

A Biotechnológia természettudományi alapjai

Műszaki Menedzser MSc hallgatók számára

Hallgatói előadás-jegyzet

Előadó: Dr. Pécs Miklós egyetemi docens

pecs@eik.bme.hu

Lejegyezte: Koroncz Eszter, lelkes hallgató

Oktatási anyagok találhatóak az

www.oktatas.ch.bme.hu

/oktatas

/konyvek

/mezgaz

/BiotechManager

alkönyvtárban

A tananyag felépítése

Genetikai alapok: (1-2 előadás)

A DNS replikációja,
mutációk,
repair mechanizmusok
operon szabályozás

Mikrobiológiai alapok:

Tulajdonságok, felosztás, szaporodás, a mikrobák és környezetük

Génmanipulációs módszerek:

Indukált mutáció+szelekció anyagcsere mérnökség
Protoplaszt fúzió,
Célzott génbevitel plazmidokkal,
Génbevitel agrobaktériumokkal,

Génmanipulált mikroorganizmusok

Génmanipulált növények

Génmanipulált állatok

Biotermékek gyártása

Szabályozás, engedélyezés

1. Genetikai alapok

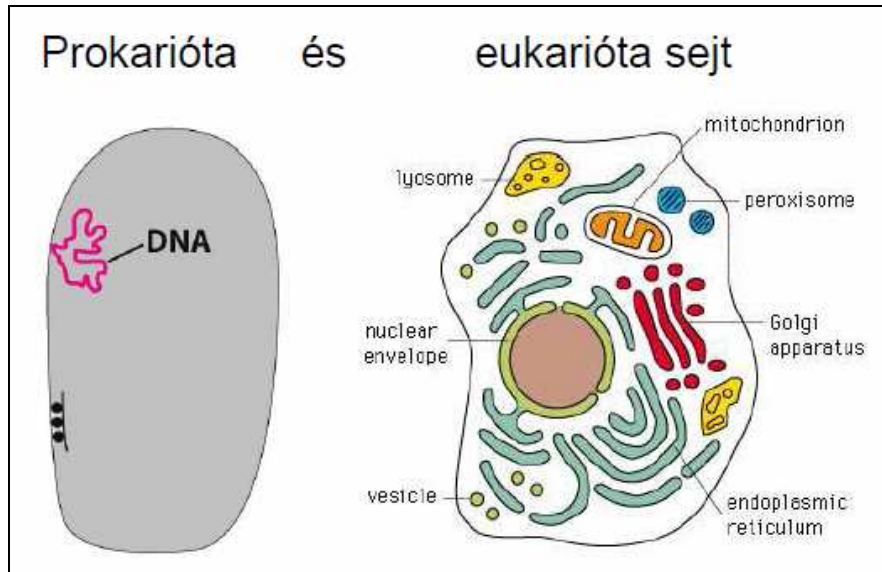
I. Prokarióták és eukarióták

Az élővilágban az élő sejtekkel foglalkozunk, ezek az sejtek, azonban nem egyformák. A legfőbb probléma a természettudományban is akárcsak a társadalomtudományban abból származik, hogy valamit elnevezünk egy névvel és utána egységesnek tekintjük, pedig tulajdonképpen nem az. Így van ez a sejtekkel is, melyek általában nem egyformák, tehát alapvető különbségek vannak a sejtek működése között így másképpen kell az egyikkel bánni és máshogyan kell a másikkal bánni. Így az első dolog az, hogy megkülönböztessük a sejteket.

Prokariótáknak nevezzük azokat az egyszerűbb élőlényeket (a primitív szó, mellyel sok helyen találkozunk helytelen elnevezés, hiszen ha egy élőlény év-százmilliókon át fenn képes maradni és nem hal ki, az nem nevezhető primitívnek), tehát az egyszerűbb élőlények, az evolúcióban előbb megjelenők a prokarióták, melyeknek nincs valódi sejtmagjuk. Idetartoznak a baktériumok, beleértve a fonalas szerkezetű sugár-gombákat (*Actinomycetales*) is, és a kékmoszatok (a kékmoszatokat újabban már kékbaktériumoknak (*Cyanobacteriales*) nevezik, éppen azért, mert ők prokarióták).

Az **eukariótáknak** a prokariótákkal szemben van valódi sejtmagjuk, méghozzá egy biológiai membránnal körülhatárolt, jól elkülönült, mikroszkóppal is megnézhető sejtmagjuk van.

Tulajdonképpen ugyanazok az molekulák megtalálhatók a prokariótákban is csak nincs meg ez az elkülönült szerkezet. Az eukarióták evolúciósan később jelentek meg, lassan, fokozatosan kialakult egy zárt belső sejtmag, és ezek a sejtek bonyolultabbak és összetettebbek lettek, mint a prokarióták, így ezek a sejtek bonyolultabb és összetettebb működésre is képesek, mint a prokarióta sejtek. Az eukarióták közé soroljuk az élesztőket, fonalas gombákat, protozoákat (nagyobb egysejtű élőlények, mint például az amőbák), zöldmoszatokat, és az összes többsejtű élőlényt. Tehát az élőlények óriási többsége eukarióta, az ember is eukarióta sejtekből épül fel.

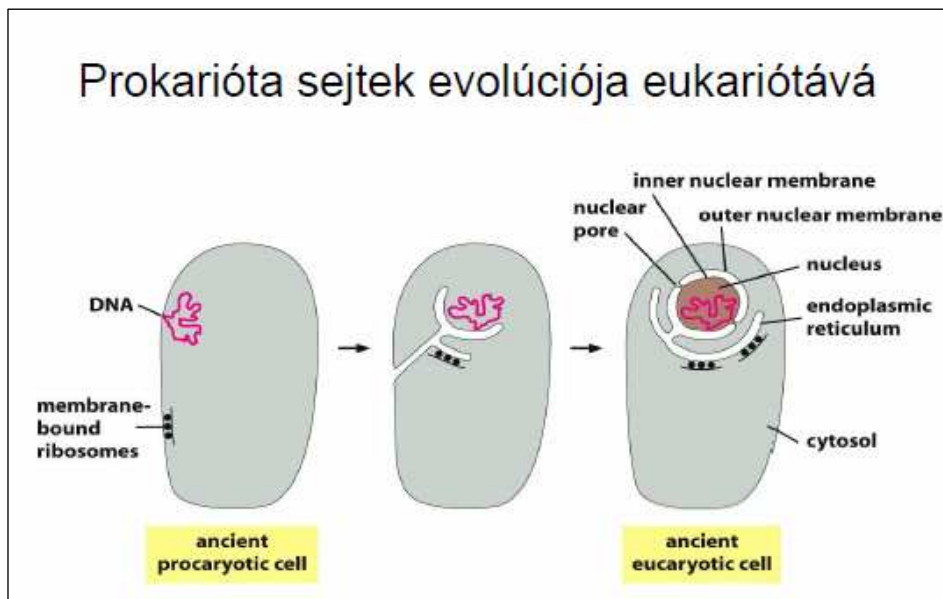


1. kép: A prokarióta és az eukarióta sejt szerkezete:

A prokarióta sejt (bal oldali): egyszerű szerkezetű sejt. A belső része gyakorlatilag homogén. Az örökítő anyag, a DNS egy zárt hurkot alkot, amely egy ponton a sejt-membránhoz kötődik. A képen a fekete pontok a riboszómákat jelölik.

Az eukarióta sejt (jobb oldali): Ebben rengeteg sejtalkotó van. Szinte mindegyiket biológiai membránok határolják. A barnás színű a sejtmag.

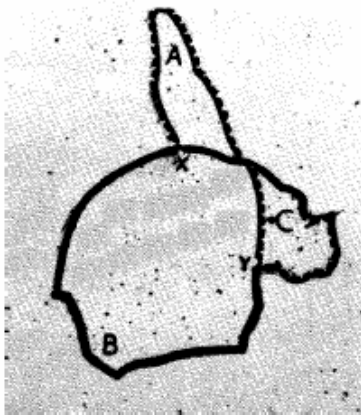
A prokarióta és az eukarióta sejt közti evolúciós kapcsolatot az alapján vizsgáljuk, hogy hogyan alakult ki a prokarióta sejtől fokozatosan az eukarióta sejt.



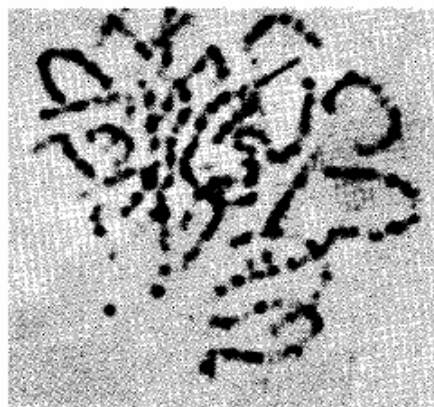
2. kép: Az eukarióta sejt kialakulása

Az ábra azt mutatja, hogy a kívülről határoló biológiai membrán fokozatosan begyűrődött a sejt a belsejébe. Az így kialakuló nagyobb felület több helyet adott a különböző biokémiai reakcióknak. Így végül az evolúció során kialakult egy többé-kevésbé zárt sejtmag. A begyűrődött membránokból alakult ki a sejtmaghártya és az endoplazmás retikulum (egy membrán szerv ami körülveszi a sejtmagot). Tehát a sejtmag létrejötte nem egyik pillanatról a másikra történt, hanem fokozatosan alakult ki.

**Prokarióta DNS (*E. coli*)
(duplikálódás közben)**



**Eukarióta DNS
(kromoszómák)**



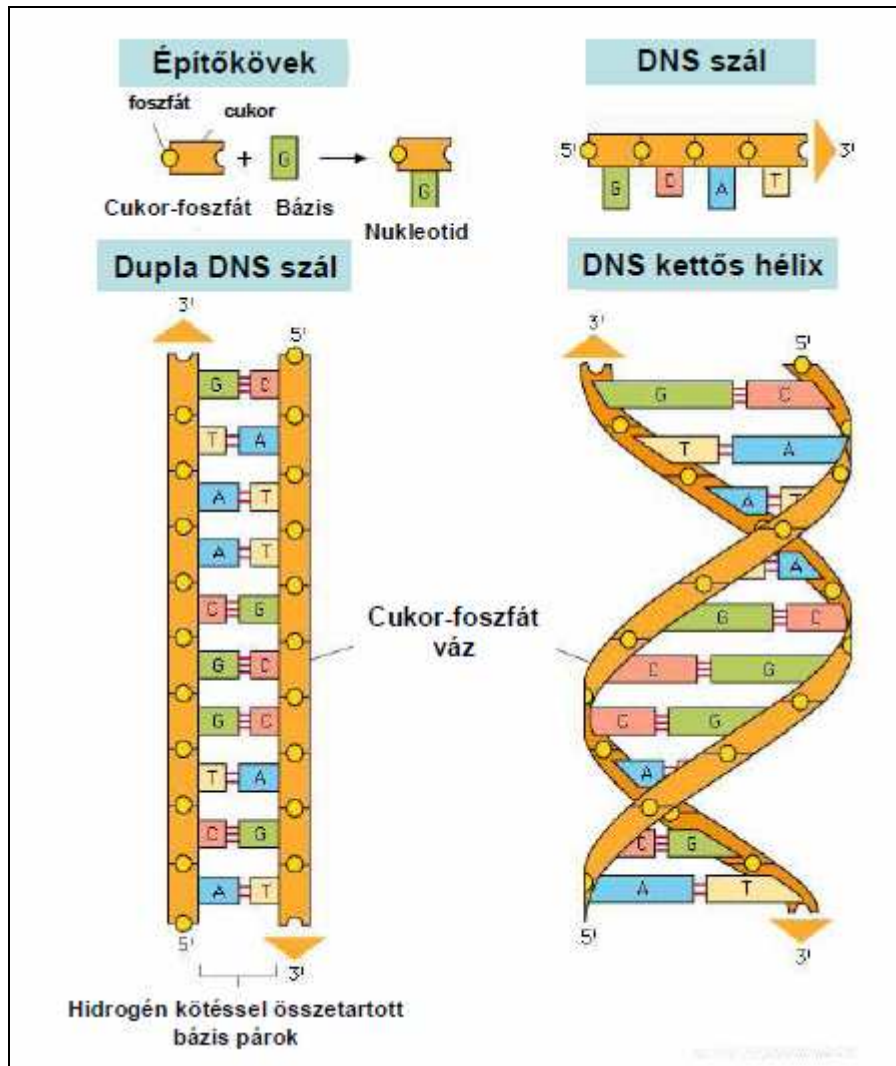
3. kép: A prokarióta és az eukarióta DNS

