját egy közös őstől örökölte, tehát ha a mutáció a nem túl távoli múltban következett be, akkor a kapcsoltságban álló, a hajlamosító allél közelében található gének ugyancsak megegyeznek. A gyakorlatban, ha a lókuszt hozzávetőlegesen helyzete ismert, ezt a szakaszt tovább vizsgálják részleteiben polimorf DNS markerek (ált. SNP-k) segítségével, így szűkítve le a kérdéses területet. A Human Genome Project segítségével nyert információk segítséget nyújthatnak a hajlamosító gének azonosítási folyamatában.



## Példák komplex öröklődésű betegségekre

A komplex betegségeket alapvetően a kialakulási ideje alapján csoportosíthatjuk: a **veleszületett** betegségek születéskor vagy a korai gyermekkor során jelennek meg, míg a **szerzett** betegségekre kora gyermekkori vagy felnőttkori kezdet jellemző. Kongenitális betegségek pl. a szív fejlődési rendellenességek, ajak-szájpadhasadék, Hirschprung betegség, velőcsőzáródási rendellenességek. Szerzett betegségek pl. az Alzheimer-kór, koronáriabetegség, diabétesz mellitusz (1 és 2 típus) és a skizofrénia.

### Alzheimer-kór

Az Alzheimer-kór (AD) a demencia leggyakoribb oka, 80 éves kor felett prevalenciája eléri a 20%-ot. Tünetei a folyamatos memóriavesztés, érzelmi zavarok, az intellektuális készségek elvesztése. Patológiai jelei a neurotoxikus tau protein kötegek, valamint az amiloid fibrillumokból álló szenilis plakkok jelenléte (az amiloid prekursor protein – APP – származékai).

Elsőfokú rokonságban álló családtagok esélye a betegsége 3-4-szerese a kontroll csoporthoz viszonyítva. Egypetűjű ikrek (EP) koncordanciája 30-80%, kétpetűjűeké (KP) pedig 10-40%. A heritabilitás 0.44-0.8. Ezek az adatok komplex öröklődésre utalnak.

A családok egy kis hányadában jelenik meg az ún. preszenilis vagyis korai kezdetű Alzheimer-kór (65 éves kor előtt jelennek meg az első tünetek). Ezt a típust **autoszómális domináns** öröklődési mintázat jellemzi. Elsőként az *APP* gén szerepét ismerték fel, amely az *amiloid prekursor proteint (APP)* kódolja. A gén mutációja az *APP* fehérje termelését serkenti, ami az amiloid fibrillumok túlermelődéséhez vezet, amely végső soron a szenilis plakkokat hozza létre. Más hajlamosító géneket is azonosítottak: a *Presenilin-1 (PS1)* és *Presenilin-2 (PS2)* elősegítik az *APP* lebontását. Ezen gének mutációja ugyancsak az *APP* felhalmozódásához vezet.

A legtöbb érintett családra azonban az ún. **poligénes AD** jellemző. A többségében 65 éves kor felett kezdődő betegségekre a leszármazottak esélye kevesebb, mint 50%. Az *APOE* lókuszt polimorfizmusa összefüggést mutat a késői kezdetű forma kialakulásával. Az *apolipoprotein E (ApoE)* a lipidanyagcserében vesz részt, 3 gyakori allélja ismert: *E2*, *E3* és *E4*. Az *E4* allél gyakorisága magasabb az Alzheimer-kórban érintett személyeknél (*E4/E4* homozigóták esetében a kockázat 12-szerese az *E3/E3* fenotípusnál tapasztalható képest). Legalább 4 másik hajlamosító gén szerepét mutatták ki a késői kezdetű AD kialakulásában.

Röviden: A poligénes AD – többek között – összefüggésben van az ApoE allélokkal. Az E4 allél hordozza a legerősebb hajlamot az időskori AD kialakulására. A másik, korai kezdetű forma autoszómális domináns öröklődésű, amelynek kialakulási valószínűsége az APP és a presenilin génekkel hozható összefüggésbe.

### Koronáriabetegség

A koszorúér-elmeszesedés az USA vezető haláloka. Hatszor gyakrabban fordul elő amerikaiakban, mint japánokban. A japán bevándorlók példája – esetükben háromszorosára nőtt a veszély az amerikai életmód átvételével – jól mutatja a környezeti faktorok fontosságát (dohányzás, étrend, testedzés hiánya).

A koronáriabetegség heritabilitása 0.5–0.6 között mozog **fiatalkori koronáriabetegség** esetében, amely egy korai, 55 éves kor előtti kezdetű forma. A férfiak veszélyeztetettebbek, egypetűjű ikrek koncordanciája 40-65%, míg kétpetűjűekre az érték 15-30%.

A koronáriaerek ateroszklerotikus folyamata egy zsíros csík megjelenésével kezdődik az artéria intima rétegében, amely később simaizmot, lipideket és fibrózus szövetet tartalmazó fibrózus plakká fejlődik. Ezek a plakkok aztán vaszkularizálódnak és vérzés, fekélyesedés, meszesedés következhet be, ezzel

komoly érszűkületet, akár trombózist okozva, amely teljes elzáródáshoz és miokardiális infarktushoz vezethet.

A koronáriabetegség különböző olyan monogénes rendellenességek összjátéka, mint pl. a hiperkoleszterinémia, vagy a hiperlipidémia más formái. Több mint 20 gén hatása játszhat szerepet a poligénes koronáriabetegségre való hajlam kialakulásában: lipidanyagcsere-gének, vérnyomást, váralvadást, és fibrinolízist szabályozó gének. Az *ACE* gén (*angiotenzin-konvertáló enzim*et kódolja) inszerció/delécio mutációját tanulmányozták behatóbban. A DD homozigóták magasabb enzim-szinttel rendelkeztek, mint az ID vagy II genotípusú alanyok, ezenkívül körükben gyakoribb volt a koronáriabetegség előfordulása.

Koleszterinszegény étrend bevezetése, valamint sztatínok alkalmazása széles körben ajánlott idős emberek számára, illetve ha korábban már előfordult koronáriabetegség a családban. A betegség veszélyét növelő környezeti faktorok az étrend, fizikai aktivitás hiánya és a dohányzás. A hajlam koronáriabetegség esetében komplex módon öröklődik, számos genetikai és környezeti faktor közrejátszik a betegség esetleges kialakulásában, illetve megelőzésében.

Röviden: A koronáriabetegség több, monogénes öröklődésű rendellenesség összjátéka, mint pl. a hiperlipidémia. Több mint 20 a lehetséges hajlamot okozó gén száma, ide tartozik az *ACE* gén. A DD homozigóták esetében a legnagyobb a koronáriabetegség kialakulásának kockázata. Számos környezeti faktor befolyásolja a betegség megjelenését, mint pl. a dohányzás, étkezési szokások, testmozgás hiánya.

### Diabétesz mellitusz

A diabétesz mellitusz (DM) két fő formája komplex öröklődést mutat.

#### 1. típusú, „inzulinfüggő” DM (IDDM)

Az IDDM viszonylag ritka forma, gyermekkorban vagy fiatal felnőttkorban jelentkező tünetekkel. A tünetek a hasnyálmirigy inzulintermelő  $\beta$ -sejtjeinek **autoimmun** pusztulásának következtében alakulnak ki.

Testvérek esetében az esély a betegség kialakulására 5-6%. EP ikrek koncordanciája 30-40%, KP ikreke esetében a konkordancia 5-10% körül mozog.

Máig két hajlamot okozó gént azonosítottak. A **HLA rendszer** felelős a teljes genetikai hajlam 30-40%-áért. Az *IDDM1* lókusztermeli az esetek 95%-ában jelenlévő *HLA-DR3* és *HLA-DR4* antigéneket, amelyek a teljes populációnak csak 50%-ában fordulnak elő. Az *IDDM2* lókusztartalmazza az *inzulin* génjét, valamint egy mikroszatellita repeat szekvenciát tartalmazó upstream régiót. Kiszámított repeat esetén a magzati thymusban csökken az inzulin gén expressziója, aminek következtében csökken az inzulinnal szembeni tolerancia. Ennek nyomán csökkenni fog az inzulin-termelő sejtek száma, ami IDDM kialakulásához vezet.

#### 2. típusú, „felnőttkori”, „nem inzulinfüggő” DM (NIDDM)

A NIDDM a 45 év feletti populáció 5%-át érinti. A tüneteket sokkal inkább inzulinrezisztencia okozza, mint relatív inzulinhoány. Kezelése diéta és/vagy orális antidiabetikumok szedésével történhet.

Elsőfokú rokonok esélye a betegség kialakulására 10-15% körül mozog (2-3-szor magasabb az általános populációs értékhez viszonyítva), egypetéjű ikrek koncordanciája 90%, ami a genetikai faktorok erős hatására utal. Számos kutatás megkísérelte a hajlamot okozó gének azonosítását, ezidáig sikertelenül.



*MODY (maturity-onset diabetes of the young), „fiatal felnőtteknél jelentkező diabétesz”*

A MODY ritka, egyértelműen autoszómális domináns módon öröklődő forma.

Okozhatják mutációk olyan transzkripció faktorok génjeiben, amelyek az inzulin gén expresszióját vagy a hasnyálmirigy fejlődését szabályozzák: *MODY1 (hepatocita nuclear factor-4-a gén)*, *MODY2 (glükokináz gén)*, *MODY3 (máj transzkripció faktor-1 gén)*, és a *MODY4 (islet duodenum homeobox-1 - IDX1 - gén)*.

Röviden: Az 1. típusú DM vagy IDDM egy ritka forma, amit az inzulintermelő sejtek pusztulása okoz. Az IDDM-re való hajlam kialakulásával eddig két lókuszt hoztak összefüggésbe. A gyakori 2. típusú DM vagy NIDDM típust inzulinrezisztencia okozza. Máig nem sikerült hajlamosító géneket azonosítani. A DM harmadik típusa, a MODY autoszómális domináns öröklődésű betegség, 4 hajlamosító génnel.

### Hirschprung betegség (HSCR)

A Hirschprung betegség veleszületett komplex betegség, amelynek első tünetei (akut bélelzáródás és haspuffadás) általában születéskor vagy korai gyermekkorban jelentkeznek. A betegséget a vastagbél disztális szakaszából és végbélből hiányzó ganglionsejtek (idegvégződések) okozzák, a bélperisztaltika ezeken a szakaszokon hiányos. A hosszú szakaszra kiterjedő típus (L-HSCR) komolyabb a rövid szakaszra kiterjedő típusnál (S-HSCR), mivel az első esetben a szigmabéltől proximálisan fekvő szakasz is érintett. Az esetek kb. 30%-a többszörös fejlődési rendellenesség részeként jelenik meg (pl. Down-szindróma). A fennmaradó 70% izolált, komplex öröklődésű betegség.

A betegség molekuláris biológiai alapjait a kutatások sikeresen felfedték: fő hajlamosító faktorként a **RET** protoonkogén szerepel, génjének heterozigóta mutációja ún. funkcióvesztést – loss-of-function hatást – okoz. A RET egy *transzmembrán tirozin-kináz receptort* kódol, amely az embrionális bélidegrendszer sejtjeinek jelátviteli folyamatait befolyásolja. Más gének mutációját is összefüggésbe hozták a betegség megjelenésével, mint pl. a RET ligand *GDNF* és *NTN*, az *endothelin* gén (*EDNRB*), valamint ligandja az *EDN3*.

A Hirschprung betegség az egyetlen olyan komplex öröklődésű betegség, amelynek esetében a fő genetikai útvonal azonosítása sikeres volt. Mivel kisszámú gén vesz részt a hajlam kialakításában, a betegséget az oligogénes öröklődésű betegségek közé soroljuk.

Röviden: A HSCR ritka példája annak, hogy egy komplex betegségre hajlamosító gének nagy részét beazonosították. Oligogénes öröklődés jellemzi, amiben egy fő hajlamosító lókuszt – a RET gén – és néhány episztatikus gén vesz részt.

### Velőcső záródási rendellenességek

Ezek a rendellenességek a korai embriogenezis folyamán jelennek meg: a velőcső záródása nem megfelelő módon történik meg. Igen súlyos tünetek jelentkezhetnek, mint az anencefália, enkefalokele, vagy a spina bifida. Néhány esetben ezek a rendellenességek többszörös fejlődési rendellenesség részeként jelennek meg, de leginkább izolált, önálló betegségként találkozunk velük.

A heritabilitás értéke ( $H=0.6$ ) erős genetikai hajlamra utal. Máig a kutatások egyetlen polimorfizmussal hozták összefüggésbe ezeket a rendellenességeket: az *MTHFR* gén C→T mutációját hordozó egyének esélye 2-4-szeresére nő (ha az anya és a magzat is homozigóta). Az *MTHFR* gén által kódolt enzim a *metilén-tetrahidrofolát-reduktáz*. A fent említett mutációra homozigóták vörösvértestei csökkent folsav szinttel rendelkeznek.

A fogantatás és a kora terhesség alatti folsavpótlás az esetek 80%-át megelőzi. Ez jó példája annak, hogyan kezelhető egy főleg genetikai faktorok által meghatározott betegség egy környezeti faktor, esetünkben a táplálkozás változtatásával.

Röviden: A velőcsőzáródási rendellenességek veleszületett poligénes öröklődésű betegségek. Máig egyetlen génnel hozták sikeresen összefüggésbe: az MTHFR gén mutációja erőteljes hajlamosító tényező. Megelőzőként – elegáns módon – folsav pótlásával (amely egy környezeti faktor megváltozása!) az esetek 80%-a megelőzhető.

### Skizofrénia

A skizofrénia kóros mentális állapot, amely a földi populáció 1 %-át érinti. Késő gyermekkorban vagy fiatal felnőttkorban jelentkeznek az első tünetek, mint pl. a zavaros gondolkodás, érzelmi és szociális zavarok, gyakran téveszmékkel és érzelmi hullámmal.

Családkutatások és ikertanulmányok erős genetikai hátteret mutattak ki a betegség kialakulásában. Elsőfokú rokonok között a betegség kialakulási esélye 10-12%, másodfokú rokonokra ez a szám 2-4%, míg harmadfokú rokonságban álló személyek esetében 2% körül alakul. Egypetéjű ikrek esetében a konkordancia 50-70%, kétpetéjűekre 10-15%, a heritabilitás 0.8 és 0.85 közé esik.

Két lehetséges hajlamosító gén a *DTNBP1* és az *NRG1*. A *DTNBP1* a *dysbindin* proteint kódolja, amely az agyi szinapszisok működésében játszik szerepet. Az *NRG1* a *neureglin 1*-et, a mielinizációt beindító fehérjét kódolja. Ezen gének szerepét független kapcsoltsági és asszociációs/kapcsoltsági egyenlőtlenségi vizsgálatok igazolták, habár specifikus patogén mutációt nem találtak.

Röviden: Néhány olyan gént sikerült azonosítani független kísérletekben, amelyek részt vesznek ennek a kóros mentális állapotnak a kialakulásához: a dysbindint és a neuroreglin 1-et.

### Hajlam elemzése komplex betegségek esetében

#### Genetikai tesztekkel megjósolt esélyek

A tény, hogy néhány hajlamosító gén azonosítása megtörtént, arra a következtetésre vezethet minket, hogy lehetőségessé vált a komplex betegségekre való hajlam vizsgálata, és hogy ez lehet a megelőzés és terápia új útja. Néhány, Egyesült Államokbeli és brit cég olyan lehetőséget kínál, hogy az egyén genetikai profilja alapján „megjósolják” a rizikót bizonyos komplex betegségekre, pl. koronáriabetegség, asztma kialakulására. Vagy éppen a szervezetünk lipideket, mérgeket lebontó képességéről kaphatunk információt, és életmód tanácsokat is adhatnak nekünk. Az eredmények értelmezése azonban túlságosan is optimista. Ha például az *ApoE4* és az Alzheimer-kór kapcsolatára gondolunk, vegyük figyelembe, hogy az *E4/E4* homozigóták esélye a betegség kialakulására 35% férfiak esetében, és 50% nőknél, míg az *E4* alléllal egyáltalán nem rendelkezők esetében ezek a számok 4,5% és 9,3% körül alakulnak. Az esélyek késői életkorban bekövetkező változásra vonatkoznak, de a kezdeti tünetek megjelenésének ideje nem jósolható meg. Ezen kívül, a statisztikai adatok azt mutatják, hogy az *E4/E4* homozigótáknak 50%-ában soha nem alakul ki a betegség, és hogy a teljes populáció 5-10%-a még az *E4* allél teljes hiányában is érintetté válik! Az ilyen és hasonló adatok a fent említett tesztek megbízhatóságát és értékét drasztikusan csökkentik.

#### Empirikus valószínűség

Komplex betegségek esetében általában általában nem lehetséges elméleti alapon megállapítani a valószínűséget. Amennyiben az öröklődést normál eloszlású hajlam (liabilitás) határozza meg, az esély statisztikai számításokkal meghatározható, a normál populációra vonatkozó gyakoriság ismeretében. Genetikai tanácsadás során az elméleti valószínűség helyett empirikus, vagyis **tapasztalati valószínűség** megállapítása történik. Az empirikus valószínűség számítása megfigyeléseken alapul (családkutatások során megállapított gyakorisági mintázatok adataiból).

## 23.8. CSALÁDFAELEMZÉS

### Bevezetés

Egyre többet tudunk meg a humán anatómiáról, élettanról, biokémiáról és molekuláris biológiáról. Számos családról vannak részletes leírásaink, információink több generációra visszamenőleg. A humán betegségek genetikai háttere a családfák elemzését nagyon fontossá teszi. A humán genetikai jellegzetességek tanulmányozásának néhány fontos tényezője:

1. Szabályozott párválasztás nem lehetséges: specifikus keresztezések nem kivitelezhetők, azonban ezek elengedhetetlenek ahhoz, hogy meghatározzuk egy egyén domináns tulajdonsága homozigótaságot vagy heterozigótaságot takar-e.
2. Az emberi fajnak hosszú a generációs ideje (kb. 20 év): még ha kontrollálni is tudnák a keresztezéseket, akkor is átlagosan 40 évet kéne várnunk, hogy lássuk az F2 generáció jellegzetességeit és a keresztezés eredményét.
3. A családok mérete általában kicsi: egy családban, ahol két gyermek van, nem lehet megfigyelni a Mendeli 3:1 arányt. Még egy extrém nagy család esetén, ahol 10-15 gyermek van, sem lehet a 9:3:3:1 dihibrid arányt vizsgálni.
4. Esetenként nehéz megállapítani az apaságot.

A fent említett okok miatt az ember a legjobb és a legrosszabb az összes organizmus között a genetikai vizsgálatok lefolytatásához.

A humán öröklődés vizsgálatának az egyik fontos módszere a családfa készítés. Egy családfa a család történet rajzi reprezentációja, a családfa egy vagy több jelleg öröklődésének nyomon követésére alkalmas.

A családfa alapján meghatározhatjuk az öröklődés módját: autoszómális domináns, autoszómális recesszív, ivari kromoszómához kötött domináns, ivari kromoszómához kötött recesszív, mitokondriális, anyai hatású; ugyanakkor megjósolhatjuk a betegség előfordulásának kockázatát a további generációkban (genetikai tanácsadás).

### Szimbólumok

(lásd ábrák)

1. A férfiakat négyzettel, a nőket körrel jelöljük
2. A horizontális vonal két szimbólum között a két ember közti párkapcsolatot jelzi
3. A gyerekeket a szülőkhöz vertikális vonal köti
4. Azok a személyek, melyek expresszálják a vizsgált jelleget kitöltött négyzettel vagy körrel jelöljük
5. A tulajdonságot nem mutató személyeket fehér szimbólumokkal jelöljük
6. A generációkat római számmal jelöljük
7. A generáción belüli személyeket arab számokkal jelöljük
8. A gyerekek a születésük sorrendjében szerepelnek balról jobbra

9. Az elhunyt családtagot áthúzott szimbólummal jelöljük
10. Az ikreket egy pontból kiinduló diagonális vonallal kötjük össze
11. Azt a személyt, akitől a családfa indul, nyíllal jelöljük

### Autoszómális recesszív jellegek

(lásd ábra)

1. az autoszómális recesszív jellegek egyforma gyakoriságúak mindkét nemnél
2. csak akkor jelenik meg, ha a személy a jelleg két allélját örökli
3. ha a jelleg ritka, akkor a legtöbb szülő hordozza az allélt, heterozigóta és egészséges
4. a jelleg kihagyhat generációkat: egy recesszív allél generációkon át öröklődhet anélkül, hogy megjelenne a családfán
5. ha a szülők heterozigóták, akkor 25% az esélye, hogy az utód örökli és expresszálja a jelleget
6. ha mindkét szülő érintett az autoszómális recesszív jelleggel (homozigóta recesszívek), akkor minden utódjuk érintett lesz
7. a családba kívülről érkező személyeket homozigótának tekintjük a normál allélra nézve: amikor egy érintett személy egy külső személlyel (AA) lép párkapcsolatra egyetlen utódjuk sem fogja kifejezni a jelleget, viszont mindannyian hordozók (Aa) lesznek
8. egy recesszív jelleg nagyobb valószínűséggel jelenik meg a családfán, ha a családban vérfertőzés történik (közeli rokonok házasodnak egymással)

### Autoszómális recesszív betegségek

*Tay-Sachs betegség*

(lásd ábra)

- a gyerekek születéskor egészségesnek tűnnek, de hat hónapos korukra kedvetlenné és gyengévé válnak
- a fizikai és idegrendszeri kondíciójuk romlik, ami vaksághoz, siketséghez és 2-3 éves korukra halálhoz vezet
- a betegség oka a GM2 gangliozid felhalmozódása az agyban
- GM2 gangliozidot a sejtek nem tudják lebontani a hexoaminidáz A enzim hiánya miatt
- a nagymennyiségű GM2 gangliozid duzzanatot és neurológiai tüneteket okoz
- a heterozigóták egészségesek, mivel egyetlen normál allél is elegendő az enzim normál mennyiségének a felét előállítani, és a szervezet így is képes a GM2 gangliozid normál ütemű lebontásához

*Fenilketonúria*

(lásd ábra)

- autoszómális recesszív betegség, melynek hátterében enzimdefektus áll, így a szervezet nem képes a fenilalanint metabolizálni

- az enzim nélkül nagy mennyiségű fenilalanin halmozódik fel, ami idegrendszeri károsodást okoz
- a PKU-ban szenvedő anyától (aki nincs fenilalanin hiányos diétán) született gyerekek általában alacsony súllyal születnek, fejlődési rendellenességeik vannak és mentálisan visszamaradottak

### Autoszómalis domináns jellegek

(lásd ábra)

1. az autoszómalis domináns jellegek mindkét nemnél azonos gyakorisággal fordulnak elő
2. mindkét nem képes továbbadni a jelleget az utódnak
3. minden személy esetén, aki domináns jelleget hordoz, az allél legalább az egyik szülőtől származik
4. az autoszómalis domináns jellegek nem hagynak ki generációt a családfán
5. kivételek: a jelleg mutáció eredménye
6. ha egy autoszómalis domináns jelleg ritka, az érintett személyek általában heterozigóták
7. ha egy szülő érintett és heterozigóta (Aa) és a másik szülő egészséges (aa), akkor az utódok 50%-a lehet érintett
8. ha mindkét szülő érintett és heterozigóta (Aa), akkor az utódok 75%-a lehet érintett

### Autoszómalis domináns betegségek

*Familiáris hiperkoleszterolémia*

- a vér koleszterin szintje jelentősen megemelkedik a koleszterin transzport hibája miatt
- a koleszterin egy lipid molekula (apoláros, töltés nélküli anyag), nem oldódik a vérben (poláros vagy töltéssel rendelkező oldat), így a koleszterint a szervezetben kicsi, oldható részecskék szállítják, amiket lipoproteineknek nevezünk (LDL, HDL, VLDL, IDL, kilomikron)
- a betegség oka az LDL receptort kódoló gén defektusa
- eredmény: túl kevés koleszterin távolítódik el a vérből, ami növeli a koronáriák működési hibájának kockázatát (szívroham)
- heterozigóták: a vér LDL szintje duplája a normálisnak
- homozigóta domináns: két defektív LDL alléljük van, nincs funkcionális LDL receptoruk, a koleszterin szint hatszorosa a normálisnak, infarktust kaphatnak 2 éves korukra

*Huntington betegség*

(lásd ábra)

- tünetek: görcsös, akaratlan mozgások, közepesen súlyos viselkedési és neurológiai elváltozások; ahogy a betegség előrehalad a beszéd is zavart szenved, a mozgás nehézkessé válik és pszichiátriai problémák fejlődnek ki, ami végül ördülethez vezet.
- a betegség tipikusan középkorban jeleneik meg
- a betegség kifejlődésétől számítva a betegek 20-30 évig élnek
- mindkét nemnél azonos gyakorisággal fordul elő
- ritkán hagy ki generációt
- ha az egyik szülő beteg, akkor kb. utódainak 50%-a örökölheti a betegséget

*Achondroplasia**(lásd ábra)*

- a lábak hosszú csontjainak növekedése gátolt, törpéséget okoz
- ha két heterozigóta érintett házasodik, akkor 50% az esélye, hogy az utódok heterozigóták és törpék lesznek
- minden negyedik gyerek lesz egészséges (nem öröklí az achondroplasiát), átlagos magasságú és minden negyedik gyerek lesz homozigóta a domináns allélre nézve
- a domináns allél homozigóta formában letális

