

DNS, kromoszóma,
alapfogalmak.

DNS károsodások, mutációk.

A genotoxikus hatás fő
célsejtjei, támadáspontjai.

Mi a molekuláris biológia?

- ▶ A molekuláris biológia az élőlények és sejtek működésének molekuláris szintű tanulmányozása.
- ▶ A sejteken belüli interakciók és szabályozásuk megértésével foglalkozik: DNS, RNS és fehérjeszintézis.
- ▶ Molekuláris laboratóriumi technikák alkalmazása és fejlesztése.
- ▶ Átfedés: genetika, biokémia, sejtbiológia.

Mi a molekuláris toxikológia?

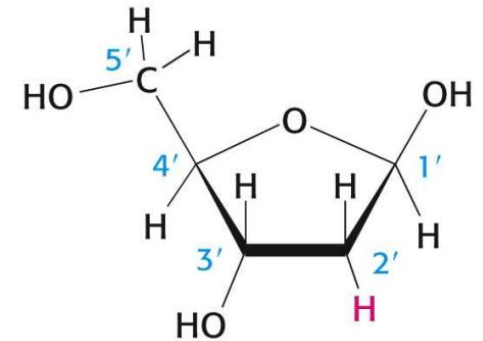
- ▶ Természetes és mesterséges anyagok (káros és jótékony) élő szervezetre gyakorolt hatásaival, azok háttérében álló folyamatok sejt szintű és molekuláris vizsgálatával foglalkozik.
- ▶ Expozíció, dózis-hatás vizsgálat, kockázatbecslés stb.

Mi a genotoxikológia?

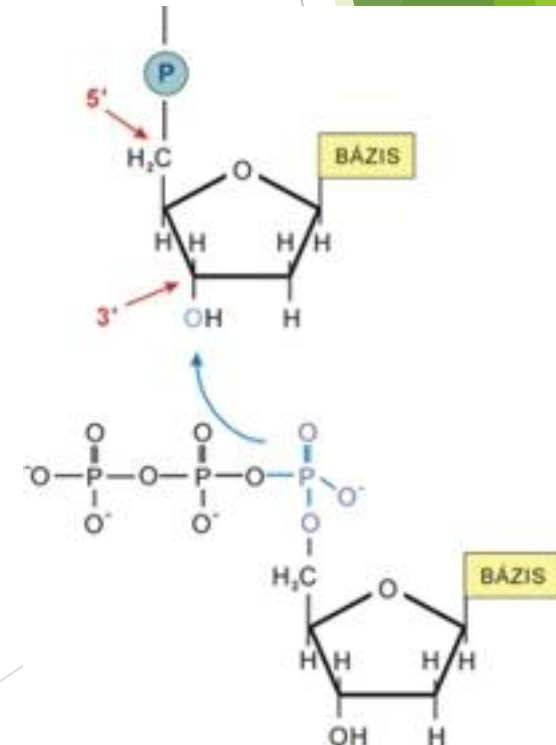
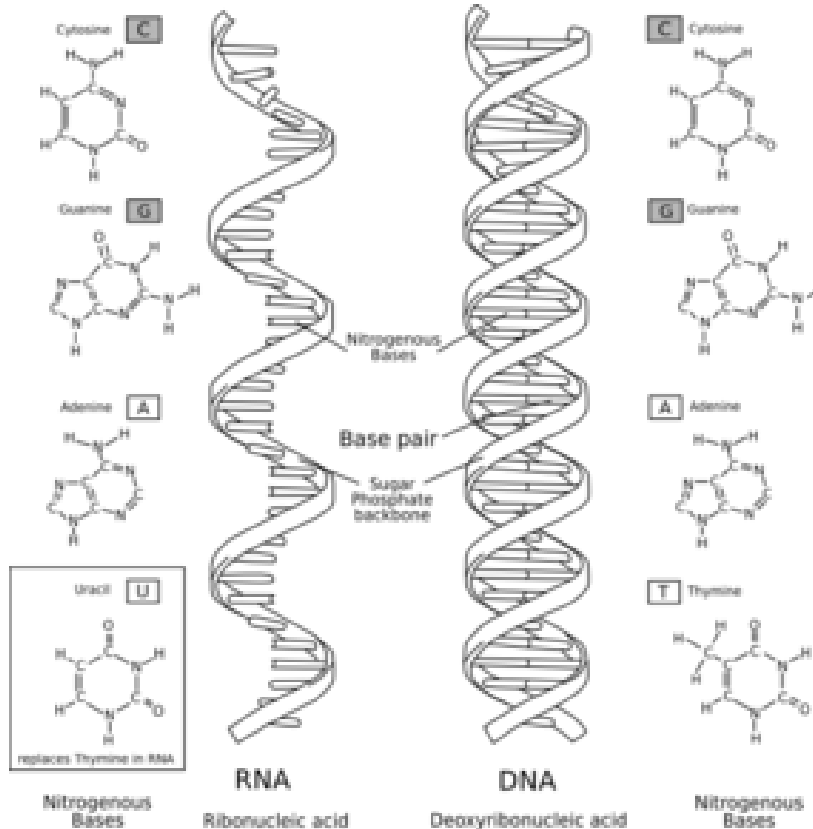
- ▶ Genotoxikológia - genetikai toxikológia, az 1960-as években alakult ki
- ▶ DNS károsító hatás vizsgálata
- ▶ A környezeti genotoxikológia az ivóvízben, felszíni és felszín alatti vízben, talajban és levegőben előforduló genotoxikus anyagok hatásának a kimutatásával foglalkozik.
- ▶ Genotoxikus anyagok: azok a vegyületeket, melyek a DNS-ben tárolt genetikai információt megváltoztatják, vagy a genetikai károsodást kijavítani szolgáló rendszereket gátolják, ezáltal az örökölt tulajdonságok megváltozását idézhetik elő.

DNS (Dezoxiribonukleinsav)

- ▶ Örökítőanyag
- ▶ Alapegysége: nukleotid
(cukor, heterociklikus bázis, foszforsav)

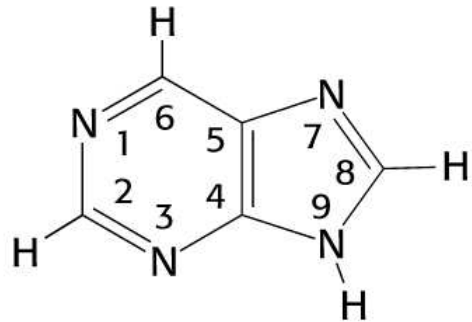


Deoxyribose

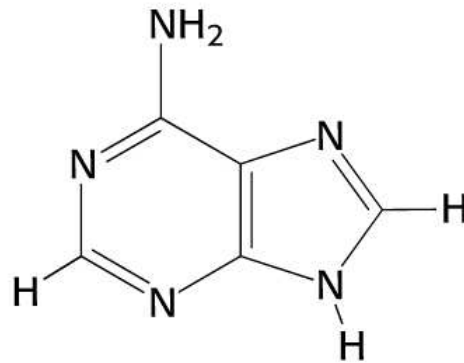


Nitrogéntartalmú heterogyűrűs bázisok:

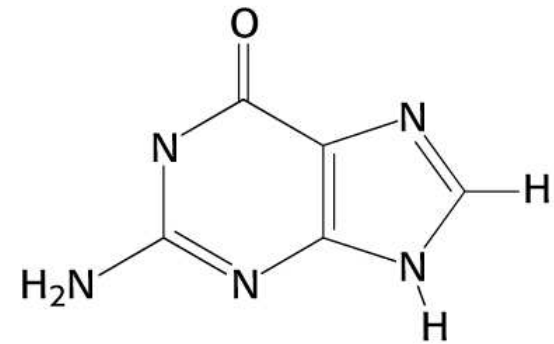
- ▶ Purinbázis: adenin (A), guanin (G)



Purine

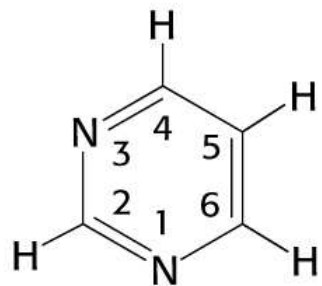


Adenine

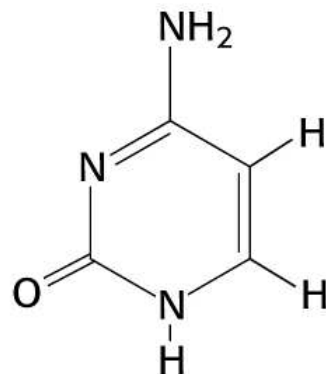


Guanine

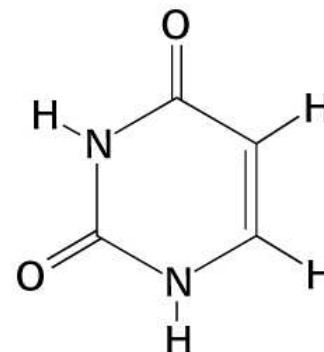
- ▶ Pirimidinbázis: citozin (C), timin (T), (RNS-ben uracil (U))



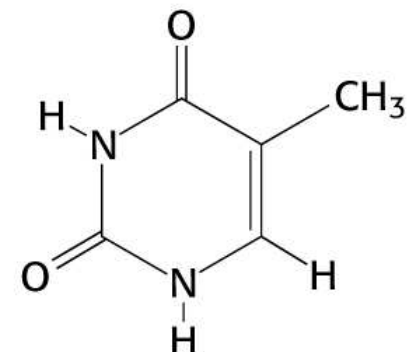
Pyrimidine



Cytosine



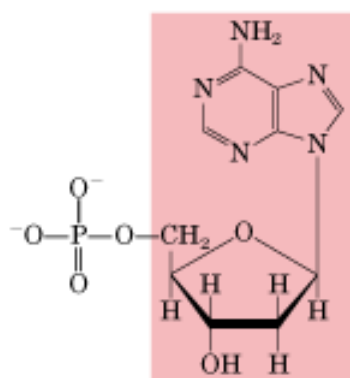
Uracil



Thymine

Nitrogéntartalmú heterogyűrűs bázisok:

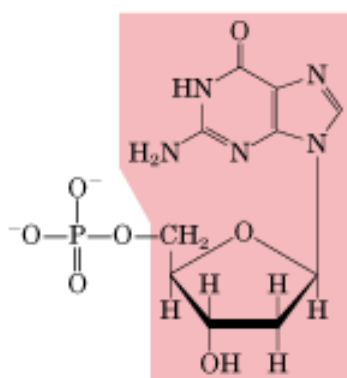
- ▶ Kovalens kötéssel egy öt szénatomos cukorhoz - dezoxiribóz - kapcsolódnak



Nucleotide: Deoxyadenylate
(deoxyadenosine
5'-monophosphate)

Symbols: A, dA, dAMP

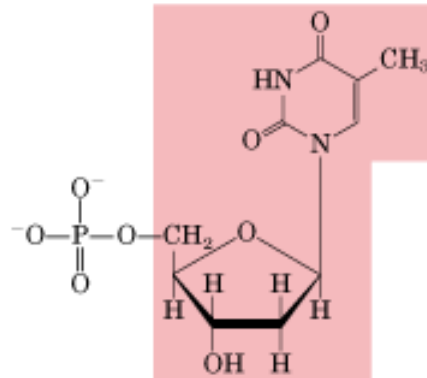
Nucleoside: Deoxyadenosine



Nucleotide: Deoxyguanylate
(deoxyguanosine
5'-monophosphate)

Symbols: G, dG, dGMP

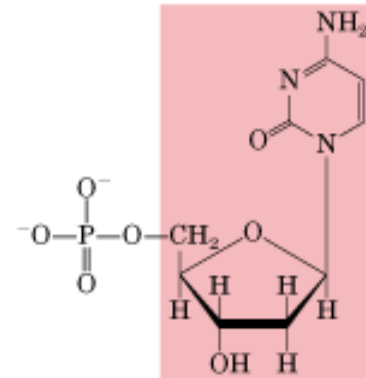
Nucleoside: Deoxyguanosine



Nucleotide: Deoxythymidylate
(deoxythymidine
5'-monophosphate)

Symbols: T, dT, dTMP

Nucleoside: Deoxythymidine



Nucleotide: Deoxycytidylate
(deoxycytidine
5'-monophosphate)

Symbols: C, dC, dCMP

Nucleoside: Deoxycytidine

A nukleotidok teljes kémiai neve: rövidítése

deoxiadenozin 5'-monofoszfát, dAMP - A

deoxiguanozin 5'-monofoszfát, dGMP - G

deoxicitidin 5'-monofoszfát, dCMP - C

deoxitimidin 5'-monofoszfát, dTMP - T

Chargaff szabályok (1955)

- ▶ Különböző élőlényekből kivonható DNS összetételének vizsgálata érdekes törvényszerűségeket tárt fel. A törvényszerűségeket Erwin Chargaff ismerte fel:
 1. Az élőlényekből származó DNS-ekben a pirimidin nukleotidok ($T + C$) mennyisége egyenlő a purin ($A + G$) nukleotidok mennyiségével.
 2. A T mennyisége egyenlő az A -val, és C mennyisége egyenlő G -vel.
 3. Azonban $A + T$ és $C + G$ mennyiségek nem feltétlenül egyenlők, azok aránya jellemző az élőlényre amiből a DNS származik. Fajon belül a különböző szervezetekben mindig azonos.

Chargaff szabályok (1955)

8-1

TABLE

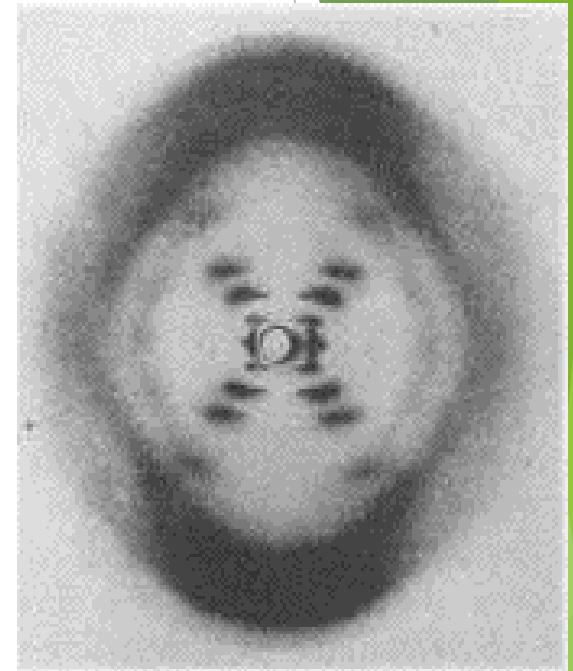
Molar Properties of Bases* in DNAs from Various Sources

Organism	Tissue	Adenine	Thymine	Guanine	Cytosine	$\frac{A + T}{G + C}$
<i>Escherichia coli</i> (K12)	—	26.0	23.9	24.9	25.2	1.00
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	—	29.8	31.6	20.5	18.0	1.59
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—	15.1	14.6	34.9	35.4	0.42
Yeast	—	31.3	32.9	18.7	17.1	1.79
<i>Paracentrotus lividus</i> (sea urchin)	Sperm	32.8	32.1	17.7	18.4	1.85
Herring	Sperm	27.8	27.5	22.2	22.6	1.23
Rat	Bone marrow	28.6	28.4	21.4	21.5	1.33
Human	Thymus	30.9	29.4	19.9	19.8	1.52
Human	Liver	30.3	30.3	19.5	19.9	1.53
Human	Sperm	30.7	31.2	19.3	18.8	1.62

*Defined as moles of nitrogenous constituents per 100 g-atoms phosphate in hydrolysate.

Source: E. Chargaff and J. Davidson, eds., *The Nucleic Acids*. Academic Press, 1955.

A DNS (B forma) röntgendiffrakciós képe (R.Franklin és M.Wilkins, 1953)



- A röntgen diffrakcióval kapott adatok azt jelezték, hogy
- a molekula fonálszerű,
 - a fonál két párhuzamos szerkezetből áll.
 - egyenletes átmérőjű,
 - spirál alakú.

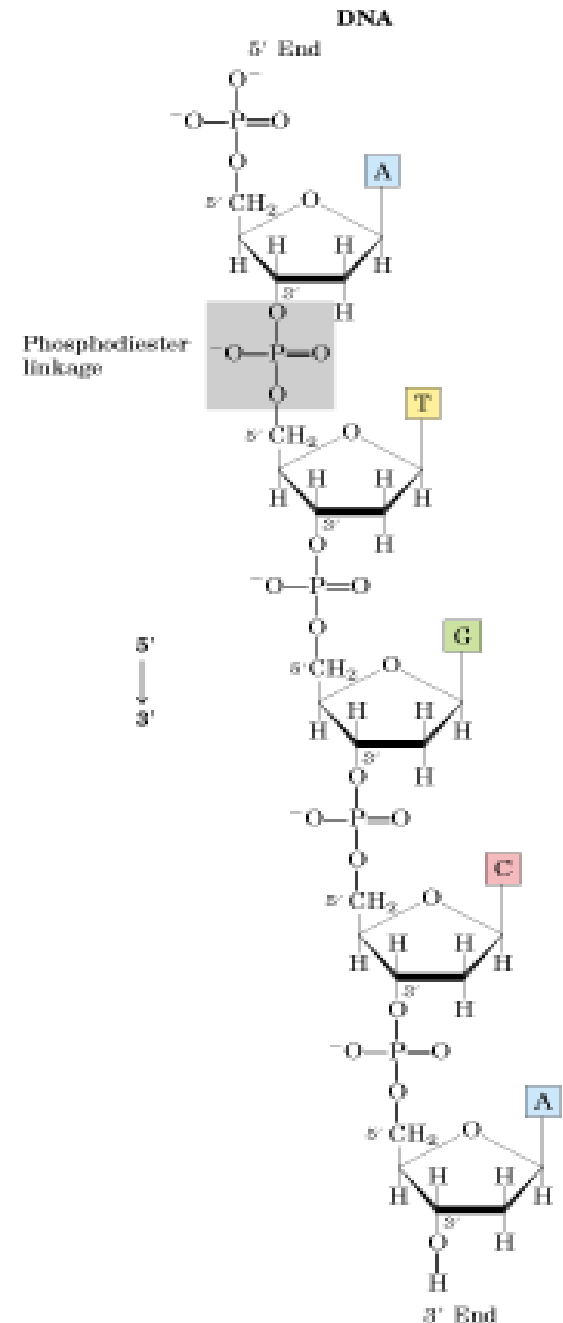
A DNS térszerkezete (Watson és Crick, 1953)



A modell kidolgozása során összeillesztették a röntgendiffrakciós adatokat, a Chragaff szabályokat és a DNS és alkotórészeiről felhalmozódott kémiai ismereteket úgy, hogy a modell eleget tehessen az örökítőanyag által támasztott követelményeknek.

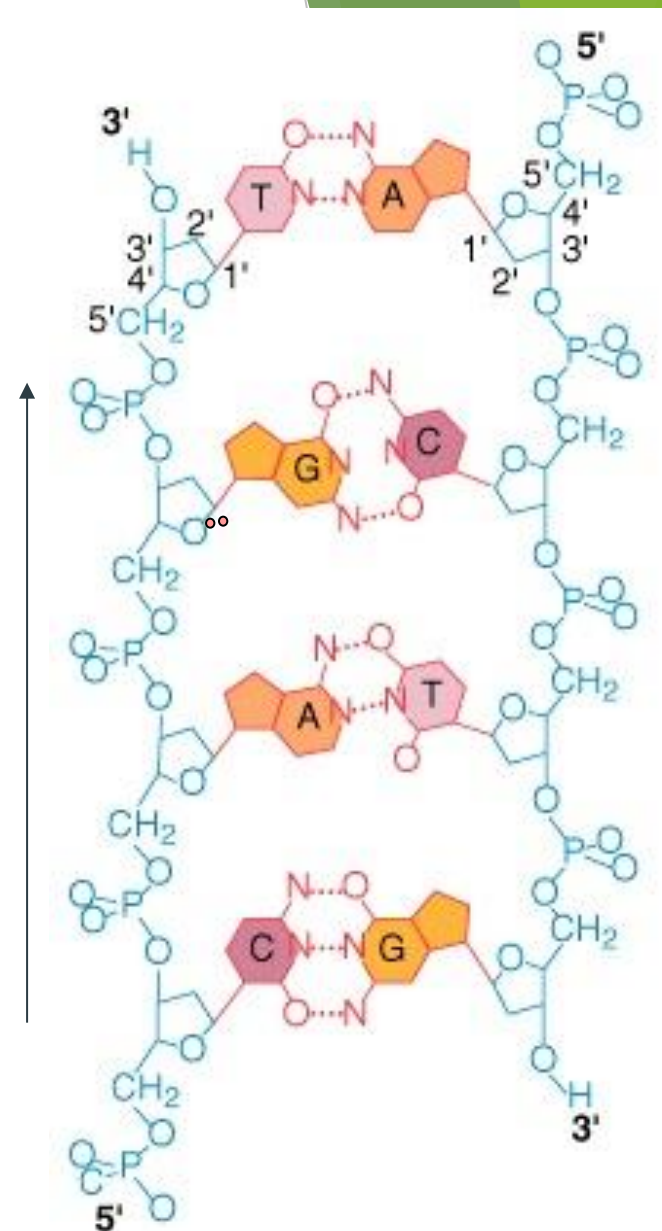
A DNS elsődleges szerkezete

- ▶ foszfodiészter kötéssel összekapcsolt nukleotidok polimerje: polinukleotid lánc
- ▶ Irányultsága van (a ribóz aszimmetrikus)
- ▶ a két végén található kémiai csoportok különbözőek: 5' monofoszfát csoport, 3' szénatom
- ▶ A különbséget a cukor szénatomjai alapján tartjuk számon



A DNS elsődleges szerkezete

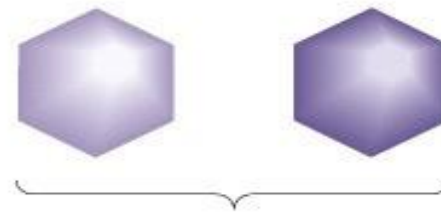
- A víztaszító bázisok belül, a cukor és foszfát csoportok kívül helyezkednek el.
- Minden bázispár egy purint, (A vagy G) és egy pirimidint, (T vagy C) tartalmaz.
- Az A-T párt 2, a G-C párt 3 hidrogénhíd stabilizálja.
- A két szál komplementer (meghatározza és kiegészíti egymást).
- Az antiparallel irányultságot a cukor 5' → 3' iránya adja.



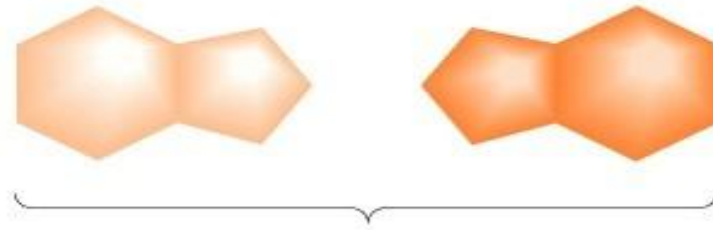
Bázispárok

- Csak a purin - pirimidin párosodás felel meg a DNS szál röntgennel meghatározott átmérőjének.
- Ez a kombináció felel meg Chargaff első szabályának is.

Pyrimidine + pyrimidine: DNA too thin



Purine + purine: DNA too thick



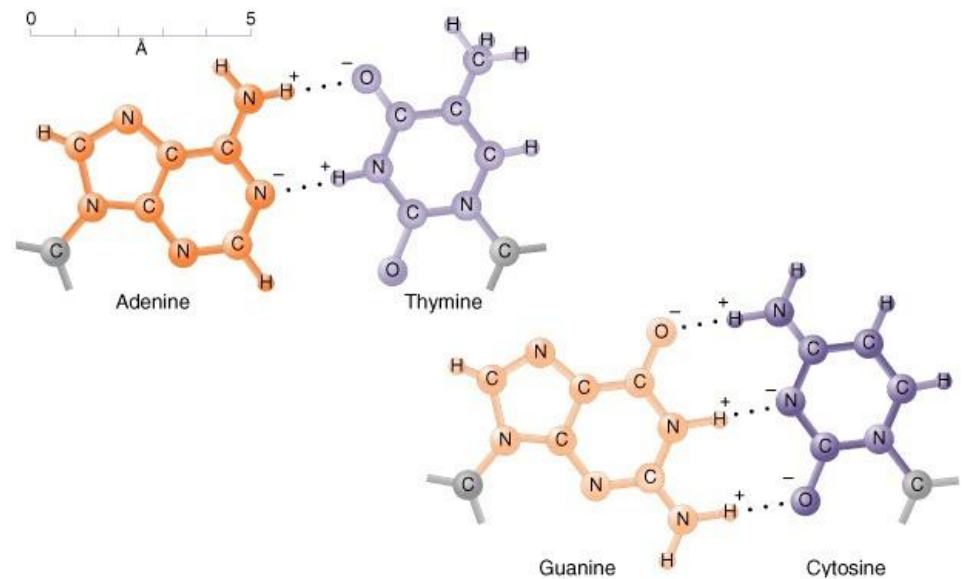
Purine + pyrimidine: thickness compatible with X-ray data



Bázispárok

A négy lehetséges purin-pirimidin bázispárból (A-T, A-C, G-C, G-T) csak kettő, az A-T és a G-C felel meg Chargaff második szabályának.

Watson és Crick kimutatta, hogy csak az A-T és G-C bázispárok képesek hidrogén hidakkal a modellbe beillő módon összekapcsolódni.



A modell azt jósolja, hogy a nagy G-C tartalmú DNS stabilabb a nagy A-T tartalmúnál. Ez a jóslat beigazolódott.

A DNS másodlagos szerkezete (spirál)

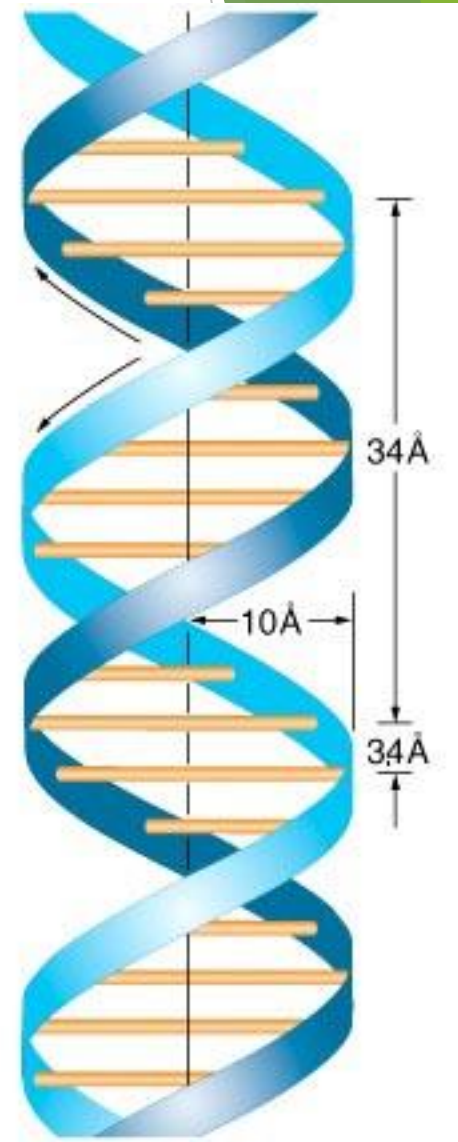
Pálcák = bázispárok

Szalagok = két antiparallel lánc cukorfoszfát gerince.

A méretek angström-ben ($1\text{\AA} = 0,1\text{ nm}$) mutatják a távolságokat.

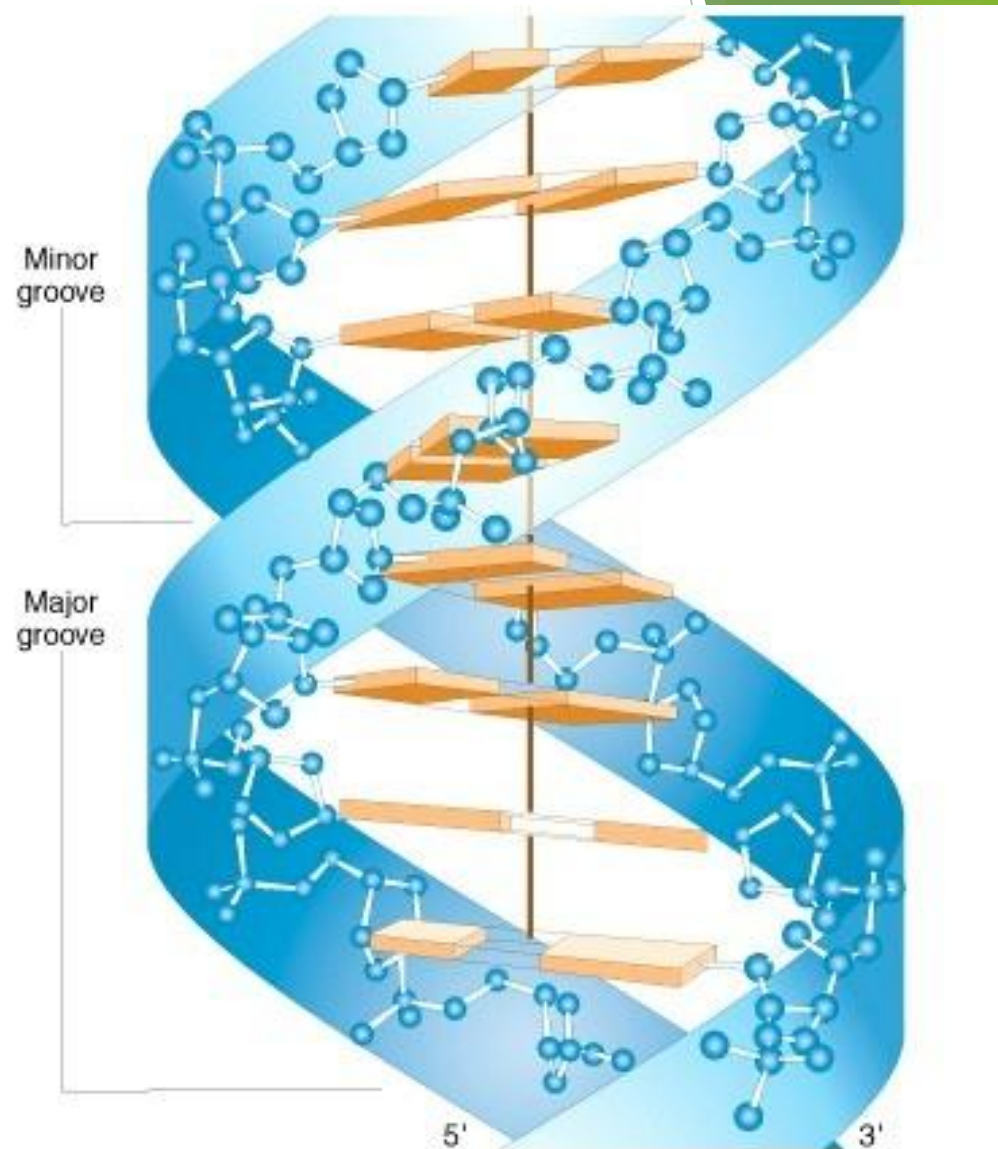
A spirál 10 bázisonként fordul csaknem pontosan 360° -ot.

A nukleotidok szabályosan ismétlődő távolságokban egymás felett helyezkednek el.



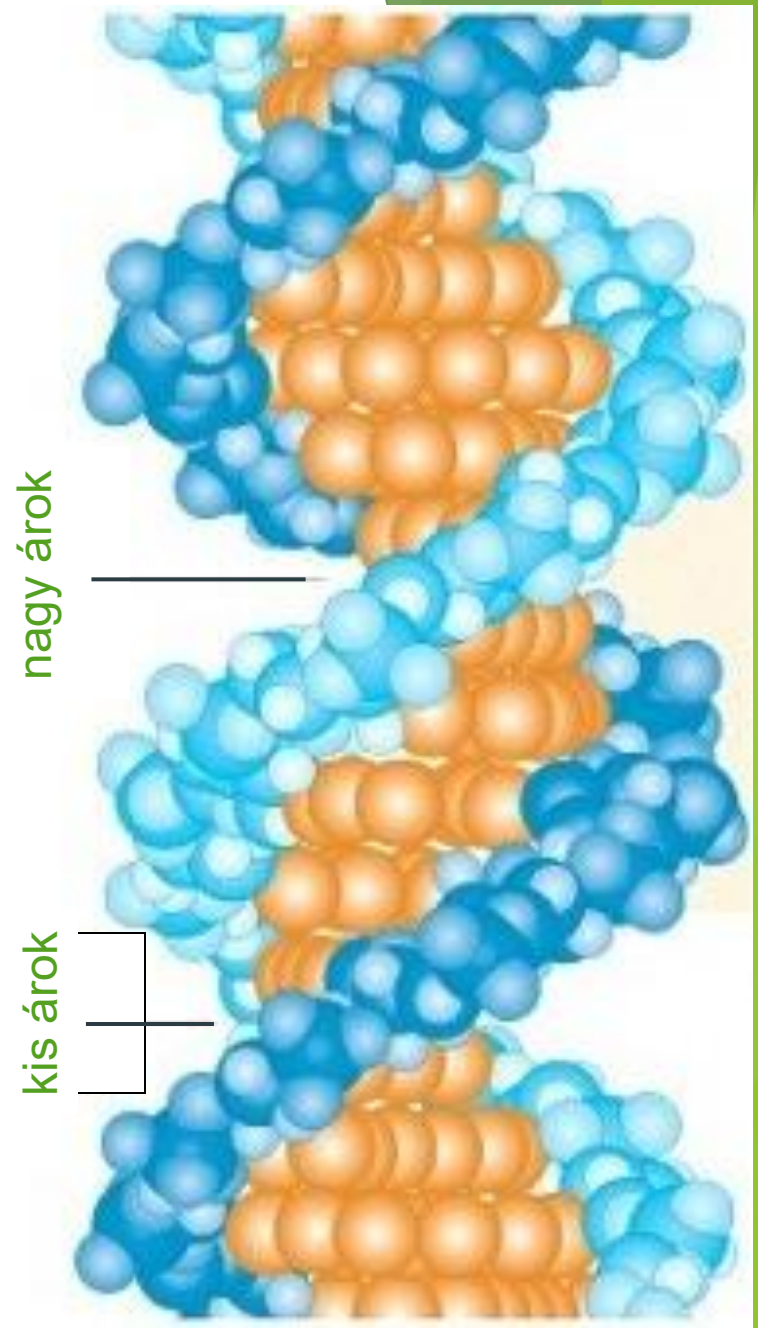
A DNS kettős spirál létra modellje

- A létra modellen jól látszik, hogy a bázispárok létrafokként helyezkednek el a szerkezet belsejében.
- A cukor gyűrű síkja majdnem merőleges a bázisok síkjára.
- A víztaszító bázisok szoros egymásra fekvése a víz kiszorítása által erősen stabilizálja a szerkezetet.
- A hidrofil cukor-foszfát gerinc kölcsönhat a sejt vízmolekuláival.



A DNS kettős spirál térkitöltő modellje

- Egymással ellentétes oldalon: kis és a nagy árok.
- A DNS-kötő fehérjék csak a barázdákban kapcsolódhatnak a bázisokhoz.

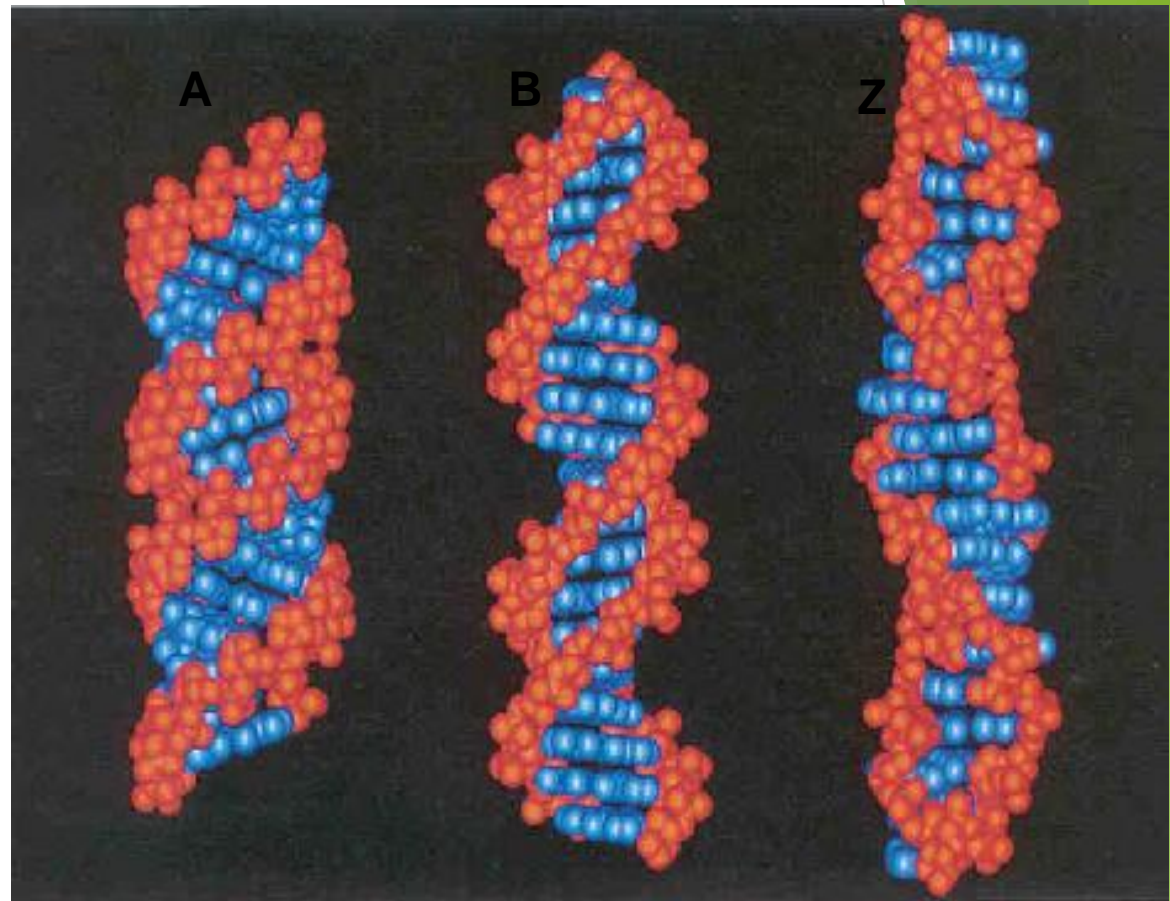


A DNS másodlagos szerkezetei

Az élőlényekben és vizes oldatban a „**B**” forma a leggyakoribb, ebben a bázisok síkja majdnem merőleges a cukor-foszfát gerincre.

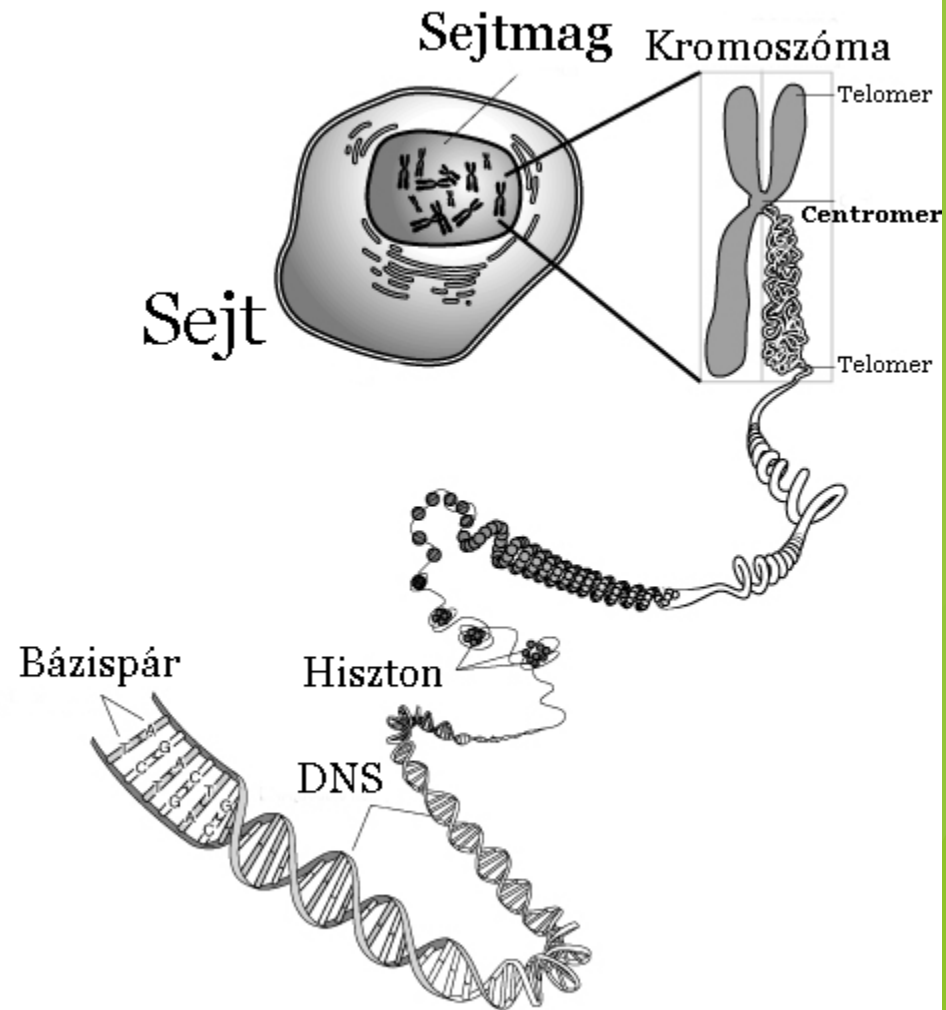
Dehidrált körülmények között egy tömörebb „**A**” forma jön létre, melyben a bázisok síkja megdől.

Hosszú GCGCGC.... ismétlődések a Z formát vehetik fel, amely balmenetes, zezugos lefutású és megnyúlt.



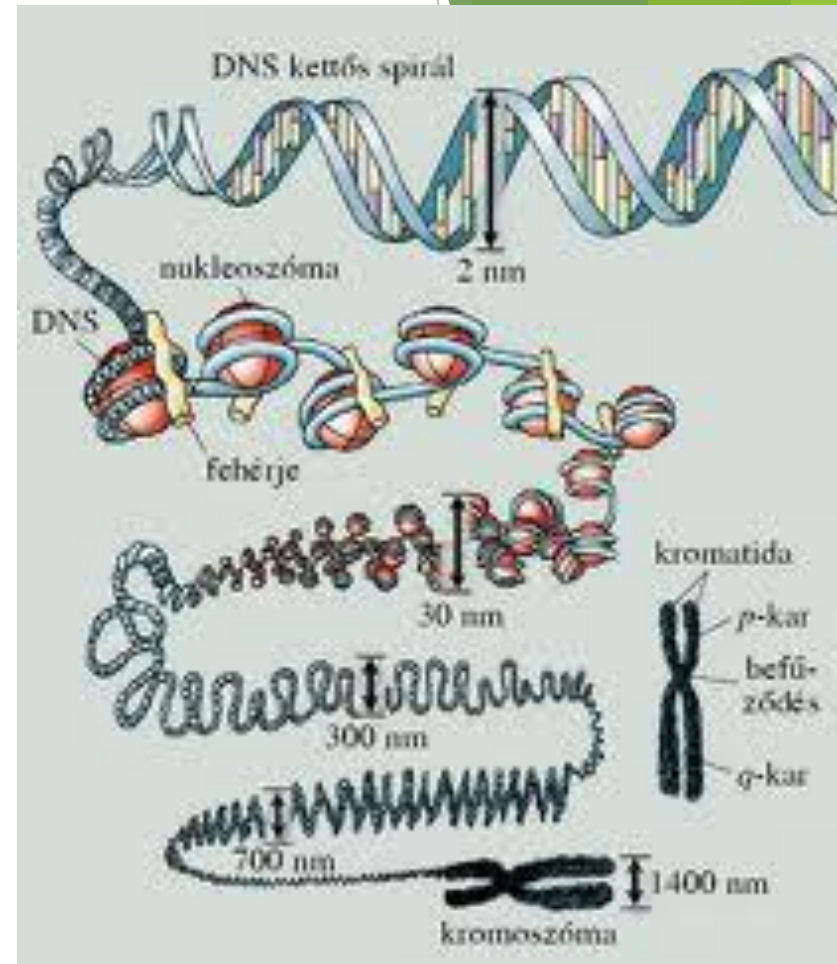
Kromoszómák

- ▶ A DNS nukleotid sorrendje = genetikai kód
- ▶ Minden sejt genetikai információtartalma azonos
- ▶ Kromoszómákba van csomagolva (a görög *chroma*=színes és *soma*=test szavakból)
- ▶ Egy kromoszómában egyetlen DNS kettősspirál található (gének, szabályozó és egyéb szekvenciák)



Kromatin

- ▶ Minden kromoszóma DNS-e speciális fehérjékkel kompakt struktúrákba pakolt
- ▶ A DNS kötő fehérjék 2 nagy csoportja:
 1. hisztonok
 2. nem hiszton fehérjék.
- ▶ kromatin = a nukleáris DNS ezen fehérjékkel alkotott komplexe.



