**2. A molekuláris biológia objektumai, összefüggései, kísérleti tervezés**

**2.1. A molekuláris biológia objektumai**

A molekuláris biológiai technikák alkalmazása során elsősorban biológiai eredetű molekulákkal foglalkozunk, mint pl. a szénhidrátok, lipidek, fehérjék és nukleinsavak.

**2.1.1. Szénhidrátok**

A szénhidrátok közé soroljuk a mono-, oligo- és poliszacharidokat. A monoszacharidok 3–7 szénatomszámú molekulák, melyek szénen és hidrogénen kívül oxigénatomokat is tartalmaznak (összegképletük CnH2nOn vagy ezt megközelítő). A legismertebb monoszacharidok a glukóz, fruktóz, mannóz, galaktóz. A természetben mint szállítandó tápanyag vagy a di-, oligo- vagy poliszacharidok építőköveként van jelen. Két monoszacharid összekapcsolódva diszacharidot alkot. Legismertebb képviselői a maltóz, szacharóz, laktóz, cellobióz. Biológiai rendszerekben elsősorban mint táplálék vagy ozmotikum játszanak szerepet, de megjelennek poliszacharidok lebomlásának köztes termékeként is. A mono- és diszacharidok többsége édes ízű, ezért ezeket cukroknak is hívjuk. Néhány monoszacharid összekapcsolódásával keletkeznek az oligoszacharidok. Önállóan nagyon ritkán fordulnak elő, legtöbbször fehérjékhez vagy membrán-lipidekhez kötődnek, módosítva azok élettani sajátosságait. A poliszacharidok nagyon sok monoszacharid építőkőből szintetizálódott polimerek, melyek elsősorban strukturális építőelemként vagy tartaléktápanyagként vannak jelen az élőlényekben. Legfontosabb képviselőik a cellulóz, glikogén, amilóz, amilopektin (2-1. ábra).

2-1. ábra

**2.1.2. Lipidek**

A lipidek (zsírok, olajok) **fizikai tulajdonságaikban** különböznek a többi makromolekulától. Részben, vagy teljesen **hidrofób** vegyületek, polimereket nem képeznek. Hidrofób tulajdonságuk a bennük lévő nyílt vagy gyűrűs, hosszú szénhidrogénláncoktól eredeztethető. A nyílt láncúak közül a legegyszerűbbek a **zsírsavak**, melyek lebontásával (oxidálásával) a sejtek igen jelentős mennyiségű energiához tudnak jutni. A telített és a telítetlen zsírsavak fontos alkotóelemei a **triglicerideknek** (tartaléktápanyag) és a **foszfolipideknek** (sejtmembrán-alkotó). A gyűrűs lipidek közül a legismertebbek a szteránvázas vegyületek és az eikozanoidok. A szteránváz négy egymáshoz kapcsolódó gyűrűből áll, melyekről különböző oldalláncok erednek. A legismertebb szteránvázas vegyület a **koleszterin**, mely fontos sejtmembrán-alkotó. A koleszterinből képződhetnek az epesavak és fontos szteroid hormonok is. A koleszterin zsírsavval képzett koleszterin-észterek formájában is szállítódhat vagy tárolódhat a sejtekben. Az eikozanoidok hosszú zsírsavból (arachidonsav) képződnek, egy gyűrűt tartalmaznak. Legismertebb képviselőik a prosztaglandinok, leukotriének, tromboxánok. Szerepük a sejtek közötti kommunikációban van (2-2. ábra).

2-2. ábra

http://www.ambrogio-pagani.it/images/trigliceride.jpg

2013.08.21.

http://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Prostaglandin\_E1.svg

2013.08.21.