**X-kromoszómához kötött recesszív jelleg***(lásd ábra)*

1. Ezek a jellegek gyakoribbak a férfiaknál
2. A férfiaknál egyetlen kópia elegendő a kifejeződéshez
3. A nőknek két kópiára van szüksége, mindkét szülőtől, hogy kifejeződjön a jelleg
4. Egy férfi mindig az anyától öröklí az allélt
5. Az érintett férfiak egészséges anyától születnek, aki heterozigóta
6. Kihagyhat generációkat: a jelleg egészséges nőről, érintett férfira majd újra egészséges nőre öröklődik
7. Egy heterozigóta nő fiainak 50%-a lesz érintett és a lányai 50%-a lesz egészséges hordozó
8. A jelleg nem öröklődik apától fiúra, mert a fiú az apától csak az Y kromoszómát öröklöheti, az X kromoszómát pedig az anyától
8. Egy beteg férfi minden lánya hordozó lesz
9. Ha egy nő expresszál egy X-kromoszómához kötött jelleget, akkor biztosan homozigóta és minden fia érintett lesz a jellegre nézve

**X-kromoszómához kötött recesszív betegség***Hemofília A**(lásd ábra)*

- a betegség hátterében a véralvadáshoz szükséges VIII-as alvadási faktor hiány áll
- a VIII-as faktort kódoló gén az X kromoszóma hosszú karjának végén helyezkedik el
- tünet: vérzékenység
- spontán vérzések alakul ki az ízületekben, ami fájdalomhoz, duzzadáshoz és csont erózióhoz vezet
- kezelés: VIII-as faktor pótlása

**X-kromoszómához kötött domináns jellegek***(lásd ábra)*

1. X-kromoszómához kötött domináns jellegek mindkét nemnél megjelennek, habár általában több nőt érint, mint férfit

2. egy férfi a jelleget csak az anyától örökölhethet
3. a jelleg nem öröklődik apáról fiúra
4. egy nő az X kromoszómákat mindkét szülőtől kapja, a nők mindkét szülőtől örökölhethetik a jelleget
5. minden érintett gyermeknek legalább az egyik szülője érintett
6. X-kromoszómához kötött jelleg nem ugrik át generációt
7. érintett férfiak minden lányuknak örököltik a jelleget, viszont egyik fiuknak sem
8. az érintett nők (ha heterozigóták) a fiaik 50%-ának adják át a jelleget és lányaik 50%-a lesz érintett

### X-kromoszómához kötött domináns betegség

#### *Hipofoszfátémia/familiáris D vitamin rezisztens csonttritkulás*

- tünetek: csont deformitások, merev gerinc és ízületek, hajlott lábak és közepes növekedési deficiencia
- oka a defektív foszfát transzport
- a betegségben szenvedő páciensek nagy mennyiségű foszfátot ürítenek a vizelettel, ami alacsony vér-foszfát szinthez vezet, és csökken a beépülése a csontokba
- a betegségben szenvedő férfiaknak súlyosabbak a tüneteik, mint az érintett nőknek

### Y-kromoszómához kötött jellegek

(lásd ábra)

1. csak a férfiak érintettek, és a jelleg apáról fiúra öröklődik
2. ha egy férfi érintett, akkor minden fia érintett lesz
3. Y-kromoszómához kötött jelleg nem hagy ki generációt
4. a dominancia irreleváns: csak egy kópia létezik a génből az Y kromoszómán (hemizigóta)
5. csak néhány humán jelleg Y kromoszómához kötött: szőrös fül
6. Y-kromoszómához kötött jelleg okozhat sterilitást (Férfiak sterilitási rendellenessége)
7. Y-kromoszómához kötött betegség: *retinitis pigmentosa*, ami a leggyakoribb formája az öröklött retina degenerációnak (az öröklődése lehet autoszómális recesszív, autoszómális domináns, X-kromoszómához kötött és anyai öröklődésű, az érintett géntől függően)

### Mitokondriális öröklődés

(lásd ábra)

1. a mitokondriumok csak az anyától származnak
2. ha egy nő mitokondriálisan öröklődő jelleggel rendelkezik, akkor minden utóda örököli a jelleget
3. ha egy férfi rendelkezik mitokondriálisan öröklődő jelleggel, akkor az utódai nem örökölik



4. csak egy allél van jelen minden egyénben, ezért dominanciáról nem beszélhetünk
5. mitokondriális betegség példája: *MELAS szindróma* (Mitokondriális Encefalomiopátia, Tejsav acidózis és Stroke-szerű epizódok) érinti az agyat, és az idegrendszert és az izmokat; tünetei az izomgyengeség, fájdalom, stroke-szerű epizódok, agykárosodás, látászavar, demencia, tejsav acidózis és ataxia.

### Anyai hatás

(lásd ábra)

1. az utód fenotípusát az anya genotípusa határozza meg: a géneket mindkét szülőtől öröklük az utódok, de a fenotípust nem az utód, hanem az anya genotípusa határozza meg
2. a citoplazmatikus öröklődésben egy jelleget meghatározó géneket csak egy szülőtől öröklük az utód, általában az anyától
3. a genetikai anyai hatás akkor következik be, amikor a petesejt citoplazmájában lévő specifikus anyagok esszenciálisak a korai fejlődésben
4. az utód fenotípusa nem feltétlenül azonos az anya genotípusával
5. az utód fenotípusát az anya genotípusa határozza meg, nem pedig a fenotípusa
6. sem az apa sem pedig az utód saját genotípusa nem képes befolyásolni az utód fenotípusát
7. az anyai hatású gének a férfiakon keresztül jutnak a következő generációkba

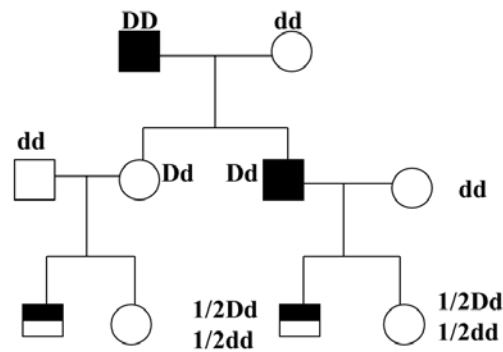
### Nem által befolyásolt jellegek

1. a nem által befolyásolt jellegeket autoszómális gének határozzák meg és a mendeli törvények szerint öröklődnek
2. az autoszómális gének eltérően expresszálódnak a férfiaknál és a nőknél
3. egy meghatározott jelleg könnyebben expresszálódik az egyik nemből

### Kopaszság – egy nem által befolyásolt jelleg

- a haj korai kihullása a fej elején és tetején
- a kopaszság mintázata egy autoszómális jelleg, ami a férfiaknál valószínűleg domináns, a nőknél pedig recesszív
- férfiak s nők is öröklhetik bármelyik szülőtől
- a férfiaknak elegendő egyetlen allél a kopaszághoz
- a nőknél két allél szükséges a jelleg kifejeződéséhez
- a kopaszság nőknél sokkal gyengébben jelentkezik
- a kopaszodásért felelős allél kifejeződését a férfi nemi hormonok elősegítik



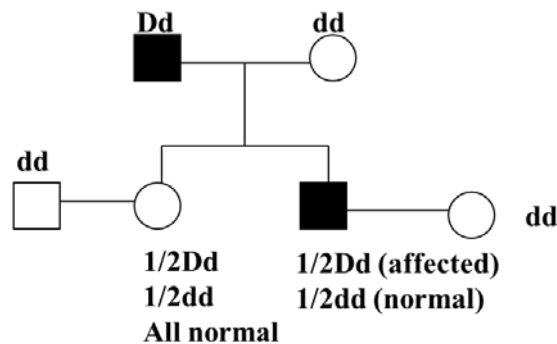


**Nem által limitált jellegek**

1. a nem által limitált jeleget autoszómális gének kódolják, de csak az egyik nemben fejeződik ki
2. a jelleg nem található meg a másik nemnél
3. a nem által limitált jeleget bármelyik szülő örökítheti az utódnak

**Férfiakra korlátozott korai pubertás – egy nem által limitált jelleg**

- egy autoszómális domináns allél okozza, mely csak fiúkban fejeződik ki
- a lányoknak normális a fenotípusa
- a fiúk korai pubertáson esnek át 4 éves kor körül
- az érintettek fertilisek
- a jelleg nagyon ritka, az érintett fiúk általában heterozigóták
- a korai pubertáson átesett férfiak, ha normál genotípusú nővel házasodnak, az utódok 50%-ba örökíti a felelős allélt, de csak a fiúkban fejeződik ki
- ha egy heterozigóta nő házasodik egy egészséges férfival, akkor a fiaik 50%-a lesz érintett korai pubertásban
- a betegség a luteinizáló hormon (LH) receptorát érinti
- normál pubertás során a fiúkban az LH emelkedett szintje serkenti a tesztoszteron termelést, ami stimulálja az anatómiai és fiziológiai változásokat
- a hibás LH receptor stimulálja a tesztoszteron termelést az LH hiányában is
- a hibás allél miatt a fiúk nagy mennyiségű tesztoszteront termelnek már nagyon fiatalon
- a hibás LH receptorok a nőkben is megtalálhatók, akik hordozzák a korai pubertásért felelős allélt, de a jelenléte nem eredményezi a betegség kialakulását, mert a folliculus stimuláló hormon és az ösztrogének is szükségesek az LH mellett



## 23.9. POPULÁCIÓGENETIKA

### Bevezetés

A populációgenetika egyedek csoportjának genetikai felépítésével foglalkozik, és vizsgálja a *genetikai összetételük* változását. A populációgenetika az *ideális populációkat* vizsgálja, melyek egymás között sikeresen szaporodó egyedeket foglalnak magukba. Az egyedek összes génjét együttesen pedig *gén pool-nak*, *gén állománynak* nevezzük. Így a gén pool a populációban lévő összes egyed összes allélja.

Mivel egy populáció a gén pool változásai során alakul ki, így a populációgenetika az evolúciót is vizsgálja. A populációgenetika ezek mellett tanulmányozza a csoportok közötti és csoporton belüli allél variációkat és az evolúciós hatásokat, amik meghatározzák a genetikai variációk mintázatát.

### Az öröklődést befolyásoló faktorok

Egy populáció öröklési mintázatát számos faktor befolyásolja:

1. A populáció mérete: A populáció elég nagy ahhoz, hogy véletlenszerű események ne okozzanak random génvesztést pl. nincs **genetikai sodródás**.
2. Mutációk: a vizsgált gén lókusznál nem szignifikáns a mutációs ráta.
3. A párválasztás az egyedek között véletlenszerű (**pánmitikus/homogén populáció**).
4. Új egyedek nem **vándorolnak be** a populációba és nincs **elvándorlás** sem pl. nincs **gén-áramlás** az azonos fajból álló szomszédos populációk között.
5. Szomszédos populációk: egy gén alléljának nincs **szelekciós előnye** vagy **hátránya**.

A genetikai sodródás, mutáció, párválasztás, migráció és természetes szelekció együtt vagy külön-külön befolyásolhatja a gének transzmisszióját generációról generációra. Ha egyik befolyásoló faktor sem működik a populációban, akkor a populáció alléljainak relatív aránya (**allél frekvencia**) állandó. Így a populáció genetikai egyensúlyban van (ekvilibríum).

### Genetikai variáció

A genetikai variabilitást három mechanizmus tartja fenn:

1. random fertilizáció
2. kromoszómák random szegregációja
3. crossing over/rekombináció

A genetikai variációk fenotípusos eltéréseket is okozhatnak. Sok variáció molekuláris szinten van jelen a genetikai kód redundanciája miatt, így eltérő kodonok ugyanazt az aminosavat kódolják. Két egyed képes ugyanazt a fehérjét szintetizálni, még akkor is, ha a DNS-ük eltérő. A genetikai variabilitás az evolúció alapja, valamint befolyásolja a populáció változó környezethez való alkalmazkodásának képességét is.

### Genotípus gyakoriságok

(lásd előadás ábra)

A gyakoriság egy arány vagy egy százalék, amit tizedes törtben fejezünk ki. A populáció genotípus és allél frekvenciái a populáció gén poolját reprezentálják. A genotípus gyakoriság kiszámításához összeadjuk az adott genotípussal rendelkező egyedek számát és elosztjuk a populáció teljes létszámával (N). Egy három genotípussal, AA, Aa, aa, rendelkező lókusznál esetén a genotípus gyakoriságok (f):

$$f(AA) = \frac{\text{AA egyedek száma}}{N}$$

$$f(Aa) = \frac{\text{Aa egyedek száma}}{N}$$

$$f(aa) = \frac{\text{aa egyedek száma}}{N}$$

A genotípus frekvenciák összege mindig egyenlő eggyel.

### Allél gyakoriságok

(lásd előadás ábra)

A populáció génállománya szintén jellemezhető az allél frekvenciákkal. Mindig kevesebb allél van, mint genotípus. A genotípus az allélok időleges összekapcsolódása. Az egyedek az allélokat a következő generációba a gamétákkal juttatják tovább. Az allél gyakoriságokat a genotípusok számából vagy gyakoriságából számolhatjuk ki a következőképpen. Összeszámoljuk a populációban lévő vizsgálni kívánt allélek számát és elosztjuk a populáció teljes allélszámával.

$$\text{Allél gyakorisága} = \frac{\text{Allél száma}}{\text{Összes allél száma}}$$

Egy két allélos lókuszt esetén (A, a) az allélok gyakoriságát p és q jelöli (lásd később), és a következőképpen számolhatjuk:

$$p = f(A) = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N}$$

$$q = f(a) = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$$

Szimbólumok:  $n_{AA}$ ,  $n_{Aa}$ , és  $n_{aa}$  reprezentálja a AA, Aa, és aa egyedeket, az N mutatja az összes egyed számát a populációban. A számlálót  $2N$ -nel osztjuk, mivel az egyedek diploidok, ezért két alléljuk van az adott génre nézve.

Ha kettőnél több alléllal rendelkező lókuszt allél gyakoriságait szeretnénk meghatározni, akkor ezeket a genotípusok számából számolhatjuk ki. Ehhez ki kell számolnunk az allélok számát, úgy hogy a homozigótákat kétszer vesszük és hozzáadjuk a heterozigóták számához, mivel ők hordozzák a vizsgált allélt, majd elosztjuk a populáció létszámának kétszeresével (diploidok).

Ha a három allél  $A^1$ ,  $A^2$  és  $A^3$ , akkor ebből a hat lehetséges genotípus  $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1A^3$ ,  $A^2A^2$ ,  $A^2A^3$ ,  $A^3A^3$ .

$$p = f(A^1) = \frac{2n_{A^1A^1} + n_{A^1A^2} + n_{A^1A^3}}{2N}$$

$$q = f(A^2) = \frac{2n_{A^2A^2} + n_{A^1A^2} + n_{A^2A^3}}{2N}$$

$$r = f(A^3) = \frac{2n_{A^3A^3} + n_{A^1A^3} + n_{A^2A^3}}{2N}$$

Ha egy X-kromoszómához kötött allél gyakoriságát szeretnénk kiszámolni, akkor ugyanezeket a szabályokat kell használni. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a nők két X kromoszómával rendelkeznek, míg a férfiaknál csak egy X kromoszóma van. A nők lehetnek homo- vagy heterozigóták ( $X^A X^A$ ,  $X^a X^a$ , vagy  $X^A X^a$ ). A férfiak viszont hemizigóták ( $X^A Y$  vagy  $X^a Y$ ). Az  $X^A$  (p) allél gyakoriságát akarjuk meghatározni, akkor először az  $X^A$  allélok számát kell meghatározni: az  $X^A X^A$  nők számát kettővel szorozzuk, majd hozzáadjuk az  $X^A X^a$  nők számát és az  $X^A Y$  férfiak számát. Ezt követően elosztjuk a lókuszon lévő allélok számával, ami a nők és férfiak együttes létszámának kétszerese.

$$p = f(X^A) = \frac{2n_{X^A X^A} + n_{X^A X^a} + n_{X^A Y}}{2n_{\text{nőstény}} + n_{\text{hím}}}$$

$$q = f(X^a) = \frac{2n_{X^a X^a} + n_{X^A X^a} + n_{X^a Y}}{2n_{\text{nőstény}} + n_{\text{hím}}}$$

## A Hardy-Weinberg törvény

(példáért lásd előadás diák)

A Hardy-Weinberg törvény az egyik legfontosabb elv a populációgenetikában. A törvényt egymástól függetlenül két kutató alkotta meg 1908-ban, Godfrey H. Hardy és Wilhelm Weinberg. A matematikai formula leírja a szaporodás hatásait a genotípus és allél gyakoriságokra a populációban. Egy autoszómális két allélos lókuszs esetén a Hardy-Weinberg törvénynek megállapításai érvényesek a populációra **ha**:

1. A populáció elég nagy, és random a párválasztás, nincs mutáció, migráció vagy természetes szelekció.
2. Az allél gyakoriságok nem változnak.
3. A genotípus gyakoriságok stabilizálódnak egy generációt követően. Ez azt jelenti, hogy megváltozhatnak már az első generációban a random párválasztás során, de egy random párválasztás elengedhetetlenül szükséges, hogy a genotípusok Hardy-Weinberg arányt mutassák. Ezt követően a genotípus gyakoriságok, ahogy az allél gyakoriságok nem változnak addig, míg a populáció a Hardy-Weinberg törvénynek megfelelően működik.

A Hardy-Weinberg törvény kimondja, hogy amíg a feltételek teljesülnek, a szaporodás önmagában nem változtatja meg az allél vagy genotípus frekvenciákat és az allél gyakoriságok határozzák meg a genotípus gyakoriságokat.

Nem elfelejtendő:

- p = A allél gyakorisága
- q = a allél gyakorisága

- $p = AA + \frac{1}{2} Aa = A$  allél gyakorisága
- $q = aa + \frac{1}{2} Aa = a$  allél gyakorisága
- $p + q = 1$
- Megkaphatjuk ezeket:  $q = 1-p$  és  $p = 1-q$
- $2pq =$  heterozigóta genotípus gyakoriság
- $p^2 =$  homozigóta domináns genotípus gyakoriság
- $q^2 =$  homozigóta recesszív genotípus gyakoriság
- $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Ha a genotípusok az elvárt arányoknak megfelelően  $p^2$ ,  $2pq$ , és  $q^2$ , akkor a populáció ún. **Hardy-Weinberg egyensúlyban van**. Ha a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyban van, akkor az allél gyakoriságok határozzák meg a genotípus gyakoriságokat.

A Hardy-Weinberg törvényt csak akkor lehet használni, ha

- az organizmus diploid
- csak ivaros szaporodás létezik
- a generációk nem fednek át
- a párválasztás véletlenszerű
- a populáció mérete megfelelően nagy
- az allél gyakoriságok megegyeznek a két nemnél
- nincs migráció, mutáció és szelekció

A Hardy-Weinberg törvény képes a gén frekvenciákat kiszámolni a genotípus gyakoriságokból. A számolt gén gyakoriságokat használja, hogy megállapítsa az elvárt genotípus gyakoriságokat a következő generációban. Képes meghatározni, hogy a populáció genetikai egyensúlyban van-e. Segítségével meghatározhatók a hordozók gyakorisága is (autoszómális recesszív, X-kromoszómához kötött recesszív öröklődés).

### A Hardy-Weinberg törvény kiterjesztései

(példákat lásd előadásban)

A Hardy-Weinberg törvény alkalmazható több allélos és X-kromoszómához kötött allélok esetén is. Általában a genotípus gyakoriságok az egyensúlyi állapot alatt az allél gyakoriságok négyzetei. Az allél gyakoriságok négyzetét használhatjuk akkor is, ha olyan lókuszt vizsgálunk, ahol több, mint két allél található. Egy autoszómális lókuszt esetén, ahol három allél van,  $A^1$ ,  $A^2$  és  $A^3$ , hat genotípus létezik:  $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1A^3$ ,  $A^2A^2$ ,  $A^2A^3$ , és  $A^3A^3$ . A Hardy-Weinberg törvény alapján, az egyensúlyi állapotban a genotípus frekvenciák az allélok gyakoriságától függenek. Ha az  $A^1$ ,  $A^2$  és  $A^3$  allélok gyakorisága  $p$ ,  $q$  és  $r$ , akkor az egyensúlyi genotípus gyakoriságok az allél gyakoriságok négyzetével egyezik meg:

$$p^2 = f(A^1A^1)$$

$$2pq = f(A^1A^2)$$

$$q^2 = f(A^2A^2)$$

$$2pr = f(A^1A^3)$$

$$2qr = f(A^2A^3)$$

$$r^2 = f(A^3A^3)$$

Egy két allélos  $X^A$  és  $X^a$ , X-kromoszómához kötött lókusznál esetén öt genotípus lehetséges:  $X^AX^A$ ,  $X^AX^a$ ,  $X^aX^a$ ,  $X^AY$ , és  $X^aY$ . Mivel X-kromoszómához kötött génről van szó, így a nők két alléllal rendelkeznek, így a genotípus gyakoriságuk az allél gyakoriságok négyzete. Az  $X^A$  és  $X^a$  allélok gyakorisága  $p$  és  $q$ . Az egyensúlyi genotípus gyakoriságok nőknél  $(p+q)^2 = p^2$ . Mivel a férfiaknak csak egy X kromoszómájuk, így csak egy alléljuk van, a genotípus gyakoriságuk megegyezik az allél gyakorisággal:  $X^AY=p$  és  $X^aY=q$ . Egy kromoszómához kötött recesszív allél gyakorisága férfiaknál  $q$ , míg nőknél  $q^2$ . Ha egy X kromoszómához kötött allél ritka, akkor a jelleg sokkal gyakoribb lesz férfiaknál, mint nőknél.

### Nem véletlenszerű párválasztás

A Hardy-Weinberg törvény egyik feltétele a véletlenszerű párválasztás. Ha ez nem teljesül, akkor megváltoznak a genotípus gyakoriságok. A nem random párválasztásnak két típusa van:

1. Pozitív asszortatív párválasztás: karakter preferencia pl. magas emberek magas embereket preferálnak, az alacsonyak pedig alacsonyakat.
2. Negatív asszortatív párválasztás: eltérő karakterek választása pl. magas ember alacsonyat választ.

### Nem véletlenszerű párválasztás egy típusa – beltenyésztés

1. rokonok közötti kapcsolat
2. minden gént érint
3. eltérést okoz a Hardy-Weinberg eloszlástól
4. növeli a homozigóták arányát és csökkenti a heterozigóták arányát a populációban
5. a beltenyésztési koefficiens határozza meg ( $F=0$ -tól  $1$ -ig változik)

Ha beltenyésztés alakul ki, akkor a genotípusok gyakorisága változik:

$$f(AA) = p^2 + Fpq$$

$$f(Aa) = 2pq - 2Fpq$$

$$f(aa) = q^2 + Fpq$$

### Természetes szelekció

Természetes szelekció akkor lép fel, ha a populáció több utódot hoz létre, mint amit a környezet fenn tud tartani. Ezért versengeniük kell a túlélésért. Ha az adaptív jellegeknek van genetikai alapja, akkor az az utódokban tovább öröklődik és a genotípus nagyobb gyakorisággal jelenik meg a következő generációban. Ha egy jelleg reprodukciós előnyt hordoz, akkor folyamatosan erősödik a populációban, hiszen a populáció jobban tud általa alkalmazkodni a környezethez. A természetes szelekció serkenti az adaptációt. Csak a legjobb adaptációs képességű egyedek élnek túl és képesek szaporodni.

A környezeti faktorok szelekciós tényezőkként hatnak (biotikus és abiotikus tényezők). A természetes szelekció hatása a populáció gén állományára a genotípusok **fitnesz/rátermettség (W) értékétől** függ. A fitnesz a genotípus relatív reprodukciós sikerét mutatja.

- Egy fundamentális elképzelés az evolúciós teóriában a „fitnesz”: a túlélés és a szaporodás képessége.
- A szaporodás a kulcs: evolúciós rátermettséghez az organizmusnak tovább kell adnia a géneit a jövő generációknak.

- Alap feltételezés: a rátermettebb egyedek nagyobb mértékben járulnak hozzá a következő generációhoz, mint a kevésbé rátermettek.
- A rátermettebb egyedekben található gének végül uralkodóvá válnak a populációban.

A genotípusok eltérő fitnessze idővel a genotípus frekvenciák megváltozásához vezet, ami pedig a genotípust meghatározó allélok gyakoriságának megváltozását okozza. A **szelekciós koefficiens (s)** a genotípus ellen ható relatív szelekciós nyomást mutatja, amit a fitnessből számolhatunk ki:  $s=1 - W$ .

A szelekció típusai:

1. Szelekció a recesszív alléllal szemben: a heterozigóták továbbra is hordozzák a recesszív allélt, így a szelekció igen hosszú folyamat ebben az esetben.
2. Szelekció a domináns alléllal szemben: a következő generáció már nem mutatja a domináns fenotípust.
3. Szelekció a részleges dominanciát okozó alléllal szemben
4. Overdominancia (heterozigózis)
5. Underdominancia

A szelekció két típusa (4-5-ös) speciális esetek, melyek egyensúlyi állapothoz vezetnek, ahol már nincs további allél gyakoriság változás. Overdominancia esetén mindkét allél előnyös a heterozigótákban, így egyik allél sem szelektálódik ki a populációból. Underdominancia esetén a heterozigótáknak alacsonyabb a fitnessze, mint a homozigótáknak, így az underdominancia bizonytalan egyensúlyt okoz.