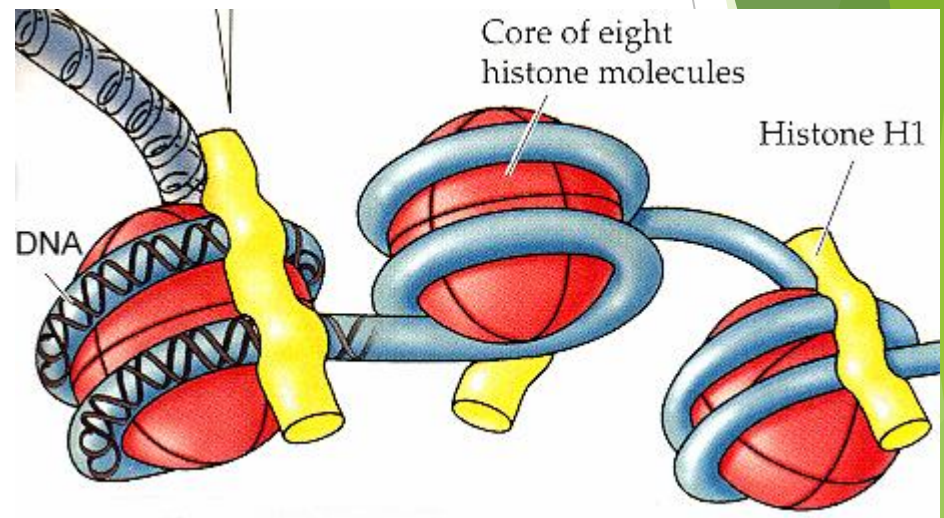
Nukleoszóma szerkezete

- ▶ DNS kettős spirál és a hisztonok alkotják
- ▶ Hisztonok: bázikus fehérjék
- ▶ 5 osztály: H1, H2A, H2B, H3 és H4

- ▶ Hisztonkorong (oktamer):
8 hisztonmolekula (2×4),
2 csavarulatban,
146 bázispárnyi DNS

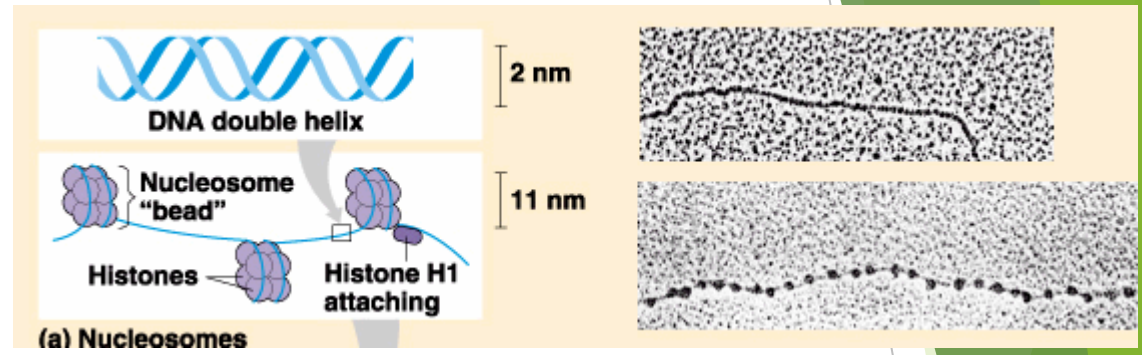
- ▶ 2 korong között kb.

60 bp linker régió (nukleoszóma közötti kettős hélix szakasz) + H1 molekula

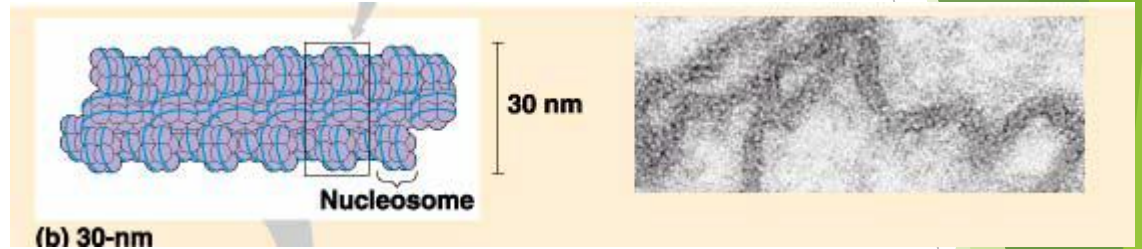


A kromatin állomány szerveződése

Nukleoszóma



Szolenoid



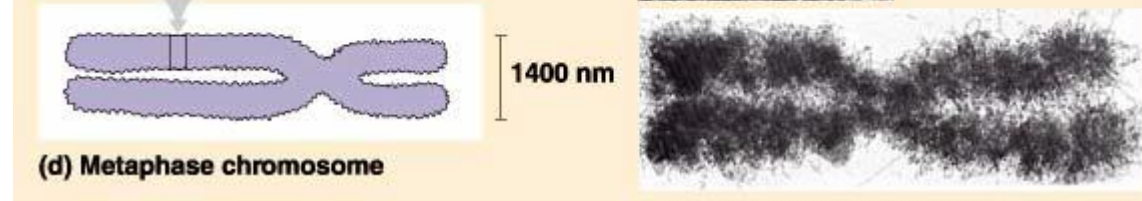
Hurok struktúra



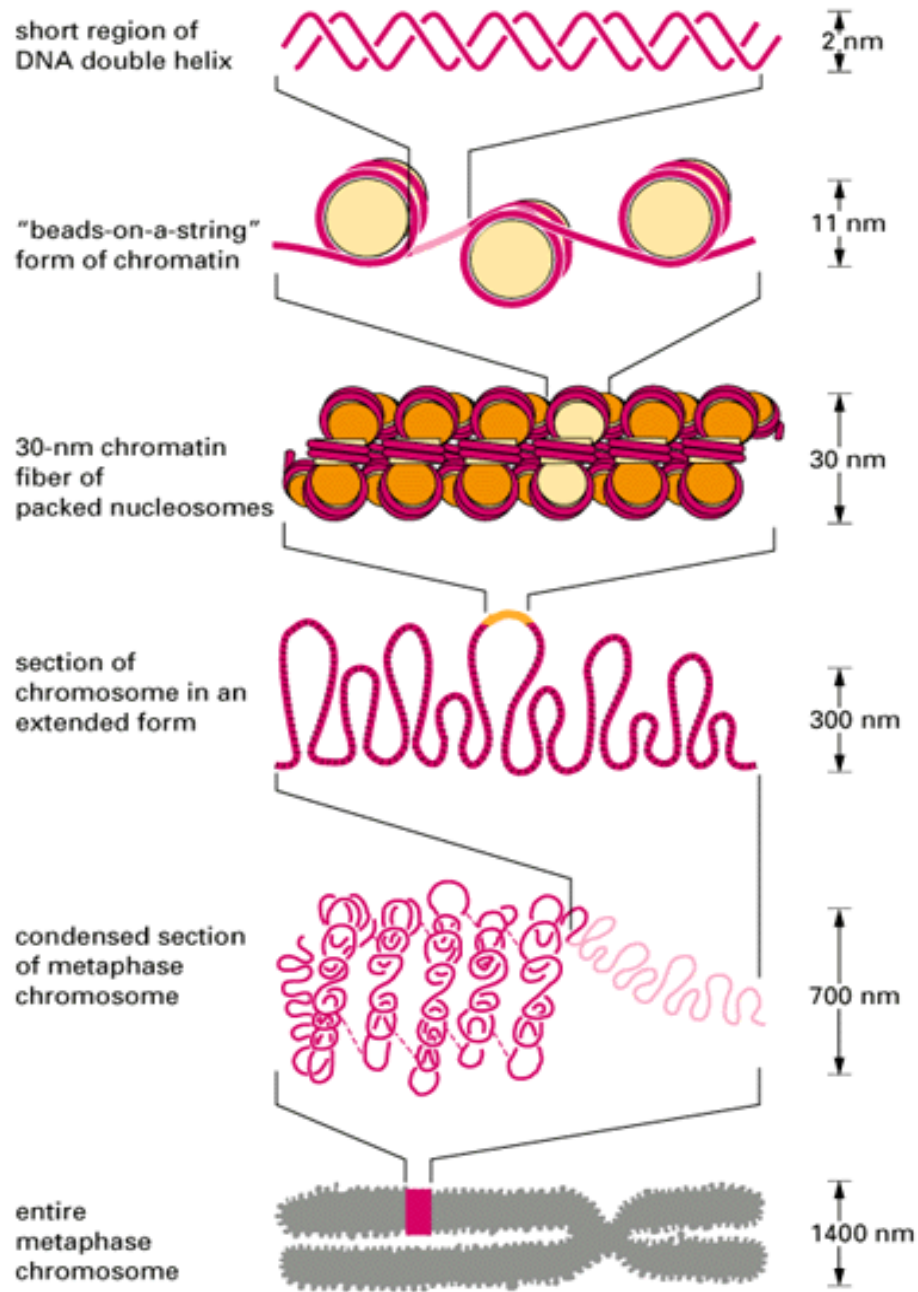
Kromatinköteg



Kromoszóma



A kromatin állomány szerveződése



Sejtciklus: az eukarióta sejtben két osztódás között lejátszódó folyamat

► Interfázis

G1 vagy **G0** nyugalmi fázis

S fázis: DNS replikáció

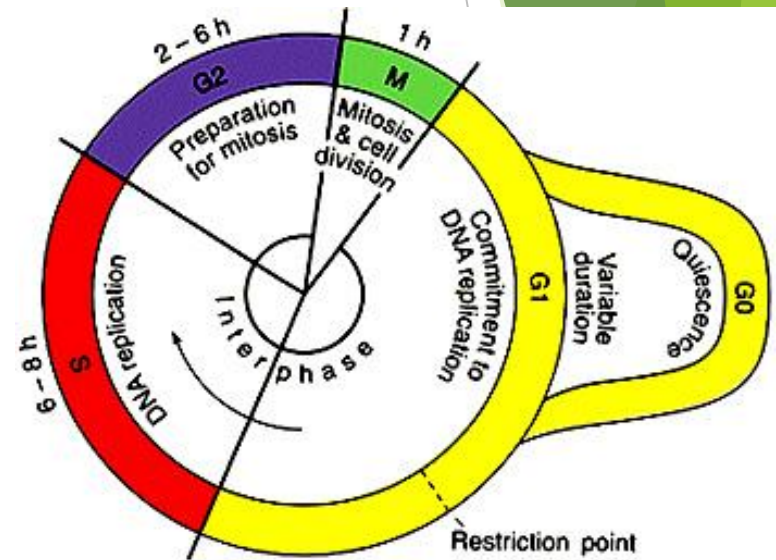
G2 fázis: felkészülés a mitózisra

(DNS replikáció: a genetikai anyag osztódás előtti megduplázódása)

► **M fázis:** mitózis

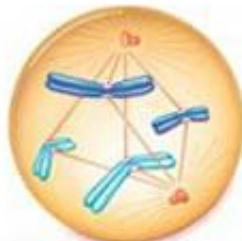
► Kromoszómák a sejtciklus interfázisában nem figyelhetők meg, ilyenkor a DNS szanaszét, össze-vissza van gabalyodva.

► A kromoszómák a metafázisban vizsgálhatók



A kromatinállomány szerveződése

- ▶ Heterokromatin: Kompakt szerkezet, nem aktív. A DNS-t körülvevő hiszton fehérjék szoros kapcsolata miatt a polimeráz enzim nem fér hozzá a DNS-hez.
 - Konstitutív heterokromatin: sohasem íródik át, irreverzibilisen inaktívvá vált
 - Fakultatív heterokromatin: átíródhat
- ▶ Eukromatin: A hiszton fehérjék nem kötődnek szorosan a DNS-hez, laza szerkezet, aktív, átíródik.
- ▶ Átrendeződhetnek: kromatin remodelling (hiszton acetiláció, metiláció)

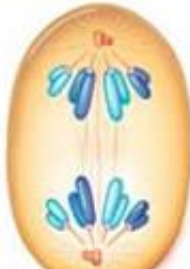
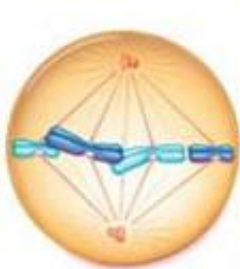
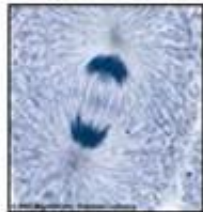
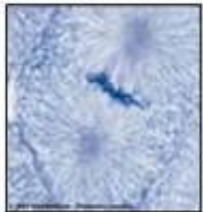


© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

Prophase:
Chromosomes Condense

Preprometaphase:
Chromosomes Attach



© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

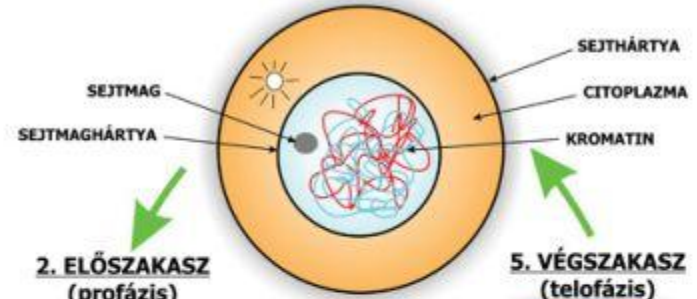
Metaphase:
Chromosomes align

Anaphase:
Chromosomes separate

Telophase:
Chromosomes relax

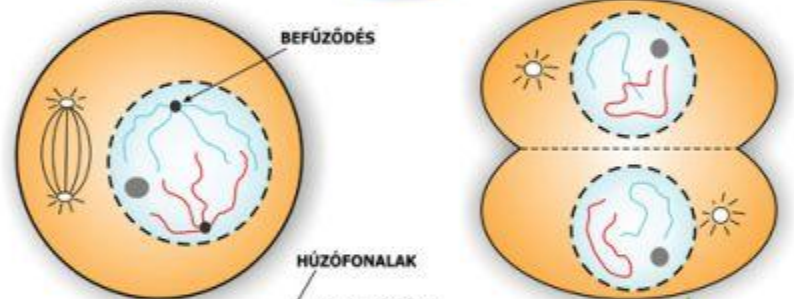
MITÓZIS

1. NYUGALMI ÁLLAPOT
(interfázis)



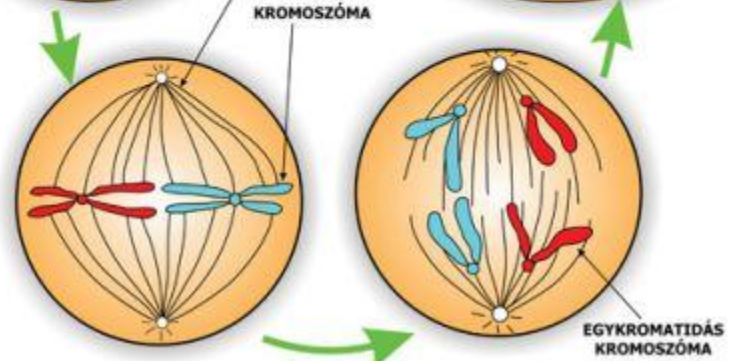
2. ELŐSZAKASZ
(profázis)

5. VÉGSZAKASZ
(telofázis)



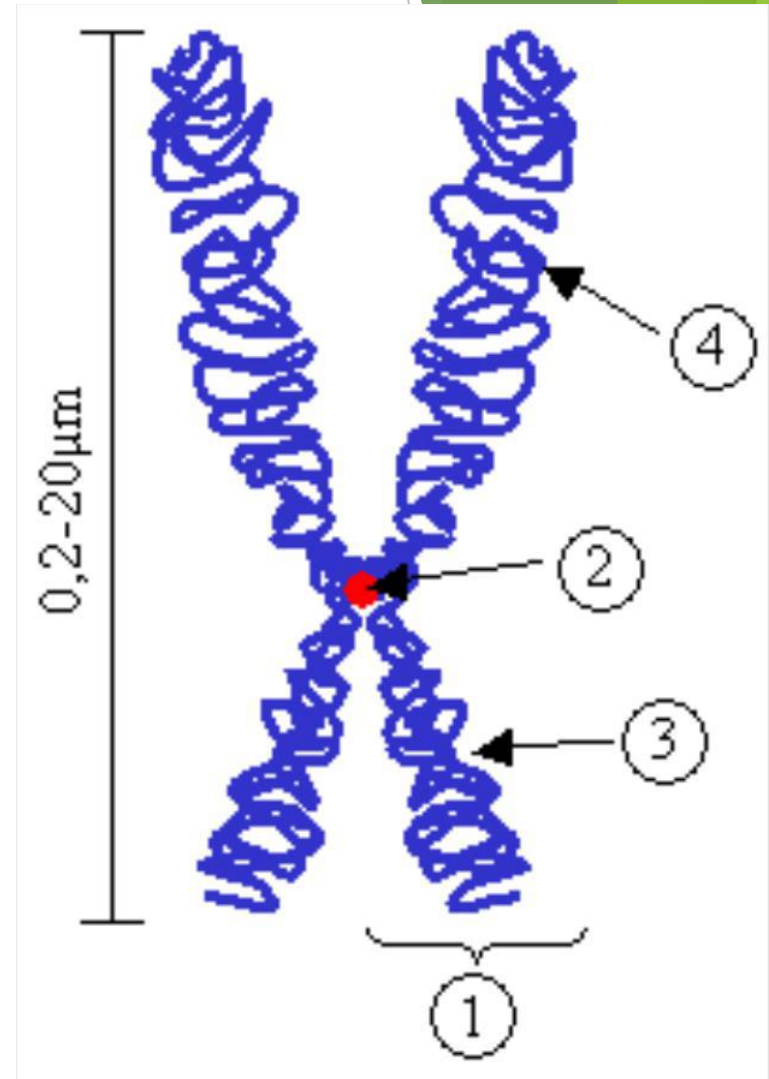
3. KÖZÉPSZAKASZ
(metafázis)

4. UTÓSZAKASZ
(anafázis)



Kromoszómák

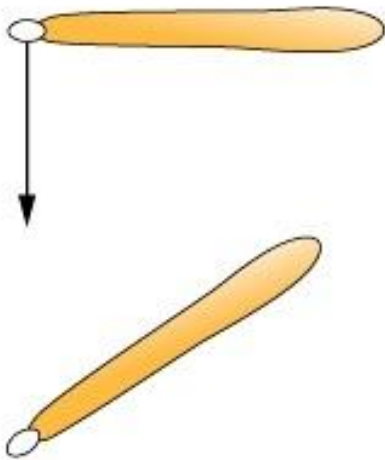
- ▶ A mitózisos kromoszóma a metafázisban: a 2 leány DNS molekula
- ▶ egymástól függetlenül tekeredik, és 2 leány kromatidát alkot, amik csak a centroméránál vannak összekapcsolva.
- ▶ Minden kromoszóma két karral, egy röviddel -*p kar a petit=kicsi francia szóból*-, és egy hosszúval -*q kar*, követte a p-t betűrendben-, rendelkeznek.



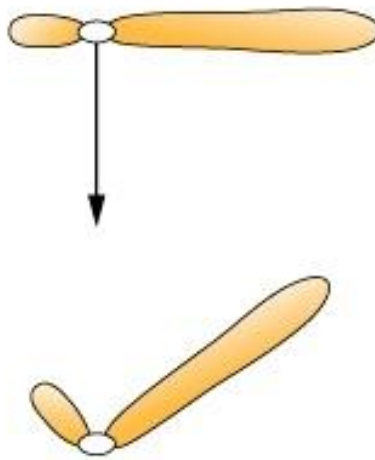
A centromer helyzete meghatározza a kromoszóma alakját.

Kromoszóma alak típusok

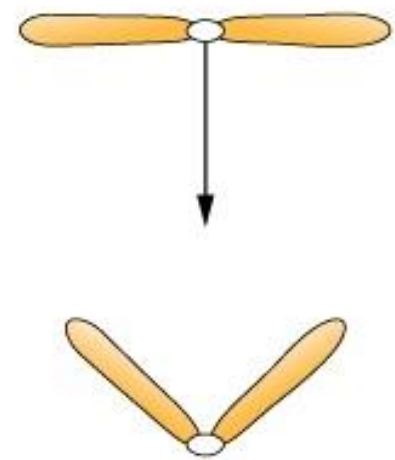
(a) Telocentric



(b) Acrocentric



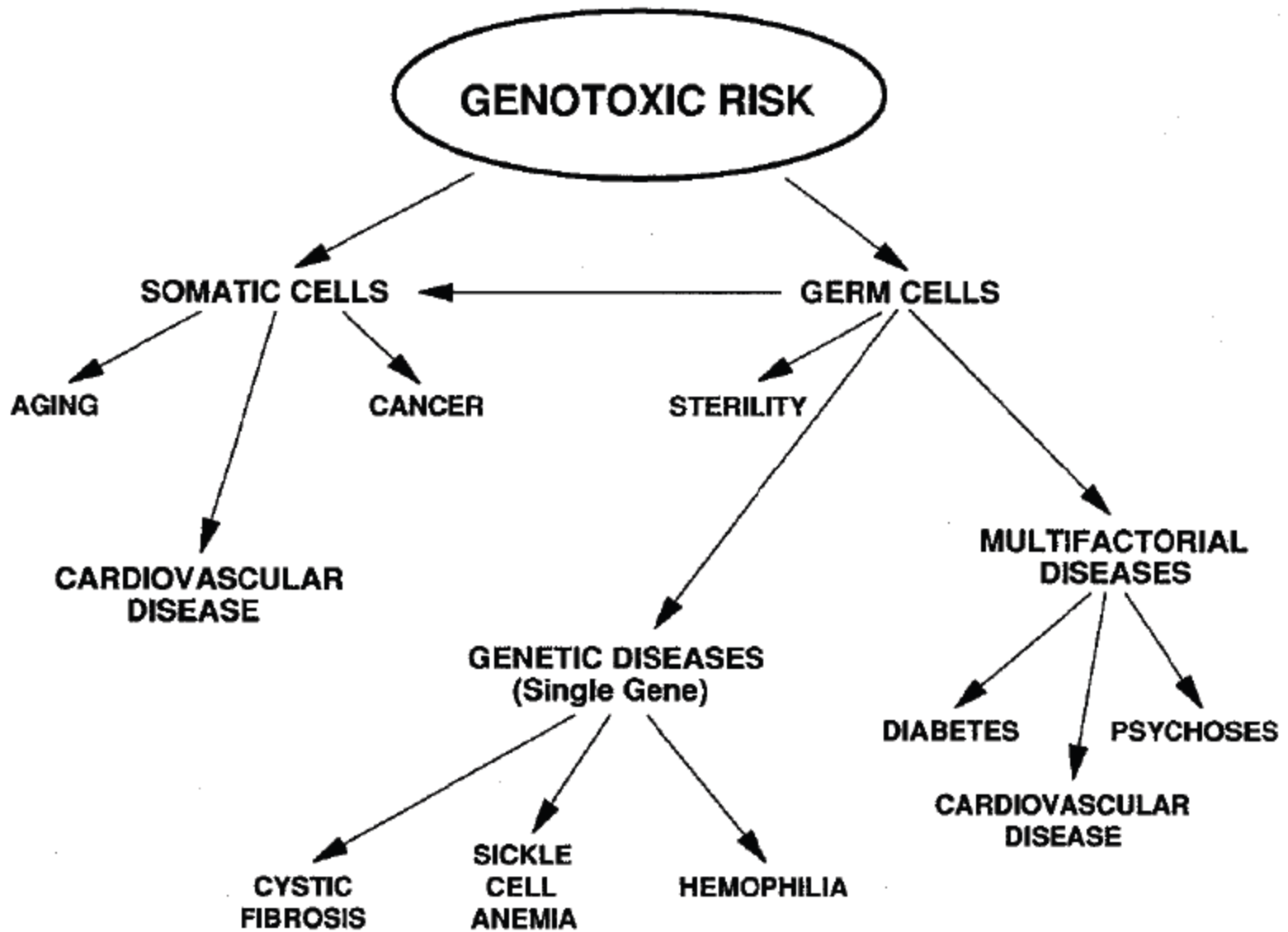
(c) Metacentric



Genotoxikus anyagok

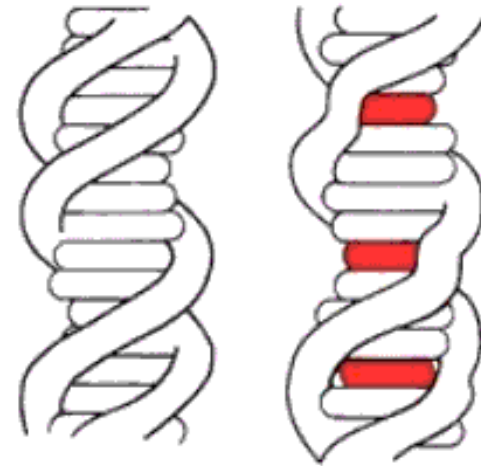
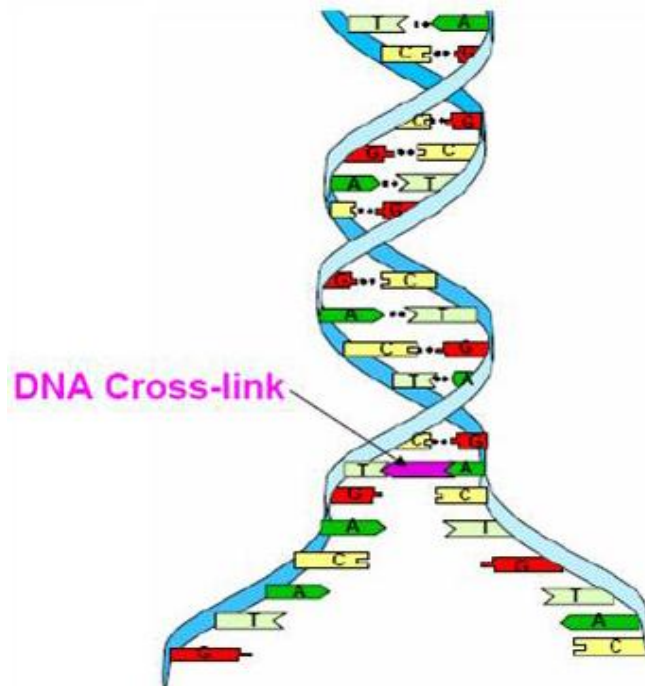
- ▶ Prokarióták genomját vagy eukarióták mitokondriális vagy sejtmagi DNS-ét károsítják
- ▶ Endogén: a sejtek normális anyagcsere folyamata során következik be (pl. reaktív oxigéngyökök)
- ▶ Exogén: külső hatásra alakul ki (pl. UV, röntgen és gamma sugárzás, hidrolízis, toxinok, mutagén vegyszerek)
- ▶ DNS által tárolt genetikai információt megváltoztatják

- ▶ hatás -> **elsődleges DNS károsodások** (kijavítható - DNS-reparáció)
- ▶ ha nem -> **mutáció**



DNS károsodások

- ▶ Nem mutációk! (nem öröklődik)
- ▶ Pl. keresztkötések kialakulása, száltörés, interkaláció
- ▶ DNS-repair mechanizmus javítja

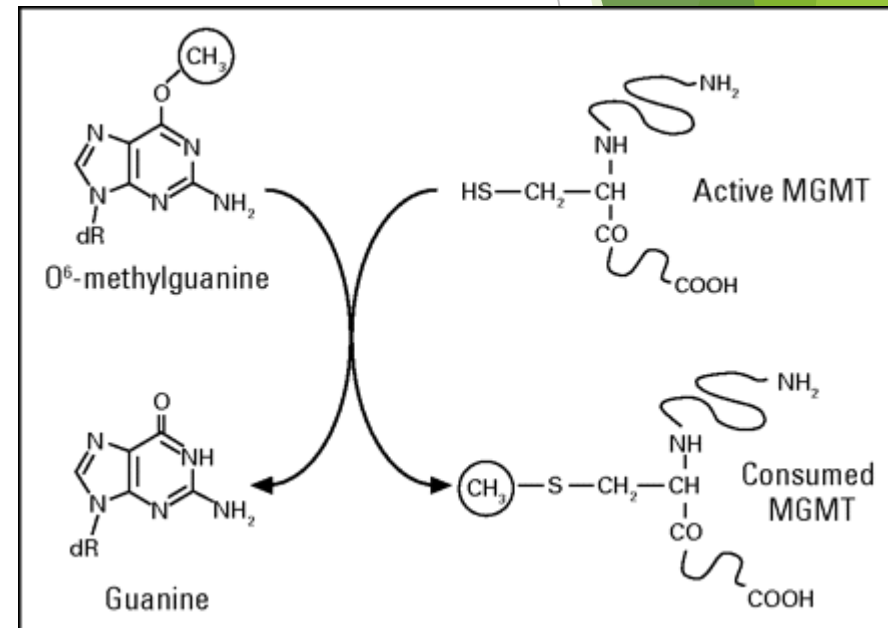


DNS károsodások

- ▶ A DNS károsodása megváltoztatja a hélix térbeli konfigurációját, amit a sejt is érzékel.
- ▶ DNS-javító molekulákat toboroz, így létrejön egy olyan komplex, amely lehetővé teszi, hogy végbemenjen a javítás.
- ▶ A résztvevő molekulák típusai és a beindított javító mechanizmus jellege függ:
 - ▶ a DNS-károsodás típusától
 - ▶ attól, hogy a sejt belépett-e az öregedés állapotába
 - ▶ attól, hogy a sejt a sejtciklus mely fázisában van

Egy szálát érintő károsodás

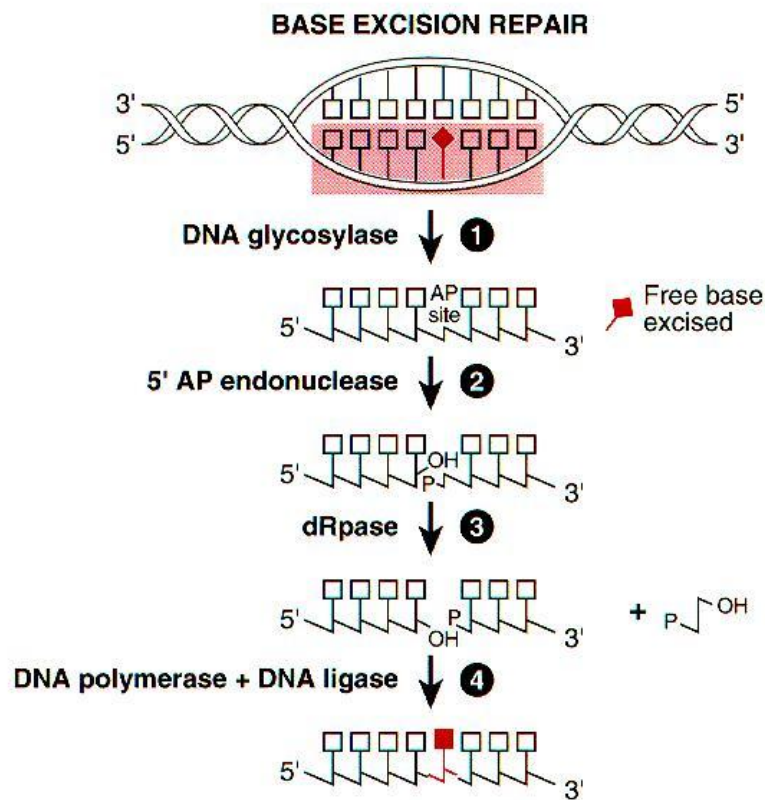
- ▶ A DNS két szála közül csak az egyik hibás, a másik szál használható mintaként a károsodott szál javításához.
- A károsodást közvetlenül visszafordító mechanizmusok: egy-egy károsodástípusra specifikusak (pl. metil-guanin javítása metil-guanin-metil-transzferázzal, bakteriális fotoliáz: timin dimereket hasít). Nem igényel „mintát” a javításhoz.



Egy szálát érintő károsodás

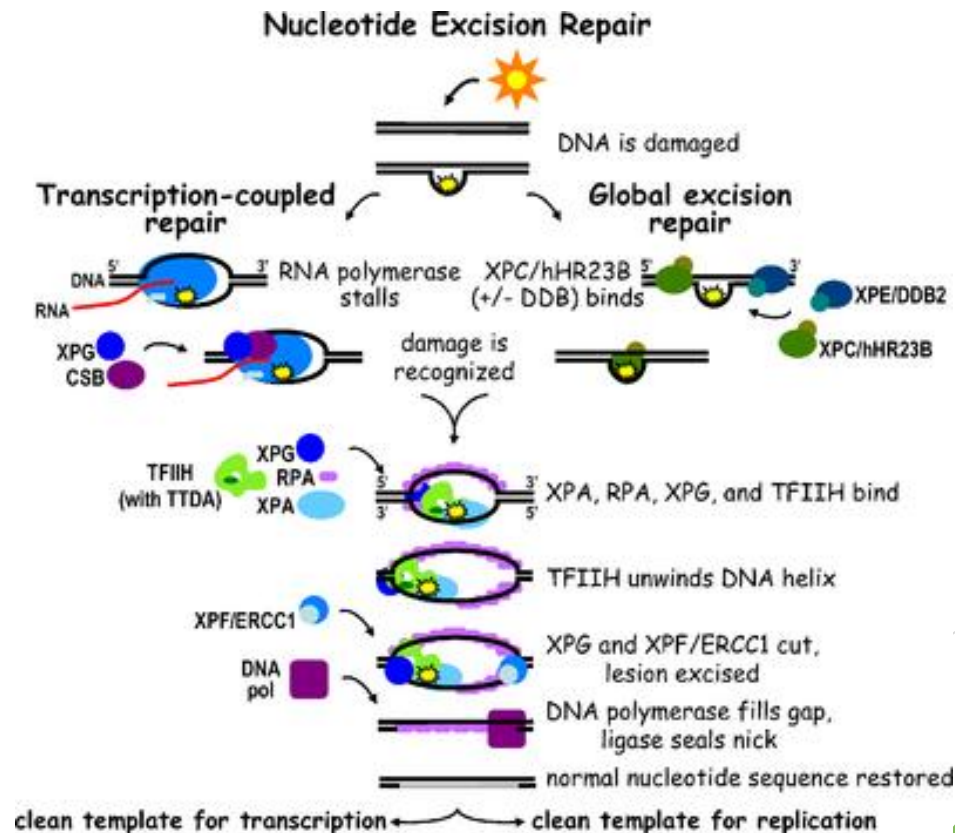
- ▶ Kivágó mechanizmusok (Excision repair), amelyek eltávolítják a károsodott nukleotidot, és a helyére egy sértetlen építenek be úgy, hogy a másik DNS szál nukleotidját kiegészítse.

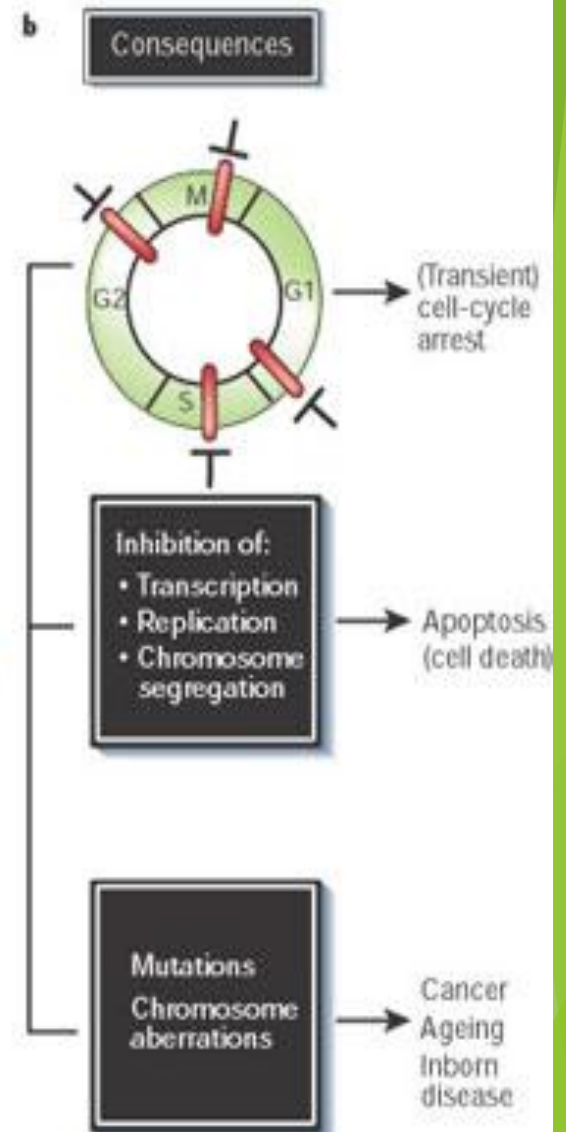
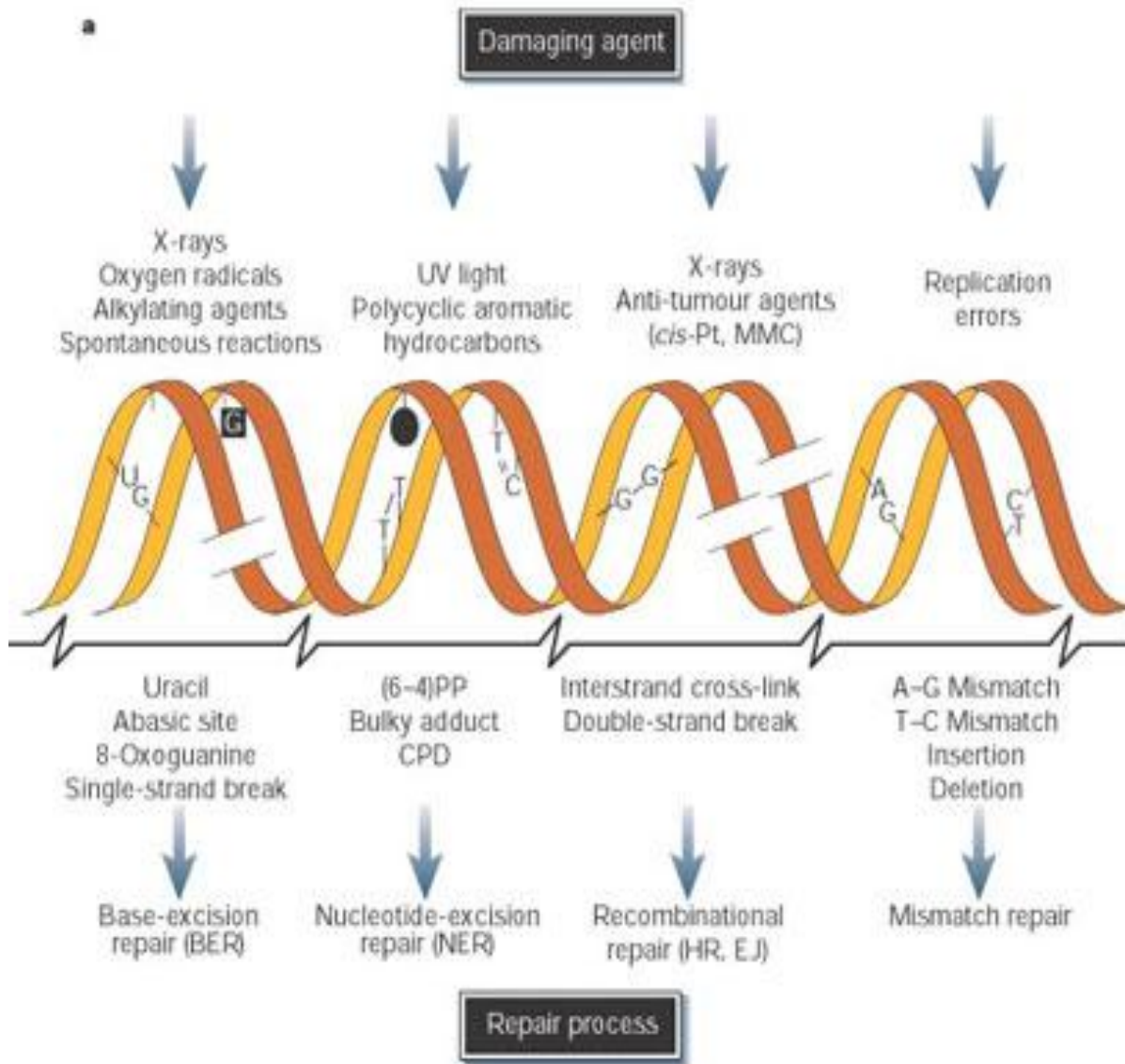
- Báziskivágó javítás (base excision repair - BER), amely egyetlen oxidáció, alkiláció, hidrolízis vagy deamináció útján károsodott nukleotidot javít ki



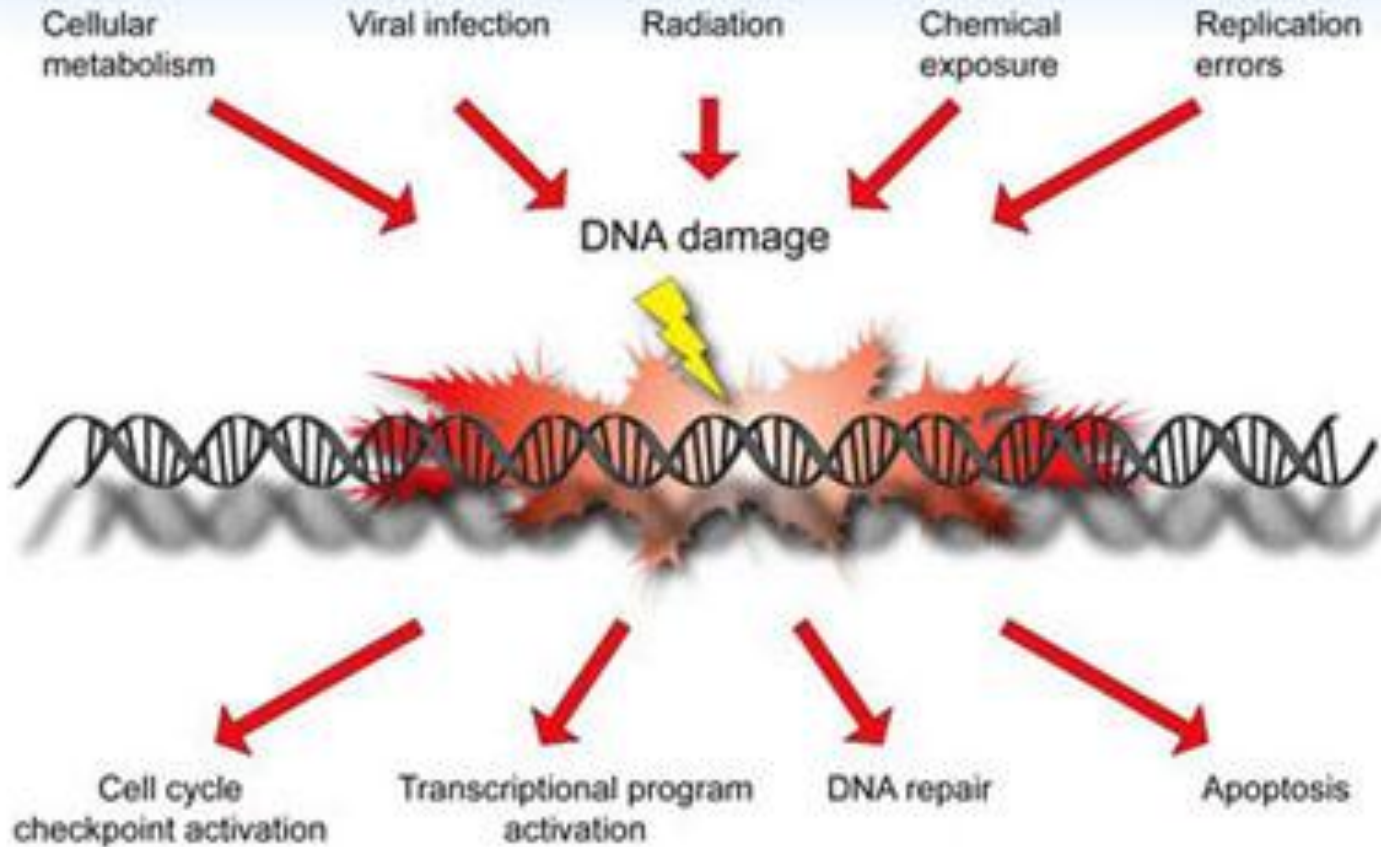
Egy szálát érintő károsodás

- ▶ Nukleotidkivágó javítás (nucleotide excision repair - NER), amely 2–30 nukleotid hosszúságú károsodott szakaszokat javít ki. A NER egy speciális formája, a transzkripcióhoz kötött javítás (transcription-coupled repair - TCR) során NER-t végző, fontos javítóenzimek települnek az aktívan átíródó génekre



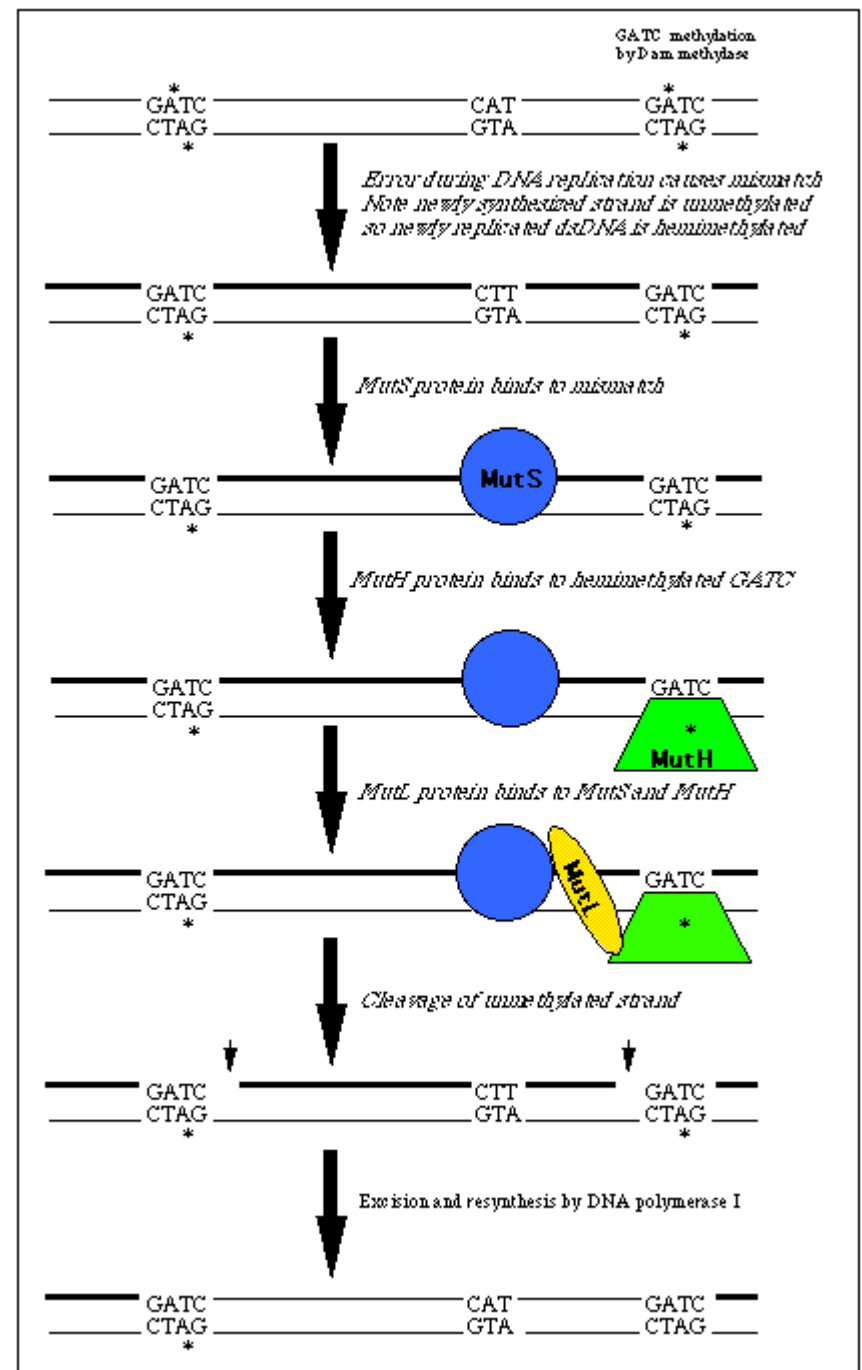


DNA damage response



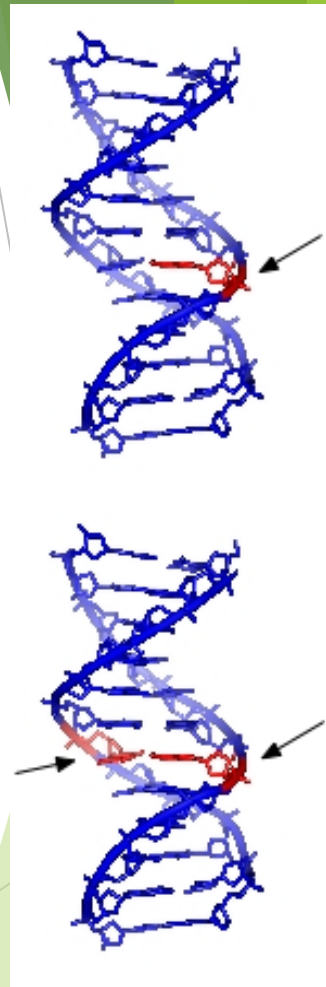
Egy szálát érintő károsodás

- ▶ Össze nem illő párok javítása (mismatch repair - MMR), amely a DNS-replikáció és az azt követő rekombináció során keletkező hibás nukleotidpárokat javítja ki



Két szálát érintő károsodás

- ▶ A DNS mindkét szála sérül
- ▶ **Rekombinációs javítás:** egy azonos vagy közel azonos szekvencia szolgál mintaként a javításhoz. Túlnyomórészt a sejtciklus azon fázisaiban működik, amelyekben a DNS megkettőződik, vagy már megkettőződött. Így a károsodott kromoszóma javításához **mintaként használható az újonnan létrejött testvérkromatid** azaz egy tökéletes másolat, amely pontosan illik a sérült régióhoz. Ha a javított szakasz a genomban több példányban van jelen, káros lehet, kromoszómális transzlokációhoz vezethet.