A képeken a prokarióta és eukarióta DNS fényképe látható. A gyűrűs prokarióta DNS-en egy kosárfül szerű áthidalás látható, mert a fotó éppen a sejt duplikálódása, osztódása közben készült. A gyűrűs kromoszóma lemásolása félig már végbement. A „rég” (C) és „új” (A,B) DNS találkozási pontjait x-el és y-nal jelölték. Az x a kiindulási pont, innen indul a másolás, az y pont pedig „körbeszalad” a kromoszómán, ahogy másolódik a DNS. Amikor visszaér az x ponthoz, akkor a két teljesen egyenértékű kromoszóma szétválik, és az osztódásnál a két utód sejtbe kerül.

Az eukarióta DNS: Egymás hegyén-hátán elkülönülő kromoszómák láthatók egy eukarióta sejt magjában. Ez a kép a valós állapotot mutatja. (Sok tankönyvben lehet találkozni a kromoszómák egymás mellé rendezett, idealizált képével).

II. A DNS

A DNS a genetika alapja, ez hordozza a genetikai információt. A kurzus során a DNS szerkezete és működése kiemelten fontos lesz. A DNS alapjait egy három egységből álló mozaik képi.



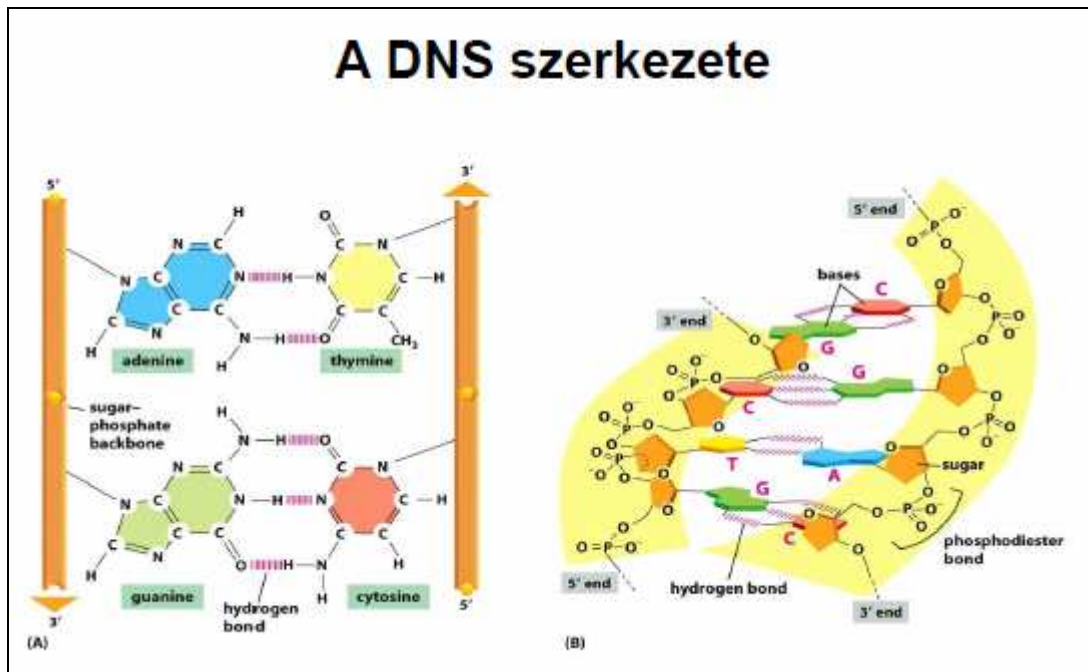
4. kép: A DNS molekula szerkezete (leegyszerűsített ábra)

Az alap három egység: Kis sárga karika: **foszfát** (foszfor sav csoport), mellette okker sárga rész a **cukor** (ez DNS esetében dezoxiribóz, ettől van a D betű a nevében), a harmadik zöld színű téglalap, amire G van írva a **DNS bázis**.

4 féle különböző DNS bázis létezik. A cukor és a foszfát mindegyiknél ugyanaz.

A kép jobb oldala azt szemlélteti, hogy hogyan néz ki a 4 féle mozaik ami felépíti a DNS láncát, valamint ezek összekapcsolódását. A lineáris alaplánc váltogatva foszfát-cukor-foszfát-cukor... molekulák hosszú sorozata, rajta a cukrokon „lógnak” a DNS bázisok. A teljes DNS molekula két ilyen lineáris polimerből tevődik össze. Így egy létraszerű alakzat áll össze. Két darab hosszú cukor-foszfát láncból és a kettő közötti bázisokból áll. A két darab cukor-foszfát lánc, azért párhuzamos, mert a köztük lévő bázisok csak bizonyos párosodásban fordulhatnak elő. A G és C, valamint A és T mindig egymás mellett fordulnak elő. Ezek így párosával egyforma hosszúak, így kifeszítik úgy a rendszert, hogy egyforma távolságra

legyenek egymástól mindig. A bázisok közt a kis piros vonalak gyenge másodlagos kémiai kölcsönhatások. Aszerint van két illetve három kis piros vonal, hogy hány hidrogén híd kötés köti őket össze.



5. kép: A DNS bázispárok kémiai szerkezete

Ha megfigyeljük a jobb oldalon az A - T bázispárt, akkor egy nagyobb és egy kisebb molekulát láthatunk. A G - C szintén egy nagyobb és egy kisebb bázis molekulából álló pár. Ez a nagyobb-kisebb párosítás eredményezi, hogy a „létrafokok” egyforma hosszúak, így párhuzamos a két darab cukor-foszfát lánc. Ezen az ábrán is ugyanaz a szín jelzi a cukrot (okker sárga) és a foszfátot (sárga). A hidrogén híd kötések a lilás színű vonalak jelzik. A bázisok közt a kis piros vonalak gyenge másodlagos kémiai kölcsönhatások. Aszerint van két illetve három kis piros vonal, hogy hány hidrogén híd kötés köti össze a párokat. Az A és a T között kettő, a G és a C között 3 tud kialakulni.

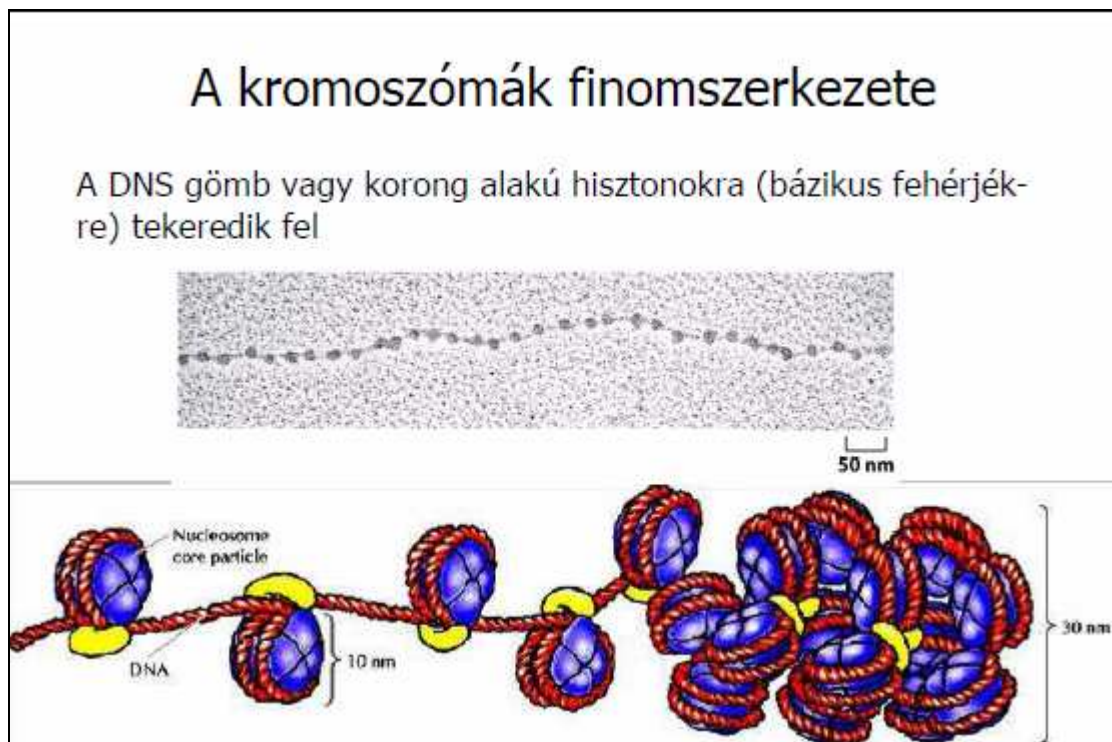
Az ábrán az is látható, hogy a DNS száznak „iránya” van, az egyik végük foszforsav csoportban, a másik pedig cukor molekulában végződik. Ezeket a végeket 3' és 5' jelöléssel azonosítják. A számok a cukormolekulában a szabadon maradó szénatom sorszámát jelentik. A későbbiekben fontos lesz, hogy a kettős szálú DNS molekulában a két szál „iránya” ellentétes.

A 4. kép baloldalán egy szép egyenes létrát láttunk. A DNS azonban nem ilyen. A DNS kettős spirált alkot. Említettük, hogy a DNS olyan, mint egy létra, azonban egy merev anyagból készült létrát nehéz lenne „megcsavarni”. Sokkal jobb hasonlat az, hogy a DNS nem „létra”, hanem „cipzár”. Egy textilcsíkot, mint a cipzár, ugyanúgy meg lehet csavarni, mint a

DNS-t. A hasonlat abból a szempontból is szemléletes, hogy (a kocszi végighúzásával) a cipzárat is szét lehet szedni két külön szárra, valamint a két szálat egyesíteni lehet sok ponton, jól illeszkedő, mégis hajlékony kettős szállá.

Az egyes átkötések a két szál között egyforma hosszúak, az egyes molekulák síkjai párhuzamosak maradnak a megtekeredés során is. Az ábrán a sárga és kék molekula egy síkot alkot, ezzel párhuzamosan a zöld és piros molekula is egy, az előbbivel párhuzamos síkot alkot. A spirál menetemelkedése is állandó, egy teljes körülfordulásra 10 bázispár esik.