**2.1.3. Fehérjék**

Az élő szervezetek tulajdonságainak döntő részét a bennük lévő fehérjék igen változatos felépítése teszi lehetővé. A változatos felépítés alapja a fehérjék alapegységeinek eltérő szerkezetében keresendő. Ezek az alapegységek az aminosavak. A Föld összes élőlényében mindössze huszonháromféle aminosav építi fel a fehérjéket, amelyekből húszféle minden élőlényben előfordul. Ezek a **proteogén aminosavak** az amino- és a karboxicsoportot összekötő szénatomhoz kapcsolódó oldalláncokban különböznek egymástól. Az aminosavak polimerizációja során létrejött **polipeptidlánc** az oldalláncok tulajdonságainak következtében feltekeredik, és **jellegzetes struktúrát** alkot, az adott polipeptidláncra kizárólagosan jellemző tulajdonságokkal (2-3. ábra). Az így létrejött fehérjék részt vesznek a sejtek és a sejtalkotók strukturális felépítésében, és szinte kizárólag fehérjékhez köthető az élőlényekben végbemenő biokémiai reakciók katalízise. Gyakran a feltekeredett fehérjék más fehérjékkel kapcsolódnak, **fehérje-komplexeket** hozhatnak létre. A komplexek létrejötte fontos előfeltétele lehet a fehérjék megfelelő működésének.

2-3. ábra

http://www.pnas.org/content/102/22/7835/F1.large.jpg

2013.08.21.

http://photos1.blogger.com/blogger/4566/894/1600/ProteinStructure-pud.jpg

2013.08.21.

**2.1.4. Nukleotidok, nukleinsavak**

A nukleotidok olyan vegyületek, amelyek alapvetően három különböző jellegű részből állnak: egy gyűrűs monoszacharidból (**pentózból**), egy aromás **szerves bázisból**, és egy vagy több **foszfát-csoportból** (2-4. ábra). A pentóz alkotórész lehet **ribóz** vagy **dezoxiribóz.** Nukleotidok találhatóak a nukleinsavakban, de szerepelhetnek koenzimként, prosztetikus csoportként, vagy energiatároló molekulaként is. A nukleotidok polimerizációjával keletkeznek a nukleinsavak. A polimerizáció során **pentóz-foszfát lánc** keletkezik, amelyről szerves bázisok ágaznak le. A ribonukleinsavakban (RNS) **adenin, guanin, citozin** és **uracil** bázisok találhatóak, a dezoxiribonukleinsavakban (DNS) az uracil helyett **timin** van.

Az RNS egyszálú, többféle funkciója lehetséges. Az **mRNS**-ek kódolják a fehérjék aminosav-szekvenciáját. A **tRNS**-ek szállítják az aminosavakat a fehérjeszintézis helyére, és felelősek a kódok felismeréséért (2-5. ábra). Az **rRNS**-ek a fehérjeszintézis komplexeiben, a riboszómákban találhatóak, ott strukturális és katalitikus funkciókat töltenek be. Számos más fontos funkcióhoz is szükségesek RNS-molekulák, például a splicinghoz, más RNS-ek éréséhez, telomérek szintéziséhez, génregulációhoz stb.

A DNS **antiparalel kettős szálat** alkot, a szemben lévő szálak bázisai között **hidrogénhíd** (H-híd) kötések teremtik meg a kapcsolatot szigorúan meghatározott módon: adeninnel szemben mindig timin, guaninnal szemben mindig citozin található; előbbi kettő 2 db, utóbbi kettő 3 db H-híddal kapcsolódik egymáshoz (2-6. ábra). A DNS szerepe az **információ tárolásában** és **továbbörökítésében** van.

2-4. ábra

2-5. ábra

https://wikispaces.psu.edu/download/attachments/54886630/figure\_17\_12.jpg

2013.08.21.

2-6. ábra

http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/dna1.html

2012.11.20.

**2.2. A molekuláris biológia összefüggései**

A molekuláris biológia nem egy teljesen különálló tudományág, más tudományágakkal szorosan összefügg, átfed. A molekuláris biológiai technikák alkalmazásával vizsgált makromolekulák sem önmagukban léteznek a természetben, élő rendszerek (sejtek, szövetek) alkotóelemei. Ez az alfejezet ezeket az összefüggéseket tárgyalja; röviden összefoglaljuk a makromolekulák (elsősorban a nukleinsavak és a fehérjék) keletkezését, sejtben betöltött szerepüket, és szót ejtünk a molekuláris biológiával rokon tudományterületekről.