Két szálát érintő károsodás

- ▶ A **nem homológ végek összekapcsolása** (non-homologous end-joining - **NHEJ**) során a törés két vége mintaszekvencia nélkül kapcsolódik össze. Közben gyakran vesznek el DNS-szekvenciák, így ez a javítás mutációt is okozhat. A NHEJ a sejtciklus bármely fázisában végbemehet, de emlősejtekben főként addig fontos, amíg a DNS megkettőződése lehetővé nem teszi, hogy a testvérkromatid felhasználásával működésbe lépjen a rekombinációs javítás. Mivel az ember és a többi többsejtű élőlény genomjának legnagyobb részén a DNS nem tartalmaz géneket (ez az úgynevezett „szemét DNS”), a mutagén NHEJ még mindig kevésbé veszélyes, mint amennyire a mintát használó javítás lenne több mintaszekvencia jelenlétében, mivel az utóbbi esetben nem kívánt kromoszomális átrendeződések történnek.

Mi a mutáció?

A DNS által hordozott információ tartósan rögzülő, öröklődő megváltozása

A mutációk szintjei:

1. GÉN (génmutáció vagy pontmutáció)
2. KROMOSZÓMA (strukturális eltérések, pl. deléciók, transzlokációk, inverzió)
3. GENOM (változások a kromoszóma számban, pl. aneuploidia)

lehet: káros, semleges, előnyös

Mutációk típusai

- ▶ A **gén** vagy pont mutációk, amelyek a génnek csak kis szakaszát érintik
 - (1) báziscsere
 - (2) bázisok számának változása.
- ▶ A **kromoszómák** strukturális mutációi, a kromoszóma törések utáni genetikai információ átrendeződése révén alakulnak ki (kromoszóma aberrációk).

Mutációk típusai

- ▶ **Genom mutációk:** A kromoszómák számbeli mutációi. Az örökítő anyag mennyiségének változásait idézik elő.

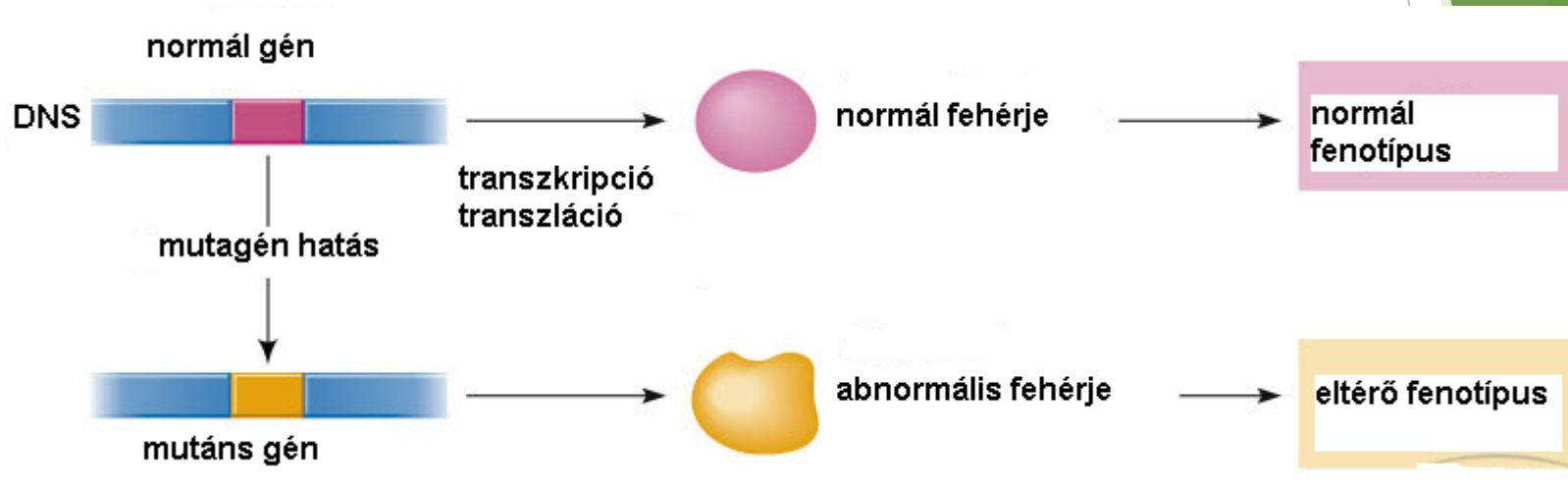
(1) Euploidia: A sejtek kromoszóma készlete a haploid kromoszóma készlet egész számú többszörösére nő vagy csökken ($2n$ -ből $3n$, $4n$, stb. lesz)

(2) Aneuploidia: A sejtek kromoszóma száma általában eggyel nő vagy csökken ($2n$ -ből $2n+1$ lesz).

Pontmutáció

egy bázis:

- cseréje → silent, missense, nonsense
- kiesése → frame-shift, leolvasási keret eltolódása
- beékelődése → frame-shift, leolvasási keret eltolódása



Point mutations

No mutation

Silent

Nonsense

Missense

conservative

non-conservative

DNA level
mRNA level
protein level

TTC

TTT

ATC

TCC

TGC

AAG

AAA

UAG

AGG

ACG

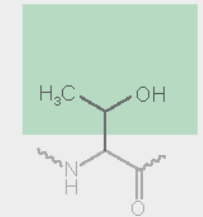
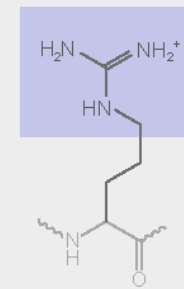
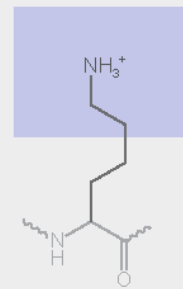
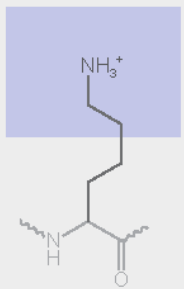
Lys

Lys

STOP

Arg

Thr



basic
polar

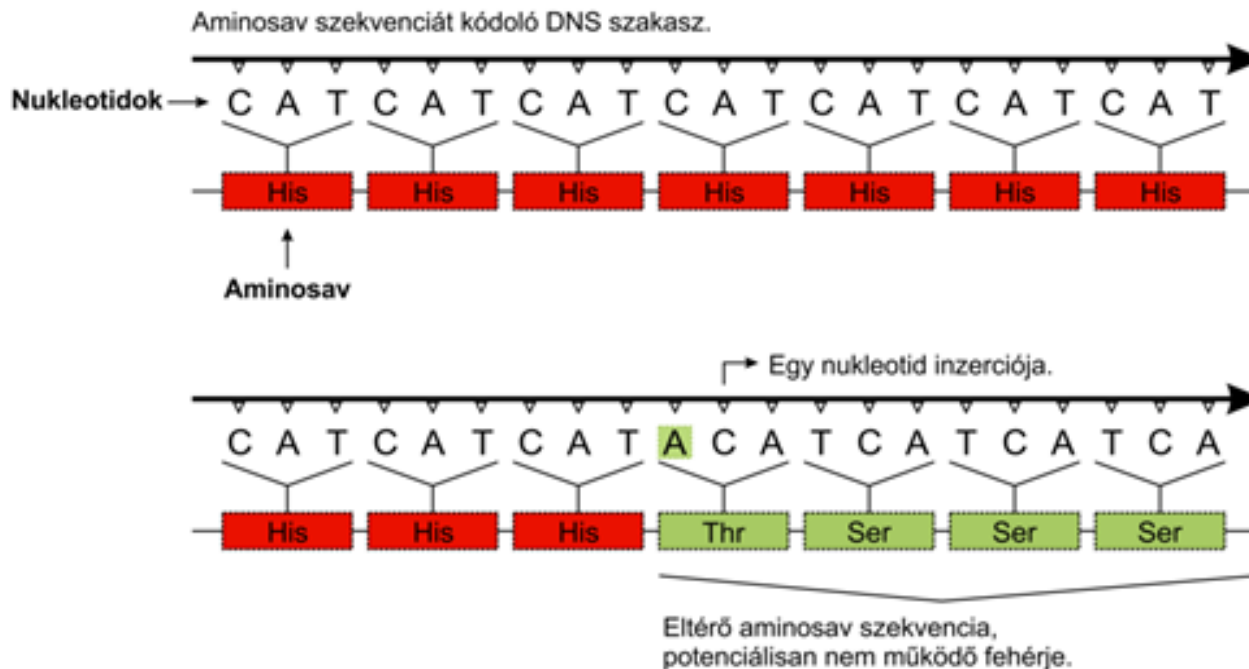
A genotípus megváltozása nem mindig vezet a funkció (fenotípus) megváltozásához (**silent**=csendes mutációk, a mutáció nem kódoló régiót érint)

A **missense** mutáció a leggyakoribb. Egy aminosav kodon másik aminosavat kódoló kodonra változik.

Nonsense mutáció: egy aminosavat kódoló triplet STOP kodonná alakul. A korai STOP kodon csonka, sokszor funkcióképtelen fehérjét eredményez.

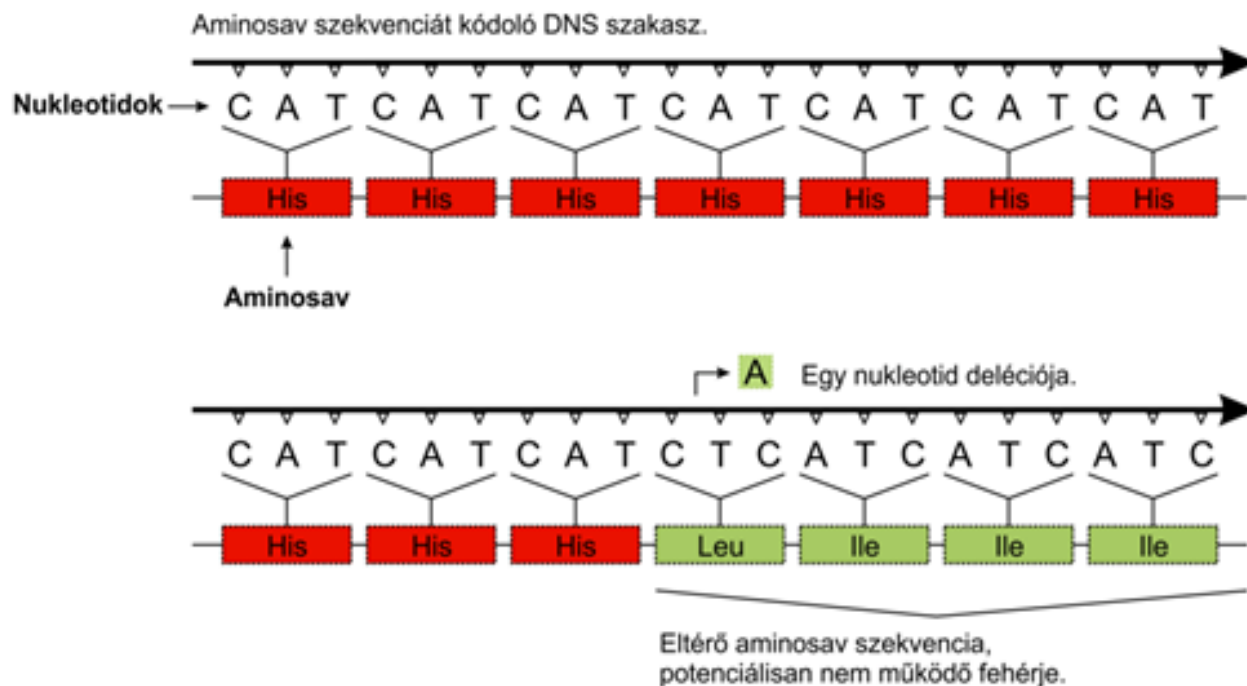
Inszerció:

- egy vagy több nukleotid beékelődése
- hatása nagymértékben függ a beékelődött nukleotidok számától. Ha egy kódoló génszakaszba hárommal nem osztható számú nukleotid ékelődik be, az olvasási keret eltolódik.



Deléció:

- egy vagy több nukleotid kiesése
- hatása nagymértékben függ a kiesett nukleotidok számától. Az inszercióhoz hasonlóan olvasási keret eltolódást is eredményezhet.



Duplikáció:

- egy szakasz megduplázódik

Inverzió:

- egy szakasz megfordul (180°)

Spontán mutációk

okai :

- a *bázisok* alternatív formái (keto/enol, amino/imino **tautomerizáció**)
- a replikáció során a *szálak elcsúszása* következtében kisméretű inszerciók és deléciók keletkezése
- a DNS szerkezeti változásai (depurináció és deamináció, amelyek a bázisok párosodási tulajdonságait változtatják meg)

Tautomerizáció

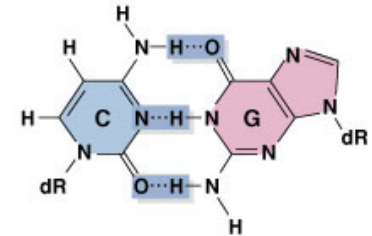
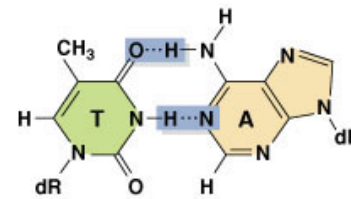
Normál bázispárosodás (keto és amino formák)

A **guanin enol** formája timinnel, az **adenin imino** formája pedig citozinnal képes H-híd kialakítására.

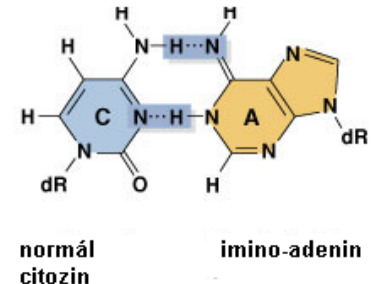
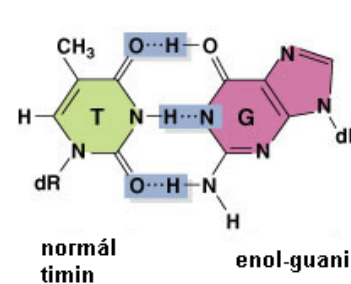
A **citozin imino** formája adeninnel, a **timin enol** formája pedig guaninnal képes H-híd kialakítására.

A párosodási hiba a replikáció során az újonnan szintetizált szálban megmarad és **állandósul**

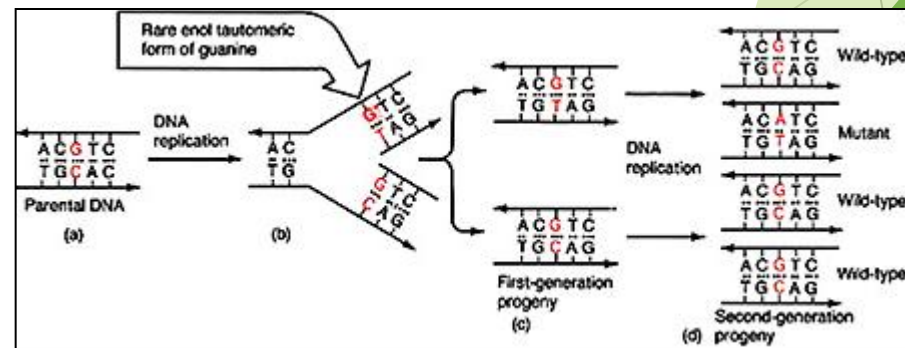
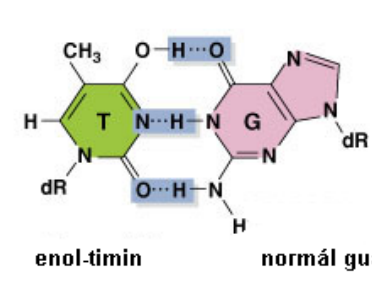
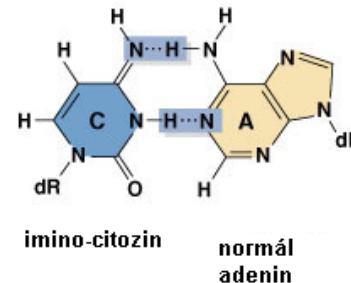
a) Watson-Crick féle bázispárosodás



b) nem Watson-Crick féle bázispárosodás rossz purin - jó pirimidin között



c) nem Watson-Crick féle bázispárosodás rossz pirimidin - jó purin között



Indukált mutációk

Külső okokból származó mutációk

Vegyszerek számos módon okozhatnak mutációkat:

- **bázis analógok** a DNS-be beépülnek, de nem a megfelelő bázissal párosodnak
- **alkiláló, deamináló szerek, oxidáló anyagok** a DNS bázisok szerkezetét és párosodási tulajdonságait megváltoztatják
- **interkaláló szerek** a bázisok közé ékelődnek és nukleotid inszerciót vagy deléciót okoznak

Mutagén

- a **mutagén** fizikai vagy kémiai ágens, mely növeli a mutációk képződésének gyakoriságát
- **indukált mutáció** a mutagének által okozott változások a genetikai állományban
- a halálozások oka a civilizált világban **40%-ban** rákos daganat
- a rákos megbetegedések közel 90%-át a környezetünket szennyező mutagének okozzák
- **a mutagén vegyületek nagy része rákkeltő (karcinogén) is !!!!!!!!!!!!!**
- évente néhány ezer olyan vegyületet állítanak elő, amelyek korábban nem léteztek a Földön (*gyógyszer alapanyagok, növény- vagy faanyagvédő szerek, élelmiszer-adalék, kozmetikum, háztartási vegyszer stb.*)
- a mutagének és a karcinogének közötti szoros kapcsolat szükségessé teszi a *környezetünkben lévő mutagén vegyületek kimutatását*

Kémiai mutagének

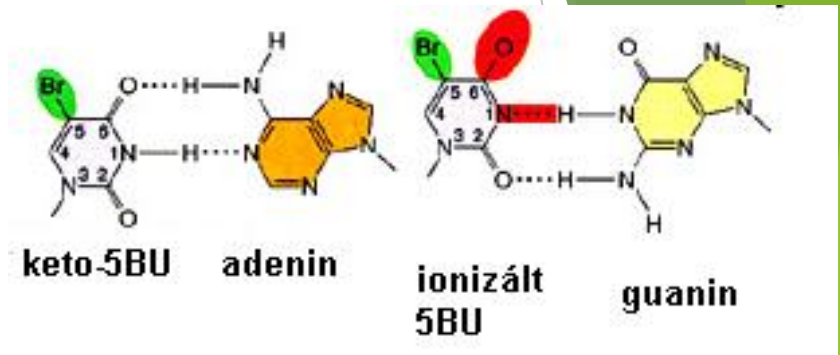
- ▶ A különféle vegyületek annyiféle módon hatnak ahányféleképpen reagálni képesek a DNS-sel. (A fizikai mutagének - sugárzás hatása egységesen visszavezethető a molekulák gerjesztésére és ionizációjára).
- ▶ Hatásmechanizmus alapján:
 - Bázisanalógok
 - Interkaláló vegyületek
 - Alkiláló vegyületek
 - Salétromsav
 - N-nitróz vegyületek
 - Szabad gyököt képező vegyületek
 - Nehézfémek
 - DNS-szintézis inhibitorok.

Bázisanalógok

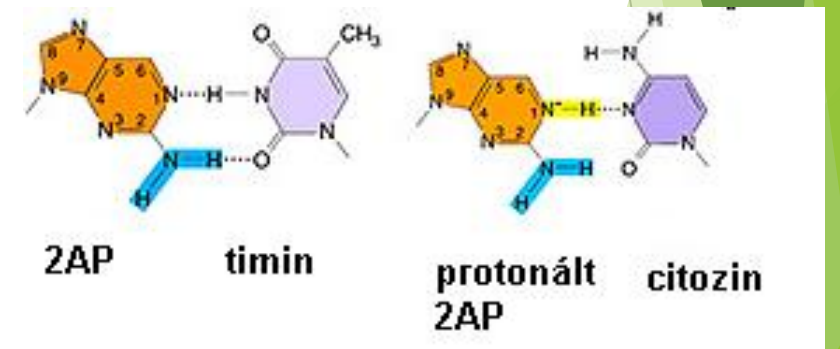
a természetes bázisokhoz hasonló szerkezetűek, a DNS polimeráz a kettős spirálba beépíti

pl.

5-brómuracil (5BU) timin analóg
adeninnel és guaninnal is (!) képes párosodni tranzíciót okoz
T-A>5BU-A>5BU-G>C-G
C-G>5BU-G>5BU-A>T-A



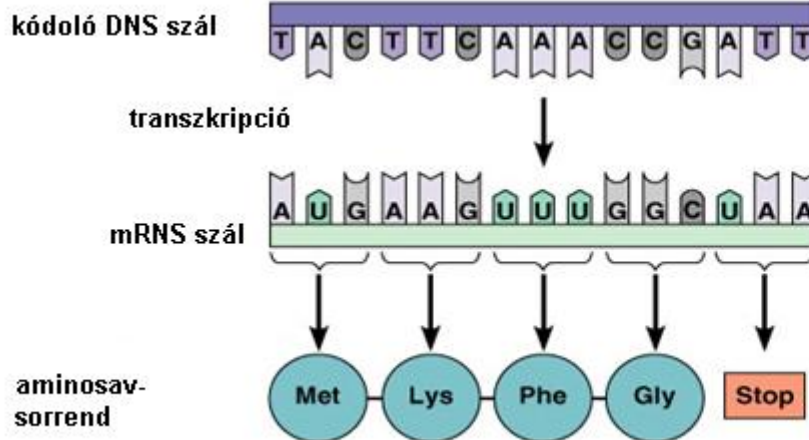
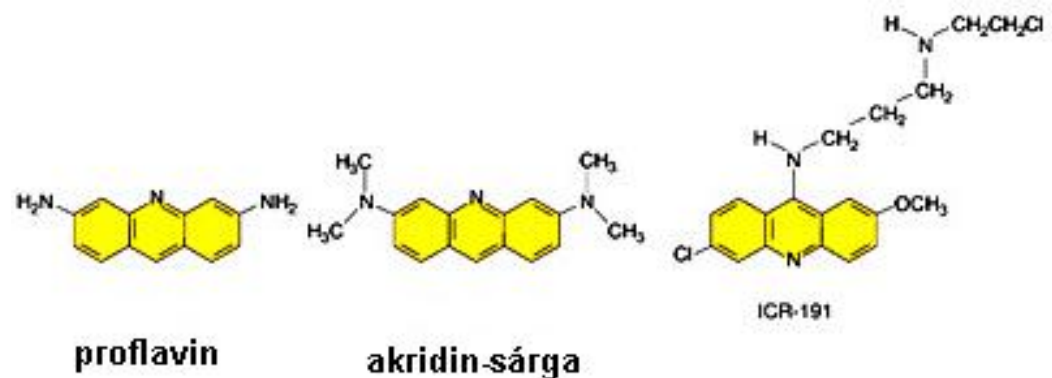
2-aminopurin (2AP) adenin analóg
a timinen kívül citozinnal is (!) képes párosodni
tranzíciót okoz
T-A>T-2AP>C-2AP>C-G
C-G>C-2AP>T-2AP>T-A



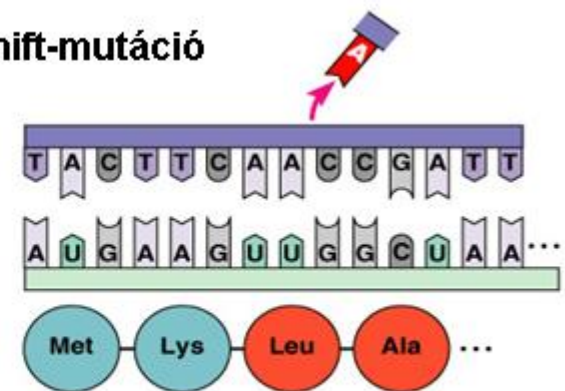
Interkaláló vegyületek

- általában gyűrűs vegyületek, melyek térkitöltése a bázispárokhoz hasonlít
- a DNS kettős spirálban egymás melletti bázispár közé képesek beépülni
- a beépülés a kettős spirál alakját torzítja, ami azután a replikáció során egy nukleotid kiesését vagy beépülését okozza

pl.
proflavin
akridin sárga
etidium-bromid
dioxin



frameshift-mutáció



Alkiláló szerek

alkil (-CH₃, -CH₂-CH₃) csoportokat építenek a nukleinsavak bázisaira és azokat módosítják

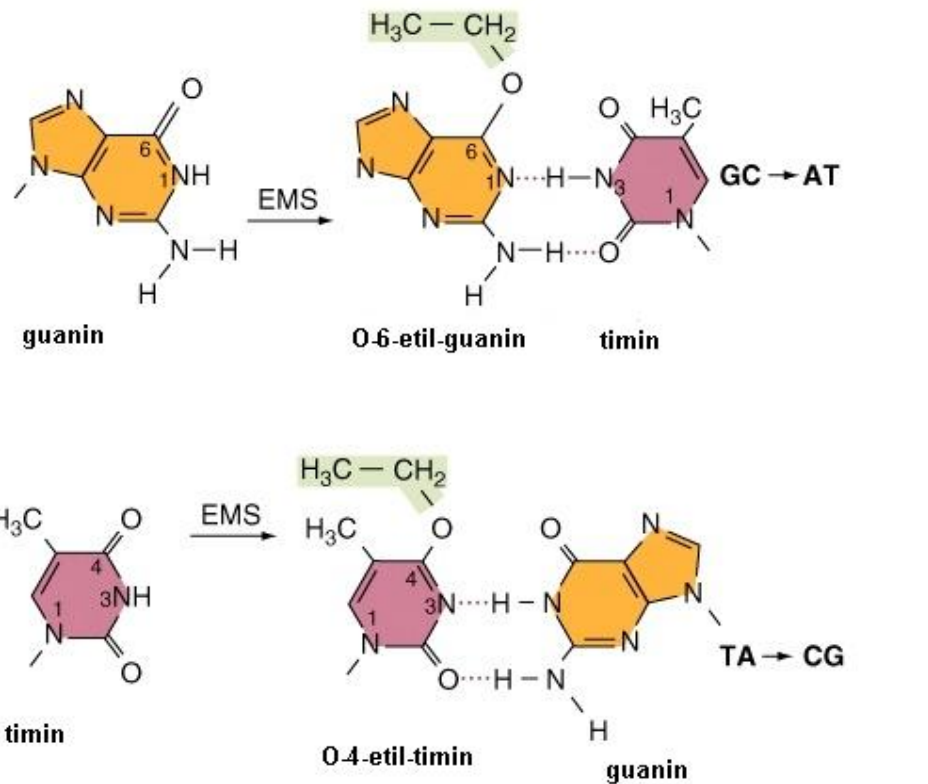
pl.

etil-metánszulfonát (EMS)

főként a guanint, kisebb mértékben a timint módosítja

a 6-etilguanin timinnel párosodik, ami C-G>T-A tranzíciót eredményez

a 4-etil-timin a guaninnal párosodik, és így T-A>C-G tranzíció jön létre



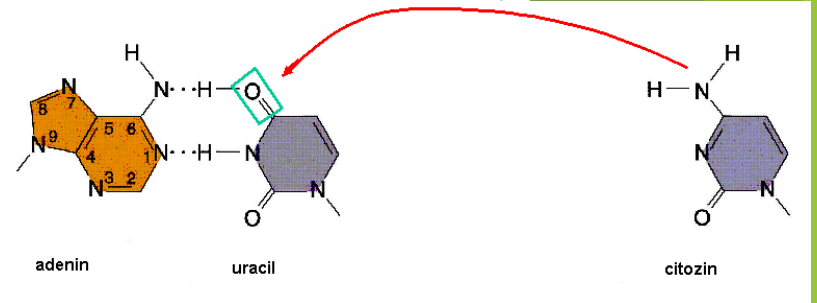
Deamináló szerek

a spontán deamináción kívül különböző vegyszerek is képesek a bázisok amin csoportjait támadni

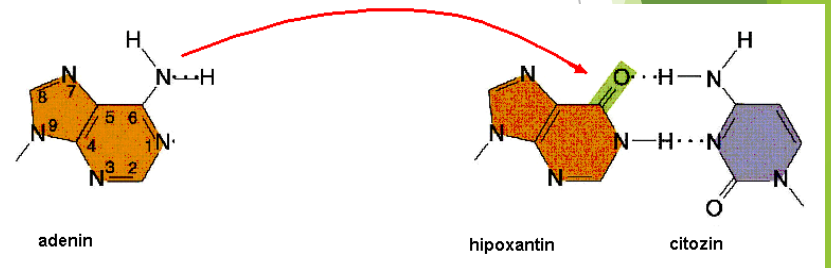
salétromossav

a citozint, az adenint és a guanint támadja

citozin → uracil, mely a következő replikáció során adeninnel párosodik és C-G > T-A tranzíciót okoz



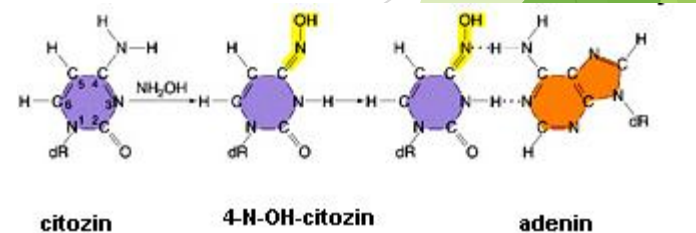
adenin → hipoxantin, ami citozinnal párosodva T-A > C-G tranzíciót eredményez



guanin → xantin, ez elsősorban citozinnal, de kisebb mértékben timinnel is párosodva C-G > T-A tranzíciót hoz létre

hidroxilamin

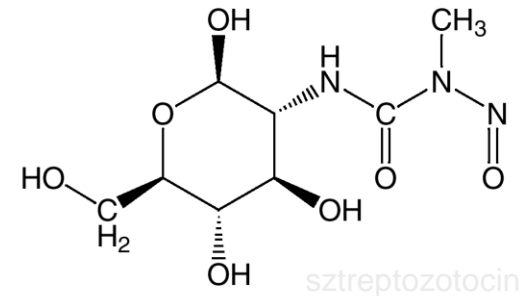
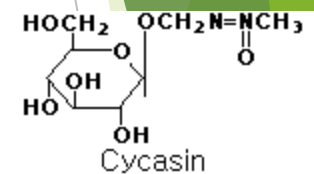
a citozin amino csoportját támadja, és hidroxilaminocitozin keletkezését okozza a hidroxilaminocitozin adeninnel párosodik, és C-G > T-A tranzíciót okoz



N-nitróz vegyületek

Az O=N-N gyököt tartalmazó vegyületek - dietil-nitrózamin, N-metil-N'-nitro-N-nitrózzguanidin, stb. - jelentős mutagén és karcinogén potenciállal rendelkeznek.

- A legtöbb növényi és állati sejt anyagcseréje a nitrózaminokat hatékony mutagénekké és karcinogénekké tudja átalakítani.
- A DNS-ben tranzícióit és tranzverziót indukálnak.
- Több karcinogén hatású vegyület tartozik ebbe a csoportba, pl. a széles spektrumú antibiotikum a sztreptozotocin vagy a cikászdióból kivont cikazin



Szabad gyököt képező vegyületek

A mutagén vegyületek jelentős része szabad gyökök képzésével fejt ki mutagén hatását.

A kémiai reakciók révén keletkező szabad gyök képzés sebességét fémionok (Fe, Cu, stb.), hőmérséklet és a fény jelentősen befolyásolja. Peroxidok számos kémiai reakció hatására képződnek. H_2O_2 spontán két -OH gyökre hasad. Hatására pirimidinek 5-6-os szénatomok közötti kettős kötése felhasad vagy hidroxil-hidroperoxi pirimidinek képződnek, mely pontmutációhoz, illetve láncszakadáshoz vezet.

A hidroxilamin - H_2NOH - is enyhén redukáló vegyület. Mutagén hatása a citozin 4-6-os csoportjának N-hidroxilációjával indul meg, amely tranzíciót okoz. A hidroxilamin egy specifikus mutagén, mert csak egyirányú G.C \rightarrow A.T tranzíciót vált ki. A hidrozinok és a hidrazidok is a hidroxilaminhoz hasonlóan reagálnak a DNS-sel. Pontmutációt és kromoszómatorést indukálnak. Az aldehidek és a fenolok mutagén hatása is a szabad gyökök képződésére vezethető vissza.

Nehézfémek

A Co, Ni, Cr, Zn, Mn, Hg különféle módon fejtik ki mutagén hatásukat.

A higany a DNS purinbázisaihoz kötődik.

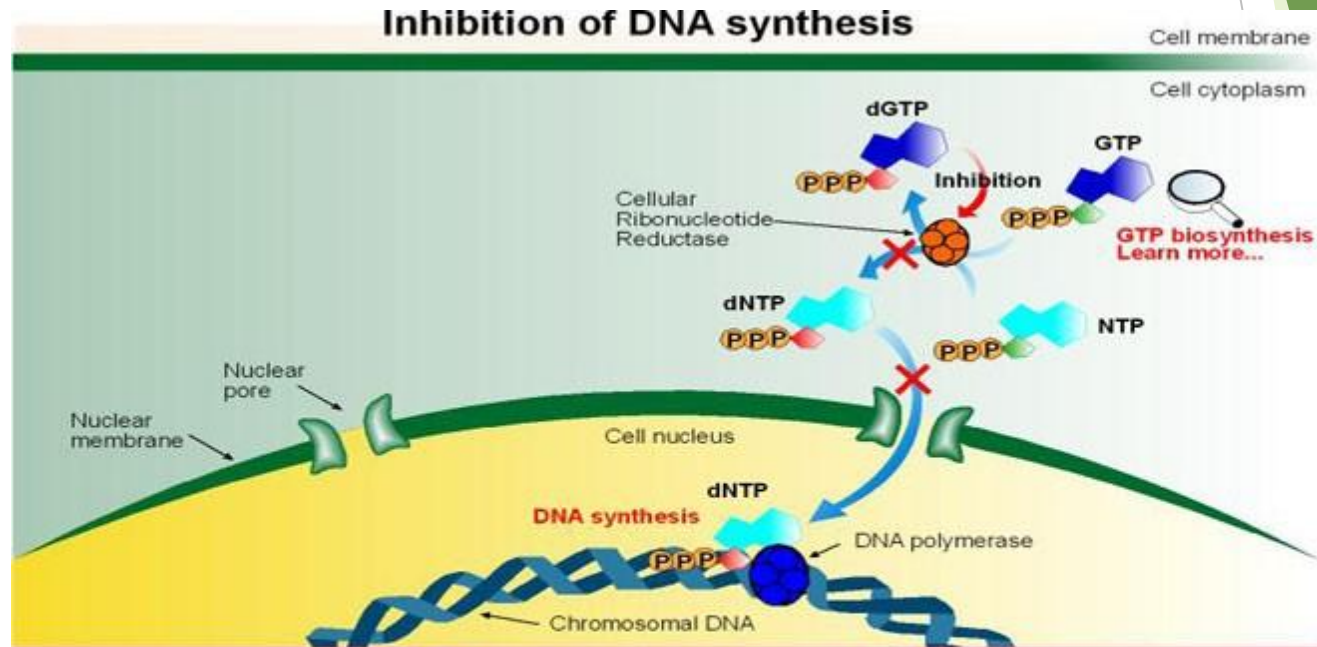
A mangán a polimerázokra hat és így változtatja meg a DNS-replikációs mechanizmus precizitását.



DNS szintézis inhibitorok

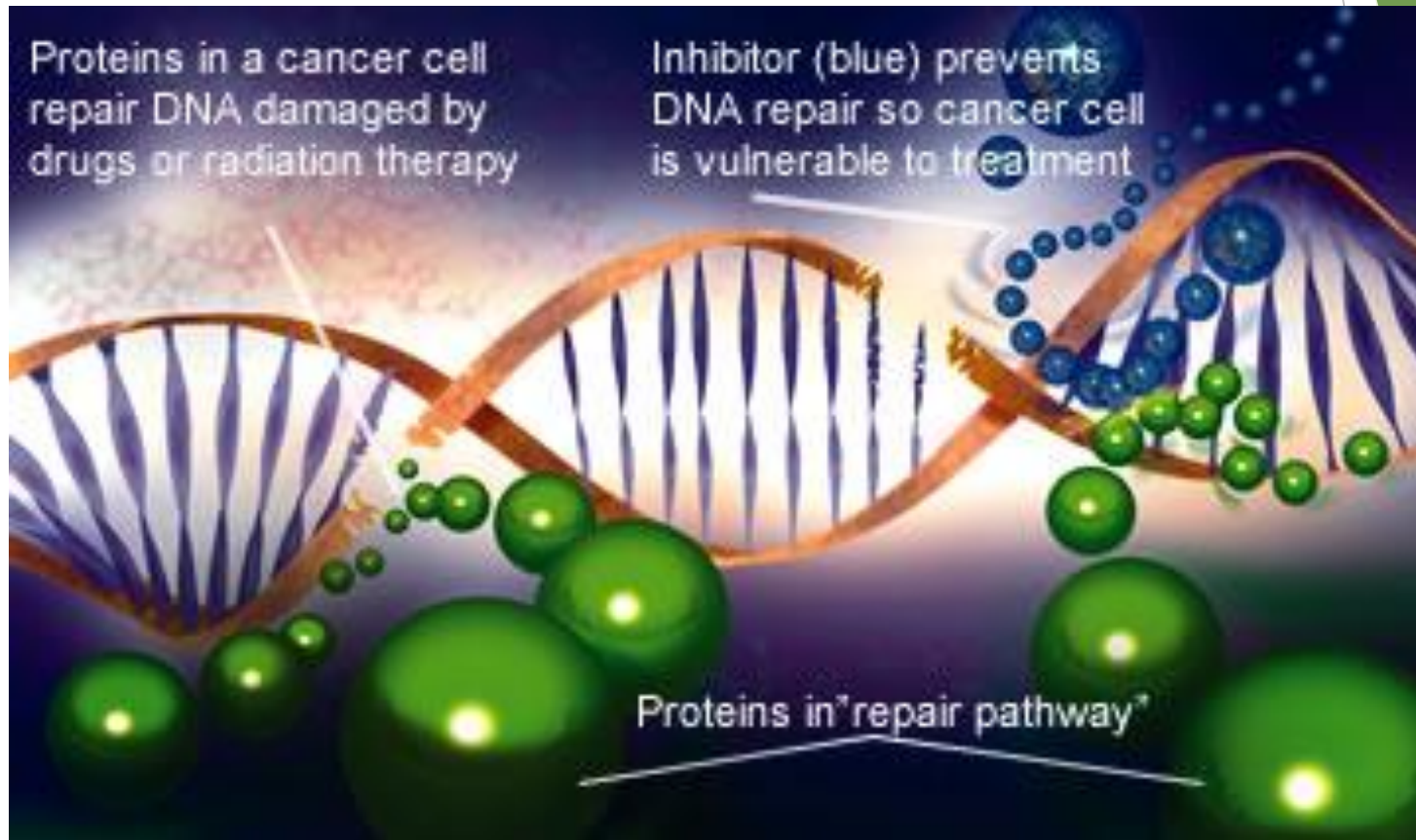
A mutagén ágensek közé sorolhatók azok a vegyületek is, amelyek a DNS-replikációt leállítják.

pl. N-hidroxiurea, etoxikoffein, tetrametil-húgysav



The inhibition of purine nucleoside phosphorylase (PNP) by tenofovir (TDF) reduces the degradation of cellular inosine monophosphate (IMP) by PNP and promotes the biosynthesis of GTP. ddI is a substrate competitor for PNP and also results in more cellular IMP. Large amounts of GTP are then synthesised and converted to dGTP by cellular ribonucleotide reductase (RNR). By negative feedback mechanisms, dGTP inhibits RNR activity. Since RNR normally produces dNTP's required for DNA synthesis, cell proliferation is inhibited. T cells are highly susceptible to PNP inhibition seen in certain forms of severe combined immunodeficiency (SCID) involving genetic disorders of PNP activity. It is thought that slower rates of CD4+ T cell recovery or declines when treated with TDF and ddI may be due to PNP inhibition.

Hibajavító mechanizmusok sérülése



Szerkezeti kromoszóma- mutációk

- ▶ Feltétele a kromoszómák törése
- ▶ Csoportosítás a törés száma és kromoszómán belüli helye alapján

A kromoszóma kisebb-nagyobb szakaszának elvesztése (**deléció**).