**Összefoglalás:** A természetes szelekció megváltoztatja az allél gyakoriságokat. A változás iránya és mértéke a szelekció erősségétől, az allélok dominancia viszonyától és az allél gyakoriságoktól függ. Az irányító szelekció egy allélt támogat a többivel szemben, és ezáltal a preferált allél populáción belüli fixációjához vezet. Az overdominancia stabil egyensúlyt hoz létre, mivel mindkét allélt megtartja populációban. Az underdominancia instabil egyensúlyi helyzetet teremt, mert a heterozigótáknak alacsonyabb a fitnessze, mint a homozigótáknak.

## Mutáció

Minden genetikai variáció mutációk útján alakul ki. A mutáció az új allélok forrása a populációban. Általában egy már meglévő allélt alakít át egy másikká. Lehet előnyös, hátrányos vagy semleges a környezettől függően. A hátrányos mutáció során létrejövő allélok szelekciós hatás alá kerülnek, és csak akkor maradnak a génállományban, ha recesszívek („rejtve” a heterozigótákban). A mutációk befolyásolják az allélok gyakoriságát. Befolyásolhatják egy genetikai variáció elterjedésének sebességét egy másik variáció ellenében. Amikor a populációra csak egyetlen evolúciós erő, a mutáció hat, akkor az allél gyakoriságok idővel megváltoznak, mivel az allélok átalakulnak. Végül ezek az allél gyakoriságok elérik az egyensúlyi állapotot, és arányuk csak az előremutató és visszafele ható mutációk függvénye. A mutációs ráta minden génnél alacsony és lassú folyamat. Így az egy generációban kialakuló allélikus változások nagyon ritkák és hosszú idő szükséges ahhoz, hogy a mutáció révén a populáció elérje az egyensúlyi állapotot. Ezáltal a mutációs ráták hatása a Hardy-Weinberg egyensúlyra elhanyagolható.

## Migráció

A migráció az egyedek vándorlása egyik populációból a másikba. Két típusa ismert:

1. Bevándorlás: az egyedek a populációba vándorolnak
2. Kivándorlás: az egyedek elhagyják a populációt

A **genetikai migráció** a gének vándorlását jelenti, nem pedig az egyedek vándorlását, és **génáramlásnak** nevezzük. A génáramlás megváltoztathatja az allélok gyakoriságát a populációban, azáltal,



hogy új allélt hoz a populációba. A változás mértéke a génáramlás során a migráció kiterjedésétől és a befogadó illetve forrás populációk közötti allél gyakoriságok eltérésének mértékétől függ.

A migrációs teljes hatása kettős:

1. Gátolja a genetikai divergenciát a populációk között.
2. Növeli a genetikai variabilitást a populáción belül.

Ha a populációk nagyok, akkor a migrációnak nincs vagy csak nagyon kicsi hatása van az allél gyakoriságokra. Ha a populációk kicsik, akkor a génáramlás nagy hatással lehet az allél frekvenciákra. A migráció megnöveli a populációk méretét, és gátolja az allélok fixálódását.

### Genetikai sodródás (drift)

A genetikai sodródás a génfrekvenciákat változtatja meg véletlenszerű események során generációról-generációra. Amikor a populáció létszáma nagy, a párválasztás véletlenszerű és környezet állandó, akkor az allél gyakoriságok állandók maradnak minden generációban. Így effektív populáció méret esetén a felnőttek száma (a szaporodóképes nőstények és hímek) és azok gamétái járulnak hozzá a következő generációhoz.

Az elvárt aránytól való eltérés egyik oka limitált minta méret, amit **mintavételi hibának** (statisztikai eltérést okoz) hívunk. A mintavételi hiba kialakul, amikor a gaméták egyesülnek az utód létrehozásához. Ha a populáció létszáma kicsi, akkor csökkent számú gaméta hozza létre az utódgeneráció egyedeit. A szerencsén múlik, hogy melyik gaméták vannak jelen ebben a populációban, és melyek vesznek részt az utódok létrehozásában, így a mintavételi hiba okozhat allél gyakoriság változást, amit genetikai sodródásnak nevezünk. Ha a populáció mérete csökken, az allél gyakoriságok nőhetnek, csökkenhetnek, vagy allélok teljesen elveszhetnek. Amikor egy allélból csak néhány kópia van jelen, a genetikai sodródás hatása nagyobb, ha nagyobb kópiaszámban van jelen, akkor a hatás kisebb. A genetikai sodródást befolyásolja a nemek aránya is: a génállományban a gaméták fele a hímeiktől, míg a másik fele a nőstényektől származik. További faktorok, amelyek befolyásolják az effektív populáció méretet: az egyedek közötti reprodukciós sikerességbeli eltérések, fluktuáció az egyed-számban, a populáció kor felépítése, és a párválasztás véletlenszerűsége.

1. Alapító hatás (lásd előadás ábra)
  - Amikor egy kis egyed csoport (alapító populáció) új kolóniát hoz létre egy földrajzilag elszigetelt területen.
  - Amikor a populáció egy kis csoportja kiválik a populációból és újat hoz létre.
  - A populációban csökkent a genetikai variabilitás.
  - Ez allél fixációhoz és/vagy speciációhoz vezethet.
  - Példa: Amish migráció Pennsilvániába: Ellis-van Creveld szindróma.
2. Palacknyak hatás (lásd előadás ábra)
  - Drasztikus létszámcsökkenés következik be a populációban (vulkánkitörés, földrengés stb).
  - Az allélok száma csökken, és az allélgyakoriságok megváltoznak.
  - Csökken a genetikai variabilitás.
  - Kisebb populáció nem képes alkalmazkodni a nagyobb szelekciós nyomáshoz.

## 23.10. FEJLŐDÉSGENETIKA

Megjegyzés: a növények többsejtűsége az állatok országától különálló módon fejlődött ki – ebben a részben az állatok fejlődési mechanizmusairól olvashattok.



A rész megértéséhez elengedhetetlen az előadásdiák ismerete.

## Történelem

A fejlődésbiológia az embriológia tudományterületéből fejlődött ki. 1894 körül Wilhelm Roux létrehozta a kísérletes embriológiát (lásd előadásdiák). Úgy vélte, nagy párhuzamok vannak az ontogenezis (egyedfejlődés) és az evolúció között. Azt gondolta, hogy a tudomány idővel fel fogja tudni deríteni ezeket. Azt mondta, hogy az evolúció alapja az organizmus fejlődésének öröklődő változása, a morfológiai struktúrák végleges formája növekedéssel alakul ki, így a morfológiai evolúció a fejlődés evolúciójával érhető meg. Ez irányú nézetei nagyon hasonlóak Darwin elméletéhez, aki az evolúciót "descent with modification"-ként (leszármazás módosulásokkal) definiálta.

## "Unity of type"

Már nagyon korán felfedezték, hogy élőlények bizonyos strukturái nagyon hasonlóka, Étienne Geoffroy Saint-Hilaire azt mondta erre: "Isten az állatokat egy alap testterv alapján teremtette, az adaptációk másodlagosak" - a morfológiai evolúció írja le ezeket a másodlagos adaptációkat. A "unity of type" elmélet a homológiákat írja le és azt tartja, hogy az alap testtervet néhány szabályozó elem módosítja az adott organizmusban. Példa: 5 ágú sugaras (pentadactyl) végtag: emberi ujjak, foka uszony, madár szárny (lásd előadásdiák).

Carl Ernst von Baer (1791-1876) munkája során embriókat hasonlított össze és vizsgálatai során azt találta, hogy egy nagyon hasonló fejlődési állapot/nagyon hasonló fejlődési állapotok alakulnak ki az egymással rokonságban lévő (azonos törzshe tartozó) állatok között. Az embrionális fejlődés ezen korai stádiumában (a gasztrulációt és neurulációt követően) a halak, kétéltűek, hüllők, madarak és emlősök embriói átmennek egy nagyon hasonló fejlődési állapoton, majd az idő előrehaladtával a fejlődési útvonalak elválnak egymástól és az embriók egyre jobban felismerhetővé és besorolhatóvá válnak (rend, család, faj). Megfigyelései alapján törvényeket alkotott, melyeknek máig nagy hatásuk van a tudományterületre.

## Von Baer törvényei

1. „... egy nagyobb csoport általános bélyegei korábban jelennek meg az embrió fejlődése során, mint az egyedi tulajdonságok.” Mik ezek a közös, általános bélyegek az emlősöknél és az embernél? A velőcső a háti oldalon, gerinchúr, előbél kopoltyúnyílásokkal, szemhólyagok, záródott idegrendszer (ami a kezdeti szakaszon kiszélesedik, ahol az agy fog fejlődni). Ezek a sajátságok korábban alakulnak ki, mint azok, amik megkülönböztetik a csoport tagjait, például a végtagok, tollazat, ...
2. „A kevésbé általános jellegek az általánosabbakból fejlődnek ki, mindaddig, amíg a legspeciálisabbak is megjelennek.
3. Egy adott faj embriója ahelyett, hogy az „alacsonyabbrendű” fajok felnőtt állapotain mennének át, egyre inkább eltérnek tőle.
4. A „magasabbrendű” állat embriója sohasem hasonlít egy „alacsonyabbrendű” felnőtt állatra, hanem csak annak embriójára”

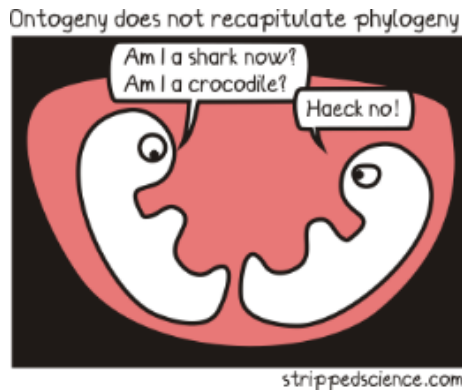
## Összefoglalva

„Az általánosabb sajátságok, amelyek közösek egy állatcsoport minden tagjánál korábban fejlődtek ki, mint azok a speciálisabb sajátságok, amelyek a csoport különböző tagjait megkülönböztetik.”

Klaus Sander sokat vizsgálta ezt a fejlődési állapotot, mely során a különböző gerinces osztályok nagyon hasonló morfológiával rendelkeznek, ezt a stádiumot filotipikus stádiumnak nevezte el 1983-ban. A melegező fejlődési szakaszok igen nagy különbséget mutatnak még közeli rokonok esetén is, azon-

ban a fejlődés mindig beletorkollik ebbe az állapotba, így viszont von Baer törvényei csak akkor igazak, ha a kiindulási pont a filotipikus stádium.

### Haeckel biogenetikai törvénye



„az ontogenezis a filogenezis rekapitulációja” (tömören)

Ez nem azt jelenti, hogy az egyedfejlődés (ontogenezis) megismétli az egyed elődeinek fenotípusát, sokkal inkább azok fejlődési történetét, de módosításokkal és lerövidülve (lásd von Baer törvényei). A törvény ír egy „terminális addíció” nevű jelenségről is, ami a fejlődésbiológiában azt jelenti, hogy egy törzs evolúciója során új szakaszok adódtak hozzá a régi fejlődési útvonalhoz, így változtatva meg a fenotípust. A terminális addíció nyomon követhető a fejlődés során, hiszen először a régi jelek jelennek meg, majdezek módosulnak tovább, például a laposhalak farokúszói: a fejlődés során először dificerk farokúszó jelenik meg, ami a tődőshalakra jellemző, majd heterocerk, ami a tokfélékre és ezt követően alakul ki a kifejlett laposhalakra jellemző homocerk farok (lásd előadás dia).

### Testterv

A génjeink többsége (több ezer) hozza létre az általános testtervet, ezek teszik az organizmus élővé. Ezek a gének sejtszintű mechanizmusok kódolásáért felelősek, nem sok változatosságot mutatnak a különböző törzsek között. Ezek a gének nem tűrik jóla mutációt, a bennük létrejött változások ritkán eredményeznek élettel összeegyeztethető állapotot.

Minden nagyobb állatcsoportban (monofiletikus taxonban) felfedezhető egy általános testterv, ami meghatározza a testrészek és szervek elrendeződését a környezettől függetlenül.

### Toolkit gének

A fentiekkel ellentétben ismerünk néhány tucat olyan gént (számuk 100 alá tehető), amik a fejlődést befolyásolják, ezek mutációja fenotípusos változásokat idéz elő, új formákat és funkciókat alakíthat ki. Ezek a gének specifikusan a fejlődést befolyásolják, főként adott részek növekedési rátájának meghatározásával, vagy növekedési ütemének befolyásolásával.

Csupán néhány gén az, ami hatással van a testtervet kódoló génekre, ezek alakítják ki a fejlődési mintázatot. Ezeket a géneket nevezzük toolkit géneknek.

A toolkit gének felfedezése után újraértelmezték az evolúciót: ugyanabból az anyagból néhány gén hatására igen eltérő morfológiájú élőlény alakulhat ki. Ezzel a tudással a morfológiai evolúció és az átmenetek sokkal könnyebben magyarázhatóak, mivel sokkal kisebb változás elegendő igen nagy változások előidézéséhez a fenotípusban. Ezek a toolkit gének adják a morfológiai evolúció alapját.

A toolkit gének univerzálisak és konzerváltak, a többsejtű állatok között mindenhol megtalálhatóak és tagjai sokszor ugyanazzal, vagy nagyon hasonló szereppel rendelkeznek minden élőlényben, például a *pax5/eyeless* gén a szem kifejeződését indukálja a *Drosophilában* és egy egérben is.

Ezek a gének határozzák meg és irányítják az általános testterv expresszióját. Például a kígyók genomja kódolja a végtagnövesztéshez szükséges géneket (Distal-less genes), azonban ezek kifejeződése gátolt, vagy igen alacsony szintű. Csak a mellkast kódoló gének fejeződnek ki a test teljes hosszán, így egy "csupamellkas" élőlény jön létre a toolkit gének működése által.

### Nemkódoló szakaszok

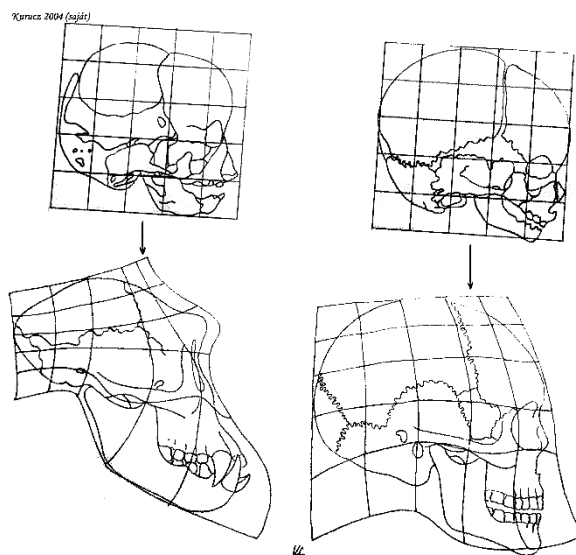
Ha összehasonlítunk genomokat, feltűnik, hogy azok fehérjekódoló régióiban nagyon kis különbségek adódnak csak, még távoli rokonok esetén is, azonban ha a nemkódoló, génekhez kapcsolódó szabályozó szakaszokat nézzük, igen nagy különbségek vehetők észre. Mivel ezek a szakaszok a mutációt jobban tolerálják, mint a kódoló szakaszok, több változás alakul ki és öröklődik ezeken a szakaszokon.

Ezek a szabályozó szakaszok (például enhancerek, silencerek) igen nagy hatással vannak a fejlődés szabályozására és a génexpressziós mintázat kialakítására, ami a végső morfológiát kialakítja. Ezen szakaszok változása gyökeresen eltérő morfológiájú állatokat tudnak létrehozni ugyanabból a génkészletből.

### Allometrikus növekedés

Ha egyes részek növekedési rátája megváltozik: felgyorsul, vagy lelassul, megváltozik a morfológia, ebben az esetben beszélünk allometrikus növekedésről.

A képen egy ember és egy emberszabású majom koponyájának fejlődése látszik. A strukturák, a testterv közel azonos, azonban a kifejlett fenotípus már nagy változásokat mutat. Az allometrikus növekedés drasztikus változásokat hozhat létre a testrészekben.



Hangyakolonériákban allometrikus növekedéssel jönnek létre a dolgozók, katonák és a királynő, amit külső tényezők alakítanak ki. Allometrikus növekedés során jönnek létre a rovarok speciális szájszervei is.

A toolkit génekkel és szabályozóelemekkel az evolúció egy alap testtervet változtat és a változásokhoz az evolúciónak csupán néhány gén, vagy rövid szakasz megváltoztatására van szüksége. Ez egy igen gazdaságos módja új részek, vagy akár teljesen új funkciók létrehozására meglévő strukturákból. Az evolúció barkácsol, variál meglévő részeket, a toolkit gének pedig ehhez nyújtják az eszköztárat.

Néhány példa:

Az emlősök középfül csontjai olyan csontokból fejlődtek, melyeknek korábban az állkapocs csúcsánál töltöttek be szerepet.

Az óriáspandának 6 uja van, a 6. uja egy járulékos (sesomoid) csontból alakult ki.

Hogyan képes néhány gén ekkora hatással lenni a teljes test szerveződésére? Hogyan képes néhány gén szabályozni a fejlődést, a testrészek számát, vagy a testrészek kifejeződését?

A toolkit gének szignál transzdukciós útvonalakat indukálhatnak, legtöbbjük azonban transzkripciósfaktor, vagy sejtadhéziós fehérje, sejt felszíni receptort kódol, vagy szekretált morfogént, ami mintázatot kialakítva létrehoz a pozicionális információt. A toolkit gének úgynevezett **mestergének**, ami azt jelenti, hogy kifejeződésük többszáz másik gén kifejeződését indukálja, beindítva ezzel teljes fejlődési útvonalakat, teljes testrészek kifejeződését (pl. még a láb visszanyerését is szalamandrákban).

### Hox gének

A Hox gének a toolkit gének közé tartoznak.

Más neveik: homeotikus gének, homeobox gének. Nevüket egy jellemző szakasról kapták: szerkezetükben található mindig egy 180 bp hosszú, 60 aminosavat kódoló, úgynevezett homeobox régió. Ez a konzervált régió a kötődésben játszik szerepet, tartalmaz egy hélix-turn-hélix részletet.

Hox géneket minden többsejtű élőlényben találunk, nagyon konzervált szakaszok.

Érdekességképpen: a hox gének elrendeződése a kromoszómákon párhuzamos a testen történő kifejeződéssel (anterio-poszterior irányban, a faroktól a fejig), ezt a jelenséget kolinearitásnak nevezzük.

4 csoportját különböztetjük meg az állkapcsosoknál, ezeket nagy betűkkel jelöljük: hoxA, hoxB, hoxC, and hoxD.

### Pozicionális információ

A sejtek saját pozíciójukat morfogénekkal és sejt kapcsolatokkal határozzák meg. Ezek tájékoztatják a sejtet arról, merre találhatóak, ez a pozicionális információ.

A morfogének olyan anyagok, szignál molekulák, amik a szervezet számára pozicionális információt nyújtanak jelenlétükkel és koncentrációjukkal, így adva információt a sejteknek, hogy melyik fejlődési útvonalat válasszák. Egyetlen morfogén képes kijelölni a dorzo-ventrális, vagy az anterio-poszterior irányt is, például a test hosszanti irányát, vagy a lábak hosszát. (Ezek a molekulák a génexpresszióra vannak hatással.)

### Fejlődés – sejtsintű mechanizmusok

A fejlődés egyetlen megtermékenyített sejtől kezdődik. Először a sejtciklus aktiválódik, majd a létrejött sejtek specializálódnak.

A szervezet minden sejtje ugyanazt a genetikai anyagot tartalmazza, azonban a sejtek megosztják a különböző funkciókat, amit génexpressziós eltérésekkel valósít meg, minden sejt teljesen egyedi és karakterisztikus génexpresszióval rendelkezik. A génexpressziós mintázatot sejt-kapcsolatok és különböző környezeti faktorok befolyásolják (pl. morfogének).

A fejlődésbiológia célja, hogy megértse, hogyan alakul ki az élőlény egyetlen sejtéből. Az embrióban 4 folyamat elengedhetetlen a fejlődés során: sejtosztódás, sejt specializáció, sejtek közötti interakció és sejtmozgás. A sejtek rendelkeznek egyfajta "memóriával" saját osztódásaikat és pozicionális információjukat illetően, majd elköteleződésükkor kialakult génexpressziós mintázatukat is. A fejlődés során kialakult változások így átöröklődnek az utódsejtekre.

A fejlődés során a sejtek először elköteleződnek egy sejtárs felé (specified cells), ezt követően válnak determinálttá. Az elkötelezett sejtek revertálhatnak, más fejlődési útvonalat választhatnak, azonban a determinált sejtek már képtelenek májsejttípussá válni. Ez azt jelenti, hogy a fejlődés során a sejtek veszítenek potenciáljukból és limitáltan specifikus funkciók ellátására szakosodnak. A folyamat közben a sejtek speciális kémiai és strukturális változásokon esnek át, melynek eredményeképpen sokszor nagyon specializált, osztódni képtelen sejtek jönnek létre.

### Sejt specializáció

Egy sejt 3 módon érheti el a differenciált sejt állapotát. Ezek az autonóm specializáció, a kondicionális specializáció és a szinciciális specializáció.

Autonóm specializáció: kizárólag belső (intrinsic) faktorok befolyásolják a folyamatot, teljesen független a környezettől. Intracelluláris determinánsok indítják el a folyamatot: a szabályozó faktorok (pl. szabályozófehérjék, mRNsek, small regulatory RNsek) egyenlőtlen eloszlása a citoplazmában asszimmetrikus sejtosztódáshoz vezet: az utódsejtek különböző (mennyiségű) szabályozó elemet foglalkoztatni, ez pedig a sejtek különböző útvonalakon történő elköteleződéséhez vezet.

Kondicionális specializáció: külső faktorok határozzák meg a folyamatot, extracelluláris faktorok befolyásolják a sejtek fejlődését. A folyamat során a (blastomer) sejtek fejlődését olyan szignálok befolyásolják, amik pozicionális információt adnak (pl. morfogének), vagy olyan szignálok, melyeket más sejtekkel cserélnek.

Szinciciális specializáció: rovarokban létező specializációs forma a fejlődés során, melyben a korai embrióban egyetlen nagy sejt figyelhető meg sok sejttaggal, amit szinciciális blasztodermának nevezünk. A szinciciális sejt citoplazmája nem egyenletesen eloszolva tartalmazza a szabályozó elemeket, a citoplazmában létrejövő különböző interakciók fogják meghatározni a sejtek sorsát.

### Emberi fejlődés

A megtermékenyítés során a petesejt (ovum) és a spermium fúzionál, egyetlen diploid sejtet, zigótát létrehozva. (Mielőtt a két pronukleusz (a spermium és a petesejt sejtmagja) fúzionál, a DNS megkettőződik, a fúzió csak ezt követően történik meg.)

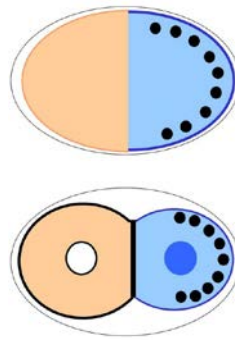
A sejtciklus aktiválódik, a zigóta mitotikus osztódásokon megy keresztül, ami létrehozza egy többsejtű embriót, amiben a sejtek még nem differenciálódtak. Ezek az első osztódások nem járnak az embrió méretének látványos növekedésével, csupán a sejtek száma nő. A folyamat végén 12-16 sejt alakul ki, ezt nevezzük morula stádiumnak.

### Anyai hatás

Az anya nem csak a leszármazott genetikai állományára van kihatással, de átörökíti más citoplazmában jelen lévő anyagot is. Az utód a petesejt mitokondiumait is örökli. Bizonyos citoplazmatikus deter-

minánsok (pl. szabályozó fehérjék, mRNsek, small regulatory RNsek) a citoplazmában nem egyenletesen helyezkednek el, ami asszimétrikus osztódáshoz vezet: a keletkező utódsejtek különböző mértékben részesülnek ezekből. Bár az örökölt genetikai állomány ugyanaz lesz minden sejtben, a különböző szabályozó faktorok miatt más expressziós mintázatot fognak kialakítani a sejtek, így más fejlődési útvonalba kezdenek.

Az asszimétrikus osztódás eredményeképpen kialakulnak a zigóta pólusai. (A spermium kizárólag a kromatinjával és a centriolumaival járul hozzá az utódhoz.)



Morfogének determinálják a differenciációt a korai stádiumokban: ez fogja elindítani az ebrionális és extraembrionális sejtek elválását a 8 sejttes állapot után (epiblaszt-hipoblaszt szegregáció). Az extraembrionális sejtek fogják létrehozni a placentát (méhlepényt).

Az aktivált szabályozó fehérjéket követően tovább osztják a részeket, egyre precízebben. A későbbi fejlődés során aztán a sejt kapcsolatok is igen fontos szerepet kapnak.

A fejlődés a gasztrulációval folytatódik (kialakulnak a csíralemezek: ektoderma, mezoderma és endoderma), majd a neurulációval (szétválik a felszíni ektoderma-neuroektoderma-dúcél), majd elválnak egymástól a szövetek, kialakulnak a szomiták, záródik a velőcső.

Morfogének is fontos szerepet játszanak a további fejlődés során, pl. Hedgehog, Wnt, Notch, TGF $\beta$ , vagy receptor tirozin kinázok. A morfogének lehetnek inhibitorok, vagy indukálók is, a szövetek között diffúzióval terjednek, ami így gradienst alakít ki azokban. (Bővebben lásd előadás diák!)

### Homeotikus mutációk

A hox gének mutációi sokszor szokatlan fenotípust eredményeznek, mely során testrészek nem odailő helyre nőnek. Például a *Drosophila* esetében a csáp (antenna) helyére lábak nőhetnek, vagy összetett szem nőhet a lábára, a törzsre, vagy máshová a rovar testén.