**2.2.1. Sejtek**

Az élőlények alapegysége a sejt. A sejteket kívülről **sejtmembrán** határolja, mely egy **kettős foszfolipid-réteg**, benne integráns fehérjemolekulákkal. A membránon belül található viszkózus állományt nevezzük **citoplazmának**. A citoplazma legnagyobb részét víz alkotja, de nagy mennyiségben találhatóak benne **fehérje-** és **RNS**-molekulák. A **prokarióta** sejtekben nincsenek **sejtszervecskék**, a DNS-állomány nincs elválasztva a citoplazmától. Az **eukarióta** sejtekben már találunk sejtszervecskéket, melyeket szintén foszfolipid kettős membrán határol. A DNS itt a **sejtmagban** található. Az eukarióta sejtek sejtmembránjában foszfolipideken és fehérjéken kívül egy másik fajta lipid, **koleszterin** is található. A sejtmagon kívül számos más sejtszervecske is található az eukarióta sejtekben: **mitokondriumok, endoplazmás retikulum** (ER)**, Golgi-készülék, lizoszómák, peroxiszómák**. Növényi sejtekre jellemző organellumok a **színtestek** (plasztisz) és a **vakuólum** (2-7. ábra). A mitokondriumok és a színtestek valamikor önálló prokarióta élőlények voltak, saját DNS-állománnyal rendelkeznek.

2-7. ábra

http://www.phschool.com/science/biology\_place/biocoach/cells/review.html

2012.11.23.

**2.2.2. Makromolekulák keletkezése**

Az örökítés során a DNS szemikonzervatív úton **megkettőződik (replikálódik)**; a két szál elválik egymástól, és mindkét szálra megszintetizálódik az **antiparalel komplementer** szál. A két új DNS adja az osztódás során keletkező két sejt genetikailag identikus örökítőanyagát. A sejtben a DNS többszörösen feltekeredik, hogy a rengeteg kódolt információt viszonylag kis helyen tárolhassa. Az információ kisebb szakaszokban, ún. **génekeben** tárolódik a hosszú láncon belül. Ezekről a génekről történik az RNS-ek átíródása (**transzkripció**) egy pontosan meghatározott polimerizációs reakciósorozat folyamán. A sejt szükségleteinek megfelelően mindig csak bizonyos génekről történik RNS-átíródás, a többi gén nem működik. A képződött mRNS-ekről (eukariótákban a poszttranszkripciós érést követően) végül fehérjék íródnak át. (A képződött tRNS-ekről és rRNS-ekről nem történik fehérjeátírás). Ezt a folyamatot **transzlációnak** hívjuk, az mRNS nukleotidsorrendje lefordítódik a keletkező fehérje aminosav-sorrendjére. A jó néhány évtizede lefektetett, ún. **centrális dogma** szerint tehát a DNS kódolhat DNS- és RNS-átírást, az RNS pedig kódolhat fehérjeátírást (2-8. ábra). Ma már tudjuk, hogy RNS szolgálhat mintául DNS és RNS közvetlen átírásához is.

2-8. ábra

http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/central\_dogma.gif

2013.08.21.

A szénhidrátok és lipidek makromolekulái energiaigényes, soklépéses biokémiai reakciókban keletkeznek kis molekulatömegű alapegységekből. A biokémiai reakciók katalizátorai döntő többségben specifikus fehérjék, melyek aminosav-sorrendje a sejt DNS-ében van kódolva, ily módon a sejt összes makromolekulájának keletkezése végső soron visszavezethető a benne található DNS bázissorrendjére.

**2.2.3. Határtudományok**

Az élőlények tulajdonságainak és a bennük található örökítőanyagnak a kapcsolatát a **genetika** tudománya vizsgálja. A sejtek, sejtszervecskék struktúráját és viselkedését a **sejtbiológia**, a sejtek tulajdonságainak és a bennük lévő fehérjéknek a kapcsolatát pedig a **biokémia** tudományág tanulmányozza. A **molekuláris biológia** az említett tudományokkal nagyrészt átfed, megpróbál kapcsolatot teremteni gének, fehérjék és tulajdonságok között. Molekuláris biológiának leginkább azokat a **kísérleti módszereket** hívjuk, amelyek alkalmazásával ezek a kapcsolatok kideríthetők. Ma már a genetikusok, sejtbiológusok és biokémikusok többsége használ molekuláris biológiai módszereket kutatásai során, ezért ez a három, eredetileg jól körülhatárolható tudományterület kezd egyre inkább összefolyni (2-9. ábra).