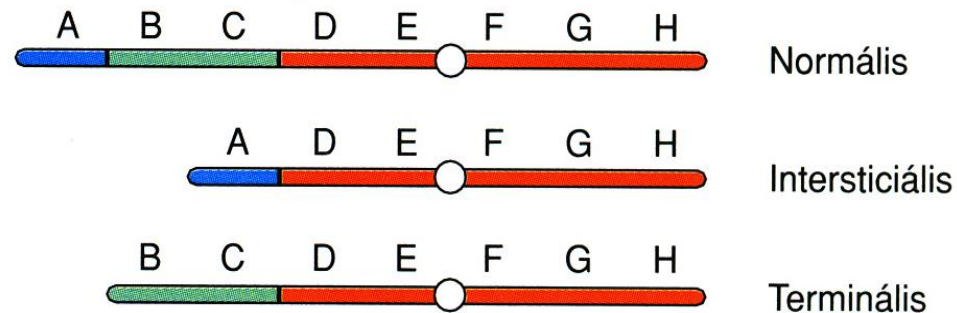
Egyes gének vagy blokkok megkettőződése (**duplikáció**).

Egy génblokk 180°-os elfordulása kromoszómán belül (**inverzió**).

Egyes szakaszok kicserélődése, ami két új típusú kromoszóma kialakulásához vezet (**transzlokáció**).

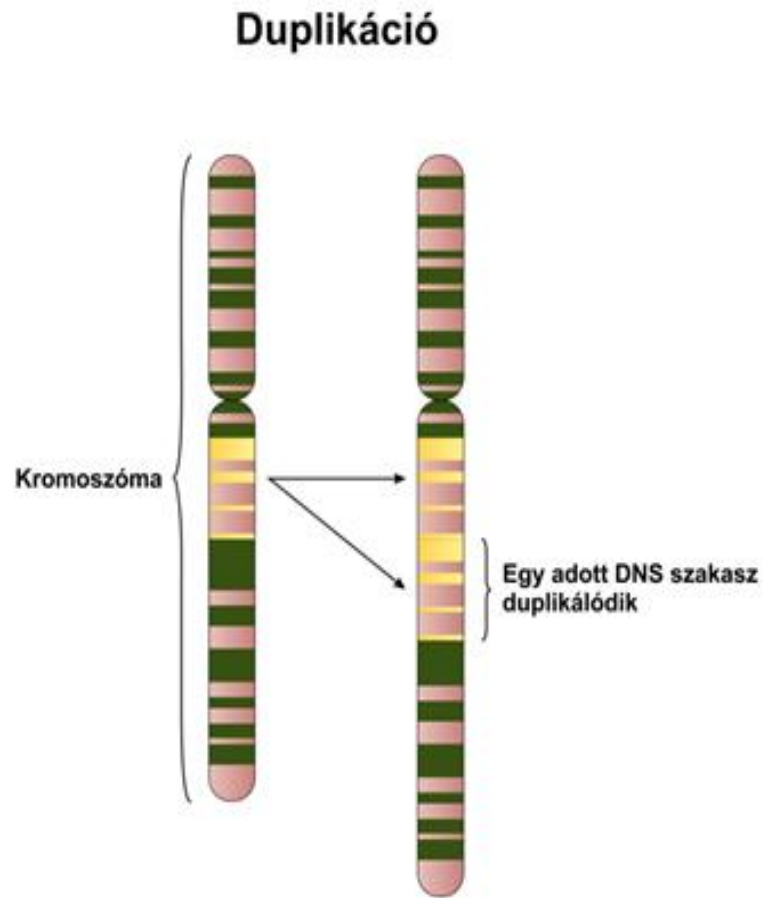
Deléció

- ▶ Letört darab elvész
- ▶ Terminális deléció: a kromoszóma végéről törik le egy darab
- ▶ Köztes deléció: 2 törés a kromoszómán belül



Duplikáció

- ▶ Kromoszóma-részlet megkettőződése



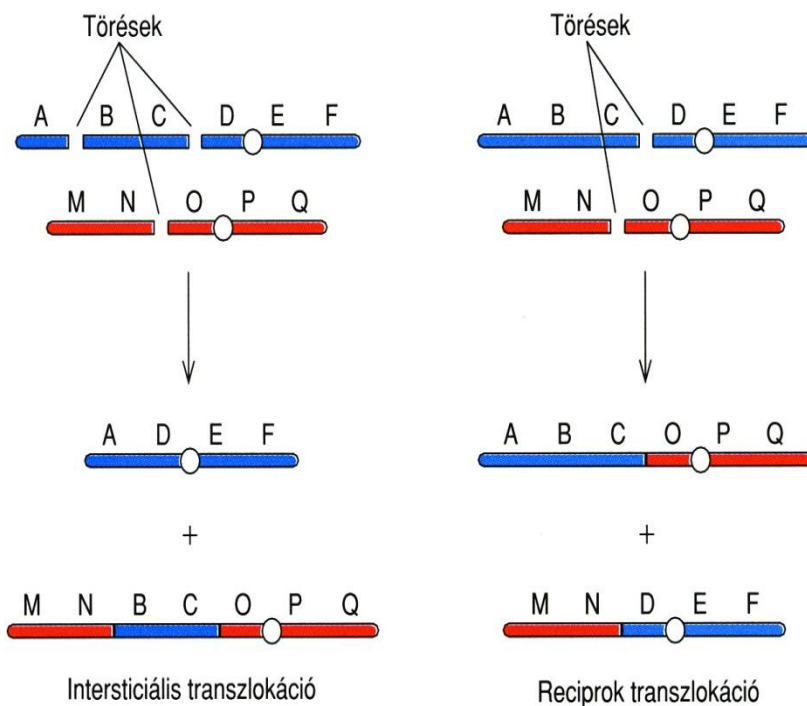
Transzlokáció

- ▶ Letört részek áthelyeződése (2 v. 3 törés)



Copyright 2002, Unistel Medical Laboratories, Unistel Group Holdings (Pty) Ltd

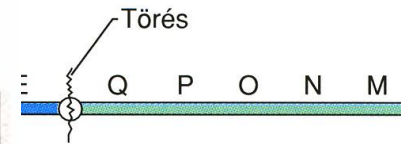
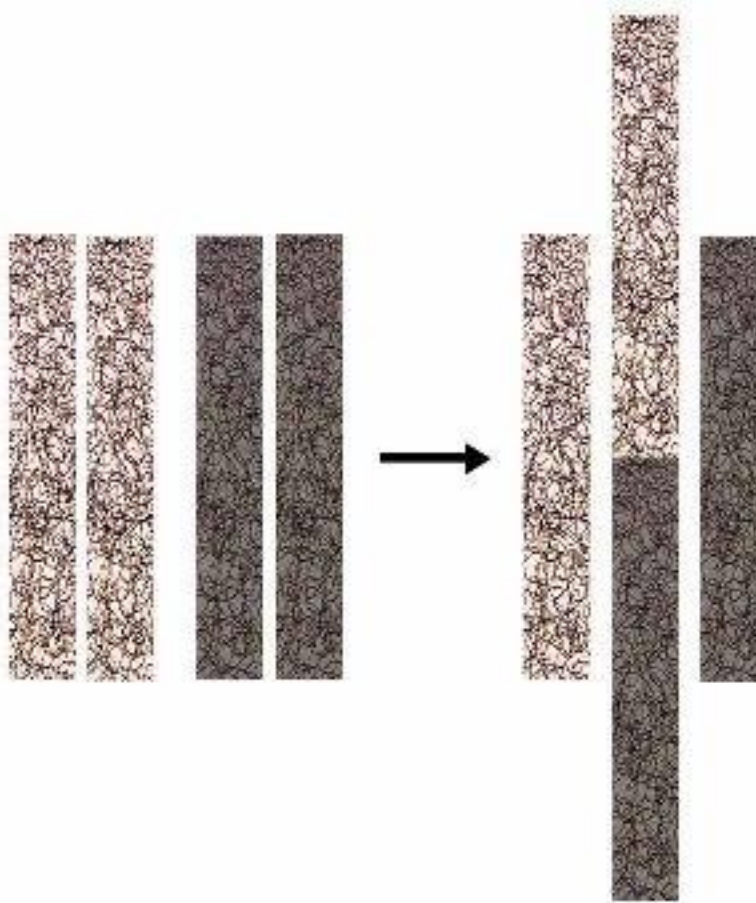
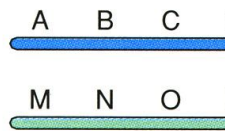
was prepared using a FISH technique "chromosome painting". As well as having a normal chromosome 22, chromosome 9 also derived material from chromosome 8.



4.26. ábra. A transzlokáció két típusát eredményező leggyakoribb események. Az intersticiális transzlokáció egy szakasz egyirányú mozgását jelenti, a reciprok transzlokáció pedig a kromoszómadarabok kétirányú kicserélődésével jár

Robertson-féle transzlokáció (centrikus fúzió)

- ▶ Kromoszómaszám-csökkenéssel jár együtt

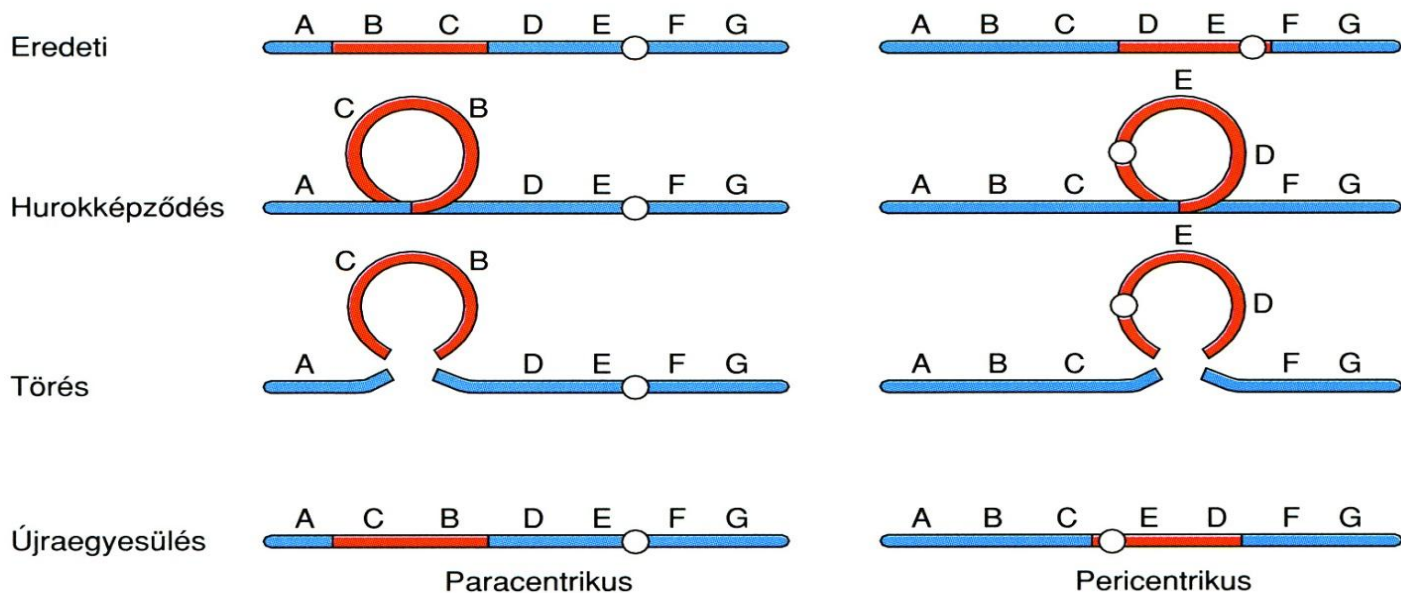


4.30. ábra. Centrikus fúzió
össze. Centrikus hasadás esetén

...moszóma egy metacentrikussá kapcsolódik
...etkezik

Inverzió

- ▶ Megfordulás, ugyanaz a kromoszóma 2X törik el, a darab megfordul



Paracentrikus és pericentrikus inverziók kialakulásának mechanizmusa kettős kromozómatörés esetén

Paracentrikus

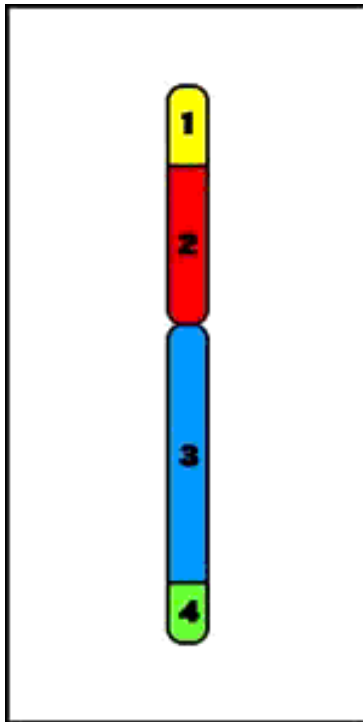
-mindkét törés ugyanazon a karon van

Pericentrikus

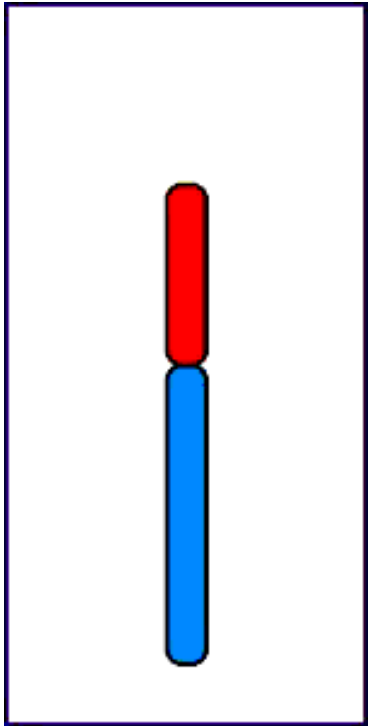
– a törések a krsz. két karjára esnek

Gyűrűkromoszóma

- ▶ A kromoszóma mindkét vége letörik, a törésvégek összezárulnak



Izokromoszóma

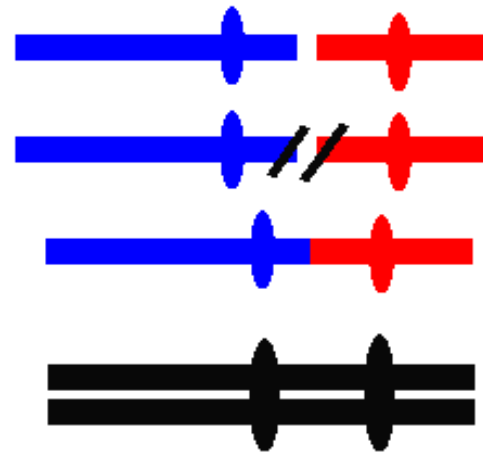
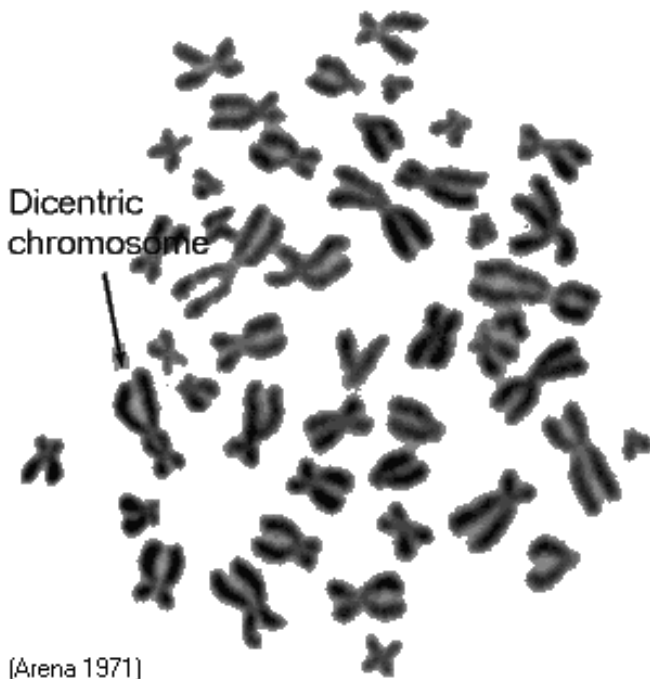


A testvérkromatidák hossz tengelyre merőlegesen válnak el

A karokon lévő sok gén elvesztése miatt gyakran letális

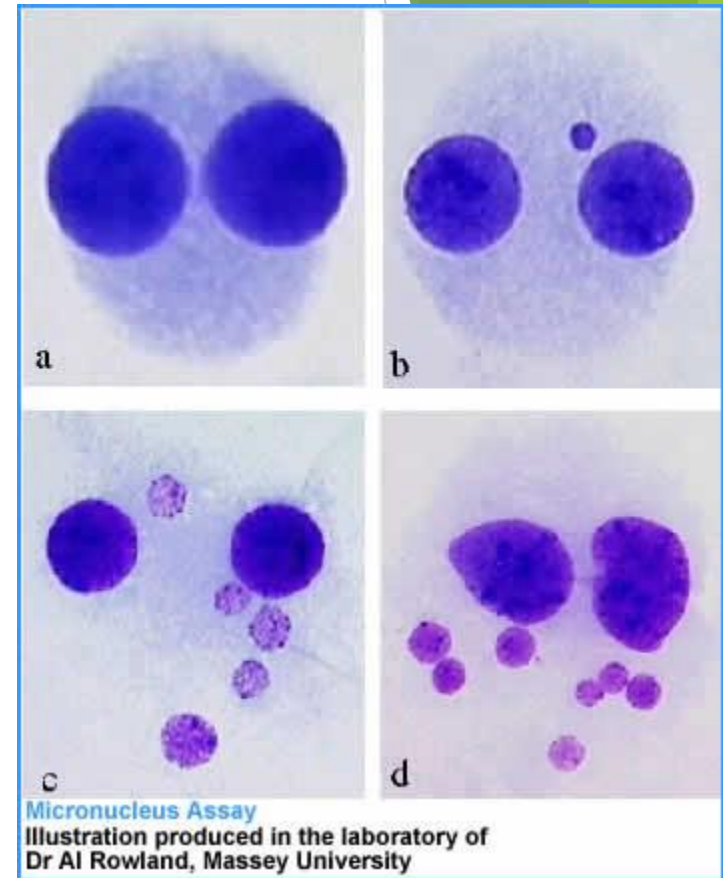
Dicentrikus kromoszóma

- ▶ 2 centromérája van a kromoszómának



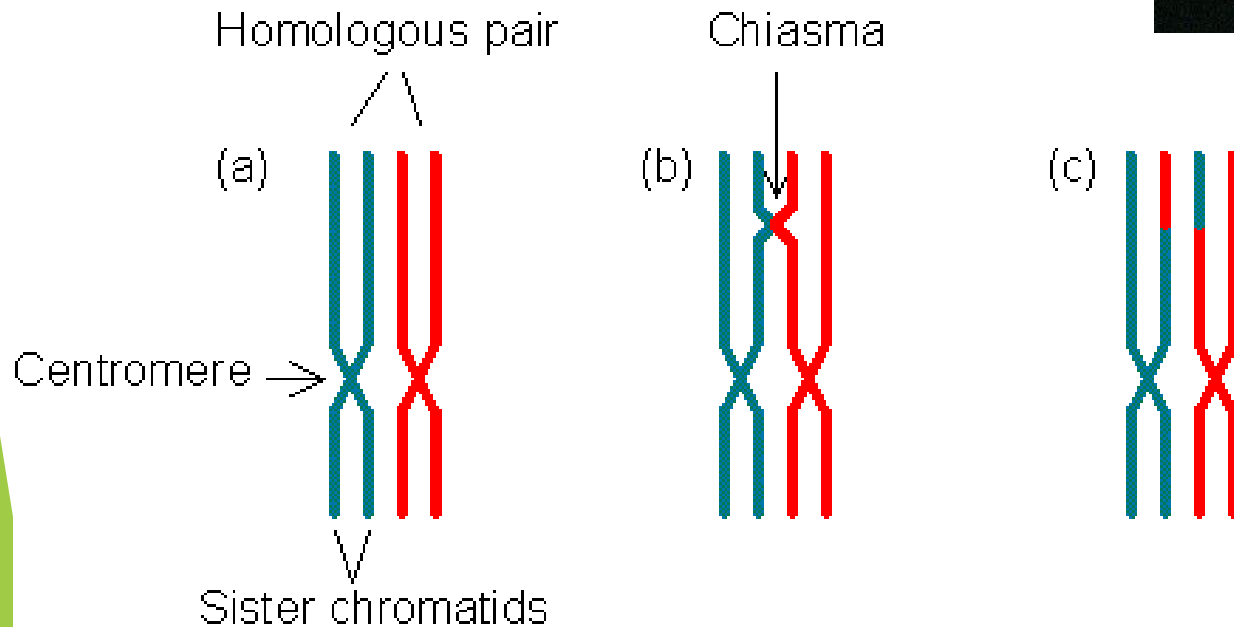
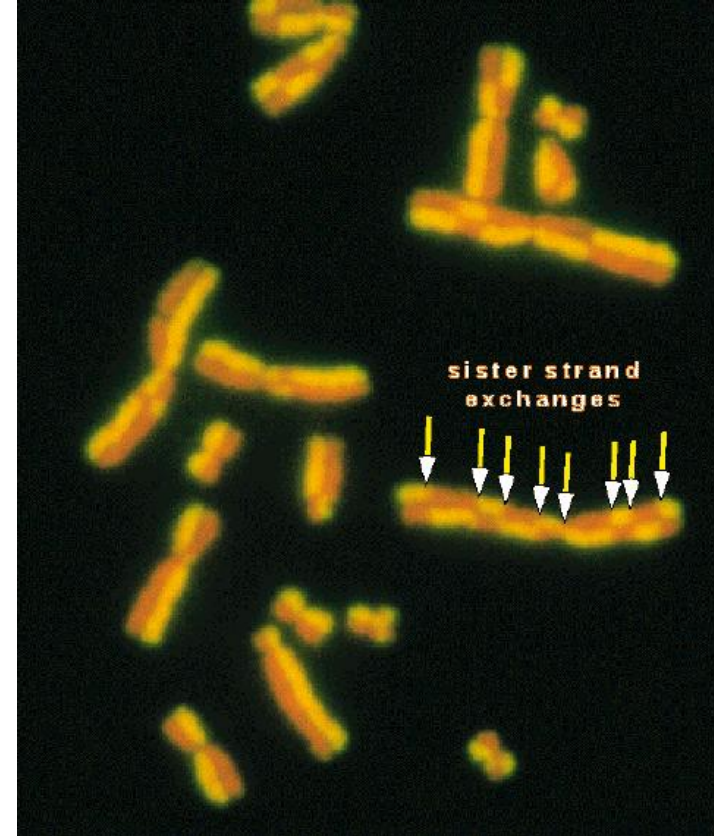
Mikronukleusz képződés

- ▶ A mikronukleusz olyan teljes kromoszóma vagy kromoszóma töredék, amely a mitózis során nem kerül át egyik utódsejt magjába sem, hanem önálló képlet formájában a citoplazmában marad.
- ▶ Oka: kromoszóma fragmentáció és/vagy oszlási orsó hiba



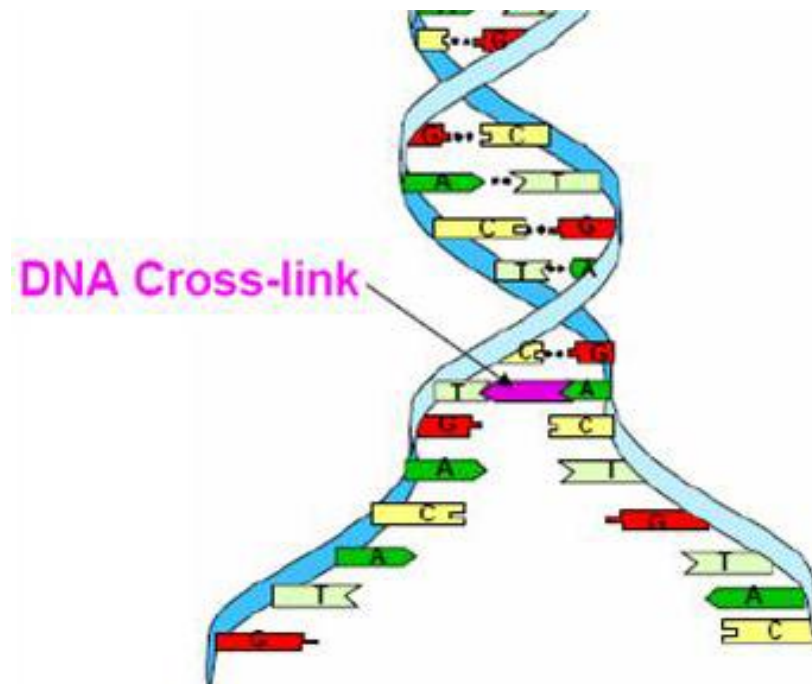
Testvérkromatida csere (Sister Chromatid Exchange (SCE))

- ▶ Szakasz kicserélődése testvérkromatidák között



Keresztkötések

- ▶ Lehet exogén (alkiláló szerek, mustárgáz, kemoterápiás szerek) vagy endogén (salétromsav, aldehidek)
- ▶ DNS szálon belül vagy szembenlévő szálak között vagy DNS-fehérje között
- ▶ Replikációt gátolják (az összekötött pontnál megakad)



Számbeli kromoszóma- mutációk

- ▶ Teljes génkészlet többszöröződése
Euploid mutációk
- ▶ Egy vagy néhány kromoszóma többlete vagy hiánya
Aneuploid mutációk
- ▶ Két eltérő kromoszómaszámú sejtvonal van jelen a szervezetben
Mixoploid mutációk

Euploid mutációk

- ▶ Kromoszómaszerelvény alapszáma n , ennek többszöröse az euploid sejtekben. Mutáció: normálistól eltérő érték
- ▶ Testi sejtek normálisan diploidak ($2n$):
2X kromoszómaszerelvény (1 apai, 1 anyai homológ)
- ▶ Poliploid mutációk:
 $n > 2$
Emberben triploidia ($3n$) - spontán abortusz, élettel összeegyeztethetetlen
- ▶ Növényeknél előnyös is lehet (búza, banán)

Aneuploid mutációk

- ▶ Csak bizonyos kromoszómák többlete vagy hiánya
- ▶ Monoszómia: 1 homológ kromoszóma 2 helyett
- ▶ Triszómia: 3 homológ kromoszóma 2 helyett
- ▶ Nulliszómia: 0 az adott kromoszómából

Genotoxicitás mérése

többféle, nemzetközileg elfogadott tesztrendszer:

- *bakteriális tesztek* (*Salmonella typhimurium*, *Esherichia coli*)
- eukarióta egysejtűek (pl. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*)

élesztőgomba

penészgomba

- *rovarok* (ágascsapú rákok *Daphnia*, ecetmuslica *Drosophila melanogaster*)
- *gerincessejt-vonalak* (humán és egyéb emlős sejtvonalak)
- *növények* (lóbab, árpa, vöröshagyma)
- *in vivo* (karmosbéka, halak, egér, hörcsög, patkány)

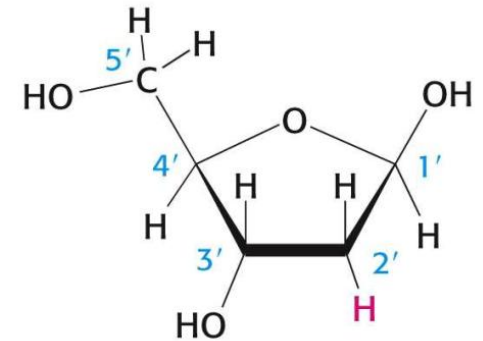
Genotoxicitás mérése (OECD protokollok)

TG 471	Bacterial Reverse Mutation Test (Ames Test)	TG 480	Genetic Toxicology: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Gene Mutation Assay
TG 472	Genetic Toxicology: <i>Escherichia coli</i> , reverse assay	TG 481	Genetic Toxicology: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Mitotic Recombination Assay
TG 473	<i>In Vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration Test	TG 482	Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells <i>In Vitro</i>
TG 474	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test	TG 483	Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
TG 475	Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test	TG 484	Genetic Toxicology: Mouse Spot Test
TG 476	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test	TG 485	Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay
TG 477	Genetic Toxicology: Sex-linked Recessive Lethal Test in <i>Drosophila melanogaster</i>	TG 486	Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mouse Liver Cells <i>In Vitro</i>
TG 478	Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test	TG 487	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test
TG 479	Genetic Toxicology: <i>In Vitro</i> Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells		

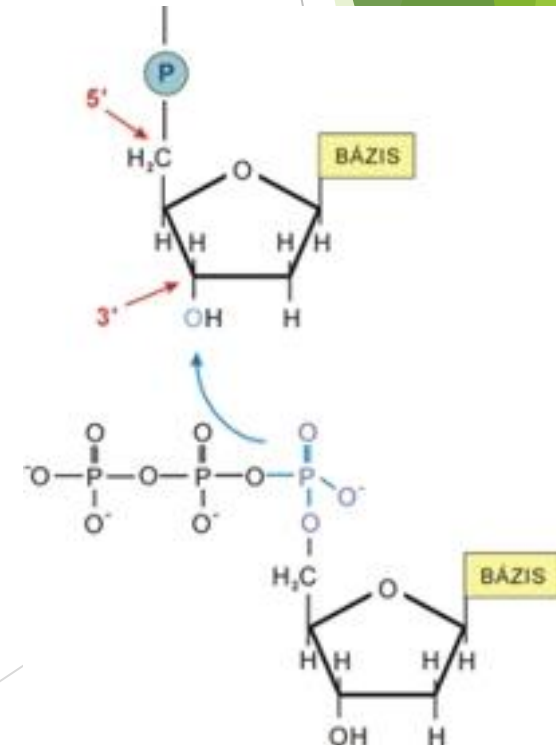
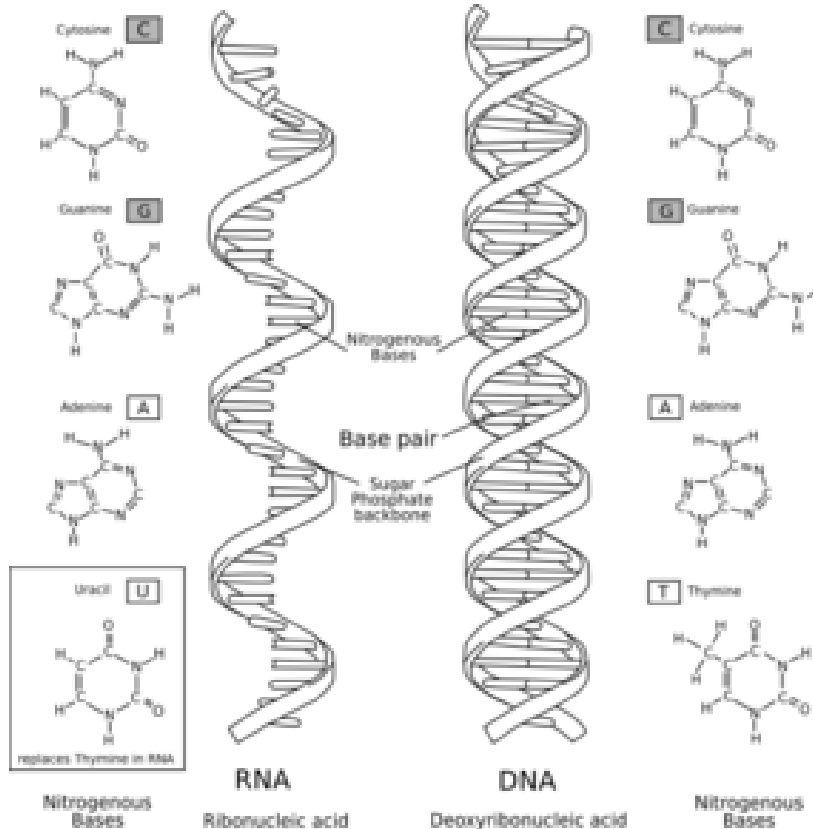
Comet assay,
Timidin-kináz assay,
citogenetikai módszerek,
mikronukleusz teszt,
FISH

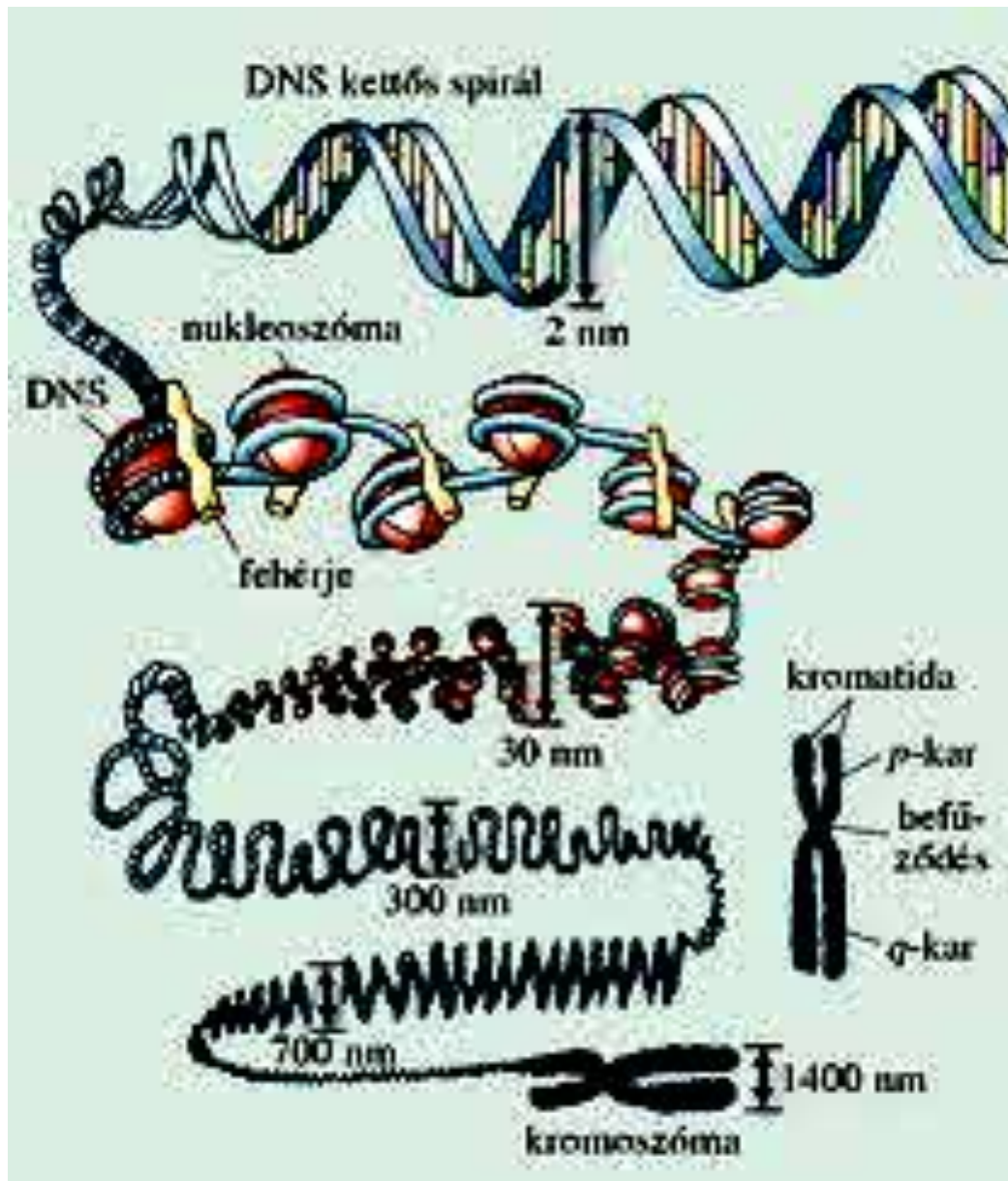
DNS (Dezoxiribonukleinsav)

- ▶ Örökítőanyag
- ▶ Alapegysége: nukleotid
(cukor, heterociklikus bázis, foszforsav)



Deoxyribose





Mutációk típusai

- ▶ A **gén** vagy pont mutációk, amelyek a génnek csak kis szakaszát érintik

(1) báziscsere

(2) bázisok számának változása.

(pontmutáció, deléció, inszerció, duplikáció, inverzió)

- ▶ A **kromoszómák** strukturális mutációi, a kromoszóma törések utáni genetikai információ átrendeződése révén alakulnak ki (kromoszóma aberrációk).

(deléció, inszerció, duplikáció, inverzió, transzlokáció)

Mutációk típusai

- ▶ **Genom mutációk:** A kromoszómák számbeli mutációi. Az örökítő anyag mennyiségének változásait idézik elő.

(1) Euploidia: A sejtek kromoszóma készlete a haploid kromoszóma készlet egész számú többszörösére nő vagy csökken ($2n$ -ből $3n$, $4n$, stb. lesz)

(2) Aneuploidia: A sejtek kromoszóma száma általában eggyel nő vagy csökken ($2n$ -ből $2n+1$ lesz).

Genotoxikológia?

- ▶ Genotoxikológia - genetikai toxikológia, az 1960-as években alakult ki
- ▶ DNS károsító hatás vizsgálata
- ▶ **Genotoxikus**: olyan vegyület vagy hatás, mely a DNS-ben tárolt genetikai információt megváltoztatja, vagy a genetikai károsodást kijavítani szolgáló rendszereket gátolja.
- ▶ **Mutagén**: olyan hatás/vegyület, amely hatására az előidézett DNS károsodás a szomatikus sejtek osztódása során fennmarad (az utódsejtek öröklik) illetve, ha az ivarsejtek is érintettek, az utódokba kerül.
- ▶ **Karcinogén** (rákkeltő): rákos elváltozáshoz vezető anyagok/hatások.

Genotoxicitás vizsgálat

- ▶ A genotoxicitás vizsgálat korai fázisában a tesztek végpontjai azonosak a karcinogenitás vizsgálatok végpontjaival.
- ▶ A genotoxikus hatás pontos felderítéséhez tesztek sorát kell elvégezni (/tiered approach/ egymásra épülő tesztek, különböző végpontok, különböző modellek)

OECD protokollok

- TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (Ames Test)
- TG 472 Genetic Toxicology: *Escherichia coli*, reverse assay
- TG 473 *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test
- TG 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- TG 475 Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test
- TG 476 *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test
- TG 477 Genetic Toxicology: Sex-linked Recessive Lethal Test in *Drosophila melanogaster*
- TG 478 Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test
- TG 479 Genetic Toxicology: *In Vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
- TG 480 Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene Mutation Assay
- TG 481 Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Mitotic Recombination Assay
- TG 482 Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells *In Vitro*
- TG 483 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
- TG 484 Genetic Toxicology: Mouse Spot Test
- TG 485 Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay
- TG 486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mouse Liver Cells *In Vitro*
- TG 487 *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test

In vitro genotoxicitás tesztek

- ▶ Bakteriális vagy sejtvonal (főleg emlős) alapú
- ▶ EU szinten elfogadott: 8 teszt, 4-et használnak általánosan
- ▶ OECD protokollal rendelkeznek
- ▶ 2 bakteriális mutagenitás teszt: reverz mutáció alapuló Ames test ([OECD TG 471](#)), *Escherichia coli* reverz mutáció vizsgálat ([OECD TG 472](#)).
- ▶ 2 emlős sejtvonal alapú teszt: *in vitro* emlős kromoszóma aberrációs teszt ([OECD TG 473](#)), *in vitro* génmutáció vizsgálat emlős sejteken ([OECD TG 476](#)).
- ▶ *In vitro* kromoszóma aberrációs teszt ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) által elfogadott alternatívája: *in vitro* mikronukleusz teszt

Alternatív toxikológiai *in vitro* tesztek

előnyei:

1. *in vitro* körülmények között sejteken (élő állat alkalmazása nélkül)
2. rövid idejű
3. olcsóbb
4. reprodukálható
5. nem használ élő állatot

Az esetleges hatás megállapításához több, különböző módszerrel végzett vizsgálat egybehangzó eredményére van szükség.

hátrányai:

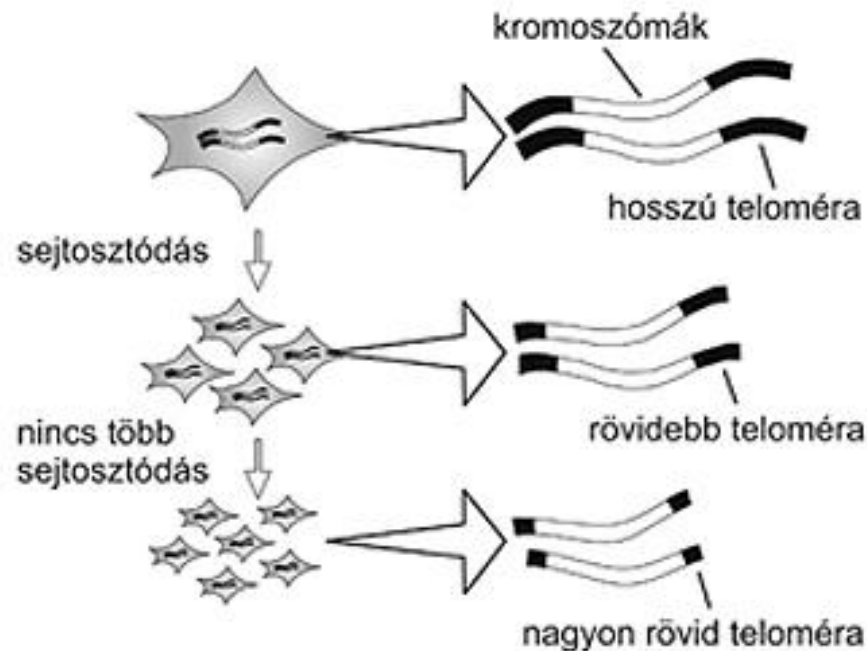
Nem képes az élő szervezetben zajló komplex folyamatokat és azok következményeit modellezni.

megoldás:

Alternatív *in vivo* tesztek (pl. halak, kétéltűek táplálkozó kor előtti lárvaín végzett toxikológiai tesztek)

Sejttenyésztés, sejtvonalak

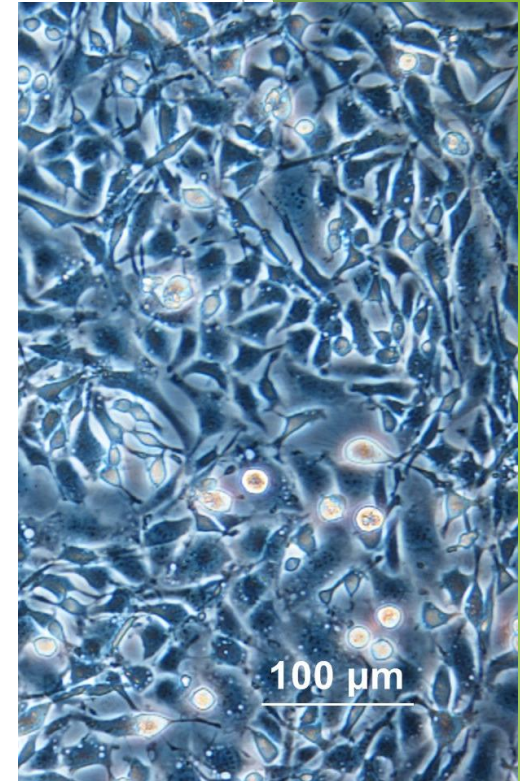
- Sejttenyésztés kezdeti lépései:
csirkeembrió/békaembrió, szövetdarab
50-60 osztódás után öregedés jegyei.
(1940 egér L sejt fibroblaszt, 1951 méhnyakráksejt
HeLa)



Sejttenyésztés, sejtvonalak

Alkalmazható sejtvonalak jellemzői:

- stabil permanens v. primer sejt kultúrák (pl. CHO, humán lymfocita)
 - növekedési képesség stabilitás: megkettőződési idő stabil és rövid
 - kariotípus stabilitás, állandó krom. szám
 - kromoszómák alaki változatossága és stabilitása
 - spontán kromoszóma aberráció gyakoriság megfelelő, nem túl magas
- kínai hörcsög ovárium fibroblaszt sejt (CHO)