A DNS kettős spirál szerkezetével már mindenki a korábbi iskolai tanulmányai során is megismerkedhetett, azonban az eukarióták DNS szerkezete ennél bonyolultabb. Ha a DNS pusztán ilyen kettős spirál lenne, akkor a sejtek több méter hosszú DNS-e jelentősen kilógna a sejtéből. Tehát a DNS-t össze kell csomagolni valahogyan.

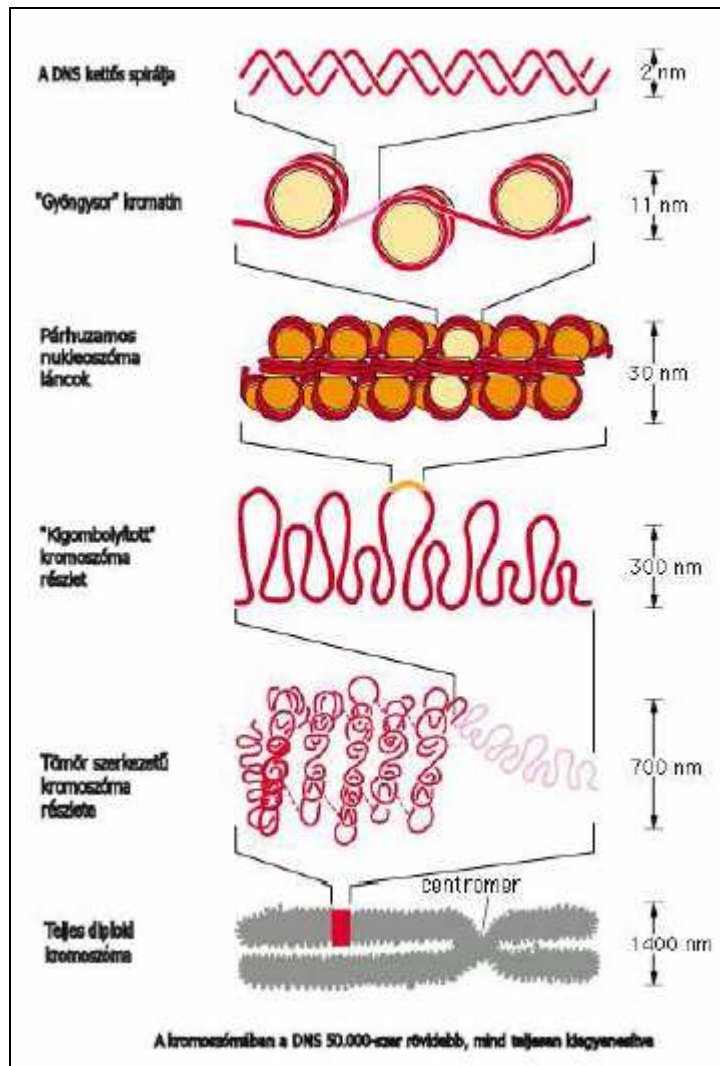


6. kép: Nukleoszómak

A DNS kettős spirál (a piros „zsinór” a képen) fehérje „orsókra” tekeredik fel. Mindegyiken pontosan két menetnyi DNS helyezkedik el. Ezek az egységeket nukleoszóma-nak nevezik. Az orsó fehérjék hisztonok, azaz bázikus fehérjék. A DNS = dezoxiribonukleinsav, ami az ellentétes töltés miatt vonzódik, kapcsolódik a bázikus fehérjékhez. A DNS rátapad ezekre a bázikus fehérjékre. Ha mind a kettő savas lenne, akkor az egyforma töltés miatt taszítanák egymást.

A kék színnel jelölt fehérje egység 8 darab fehérjéből áll. Ahhoz, hogy a gombolyítás precíz legyen, még egy kilencedik kis fehérje (sárgával jelölve) is odatapad. Ha rátekeredett a hisztonra a két menetnyi DNS, akkor ez a kis fehérje, mint rögzítő egység még rögzíti, nehogy véletlenül kigombolyodjon.

A középen a fotón a nukleoszómák lineáris (gyöngysorszerű) elhelyezkedése látható. De ez sem ilyen lineáris elhelyezkedésű legtöbbször, hanem tovább tömörödik.



7. kép: A DNS tömörítése

Az ábrán a felső 3 rész a DNS kettős spirálját, a gyöngysor kromatint (az előbbi elektronmikroszkópos felvételen is ez az állapot volt látható) és a párhuzamos nukleoszóma láncokat mutatja. Minden felsőbb ábráról látni lehet, hogy az alatta lévő alsóbbnak mekkora része. A negyedik sorban a tömör nukleoszóma lánc is rendezett hullámzó szerkezetet ad és még ez is lazának tekinthető az igazi tömör szerkezetű kromoszómához képest (a kép legalsó részén). Tehát az emberi kromoszómának a nukleoszóma lánc is igen kis része.

A DNS feltekert és összehajtogatott formája, ami a kromoszómákban tárolódik kb. 50000-szer rövidebb, mint az eredeti kettős spirál forma.

A DNS funkciója, működése

A DNS elsődleges funkciói az átírások. Több féle irányú átírás lehetséges és mindegyiknek más szerepe van. Attól függően, hogy mire írjuk át a benne lévő információt más és más a funkció.

1. Átírás: DNS-ről DNS-re:

Ez a genetikai információ a megduplázása. A sejtosztódáshoz szükséges információ átírása. Tehát az alap molekula és ami keletkezik az is DNS.

2. Átírás: messenger RNS-re

A fehérje szintézis része, átírás DNS-ről mRNS-re. A fehérje szintézisnek két lépése van. A transzkripció és a transláció.

Első lépése a transzkripció. Átírás messenger RNS-re, ami egy olyan ribonukleinsav, ami információt továbbít, ezért messenger (hírvivő, kézbesítő) RNS.

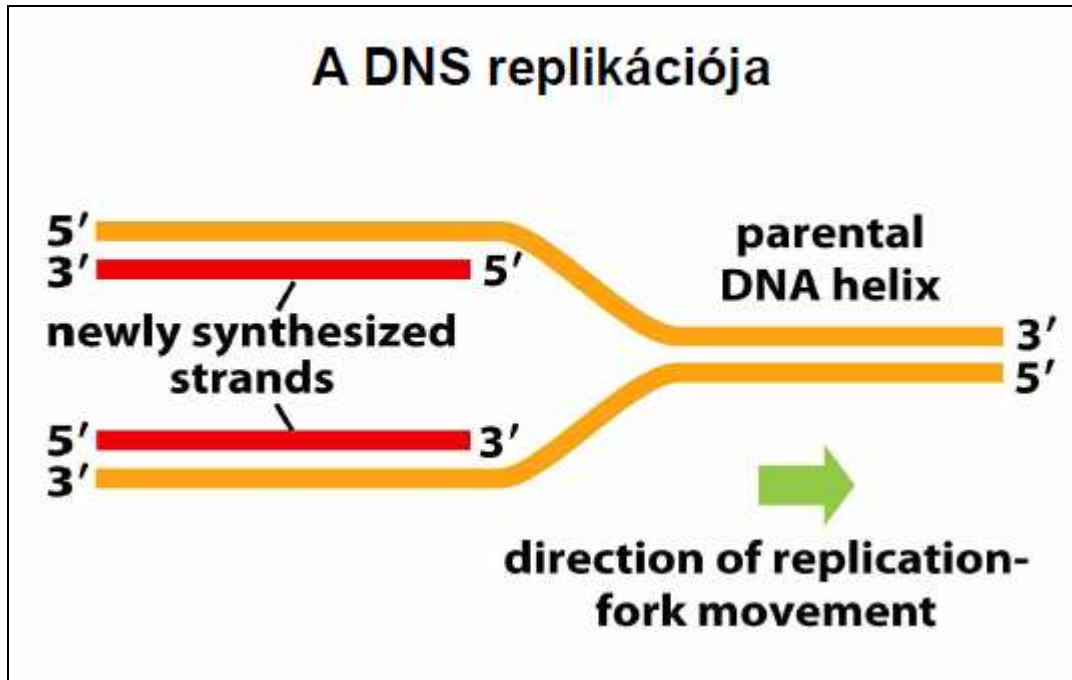
3. Átírás: más nukleinsavakra

Ez szintén DNS-ről RNS-re történik. Csak ez a másik RNS ami létrejön nem a fehérje szerkezetet kódolja, hanem lehet riboszóma RNS (szerkezeti RNS) és lehet transzfer RNS.

A riboszóma és a transzfer RNS bázis sorrendje is a DNSben tárolódik, szintézisük direkt átírással történik.

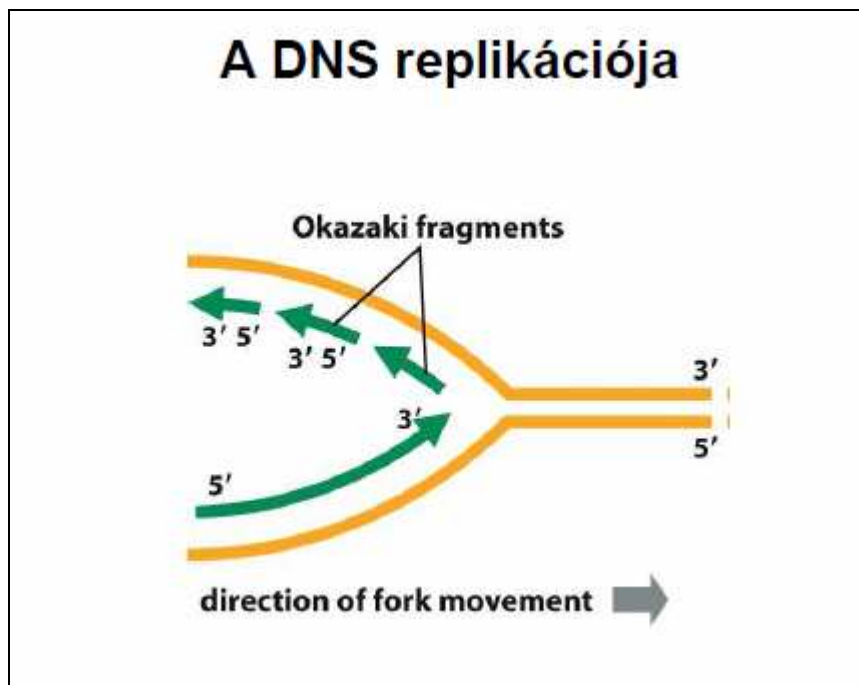
A DNS átírásának, másolásának folyamata

A DNS kettős szála látható (mint a párhuzamos szálú zipzár), ezt először szét kell csavarni, majd szét kell választani, tehát egy megfelelő enzimrendszer szétnyitja a két szálat és utána mind két szál alapján elkészít egy új DNS szakaszt. A képen pirossal van jelölve az új DNS. És két teljesen ekvivalens másolat keletkezik. Ez attól jöhet létre, hogy az egyes bázis párok mindig csak a fentebb elmondott párosításokban fordulhatnak elő. A bázispárok részei komplementer módon mindig meghatározzák egymást, így az egy szálból kiépült kettős szálú DNS tökéletesen azonos lesz az eredetivel. Ezt mindkét szimpla szálú DNS-sel meg lehet csinálni.