2-9. ábra

**2.3. Kísérleti tervezés**

A problémák molekuláris biológiai oldalról történő megközelítésének van egy **általános** kísérleti **sémája**. Természetesen nem minden kísérleti rendszerben szükséges a teljes sémán végigmenni, de ez egy jó kapaszkodót nyújt, ha egy feltett tudományos kérdésre kísérletek útján szeretnénk megtalálni a helyes választ.

Az esetek többségében valamilyen élő rendszerből indulunk ki, és valamely rá jellemző makromolekulát szeretnénk megvizsgálni vagy manipulálni. Ehhez a különböző alkotóelemeket el kell különítenünk egymástól, egy adott molekulatípusra fókuszálva. Ilyenkor az adott molekulatípust (RNS-eket, fehérjéket, DNS-t stb.) **izolálnunk** kell a szövetből vagy a sejtkultúrából. A molekulatípusok különböző tulajdonságait felhasználva, megfelelő izolálási technikák segítségével tudjuk ezt megtenni. Bizonyos molekulatípusokon (DNS, RNS) belül a molekulák hasonló tulajdonságúak, míg más esetekben (pl. fehérjék) a tulajdonságok nagyon eltérőek lehetnek. Az izolálási lépések során használt, a későbbi felhasználás szempontjából felesleges vagy káros anyagokat különböző **tisztítási** mechanizmusokkal tudjuk eltávolítani. Gyakran előfordul, hogy az így kapott heterogén keveréket további részekre szükséges bontanunk, akár addig, hogy csak egyetlenegy fajta molekulát kapjunk. Legtöbbször ezt valamilyen **elválasztási** technikával oldjuk meg, az adott molekulára jellemző specifikus fizikai tulajdonságo(ka)t kihasználva.

Az izolálási, tisztítási, elválasztási folyamatok szükségszerűen felcserélődhetnek, ismétlődhetnek, akár változó kondíciókkal. Minden esetben a megfelelő tisztaságú és mennyiségű makromolekula kinyerése a célunk.

Az izolálási, tisztítási, és elválasztási folyamatok során kapott termékünket ellenőriznünk kell. Ehhez valamilyen **azonosítási** módszerre van szükségünk. Ha az izolált és azonosított termék bizonyos paramétereit szeretnénk kideríteni, akkor különböző **vizsgálati** módszereknek is alávethetjük. Bizonyos esetekben nem csak tisztított, hanem tisztítatlan mintákból is történhet az azonosítás vagy a vizsgálat. Ilyenkor az adott molekula jelenlétét különböző analitikai módszerekkel tudjuk kimutatni.

Előfordul, hogy a makromolekula azonosításával, vagy minőségi/mennyiségi vizsgálatával le is zárul a kutatás kísérletes része. Az esetek egy részében azonban a kitisztított anyagot valamiféleképpen **manipulálni** szeretnénk, hogy a megváltoztatott kémiai szerkezet hatására bekövetkező biokémiai/élettani tulajdonságok változását tanulmányozhassuk. A manipuláció után szinte törvényszerűen ismétlődnek majd a szükséges izolálási, tisztítási, elválasztási, azonosító és vizsgálati lépések.

A tulajdonságok sikeres megváltoztatását minden esetben **ellenőrizni** kell, a hatásukra létrejött biokémiai/élettani változásokat pedig kísérletesen **mérni** szükséges (lehetőleg numerikusan) (2-10. ábra).

A kísérleteket mindig a legnagyobb előrelátással, a lehetséges zavaró körülmények kiiktatásával kell megtervezni. Igyekezzünk a már bevált technikák minél pontosabb adaptációjára, a körülmények standardizálására. A kísérletekben elengedhetetlen a megfelelő kontrollok használata. A **negatív kontrollok** használata esszenciális, de amennyiben lehetséges, **pozitív kontrollokat** is használjunk.

2-10. ábra