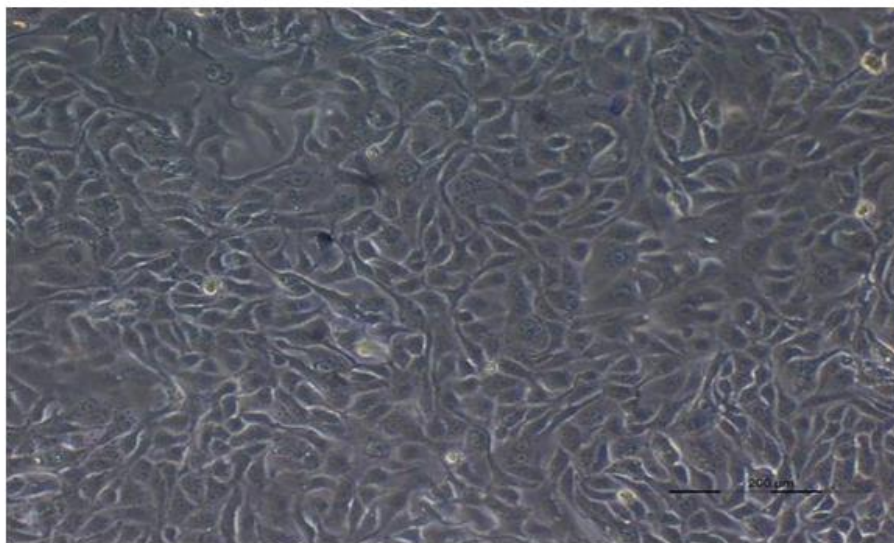
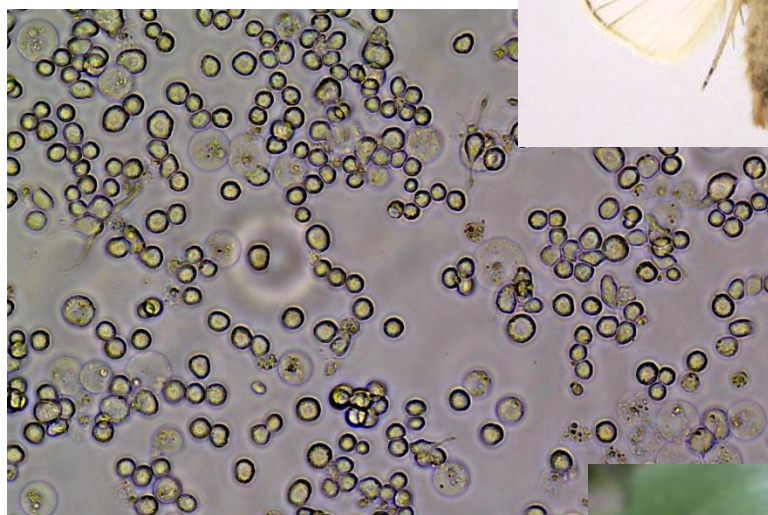
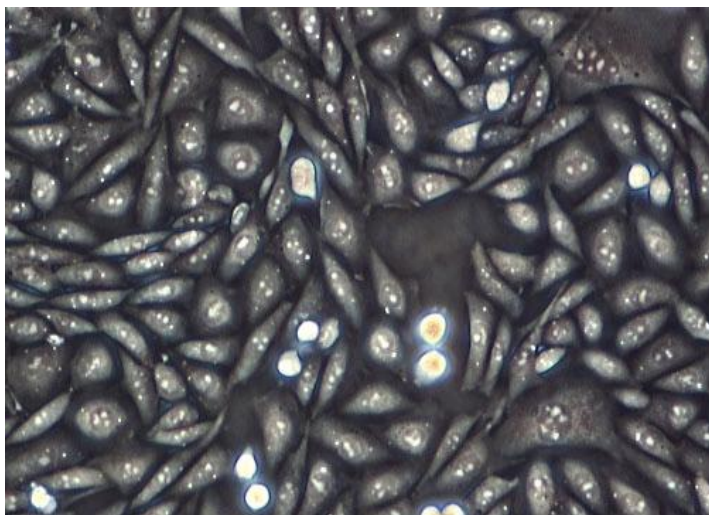


Sejttenyésztés, sejtvonalak

- tápfolyadékok, tenyésztési körülmények (Természetes sóoldat, tojás fehérje, nyirok , vérplazma)
- mesterséges tápfolyadékok elterjedése (F12).
- Metabolikus aktiválás



Sejttenyésztés, sejtvonalak





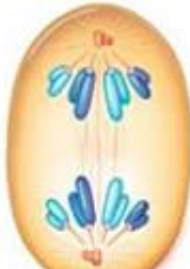
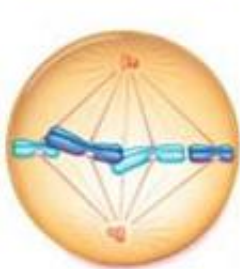
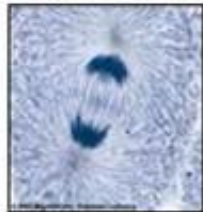
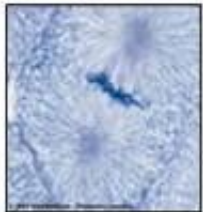


© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

Prophase:
Chromosomes Condense

Preprometaphase:
Chromosomes Attach



© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

© 2011 Brooks/Cole - Thomson Learning

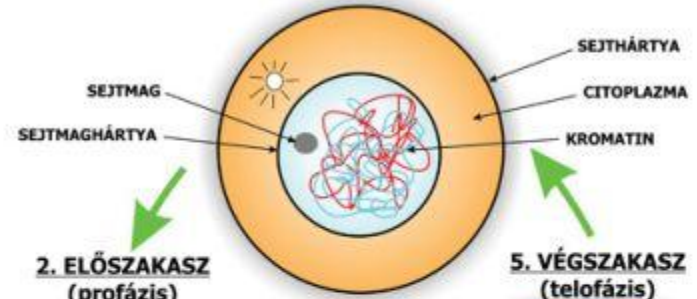
Metaphase:
Chromosomes align

Anaphase:
Chromosomes separate

Telophase:
Chromosomes relax

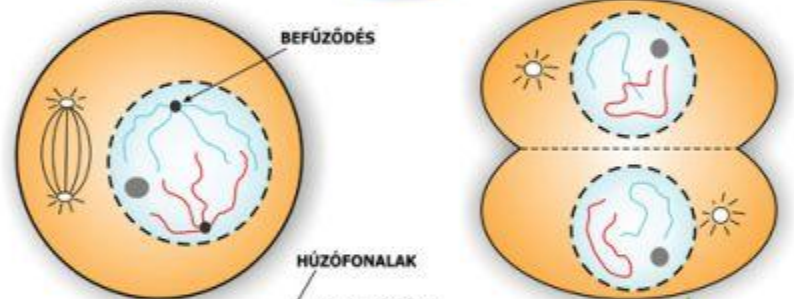
MITÓZIS

1. NYUGALMI ÁLLAPOT
(interfázis)



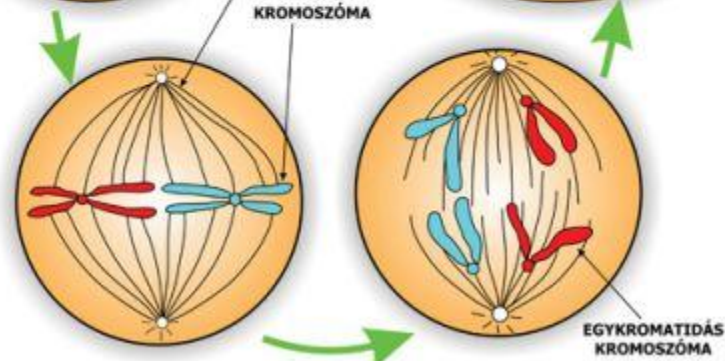
2. ELŐSZAKASZ
(profázis)

5. VÉGSZAKASZ
(telofázis)



3. KÖZÉPSZAKASZ
(metafázis)

4. UTÓSZAKASZ
(anafázis)



Kromoszómapreparátum készítése

1. Mitotikus aktivitás (sejtosztódás) serkentése mitogénekkal (T-limfociták fitohemagglutininnel (PHA))
2. Sejtosztódás leállítása metafázisban (kolhicinnel)

kolhicin: Őszi kikerics (*Colchicum autumnale*) hagymájából készült kivonat. Köszvény gyógyítására alkalmazták. A kolhicin sejtosztódás gátló, a mitózis metafázisában.

Normál esetben a sejtek 2-5%-a osztódik, néhány órás kolhicinezés összegyűjti a sejteket a metafázisban, akár 40-50 %-uk is blokkolt metafázisban található.

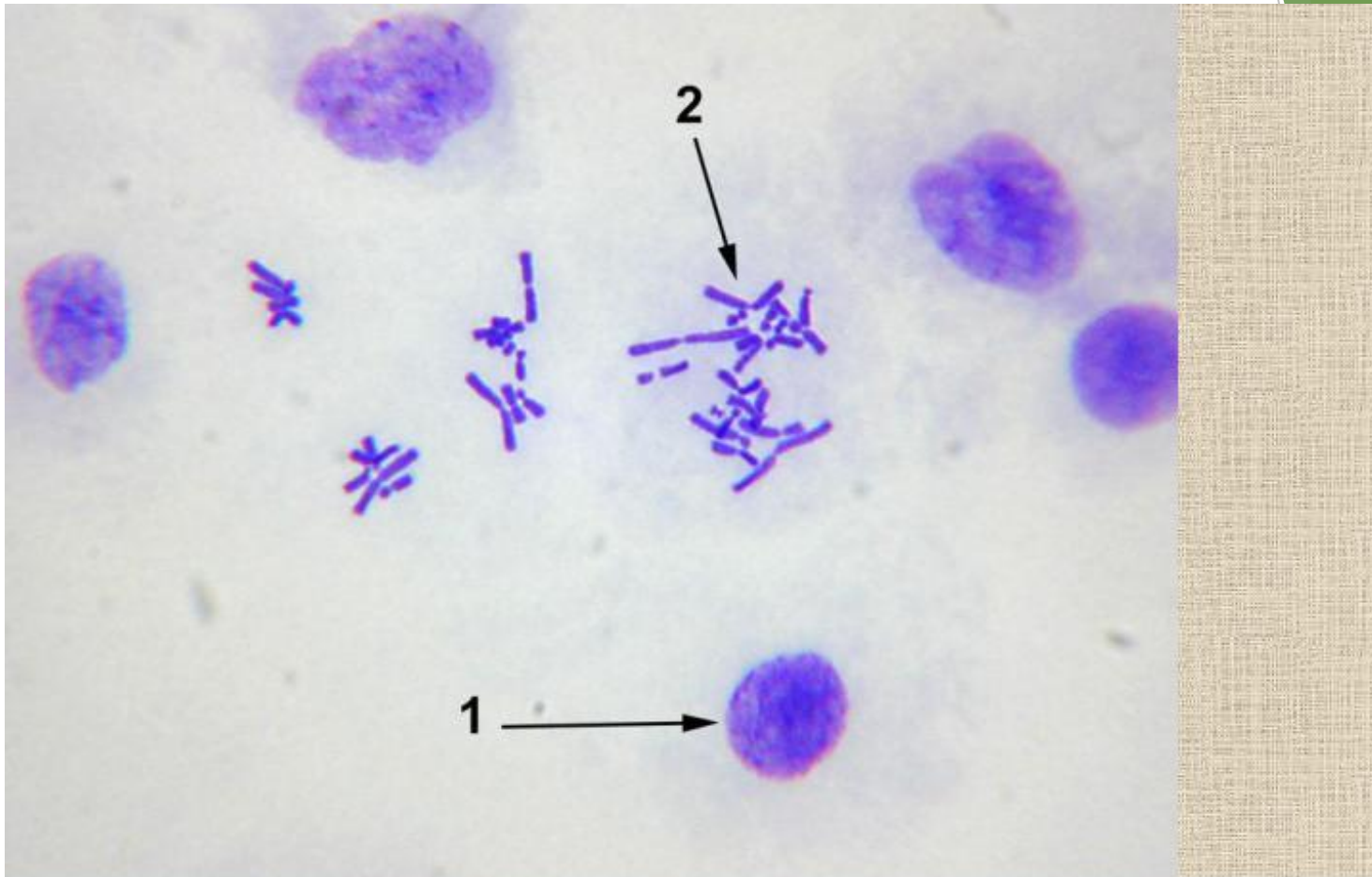
A kolhicin a magorsó mikrotubulusaihoz kötődik.

3. Sejtmag „kipukkasztása” hipotóniás sóoldattal (KCl vagy Na-citrát)
4. Fixálás (pl. metil-alkohol - ecetsav elegyében)
5. Szárítás (tárgylemezen)
6. Festés

Kromoszómapreparátum készítése

Kromoszóma aberrációs teszt

- Régebben CHO sejtek, ma limfocitatenyészet (teljes vérből)
- limfocita + fitohemagglutinin -> sejtosztódást serkent, tenyésztés 48 óra
- Toxikus anyag hozzáadása, tenyésztés 17 óra (1,5 sejtciklus)
- kolchicin: mitózist metafázisban leállítja
- hipotonizálás -> kromoszóma preparátum
- Giemsa-festés



[64] CHO (kínai hőresög ovárium) kromoszóma preparátum. **Giemsa festés.**

1 = interfázisos sejtmag, 2 = karyogramm.

1200 X.

Sávozás típusai

(1) G-sávozás

Giemsa festés, a kromoszómák tripszines emésztése után.

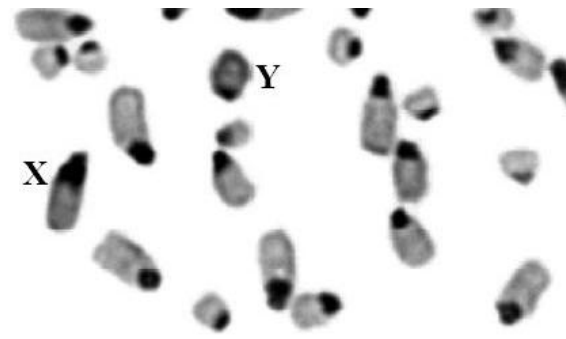
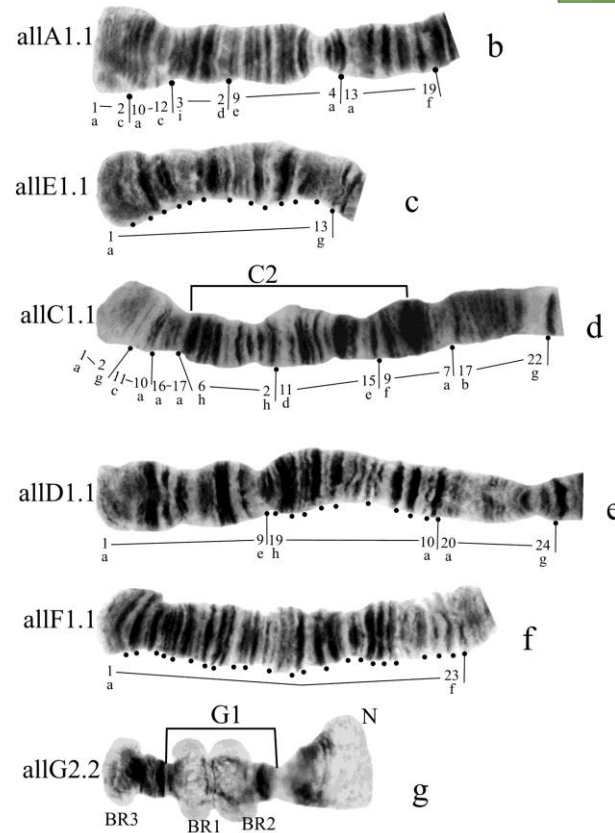
Halvány (**eukromatikus**, korán replikálódó, GC gazdag régiók) és sötét (**heterokromatikus**, későn replikálódó, AT gazdag régiók).

(2) R-sávozás (R=reverz)

A G-sávozás inverze.

(3) C-sávozás

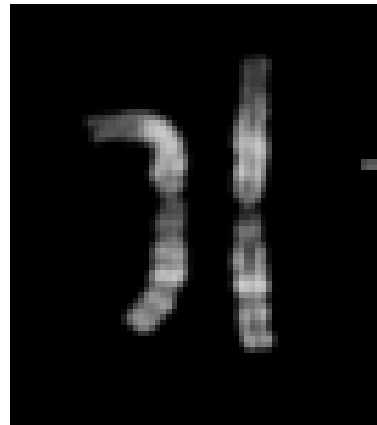
A Giemsa a **konstitutív heterokromatinhoz** kötődik, így a centromerhez is.



Sávozás típusai

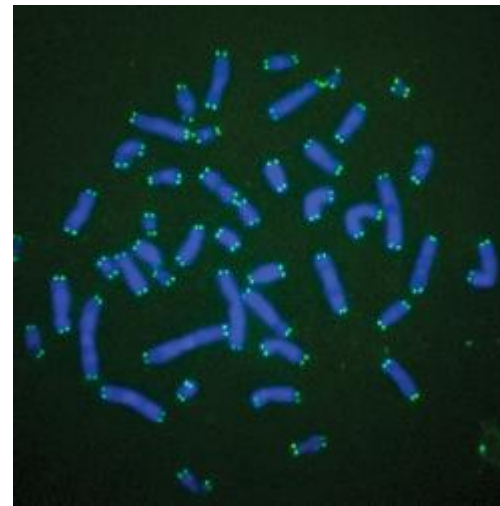
(4) Q-sávozás

Fluoreszcens festékekkel (guinakrin). A sávozás a G-sávozáshoz hasonló



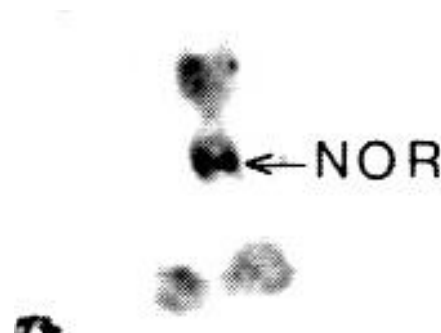
(5) T-sávozás

Telomerek vizualizálása



(6) Ezüstoffestés

Az ezüst-nitrát a nukleáris organizátor régió (NOR) fehérjéihez kötődik. Sötét sávok az rRNS gének kifejeződésénél.



Kariotípus és kariogram

- A sejtek kromoszómaszáma állandó, fajra jellemző
- Minden kromoszómára egyedi sávozás jellemző

A kromoszómapreparátumról fényképet készítenek

A kromoszómákat szoftver segítségével

szabályosan elrendezik (rövid karok /p/ felfelé,
hosszú karok /q/ lefelé néznek, párok egymás mellé)

- **Kariogram**: egy sejt/szervezet rendezett kromoszómakészletének képe
- **Kariotípus**: a fajra jellemző kariogram



1



2



3



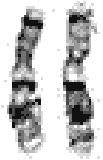
4



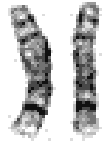
5



6



7



8



9



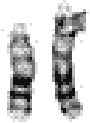
10



11



12



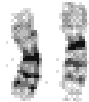
13



14



15



16



17



18



19



20



21



22



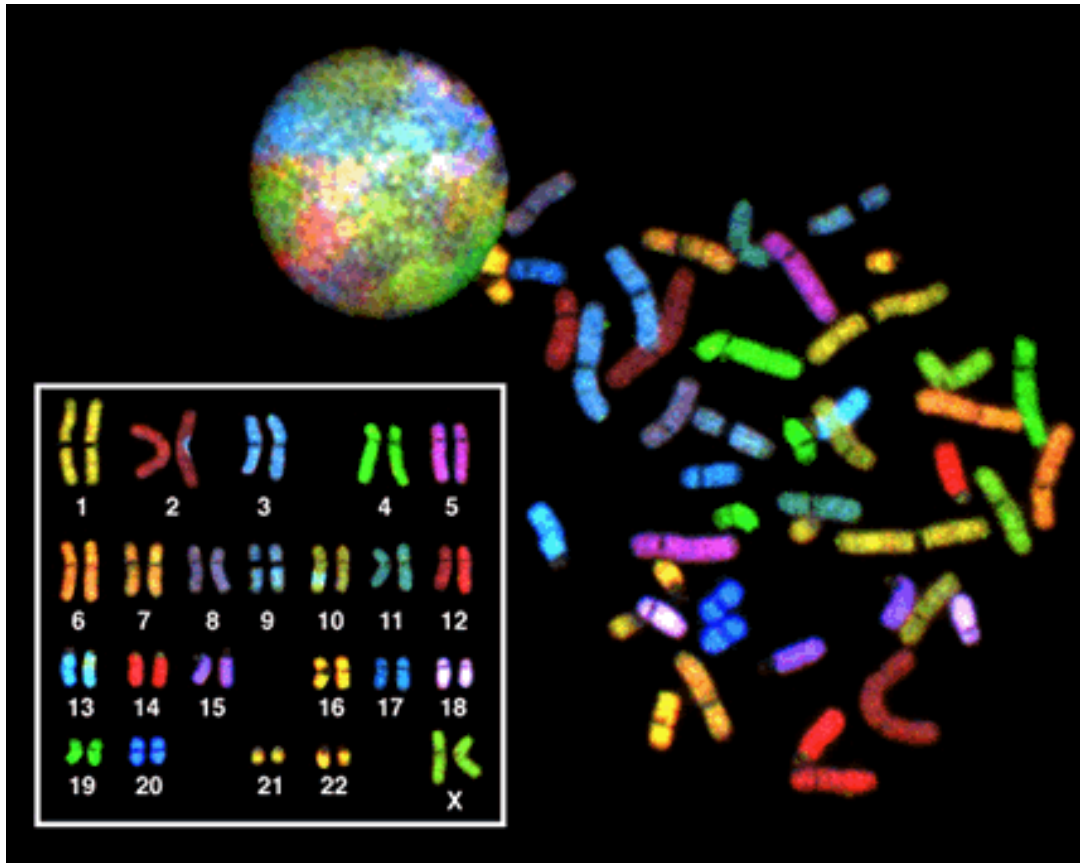
X



Y

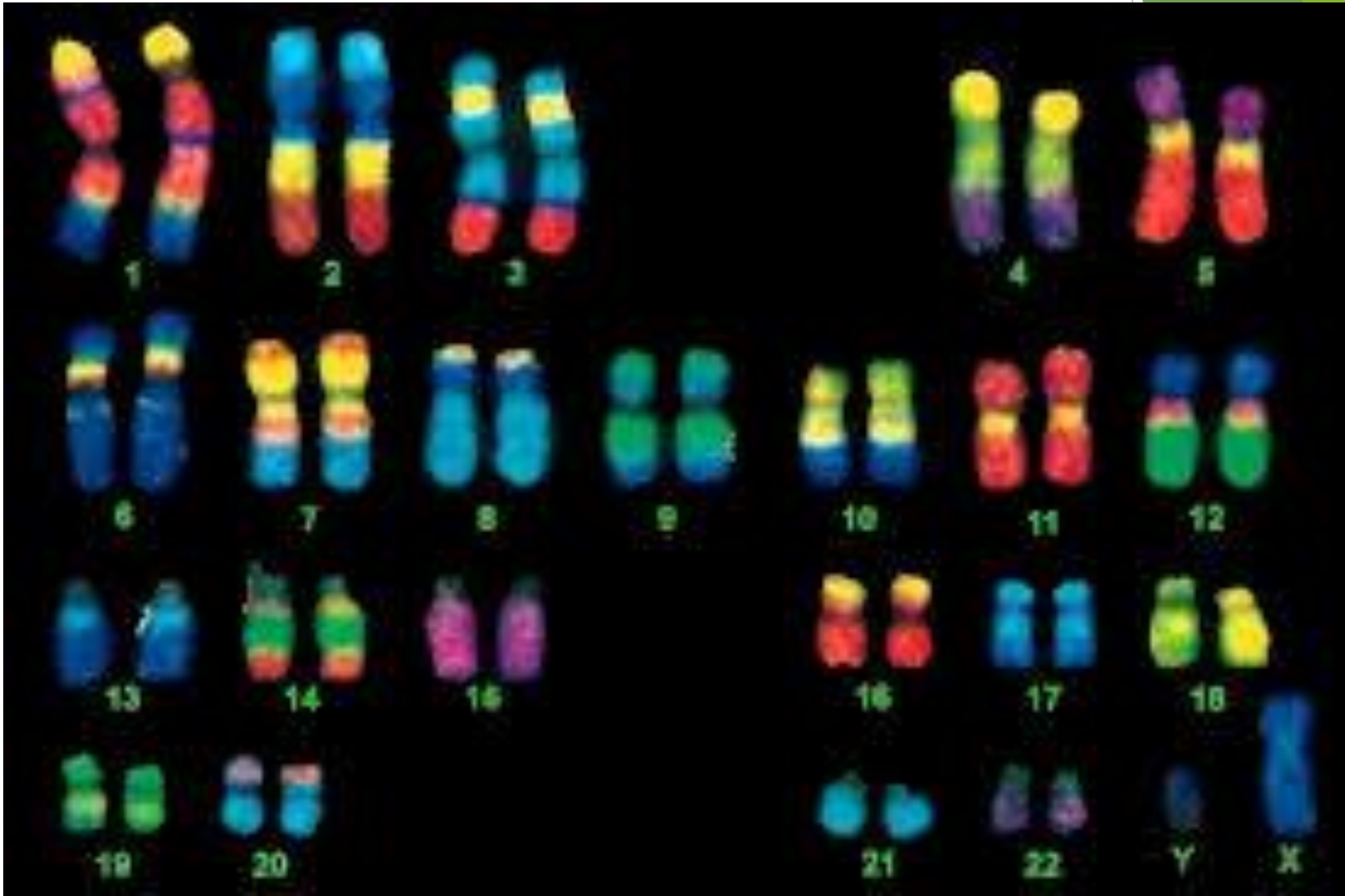
Spektrális kariotípus

Minden kromoszómát (párt) más színű fluoreszcens próbával (vagy azok kombinációjával) jelölnek.



FISH (Fluoreszcens *in situ* hibridizáció)

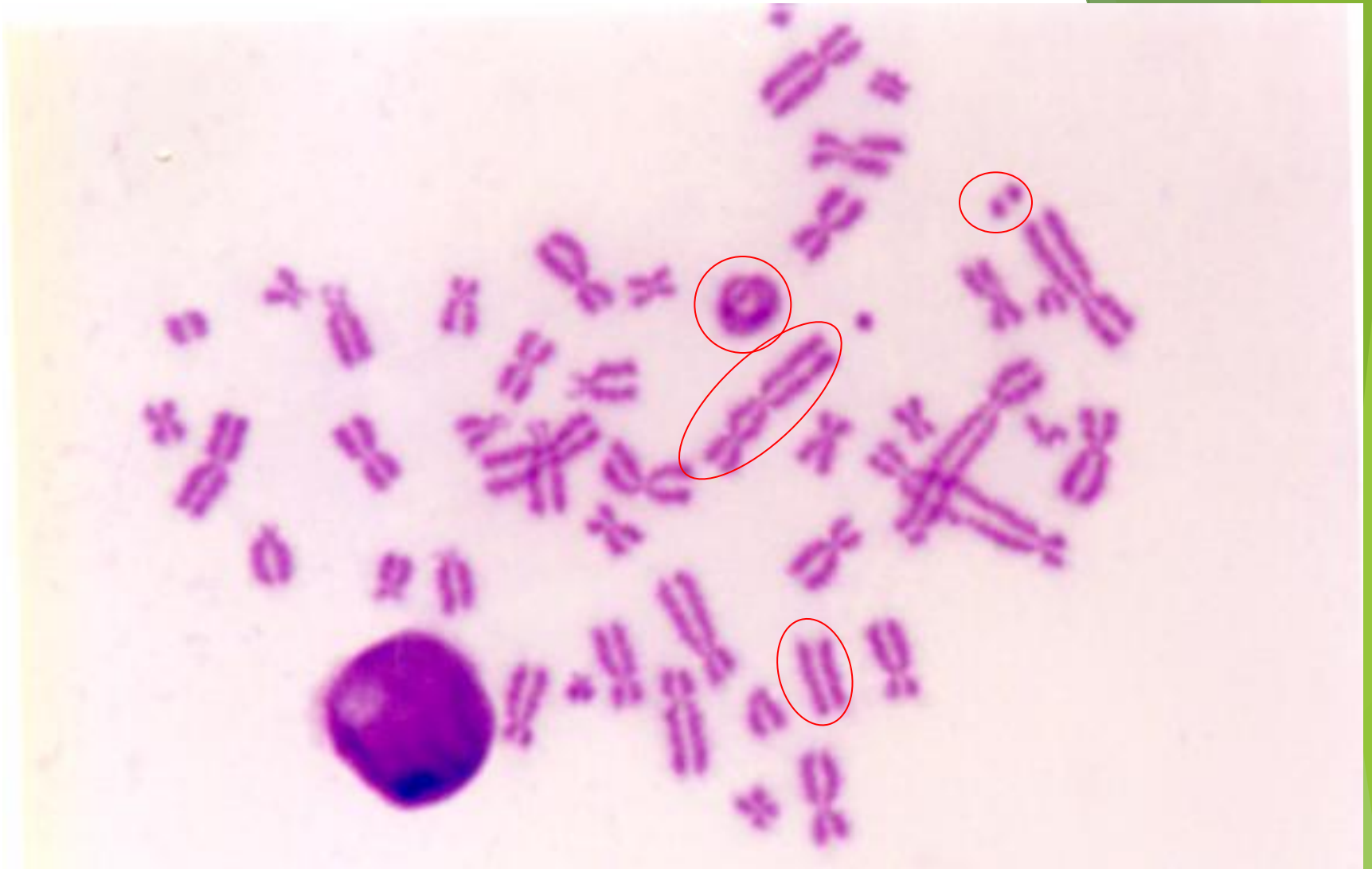
- Citogenetikai módszer
- Kromoszómák, és kromoszóma-szintű mutációk azonosítása, specifikus szakaszok helye, jelenléte, hiánya
- Fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próba, amely csak olyan DNS szakasszal hibridizál, amellyel magas fokú komplementaritást ad



Kromoszóma aberrációk kimutatása

- ▶ Kromoszóma preparátum mikroszkópos vizsgálata
- ▶ Kromoszóma aberrációs teszt (CHA)
- ▶ CHO (kínai aranyhörcsög petefészek) sejtek, humán limfocita tenyészet

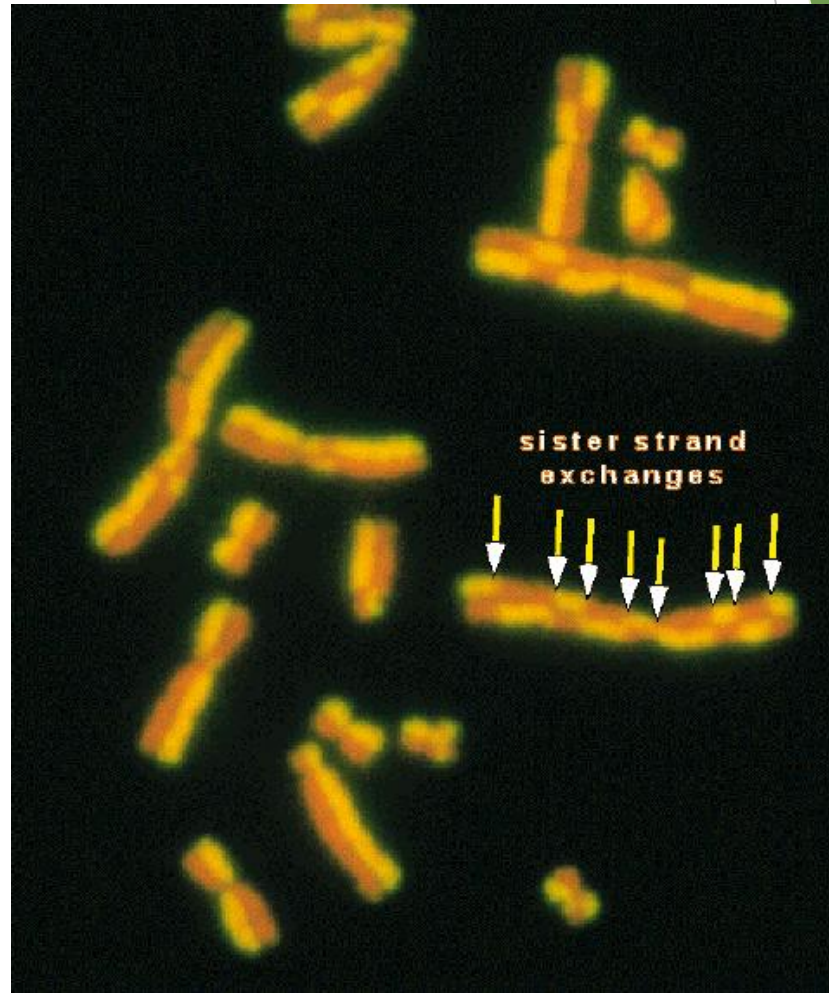
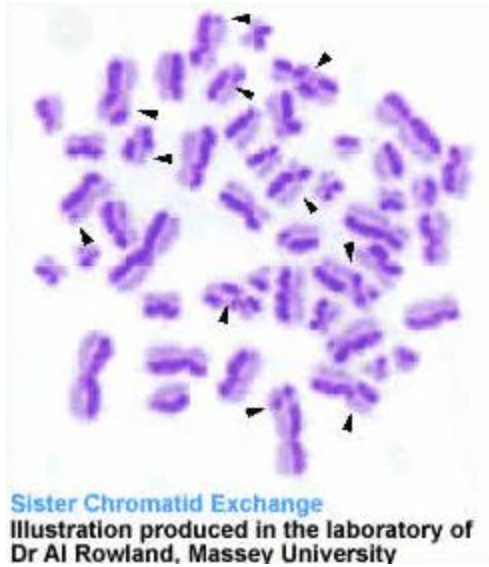
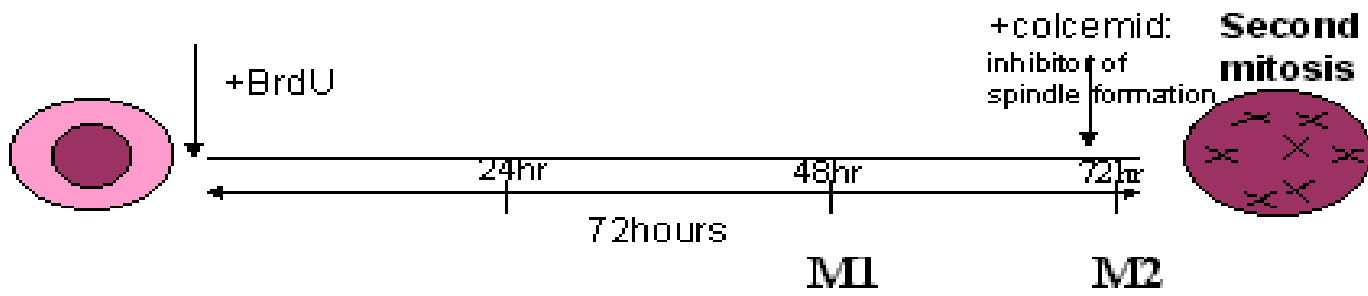
- ▶ limfocita + fitohemagglutinin -> sejtosztódást serkent, tenyésztés 48 óra
- ▶ Toxikus anyag hozzáadása, tenyésztés 17 óra (1,5 sejtciklus)
- ▶ kolchicin: mitózist metafázisban leállítja
- ▶ hipotonizálás -> kromoszóma preparátum
- ▶ Giemsa-festés

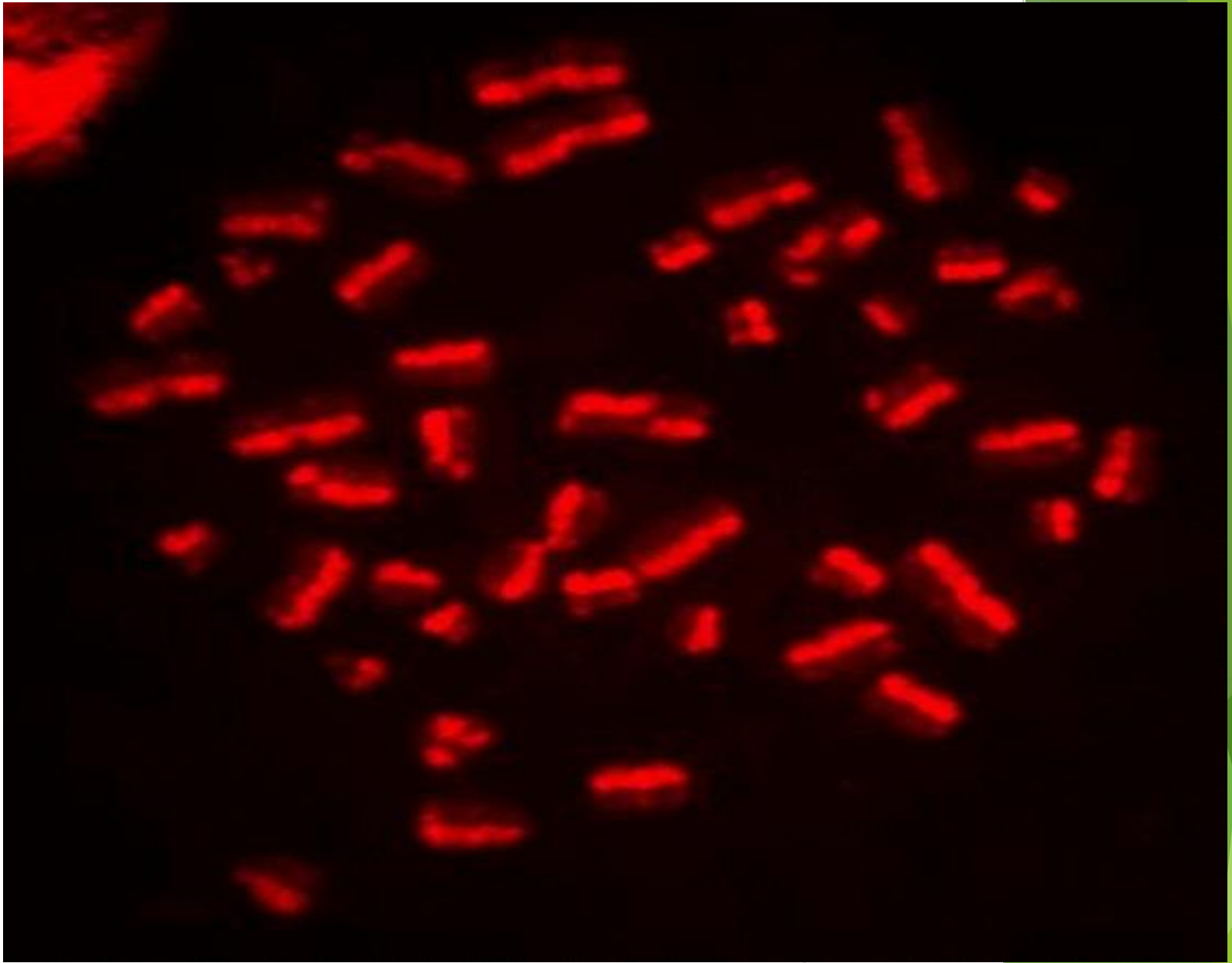


Kromoszóma aberrációk: terminális deléció, inverzió, dicentrikus, gyűrű, acentrikus fragmentum

Sister Chromatid Exchange (SCE)

- ▶ Homológ szakaszok kicserélődése testvérkromatidák között
- ▶ perifériás limfociták in vitro tenyésztése (72 óra) + BrDU (5-bromo-2'-deoxyuridine, timin analóg) beépülése
- ▶ szemikonzervatív replikáció
- ▶ második metafázisban testvérkromatidok differenciális festődése
- ▶ genotoxikus hatás -> homológ szakaszok közti kicserélődés gyakorisága
- ▶ „fluoreszcens plusz Giemsa” festés
- ▶ DNS léziók csaknem mindegyike vezethet SCE-hez





Mikronukleusz teszt (MN)

mikronukleusz:

- sejtmagként festődnek
- számfeletti kromoszómából vagy kromoszómális törtvégekből
- osztódásnál egyik utódsejtmagba sem képesek integrálódni
- mag mellett elkülönülten

vizsgálat:

- limfociták (osztódásra serkentett) *in vitro*
- teljes magosztódás után **cytochalasin-B-vel** blokkolják a sejtosztódást -> sejtek **interfázisban** -> kétmagvú sejtek
- Giemsa festés

in vivo: eritrocitákon, epiteliális sejteken (bucca, urothelium)

Sejtciklus: az eukarióta sejtben két osztódás között lejátszódó folyamat

► Interfázis

G1 vagy **G0** nyugalmi fázis

S fázis: DNS replikáció

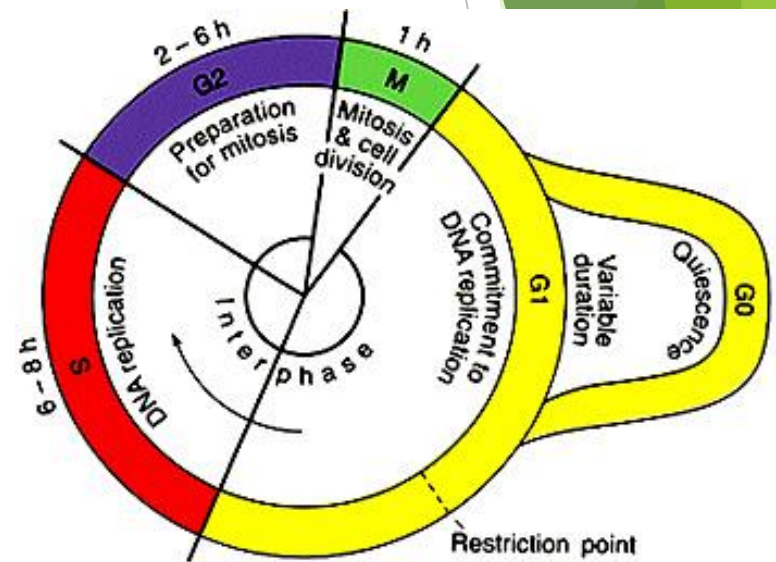
G2 fázis: felkészülés a mitózisra

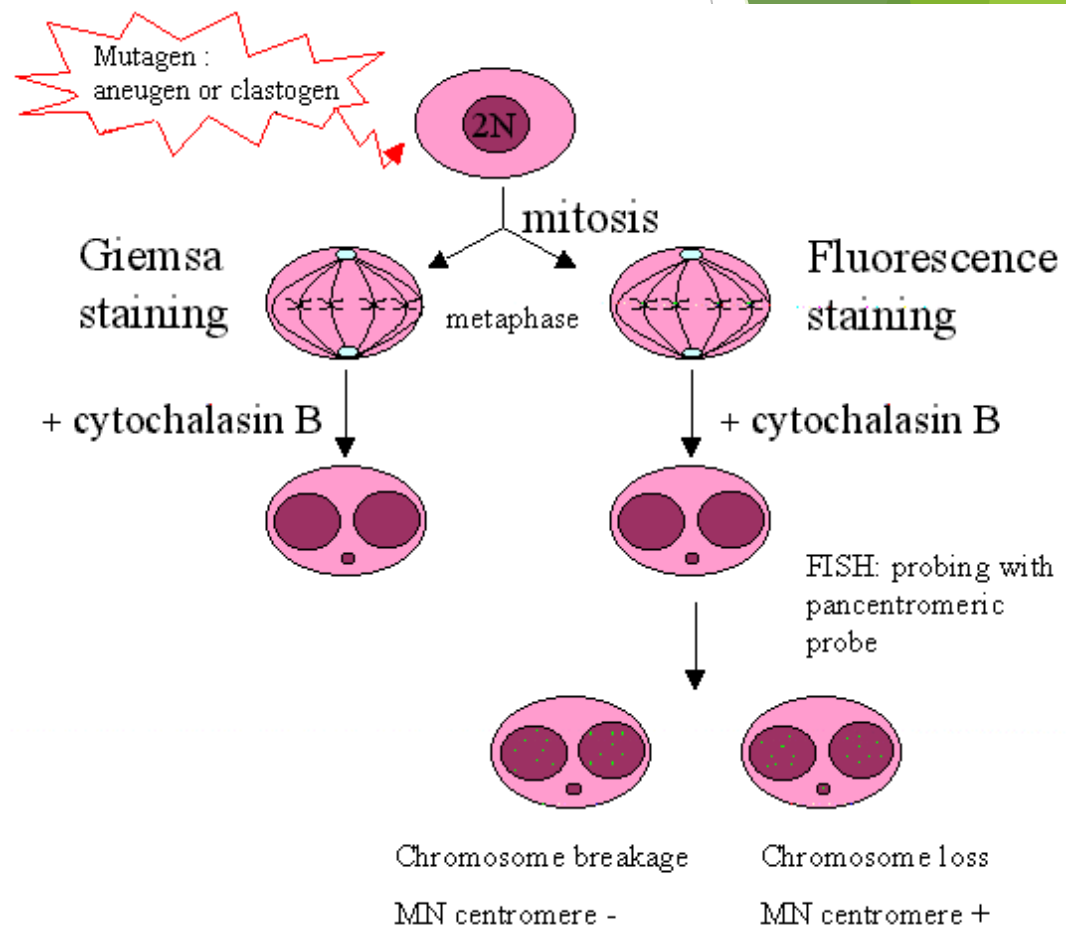
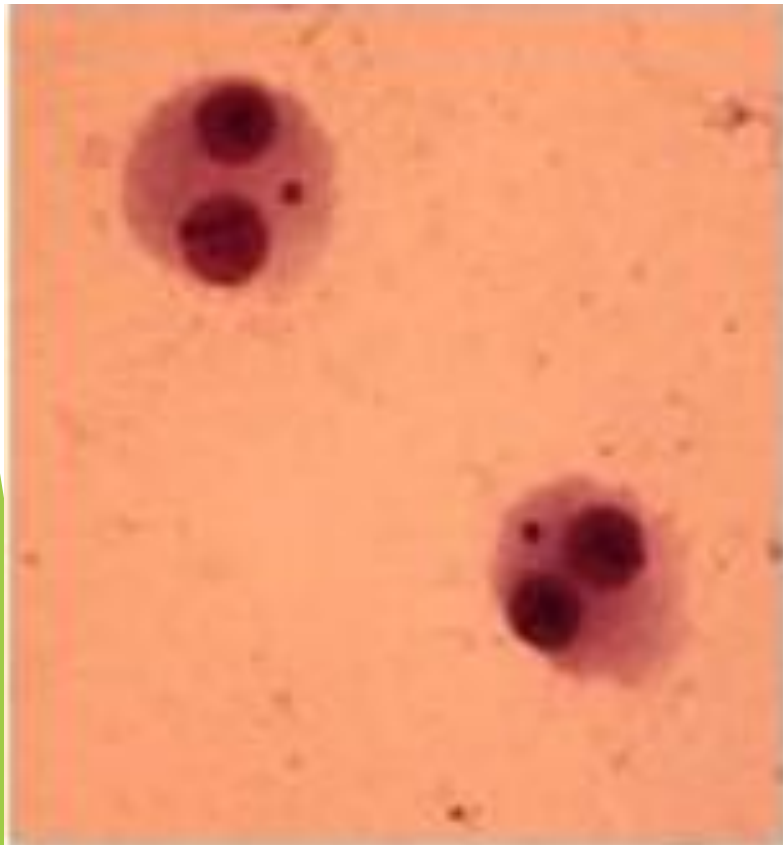
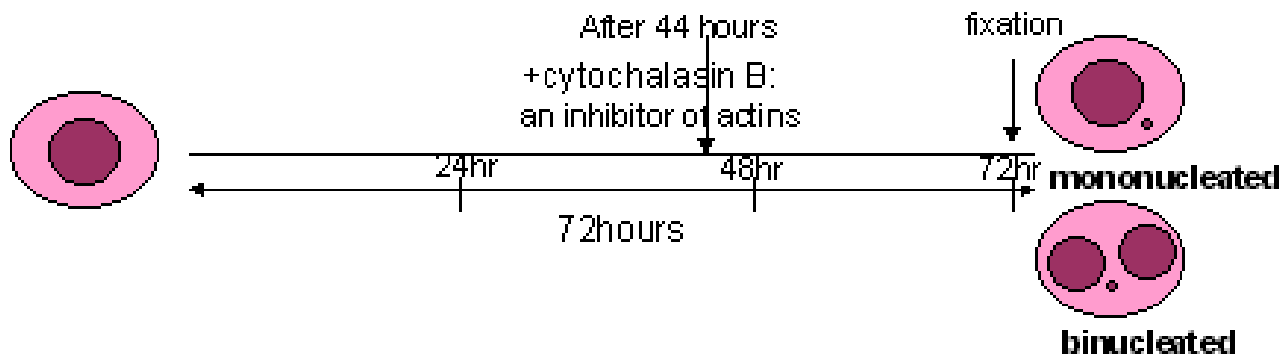
(DNS replikáció: a genetikai anyag osztódás előtti megduplázódása)

► **M fázis:** mitózis

► Kromoszómák a sejtciklus interfázisában nem figyelhetők meg, ilyenkor a DNS szanaszét, össze-vissza van gabalyodva.