8. kép: A DNS replikációja 1

Az ábrán a számok 3' és 5' azt jelzik, hogy a DNS szálak azok irányítottak. Van irányuk, így a két végük nem egyenértékű.

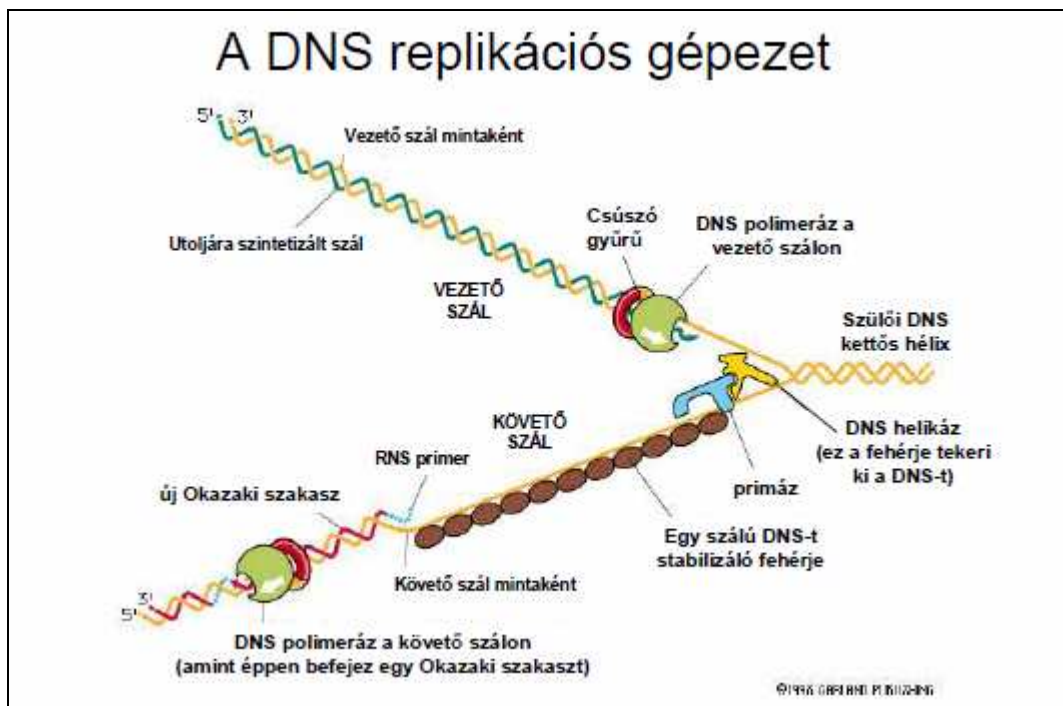


9. kép: A DNS replikációja 2

A DNS kiíró enzimek másolása egyirányú. Csak az 5'-3' irányba képes építeni, fordítva nem. Ha ketté szedjük a DNS-t akkor azt látjuk, hogy az enzim az egyik szálon

folyamatosan végig tud menni és folyamatosan építi ezt a szálát. Ez az egyszerűbb eset. A másik szálon a másik irányba kellene haladni, hogy ugyanolyan folyamatosan menjen a DNS szintézis, de az enzimek erre nem képesek. (Az evolúció nem tökéletes ☺). Ebből az következik, hogy ezen a másik szálon a folyamat nem tud egy lépésben végig menni. Az új DNS darabokban keletkezik. Egyszerre kb. ezer bázispárnyi DNS darabok keletkeznek és ezeket össze kell kapcsolni. Az összekötéseknél megnő a hiba lehetőség. A másolási során keletkeznek hibák, ezekről később lesz szó.

A szétnyíló DNS szakaszt, ahol a folyamat végbemegy, az angolból átvéve magyarul is replikációs villának nevezik.

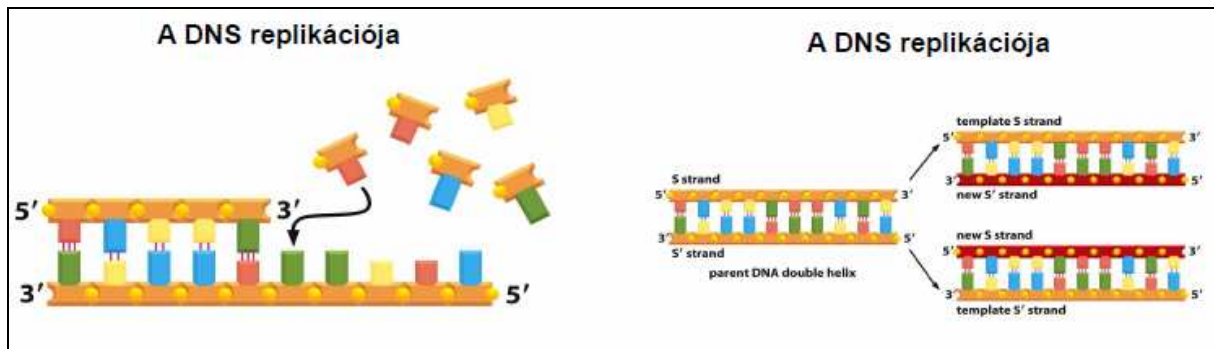


10. kép: A DNS replikációs gépezet.

Az eredeti DNS szál sárgával van jelölve. Az új szálak pirossal és zölddel. Fent a DNS 3' vége látható, tehát itt az enzimrendszer folyamatosan végig tud menni a DNS-en, ami egyenként több enzimből álló komplex (a zöld polimerázból és pirosas csúszó gyűrűből tevődik össze). Ez az enzimrendszer folyamatosan szintetizálja a komplementer szálát. A másik szálon viszont ezt visszafelé kell megcsinálni. Ugyanaz az enzimrendszer hajtja végre a folyamatot, de ez csak úgy lehetséges, hogy a villától távolodó irányban halad. Rákapcsol a szimpla DNS szálra, és felépíti az új szálát a már kész kettős szál végéig (ez egy Okazaki szakasz), majd leválik és visszatér a villa közelébe.

A villa közelében a „fedetlen” DNS szakaszt stabilizáló fehérjék tartják egyenesen (barna részek).

A sárgával jelzett rész a DNS helikáz enzim, ez csavarja szét a DNS-t.

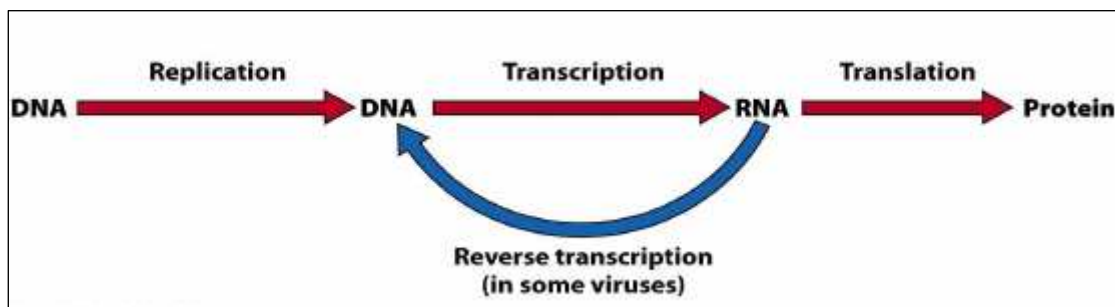


11. kép: A DNS replikációja 3

A DNS átírása fehérjékre

Ez a folyamat két lépésben történik. Az első lépés (transzkripció) során az információ átíródik a DNS-ről RNS-re, tehát ribonukleinsavra, a messenger RNS-re. A messenger (hírvivő) RNS viszi át az információt a DNS-ről a riboszómákra.

A második lépés a lefordítás, vagy transláció. Ez a fehérjeszintézis, az információ átíródik mRNS-ről aminosav láncokra.

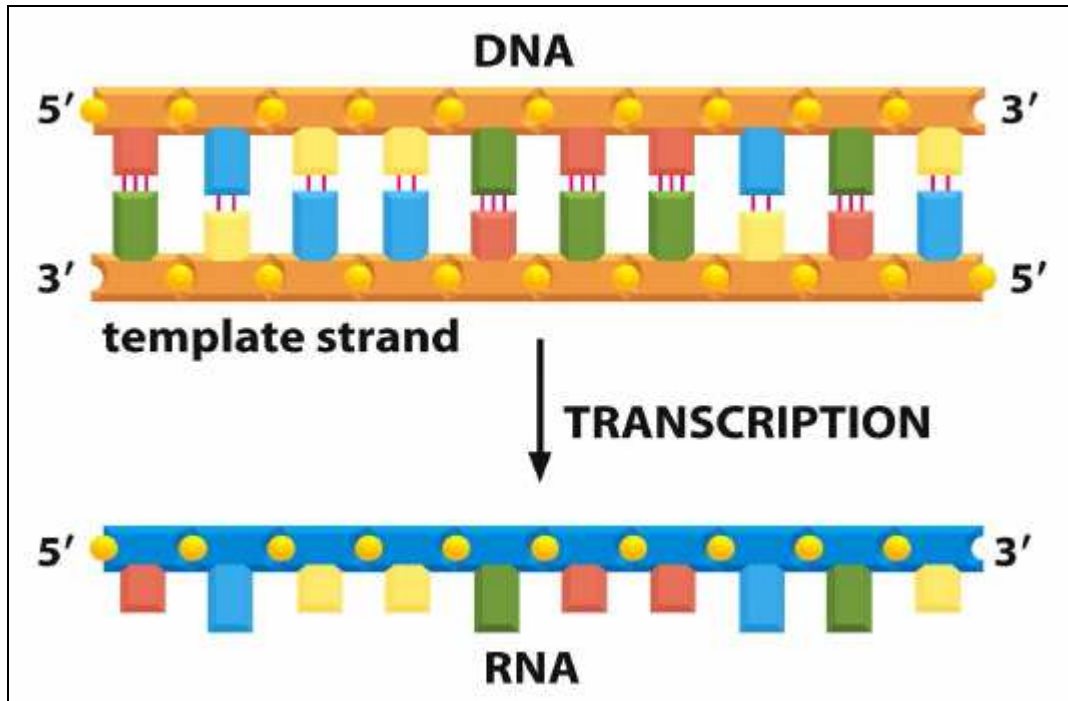


12. kép: Az átírások fajtái

A ábrán a piros nyilak iránya fejezi ki a genetika centrális dogmáját. A centrális dogma azt mondja, hogy az információ mindig a DNS-től megy az RNS-ig, és aztán a fehérjére. A centrális dogma akkor dőlt meg, amikor felfedezték a vírusok egy csoportjában (RNS vírusok) az információt nem DNS tárolja, hanem ribonukleinsav. Ezeknek a vírusoknak van egy sajátos enzimrendszere, ami az információt RNS-ről írja át DNS-re. Ezzel megdőlt a centrális dogma, hogy az információ mindig egy irányba terjed.