Homeotikus mutációk emberek esetén szokatlan számú végtagot, szokatlan morfológiájú végtagot eredményeznek, illetve ugyanez előfordulhat bordák és csigolyák esetén is. Ha egy testrészt, vagy szervet abnormális helyen jelen jelenik, "ektópikus"-nak nevezzük. Ektópikus szerveket és testrészeket homeotikus mutációk hozhatnak létre. Pl.: a *Drosophila* ektópikus szemeket képes növeszteni azokra a helyekre, ahol a pax6 gén expresszálódik: akár a lábón is.

### Atavizmus

Néha struktúrák megjelenését követően alakul csak ki azok hox gén általi szabályozottsága. Így alakult a szárnyak megjelenése során is az ősi ízeltlábúaknál. A szárnyak megjelenésekor az evolúció során kezdetben minden szelvényem megjelent 1 pár szárny, majd a hox gének

szabályozása miatt csak bizonyos helyeken kezdtek kifejeződni. A szabályozó hox gének mutációi során azonban megjelenhet egy korábbi evolúciós állapot. A korábbi evolúciósállapotról hasonlító fenotípus megjelenését atavizmusnak nevezzük. A hox gének szabályozása nélkül 8 (!) ujjunk lenne.

### Összefoglaló

Génjeink többsége (több ezer) hozza létre az általános testtervet, ez kódolja a sejtszintű mechanizmusokat. A legtöbb gén a különböző törzsek között nem tér el nagyban. Ezek a gének nem tolerálják jól a mutációkat. Ezzel szemben ismerünk néhány olyan gént (100 alatti számút), ami a fejlődésre gyakorol hatást, mutációi a fenotípust változtatják meg, így hozva létre új formákat és funkciókat. Ezek a gének az úgynevezett toolkit gének (pl. hox gének). Ezek a gének biztosítják a fenotípusos evolúciót, az új formák és funkciók gazdaságos létrehozását ugyanabból a kiindulási „anyagból”. Ezek a gének úgynevezett mestergének és expressziójuk több száz másik gén kifejeződésére van hatással.

A fejlődés során (a differenciáció alatt) a sejtek veszítenek potenciáljukból, hogy bármilyen sejtípusá alakulhassanak, annak ellenére, hogy a test minden sejtje ugyanazt a genetikai információt tartalmazza.

A sejtek saját helyzetüket a szervezetben morfogének (kémiai anyagok) és sejtkapcsoló struktúrák segítségével határozzák meg.

Az emberi differenciálódás kezdőpontja az aszimmetrikus sejtosztódás, mely okozója, hogy a petesejt bizonyos citoplazmikus determinánsai (morfogének) egyenlőtlenül oszlanak a citoplazmában, így egy sejtosztódást követően az utódsejtek különböző morfogéneket fognak tartalmazni, ami más irányba indítja el a különböző sejtekben a differenciálódás folyamatát.

## 23.11. GÉNTERÁPIA

### Bevezetés

Számos betegség ismert, melynek oka egy gén mutációjára vezethető vissza. Ezek a monogénes öröklődésű betegségek a Mendeli szabályokat követve öröklődnek. Néhány példa a teljesség igénye nélkül: fenilketonuria, Hurler kór, Duchenne féle izomsorvadás, sarjősejtes anémia, hemofília.

Jellemző ezekre a betegségekre, hogy súlyosak, a beteg életminőségét jelentősen rontják és valódi terápia nem áll rendelkezésünkre.

A génterápia ezeket a betegségeket kívánja gyógyítani a hibás DNS szakasz javításával. Ez több módon is elérhető:

- a hibás allél javítása
- a hibás allél kiütése, „törlése”
- vad típusú allél bevitele

A génterápia megkezdése előtt mindig ellenőrizni kell, hogy a beteg valóban a feltételezett gén mutációját hordozza.



## Módszerek

DNS-t bejuttatni egy-egy izolált sejtbe nem nagy technikai kihívás. Amikor azonban egy teljes szervezet összes (vagy legalábbis számos) sejtének genetikai állományát szeretnénk módosítani, rengeteg komplex technikai problémával szembesülünk. A két fő módszertani irányzat:

- Indirekt terápia: A szervezetből eltávolított sejtek DNS állományát *in vitro* módosítják, majd ezeket a sejtek juttatják vissza a szervezetbe.
- Direkt terápia: A módosított szekvenciát tartalmazó vektort közvetlenül a szervezetbe juttatják.

## A génterápia vektorai

Vektoroknak hívjuk azon ágenseket, amik segítenek a megfelelő DNS szakaszt bejuttatni a sejtekbe. A génterápia vektorait két fő csoportra oszthatjuk: virális és nem virális vektorok.

Nem virális vektorok:

- „csupasz” DNS
- lipoplexek: a DNS-t egy lipofil membránba csomagolva megnövelhető a transzdukció hatékonysága
- nanopartikulumokhoz kapcsolt DNS: az apró „gyöngyhöz” kötött molekula fizikai eszközzel juttatható be a sejtbe (pl.: gene gun)

A nem virális vektorok legnagyobb hátránya, hogy a transzdukció hatékonysága nagyon alacsony, még a lipoplexek esetében is. Ezért ezek a vektorok csak indirekt terápia esetén jöhetnek szóba. Előny az egyszerűbb technikai kivitelezhetőség és az immunválasz hiánya.

## Virális vektorok

A vírusok szaporodásához az örökítő anyagukat be kell juttatniuk a megfertőzött sejt sejtmagjába. Az erős szelekciós nyomás alatt a vírusok ezen apparátusa a végletekig kifinomult: a transzdukció nagy hatékonyságú, a szervezet számos sejtjét képesek megfertőzni. Kézenfekvő volt az ötlet, hogy e tulajdonságaik miatt a vírusokat a génterápia vektoraiként lehetne alkalmazni. (a vírusokról bővebben a Vírusok fejezetben)

Az alábbiakban találhatóak a génterápia céljára felhasznált legfontosabb csoportok:

**Retrovírusok:** RNS vírusok, melyek kódolják az reverz transzkriptáz nevű enzimet, ami a vírus RNS alapú genetikai állományát a gazdasejtben átírja DNS-sé. Akár 8-10 kilobázis hosszúságú szakasz is integrálható ilyen módon a gazdasejt genomjába. A retrovírusok legnagyobb hátránya, hogy csak osztódó sejteket képesek fertőzni illetve, hogy a genomba történő inszerció kvázi véletlenszerű (lásd: inszerció mutagenezis, inszerció inaktiváció)

**Lentivírusok:** A Retroviridae család egyik nemzetsége. Legfőbb előnye a többi retrovirális vektorhoz képest, hogy a lentivírusok képesek nem osztódó sejteket is megfertőzni.

**Adenovírusok:** Leginkább gasztrointesztinális és légúti fertőzésekről ismert kettős szálú DNS-t hordozó vírusok. Ez a DNS nem integrálódik a megfertőzött sejt genomjába, a sejtek osztódásakor „elvész”. Ez azonban azt is jelenti, hogy a véletlenszerű inszerció káros hatásaival nem kell számolnunk. Legnagyobb hátrányuk, hogy mivel patogén vírusok, az immunválasz nem csak a transzdukció hatékonyságát csökkenti, de az immunrendszer túlzott válaszreakciója, az anafilaktikus sokk a beteg életét is veszélyeztetheti (lásd: Jesse Gelsinger).



Adeno asszociált vírusok: Az adenovírusok egy alcsoportja. Kisméretű, kettős szálú DNS vírusok, melyek nem kórokozók ezért erős immunválaszt sem váltanak ki. Képesek osztódó sejteket is megfertőzni, azonban csak kis méretű DNS szakaszokat képesek hordozni (4,8kb).

### A génterápia veszélyei

Mint minden beavatkozás a génterápia esetén is valós veszélyekkel kell számolnunk:

- inszerciós mutagenézis: a beépülő DNS szakasz egy sejtciklust szabályzó gént inaktivál, aminek malignus neoplázia lehet a következménye.
- egy esszenciális gén inszerciós inaktivációja
- a virális vektor által kiváltott immunválasz. Jellemző az adenovírus vektorokra.

A megfelelő vektor és módszer kiválasztásával törekedni kell ezen veszélyek minimalizálására.

### Génterápia a gyakorlatban

Sok monogénes betegség esetén elindultak a kutatások a génterápia kifejlesztésére, számos terápia el is jutott a klinikai II. fázisig (ezekről részletesebben az előadáson), azonban jelenleg egyetlen kezelés elérhető a „rutin” gyógyászatban.

Az első, az Európai Unióban engedélyezett génterápia a Glybera márkanév alatt forgalmazott alipogene tiparvovec, ami a lipoprotein lipáz (LPLD) hiányt gyógyítja. Egy, az enzimben található mutáció okozza az aktivitás hiányát. Az LPLD tünetei chylomicronémia és a krónikus hasnyálmirigy gyulladás. A lipoprotein lipáz vad allélját adeno asszociált vírus hordozza, amit a combizmokba injektálnak. Az alipogene tiparvovec hátrányai a kezelés előtt szükséges immunszuppresszió és a nagyon magas ár.



# FÜGGELÉK (MÓDSZEREK)

## NUKLEINSAVAK

### Izolálás

DNS és RNS szinte valamennyi élő szövetből, sejtől, sőt akár holt szövetből is kinyerhető. A nukleinsav izoláció történhet fizikai-kémiai módszerekkel, különféle technikák alkalmazásával. DNS és RNS hasonló technikákkal izolálható, különbség csak az oldatok összetételében van. Nukleinsav-izolációs technikák leírása:

#### 1. Fenol–kloroform extrakció

A vízben oldott mintát fenol:kloroform eleggyel keverjük, majd centrifugáljuk. Két fázis különül el, a vizes fázis található felül, míg a fehérjék az alsó, szerves fázisban foglalnak helyet. A nukleinsavak (egyéb szennyeződésekkel együtt, mint a sók, cukrok, stb.) a felső fázisban találhatók, ezt pipetta segítségével, a szerves fázis elkerülésével távolítjuk el. A DNS további tisztítása a fenti lépések megismétlésével történik.

Ha a centrifugálás előtt a minta-reagens elegy savas kémhatású, a DNS kicsapódik, és az alsó fázisban található, míg az RNS a vizes fázisban marad (a DNS könnyebben semlegesíthető az RNS-nél).

#### 2. Szilárd fázisú extrakció (Boom módszer)

A nukleinsavak bizonyos körülmények között kötődnek a szilikát szilárd fázishoz (ún. kaotróp szerek jelenlétében, mint pl. a guanídium tiocianát, valamint lúgos pH). Ezen alapul a Boom-módszer. Az izoláció lépései a következők:

- **Minta lízis/homogenizálás:** Lízis puffer (detergenst és degradáló enzimeket tartalmaz), fizikai homogenizálás (darálás, zúzás stb.)
- **Nukleinsav megkötése:** Kaotróp anyagot tartalmazó puffert és szilikagyöngyöket keverünk a minta homogenizátumhoz. A nukleinsavak ilyen körülmények között hozzákötődnek a gyöngyökhöz.
- **Mosás:** A gyöngyöket többször mossuk, a szennyeződések eltávolítása érdekében: centrifugálással összegyűjtjük a gyöngyöket, a felülúszót kiöntjük, mosópufferrel összekeverjük. Először a kaotróp szert tartalmazó mosópuffert használunk, majd ezt követően ugyanezeket a lépéseket alkohol-tartalmú mosóoldattal többször megismételjük.
- **Elúció:** a nukleinsavakat elúciós puffer segítségével leválasztjuk a gyöngyökről. Az elúciós puffer csökkenti a kaotróp koncentrációját, ebben tároljuk a tiszta nukleinsav-oldatot.

#### 3. Oszlopos nukleinsav tisztítás

Gyors szilárdfázisú extrakciós módszer, alapja a szilikagyöngyös módszer. Az oszlopban található membrán szilárd fázisként szolgál az extrakció során. A többi komponens a Boom módszerben leírtakhoz hasonló. Az extrakció lépései:

- **Lízis** – Sejtek feltárása a célpont (nukleinsavak) elérése érdekében. → szövet fizikai roncsolása, vagy lízis puffer a sejtmembrán feltárására.
- **Nukleinsav megkötése** a szilikamembránra – A mintához etanol/izopropanol tartalmú „binding” puffert adunk, majd az elegyet az oszlopra visszük és lecentrifugáljuk. → A centrifugális erő hatására a puffer áthalad a membránon. Ha a puffer pH-ja és sókoncentrációja optimális, a nukleinsavak hozzákötődnek a membránhoz.

- **Mosás** – Az átfolyó eltávolítása után az oszlopra mosópuffert pipetázunk. Az oszlopot lecentrifugáljuk, a puffer a szennyeződésekkel átmossa a membránon, csak a nukleinsavak maradnak a membránhoz kötve.
- **Elúció** – A mosópuffert eltávolítjuk, majd elúciós puffert viszünk a membránra (ez lehet egyszerűen desztillát víz). A puffer felszakítja a kötéseket a membrán és a nukleinsavak között, és centrifugálásakor a tiszta nukleinsav-oldat áthalad a membránon. Az így kitisztított nukleinsav-oldatot tiszta Eppendorf csőbe gyűjtjük össze.

## Detektálás

### Southern blot

A **Southern Blot** olyan molekuláris biológiai technika, amelyet specifikus DNS szakaszok kimutatására alkalmaznak, és a komplementer egyszálú DNS szakaszok hibridizációs képességén alapszik. A módszer nevét felfedezőjéről, Edwin Southernről kapta. A technika leírása:

1. A DNS-t specifikus restrikciós enzimekkel hasítják, hogy a fragmensek képesek legyenek belépni a gélbe.
2. A fragmenseket gélelektroforézissel elválasztják (agaróz vagy akrilamid).
3. Lúgos denaturáció után az egyszálú fragmensek alkalmasak a hibridizációra.
4. Egyszálú DNS fragmensek átvitele membránra.
5. A membránon a fragmensek hibridizációja jelölt próbákkal (általában radioaktív izotópjelölést alkalmaznak). A jelölt próbák összekapcsolódnak a komplementer szálakkal, amelyek a gélen (és a membránon) egy specifikus pozícióban találhatóak.
6. A jelölt sáv (band) detektálása röntgen vagy fluoreszcencia alapján.

A módszer alkalmas inszerciós vagy deléciós mutációk meghatározására egy bizonyos lókuszon belül, a lókuszban található szakasz hosszának vizsgálata alapján.

### Northern blot

A módszer hasonló a Southern blot-hoz, azzal a különbséggel, hogy a cél szekvencia ebben az esetben RNS, míg a próba lehet egyes szálú DNS vagy RNS darab.

A Northern blot lépései a következők:

1. RNS izolálása sejtkultúrából, (állati vagy emberi) szövetekből, bakteriális vagy élesztő kultúrákból, vagy más forrásból.
2. Az RNS-eket méretük alapján elválasztjuk denaturáló (agaróz vagy akrilamid) gélen – a denaturálással az RNS magasabb rendű szerkezetét megszüntetjük.
3. Az elválasztott RNS transzkriptumokat pozitívan töltött membránra visszük át.
4. Az RNS-hez jelölt (fluoreszcensen, enzimatikusan) próba hibridizálódik.
5. A hibridizáció detektálása – a cél RNS jelenléte, mérete és a relatív mennyisége válik láthatóvá.

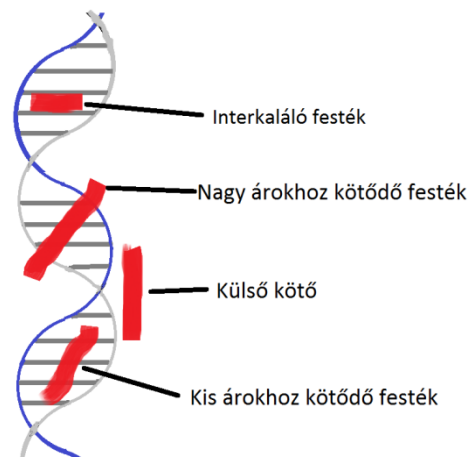
### Nem specifikus nukleinsavjelölők

A nukleinsavakat UV fény alatt 260 nm-en tudjuk detektálni, de ezek mellett nem-specifikus markereket is használhatunk, ami így a teljes DNS, vagy nukleinsav mennyiségét jelöli.

Mivel a nukleinsavak savas karakterűek, bázikus festékekkel festhetőek. (Ezt úgy nevezzük, hogy a nukleinsavak bazofilek.)

Nukleinsav festékek 3 legfontosabb osztálya:

1. Interkaláló festékek: a DNS szálak közé épülnek be, pl.: propidium-jodid (PI), etidiom-bromid (EtBr), vagy daunomicin. Ezek a festékek használhatóak például gélekben is.
2. Kis árokhoz kötődő festékek: DAPI és Hoechst, lásd a képen
3. Egyéb nukleinsav festékek: például akridin narancs (AO). (Az akridin narancs képes különbséget tenni az egyes- és duplaszálú DNS között: a duplaszálú DNShez kötődve zöld, míg az egyes szálúhoz kapcsolódva vörös fluoreszcens kibocsátással rendelkezik.)



## Radioaktív jelölés

### Radioaktív izotópok

Radioaktivitás az a folyamat, mely során nem stabil (=radioaktív) atommagok bomlanak.

Radioaktív sugárzás típusai:

- $\alpha$ : He atommagok,
- $\beta$ : elektronsugárzás,
- $\gamma$ : elektromágneses sugárzás

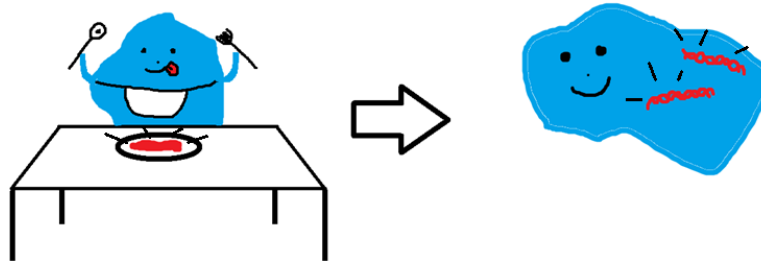
A molekuláris biológiában és az orvostudományban a radioaktív molekulák egyik legfontosabb paramétere a féléletidejük. A féléletidő az az idő, ami az adott mennyiségű radioaktív atomok felének elbomlásához szükséges.

A leggyakrabban használt radioaktív izotópok és féléletidejük

Radioaktív izotóp	Sugárzás	Féléletidő
$^3\text{H}$	$\beta$ részecske	12,35 év
$^{14}\text{C}$	$\beta$ részecske	5730 év
$^{35}\text{S}$	$\beta$ részecske	87,5 nap
$^{32}\text{P}$	$\beta$ részecske	14,3 nap
$^{131}\text{I}$	$\gamma$ részecske	8,1 nap

A molekuláris biológiában a radioaktivitást a következő módokon detektáljuk:

- speciális fotopapírok (autoradiográfiai film), PET, MRI, úgynevezett részecskedetektorok, mint például: Geiger-Müller számláló, szcintillációs detektorok, ionizáló kamra.
- Nukleinsavak radioaktív jelölése során olyan próba nukleotidokat kötünk hibridizációval a FISH-hez hasonló módon, amik radioaktív foszfátot ( $^{32}\text{P}$ ) tartalmaznak.
- Használhatjuk még továbbá a timidin-beépülési módszert, ahol radioaktív bázist ( $^3\text{H}$ - or  $^{14}\text{C}$ -timidint) építünk be a DNS szálba élő sejtekben: a radioaktív bázisokat tápanyagforrásként tesszük elérhetővé a sejteknek, amik így beépítik azokat az új DNS szálakba.



#### FISH: szekvensspecifikus nukleinsavjelölés

A FISH szó jelentése fluoreszcens in situ hibridizáció, ami specifikus RNS, vagy DNS szakaszok detektálására, vagy azonosítására használható citogenetikai módszer.

Rövid szekvensspecifikus próba DNS-sel DNS motívumok, szekvensspecifikus próba RNS-sel pedig RNS szekvenciák azonosíthatóak. Ezek a szekvensspecifikus próbák attól specifikusak, mert komplementerei a vizsgálni kívánt DNS, vagy RNS szekvenciának. Ezek a rövid komplementer szakaszok fluoreszcensen jelöltek, így téve őket detektálhatóvá. Erre a célra ugyancsak használhatóak radioaktív anyagok, vagy biotin is.

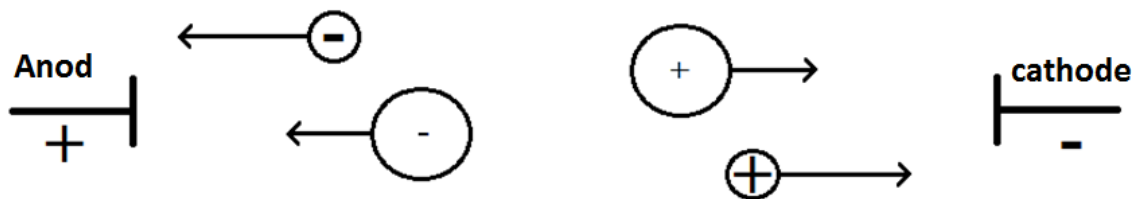
Folyamat: Megfelelő próba szakaszokat kell terveznünk, amik elég nagyok ahhoz, hogy hibridizálni tudjanak, de nem túl nagyok ahhoz, hogy az gátolja a kötődést.

Elsőként denaturáljuk a vizsgált nukleinsavat (formamiddal, vagy hővel), majd hozzáadjuk a jelölt kis próba oligonukleotidokat és megfelelő körülményeket biztosítunk a próba szakaszok hibridizációjához (kötődéséhez) a komplementer szakaszokhoz (ez hozzávetőlegesen 12 órán át zajlik). Ezt követően több mosási lépés során eltávolítjuk a nem-hibridizált oligonukleotidokat a rendszerből és detektáljuk a kötődött szekvenciákat.



### Nukleinsavak elektroforézise

Az elválasztás alapja: a töltéssel rendelkező részecskék mozognak a homogén elektromos térben. A mozgásuk sebessége a mérettől és a töltéstől függ. A kisebb és erősebben töltött részecskék gyorsabban mozognak, mint a nagyobb méretű és kevésbé töltött részecskék.



Az elválasztás hatékonyságát növelhetjük különböző mátrixok használatával, például különböző gélekkel, de a mérések más közegben, például pufferekben is elvégezhetők.

### Gélelektroforézis

A nukleinsavak elektroforézisét általában gélekben végezzük.

A gélelektroforézis során a legfontosabb jelenség, hogy a kisebb molekulák könnyebben mozognak/jutnak keresztül a gél mátrixán, mint a nagyobbak.

A két általánosan használt gél:

**Agaróz:** poliszacharid vizes szuszpenziója, ami keresztkötéseket alakít ki egy forralási és hűtési folyamat során. A sűrűséget ebben az esetben az agar koncentrációja határozza meg. Agaróz gélekkel általában vízszintes irányban történik az elválasztás

**Poliakrilamid gél (=PAGE):** akrilamid és biszakrilamid 3 dimenziós polimerje, ahol a molekulák kovalens kötéssel kapcsolódnak egymással. Fizikai tulajdonságai jobbak, mint az agaróz gélé. A gél pórusainak méretét a monomerek koncentrációja határozza meg. Ebben az esetben az elektroforézis főleg függőleges pozícióban zajlik. Felbontása jobb, mint az agaróz gélé.

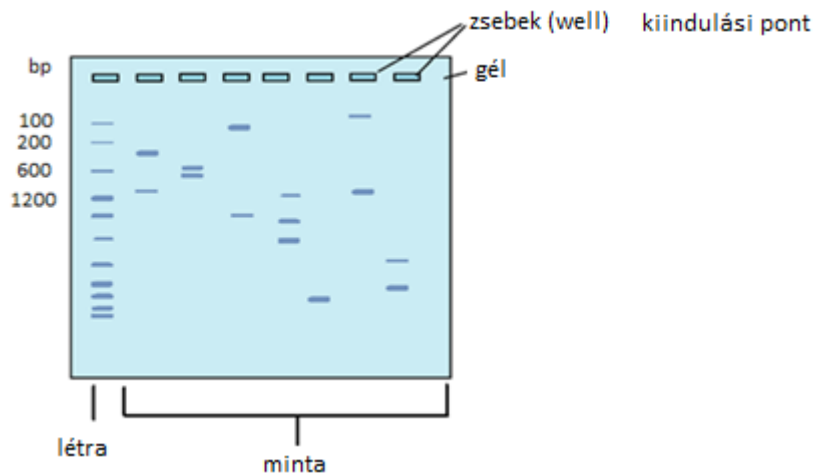
### Denaturáló gélelektroforézis

A gélelektroforézis kivitelezhető nem-denaturáló és denaturáló körülmények között is. A denaturáló körülmények felbontják az intramolekuláris kölcsönhatásokat, ami nagyon fontos az RNSEk pontos méretének meghatározása során nagyon fontos.

**Denaturáló gélelektroforézis:** általában RNSEk és fehérjék elválasztására használjuk. Nukleinsavak esetén ureát, illetve gyakran DMSO-t és glioxált, formamidot használnak RNS denaturálására.

**Natív gél:** olyan gélek, amik nem-denaturáló körülmények között futnak

Az analízis során elválasztást végzünk és meg tudjuk határozni a molekulák méretét egy létrával (ismert méretű molekulákkal, amikhez a minta molekuláit tudjuk hasonlítani).