► A kromoszómák a metafázisban vizsgálhatók



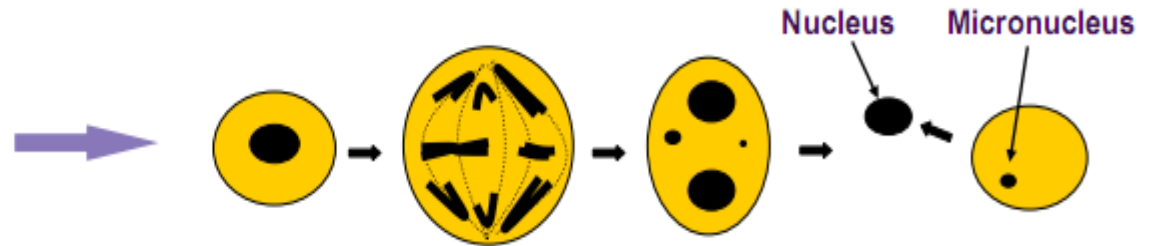


Mikronukleusz teszt (MN) *in vivo*

Rodent bone-marrow micronucleus test

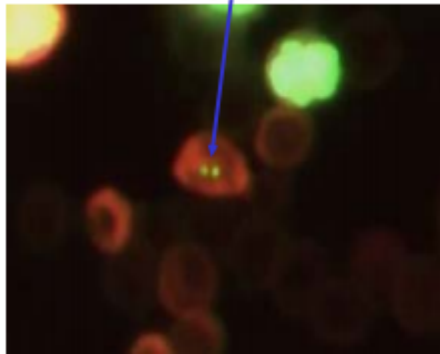


Rats/mice dosed with compound, three doses, seven animals / group. Animals sacrificed 24 or 48 hours later

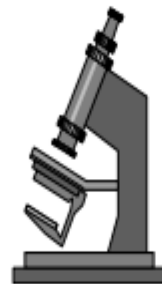


Micronuclei may be formed by loss of whole chromosome during division or by chromosome breakage. The erythrocyte's nucleus is extruded leaving any micronuclei behind

Micronucleus



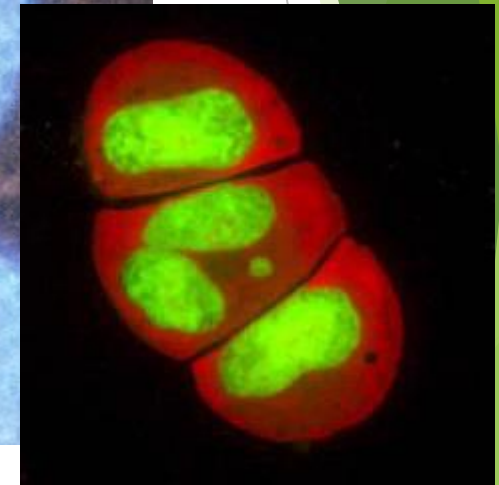
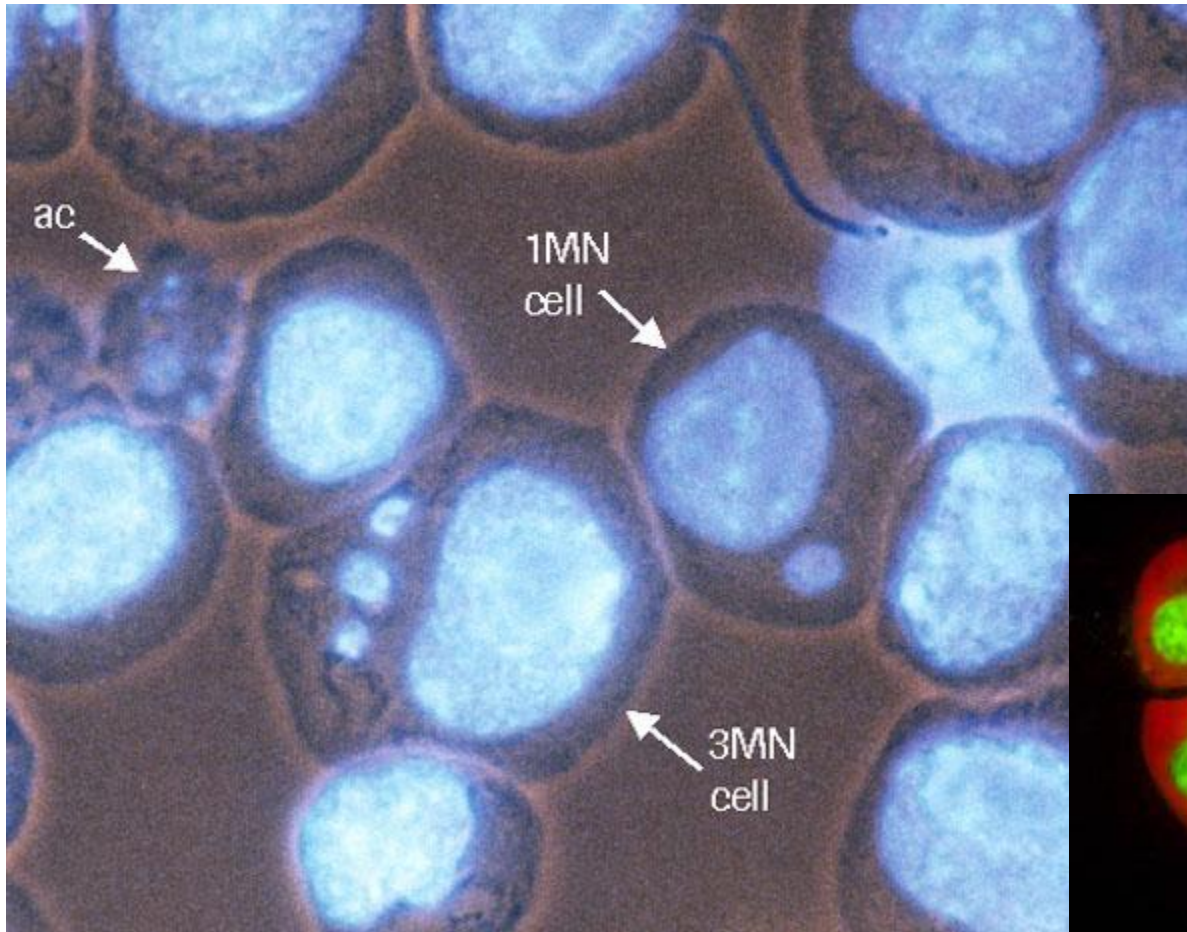
2000 cells analysed per animal, number of micronucleated immature erythrocytes scored



Bone marrow cells spread onto slides. Slides fixed and stained (acridine orange)



Femurs removed and bone marrow aspirated

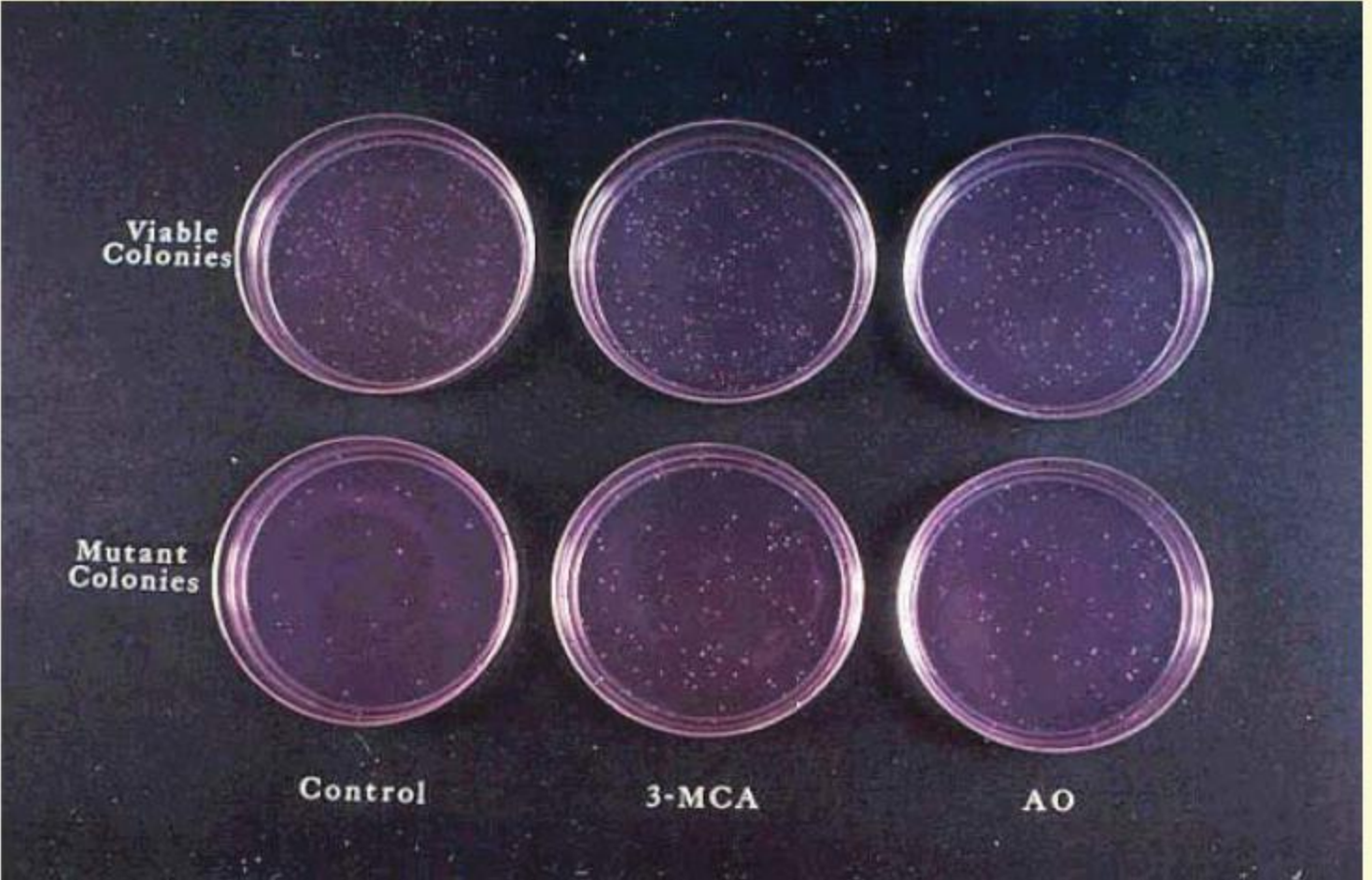


L5178Y tk^{+/-} mouse lymphoma cells after treatment with methyl methanesulfonate.
The DNA is stained with dibenzimide (fluorescence microscopy, phase contrast, 1000x magnification)
Tk: thymidine kinase, 1 MN cell: cell with one micronucleus, 3 MN cell: cell with three micronuclei, Ac: apoptotic cell

Source: Dr. Stephan Kirchner, Sabine Marget-Müller, PRNS, Roche

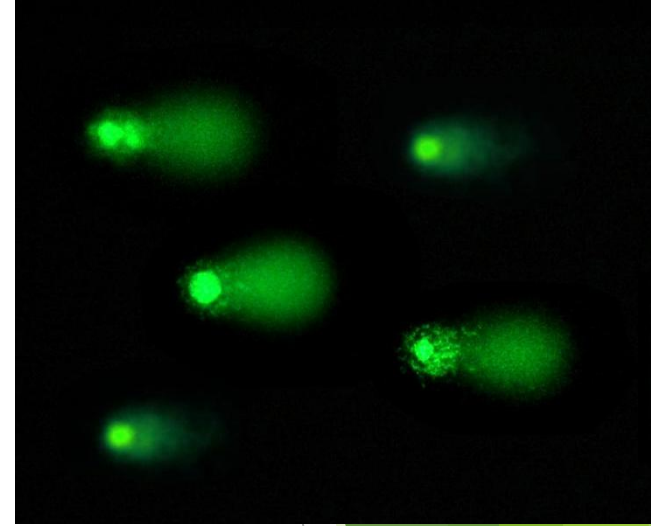
Timidin-kináz (TK) assay (MLA: Mouse lymphoma assay)

- ▶ Egér limfóma sejtek (L5178Y TK+/-)
- ▶ Timidin-kináz (TK): a timidin timidin-trifoszfáttá alakulását katalizálja (dTMP-dTDP-dTTP)
- ▶ A TK mutáns sejtek rezisztensek a pirimidin analógokra pl. trifluorotimidin (TFT).
- ▶ TK +/- sejtek kezelése a tesztanyaggal
- ▶ A mutagén hatás következtében a toxikus pirimidin analógot tartalmazó médiumban egyre több sejt él túl (TK-/-)
- ▶ Szubsztitúció, frameshift, transzlokáció, deléció, génkonverzió, aneuploidia detektálása



Comet assay

- ▶ A '80-as évek végén fejlesztették ki
- ▶ Comet = üstökös
- ▶ assay = módszer, vizsgálat
- ▶ (másnéven: Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE)
- ▶ DNS-károsodás mérése és elemzése eukarióta sejtekben (többféle minta)
- ▶ Az üstökös csóvájának mérete arányos a DNS-károsodás mértékével

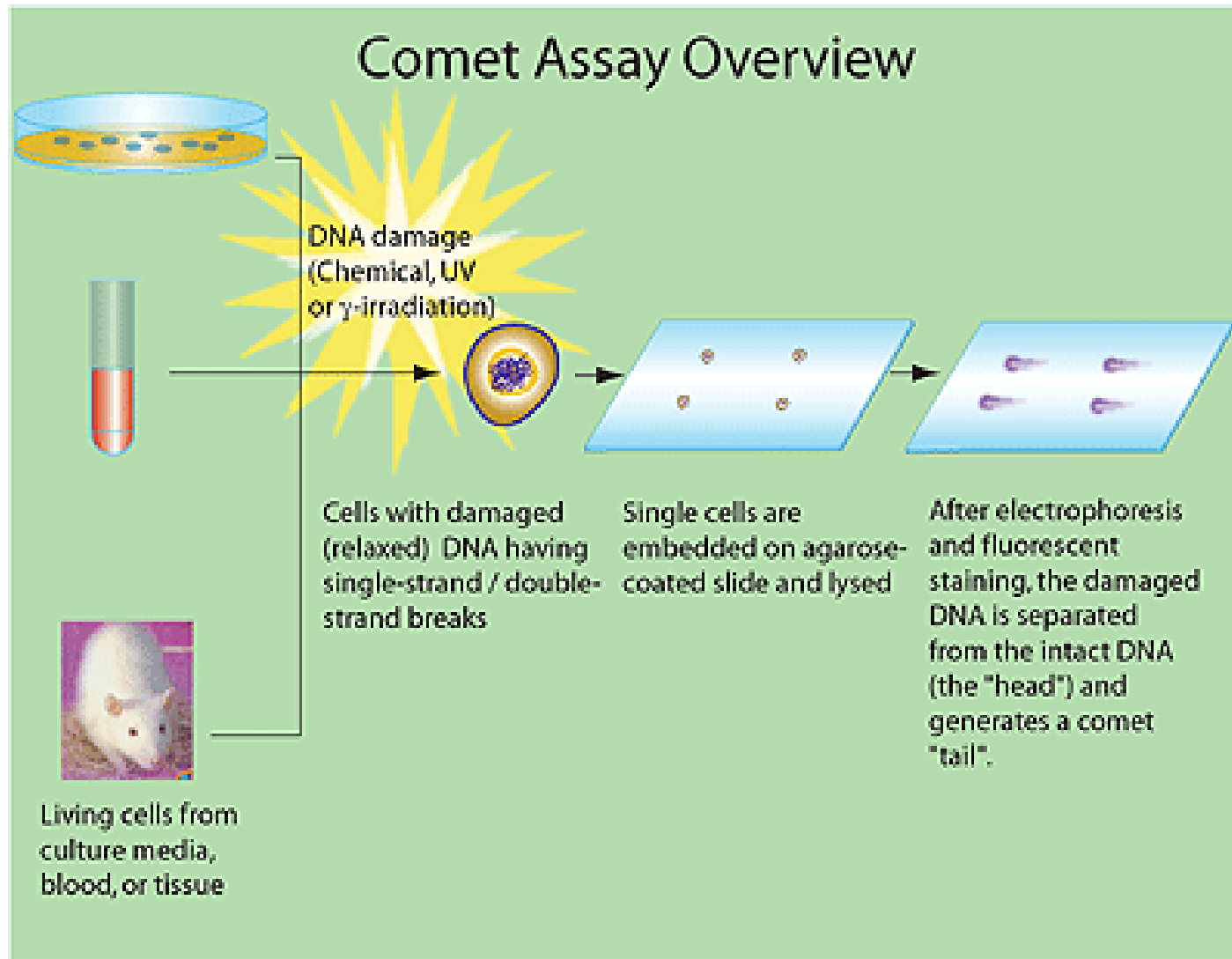


Comet assay

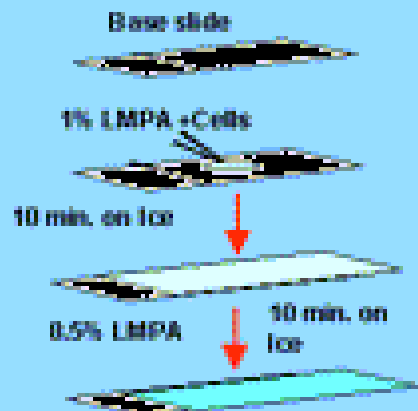
- ▶ Duplászálú törés (double strand breaks DSBs),
egyszálú törés (single strand breaks SSBs),
alkali labilis helyek, oxidatív károsodás,
keresztkötések, DNS javító mechanizmusok

- ▶ A sejteket agaróz gélbe ágyazzák, a sejteket
lizálják (fehérjék eltávolítása),
elektroforézis, festés (Hoechst, etídium-
bromid, akridin narancs, stb.)

Comet assay (*in vitro* vagy *in vivo*)



PREPARATION OF SLIDES



Single Cell Suspension

DNA Rejoining - Repair



Cells, tissues, cell line, etc.

Preparation of Slides

Neutral Lysis

Alkaline Lysis



COPLIN JAR FOR LYSIS

2hrs

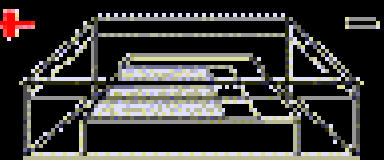
Alkaline Unwinding

Alkaline Unwinding

Double Strand Break Detection

Single Strand Break Detection

Neutral Wash



[-0.7 - 1.0 V/cm, 300mA]

Alkaline Electrophoresis

Neutral Electrophoresis

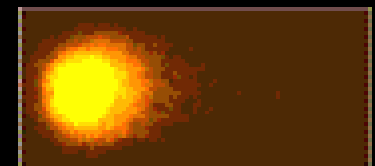
Neutralize
(0.4 M Tris, pH 7.8)

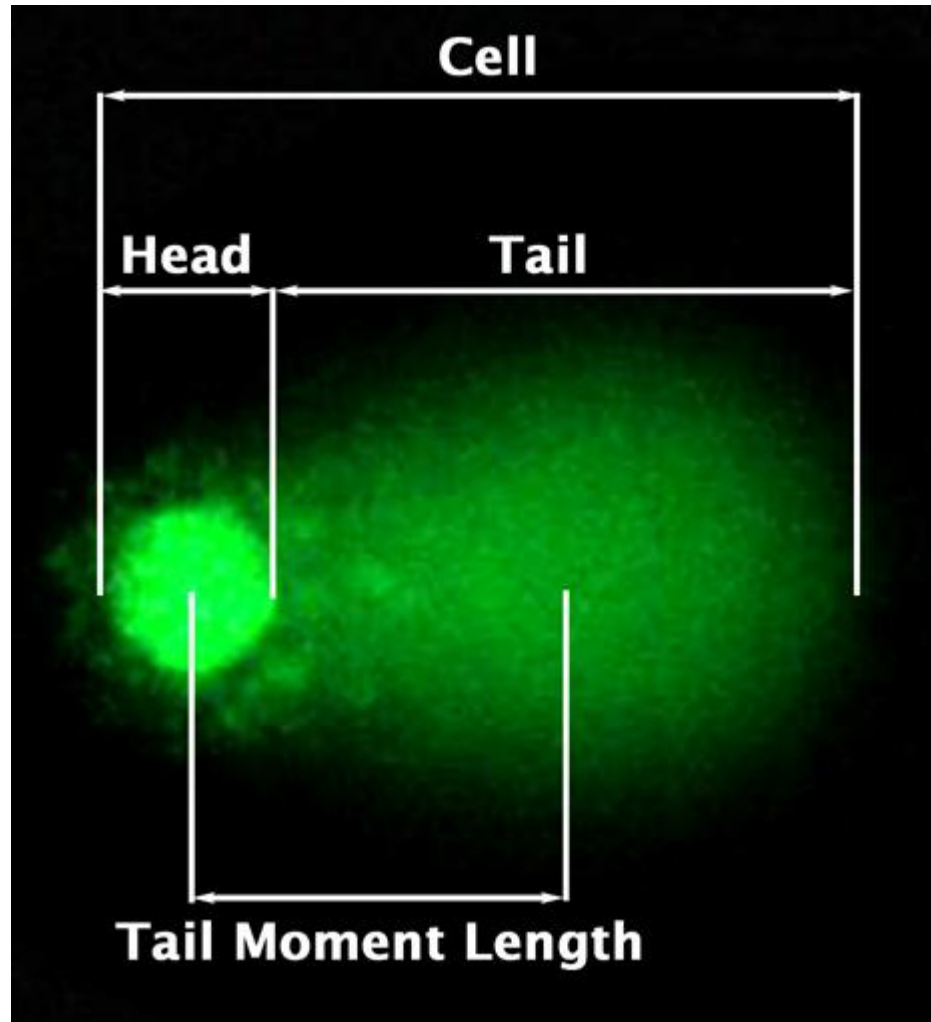
5 min., three times

Stain Slide

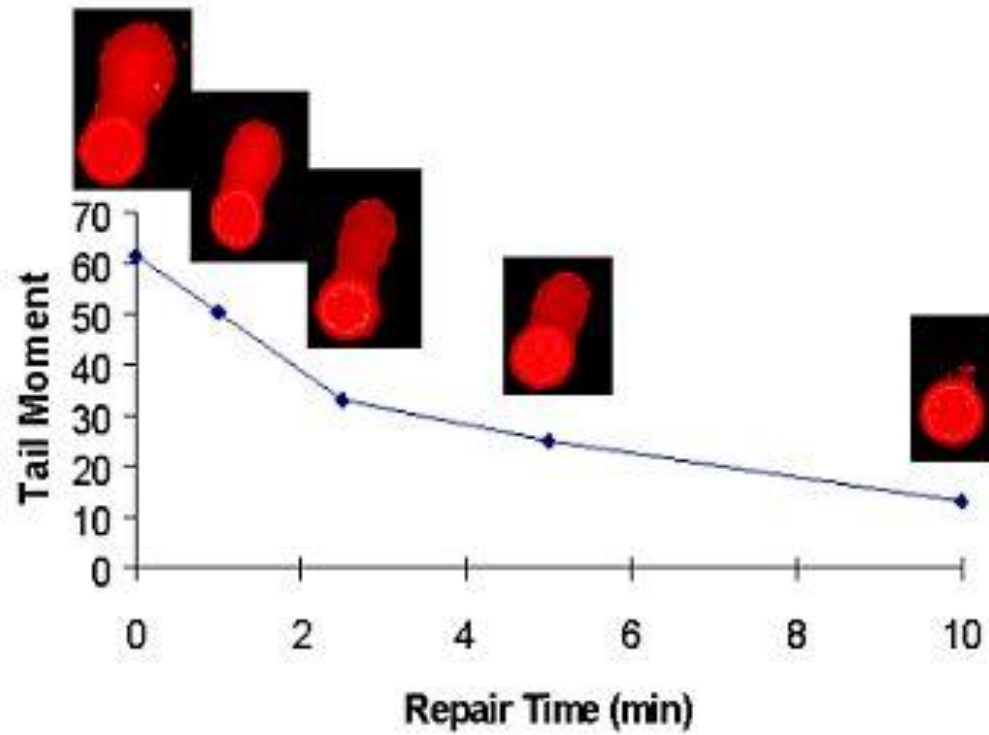
(2% DAPI, 20 µg/ml)

Image Processed





Fej:intakt DNS

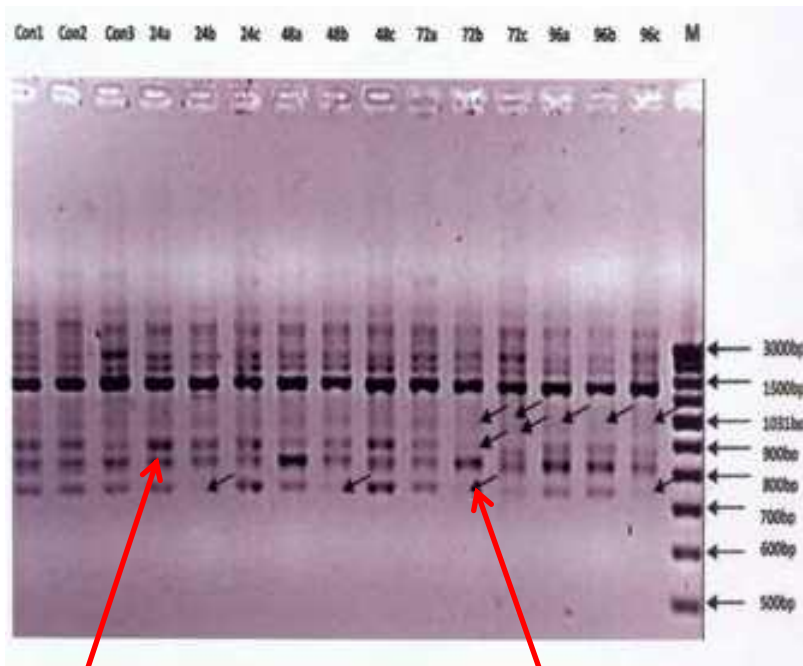


Leggyakrabban használt paraméterek

- ▶ A csóva százalékos DNS tartalma, azaz a DNS hány százaléka vándorolt el a nukleusztól.
- ▶ Olive Tail Moment: $\text{DNS}\% \times \text{DNS felhő súlypontjának távolságával}$.
- ▶ Csóva hossza, azaz a fej és az utolsó fragment távolsága.
- ▶ Csóva erőssége, azaz $\text{DNS \%} \times \text{csóva hossza}$.

A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), mint genotoxicitás vizsgálati módszer

- A RAPD technikával a DNS károsodása és mutációk is azonosíthatók.
- A kiértékelés alapja a kezeletlen és a különböző koncentrációjú tesztoldatokkal kezelt minták DNS profiljának összevetése.
- A különbségekből következtethetünk a károsodás mértékére.



Sok fragmentből áll

Hiányzik egy fragment

In vivo genotoxicitás tesztek

Növényeken végzett tesztek

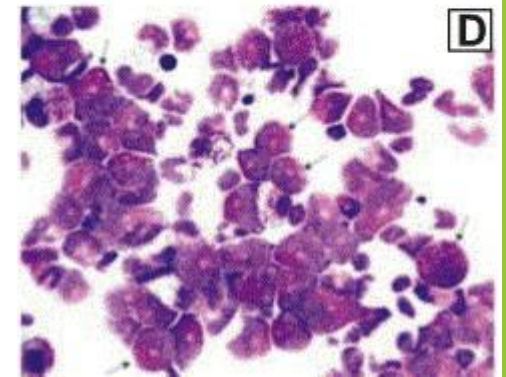
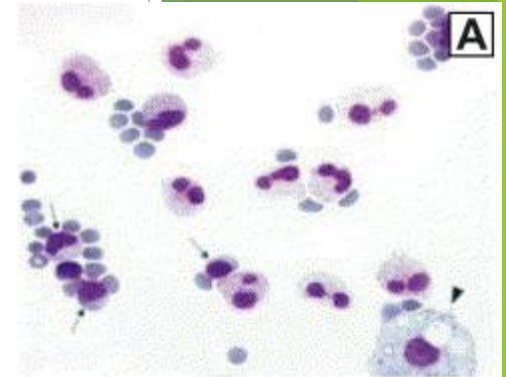
- ▶ kromoszóma abberációk és mikronukleusz teszt, Sister Chromatid Exchange (SCE) vizsgálat
- ▶ hagyma (*Allium cepa*), lóbab (*Vicia faba*), árpa (*Hordeum vulgare*), vékony zörgőfű (*Crepis capillaris*), pletyka (*Tradescantia*), dohány (*Nicotiana tabacum*)...
- ▶ gyökércsúcs



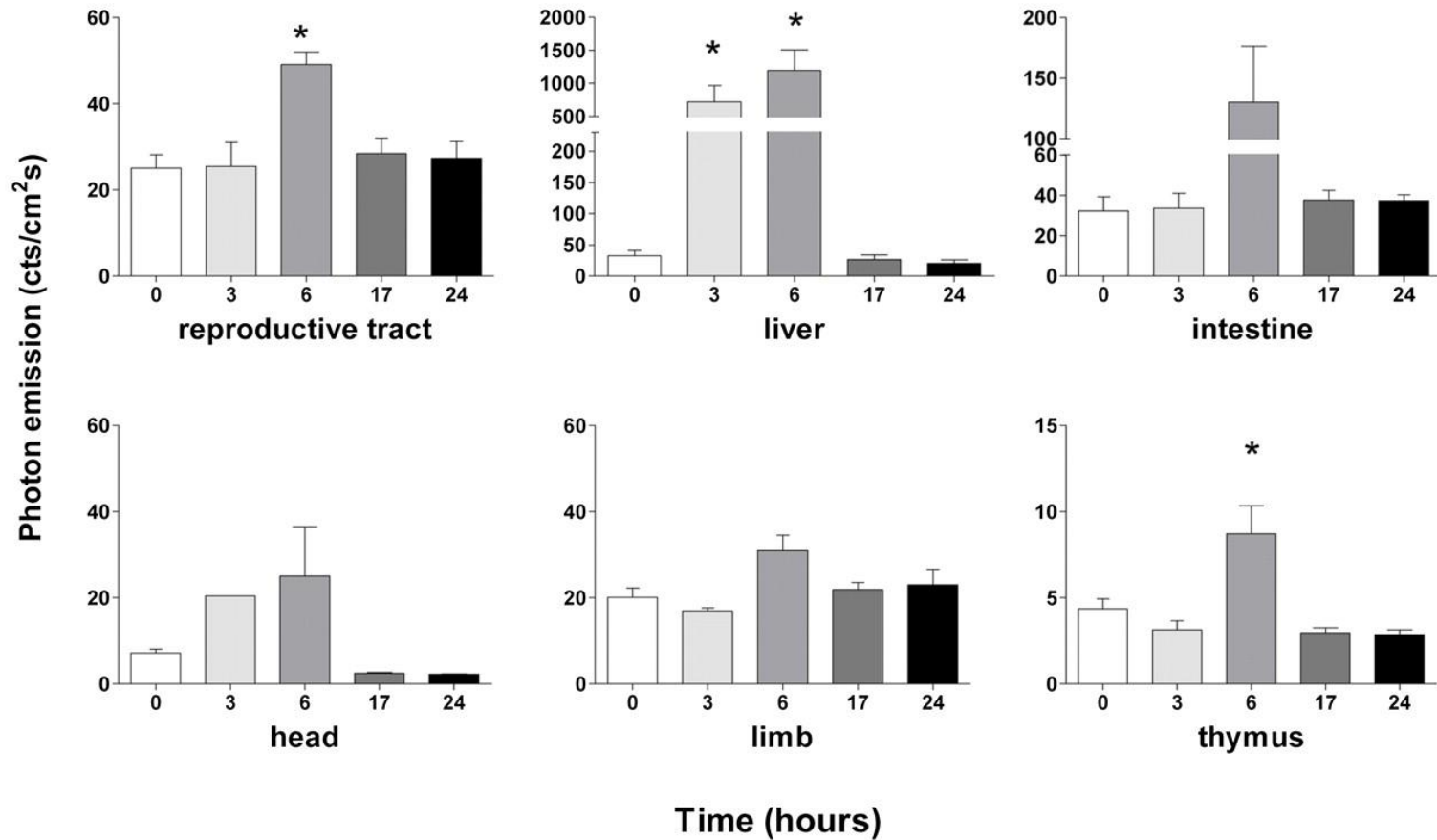
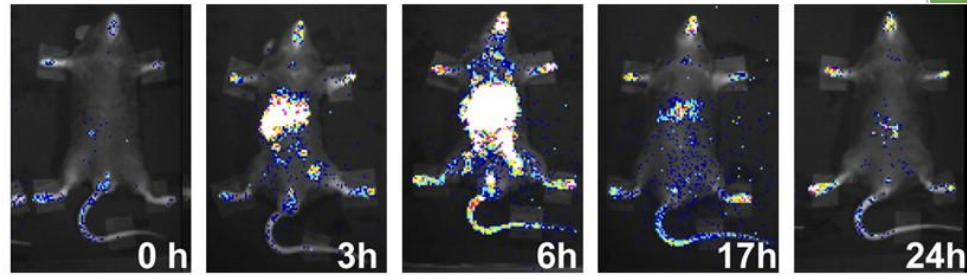
In vivo genotoxicitás tesztek

Állatokon végzett tesztek

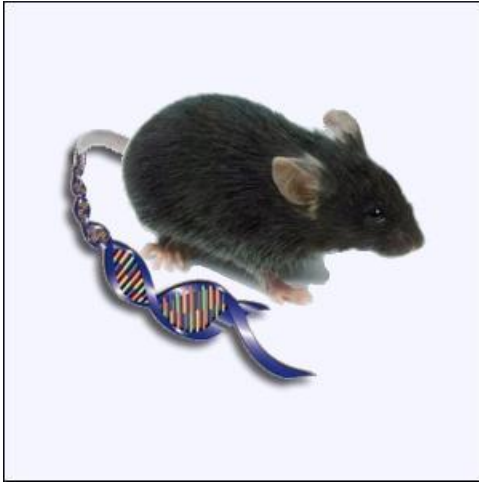
- ▶ kromoszóma abberációk és mikronukleusz teszt, Sister Chromatid Exchange (SCE) vizsgálat, transzlokációs teszt, nem tervezett DNS-szintézis (UDS- Unscheduled DNA synthesis=sejtek nukleotid excision repair aktivitása)
- ▶ Emlősök (főleg rágcsálók)
- ▶ Ivarsejtek, vérsejtek, csontvelő, máj
- ▶ Transzgenikus állatok



17 β -estradiol (10 μ g/kg)

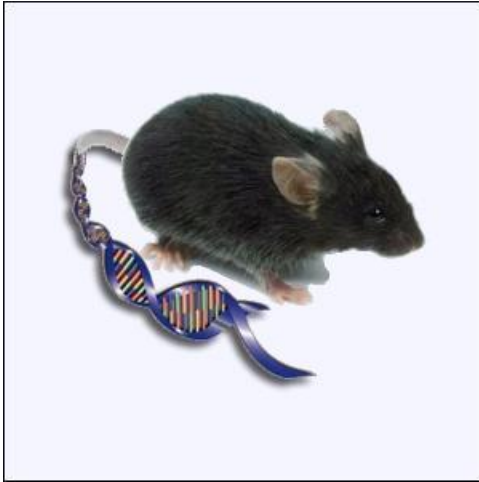


Egéren végzett örökletes transzlokációs vizsgálat



- ▶ az első utódnemzedék szerkezeti és számbeli kromoszómaváltozásait mutatja ki (reciprok transzlokáció és - ha nőstény utódokat is vizsgálunk - az X-kromoszóma-vesztés)
- ▶ A transzlokáció-hordozók és az XO-nőstények csökkent termékenységgel rendelkeznek, ezen állatokat az F1 utódnemzedékből ennek alapján válogatjuk ki a citogenetikai elemzéshez. Bizonyos transzlokáció-típusok teljes sterilitást eredményeznek. A transzlokációk citogenetikai vizsgálattal hím állatok (vagy F1 hímek vagy F1 nőstények hím utódai) meiotikus sejtjeiben a metafázisban figyelhetők meg. Az XO-nőstények a csontvelői sejtek mitózisa során megfigyelhető, mindössze 39 kromoszóma jelenléte alapján azonosíthatók.

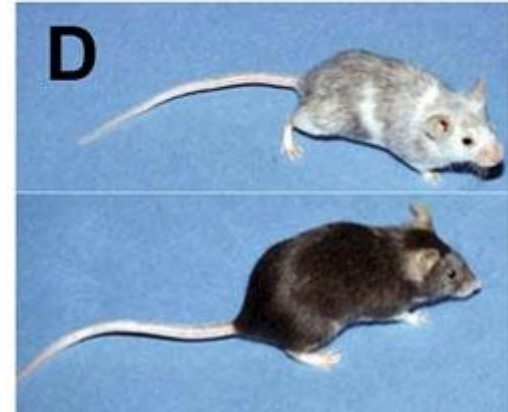
Egérfolt (mouse spot) teszt



- ▶ fejlődő embriókat kezelnek
- ▶ Célszövetek: melanoblasztok
- ▶ Célgének: a hátszőrzet pigmentációjáért felelős gének.
- ▶ A fejlődő embriók több ilyen, a szőrszint kódoló génre heterozigóták.
- ▶ Ha mutáció következik be, vagy elvész a domináns allél, az utódsejtben a recesszív fenotípus jelenik meg, így a születő egér szőrzete egy foltban eltérő színű lesz.
- ▶ A mutáns egerek gyakoriságát összehasonlítják a csak oldószerrel kezelt embriókból keletkező utódnemzedékben előforduló foltosodási gyakorisággal.
- ▶ Magzati sejtek feltételezett szomatikus mutációinak kimutatására alkalmas.

Egérfolt teszt

- ▶ A vemhesség 8., 9., 10. napján kezelnek.
- ▶ fehér foltok a hasfal középvezonától számított 5 mm-en belül: sejtpusztulás (WMVS);

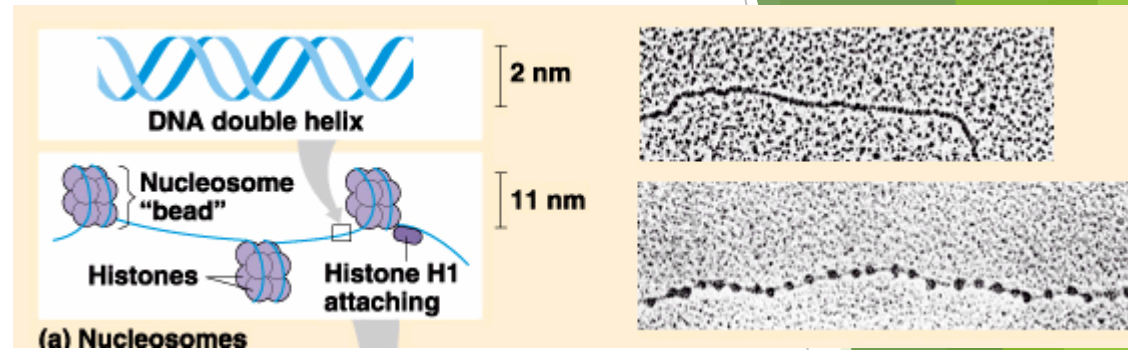


- sárga, agouti-szerű foltok az emlők, a nemi szervek, a torok, a váll és a lágyék területein, valamint a homlokon: hibás differenciáció (MDS)
- pigmentált és fehér foltok véletlenszerűen, elszórtan a szőrzeten: szomatikus mutáció (RS)

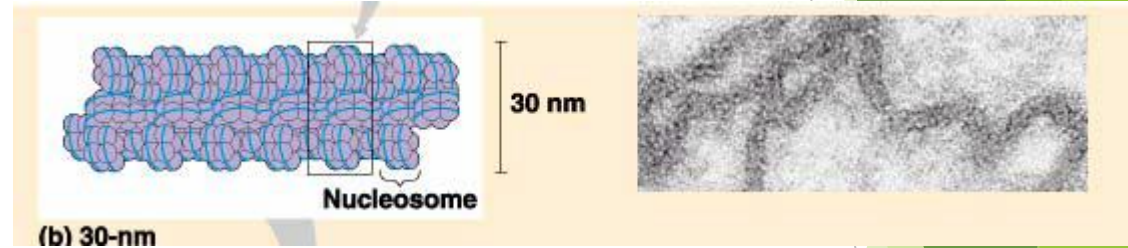
Génkifejeződés alapfogalmak.
RNS, cDNS. PCR,
gélelektroforézis, real-time
PCR, microarray,
transzkriptóma analízis, whole
mount in situ hibridizáció I.

A kromatin állomány szerveződése

Nukleoszóma



Szolenoid



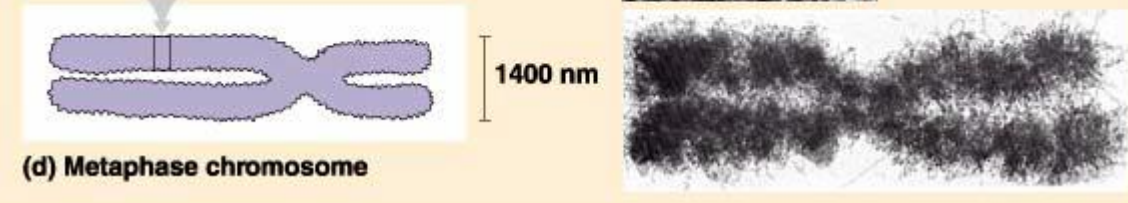
Hurok struktúra



Kromatinköteg



Kromoszóma



Mutációk típusai

- ▶ A **gén** vagy pont mutációk, amelyek a génnek csak kis szakaszát érintik

(1) báziscsere

(2) bázisok számának változása.

(pontmutáció, deléció, inszerció, duplikáció, inverzió)

- ▶ A **kromoszómák** strukturális mutációi, a kromoszóma törések utáni genetikai információ átrendeződése révén alakulnak ki (kromoszóma aberrációk).