A biotechnológiában sokszor az a cél, hogy egy élőlénybe egy új tulajdonságot vigyünk be. Ehhez ebbe a rendszerbe kell belenyúlni. Az új tulajdonsághoz egy (vagy több) új fehérjét kell szintetizálnia a sejtnek. Ehhez pedig a megfelelő gén(ek)e)t kell bevinni a sejtbe - ezt nevezzük génmanipulációnak. Meg kell változtatni a DNS-t, olyan módon, hogy az

öröklődő legyen. Ugyanis, ha nem öröklődik, akkor az utód generáció nem fogja hordozni az adott tulajdonságot. Ha a rendszerbe ilyen módon sikerült belenyúlni, akkor megjelenik az új fehérje, és megjelenik az élőlény új tulajdonsága.



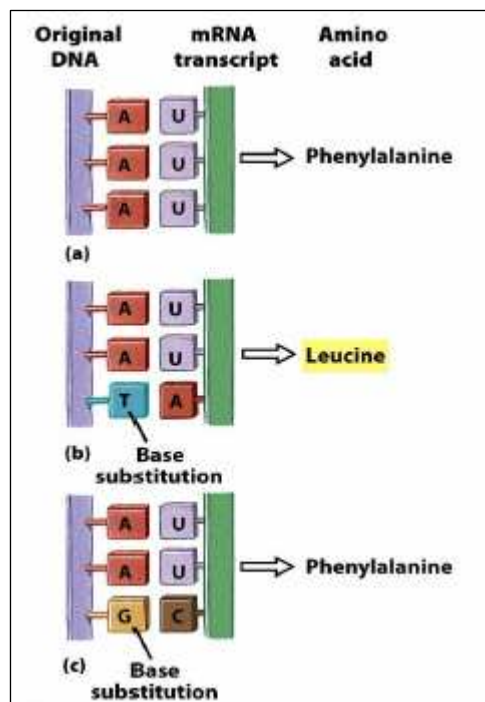
13. kép: Transzkripció

A transzkripció folyamatát az eddig használt szimbólumokkal mutatja be a 13. kép. A DNS szín és formakódja ugyanaz, mint eddig. Alul a ribonukleinsav szintézist láthatjuk. Az alapszál cukorrészei kékek, mivel ezek ribózok és nem dezoxi-ribózok. A cukorrész adja a kétféle nukleinsav (DNS, RNS) nevének első tagját. A dezoxi-ribóz kémiaailag úgy vezethető le ribózból, hogy a cukor egyik szénatomján az OH csoport helyett csak egy hidrogén van. Dez + oxi = oxigén nélküli.

Ez egy szimpla szálú nukleinsav, nincs komplementer párja.

Az átírás (transzkripció) részletesebben

A genetikai kód az egész élővilágban közös, a végül kialakuló aminosav sorrendet a bázisok sorrendje határozza meg. A DNSnek csak 4 féle bázisa van, fehérjealkotó aminosavból meg 20 féle. Tehát az egy bázis - egy aminosav megfeleltetés nem működik. Emiatt több bázisból álló kódot kell választani. A következő lehetőség a két bázisból álló kód. Két bázisból is csak $4 \cdot 4 = 16$ féle kombinációt lehet kialakítani, ez is kevés a húszféle aminosavhoz. Így még a

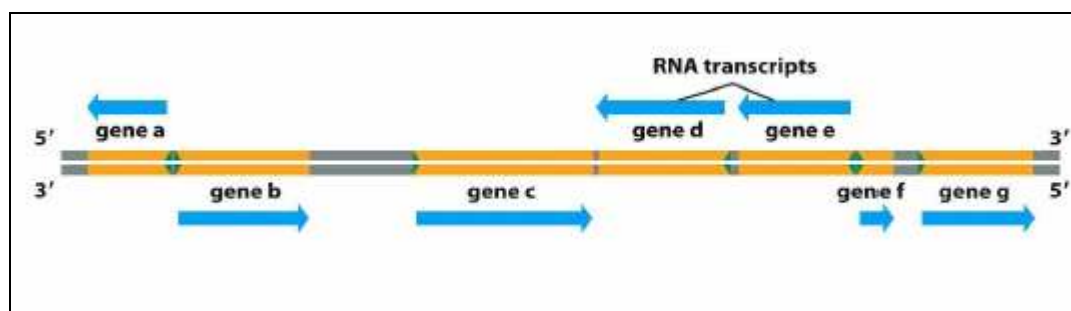


kettő bázis is kevés. Az élőlényekben a kódolás bázis-triplettekkel (bázis hármassokkal) történik. Így az első helyre 4 félet a második helyre 4 félet a harmadik helyre szintén 4 féle bázis kerülhet, azaz $4 \times 4 \times 4 = 64$ féle kombináció lehetséges. Ez nemcsak elegendő a kódolásra (több mint 20), sokkal több lehetőséget ad.

Tehát a kód bázis tripletekkel működik, de ez a kód redundáns, mivel sok olyan triplett létezik, ami ugyanazt az aminosavat kódolja. Három triplett az ún. stop kód, ami nem aminosavat jelöl, hanem a fehérjelánc végét jelöli.

14. kép: Transzkripció

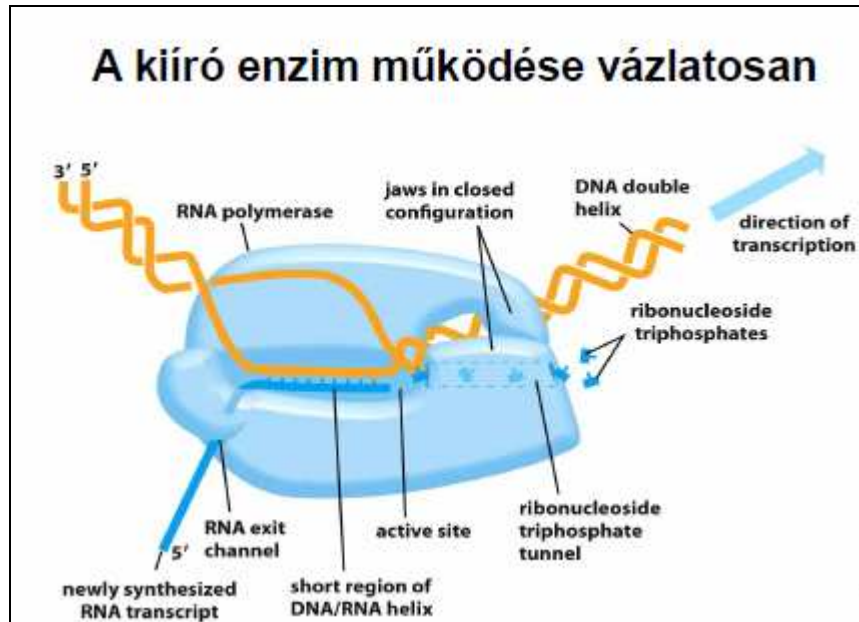
A kettős szálú DNS két szála a duplikáció szempontjából egyenértékű. A fehérjeszintézisnél viszont a szétválasztott két DNS szál közül csak az egyikről lehet értelmes fehérjét kiírni. Ha a másikat is kiírnánk, akkor az a komplementer szál teljesen értelmetlen és haszontalan fehérjét eredményezne. Csak az egyik DNS szál hordozza az információt, csak az íródik át mRNS-re. Tehát a két szálú DNS molekulában megkülönböztethetünk egy értelmes (kodogén = kódot generáló) szálát, valamint egy értelmetlen/néma szálát. Az értelmes szál egy kromoszómán belül sem mindenhol ugyanaz, néha akár génenként váltakozik. Az élővilágban az értelmes szálak helye és iránya az nem állandó, néha meglehetősen összevisszaságot takar (→ ábra).



15. kép: Az értelmes DNS szál elhelyezkedése

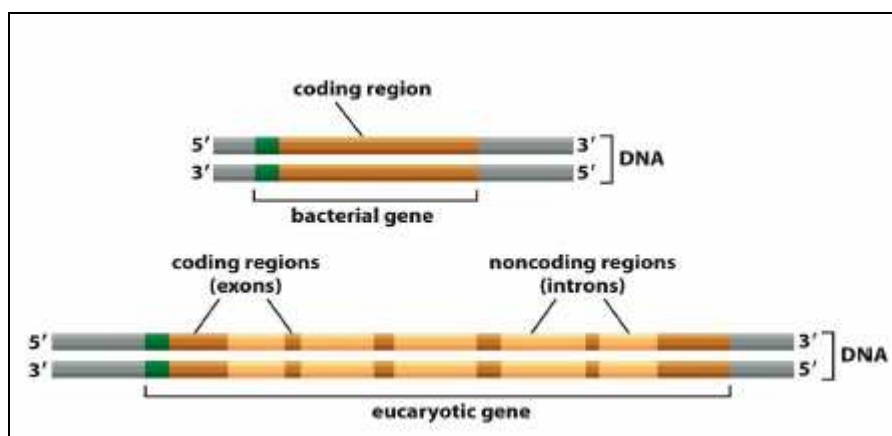
Csak az egyik DNS szál hordozza az információt, csak az íródik át mRNS-re. Aszerint, hogy hol az egyik hol a másik szál értelmes, a kiírás iránya is változik. A másolás itt is csak a 3'-5' irányba működik, ezért a két szálon ellentétes irányú a transzkripció. Az ábrán

a nyílak iránya mutatja a másolás irányát. A másolás a zölddel jelölt start helyektől elindulva a sárgával jelölt génszakasz végéig halad. A szürke szakaszok a másolás szempontjából érdektelenek. Az enzimrendszereknek fel kell ismernie, hogy hol kezdjék el és melyik szálon kezdjék el a kiírást.



16. kép: A kiíró enzim működése vázlatosan

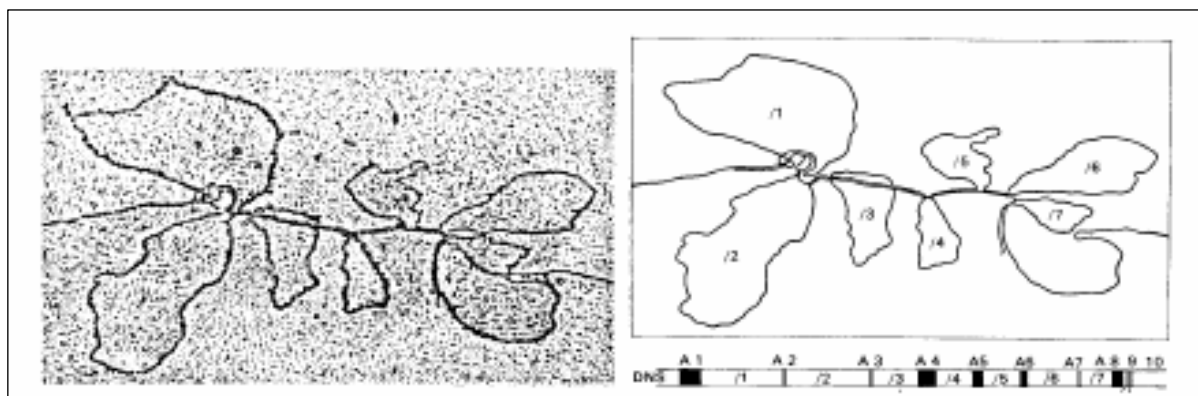
A kép egy több fehérje molekulából álló enzim-komplexet mutat be, ami a DNS átírását végzi. Először szétnyitja a DNS-nek a két szálát (anélkül, hogy elvágná a szálakat), majd felismeri az értelmes szálát, és szépen el kezd építgetni az új messenger RNS darabot és a végén enged ki a már elkészült szakaszt (sötétkék vonal). A kis sötétebb kék „kalapácsok” az RNS-t felépítő a nukleotidok, melyek a DNS-re komplementer módon rendeződnek. A komplex tovább haladása után a DNS visszatekeredik kettős spirálba.