A start ponttól mért távolságok és a molekulák mérete között logaritmikus az összefüggés.

### Klónozás

Klónozáskor egy DNS fragmentet illesztünk egy klónozó vektorba, és a rekombináns DNS-t bevisszük egy gazdaszervezetbe. A folyamat leírása röviden:

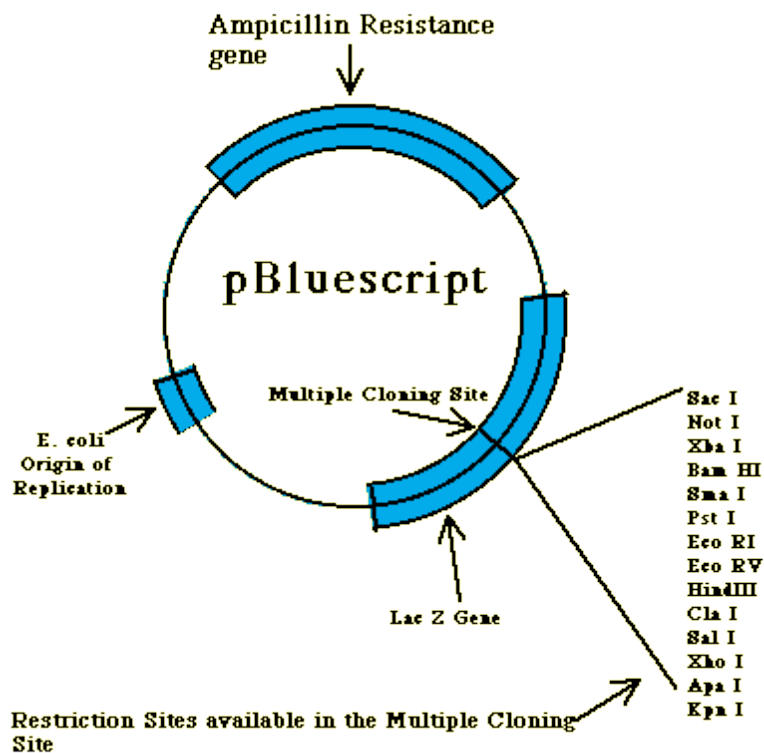
1. **Inszert DNS** izoláció és tisztítás.
2. **Vektor DNS** izolálás.
3. **Emésztés:** a target DNS és a vektor emésztése restrikciós endonukleázokkal.
4. **Ligálás:** a target inszertálása a vektorba.
5. **Transzformáció:** az inszertet tartalmazó vektort bevisszük kompetens baktérium sejtekbe.
6. **Screening:** a rekombináns molekulák átvizsgálása PCR reakcióval (colony PCR), restrikciós emésztés, vagy DNS szekvenálás segítségével.
  - *Colony PCR:* számos kolónia ellenőrzése, a plazmid jelenlétének igazolásának céljából: a target szelektív amplifikálása után a terméket agaróz gélen megfuttatjuk, a gélkép elemzésekor az inszert hosszára jellemző sávot keressük.
  - *Restrikciós emésztéskor* a megfelelő restrikciós endonukleáz(ok) segítségével hasítjuk a DNS-t, és az így kapott fragmenseket agaróz gélen megfuttatva a rekombináns klónokat keressük.
  - *DNS szekvenálás:* a rekombináns plazmidok legbiztosabb azonosítási módszere. A DNS szekvenálás technikája ugyanezen fejezetben található.



**Inszert:** A vektorba bevinni kívánt DNS szakasz. Más szavakkal, a célgén, vagy target szekvencia. A target forrása lehet genomiális DNS, komplementer DNS (mRNS szárlól szintetizált cDNS), vagy PCR segítségével amplifikált DNS szakasz.

**Vektor:** extrakromoszomális cirkuláris DNS molekula, amely a gazdasejtben fenntartható. Klónozáshoz gyakran használt vektorok: bakteriális és élesztő **plazmidok**, mesterséges kromoszómák (YAC, BAC), bakteriofágok, vagy retrovirális vektorok. A plazmidok fontos jellemzői:

- **MCS: Multiple Cloning Site:** számos hasítási helyet tartalmaz (olyan szekvencia, ahol restrikciós endonukleázok szelektív módon képesek elhasítani a plazmidot). A hasítás után a ligázok az inszertet képesek a vektorba beilleszteni. A módszer segítségével a kutató a plazmidon ismert pozícióba illesztheti be az inszertet.
- **Szelekciós marker:** Olyan szakasz a vektoron, amely lehetővé teszi a sikeresen transzformált sejtek kiválogatását. Gyakran használunk erre a célra antibiotikum rezisztencia géneket (pl. Ampicillin, Kanamycin rezisztencia).
- A vektor tartalmazhat ún. **riporter géneket** is, ezek a sikeresen transzformált sejtek átvizsgálására szolgálnak. A  $\beta$ -galaktozidáz enzimet kódoló gén jó példa, amelynek génterméke a színtelen X-gal molekulát egy kék színű terméké hidrolizálja. Ha az inszert betranszformálódott a  $\beta$ -galaktozidáz lacZ $\alpha$  szakaszába a vektor MCS-ében, az enzim nem termelődik. Ha X-gal-t tartalmazó, ún. szelektív agarlemezen tenyésztjük a baktériumsejteket, a transzformált sejtek kolóniái kéknek látszanak, amennyiben a vektoruk nem tartalmaz inszertet, és fehérek, ha a vektoruk tartalmazza a klónozendó DNS-szakaszt.



1. ábra:

a pBluescript plazmid általános leírása.

Figyeljék meg az MCS-t, a hasítási helyeket, és az ampicillin rezisztenciát hordozó szakaszt.

**Restrikciós endonukleázok:** olyan enzimek, amelyek a DNS-t specifikus szekvenciák mentén hasítják el. A hasítási helyek hossza 4-8 bázis között mozog. Közülük számos ún. palindrom hasítási hely, azaz a nukleotidsorrend mindkét irányban azonos. Egyes restrikciós enzimek ún. „ragadós” véget

hoznak létre (vagyis az egyik szál „túllóg” a másikon, pl. EcoRI), mások tompa véget eredményeznek (SmaI):



## 2. ábra:

Az EcoRI és SmaI enzimek hasítási helyei

A target és vektor DNS azonos enzimmel történő hasítása megkönnyíti a ligálást (különösen ragadós végű termék eredményező enzimek esetében).

**DNS ligáz:** Két DNS fragment összekapcsolására képes enzim (foszfodiészter kötést hoz létre a 3' és 5' végek között). A restriktív endonukleázok mellett alapvető kelléke a DNS szakaszok vektorba történő illesztésének.

**Plazmid transzformáció:** a plazmid felvétele ún. kompetens baktériumsejtbe. Hőshock vagy elektroporáció segítségével a baktériumsejtek képessé válnak a vektor (és a benne található inszert) felvételére. Ezután a baktériumsejteket antibiotikum-tartalmú agarlemezre szélesztjük. Csak a plazmidot felvevő baktériumok rendelkeznek antibiotikum rezisztenciával, így csak ezek képeznek kolóniákat. A kolóniákat ezután folyékony tápoldatban növesztjük, majd a plazmidot izoláljuk.

**Transzfecció** idegen DNS bevitele eukarióta sejtekbe. Megvalósítható elektroporáció, lipofekció és mikroinjektálás segítségével. Lipofekció esetében a vektort liposzómákba csomagolják, ami aztán a gazdasejt membránjával fuzionál, a mikroinjektáció a DNS-t közvetlenül a sejtmagba juttatja.

**Mutagenézis:** génmutációk létrehozása a DNS mesterséges módosításával. A mutagenézis célja lehet a gén funkciójának vizsgálata a gén szabályozó elemeinek, vagy termékének módosításával. Létrejöhetnek megváltozott működésű mutáns fehérjék, amelyek esetenként az iparban is hasznosíthatók. *Random mutagenézis* történik, ha az élőlényt mutagéneknek tesszük ki (UV, mutagén kemikáliák). Az érdekes fenotípusú mutánsokat ezután kiválogatjuk. Más technikák ún. error-prone (hibázásra hajlamos) PCR reakciót alkalmaznak, amelynek beállításai növelik a hibás nukleotidok beépülésének esélyét. A mutációt hordozó PCR termékeket ezután expressziós vektorokba klónozzák, és az így termelt mutáns fehérjét karakterizálják. A *célzott mutagenézis* során korábban nukleotid analógokat vagy vegyszereket használtak a lokalizált pontmutációk létrehozásához, jelenleg mutagén oligonukleotidokat alkalmaznak egy primer extenziós reakcióban DNS polimeráz segítségével, célzott pontmutációk, rövid deléciók, inszerciók létrehozásához. A *kombinatorikus mutagenézis* néhány DNS-pozíció módosítását jelenti, egy darab kihalásával és annak egy mutációs könyvtárból származó szakasszal történő helyettesítése segítségével. Az eljárás akkor hasznos, ha egy bizonyos tulajdonságot akarunk kiválogatni. Az *inszerció mutagenézis* alkalmas olyan gének azonosítására, amelyeknek szerepük van a karcinogenezisben, illetve bizonyos ráktípusok biológiai útvonalainak megértésében, génfunkciók vizsgálatában is használható. A *homológ rekombináció* módszere egy szervezetben történő specifikus mutáció létrehozására használható. A sejtbe olyan vektort viszünk be, amely a módosítani kívánt génhez hasonló DNS-szakaszt hordoz. Ezután a rekombinációs folyamatban a kromoszomális célgén lecserélődik. A módszer használható mutáció beépítésére vagy egy gén kiütésére („knock out” technika).

## Nukleinsavak analízise

### PCR

#### qRT-PCR

A kvantitatív reverz transzkripció révén egy adott RNS transzkriptum mennyiségének változását követhetjük különböző körülmények között (például egy adott kezelés mellett és kezelés nélkül). Ebben az esetben az RNS izolálást követően reverz transzkriptáz enzim segítségével valamennyi RNS molekuláról egyes szálú DNS másolat (cDNS: copy) készül oligo d(T) alkalmazásával csak a mRNS-ek másolódnak át, amikor is a 3' poli(A) farok a templát). A szintetizált cDNS-t használjuk PCR reakcióban gén specifikus primerek alkalmazása mellett. Ilyen módon a reakció exponenciális szakaszában a PCR termék relatív mennyisége arányos lesz a kiindulási RNS mennyiségével.

#### Real Time PCR

#### DNS szekvenálás

## A nukleinsavak interakciói

### EMSA- Electrophoretic mobility shift assay/elektroforetikus mobilitás eltolódás esszé

Gél retardációs vagy fehérjecsik eltolódási módszerek is nevezik. Gyors és érzékeny módszer a **szekvenca-specifikus DNS-kötő fehérjék** detektálására. Kvalitatív és kvantitatív meghatározásra is alkalmas technika. A módszer alapelve, hogy a transzkripció faktor szekvenca-specifikusan kötődik az izotóppal jelölt oligonukleotid próbához. A kötődés következtében visszatartja a transzkripció faktor migrációját a nem denaturáló poliakrilamid gélben. Teljes sejtmagi kivonat és tisztított faktorok is használhatók a DNS-kötő fehérjék vizsgálatára.

#### *A DNS/fehérje interakció specificitásának meghatározása*

A DNS/fehérje interakció specificitásának meghatározásához és a komplexképzésben részt vevő fehérje meghatározásához két gyakori megközelítést alkalmaznak: kompetíció a jelöletlen kompetítor DNS molekulával és az antitest eltolódás (szupershift).

1. *Jelöletlen kompetíció:* Az izotóppal jelölt DNS próba hozzáadása mellett, 50-100-szoros moláris mennyiségben adjuk a kompetítor DNS-t a reakció elegyhez. Különböző reakciókat készítünk a target DNS szekvenciát tartalmazó oligonukleotidokkal és a target szekvenciában mutációt hordozó oligonukleotidokkal. Specifikus kötődés akkor mutatható ki, ha megszűnik a kötődés az izotóppal jelölt oligonukleotiddal.
2. *Antitest szupershift:* a DNS-kötő fehérjére specifikus antitesteket együtt inkubáljuk a jelölt próbát tartalmazó kötési reakció eleggyel. Ha az antitest felismeri a célfehérjét, akkor két eredmény lehetséges. Ha az antitest nem gátolja a kötődést, akkor egy nagyobb molekula-tömegű komplex jön létre, melyet egy ún, szupershift-ként detektálunk az autoradiogramon. Ha az antitest gátolja a kötődést, akkor nem látunk jelet.

#### *Módszer*

1. Sejtmagi kivonat készítése
2. Fehérjekoncentráció mérés
3. DNS oligonukleotidok készítése
4. Az oligonukleotidok összekapcsolása
5. A DNS próba jelölése
6. Kötési reakció
7. Nem denaturáló poliakrilamid gél készítése és autoradiográfia

A fehérje kivonatot teljes sejtől vagy sejtmagból készítjük. A nukleáris kivonat mennyisége változó lehet a kivonat fehérje koncentrációjának és a vizsgált transzkripció faktor mennyiségének és kötési affinitásának függvényében.

A vizsgálat során használt próba típusa és mérete a kísérleti felállástól függ. Ha egy korábban azonosított DNS-kötő helyet szeretnénk vizsgálni, akkor szintetikus oligonukleotid próbára van szükség. A szintetikus kötőhelyek létrehozásához két, egymással komplementer egyes szálú DNS oligonukleotidra van szükség, melyek tartalmazzák a vizsgálandó szekvenciát, majd összekapcsoljuk őket (annealing). Az összekapcsolás után az oligonukleotidok túlnyúló 3' végeket hordoznak.

A próbák jelölése a DNS végeitől függ. A 3' túlnyúló végek esetén az 5'-3' polimeráz aktivitással rendelkező T7 DNS polimerázt használjuk a jelöléshez. Az oligonukleotidok jelölésének alternatív módja  $^{32}\text{P}$  hozzáadása az 5' véghez T4 polinukleotid kinázzal és  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-vel. Ebben az esetben az oligonukleotidokat tompa véggel kell szintetizálni.

A nem specifikus DNS –kötő fehérjék kompetitoraként poly d[I-C]-t adunk a kötési reakcióhoz. Kompetitoraként szintén használatos az ultrahanggal tördelt lazac sperma DNS (ssDNS), habár általában a legegyszerűbb kopolimerek adják a legjobb eredményt. A kompetitorok koncentrációját és a megfelelő kombinációját empirikusan határozzuk meg.

A jelöletlen DNS fragmenttel (azonos a szekvenciája a jelölt próbáéval) végzett kompetíció alkalmas a komplex képződés és a DNS kötés specificitásának vizsgálatára. A jelöletlen kompetitor DNS transzkripció faktorhoz való kötődése csökkenti a vizsgált fehérje mennyiségét, így csökkenti a jelölt próbához kötődő fehérje mennyiségét. Ennek eredményeként csökken vagy eltűnik az a fehérje csík a gélből, ami a vizsgált fehérjéből álló komplexet mutatná.

A DNS-kötő helyekkel komplexet képező fehérjék azonosításához a transzkripció faktorra specifikus antitestet adunk a kötési reakcióhoz. Ezek az antitestek a komplexhez kötődnek, így megváltoztatják a komplex mobilitását, amit szupershiftnek nevezünk, vagy a gátolják a komplex képződését, azáltal, hogy lefedik a kötéshez szükséges helyeket a transzkripció faktoron, így az nem képes a próbához kötődni. Utóbbi esetben a komplexet jelölő fehérje csík hiányzik a gélről.

#### ChIP- Kromatin immunprecipitáció

A kromatin immunprecipitáció egyedi módszer specifikus **fehérjék és genomiális DNS szakaszok közötti kapcsolatok** feltérképezésére. A módszer segítségével meghatározható, hogy egy transzkripció faktor interakcióba lép-e a célgénnel. Vizsgálható az is, hogy a poszttranszlációs modifikáción átesett hiszton fehérjék jelen vannak-e specifikus helyeken a genomban.

#### Módszer

1. A sejteket formaldehiddel kezeljük, mely keresztkötéseket hoz létre a DNS és a DNS-kötő fehérjék között
2. A kromatint izoláljuk a sejtekből.
3. A genomiális DNS-t ultrahanggal kezeljük, így 200-1000 bp hosszúságú DNS szakaszokat kapunk, majd előtisztítjuk a nem specifikus precipitáció csökkentése érdekében.
4. Az előtisztítást protein A- vagy G-agaróz gyöngyökkel végezzük el, melyeket előzetesen ssDNS-sel blokkoltunk.
5. A célfehérjére specifikus antitesteket protein A- vagy protein G- agaróz gyöngyökhöz kötjük, majd a mintához adjuk.
6. A mintákat a gyöngyökkel inkubáljuk.
7. Az inkubációt követően a gyöngyöket mossuk, így eltávolítjuk a nem specifikusan kötődött fehérje-DNS komplexeket.
8. A fehérje komplexeket eluáljuk a gyöngyökről.

9. A mintákat felmelegítjük, hogy megszüntessük a kovalens keresztkötéseket.
10. A DNS fragmenteket kitisztítjuk a mintából és PCR-ral analizáljuk.

### Footprinting

Footprinting segítségével meghatározhatjuk azt a **pontos DNS szakaszt**, amihez meghatározott **DNS-kötő fehérjék kapcsolódnak**.

#### Módszer

1. Klónozzunk egy olyan DNS szakaszt, ami tartalmazza a transzkripció faktor kötőhelyét.
2. A DNS molekulák egyik végét radioaktívan jelöljük, általában radioaktív ATP-vel.
3. A DNS-t **DNáz I** enzimmal emésztjük.
  - DNáz I random módon hasítja a DNS molekulákat (enzimnek nincs felismerési szekvenciája)
4. Az emésztés eredménye radioaktív fragmentek keveréke, melyben a legrövidebb fragment egyetlen nukleotidból áll.
5. Elektroforézissel elválasztjuk a DNS fragmenteket.
6. Ha a transzkripció faktor a DNS szakaszhoz kötődik, akkor a DNáz I nem képes megtámadni a molekulát (a fehérje lefedi, ezáltal védi a hasítástól).
7. Amikor a fragmenteket elválasztjuk, akkor a fehérje által lefedett DNS szakasz hiányzik az autoradiogramról.
8. A kapott rész a „footprint”.
9. Ugyanazt a DNS mintát (a transzkripció faktor nélkül) szekvenáljuk, majd a kapott létrát összevetjük a footprint autoradiogrammal.
10. A DNS pontos bázisszekvenciája leolvasható a szekvenálást követően. A keresett szakasz megegyezik a footprinting során kapott létra hiányzó fokával.

### RNS interferencia

Az RNS interferencia (RNSi) során egy specifikus **mRNS degradáció**n esik át az ún. **kis duplaszálú siRNS** jelenlétében, melynek szekvenciája megtalálható az mRNS szekvenciájában (egymással komplementerek).

#### Módszer

A gének szerepének meghatározásával párhuzamosan megvizsgálhatjuk az si RNS-ek hatását a sejtek aktivitására. Az RNS interferencia segítségével vizsgálható a gének szerepe az emlős sejtekben. Ehhez a sejteket rövid dsRNS molekulákkal inkubáljuk. Ahhoz hogy az RNS molekulák bejussanak a sejtbe lipid burokba kell őket csomagolni (transzfekción), vagy a sejteket kell úgy módosítani, hogy maguk termeljék meg az siRNS molekulákat. A sejt belsejében az siRNS molekulák szabályozzák a cél mRNS degradációját. Így a sejt nem képes a célgén által kódolt fehérjét szintetizálni. A gének funkciójának modell organizmusokban történő vizsgálatához használhatunk siRNS könyvtárakat (több ezer siRNS-t tartalmaznak) vagy olyan vektorokat, melyek ezeket az RNS-eket kódoló DNS szakaszokat tartalmaznak. Ezzel a módszerrel megvizsgálhatjuk a gén eliminációjának hatását a különböző sejtfunkciókra.

#### Az iRNS szerepe a sejtben

Az interferáló RNS vélhetően a genetikai immunrendszer egyik típusa, ami védi a gazdaszervezetet az idegen vagy nemkívánatos genetikai anyagokkal szemben (infekció). Az interferáló RNS-ek valószínűleg azért fejlődtek ki, hogy gátolják a vírusok szaporodását és/vagy gátolják a transzpozonok mozgását a genomban. A sejtek a dsRNS molekulákat idegen molekulákként ismerik fel, mivel ezek nem a sejt normál működése során képződnek. A duplaszálú RNS először elhasítódik rövid, kettőszerű

fragmentekre (21-23 nukleotid), amiket kis interferáló RNS-eknek nevezünk (siRNS). A hasítást egy speciális ribonukleáz enzim, a Dicer végzi. Ezt követően a siRNS-ek komplexet képeznek, amit pre-RISC-nek nevezünk. Az RNS duplex egyik szála (vándorló szál) kettéhasítódik, majd leválik a pre-RISC komplexről. A másik szál (követő szál) beépül a RISC fehérje komplexbe. A RISC lehetővé teszi az egyszálú siRNS komplementer RNS szekvenciához kötődését. A kötődést követően a cél RNS elhasad a ribonukleáz enzim aktivitása révén. Minden siRNS számos cél RNS destrukcióját képes kiváltani.

## FEHÉRJÉK

### Fehérje kivonás (izolálás)

Léteznek speciális kivonási és tisztítási eljárások, amik specifikusan adott fehérjék kivonására lettek kifejlesztve adott biológiai mintákból, azonban van néhány általános lépés, ami általános a különböző izolációs módszerek között.

A kivonás a sejtek lízisével kezdődik, ami különbözőképpen kivitelezhető, például folyékony nitrogénnel, ultrahanggal, fagyasztást követő nagy nyomás kifejtésével, vagy különböző kémiai anyagokkal. A megfelelő technikát a sejt típusa szerint (baktérium, növény, gomba, emlős sejt) és az ezt követő tisztítási lépések alapján választhatjuk meg. Ez a lépés határozza meg a fehérje kihozatalát és minőségét is. A lízist követően el kell választanunk a nem-protein komponenseket, mint a nukleinsavakat, a sejtorganellumokat specifikus kicsapási technikákkal, vagy centrifugálási lépésekkel. A centrifugálás során először a sejtörmeléket tudjuk elválasztani a lizátumból, majd ki tudjuk csapni a nukleinsavakat, majd elválaszthatjuk azokat egy újabb centrifugálási lépéssel. A folyamat során proteáz inhibitorok használata javasolt a maximális kihozatal érdekében.

Az elválasztást követően a fehérjék tovább tisztíthatóak a célzott fehérje tulajdonságai alapján: aminosavtartalom, méret, alak, nettó töltés, izoelektromos pont, oldékonyság, hőstabilitás, hidrofobicitás, kötődési viselkedés és egyéb tulajdonságok.

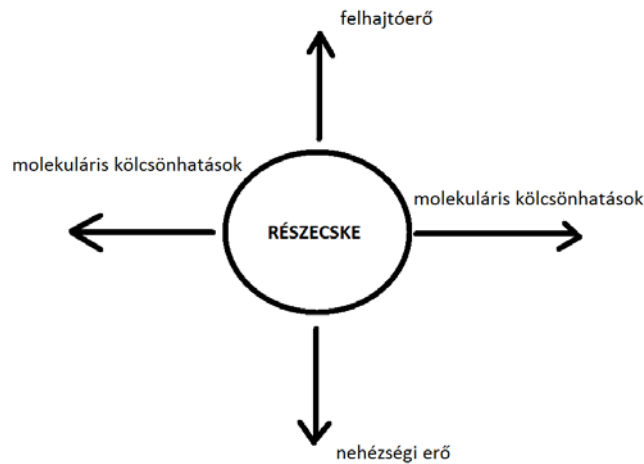
Megkülönböztető tulajdonságok	Alkalmazható technika
Oldékonyság	szelektív kicsapás
Különböző kötődési/szorpciós képesség	kromatográfias módszerek, ioncserélő módszerek
Molekulasúly/méret	Ülepítés, centrifugálás, gélelektroforézis
Alak	Ülepítés, centrifugálás
Sűrűség	Sűrűség grádiens centrifugálás
Töltés	Elektroforézis, izoelektromos fókuszálás, ioncserélő kromatográfia
Specifikus és nonspecifikus kötőhelyek	Különböző kromatográfias módszerek és immun-technikák

### Elválasztások

#### Centrifugálás

A centrifugálás során az elválasztást a létrehozott nehézségi gyorsulás hozza létre (g). Ezzel a technikával a fehérjéket oldatban választhatjuk el. (Más részecskéket is elválaszthatunk a technikával, például sejteket, sejtorganellumokat, makromolekulákat, vagy kisebb molekulákat is.)

Folyadékban a részecskékre ható erők: a felhajtóerő, a nehézségi erő és különböző molekulák közötti kölcsönhatások.

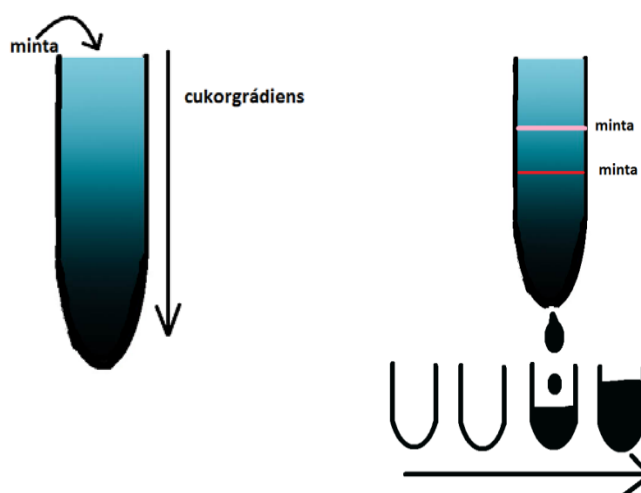


A centrifugálás során a mintára ható nehézségi erőt növeljük meg. **A részecskék** ennek hatására **süllyedni kezdenek** a folyadékban **méretüknek, alakjuknak és sűrűségüknek megfelelően**.