(deléció, inszerció, duplikáció, inverzió, transzlokáció)

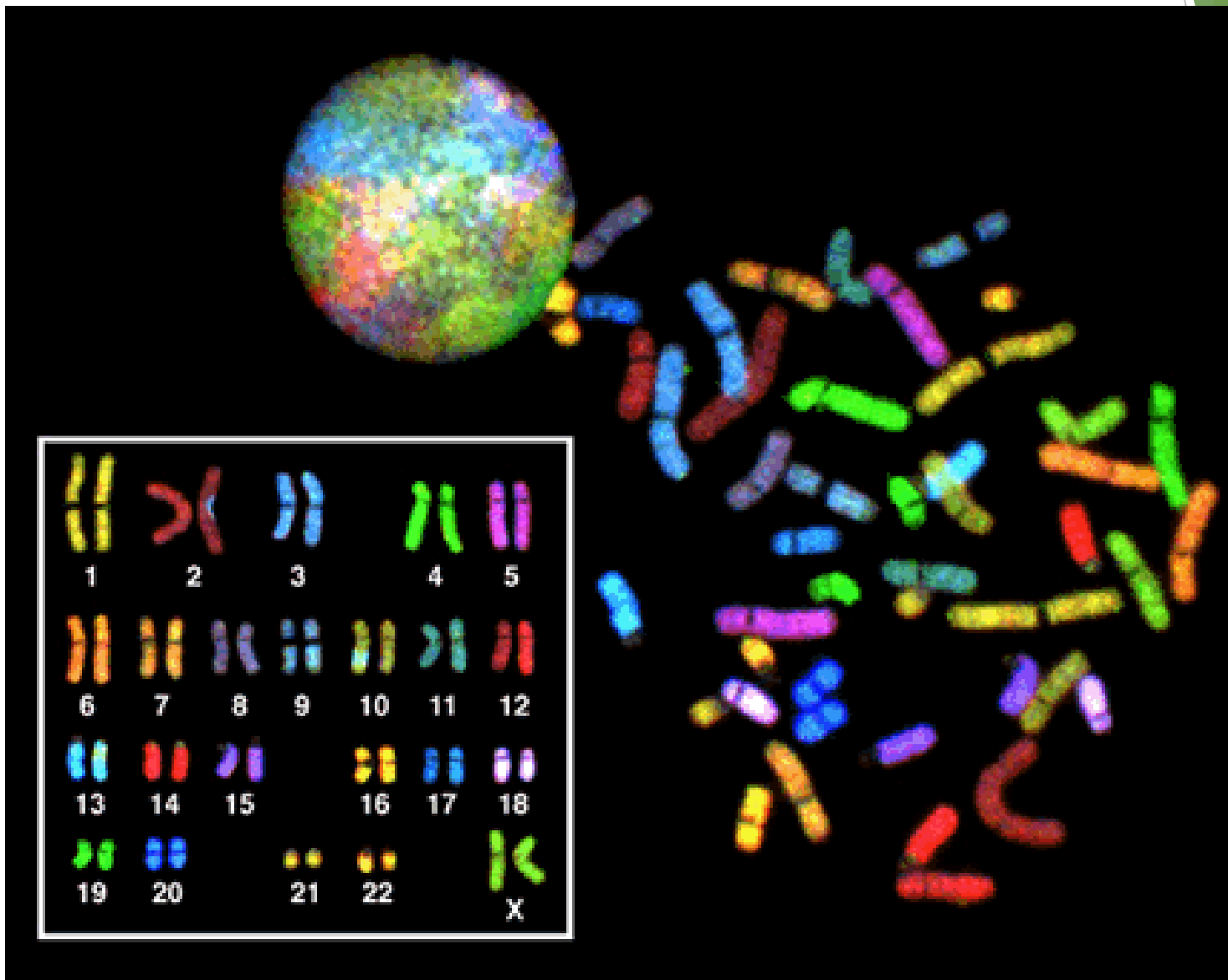
Mutációk típusai

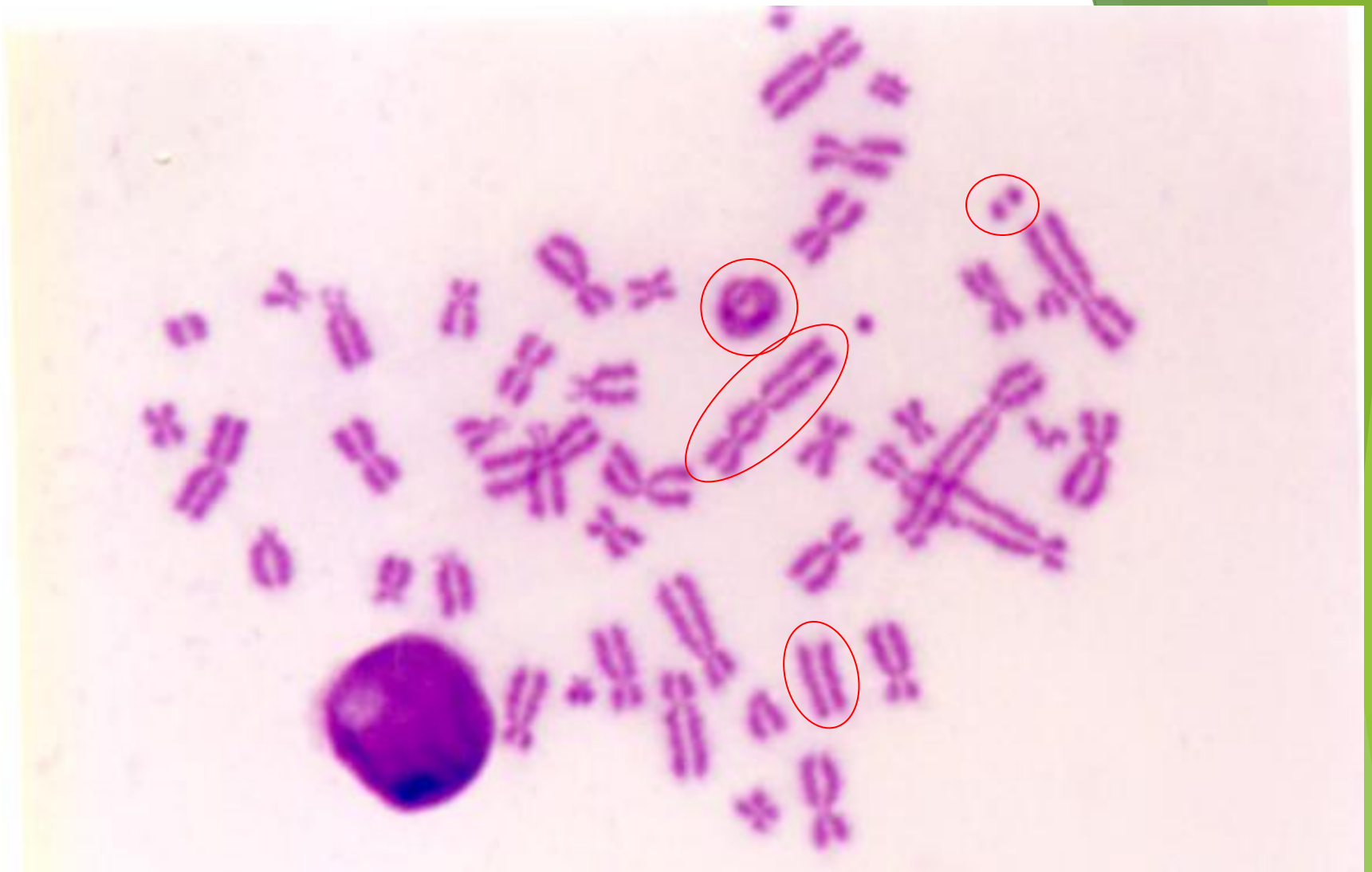
- ▶ **Genom mutációk:** A kromoszómák számbeli mutációi. Az örökítő anyag mennyiségének változásait idézik elő.

(1) Euploidia: A sejtek kromoszóma készlete a haploid kromoszóma készlet egész számú többszörösére nő vagy csökken ($2n$ -ből $3n$, $4n$, stb. lesz)

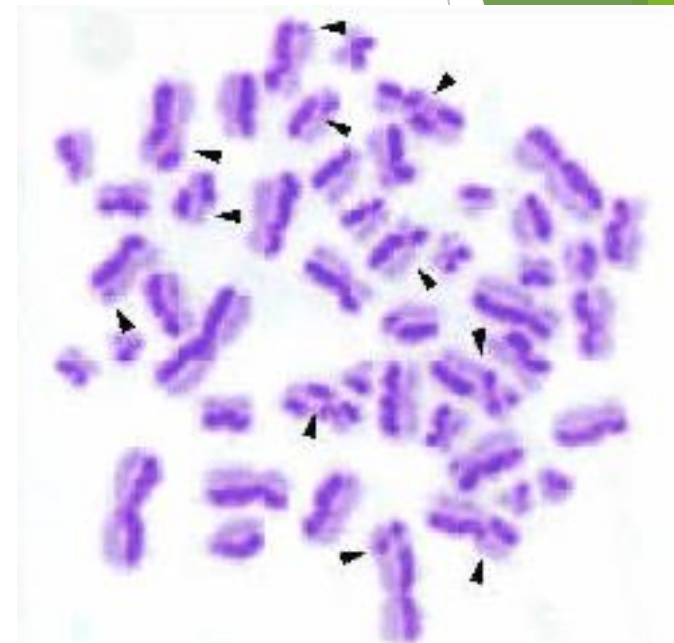
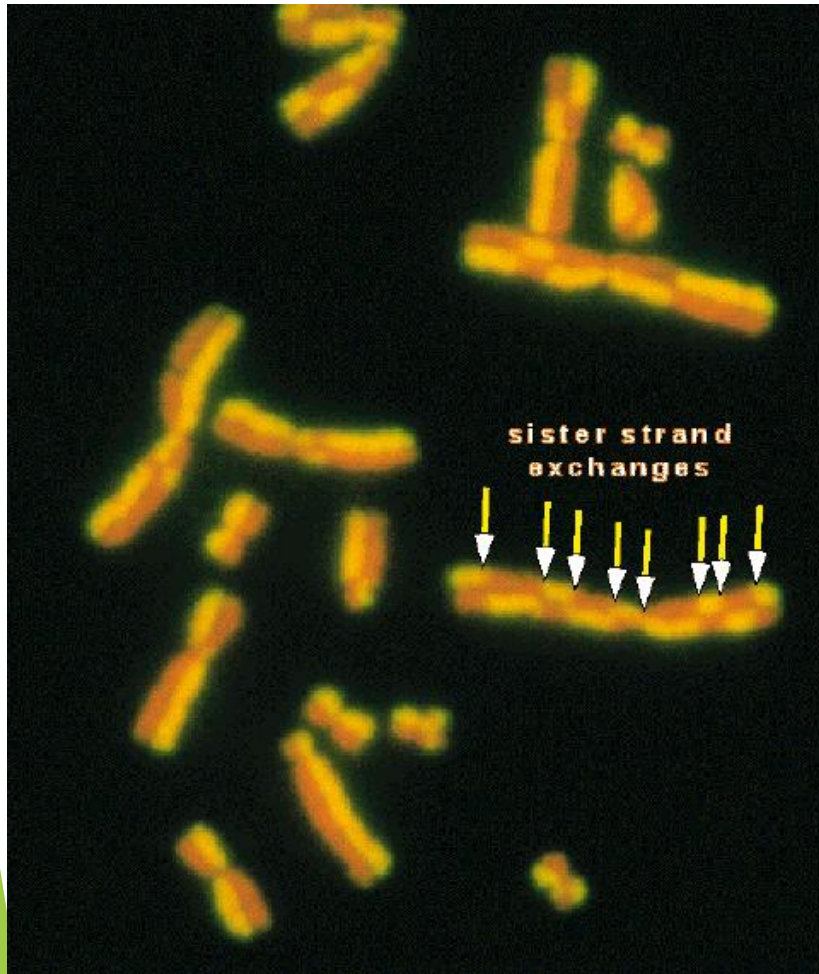
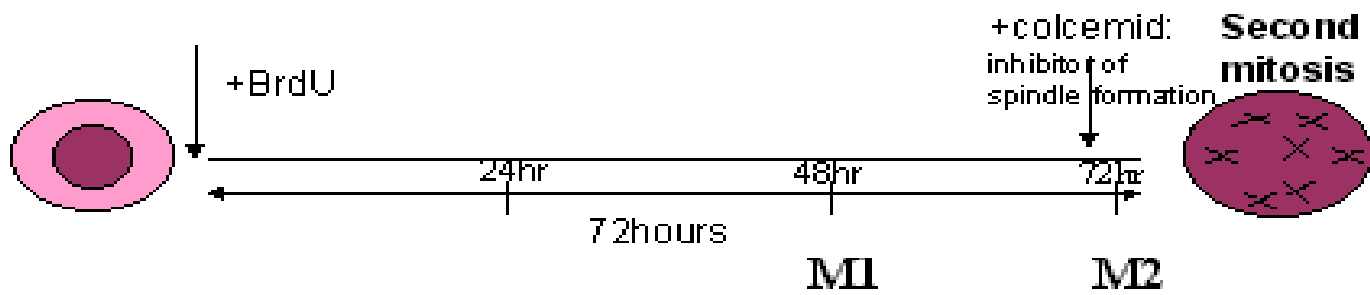
(2) Aneuploidia: A sejtek kromoszóma száma általában eggyel nő vagy csökken ($2n$ -ből $2n+1$ lesz).

► Kariotípus és kariogram



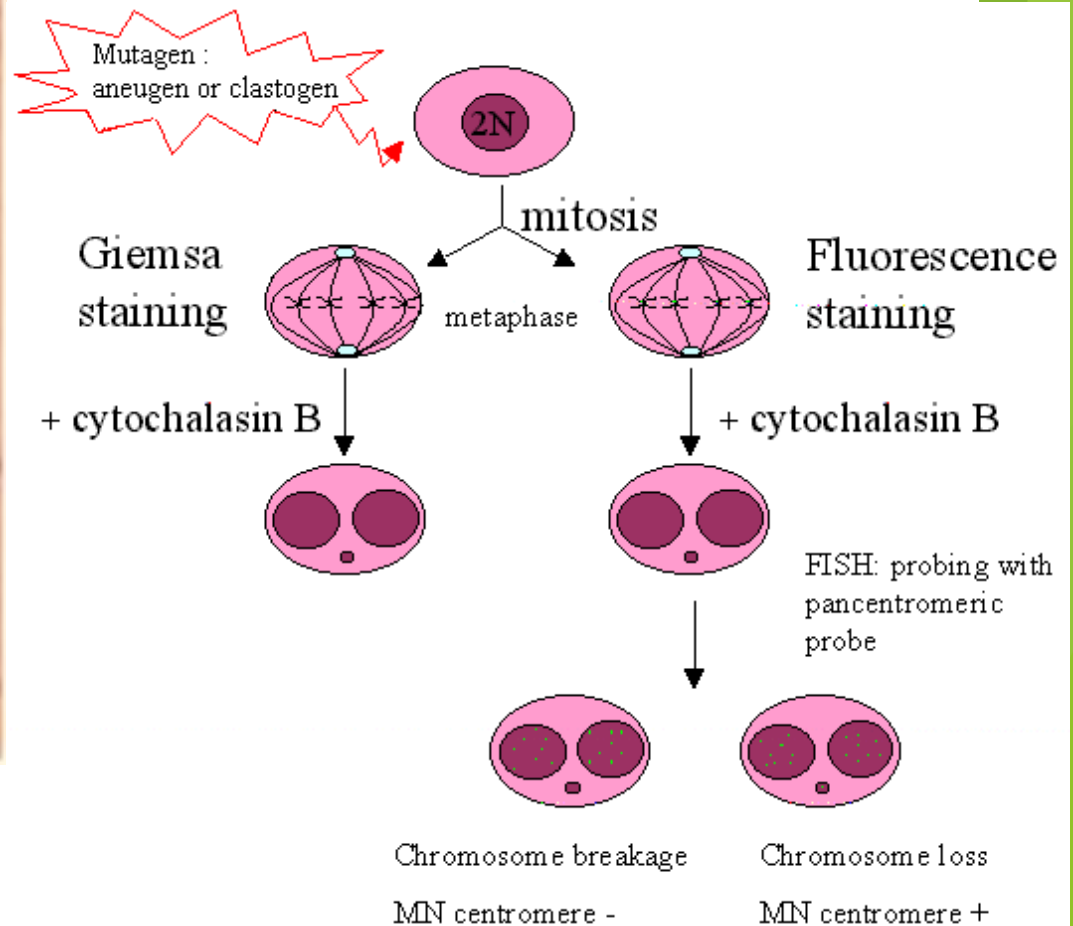
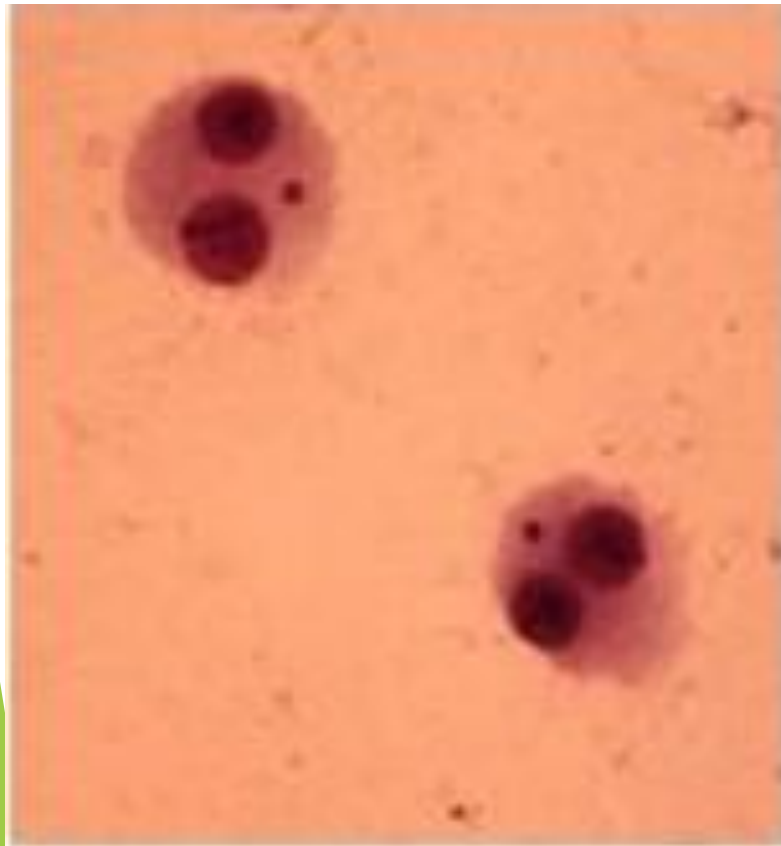
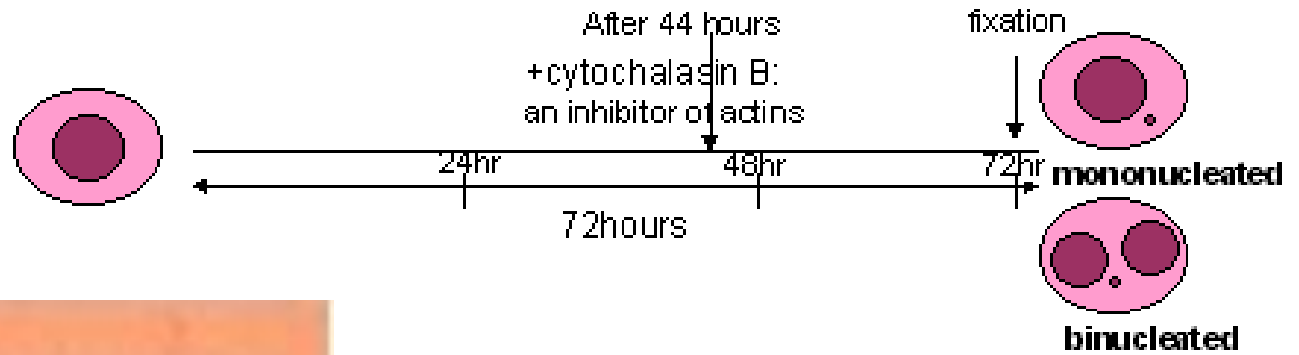


Kromoszóma aberrációs teszt: terminális deléció, inverzió, dicentrikus, gyűrű, acentrikus fragmentum

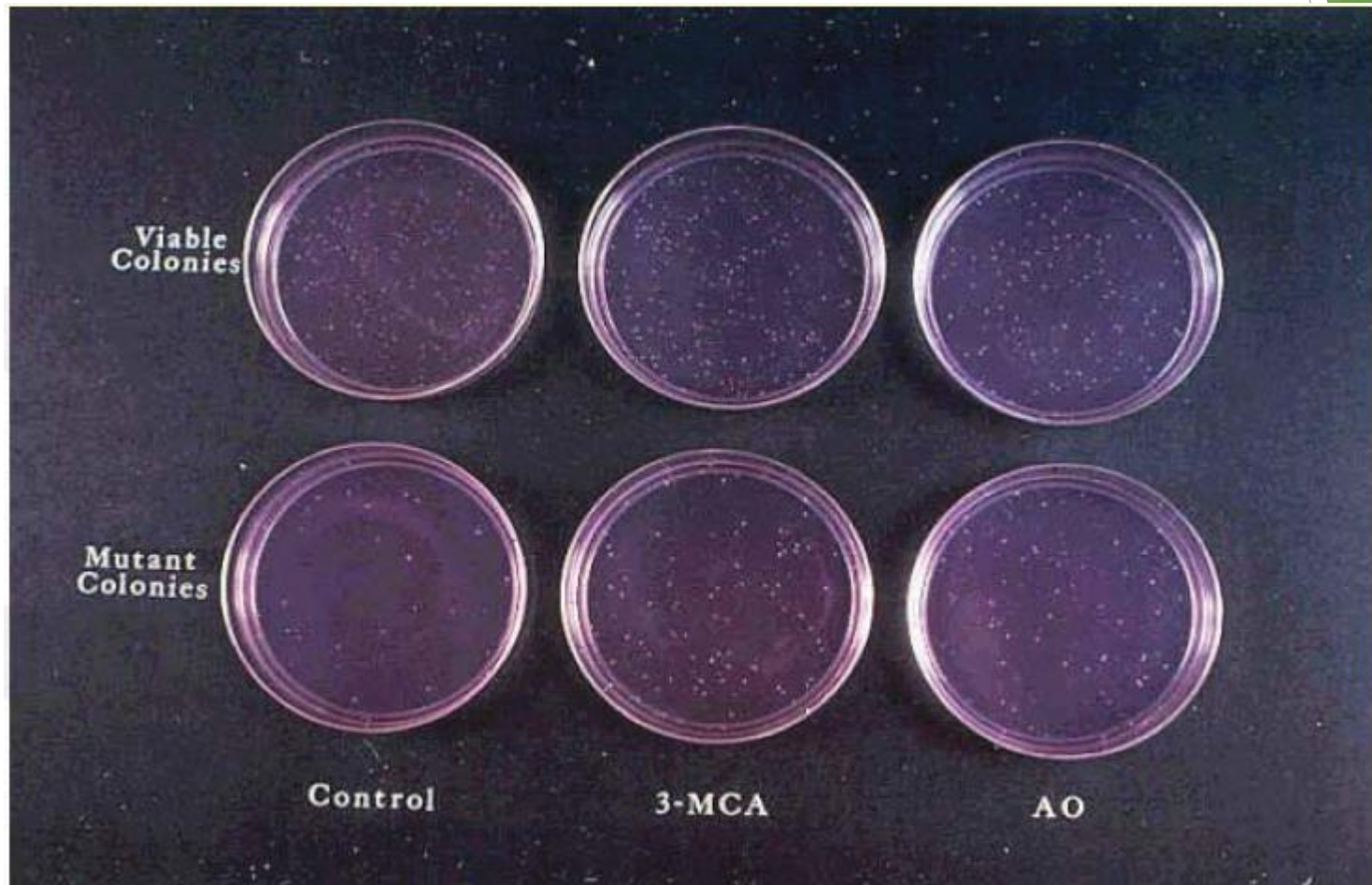


Sister Chromatid Exchange
 Illustration produced in the laboratory of
 Dr Al Rowland, Massey University

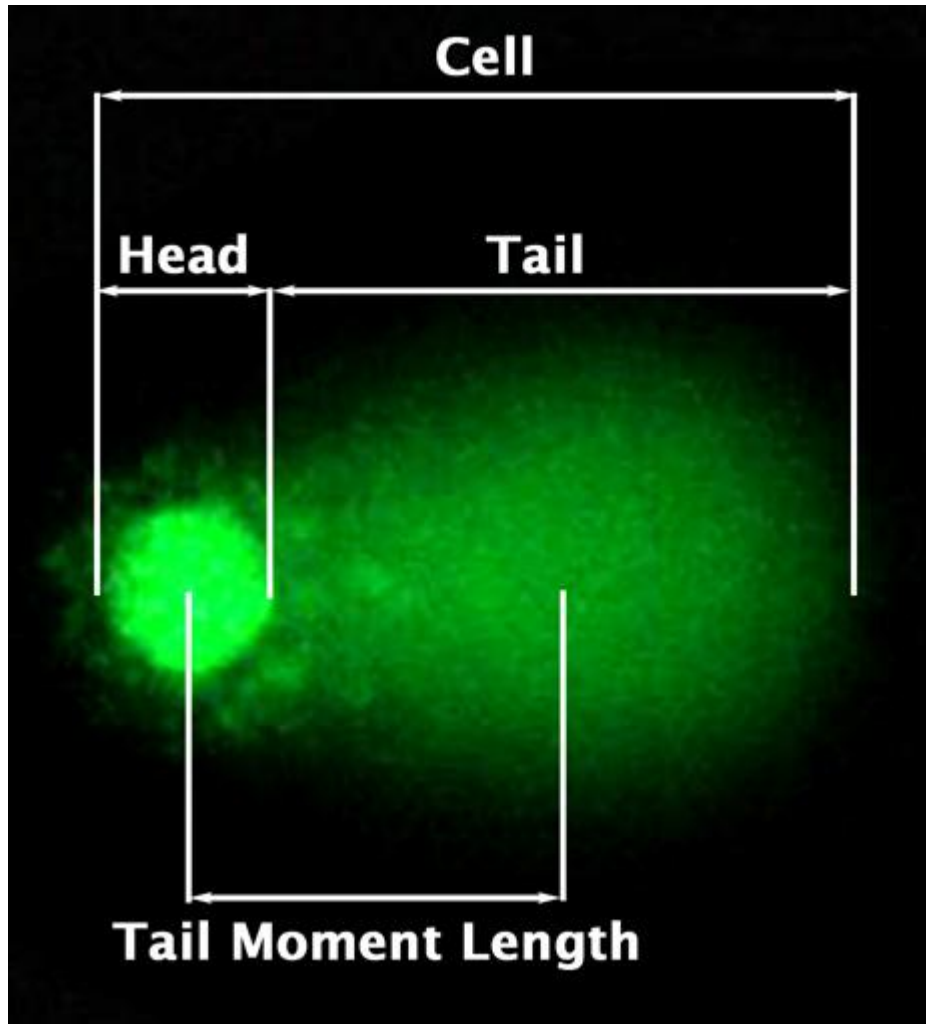
Mikronukleusz teszt



Timidin-kináz assay



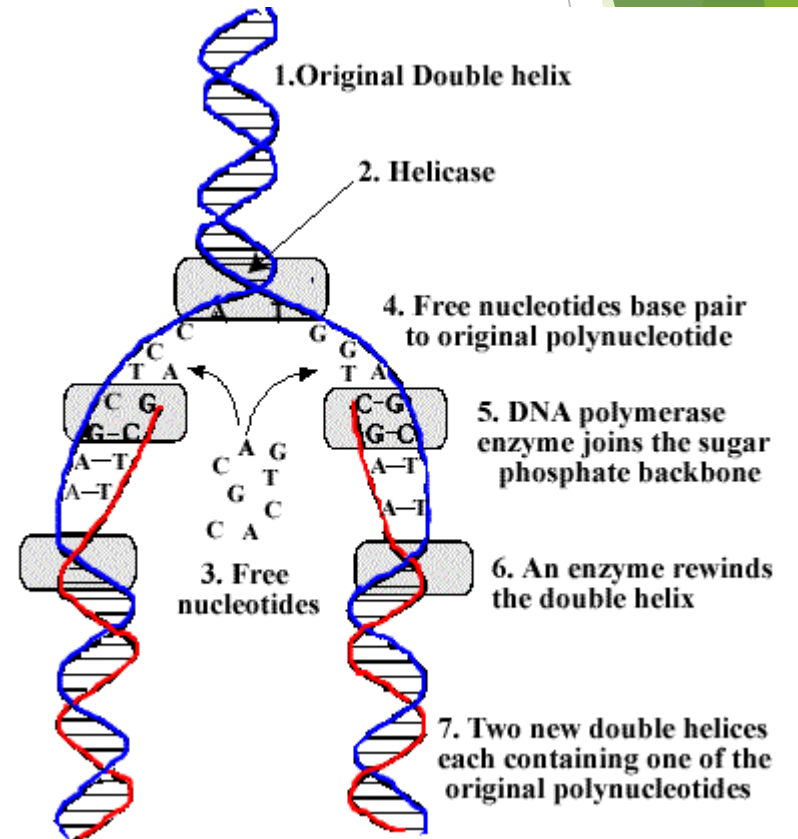
Comet assay



Fej:intakt DNS

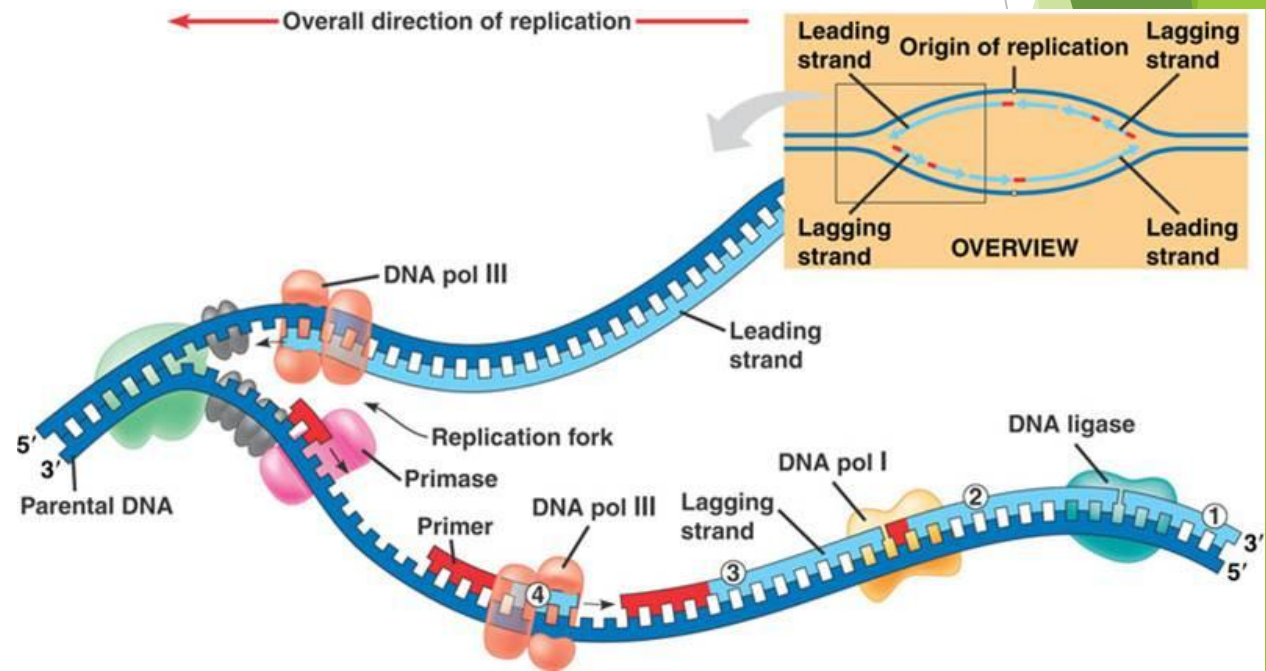
Biológiai DNS szintézis (replikáció)

- ▶ DNS-polimeráz: dezoxiribonukleotidok hozzáépítése a DNS szabad 3' végéhez
- ▶ Szemikonzervatív
(az utódmolekulák egyik szála régi, a másik új)



Biológiai DNS szintézis (replikáció)

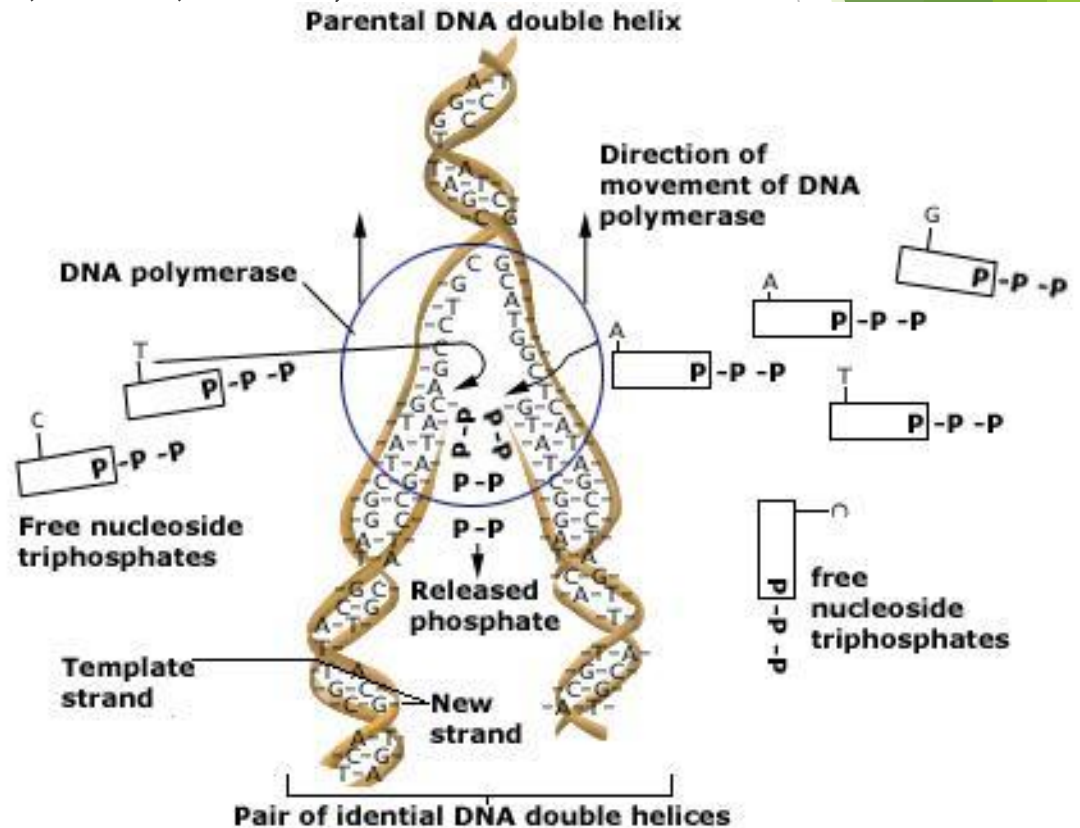
1. Szekvenca specifikus DNS-kötő fehérjék felismerik és felnyitják a duplaszálú DNS-t (replikációs origó)
2. A DNS lánc két szála szétválik
3. RNS primerek kötődnek be
4. dNTP-k épülnek be
5. A bázissorrendet a templát „irányítja”, komplementer bázisok épülnek be
6. A szintézis iránya:
7. DNS-polimeráz katalizálja

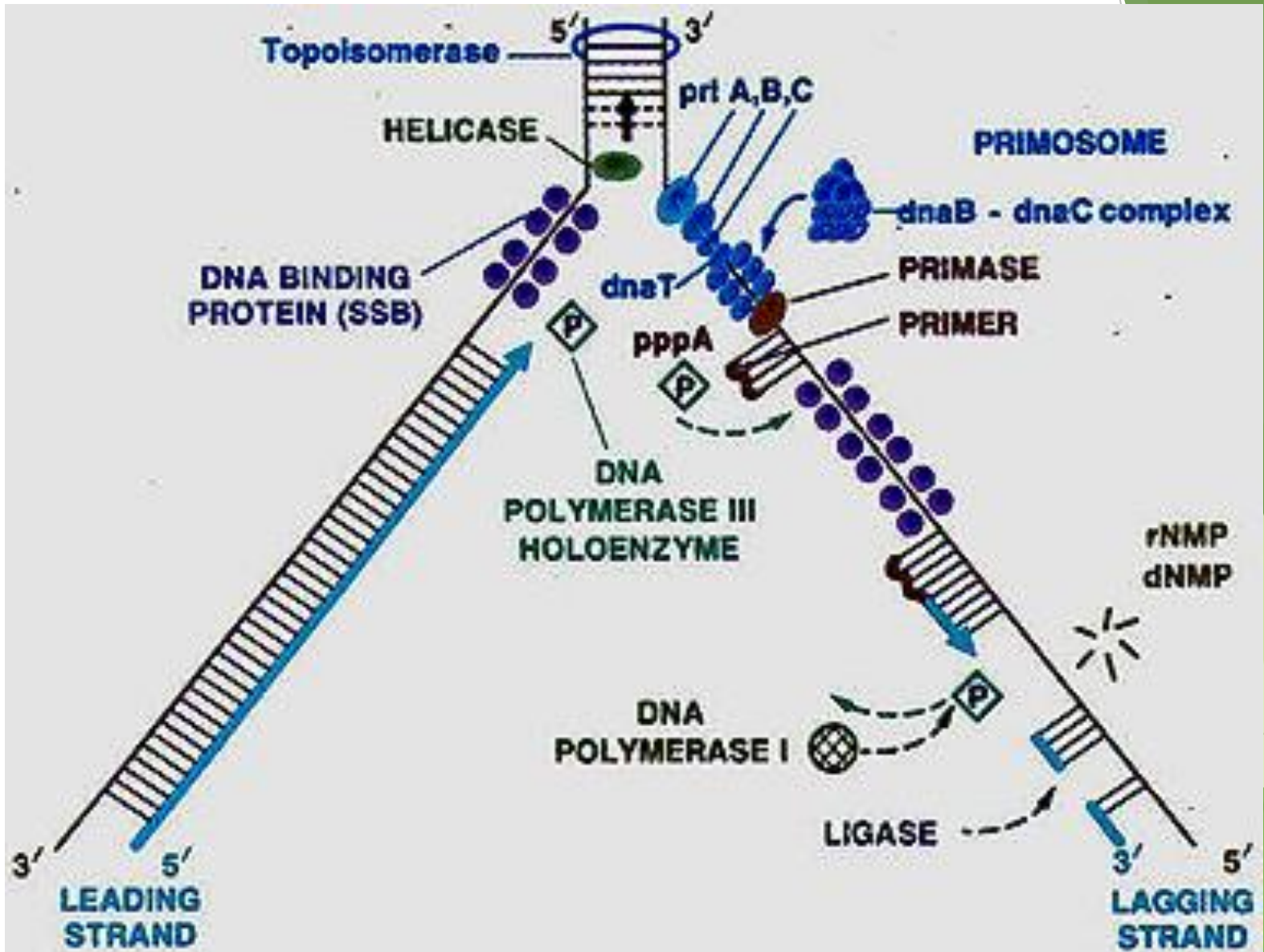


Biológiai DNS szintézis (replikáció)

Szükség van:

- ▶ Egy szál (primer szál) szabad 3' végére
- ▶ Templátra: DNS egyszálú szakasza
- ▶ Egy természetes templát lemásolásához 4 nukleotid (dNTP: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- ▶ Magnézium ionok
- ▶ DNS-polimeráz enzim





Polimeráz láncreakció

- Kary Mullis, 1983. (1993. Nobel-díj)

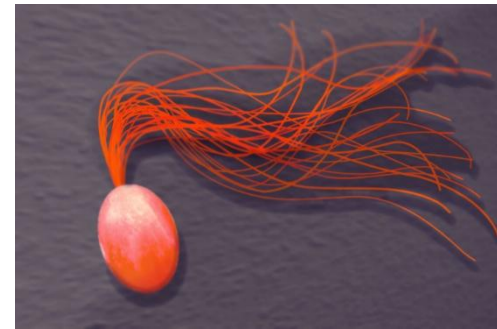


-*In vitro* DNS szintézis

-A biológiai DNS szintézis „mesterséges változata”

-Lépései:

1. 2 DNS szál szétválása
(mesterségesen magas hőmérsékleten lehetséges -> a láncokat összetartó H-hidak felbomlanak)



Emiatt HŐSTABIL DNS
POLIMERÁZ KELL!!!!

Taq vagy Pfu polimeráz

(*Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* baktériumból)



Polimeráz láncreakció

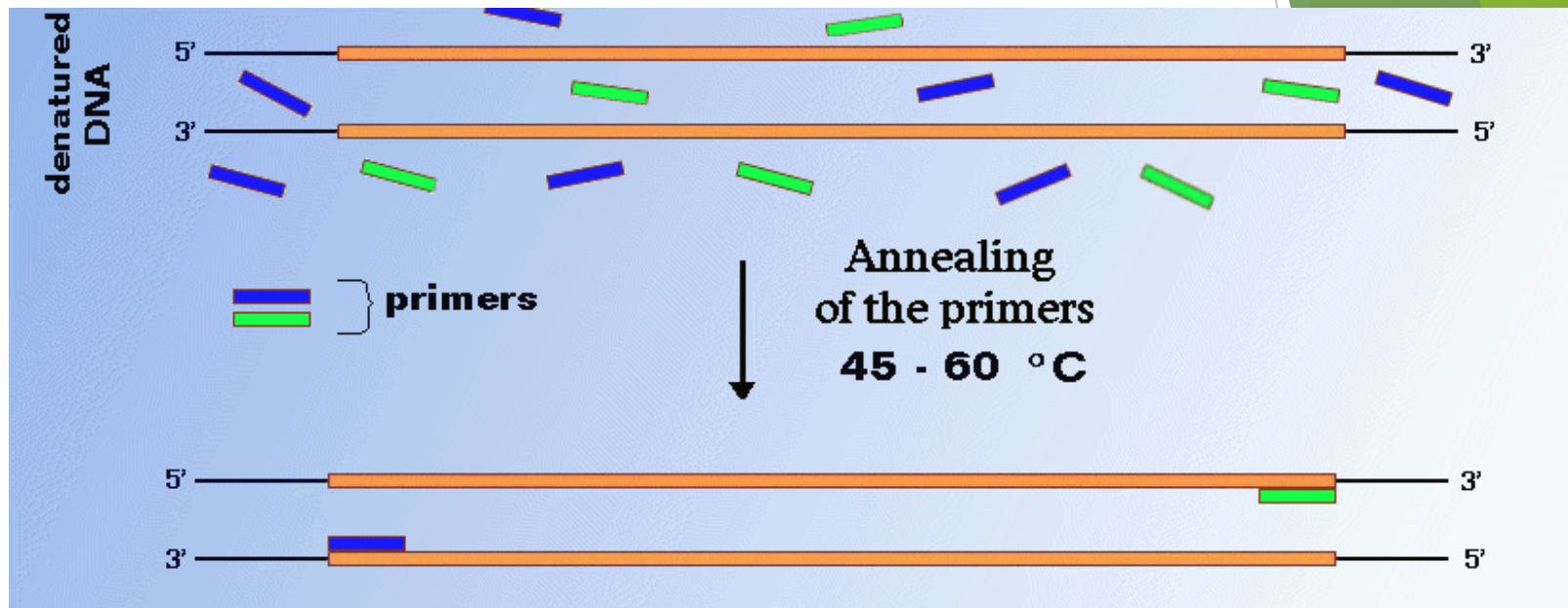
2. Primerek feltapadása (mesterségesen tervezzük, a felsokszorozandó szakasz két végére)



Pl. 3'AAGTCTCCGATTGCTCAGTGACG5'

Primer: 5' TTCAGAGGCTAACGAGTCACTGC 3'

Polimeráz láncreakció



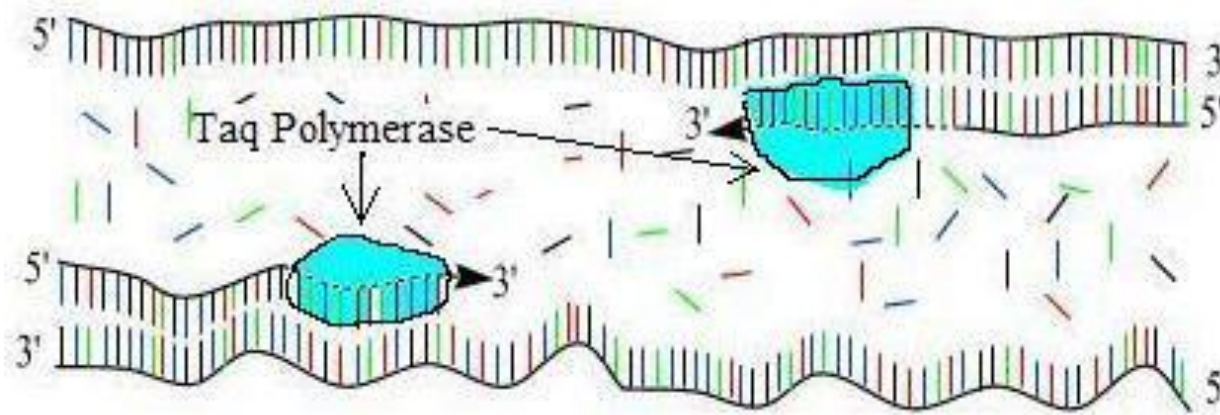
A primerek feltapadási hőmérséklete a primer hosszától (15-25 bázis) és bázisösszetételétől függ (minél több G/C, annál több H-híd alakul ki, annál magasabb hőmérséklet optimális) (ált. 45-60 °C)

Minél magasabb a hőmérséklet, annál specifikusabb a kötődés!