17. kép: Kódolás prokarióta és eukarióta sejtekben

A gének az elhelyezkedése és kiírása nem egyforma a prokarióta és eukarióta sejtekben. A prokariótáknál egyszerű a helyzet, hogy van egy indító hely, és mögötte van egy átírandó gén. A bonyolultabb (eukarióta) sejtekben, pl. a humán sejtekben más a helyzet. A humán DNS nagyon sok felesleges szakaszt tartalmaz. Az átírás a teljes szakaszt átviszi mRNSre. A mRNS önmagával hurkokat képez, a felesleges szakaszok (intronok) a hurkokba kerülnek, és ezeket egy enzimrendszer kivágja, a maradék mRNS-ről (exonok) szintetizálódnak a fehérjék.

A képen látható, hogy az eukarióta gén „csíkos”, azért ilyen csíkos, mert a szükséges fehérjének az információ darabjai nem lineárisan szorosan egymás mellett helyezkednek el, hanem közben a világosabb sárga részek értelmetlen és felesleges módon bekerültek. Ezeket a felesleges részeket enzimrendszer kivagdosza. Ez az értelmetlennek tűnő kódolás feltehetőleg



18. kép: Az intronok kivágásának menete

azért alakult így ki, hogy a sejtek védekezzenek az idegen DNS ellen. Ha a vírusok, vagy más kórokozók idegen DNS-t hoznak be a sejtekbe, és az el kezdene szaporodni akkor az igen komoly következményekkel járna. A vírus betegségek így is elég súlyosak lehetnek, de ha nem lenne ez a védekező mechanizmus, akkor sok idegen DNS is bemásolódná és sok kóros fehérje keletkezne. Ezért alakult ki a intron-kivágás mechanizmusa, ami, ha el is készül egy idegen messenger RNS, akkor azt felaprítja használhatatlan darabokra.

Az exonok a beépülő értelmes szakaszok, az intronok a kivagdosott értelmetlen részek.

Amikor már meg van a messenger RNS, akkor az képes saját magával a képen látható hurkok képzésére. Ezzel egy bonyolult több hurkos szerkezet jön létre. Ekkor egy enzimrendszer a kilógó hurkokat levágja. Ez után az enzim-rendszer egy másik enzime a megmaradt részeket összekapcsolja. Ez az összerakott maradék egyenes mRNS kerül transzlációra. A jobb oldali részen lévő ábra alatti lineáris részen a fekete részek azt jelzik, hogy mi marad meg a mRNSből, a /1, /2, /3-as ... részek pedig levágásra kerülnek.

(Példa: Veszünk egy emberi gént, mondjuk egy fehérje típusú hormont, és szeretném ezt a gént áttenni egy mikrobába, hogy az termelje a gyógyszerként adható hormont. Ha az egész gént átviszem, akkor a mikroba elkészíti az egész génnek megfelelő fehérjét, mert a prokariótában nincs intron-kivágás, tehát egy sokkal hosszabb, értelmetlen, hatástalan fehérjét kapunk végül. Így nem az emberi DNS szakaszt kell kivenni, hanem meg kell keresni a megfelelő sejtben azt a messenger RNS-t amiből már kivagdosták a felesleges részeket, és ebből kialakítani, majd mikrobába vinni a tényleges fehérjét kódoló, sokkal rövidebb DNS-t.)

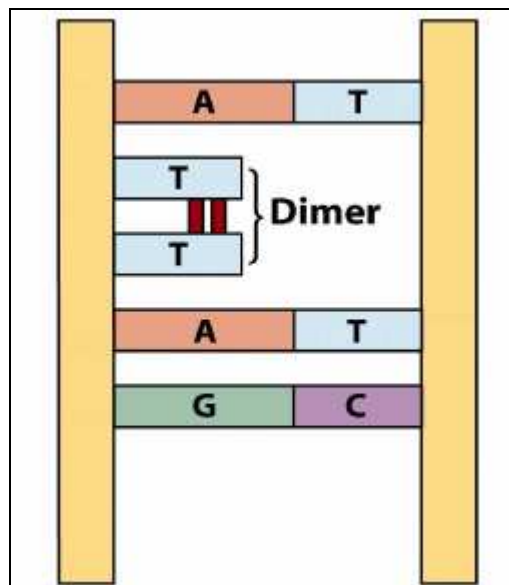
Mutáció

Az örökítő anyagon keletkezett ugrásszerű változás, ami átöröklődik az utódokra. (Példa: Ha valaki bőrrákot kap, mert túl sok káros napsugárzás érte, és a bőrén elváltozás keletkezett, azt nem nevezhetjük mutációnak, mert nem adja tovább az utódjainak. Ahhoz, hogy ezt tovább is adja valaki, ahhoz az ivarsejtekben kellene változásnak bekövetkeznie.)

A mutáció okai: Ezek lehetnek belső okok, ezek a másoló rendszer tökéletlenségéből eredő hibák (kb. 1 hiba/millió másolt bázis)

Valamint lehetnek külső okok: Ezek a környezet mutagén hatásai.

- mutációt okozhatnak különböző kémiai anyagok. A kémiai anyagok reagálnak a DNS-sel és megváltoztatják azt.
- Fizikai okok lehetnek a sugárzások (kozmosz sugárzás, UV sugárzás, kőzetek radioaktív sugárzása, Röntgen). Ezek a nagy energiájú sugárzások kémiai reakciókat idéznek elő a DNS-en.



19. kép: Egy tipikus mutáció

A nagy energiájú sugárzások képesek arra, hogy két egymás mellett lévő timin bázis között is létrehoznak egy kettős kötést és így nem tudnak a szemben lévővel kapcsolódni, illetve velük szembe már nem is kerülnek bázisok.

A mutációk fajtái

Pontmutációk: Az előbb bemutatott mutáció egy pontmutáció, egy helyen bekövetkezett változás. Egy bázist, vagy bázispárt érintenek. Ha csak egy bázis változik meg: egy aminosav változik meg a fehérjében. (Egy aminosav megváltozása sokszor semleges mutáció (nincs kimutatható előny/hátránya), de például alkalmas arra, hogy a különböző fajok evolúciós távolságát megbecsüljék.)

Ha egy bázis beépül, vagy kiesik, akkor az egész utána következő szakasz értelmetlen lesz. (eltolódási vagy shift mutáció)

Kromoszóma mutációk: Egy DNS szakaszt érintő kiesés (deléció), áthelyeződés (transzpozíció), megfordulás (inverzió). Sok csernobili katasztrófát átélt személynek nem tanácsolják, hogy legyen gyermeke, mert a kromoszómáin mikroszkóppal is látható törések vannak.

Egyes kromoszómákat érintő változás a törés, a megkettőződés és a **számbéli változás** (géndózis): XXX, XYY, XXY, Down kór. A Down kór esetében a problémát a kromoszóma többlet és nem a kromoszóma hiány okozza.

Egy normális férfi kromoszóma képlete az XY, de vannak olyan esetek is, amikor egy férfinak az egy X mellett két darab Y kromoszómája van. Ezek a „szuperférfiak” általában agresszívbak és alacsony intelligencia hányadossal rendelkeznek.

Lehet egész kromoszóma szerelvényt érintő megsokszorozódás, pl.: xn (**poliploiditás**). Ez magasabb rendű élőlényeknél nem nagyon fordul elő. Növényeknél viszont egy nagyon gyakori nemesítési eljárás. Pl. a mezőgazdaságban az ipari méretekben termelt nemesített cukorrépa vetőmag ilyen többszörös kromoszóma szerelvényel rendelkezik. Ha ezt a növényt hagyják felmagzani (ivaros szaporodás), akkor abból a magból a következő évben gazdaságilag haszontalan, satnya növény kel ki.

A mutációs ráta, vagy mutációs arány

Ez két hatásnak az eredője. Eddig arról volt szó, hogy mi az, ami létrehozza a mutációt (külső és belső hatások). De ezek ellen dolgoznak az úgynevezett repair mechanizmusok. (Reparáló mechanizmus, igazából csak egy magyarosítás, valójában a repair = (a bázisok) újra párosítását jelenti)

A **repair mechanizmusok** olyan enzimrendszerek, amelyek képesek a DNS hibáit kijavítani. Egy enzim komplex, amely végighalad a DNS mentén, és a felismert hibákat kijavítja. Egy enzim komplex azonban csak egy bizonyos hibát (pl. timin dimer, ld. fent) ismer fel és tud kijavítani. Minél fejlettebb egy faj, annál többféle repair enzimrendszere van. Az elsők már a prokariótáknál is megjelentek.

Tehát a mutációs rátát a mutációk és a repair mechanizmusok egyensúlya határozza meg. Az egészséges mutációs ráta biztosítja a fajon belüli változatosságot, ezzel az evolúciós rugalmasságot. Az egészséges mutációs ráta abból a szempontból is jelentős, hogy ez szolgálja egy faj környezethez való alkalmazkodását, fennmaradását. Ha túl nagy a mutációs ráta, akkor sok „torzszülött” jelenik meg, ami szintén nem jó. Ha túl alacsony, akkor meg az egyedek „túlságosan egyformák”, és nem képesek alkalmazkodni a megváltozott környezethez → evolúciós hátrány.

A repair hatékonysága szabályozás alatt áll, állandó a mutációs ráta. (klíma-hőmérséklet).

Pl. vizsgáltak egy rovarfajt, ami a trópuson és a mérsékelt égövön egyaránt él. A magasabb hőmérsékleten a mutáció gyakoribb, emiatt azt várták, hogy a mutációs ráta a trópuson nagyobb lesz. De kiderült, hogy ott a repair mechanizmusok hatékonyabban működnek, és az eredő mutációs ráta azonos volt mind a két helyen.

Genetikai szabályozó mechanizmusok

Először azt vizsgáljuk, hogy az evolúció, illetve a természetes szelekció hogyan irányítja a genetikai állomány alakulását. Az alapséma, hogy a genomban található gén az meghatároz egy fehérjét (ami a sejtben jön létre), ez egy fehérjéje meghatározza az élőlény egy tulajdonságát, a tulajdonság meghatározza az életképességét, pontosabban a szaporodó képességét egy adott környezetben. Ez az életképesség hat vissza magára a génre, olyan módon, hogy a természetes szelekció a kevésbé életképeseket nem hagyja fennmaradni. Az életképesek jobban el fognak szaporodni, a kevésbé életképeseket pedig a természetes szelekció ritkítja, olyan módon, hogy kevesebb utódjuk lesz és előbb-utóbb ki fognak halni.

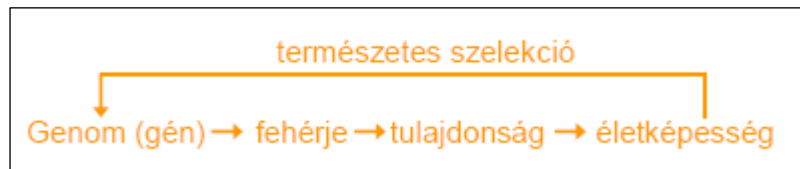
Tehát a genom (génállomány) „célja” a fennmaradás és elszaporodás.