#### Grádiens centrifugálás

A grádiens centrifugálás egy specifikus centrifugálási módszer, ahol a centrifugálás során sűrűség grádienszt használunk, legtöbbször szacharózt, vagy cézium-kloridot, melyben a sűrűség a centrifugacső alja felé növekszik. A mintát (például sejtlizátumot) a grádienshez adjuk és így centrifugálunk. A részecskék süllyedni kezdenek és különböző sávokat (bandeket) hoznak létre a csőben: ezek saját sűrűségüknek megfelelő helyet fognak elfoglalni. Ebben a technikában kizárólag a sűrűség játszik fontos szerepet, az alak és a méret kizárólag azt befolyásolják, mennyi idő alatt éri el az adott részecske a megfelelő bandet.

A szeparációt követően a különböző frakciókat (bandeket) külön csövekbe gyűjthetjük.





### Ultracentrifugálás

Ultracentrifugálásnak a magas hatékonyság miatt hívjuk ezt a technikát. A rotorok 600.000xg, vagy akár 2.000.000xg gyorsulást is képesek elérni. Ennél a sebességnél már a légellenállás is fontos tényező, ezért a készülék belsejében vákuumot használunk.

Theodor Svedberg (Nobel díjas kémikus) készítette az első készüléket 1925-ben. **A mérésből számolható a szedimentációs állandó, amit Svedbergnek hívunk** (ez figyelembe veszi a részecske süllyedését, a centrifuga sebességét). **A szedimentációs állandó karakterisztikus**, jellemző a különböző fehérjékre. (Emlékeztető: elevenítsd fel, hogyan különböztetjük meg a riboszómaalegységeket egymástól: 40S és 60S névvel illetjük őket, amiben az S az alegységek ülepedési állandóját jelenti, tehát ezeket 40 és 60 Svedberg ülepedési állandó jellemzi.)

### Kromatográfia

A kromatográfia az egyik legfontosabb szeparációs módszer a gyógyszerésztudományi kutatásokban. Ahhoz, hogy megértsük a kromatográfiát, meg kell ismerni néhány fontos definíciót.

A kromatográfiás elválasztás egy álló és egy mobil fázisból áll. A mobil fázis szállítja a mintát a rendszeren és az állófázison keresztül.

Az elválasztás alapja: a mintaszállító mobil fázis keresztülhalad az álló fázison és az elválasztás a minta álló és mobil fázis közötti különböző megoszlása miatt fog létrejönni. Mivel a részecskék különböző módon lépnek reakcióba egymással, a mintát alkotó részecskék különböző idők alatt tudnak áthaladni az állófázison, ez hozza létre a szeparációt.

Az erősebb kölcsönhatás lassabb átjutást jelent az állófázison, míg azok a molekulák, amik nem lépnek kölcsönhatásba (vagy kevésbé erős kölcsönhatást hoznak létre) gyorsabban haladnak át rajta. A részecskék rendszerben töltött idejét „retenciós időnek” nevezzük. A kromatogram a kromatográfia vizuális outputja.

A mobil fázis lehet folyadék, gáz, vagy szuperkritikus folyadék

Megkülönböztetünk különböző kromatográfiás módszereket az alábbiak szerint:

- Gázkromatográfia (GC): a mobil fázis gáz
- Folyadékkromatográfia (LC): a mobilfázis folyadék
- Papírkromatográfia (PC): az állófázis papír
- Vékonyrétegkromatográfia (TLC): az állófázis egy sík vékonyréteg, mint a PC esetén

A mobil fázist hajtó erő lehet különféle: elektromos feszültség (elektrokromatográfia), nyomás (a legtöbb kromatográfiás módszer), kapilláris hatás (sík módszereknél: papír és vékonyréteg kromatográfia).

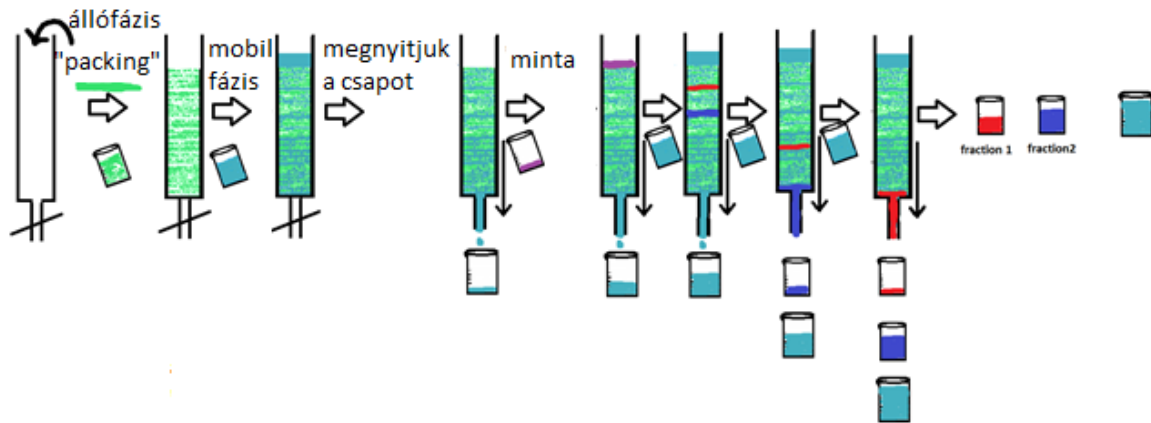
#### *Oszlopkromatográfia*

Az „oszlopkromatográfia” fogalma azt jelenti, hogy az elválasztás egy **oszlop alakú** térben jön létre. (A név **nem határozza meg az interakciót** az állófázis és a minta között.)

Az egyik legszélesebben használt technika, mivel mikroszkópikus tartománytól a több méteres méretig használható.

A képen lévő példán az álló fázis oszlopba csomagolva foglal helyet, megtöltjük az oszlopot a mobil fázissal és annak tetejére poipettázzuk a mintát. Ahogy az oszlop alján megnyitjuk a csapot, a minta megkezdte átfolyását a rendszeren. Az oszlopot folyamatosan utántöltjük a mobil fázissal (hogy a nyomás állandó maradjon). A minta részei elválnak egymástól, majd frakciókra szedve külön gyűjtjük őket.



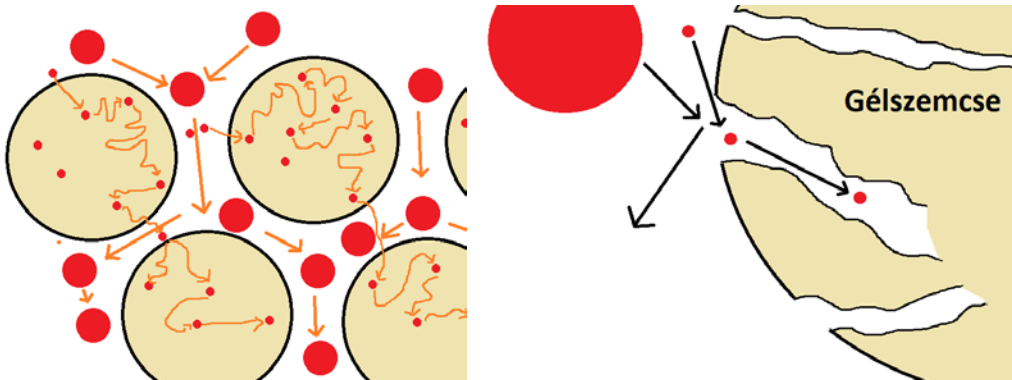


A leggyakrabban alkalmazott kromatográfiai módszerek az interakciók alapján

#### *Méretkizárásos kromatográfia*

Az állófázis apró porózus gélszemcsékből áll, amik készülhetnek pl. agarózból, poliakrilamidból, vagy dextránból.

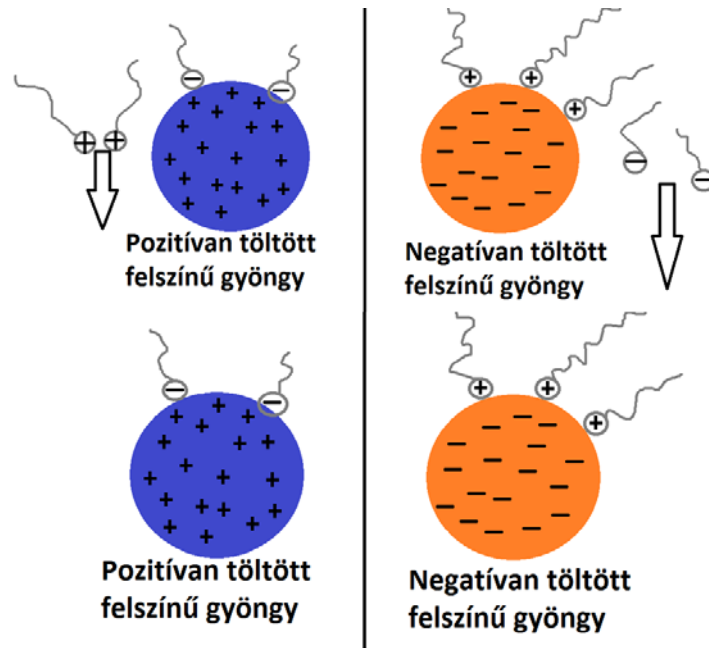
Ahogy a mobil fázis a mintával keresztül halad a rendszeren, a kisebb részecskék be fognak menni a gélszemcsék pórusaiba, míg a nagyobbak nem tudnak belépni ezekbe, így csak megkerülik azokat (lásd kép). A kisebb molekulák, amik képesek bejutni a pórusokba így hosszabb utat tesznek meg az oszlopban, szóval retenció idejük hosszabb lesz. A módszerrel **méret** alapján tudunk elválasztani.



#### *Ioncserélő kromatográfia*

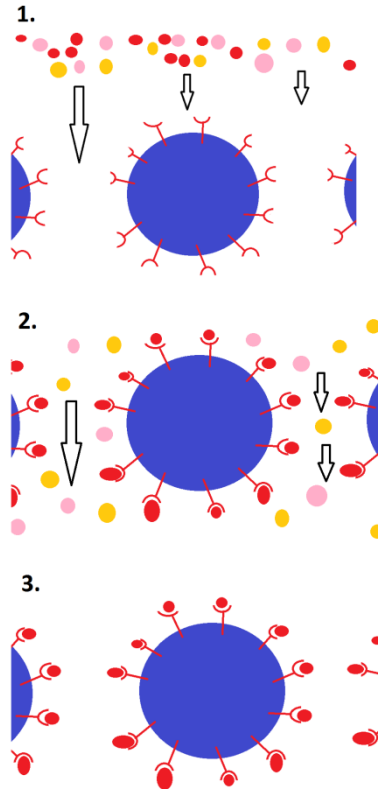
Az ioncserélő kromatográfiában az állófázis töltött felszínű szemcsékből áll (ezek is lehetnek gélszemcsék).

Az elválasztás alapja, hogy az ellentétes töltésű részecskék kötődni fognak a gél felszínére. A kötés erőssége különböző lesz a töltés erőssége alapján. A kölcsönhatásba lépő részecskék lassabban, vagy nem fognak átjutni az oszlopon.



*Affinitáskromatográfia*

Ebben a technikában a gélrészecske felületére specifikus anyagokat kötünk az állófázis készítése során. Ezek a molekulák specifikusan tudnak kötni célzott molekulákat a mintából. A megkötött molekulák nem fognak áthaladni az oszlopon, míg minden más igen. A nemkötődött részecskék átfolyását követően eluáljuk (lemossuk) a megkötött részecskéket, így külön gyűjtjük őket.



*HPLC = High Pressure (vagy High Performance) Liquid Chromatography azaz magas nyomású (vagy magas hatékonyságú) folyadékkromatográfia*

HPLC-vel olyan anyagok elválasztását végezzük, amik nem eléggé illékonyak a gázkromatográfiai analízishez és nem is derivatizálhatóak illékonyra a GC analízishez (ilyenek a fehérjék is). A műszer magas nyomást használ, hogy a mintát keresztüljuttassa az állófázison.

A hagyományos HPLC készülékek 400 bar, vagy akár több, 1200, vagy 1500 bar túlnyomással dolgoznak. (Még magasabb nyomással dolgozó készülékeket neveznek UHPLC-nek=ultra high pressure liquid chromatography.) Az analitika egyik legfontosabb készüléke.

A HPLC-ben bármely folyadékkromatográfiai módszer használható.

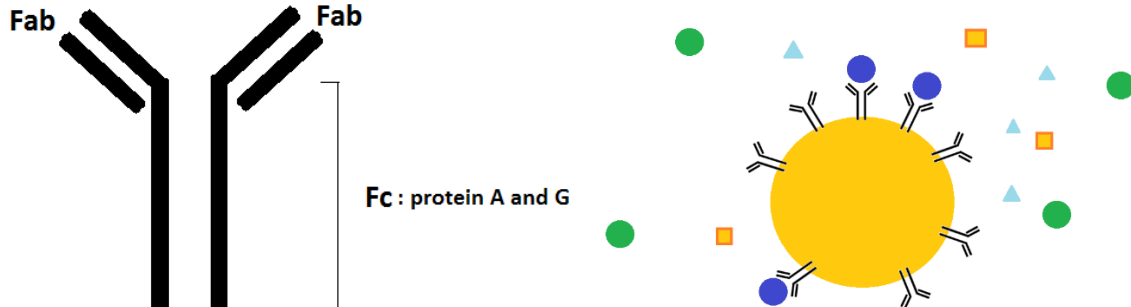
### Immunprecipitáció

Az immunprecipitáció egy olyan módszer, ami egy célzott fehérje (antigén) antitesten történő precipitációján (kicsapódásán) alapul. A folyamat használható tisztítás, vagy koncentráció során is nagyon specifikusan. Tisztíthatunk a technikával adott fehérjéket szövetizátumból. Használhatjuk a módszert arra is, hogy vizsgálni kívánt fehérjéket láthatóvá tegyünk például a Western blot során.

Adott fehérjék izolációja:

Antitesteket köthetünk agaróz gélszemcsékre azok Fc régióján keresztül. (Speciális agaróz gél kötődhet a protein A, vagy a protein G régiójához az antitestnek.)

A precipitációt követően a célfehérjék centrifugával elválasztható. Az izolációt követően tovább vizsgálhatjuk őket elektroforézissel.



### Fehérjék elektroforézise

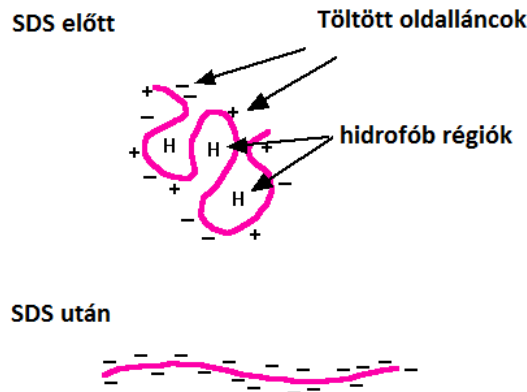
*(Az elektroforézisről általánosan. lásd nukleinsavak elektroforézise)*

A fehérjék elektroforézise történhet folyadékban, vagy gélben is. Általában denaturáló körülményeket használunk, hogy elkerüljük a 3D szerkezet zavaró hatását.

**Denaturáló gélelektroforézis:** általában fehérjék elválasztására használjuk (és RNsekhez). Fehérjéknél a denaturáló szer tipikusan **SDS** (nátrium-dodecil-szulfát). és **merkaptotanol**.

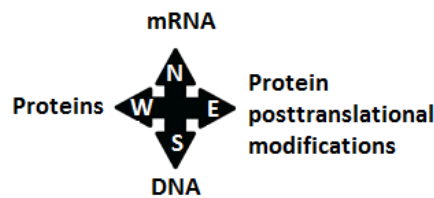
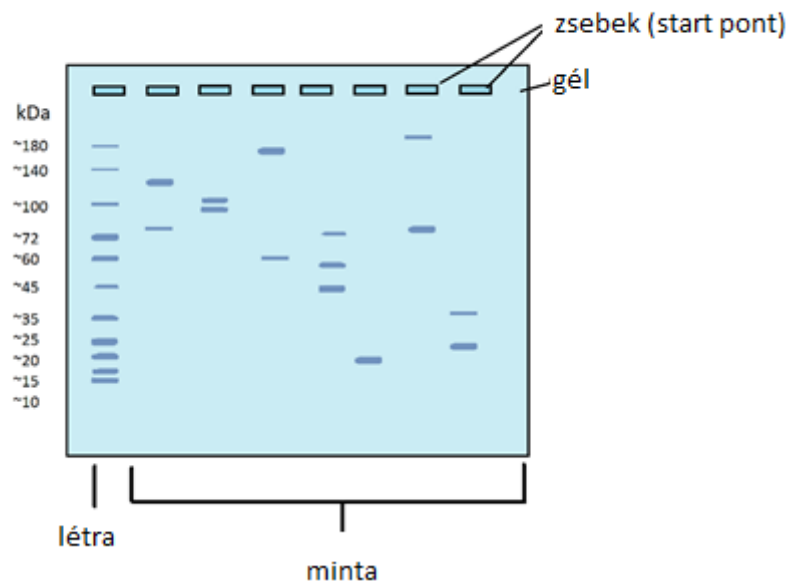
A detergens tulajdonságú SDS a fehérjék hidrofób aminosavaihoz kapcsolódik, ez pedig erős negatív töltést ad a fehérjének (az SDS szulfátcsoportja adja a negatív töltést). A molekula teljes hosszában kialakult negatív töltések taszító erőt fejtenek ki egymásra, ezért a fehérje „kiterül”, elveszíti eredeti konformációját és nem kovalens kölcsönhatásai megszűnnek. A polipeptidláncok közötti és azon belüli diszulfidhidakat a merkaptotanol redukálja, így egységesen negatív fehérjemolekulák jönnek létre, amiknek töltése attól függ, mekkora a hosszuk! DE! a méret/töltés arányuk állandó, ezért az elválasz-

tás során csak az számít, hogy mekkora a molekula, mennyire „akad fenn” a gélmátrix térhálóján: így a kisebb molekulák gyorsabban képesek áthaladni, mint a nagyobbak.



Az elektroforézis során így méret szerinti elválasztást végezhetünk. A molekulák vándorlásával nem csak elválasztást végezhetünk, hanem meghatározhatjuk pontosan a molekulaméretet is.

Fehérjék denaturáló poliakrilamid gélelektroforézise (SDS-PAGE)



A megtett távolság és a molekula mérete között logaritmikus összefüggés áll fenn.

## Fehérjék detektálása

### Western blot (vagy immunoblot)

A Western blot egy gélelektroforézis lépéssel kezdődik (ez lehet natív, amia fehérjék 3D szerkezete alapján választ el és denaturáló gélelektroforézis is, ami a méret alapján választ el), mint az összes blot technika. Ezt követően az elválasztott fehérjéket membránra vesszük át (transzfer, a membrán általában nitrocellulóz), majd ezen tesszük a mintát láthatóvá. A mintát antitestekkel jelöljük (immunjelölés).

### Immunjelölés

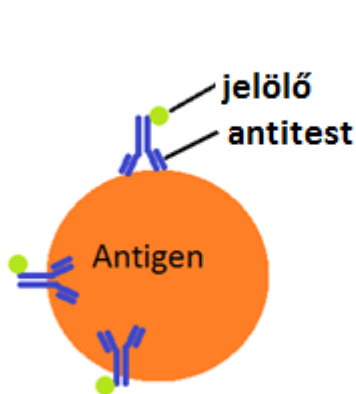
Az antitestek nagy affinitással és nagyon specifikusan kötődnek. Megkülönböztetünk monoklonális és poliklonális antitesteket az antitestek specificitása alapján. A poliklonális antitesteket különböző B sejtvonalak szekretálják (amik ugyanazt az antigént ismerik fel, azonban a molekula különböző részeihez kötődhetnek). A monoklonális antitestek ugyanabból a B sejtvonalból származnak, kémiaiailag teljesen azonosak. A molekuláris biológiában az úgynevezett monoklonális antitesteket részesítjük előnyben, amik speciális részét ismerik fel a célfehérjének.

Az immunjelölés 2 típusát különböztetjük meg: direkt és indirekt jelölőket.

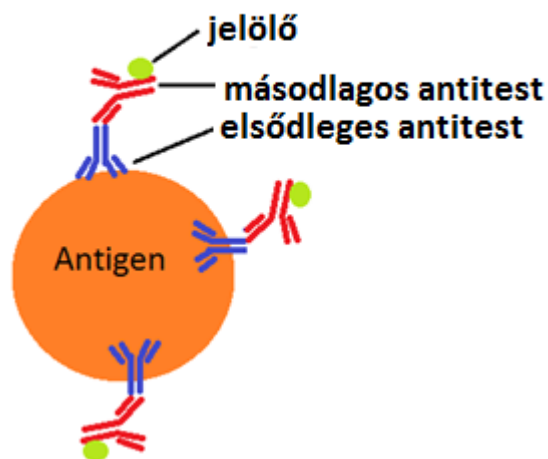
A direkt módszer esetén az antigénhez kötődő antitest jelölt. Az indirekt módszer esetén specifikus antitest kötődik az antigénhez, majd ezt követően az először kötődött antitestet tesszük láthatóvá egy másik, jelölt antisszonnal. Ebben az esetben az először kötődött antitest a primer antitest, a másodsorra kötődött pedig a secunder. Az indirekt módszer során a jel erősebb lesz (jelerosítés zajlik) és lehetővé teszi a jelölt secunder antitest tömegtermelését.

A módszerrel az antitestek különböző módokon jelölhetnek. fluoreszcens anyagokkal, enzimmal, ami színes komponenst képez, vagy arany gyöngyökkel.

### Direkt jelölés



### Indirekt jelölés

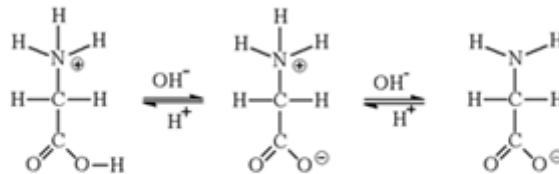


## Fehérjék analízise

### Izoelektromos fókuszálás

Ezt a technikát általában fehérjék elválasztására használjuk.

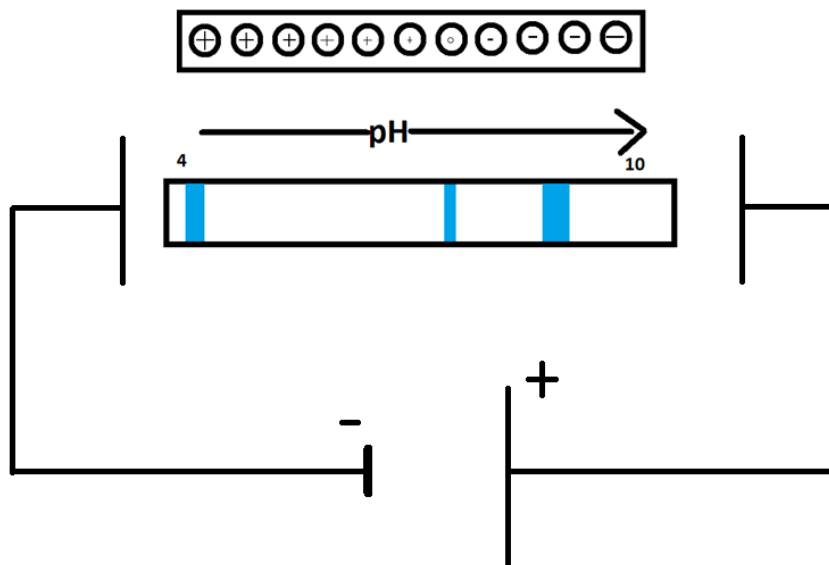
A fehérjék pozitívan és negatívan töltött csoportokkal is rendelkeznek. Ha a környezet pHja változik, változást hoz létre a töltésben, mivel ezek a csoportok protonálódhatnak, illetve deprotonálódhatnak. Magas pHn a nettó töltés negatívabb, mint alacsony pHn, ahol pozitívabb nettó töltést vesznek fel a fehérjék.



**alacsony pHn   semleges pHn   magas pHn**

A fehérjék amfoterikus tulajdonságokkal rendelkeznek, gyenge bázisként tudnak viselkedni savas folyadékokkal szemben és gyenge savként bázikus oldatokkal szemben (a töltött csoportjaik miatt)

Az izoelektromos fókuszálás során a fehérjét pH grádiensbe helyezük és egyenáramot kapcsolunk a rendszerre (ez homogén elektromos erőteret fog létrehozni a pH grádiensben).

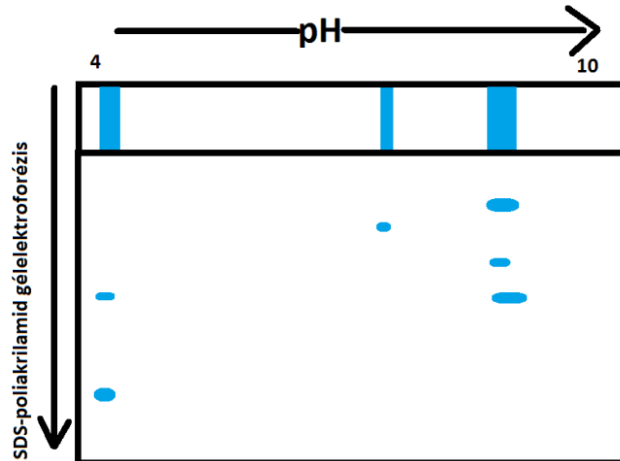


Hozzáadjuk a mintamolekulákat, amik mozogni/vándorolni kezdenek az elektromos erőterben és a pH grádiensben nettó töltésüknek megfelelően (lektroforetikus jelenség). a Ph GRÁDIENS egy adott pontján a fehérjék nem rendelkeznek töltéssel (nettó töltésük nulla), azon a ponton nem vándorolnak tovább, hanem bandet alakítanak ki. (Mivel az elektromos erőterben csak töltéssel rendelkező részecskék mozognak!)

Az izoelektromos pont az a pont, ahol a fehérje nettó töltése nulla.

## 2 dimenziós (2D) elektroforézis

A kétdimenziós technikák során a minta részecskéit 2 technikával is elválasztjuk egymást követően. Fehérjéknél az összes fehérje elválasztására általában a 2D elektroforézis egy izoelektromos fókuszálás és egy SDS PAGE. A 2 tulajdonság alapján elválasztott fehérjék (izoelektromos pont és méret) a különböző fehérjék egyedi foltokat fognak kialakítani.



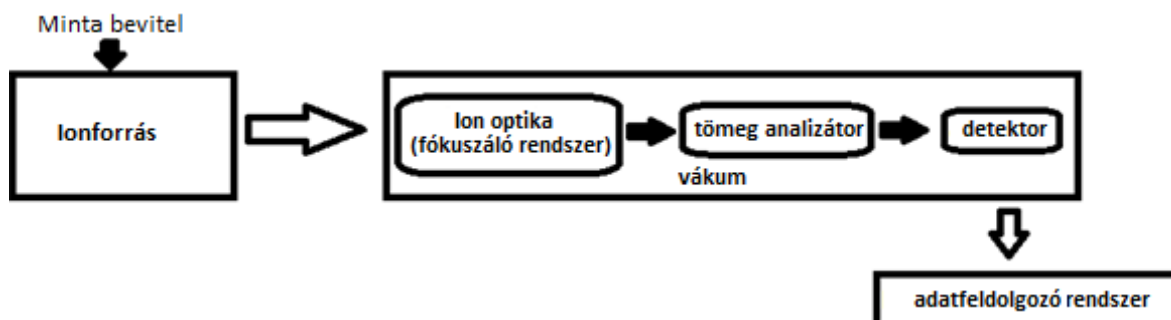
1. dimenzió: izoelektromos fókuszálás
2. dimenzió: SDS-PAGE elektroforézis

## Tömegspektrometria (MS)

A tömegspektrometria egy olyan analitikai technika, ami egy vizsgált mintából nyert ionok típusát és mennyiségét képes meghatározni azok tömeg-töltés ( $m/Z$ ) arányának mérésével.

A mintát egy **ionforrás** ionizálja, majd az ionok el lesznek választva tömegük és töltésük alapján (egy **tömeg analízátorral**). Az elválasztott ionokat egy **detektor** méri. A létrehozott ionok rendkívül rövid életűek és reaktívak, így az analízis vákuumban zajlik.

Az ionizáció (analizálható ionok előállítása molekulákból és atomokból) kivitelezhető kinetikus energiával, fényel, elektromos, vagy kémiai energiával. Az ionforrást követően egy ion optika is helyet foglal, ami fókuszálja a mintát, biztosítja, hogy az ionok azonos kinetikus energiával és egy nyalábban érkezenek meg a detektorba. Ez az ion optika juttatja az ionokat a tömeganalízátorba, vákuumba. A tömeganalízátor elválasztja az ionokat tömeg-töltés arány alapján. A detektor az ionok intenzitását méri és tömegspektrumot készít az ionáramintenzitás és a fajlagos tömeg alapján.



A feljebb leírtak alapján a tömegspektrométer egy ionforrásból, egy tömeganalizátorból és egy detektorból áll. Vákuum berendezések biztosítják a vákuumot és adatfeldolgozó rendszer dolgozza fel az adatokat, valamint ez tartja ellenőrzés alatt a teljes berendezést.

#### *Ionforrás*

A tömegspektrométer ionforrása különböző lehet. Néhány ezek közül atmoszférikus nyomáson, míg mások vákuumban működnek.

Néhány fontos ionforrás típus: elektropray (ESI), léghőri nyomáson történő kémiai ionizáció (APCI), léghőri nyomáson történő fotoionizáció (APPI).

Elektropray ionizáció: elektromos erőterrel hoz létre töltött cseppeket, majd forró nitrogén szárítógáz zsugorítja a cseppeket, ami a töltéssel nem rendelkező részecskéket távolítja el a mintából. Léghőri nyomáson működik.

A léghőri nyomáson történő kémiai ionizáció nagyon hasonló az ESIhez, egy porlasztó itt is cseppeket készít, azonban itt koronakisülések ionizálják a mintát a gáz fázisban.

A léghőri nyomáson történő fotoionizáció során olyan adalékanyagokat adunk a mintához (pl. toluolt), ami erőteljesen elnyeli az UV sugárzást. A porlasztás során az oldatot besugározzuk UV fényel, a mintát az adalék fogja ionizálni.

A legjobban elterjedt tömeg analízátor a quadrupol analízátor (Q), az ion csapda (IT) és a repülési idő analízátor (TOF).

A technikát használhatjuk különböző folyadékkromatográfiai elválasztásokat követően is a proteomikában.

Az MS használható a fehérjék peptid fragmentjeinek azonosításában, a fehérjék szerkezetének vizsgálatában, interakciók és poszt-transzlációs módosítások felderítésében, ...

#### Fehérje szekvenálás

A szekvenálási technika alapja az ún. Edman reakció, ami lehasítja az N-terminális aminosavat a peptid lánc végén.

A módszer elég komplex. Az első lépés a fehérje emésztése, amit egy 2D kromatográfia követ (általában 2D oszlopkromatográfia, vagy RP-HPLC). Edman reakcióval hasítjuk az N-terminális aminosavat fenilizotiocianáttal. A leválasztott N-terminális aminosavat tömegspektrométerrel azonosítjuk egyiket a másik után. Az emésztett részek szekvenálása során megismételjük a mintát más enzimekkel, más hasítóhelyekkel. A szekvenálásokat követően az átfedő szakaszok alapján összeillesztjük a szekvenációt.

#### Mágneses magrezonancia (NMR)

Az NMR-aktív atommagok mágneses erőterben elektromágneses sugárzást nyelnek el, majd sugároznak vissza. A rezonanciafrekvencia jellemző az adott anyagra és függ az elektromos erőter erőségétől, valamint az atom izotópjának tulajdonságaitól. A technikát elsősorban szerkezetvizsgálatra használjuk, például fehérjék 3D szerkezetének vizsgálatában.



## Röntgen diffrakció

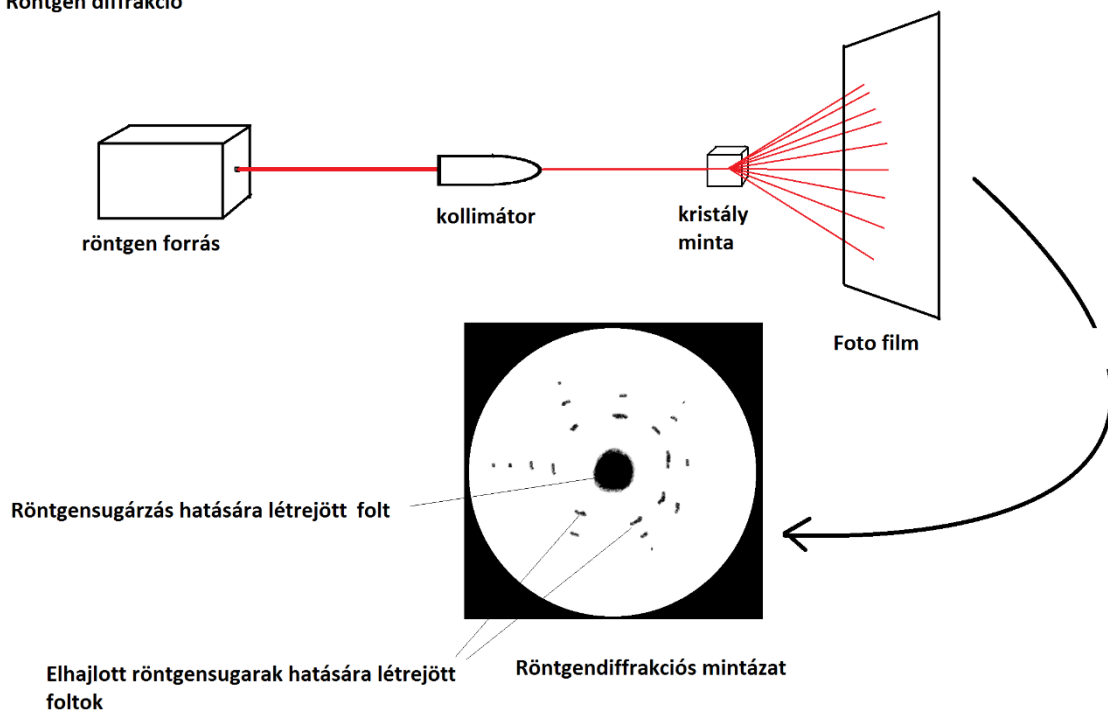
Vagy más néven: Röntgen elhajlás

A röntgen sugárszóródik és elhajlik az elektronburkon. Az interferencia miatt az interferáló röntgensugarak kis foltokat és köröket rajzolnak ki specifikus fotopapírra, ha azok kristályosított anyagon haladnak át (például fehérjén). A sugárzás interferál a különböző atomokról történő szóródás során. Az interferenciakép alapján egy adott atom helye meghatározható a kristályban.

A foltok méretéből következtethetünk az atomok minőségére (az adott anyag felépítésére). A módszer használható nagy molekulák (például fehérjék) vizsgálatára is.

A technika fontos, mivel a DNS szerkezetének leírása röntgendiffrakciós képek alapján lett megoldva (Rosalin Franklin).

Röntgen diffrakció



## Fehérjék interakciói

Egy adott fehérjével (esetleg egy potenciális gyógyszer célpont) kapcsolatban fontos információ, hogy milyen más fehérjékkel lép interakcióba. A szekvencia adatok ismerete segíthet, amennyiben ismert domének funkcionális csoportjai (specifikus kötő aktivitás) találhatóak a fehérjében. A következőkben két módszert ismertetünk röviden, amelyek fehérje interakciók feltárására alkalmasak: pull-down („le-húzási”) módszer és az élesztő két-hibrid esszé.

### Pull-down módszerek

Ezek a módszerek in vitro, minőségi módszerek fehérje-fehérje interakciók detektálására. alkalmazhatók feltételezett kapcsolatok megerősítésére, csali (bait) fehérjével kapcsolódó partnerek felderítésére, sejt lizátummal végzett screening (szűrővizsgálat).

Általánosságban a csali fehérjét N- vagy C-terminális todalékkal expresszáljuk (fúziós fehérje: a vizsgált fehérje affinitás tag-gel). A leggyakrabban használt affinitás tag-ek: GST (glutathion S-transzferáz: glutationt köt); His<sub>6</sub> (6 hisztidin egymás mellett: kétértékű kationokat köt); biotin (sztreptavidint köt). Az

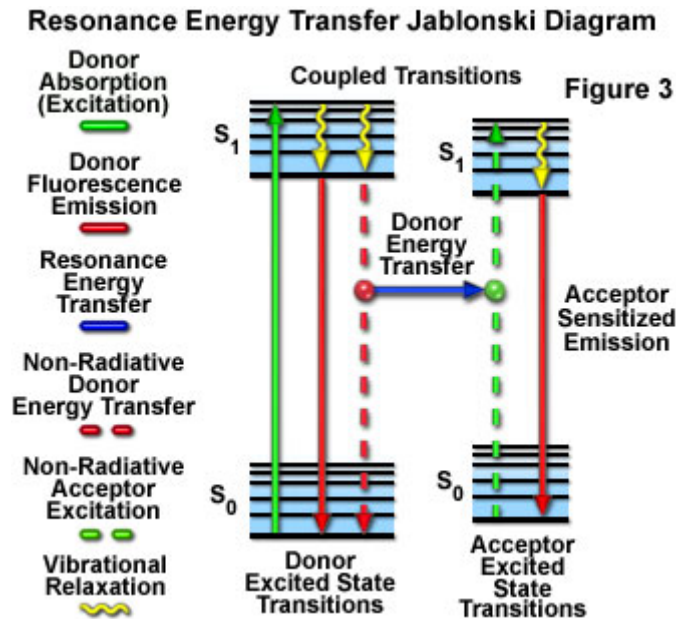
elúció („le mosás”) módszere a toldalék típusától függ (redukált glutation, EDTA, alacsony pH). A csali fehérje az affinitás oszlop anyagágot specifikus ligandon keresztül kötődik. A vizsgált anyag, amely tartalmazza a potenciális kötő partnereket (pl. sejt lizátum) az oszloppal, és így a rákötődött csali fehérjével inkubálódik. A nem kötődő molekulákat kimossuk, majd a kötődött fehérjéket eluáljuk. Az eluált fehérjék gél elektroforézissel, Wester blottal, vagy tömeg spektrometriával analizálhatók.

A pull-down módszerek hátrányai: ha az expresszáldott fehérje nem megfelelően csomagolódott, a kötő affinitása változhat; a toldalék (tag) hatással lehet a csali fehérje szerkezetére és/vagy a kötőhelyére; esetenként az elúció nem egyszerű feladat. Figyelembe kell vennünk, hogy a feltárt fehérje interakciók stabilak, vagy csak átmenetiek. Számos esetben a fehérje csak adott változások után (foszforiláció, GTP-kötés) válik alkalmassá más fehérjék kötésére.

#### Élesztő két-hibrid esszé

Ebben az esszében a két vizsgált fehérjének az élesztő sejten belül (in vivo) kell egymással kapcsolatba kerülnie. Hogy láthatóvá tegyük ezt az interakciót, a két vizsgált fehérjét két különböző expressziós plazmidba kell klónoznunk, és az élesztő sejtet a két plazmiddal egy időben kell transzformálnunk. Az egyik plazmid tartalmazza az egyik fehérje kódoló szekvenciáját fúzionálva egy transzkripciós faktor egyik (DNS kötő domén) részével. A másik fehérje (vagy egy screening könyvtár = library tagjai) a másik plazmidban expresszáldnak fúzióban a transzkripciós faktor másik (aktivációs) doménjével. Az élesztő sejt hordozza egy riporter (jelentéstevő) gén szekvenciáját, amelynek aktivitása egyszerű (enzimatis, kolorimetriás) módszerrel meghatározható. Ha a vizsgált fehérjék a sejten belül kötődnek egymáshoz, a transzkripciós faktor két doménje egymással kontaktusba kerül, így a riporter gén aktivitása mérhetővé válik. A fehérjék kapcsolódása nélkül a riporter génnek nincs vagy csak minimális az aktivitása.

A **Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET)** (vagy Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer) egy biofizikai jelenség, amelyet a molekuláris biológiában molekuláris interakciók nanométeres skálán történő vizsgálatára alkalmaznak. Egy fényérzékeny fluorofór molekula (*donor*), adott hullámhosszúságú fény elnyelésekor magasabb energiaállapotba kerül (*gerjesztődik*). Miközben egy alacsonyabb energiaállapotba lép vissza, fluoreszcencia formájában energiát bocsájthat ki (*emisszió*). Ezen kívül történhet nem sugárzó típusú energiaátadás is, amikor is a donor egy fogadó/vevő (*akceptor*) fluorofór molekulának dipol-dipol kölcsönhatáson keresztül adja át az energiát. Lásd az alábbi Jablonski-diagramot:



3. ábra:

Jablonski-diagram a FRET ábrázolásával

Az energiaátadás **hatékonysága** fordítottan arányos a donor és akceptor **távolságának** hatodik hatványával. A FRET tehát igen érzékeny a fluorofórok távolságának kis változására is, ezért hasznos módszert kínál molekulaszervezeti és molekulaszintű kölcsönhatások vizsgálatához. Gyakran alkalmazzák biológiai vizsgálatokban a kék és a sárga színű cyan fluorescent protein (CFP) – yellow fluorescent protein (YFP) párt donor és akceptor molekulaként.

### Rekombináns fehérjék expressziója

Nagy mennyiségű tiszta fehérje nyerhető olyan módon, hogy a kódoló mRNS-ről írt cDNS-t expressziós vektorba klónozzuk, gazda sejtben nagy mennyiségű fehérjét szintetizáltatunk, és a fehérjét specifikus szekvencia vagy egyedi jellegzetesség segítségével kitisztítjuk. Ilyen módon terápiában használt peptidok és fehérjék is előállíthatók (rekombináns technológia).

A rekombináns fehérjék expressziójának **célja lehet**: a cél fehérje szerkezetének és funkciójának tanulmányozása, e fehérje terápiás alkalmazása, specifikus ellenanyagok termelése, a fehérje alkalmazása célmolekulaként gyógyszer előállítására. Az **expressziós vektor** az eszköz arra, hogy az idegen DNS-t a gazda sejtbe juttassuk és a klónozott fehérjét nagy mennyiségben termeltessük. A vektor plazmid vagy rekombináns vírus lehet. A **gazda sejt** lehet baktérium (olcsó, könnyen kezelhető, de az eukarióta fehérjék nem mindig csomagolódnak benne megfelelően); élesztő (eukarióta fehérjékre); emlős sejtek (drága, nehéz nagy mennyiségű fehérjét kinyerni).

A módszer **közös lépései**:

- a fehérje kódoló szekvenciájának megszerzése
- a megfelelő expressziós rendszer kiválasztása (mire fogjuk a tisztított fehérjét használni, a tisztítás módja, a fehérje eredete, lehetséges poszttranszlációs módosítások, nagyfokú expresszió toxikus vagy nem)
- cDNS expressziós vektorba klónozása restriktív enzimek segítségével (= rekombináns plazmid)
- gazda sejtek transzformálása a rekombináns plazmiddal

- a sejtek növelés és az expresszió indukálása
- az expresszált fehérje tisztítása és azonosítása.

A könnyebb tisztíthatóság kedvéért a fehérjéket a C- vagy N-terminálisukon **specifikus tag-gel** (toldalék) lehet ellátni. Ez a tag a fehérje szekvenciájához a PCR során adható, vagy a fehérjét kódoló DNS-t úgy klónozzuk a vektorba, hogy az már hordozza a tag-et (ügyelni kell arra, hogy a szekvenciák in frame legyenek, azaz az olvasási keret megmaradjon a transzláció során). A **bakteriális gazdasejtek** alkalmazásakor nem szabad elfelejteni, hogy eltérés lehet a kodon használatban, poszttranszlációs módosulatokban, a foldingban vagy a toxicitásban a prokarióta és eukarióta fehérjék között.

Egy prokarióta gazda sejtben alkalmazott **expressziós vektor** az alábbi szekvenciákat tartalmazza: replikációs origo; antibiotikum rezisztencia gén (a transzformált sejtek kiválasztására); többszörös klónozó hely (a cDNS beillesztésére a megfelelő irányban és leolvasási keretben); promóter szekvencia (konstitutív vagy indukálható); terminációs szekvencia; riboszóma kötő hely a transzlációhoz; esetleg egy tag (affinitás tisztítás lehetőségéhez, esetleg a fehérje és a toldalék között hasítási helylyel).

**Indukált expresszió:** a transzformált sejtek (amelyek hordozzák a rekombináns plazmidot) az exponenciális fázis közepéig növekednek, majd az indukáló szert a médiumhoz adjuk (az indukáló szer koncentrációját és az indukálás időtartamát kísérletesen kell meghatározni), további növekedést követően a sejteket összegyűjtjük (centrifugálással), mossuk, feltárjuk (lizáljuk), és a fehérjét kitisztítjuk.

## MODELL ORGANIZMUSOK

„Ami igaz az *E. coliban*, az igaz az elefántban is.” - Jacques Monod

A modell organizmusok segítségével tanulmányozhatóak a különböző biológiai folyamatok. Számos biológiai, biokémiai folyamat erősen konzervált, ezért vizsgálhatóak számos élőlényen, a megszerzett tudásanyag alkalmazható több organizmusra is.

Modell organizmusként számos élőlényt alkalmaznak a vírusoktól a főemlősökig, de többségükre igazak az alábbi tulajdonságok:

- könnyen tartható és szaporítható
- rövid életsiklus
- genetikailag ismert (ideális, ha a teljes genom szekvenciája ismert)
- speciális törzsek

Általában a modellként alkalmazott élőlények önmagukban nem bírnak jelentős orvosi vagy gazdasági jelentőséggel, de az általuk megszerzett tudás, bizonyos megkötésekkel, alkalmazható más fajokra is.

### Példák modell organizmusokra

#### Baktérium

*Escherichia coli*: Valószínűleg a világ leginkább ismert élőlénye. Rövid osztódási ciklussal (20-30 perc) rendelkező Gram negatív bélbaktérium. Cirkuláris, haploid genomja teljes egészében ismert, számos módszerrel módosítható a genetikai állománya. A laborban alkalmazott törzsek általában nem patogének.

#### Élesztőgomba

*Saccharomyces cerevisiae* (közönséges élesztő): A mindennapi életben is gyakran alkalmazott (sütés, sörfőzés) diploid, egysejtű élőlény. Számos biológiai folyamata nagymértékű hasonlóságot mutat a

többi eukariótáéval, ezért számos alapvető felfedezésben játszott szerepet. Az osztódási ideje ideális körülmények között 90 perc.

### Növények

*Arabidopsis thaliana*: A lúdfű egy kicsiny virágos, kétszikű növény. Annak ellenére, hogy mezőgazdasági jelentősége nincs, az egyik legalaposabban tanulmányozott növény, ami a kisméretű genomjának és rövid életidejének köszönhető. Örökítő anyaga az *Agrobacterium tumefaciens* nevű talajbaktérium segítségével relatíve egyszerűen manipulálható.

### Állatok

*Caenorhabditis elegans*: Talajlakú, körülbelül egy mm hosszú fonálféreg. Fejlődésbiológia kedvelt modell állatává teszi áttetsző teste és a felnőtt egyedek ismert, állandó sejtszáma (hím: 1031 sejt, hermafrodita: 959 sejt). Baktériumokkal táplálható. Számos fontos eredményt köszönhetünk nekik, például az apoptózis és az RNS interferencia részleteinek felfedezését.

*Ecetmuslica* (ecet muslinca, *Drosophila melanogaster*) Apró termetű légy. Rothadó, erjedő gyümölcsök körül nagy számban megtalálhatóak. Rövid élettartalommal és mindössze négy kromoszómával rendelkezik. Thomas Hunt Morgan laboratóriumának köszönhetően a genetika és a fejlődésbiológia fontos modell állata.

Zebradánió (*Danio rerio*): Akváriumokban díszhalként előszeretettel tartott kistermetű hal. Fejlődésbiológiai kutatásokban gyakran alkalmazzák, mivel a lárva áttetsző és az anya szervezetén kívül fejlődik.

Egér (*Mus musculus*): Számos biológiai folyamat az emlősökre jellemző. A legkedveltebb emlős modell állat a közönséges egér. Kis mérete, gyors szaporodása ideális modell organizmussá teszik. Genomja ismert, továbbá léteznek betegségeket modellező törzsek is. Létrehozhatóak transzgenikus és knock out egyedek is.

Bizonyos esetekben számos más élőlény is alkalmazható, mint modell állat. Például: patkány, tengeri malac, kutya, macska, sertés, csimpánz.

### Genetikailag módosított organizmusok (GMO), transzgenikus élőlények

Genetikailag módosított organizmusnak nevezzük azokat az élőlényeket, melyek genetikai állományát modern molekuláris biológiai módszerekkel módosították.

Szigorúan vett transzgenikus élőlény, amelybe egy másik fajból származó gént vagy DNS szakaszt illesztettek be. Ennek számos előnye lehet, mind az alaputatásban, mind az alkalmazott kutatásban. Például: humán gének funkciójának vizsgálata modellorganizmusokban, fontos peptidok, fehérjék termeltethetőek nagy mennyiségben (pl. inzulin termeltetés élesztővel) vagy szárazságtűrő növények kifejlesztése.

Knock-out (KO) módosítás, mikor egy gént szelektíven mutálnak, "kiütnek", ami funkcióvesztéssel jár. Megkülönböztethetünk permanens és indukálható KO módosításokat. Az utóbbi esetben a vizsgált gén expressziója egy hatóanyaggal szelektíven blokkolható, így olyan mutációk is vizsgálhatóak, melyek letálisak lennének az élőlény korai életszakaszában.

## KÉPALKOTÓ MÓDSZEREK

### Mikroszkóp

Vannak olyan struktúrák: sejtek, szövetek és azok finomstruktúrái, amik csak (nagyon) magas nagyítás mellett vizsgálhatóak.