Mi kell ehhez? (két dolog)

1. Az adott génállomány mindig arra törekszik, hogy a génállományát mindig tökéletesen lemásolja, tehát önmagát szaporítja.
2. Szaporítja önmagát, de egyúttal a leghatékonyabb módon igyekszik elterjedni. A gének „önzők”, abból a szempontból, hogy ők akarnak elszaporodni és ehhez az összes

erőforrást meg akarják szerezni maguknak és minél nagyobb egyed számban akarnak megjelenni egy adott környezeti paraméter-kombinációban.

Ha a két szabály ellentétbe kerül egymással, akkor mindig a második érvényesül, azaz a leghatékonyabban kell elszaporodni és ha a leghatékonyabb elszaporodáshoz a genetikai állománynak meg kell változni, akkor változzon meg. Ez az alapvető evolúciós szabályokon működik, amit még Darwin állapított meg.



20. kép: A természetes szelekció folyamata

Egyrészt jellemző az "overproduction", azaz mindig több utód jön létre, mint amennyi az adott populáció fenntartásához szükséges, és a rengeteg utód közül a természetes szelekció kiválogatja a legéletrevalóbbakat. A legéletrevalóbb az, amelynek a genetikai állománya az adott életkörülmények közt a leghatékonyabb.

Az evolúció eszerint működik, és már kb. 1 milliárd éve irányítja az élővilág fejlődését.

Genetikai szabályozás mechanizmus egyetlen egy sejtben belül

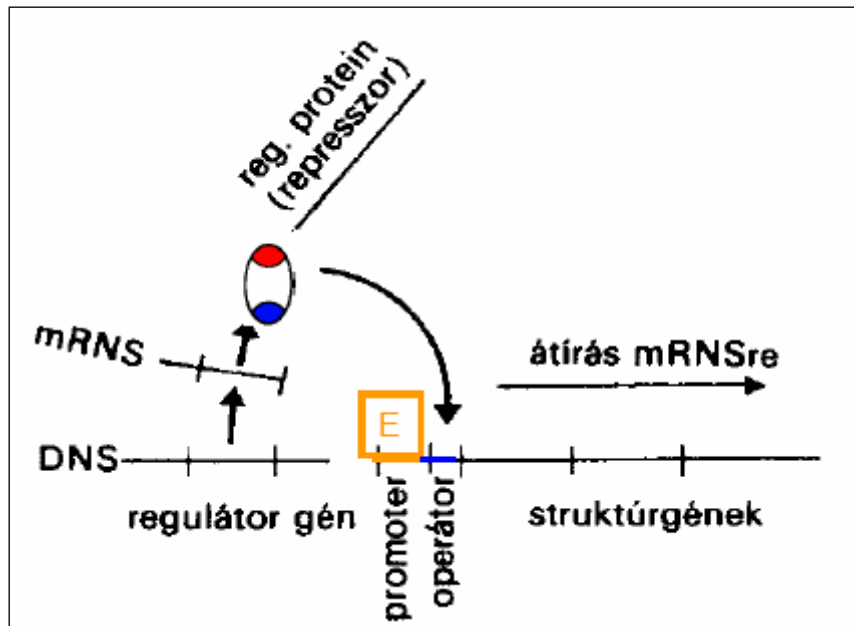
A genetikai szabályozás arra szolgál, hogy bizonyos géncsoportokat ki és bekapcsoljon.

Olyan, mint egy villanykapcsoló, melynek két állása van. Azt kapcsolja, hogy a másoló enzimszisztéma egy géncsoportot a DNS-ről átírjon messenger RNS-re és azután fehérjére, vagy ne írjon át. „Egy bites:”

Átír = igen (bekapcsolt állapot)

Nem ír át = nem (kikapcsolt állapot).

Ez az igen egyszerűen hangzó, de önmagában bonyolult mechanizmust operon szabályozásnak nevezik.



21. kép: Az operon szabályozás

Operon: Közös szabályozott gének csoportja.

A 21. képen a hosszú vízszintes vonal a DNS-t jelöli. Ezen a vonalon belül a kis függőleges vonalak, melyek kis szakaszokra osztják, ezek a géneket határolják.

Először a kép jobb oldalát vizsgálva az operon részeit tekintjük át: Van elől egy rövid génszakasz, ennek neve **promóter**. Ez után van egy **operátor** szakasz, amely szintén egy rövidke gén. Ennek a kettőnek a szabályozásban van szerepe (ezekből nem lesz fehérje).

Ez után következnek a ténylegesen fehérjét kódoló gének, a **struktúrgének**. Az egész mechanizmus ezek átírását, illetve át nem írását irányítja.

A struktúr gének kiírásának folyamata:

A kiíró enzim (sárga E betű a képen) végighalad a DNS mentén és lemásolja messenger RNS-re a struktúrgéneket. Az enzim onnan „tudja”, hogy hol kell kezdeni a kiírást, hogy felismeri a promóter szakaszt. Az enzim fehérjének van egy molekula felülete, a DNS promóter szakaszának is van egy molekula felülete, és ez a kettő összeilleszkedik, mint egy öntvény meg egy öntőforma (vagy mint a kulcs és a zár).

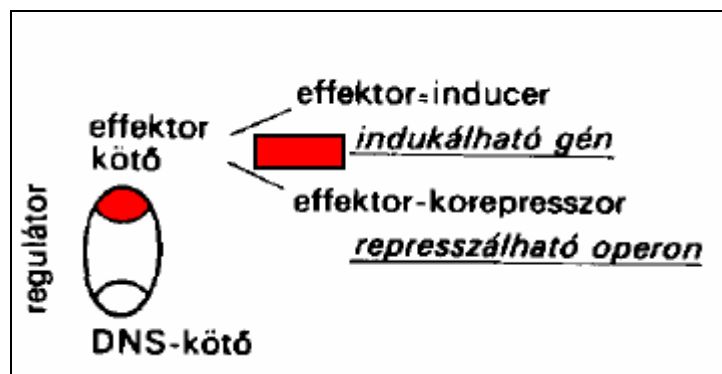
A biokémiai molekulák képesek arra, hogy a molekula felületek összeilleszkedve méretben és alakban (molekula-geometria), és kémiai (másodlagos kémiai kötésekkel) felismerjék egymást. Ez eléggé szelektív kölcsönhatás, az adott enzim nem akárhová fog kötődni a

DNS-en, hanem csakis a promóter szakaszra (ami egy rövid, egy-két tucat bázisnyi hosszúságú DNS szakasz). Ez egy címke a DNS-en, hogy „Itt kell elkezdni a másolást!”, az enzim rá-tapad és „ha hagyják” végigmegy és kiírja a messenger RNS-t.

A „ha hagyják”, azt jelenti, hogy a szabályozásnak az a lényege, hogy van egy olyan fehérjén alapuló mechanizmus, ami esetenként megakadályozza, hogy az enzim végighaladjon. Ez a **regulátor fehérje** képes odakapcsolódni a következő, az **operátor** szakaszhoz, és ez úgy viselkedik, mint egy „sorompó”. Ha leeresztjük a sorompót, akkor nem megy a forgalom, ha odatapad ez a regulátor (vagy más néven represszor) fehérje, akkor az enzim nem tud végigmenni. Megtalálja ugyan a promoter szakaszt és rá is kötődik, de nem tud elindulni, mert ha le van eresztve a sorompó, ekkor nincs kiírás. Ehhez az kell, hogy ennek a fehérjének egy bizonyos molekula felülete felismerje ezt a bizonyos operátor szakaszt, ismét a két molekula felület pontos illeszkedéséről van szó („egy másik öntvény egy másik öntőformához”), tehát a sorompó le van engedve és nincs kiírás. (A fehérjének ez az odatapadó része a képen kékkel van jelölve.)

Jól látható, ha a regulátor fehérje odakötődik, akkor az egész folyamatnak nincsen semmi értelme, hiszen hiába van enzim, hiába van DNS, a fehérjék nem fognak termelődni.

A szabályozás lényege a regulátor fehérjében van:



22. kép: A regulátor fehérje felépítése

A regulátor fehérjének ugyanis két kötőhelye van. Az alsó a DNS kötőhely (ez a rész fog odakötni a DNS-nek egy bizonyos szakaszára), a másik kötőhely (felül, pirossal jelölt) képes egy másik molekulát megkötni. Ez a másik molekula az **effektor** (piros téglalap). Ennek az a következménye, hogy ha az effektor molekula odakötődik, akkor a regulátornak a másik vége is megváltozik, és elveszti a képességét, hogy a DNS-hez kapcsolódjon (az animációban ez a kék szín eltűnése volt). Így többet nem tudja akadályozni a kiírást, „a sorompó fel van húzva”.

Összefoglalva: A szabályozás úgy működik, ha megjelenik ez az effektor molekula, akkor a sorompót játszó molekulát hatástalanítja, ekkor nincs ami megállítsa a kiírást.

A folyamat értelmezése egy fehérjén belül:

A fehérje egy rugalmas anyag, a fehérjeláncok hajtogatása, tekeredése (harmadlagos szerkezet) megváltoztatható. Ha a szerkezet egyik oldalán jelentkezik egy deformáló hatás, akkor a másik oldalán is létrejöhet egy konformáció változás.

Mikor van értelme egy ilyen mechanizmusnak?

Példa: Az *Escherichia coli* bélbaktérium laktóz operonját fedezték fel legelőször (Nobel-díj!), ami szintén így működik. Itt az volt a lényeg, hogy a *coli* többféle cukrot képes felhasználni, de ameddig laktóz (tejcukor) nincs jelen a rendszerben, addig nem termeli a laktóz hasznosításához szükséges enzimeket. Ha viszont a táptalajba laktózt adunk, a *coli* „ráfanyalodik” a laktózra.

A laktóz hasznosításához szükséges 3 féle enzim. Ez ott van a genetikai állományban, de nem íródik ki, azért mert le van eresztve a sorompó. Ha megjelenik a laktóz (ez az effektor, az ábrán a piros téglalap jelképezi) odakötődik a regulátor fehérjéhez, és ettől kezdve a regulátor fehérje nem akadályozza a három laktóz-hasznosító enzim kiírását.

Ha nem akadályozza, akkor ez a 3 enzim elkezd termelődni és a *coli* sejtek fel tudják venni a laktózt, mert a termelt enzimekkel hasznosítani tudják.

Ha a laktóz elfogy, akkor eltűnik az effektor (a piros téglalap), akkor a regulátor fehérjének a kötőhelye ismét üres, visszakapja a DNS-kötő képességét, visszajön a kék színű kötőhely, ismét odakötődik a DNS-en az operátor szakaszra → le van eresztve a sorompó, feleslegesen nem termeli ezt a három enzimet a sejt, csak akkor ha jelen van a laktóz

Ez az operon mechanizmusnak az egyik lehetősége, ezt **pozitív szabályozásnak, (indukció, vagy derepresszió)** nevezzük, mert az effektor megjelenése enzim-termelődést idéz elő. Pozitív, mert valami megjelenik, ami eddig nem volt jelen. Indukciónak azért nevezik, mert egy anyag megjelenése enzim-termelést indukál.

Ugyanez a mechanizmus fordítva is működik. Ezt **negatív szabályozásnak, (represszió, inhibíció)** nevezzük, ekkor egy molekula a megjelenése leállítja az enzimeknek a kiírását. A regulátor fehérjére kötődő effektor a másik, a DNS kötőhelyet nem megszünteti, hanem létrehozza.