Struktúra	Átlagos méret
Szövetstruktúra	100 $\mu\text{m}$
Egy átlagos sejt	10-50 $\mu\text{m}$
VVT	7,5 $\mu\text{m}$
Kromoszómák	1-5 $\mu\text{m}$
Baktérium	0,1-1 $\mu\text{m}$
Vírus	10-100 nm
Fehérje	2-20 nm
Aminosav	0,33 nm

Ezeket a kicsi struktúrákat különböző mikroszkópokkal tudjuk vizsgálni. Az elsőként kifejlesztett mikroszkópok fénymikroszkópok voltak a 17. században. Ezekkel a mikroszkópokkal már lehetséges volt sejtek vizsgálata. Ma már számtalan mikroszkóptípust ismerünk, ezek azonban alapvetően 2 csoportba sorolhatóak: fénymikroszkópokra (=optikai mikroszkópokra) és elektronmikroszkópokra.



### Fénymikroszkóp

*Hagyományos fénymikroszkóp (=optikai mikroszkóp)*

Ez a mikroszkóp a látható fényt (~400-800nm) használja képalkotásra. Lencserendszerek (optikai rendszer) nagyítja a minta képét.

#### Optikai rendszer

Általában összetett mikroszkópokat használunk, ami azt jelenti, hogy nem egyetlen lencsét, hanem lencserendszert tartalmaz a mikroszkópunk.

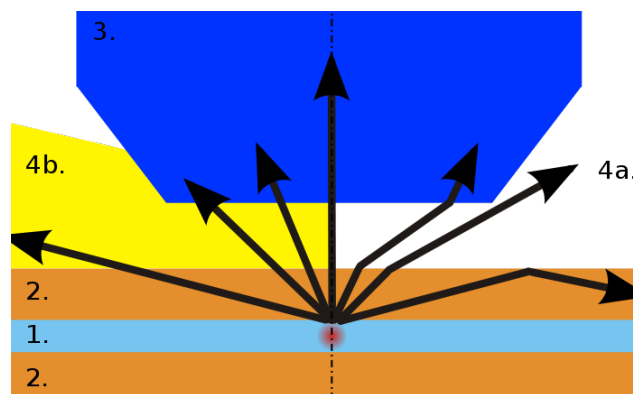
A minta általában nagyon vékony és fényel átvilágítva a rajta keresztülhaladó fényel vizsgálódunk. A lencsék nagyítják, és többször megfordítják a képet.

Legalább két lencsére van szükségünk (általában az egyetlen lencseként ábrázolt részekben lencserendszereket találunk): egyre a minta közelében, ez az objektív lencse, egyet pedig a szemünk közelében, amit okulárnak, vagy szemlencsének hívunk. Az objektív lencse nagyítja a képet, valós, nagyított képet továbbít a szemlencse felé, ami tovább nagyítja azt.

**A teljes nagyítást úgy kapjuk meg, ha az objektív lencse és a szemlencse nagyítását összesorzuk** (Tehát ha van egy 10x objektív lencsénk és egy 20x szemlencsénk, akkor a teljes nagyítás 200x.)

Objektív: lencse, vagy lencserendszer, az egyik legfontosabb része, ez határozza meg elsősorban a kép minőségét és a felbontást.

Immerziós lencse: speciális objektív lencse. A minta és az objektívlencse közötti levegő (a levegő törésmutatója), mint törőközeg, behatárolja, mekkora nagyítás érhető el egy mintáról. Használhatunk azonban specifikus immerziós lencsét immerziós olajokkal, így sokkal nagyobb, 60-100x nagyítású objektív lencsét is használhatunk. Az olaj törésmutatója nagyobb, így több fényt képes gyűjteni a mintáról, így annak nagyobb részét vizsgálhatjuk.



1. Minta
2. Tárgylemez és fedőlemez
3. Objektív
4. a, hagyományos használat, a minta és az objektív között levegő van  
b, immerziós olaj a minta és az objektív között

Megvilágító rendszer

**Fényforrás:** lámpa, vagy tükör, ami a fényt a mintán keresztül küldi

A lámpa és a minta között találjuk az állítható kondenzort, vagy írisz diafragmát=látótérrekeszt. Ezekkel állíthatjuk a bejutó fény mennyiségét, így a kontrasztot erősíthetjük, ez azonban lecsökkenti a fény mennyiségét is.

**Felbontás:** az a legkisebb távolság, ami a mikroszkópban még két külön pontnak látszik. Ez az egyik legfontosabb paraméter, ami egy mikroszkópot jellemez, és ami alapján egy mikroszkópot minősíteni tudunk.

*Sztereo mikroszkópok (=boncoló mikroszkóp)*

A sztereomikroszkópok alacsonyabb nagyítással rendelkeznek. Ezek a mikroszkópok általában nem az áthaladó fényt használják, hanem a minta felületéről visszaverődő fényét. Elsősorban felületek vizsgálatára alkalmas, mikrosebészeti eljárások során (pl. fogászati beavatkozások) és a mérnöktudományokban. A fényforrás a minta fölé van helyezve.

A sztereomikroszkópok két különálló, eltérő szögű optikai úttal rendelkeznek, ezek jutnak el a két szemhez. Ezzel szemben a fénymikroszkópok két okulárjában ugyanazt a képet látjuk, csak megosztva. (A két benéző csak a kényelmet szolgálja.) A két eltérő szögű optikai út eredményeképpen **há-**



**romdimenziós** képet kapunk! Ezzel különböző dolgok felületét jobban vizsgálhatjuk. Használhatjuk (mikro)sebészeti eljárásokhoz, ékszerészeti célokra, fogászati mikroszkópként, ---

A hagyományos fénymikroszkópok esetén is 2 okulárunk van, azonban ott nincs 2 optikai útvonal, a mikroszkóp ugyanazt a képet osztja meg a 2 szemnek. (A két szemnek juttatott kép nem tér el egymástól és egy monokuláris mikroszkóptól, a binokuláris nézet kiárólag a kényelmet szolgálja.)

Festés

A különböző vizsgálatokhoz szükségünk lehet arra, hogy bizonyos sejteket, sejtstruktúrákat, vagy bizonyos kémiai anyagokat jelöljünk, vagy csak egyszerűen növeljük a minta kontrasztját. Ehhez különböző jelölőket tudunk felhasználni. Használhatunk fluoreszcens jelölőket is, ebben az esetben szükségünk van a fluoreszcens festék mellett megfelelő megvilágításra (gerjesztésre) képes lámpára is (pl.: higany gőz lámpa).

### Elektron mikroszkóp

Az elektronmikroszkópok felbontása jobb, mint a fénymikroszkópoké, mivel elektronnyalábokat használ a kép elkészítéséhez és az elektronok hullámhossza 100.000x rövidebb, mint a látható fotonoké.

Az elektronmikroszkópok több típusát ismerjük. A transzmissziós elektronmikroszkópok (TEM) esetén az elektronnyaláb keresztülhalad a mintán és az elektronforrással szemben történik a detektálás. A reflexiós elektronmikroszkópia (REM) során visszaverődött elektronokat detektálunk, ami így a felületről ad nekünk információkat. A scanning elektron mikroszkópok (SEM) egy vékony elektron sugárral tapogatják le a mintát pontról-pontra.

## SEJTKULTÚRÁK

A sejt kultúrákban a sejtek ellenőrzött körülmények között vannak „tartva”, a szervezeten kívül, sejt kultúra tenyésztőedényekben (flaska), vagy csövekben. Általában sejt kultúra alatt eukarióta többsejtű élőlényekből származó sejttenyésztet értünk. Azonban, mint minden technikának, a sejt kultúráknak is vannak korlátai: a sejt vonalakon végzett kísérletek eredményei nem vetíthetők ki egy az egyben az emberi szervezetre.

A **primer vagy elsődleges sejt kultúrák** szövetből „frissen” izolált sejtekből készülnek. Az ilyen sejtek funkcionális és fiziológiás tulajdonságai közelebb állnak a testben lévő sejtekhez, ezért biológiai kísérletekben ezek működnek legjobb modellként. Ám nehezebb kinyerni és kultúrában megtartani őket. A primer sejt izoláció egyik célja lehet a „tisztá”, csak egy sejt típust tartalmazó tenyésztet létrehozása. A primer sejtek korlátozott számú sejtosztódásra képesek (Hayflick korlát). Primer sejt kultúrát főleg állati szövetekből hoznak létre. A primer sejt izoláció lépései:

- A szerv/szövet izolálása
- Az extracelluláris mátrix emésztése (tripszin, kollagenáz)
- A sejtek tápoldatba helyezése (médiüm)

**Másodlagos vagy szekunder sejt kultúrák** primer sejt kultúrák továbbvitelével (passzázs, subculturing) hozhatók létre.

**Sejttörzsek** primer sejtek többszöri továbbvitelével jönnek létre. Az ilyen tenyésztetek véges élettartamúak (40-50 passzázs).

A **sejt vonal** immortalizált, osztódó sejtek genetikailag homogén tömege. Tumorszövetből, hibridómából vagy adenovírusból származnak. A sejtek telomeráz aktivitása miatt a sejt vonalak végtelesen számú osztódásra képesek. Tenyésztetben tartásuk könnyű, minőségük állandóbb, így az egyes kísérletek közötti eltérések kisebbek lesznek. Néhány általánosan használt sejt vonal:



- HeLa: az első immortalizált sejtvonal, méhnyak karcinóma eredetű (Henrietta Lacks-tól származik), számos alkalmazásra általánosan használják (Salk-féle polio vakcina).
- Jurkat: immortalizált T-lymphocyta sejtvonal, főleg immunológiai kísérletekhez használják. Szuszpenzióban nőnek.
- CHO: Chinese Hamster Ovary: nem emberi eredetű, alacsony kromoszómaszámú ( $2n=22$ ) sejtkultúra, intenzív fehérje expresszió jellemzi.

Sejtvonalakat számos alkalmazásban használják: gyógyszer szűrés, toxikológiai szűrés, fehérjetermelés, vírustenyésztés, génexpressziós kísérletek.

A **sejtbankok** a sejtörzsek és sejtvonalak tárolását végzik, speciális krioprotektív médiumban, folyékony nitrogénben.

A sejtkultúrák kísérleti felhasználásának előnyei:

- specifikus, homogén sejtpopuláció
- precíz és reprodukálható kísérletek
- ellenőrzött környezet
- a sejtfunkciók megfigyelése (Nem vetíthető ki egy az egyben a teljes szervezetre!)
- (részben) kiváltja az in vivo állatkísérleteket

A **transzfekeció** során a tenyésztet sejtjeibe idegen DNS szakaszt juttatunk. Célja egy gén funkciójának és szabályozásának, valamint a fehérjetermék funkciójának vizsgálata. **Stabil transzfekecióról** beszélünk, ha a genetikai anyag beépül a gazdasejt genomjába, és folyamatosan kifejeződik. **Tranziens (átmeneti) transzfekeció** esetében az idegen gén nem integrálódik a gazdasejt genomjába, a génekifejeződés korlátozott ideig figyelhető meg.

Transzfekeciós módszerek:

- biológiai (transzdukeció): vírus-mediált folyamat, amely eukarióta expressziós vektort (plazmidot) alkalmaz
- kémiai: negatív töltésű nukleinsavak és pozitív töltésű molekulák komplexe kötődik a negatív töltésű membránhoz, így jutva a sejtbe
- fizikai: mikroinjekció, elektroporáció, lézer-alapú transzfekeció

A transzfekeció lépései eukarióta expressziós vektorok használatával

- A célgén (az idegen szakasz) beklónozása expressziós vektorba
- A vektor amplifikálása (felszorzása) kompetens baktériumokban
- A vektort tartalmazó baktériumok kiválasztása szelekciós marker segítségével
- Plazmid DNS izolálása a kiválasztott klónokból
- A plazmid bejuttatása a gazdasejtbe
- Génexpresszió/fehérjeszintézis változásának vizsgálata

## SPECIÁLIS MÓDSZEREK A GENETIKÁBAN

### Kromoszómaszám és struktúra, jelölési technikák

A kromoszóma mutációk olyan változások, amik a kromoszóma átrendeződésével (strukturális eltérések), vagy a kromoszóma (vagy részének) mennyiségbeli változásával járnak. Ezeket a citogenetika eszköztárával vizsgálhatjuk: genetikai és mikroszkópos módszerekkel.

A kromoszóma mutációk főként a petesejtben, vagy a spermiumban kialakult balesetekből erednek, így a változás a kifejlett szervezet összes sejtjében jelen lesz. Ennek ellenére egy változás létrejöhet a

megtermékenyítés után is, ami mozaikosságot eredményez, azaz csak a sejtek egy része fog eltérő genetikai állományt hordozni.

A kromoszóma eltérései lehetnek öröklöttek egy szülőtől (mint amilyen egy transzlokáció), vagy kialakulhatnak „de novo” (újonnan). Éppen ezért fontos a szülők kromoszómáit is vizsgálni egy gyermeknél felfedezett genetikai eltérés esetén.

### Citogenetika

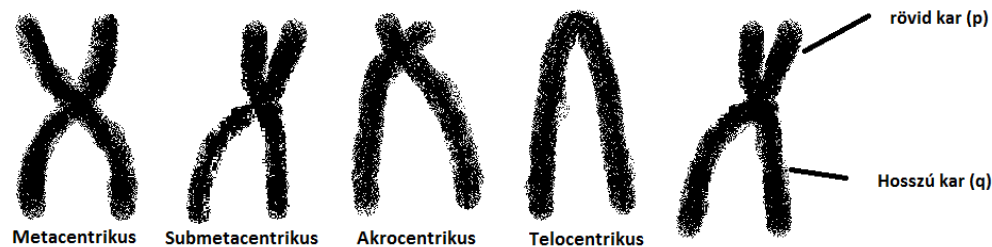
A citogenetika a **citológia** és a **genetika** határterülete, ami a kromoszómák vizsgálatát foglalja magába. A citogenetika feladata a normális és kóros kromoszómák vizsgálata: **szerkezetük, fenotípusuk, számuk** és az ezek közötti kapcsolat leírása, kromoszóma rendellenességek okainak feltárása.

Egy sejt kromoszómaszerelvényének leírásához és vizsgálatához általában különböző sávozási technikákat és in situ hibridizációt használunk.

Általában kondenzált kromoszómákat vizsgálunk, ezért olyan sejtekre van szükségünk, amik a mitózis metafázisában vannak. (Emlékeztető: a metafázisban a már megkettőződött DNS erősen kondenzált, a testvérkromatidák még együtt vannak.) Vizsgálhatunk spontán osztódó sejteket (tumorsejteket, vagy csontvelőből származó sejteket), vagy indukálhatjuk az osztódást más sejtípusokban mitogén anyagokkal (pl.: fehérvérsejtekben). Ezt követően a sejtosztódás specifikus mozzanatait gátolhatjuk, pl. a mitotikus orsó kialakulását kolcemiddel, vagy kolhicinnel, így a sejtosztódás a metafázisban ragad.

### Kromoszóma morfológia

A kromoszómákat különböző morfológiai csoportokba oszthatjuk a centromer relatív helyzete alapján. A kondenzáltság mértéke alapján a karok hossza eltérő lehet, azonban egymáshoz viszonyított arányuk állandó.



### Sávozási technikák

Mivel a különböző kromoszómák morfológiája, a p és q karok hossza nagyon hasonló lehet, a natív kromoszómák azonosítása elég bonyolult feladat, ezért használunk úgynevezett „sávozási technikákat”. A kromoszómák festését és sávozását többféleképpen végezhetjük. Az így létrehozott sávokat arab számokkal jelöljük.

**A kromoszómák száma, alakja és sávozásos festődése karakterisztikus és fajspecifikus.** Természetesen létezik kromoszóma-heteromorfizmus (vannak kisebb eltérések), de az egészséges kariotípusok közötti eltérés azonos faj esetén igen kevés.

A kariotípust, azaz a kromoszómaszerelvényt vizsgálva a sejteket a mitózis metafázisában fixáljuk (ahogy feljebb található). Ezt követően a hipotóniás körülményeket teremtünk, ami miatt a sejtek megduzzadnak, így az egyes sejtek és azok kromoszómái is messzebb kerülnek egymástól, ami megkönnyítve a későbbi megfigyelésüket.

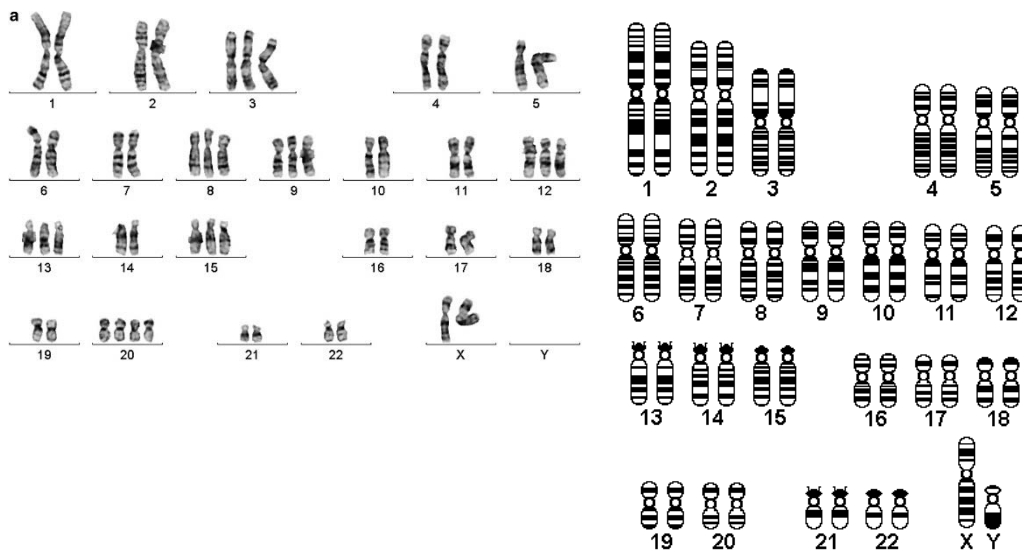
Néhány sávozásos technika:

- Q-sávozás: a kromoszómák fluoreszcens festése, pl. a kvinakrinnal (quinacrine hidroklorid)
- G-sávozás: Giemzával történő festés trypsin emésztést követően
- C-sávozás: savas, majd bázikus kezelést követő Giemsa festés (reversed Giemsa)

*Kariogram vs ideogram*

**Kariogram:** a sejt kromoszómaszerelvényéről készített fotó: ahol a kromoszómákat azok mérete, alakja és sávozása alapján sorba rendezzük.

**Idiogram:** sematikus kép (rajz/grafika) a sejt kromoszómaszerelvényéről: egy ideális kép, ahogy a kromoszómáknak ki „kellene” nézniük.



## Molekuláris citogenetika

### In situ hibridizáció

A technika során ismert szekvenciájú, jelölt oligonukleotidokat használunk, amik a velük komplementer minta DNS szakaszaival bázispárosodni képesek. A kötődésükkel a komplementer szakaszok jelenlétét igazolják a mintában. A technika előnye, hogy nincs szükség hozzá kondenzált kromoszómákra. Amennyiben mégis kondenzált kromoszómákat használunk, a jelölni kívánt szakasz helyét is azonosíthatjuk.

Az in situ hibridizáció jóval érzékenyebb technika a sávozásnál. (És természetesen jóval drágább is.) Míg a sávozással csak a 2 Mbp-nál nagyobb változások észlelhetők, az in situ hibridizációval már néhány bp-os átrendeződések is feltérképezhetők. Elsőként izotópos jelöléseket használtak, ma főként fluoreszcensen jelölt oligonukleotidokat használunk (lásd FISH).

## GYÓGYSZERÉSZETI KUTATÁSOK SPECIÁLIS MÓDSZEREI

### Szerkezet alapú gyógyszertervezés

A szerkezet alapú **gyógyszertervezés alap lépései** a következők: a cél (target) molekula kiválasztása, klónozása és tisztítása; a célmolekula szerkezetének meghatározása; a célmolekulán interakciókra alkalmas régióinak azonosítása; komputer programok segítségével olyan molekulákat azonosítani, amelyek a kiválasztott molekula részhez kötődnek; vezető komponensek szintézise; a kapcsolódó molekulák biológiai vizsgálata; a célmolekula-vezető molekula komplexének szerkezete és a vezető molekula lehetséges optimalizálása.

A célmolekula kiválasztása biológiai és biokémiai vizsgálatok segítségével történik. A szerkezet alapú gyógyszertervezés akkor valósítható meg, ha a célmolekula kapcsolatba hozható egy humán betegséggel, és a molekula aktivitásához egy kis komponens megkötése szükséges. Ez a kis komponens a célmolekula meghatározott helyéhez kötődik, így más, ezt utánozó molekulák versengeni tudnak a kötődési helyért. A szerkezet alapú gyógyszertervezésnek jó célpontjai a G-protein kapcsolt receptorok, ion csatornák, proteázok, kinázok és hormon receptorok, hogy csak a leggyakoribbakat említsük. Humán betegség esetében a gyógyszernek meg kell változtatnia a célmolekula aktivitását, és lehetőség szerint az ép sejtek működésébe nem szabad beleavatkozni. Egy kórokozó elleni gyógyszernek a patogén organizmus működését teljesen gátolnia kell, így ezek a célmolekulák esszenciális, patogén specifikus molekulák.

A **célmolekula szerkezetének** meghatározásához általában a molekula kristályos állapotára van szükség. Ha ez valamilyen okból nem megvalósítható, akkor egy homológ modell lehet a helyettesítő. A ligand kötő hely (enzim aktív centruma vagy kommunikációs hely például) sok esetben egy molekulán lévő mélyedés hidrogén kötés donor/akceptor vagy hidrofób interakcióra alkalmas szekvenciával. **Két fő módszere** van a célmolekulát kötő aktivitással rendelkező komponensek létrehozásának: kísérletes vagy komputer-alapú. Az utóbbinak **három kategóriája** van: inspekció (megtekintés), látszólagos screening és de novo szintézis. Az inspekció ebben az esetben azt jelenti, hogy a célmolekula ismert kötő partnereit próbáljuk úgy változtatni, hogy gátló hatásúvá váljanak. A látszólagos (virtuális) screening során in silico keresünk a kis molekulák adatbázisában a célmolekulát kötő csoportokat. Más esetekben in silico kis fragmentumokat hozunk létre és komputer programok segítségével választjuk ki közülük a célmolekulához leginkább kötődőket. A potenciális vezető komponenseket meg kell szintetizálni és le kell tesztelni. Még ezelőtt a jelölt molekulákat értékelni kell: célmolekulához való affinitás, orális bioavailability („biológiai hozzáférhetőség”), stabilitás, szintézis folyamata.

### Kombinatorikus kémia

A módszer lényege, hogy kémiai könyvtárakat hozunk létre, amelyekből gyógyszerfejlesztés vezető vegyületei kerülhetnek ki. Ezek a könyvtárak különböző, de bizonyos tekintetben rokon vegyületek, amelyeket szintetikus úton hozunk létre, és egy időben tesztelünk biológiai aktivitásukat vizsgálva. A módszer alkalmazható egy meghatározott targethez új vezető molekulák kifejlesztésére, vagy egy meglévő vezető molekula módosulatának létrehozására. A módszerben alkalmazott reakciók során különböző építőelemek kovalens kapcsolódása történik olyan módon, hogy a szerkezet nagyszámú variációja keletkezzen. A reakciók oldatban és szilárd felületen is lejátszódhatnak. A mechanizmus alapján párhuzamos szintézis vagy szétosztás-összekeverés (split and mix) szintézis. A párhuzamos szintézis során minden anyag minden kis csoporttal reagál, aztán a reakciókat annyi felé osztjuk, amennyi a következő reakcióban részt vevő kis csoportok száma. A split and mix módszer során minden reakció lépés végén a termékeket összevonjuk, összekeverjük, aztán újra szétosztjuk a következő reakcióra, ahány reagáló kis csoport van - ezeket a lépéseket többször ismétljük, hogy nagyméretű, komplex könyvtárakat nyerjünk.

### High-throughput screening (HTS) = nagy áteresztőképességű szűrés

A gyógyszer célpontok és a potenciális gyógyszermolekulák számának növekedése szükségessé tette, hogy a hagyományos szűrési és tesztelési módszereket megváltoztassák. Ezt a változást segítette a miniatürizálás és az automatizálás térhódítása is. A HTS definíciója: 10 000 – 100 000 vegyület tesztelése egy adott rendszerben egy nap alatt. Korábban a 96-lukú lemezek (plate) alkalmazása szolgáltatta a leggyorsabb eredményeket. Manapság 384- illetve 1536-lukú lemezek használata terjedt el a szűrések során. Ezeknek az is előnye, hogy nagyon kis volumenben játszódnak le a reakciók. Az eddig megszokott célmolekula csoportok (enzimek, ion csatornák, GPCR-ok) mellett újak is megjelentek: transzporterek, receptorok, jelátviteli utak, fehérje-nukleinsav interakciók, DNS/RNS interakciók - amelyek már nemcsak biokémiai, hanem sejt alapú célmolekulák is.

A könyvtárak méretének növekedése miatt a gyógyszerkutatásban új folyamatok jelentek meg. A szűrési módszerek során új eszközöket alkalmazunk (rekombináns sejtvonalak például). A szűréseknek különböző típusai vannak: dereplikáció – a reagáló vegyületek közül kiválasztjuk azokat, amelyek már ismertek és tanulmányozottak; szelektív szűrés a target és más célmolekulák között játszódik le. Napjainkban egy szer hatásmechanizmusának megértése fontosabb, mint korábban volt. Több energiát fordítanak a vezető molekulák optimalizálására, és a szűrés során a biológiailag aktív molekulák kiválasztására. Új vonása a szűréseknek az, hogy nem feltétlenül a teljes könyvtárat szűrik, hanem a legjobb helyre sorolt vegyületek csoportját („fókuszált könyvtár”) használják, így az oldatban keletkező melléktermékek számát is csökkenthetik.