Tehát ekkor egy effektor molekula megjelenése nem elindítja, hanem leállítja az enzim kiírását. Ekkor fordított a kapcsolás. (Fordítva van bekötve a kapcsoló.) Ha a molekula odakötődik a fehérjére, akkor a kék szín nem eltűnik, hanem megjelenik. A represszornál a molekula megjelenése leengedi a sorompót, akkor képes odakötöni a DNS-hez a represszor fehérje, és a kiíró enzim nem tud végigmenni.

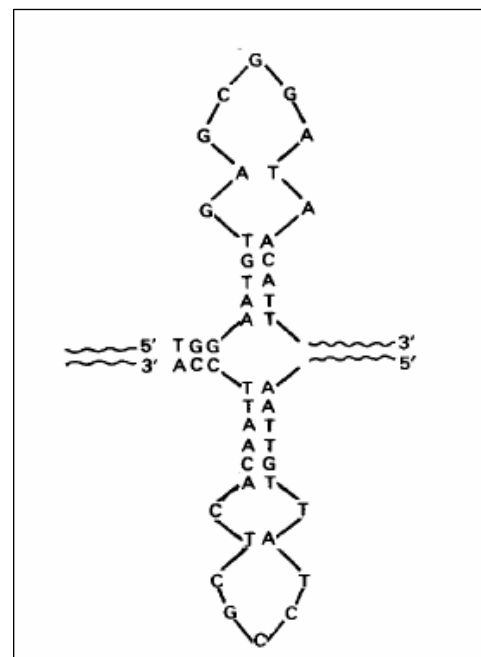
Mikor van a negatív szabályozásnak értelme?

A pozitív lényege az volt, ha jön egy új tápanyag, akkor azt hasznosítani kell. A negatív folyamatnak a túltermelések szabályozásánál van szerepe. Egy élő sejt saját maga számára nagyon sokféle anyagot termel. Pl. megtermeli az aminosavakat, abból lesznek fehérjék, vagy megtermeli a nukleotidokat abból lesz a nukleinsav, vagy megtermeli a zsírokat.

Honnan tudja, hogy mikor elég?

A sejtben minden anyagnak van egy elégséges/normális koncentrációja, ekkor a sejt anyagcseréje optimálisan működik. Ha ennél több van jelen (mert sokat termelt a sejt, vagy a tápoldatban van bőségesen), akkor ebből nem kell többet termelni. Ez az anyag – az egyszerűség kedvéért nevezzük X-nek – egyúttal effektor molekulaként is működik. Ha az X nagy koncentrációban van jelen, akkor odakötődik a megfelelő regulátor fehérjéhez, a regulátor fehérje odakötődik a DNS-en a megfelelő operátorhoz és leállítja a X-et termelő enzimek kiírását. Tehát ez egy negatív visszacsatolás, a túltermelést megakadályozó szabályozás. Negatív, mert egy anyag megjelenése a meglévő enzimtermelést megszünteti.

Két helyen is szó volt olyan DNS szakaszokról, amire egyes fehérjék szelektíven rátapadhatnak. Ha ez a „címke” egy bizonyos bázissorrend, ezt „kívülről” elég nehéz észrevenni, mert kifelé a cukor-foszfát láncok állnak, a bázisok befelé fordulnak. Emellett a DNS-en címkéként szolgálhatnak jellegzetes hurkos alakzatok. Ezek úgynevezett „tükrökép”, vagy „palindrom” DNS szakaszok, mert egyes rövid szakaszok bázissorrendje a két szálon fordított sorrendben megismétlődik. A hurkok egy-két tucatnyi bázis



23. kép: hurkos palindrom (gén)szakasz

párból állnak, ahogy ez a képen is látszik. Lokálisan létrejön egy kis kiálló hurok, ennek megtalálása a fehérjék számára sokkal könnyebb, mintha a kettős szálú DNS belsejében kellene megtalálni a megfelelő bázissorrendet.

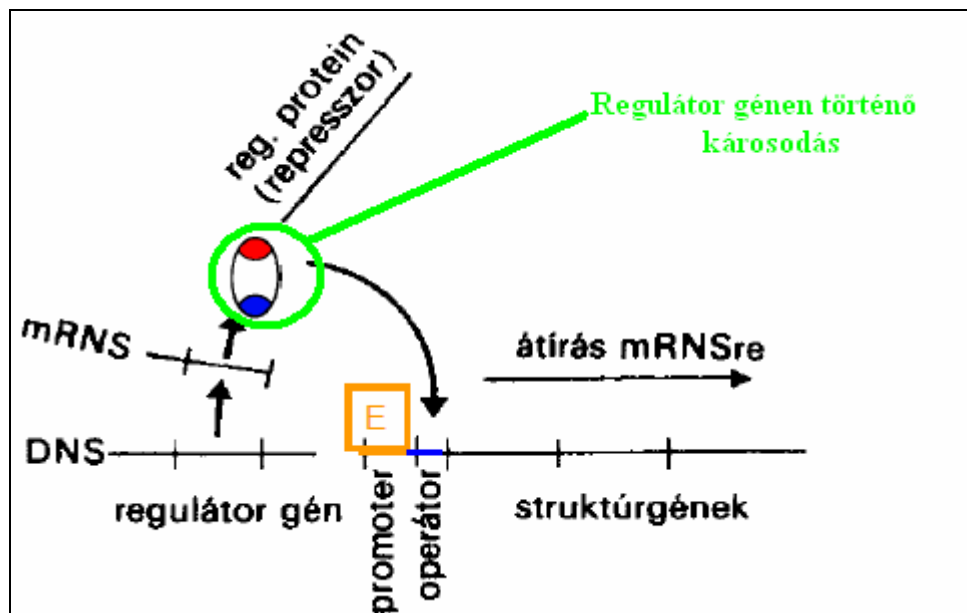
Mutációk az operonon

Mi történik akkor, ha mutáció következik be az operon valamelyik elemén? Az operonnak sok eleme van, pontmutáció bármelyiken bekövetkezhet.

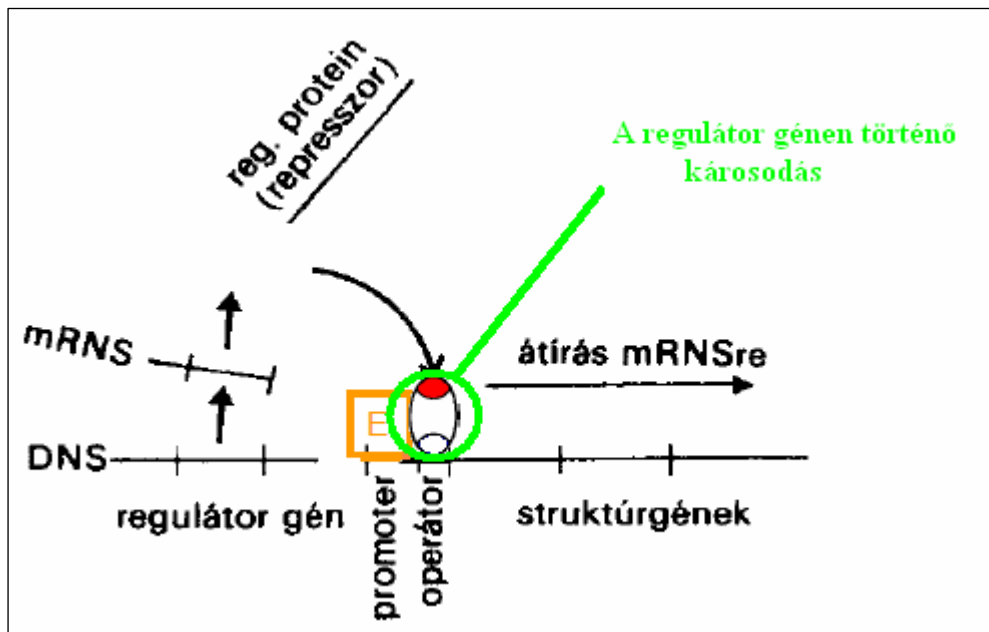
Melyik génben, melyik változás, milyen hatást okoz:

Mutáció a regulátor génen:

A regulátor fehérjét tartalmazó kódoló génről van szó. Ha a regulátor génen történik valami változás, akkor a regulátor fehérje romlik el. Ha a regulátor fehérje elromlott, akkor „a sorompó romlott el”, azaz vagy állandóan nyitva van, vagy állandóan zárva van, és nem tud átkapcsolni az egyik állapotról a másikra. Tehát a szabályozás megszűnik, vagy állandóan folyik a kiírás és a termelés (ha a felső állapotban akad ki, 24. kép), ebben az esetben a szabályozástól függetlenül az adott enzimek állandóan szabályozatlanul, bőségesen termelődnek, állandóan jelen vannak az adott mutáns organizmusban.



24. kép: A regulátor génen történő károsodás nem-kötődő állapottal



25. kép: A regulátor génen történő károsodás állandó kötődéssel

Ha a sorompó a leengedett állapotban ragad be, akkor ezek az enzimek soha nem íródnak ki. Ebbe akár bele is pusztulhat az adott sejt, ha egy fontos dolgot nem tud magának előállítani. Tehát a regulátor génen a szabályozás megszűnik és valamelyik szélsőséges állapot állandósul.

Mutáció az operátor génen:

Ha itt történik egy mutáció, akkor a reguláló fehérje nem tud odakötődni az adott szakaszhoz, tehát a kiírás fékezés nélkül, állandóan tart. „A sorompót nem lehet leengedni.” Ha ez egy természetben élő, evolúció által érintett organizmussal történik, akkor ez neki nyilván hátrány, hiszen, ha sokat termel valamiből egy adott sejt, amiből neki nem kellene sokat termelnie, akkor ez neki az evolúciós küzdelemben hátrány, mert pazarol, és a pazarló megoldásokat a természetes szelekció kiszűri.

A biotechnológusok érdeke viszont lehet más: Pl. egy biotechnológus azt akarja, hogy egy adott organizmus egy bizonyos vegyületből sokat termeljen számára, akkor neki ez a változás előnyös lehet. Tehát az adott változás értékét, hogy az pozitív vagy negatív, mindig az adott körülmények határozzák meg.

Mutáció a promóter génen:

Ha a promóter génen következik be változás, akkor az azt jelenti, hogy az enzím rendszer nem tud bekapcsolódni. Nincs átírás messenger RNS-re. Ha létfontosságú anyagról van szó, akkor ez pusztulást jelent a sejt számára, mert nem tud megtermelni egy létfontosságú anyagot. Ha az anyag kevésbé létfontosságú, akkor a sejt alkalmazkodó képessége csökken.

Pl.: Ha a laktóz hasznosító enzimeket nem tudja termelni egy *coli* baktérium, akkor az csak akkor hátrány számára, ha laktóz van a tápoldatban. Ha glükózt fogyaszt, akkor nem hátrány.

Struktúr génen bekövetkező mutáció:

Ez a szabályozást abszolút nem érinti, hiszen a sorompó be és kikapcsolása ugyanúgy működik, viszont a struktúr gének közül az elrontott génnek a fehérjéje hibás lesz. Az egy csoportban szabályozott gének közül egy fehérje nem fog termelődni, illetve hibás szerkezetű lesz.