Polimeráz láncreakció

3. Lánchosszabbítás (nukleotidok beépítése) (elongáció, extenzió)

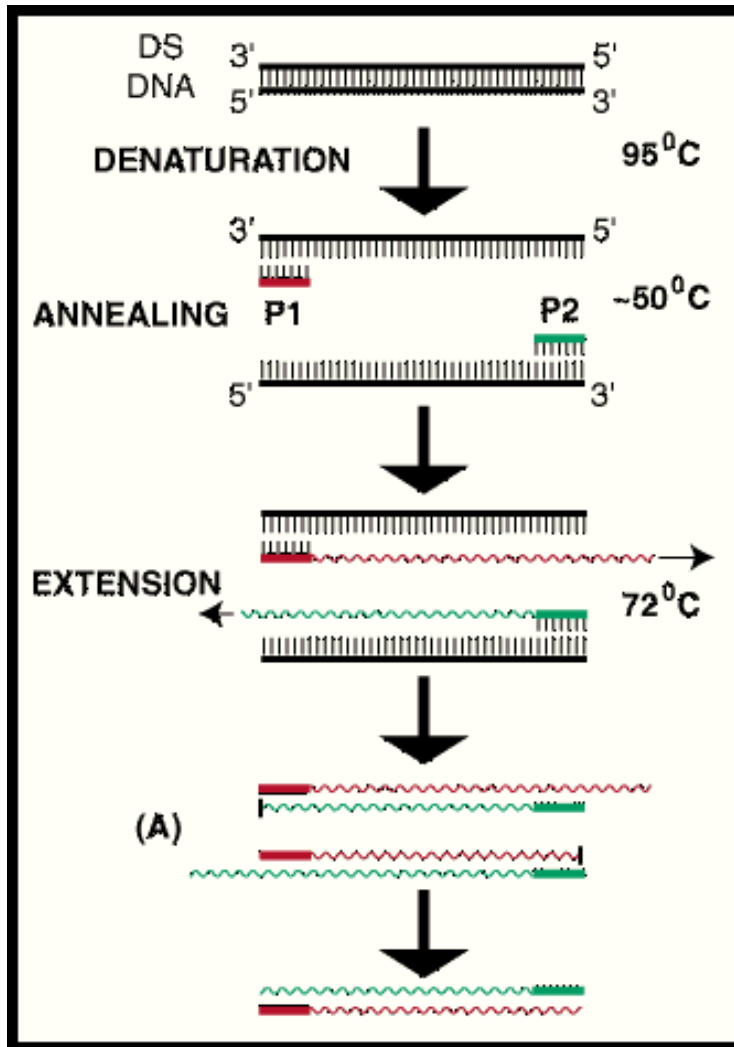
A DNS-polimeráznak megfelelő hőmérsékleten
(Taq esetén 72 °C)



Step 3 : extension

72 °C

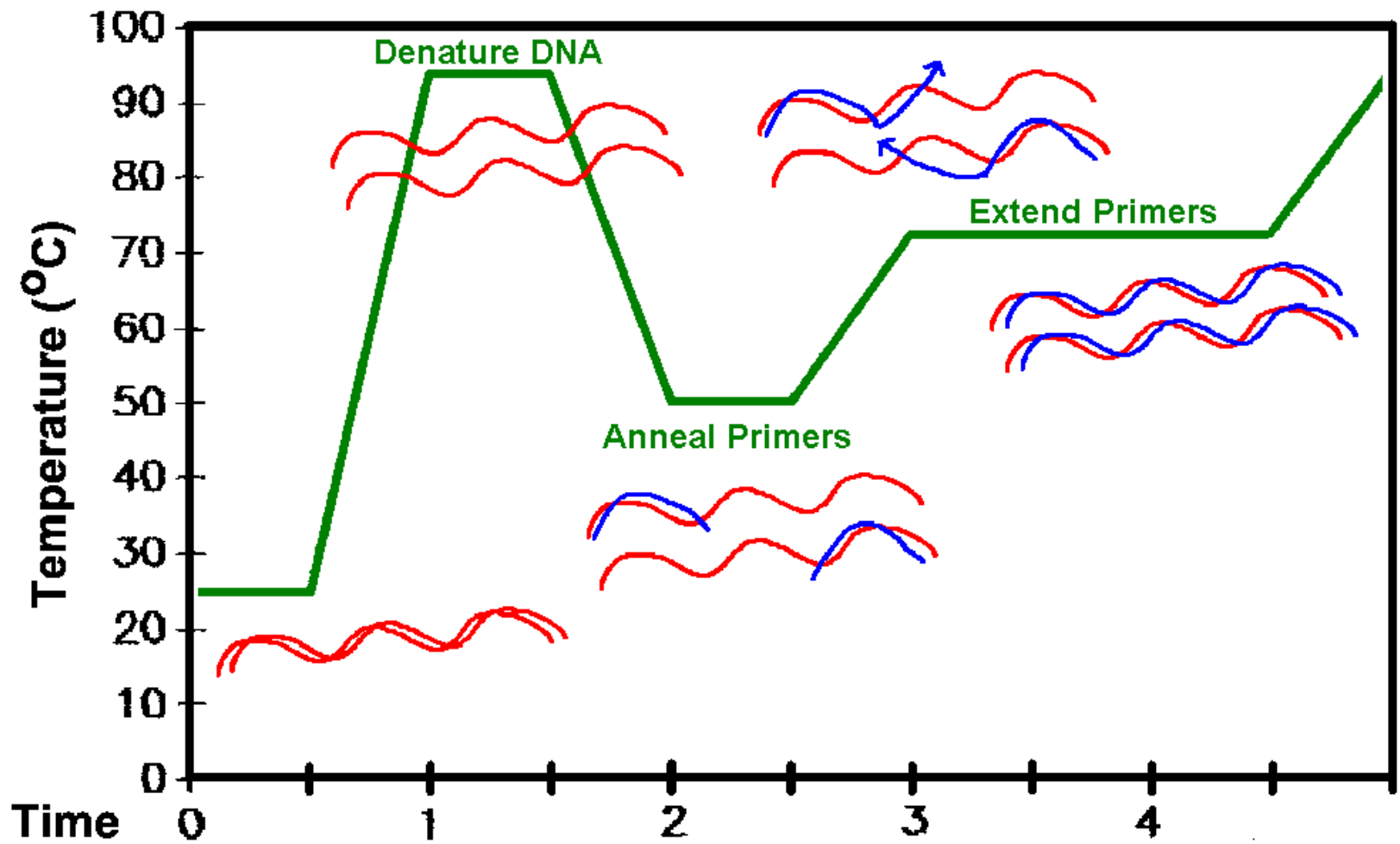
Polimeráz lánreakció



Szükséges anyagok:

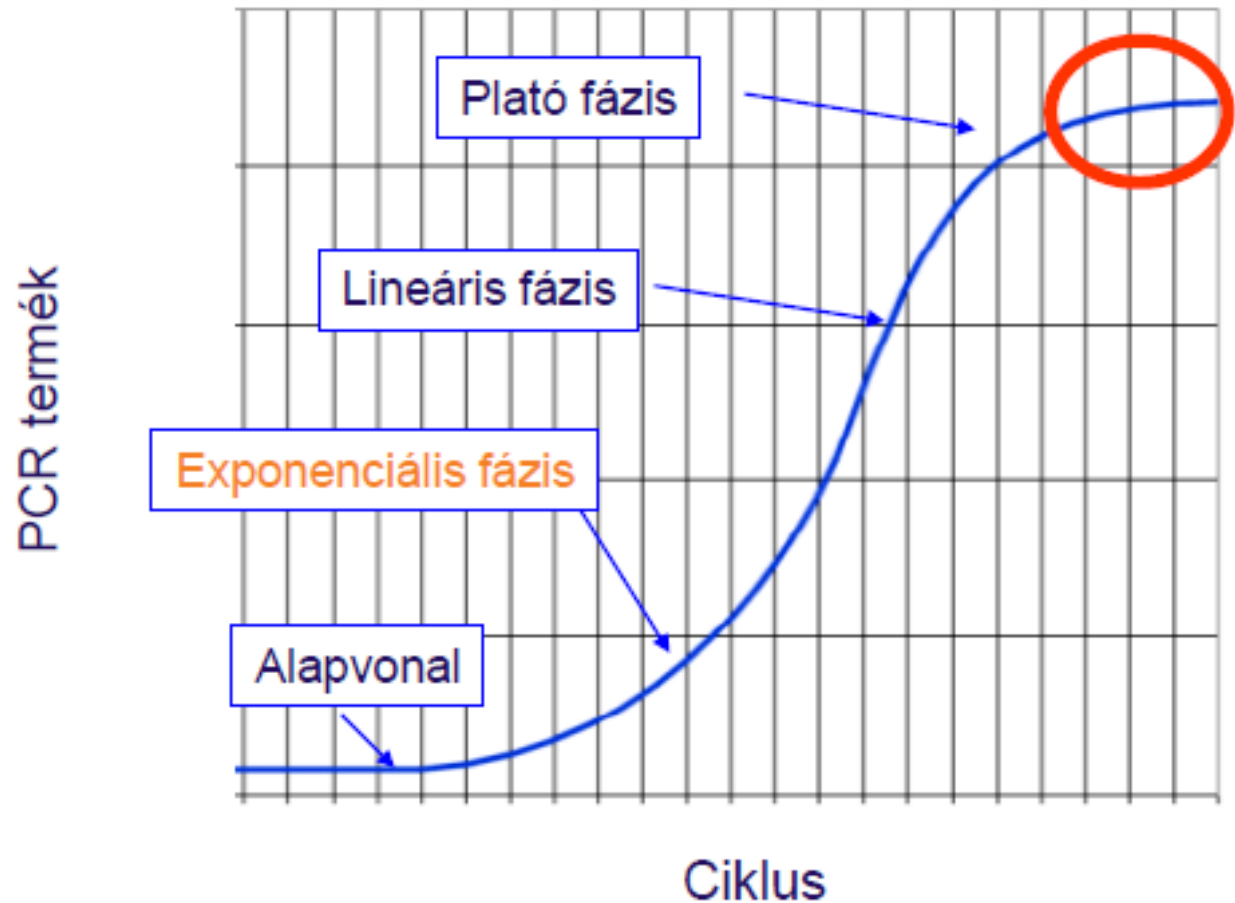
- Templát (felsokszorozandó DNS)
- Primerek (Forward és Reverz)
- Nukleotidok (dNTP-k: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- hőstabil DNS-polimeráz (Taq)





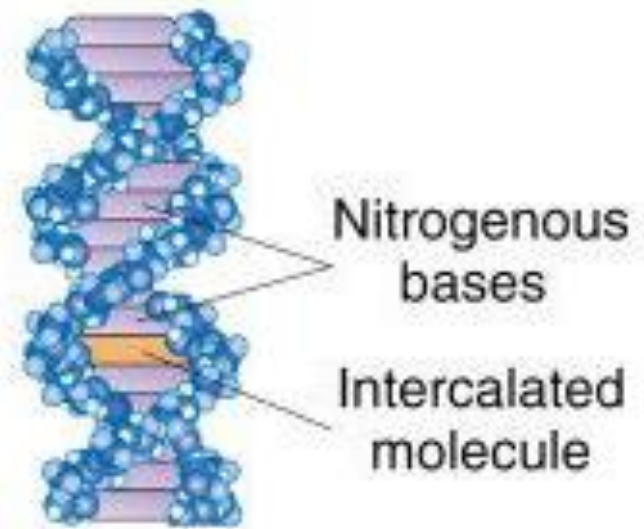
A PCR termék mennyisége az egymást követő ciklusokban duplájára nő, így a reakció végén 2^n n =ciklusok száma (ált. 20-40)

Telítési görbe

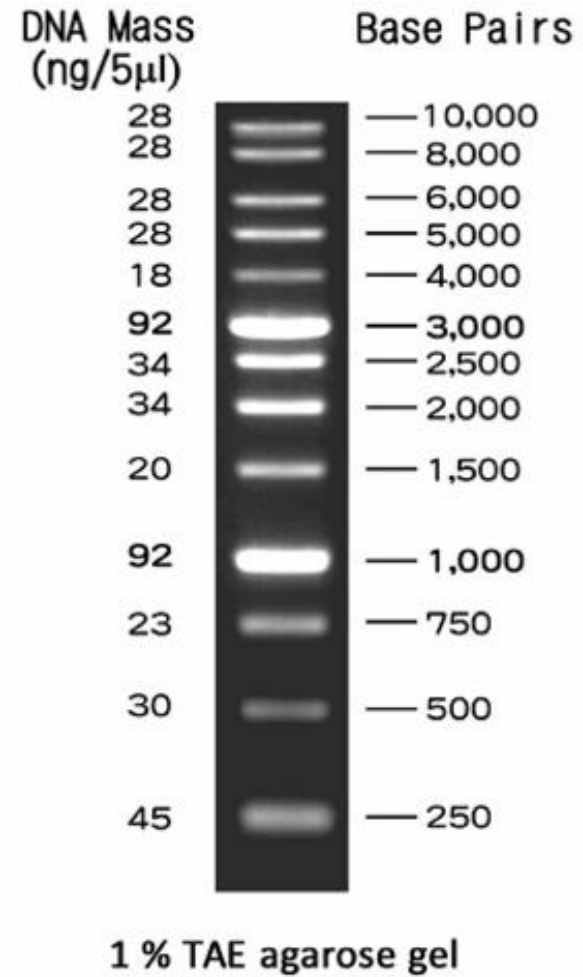
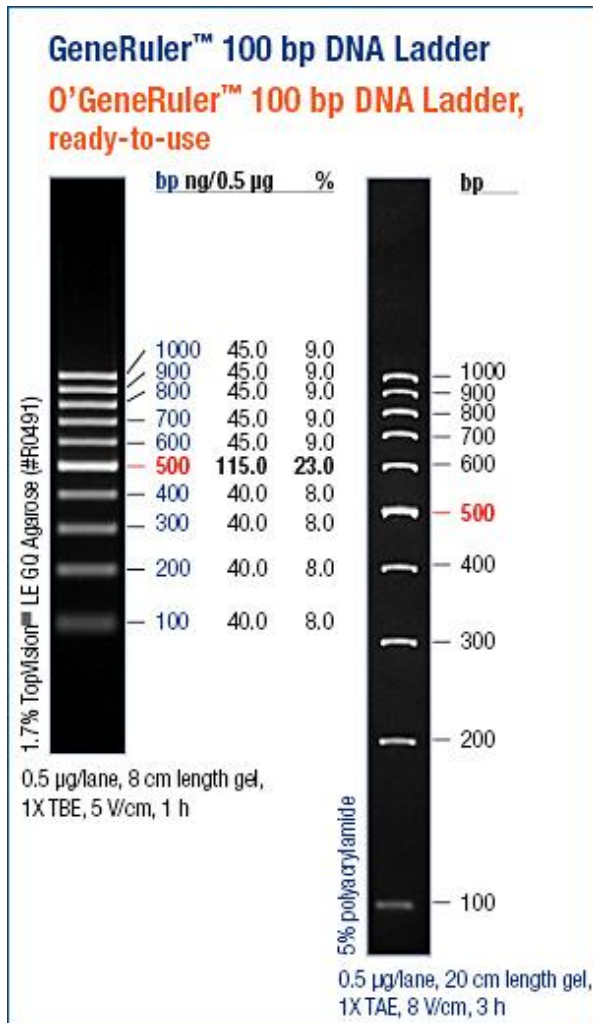


PCR termék kimutatása

- Agaróz gélelektroforézissel
- Az agaróz térhálós szerkezetű (poliszacharidokból áll)
- A DNS a pozitív pólus felé vándorol
- A térháló akadályozza a vándorlást (minél hosszabb a DNS, annál inkább, így a kis méretűek gyorsan, a nagyok lassabban haladnak a gélben)
- DNS festékekkel (Pl. etídium-bromid, interkalálódik a DNS két szála közé)
- Molekulasúly marker: a PCR termékkel együtt futtatjuk, ismert méretű DNS fragmentekből áll

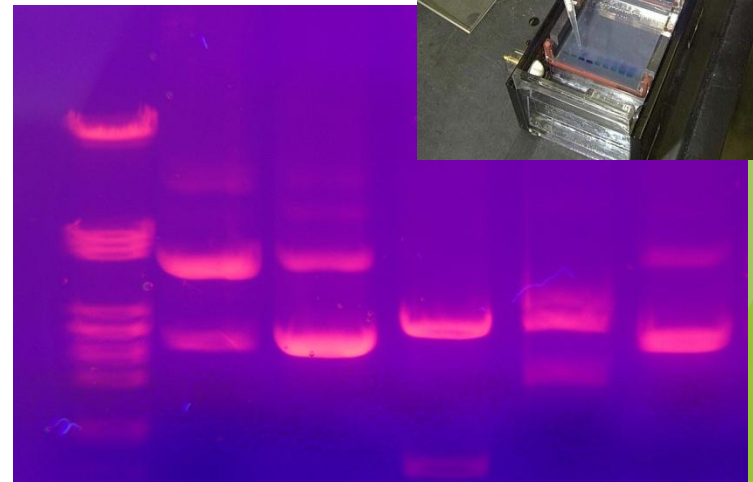
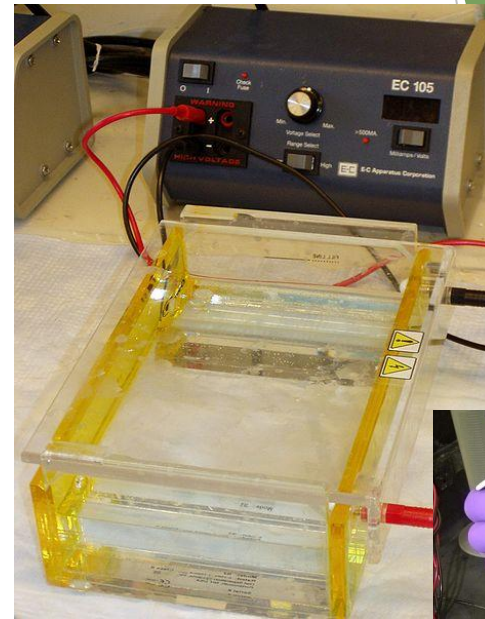
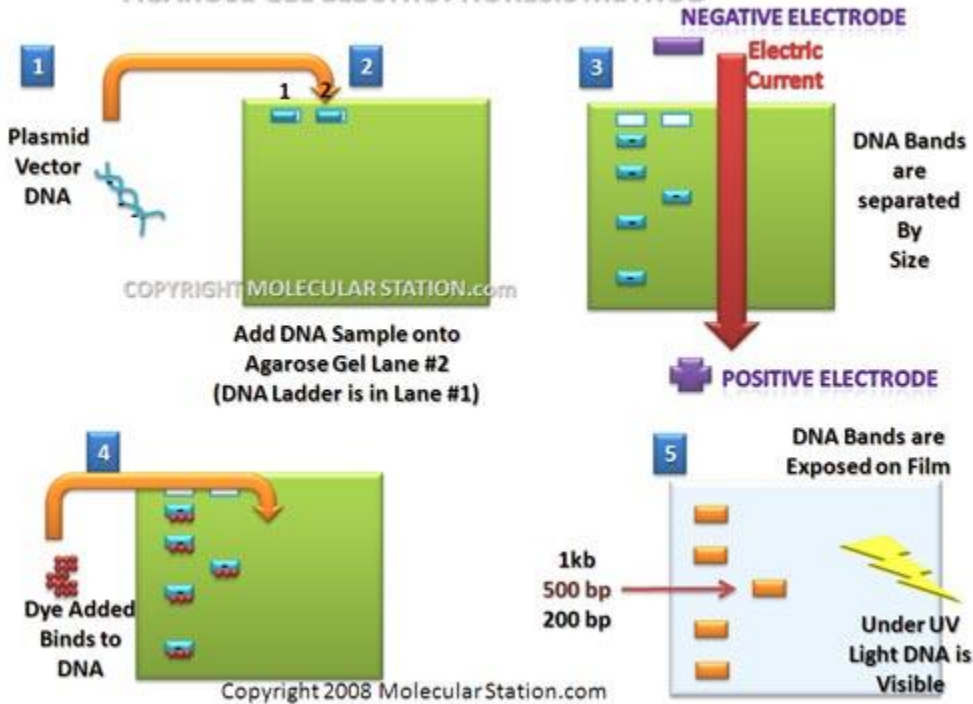


„Létra”

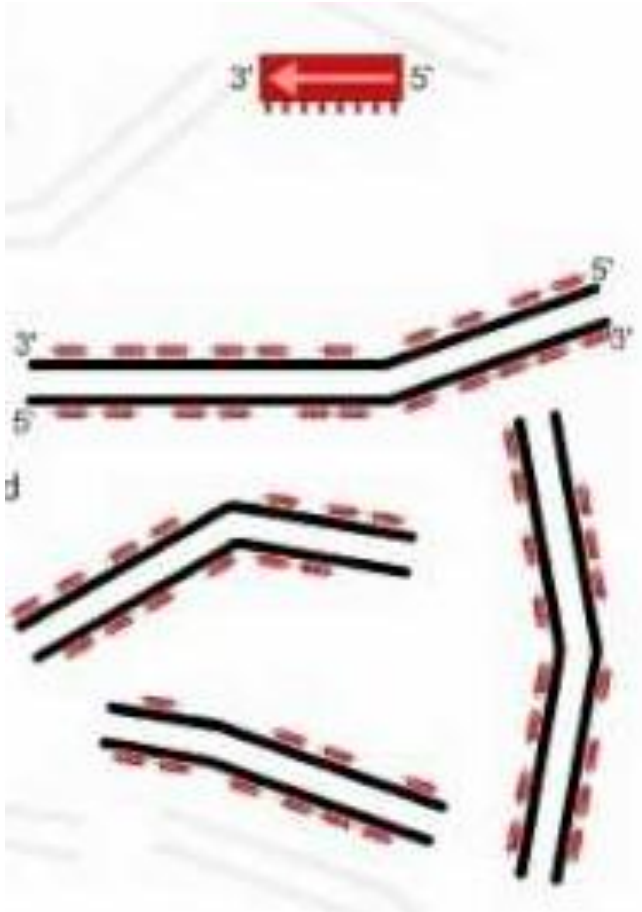


Gélelektroforézis

AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS METHOD



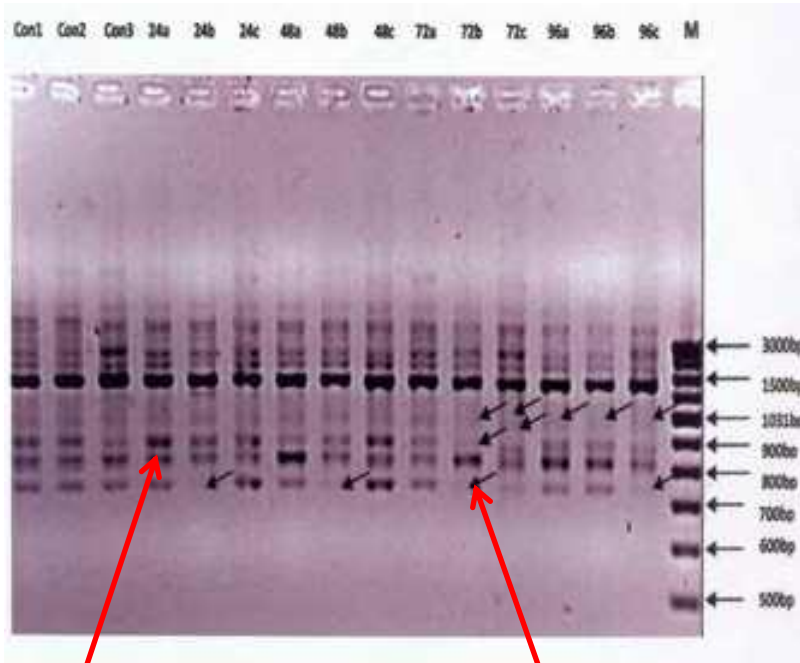
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)



- Nem specifikus primerek
- Alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 40 °C) sok helyre feltapad
- Sok fragment keletkezik
- Ha a DNS törik, fragmentek esnek ki

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

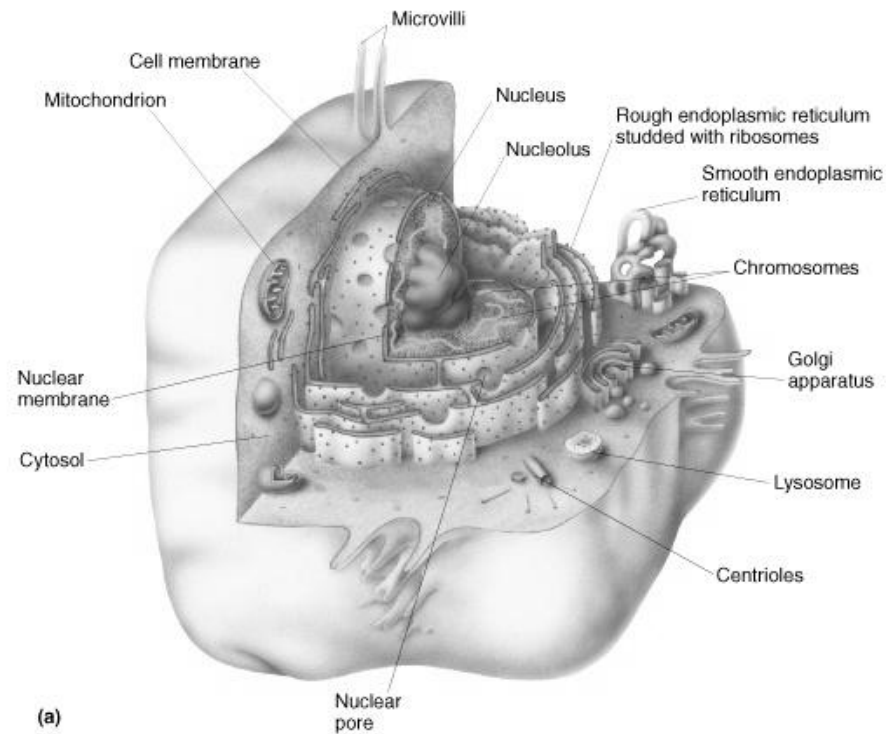
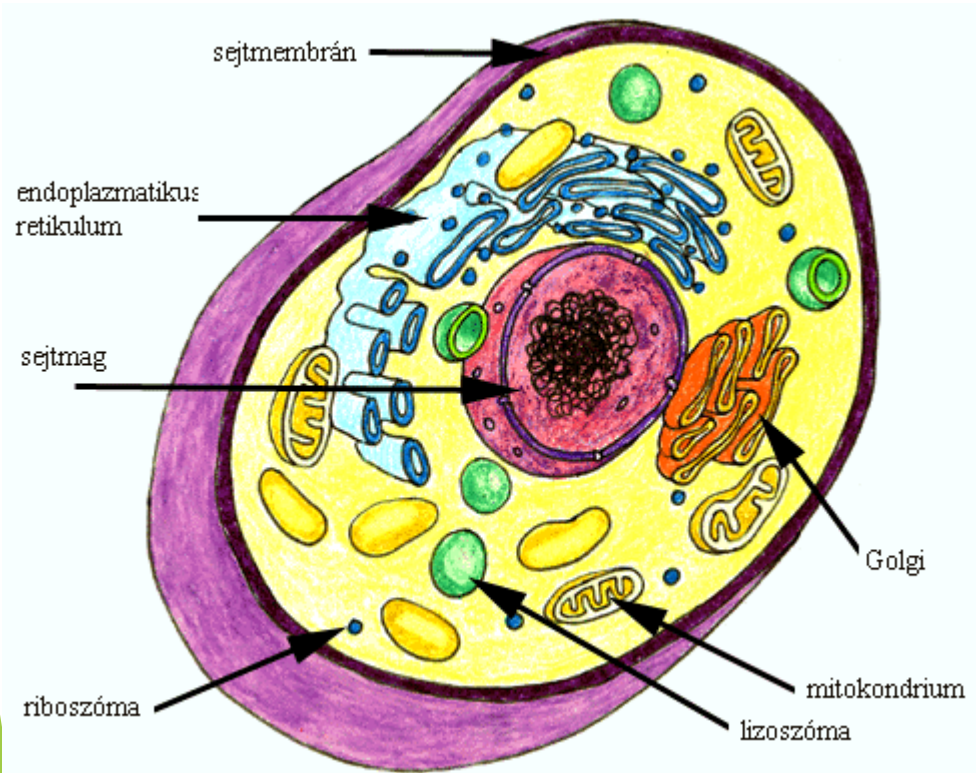
- A RAPD technikával a DNS károsodása és mutációk is azonosíthatók.
- A kiértékelés alapja a kezeletlen és a különböző koncentrációjú tesztoldatokkal kezelt minták DNS profiljának összevetése.
- A különbségekből következtethetünk a károsodás mértékére.



Sok fragmentből áll

Hiányzik egy fragment

Az eukarióta sejt szerkezete



RNS

- ▶ Kémiai felépítése, elsődleges szerkezete nagyon hasonlít a DNS-hez
- ▶ 3'-5' foszfodiészter kötések

Különbségek:

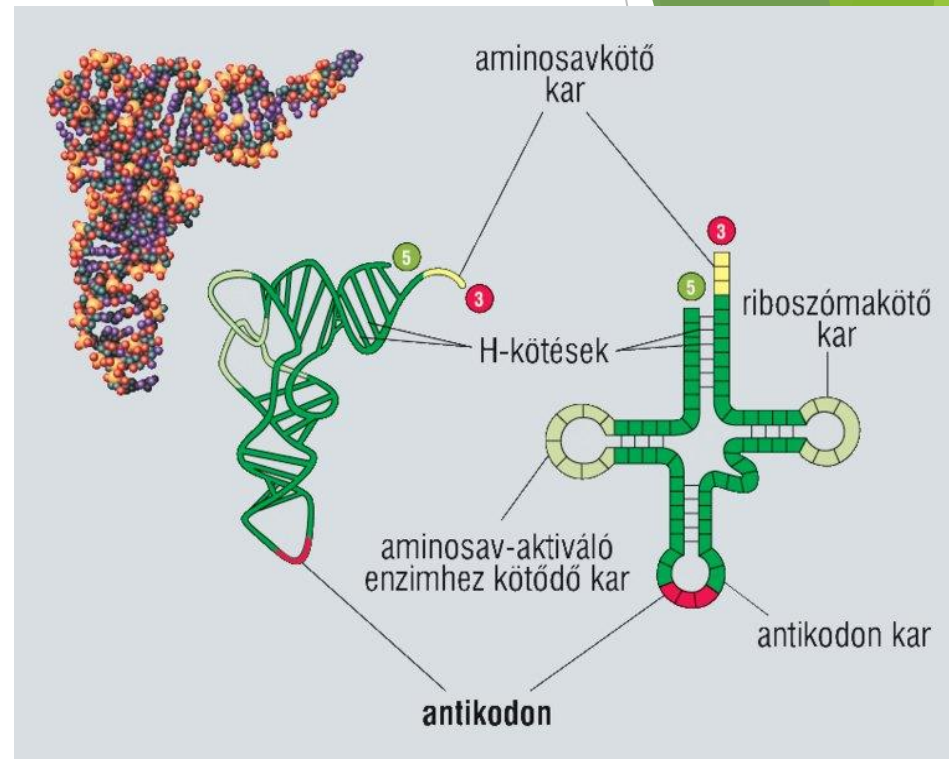
- ▶ A bázisok D-ribózhhoz (nem dezoxiribózhhoz) kapcsolódnak
- ▶ Purinbázisok azonosak (A, G), DE: T helyett U (uracil) (pirimidinbázisok: C, U)
- ▶ Egyszálú, ezért a purin/pirimidinbázisok aránya tetszőleges

- ▶ A sejtek RNS-tartalma 2-8x-osa a DNS mennyiségének
- ▶ Prokarióták: szinte az összes RNS a citoszólban
- ▶ Eukarióták: sejtmag, mitokondrium (és kloroplasztisz), riboszóma, citoszól
- ▶ Vírusok örökítőanyaga lehet

Az RNS biológiai szerepe

tRNS (transzfer RNS):

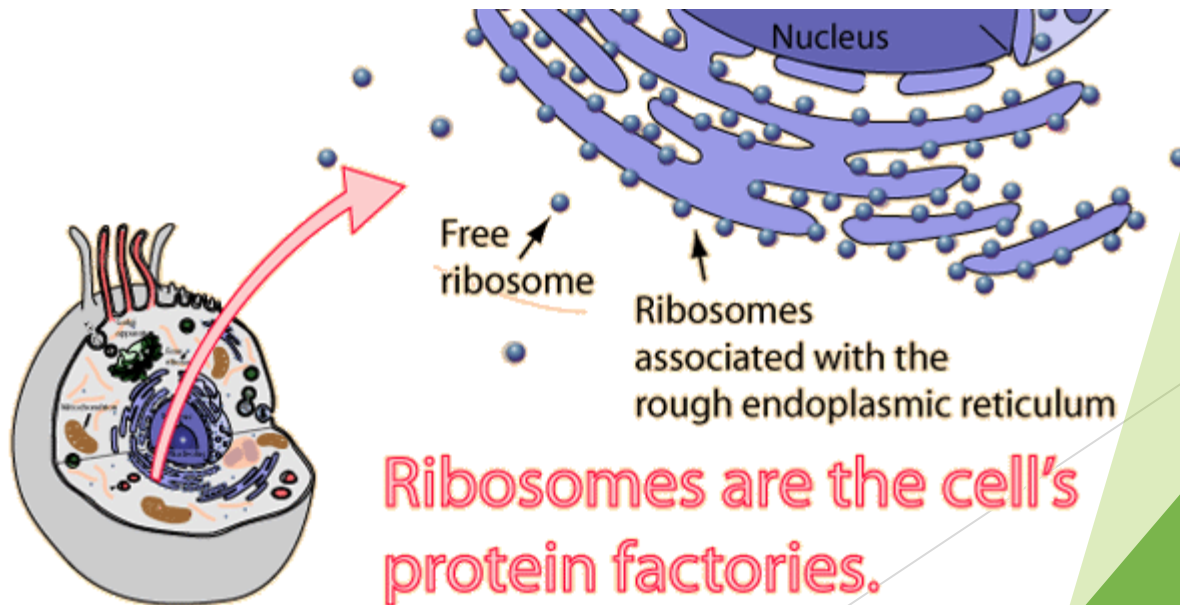
- ▶ Feladata: a fehérjeszintézis során aminosavak szállítása a riboszómákhoz
- ▶ Térben L alakú
- ▶ 73-93 nukleotid
- ▶ 2 hurok (benne ritka bázisok) funkciója a aminosavakat a tRNS-hez kötő enzim és a riboszóma felismerése
- ▶ A 3' vég CCA, a szállítandó aminosav ide kapcsolódik



Az RNS biológiai szerepe

rRNS (riboszómális RNS):

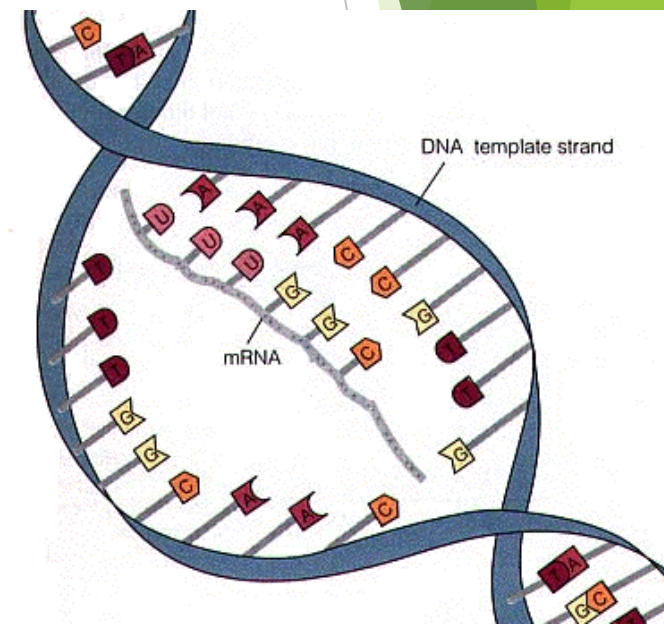
- ▶ A sejtben található RNS túlnyomó része
- ▶ Elsődleges szerepük a riboszóma szerkezetének kialakítása
- ▶ A riboszómális fehérjékhez kapcsolódnak

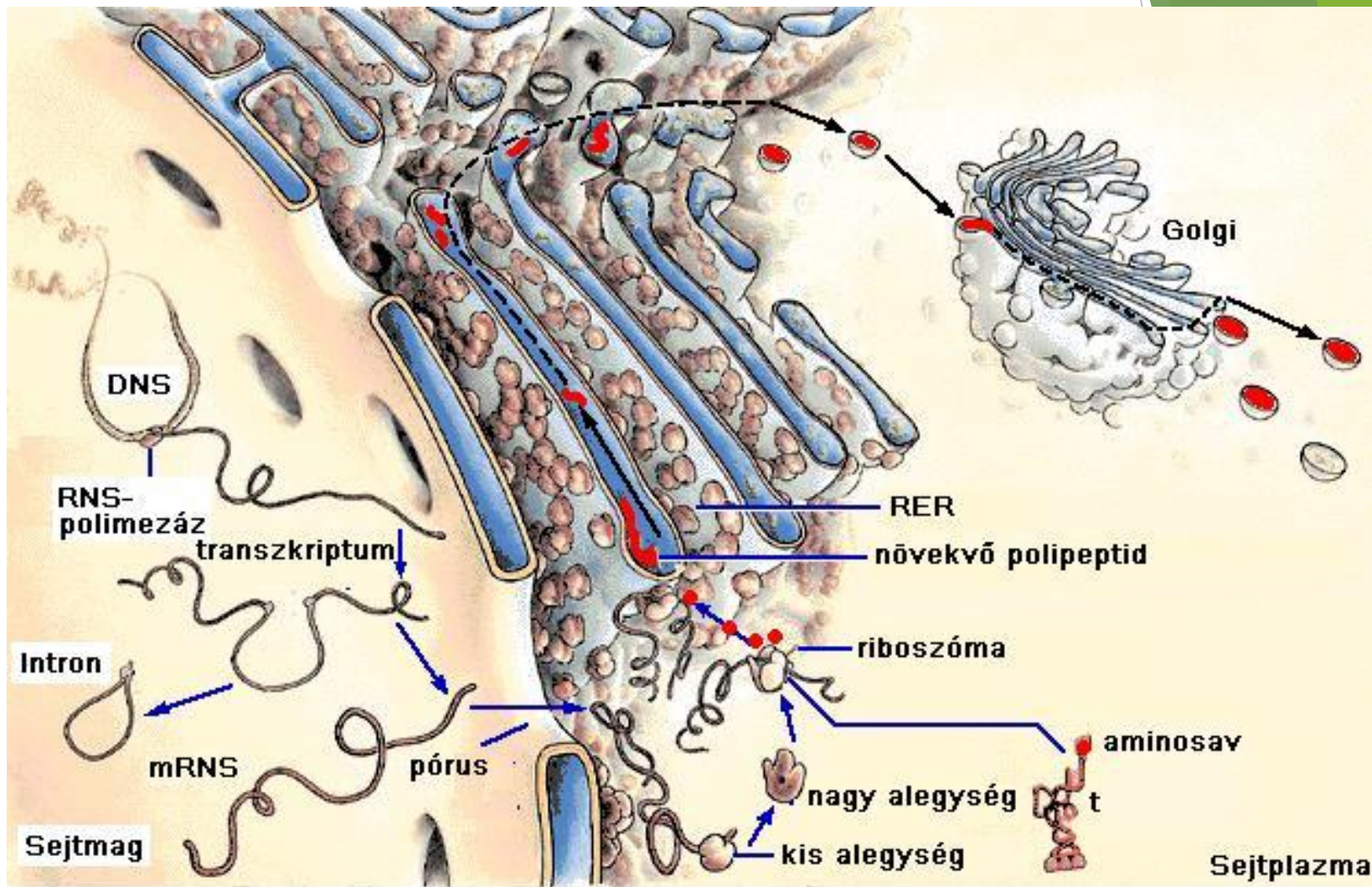


Az RNS biológiai szerepe

mRNS (messenger, hírvivő RNS):

- ▶ Feladata: a genetikai kódban tárolt információ továbbítása
- ▶ 4 bázis építi fel (A, G, C, U)
- ▶ A sejtmagban keletkezik gének TRANSZKRIPCIÓJA során
- ▶ A sejtmagból a citoplazmába kerül, kapcsolatba lép a riboszómákkal
- ▶ A fehérjeszintézis templatja
- ▶ Kis koncentrációban keletkeznek
- ▶ Bomlékonyak (rövid féléletidő)
- ▶ Változatosak (az adott sejtben zajló fehérjeszintézisnek megfelelően)

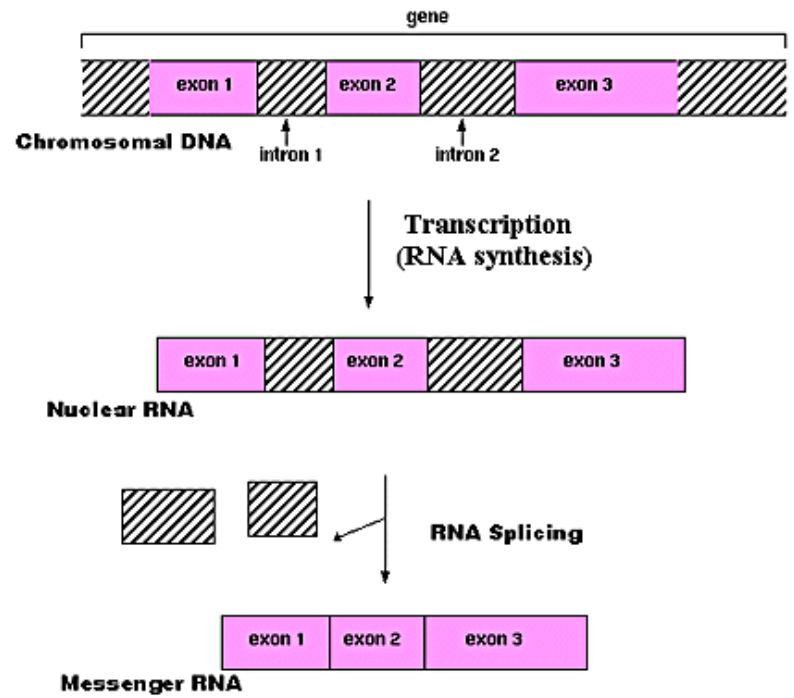




Az mRNS érése

Intronok kivágódása (splicing)

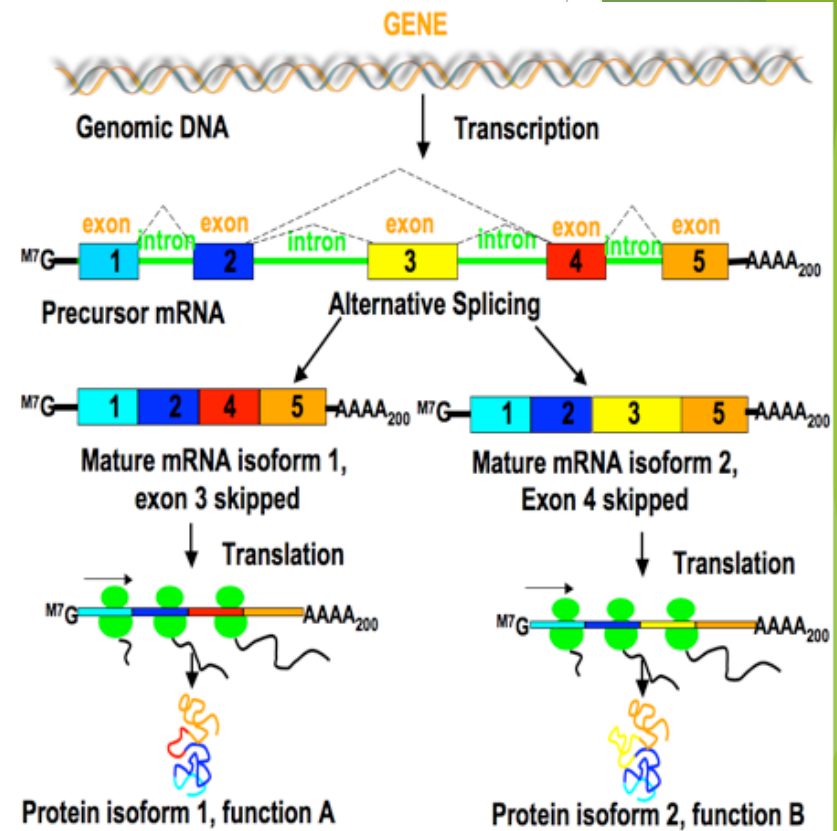
- ▶ Génen belül kódoló (exon) és nem kódoló (intron) szakaszok
- ▶ Lemásolódik, a pre-mRNS-ben intronok és exonok is
- ▶ A sejtmagon belül egy fehérjékből és RNS-ekből álló apparátus (spliceosome) kivágja az intronokat
- ▶ Prokariótákban nincsenek intronok!



RNA synthesis and processing

Alternatív splicing

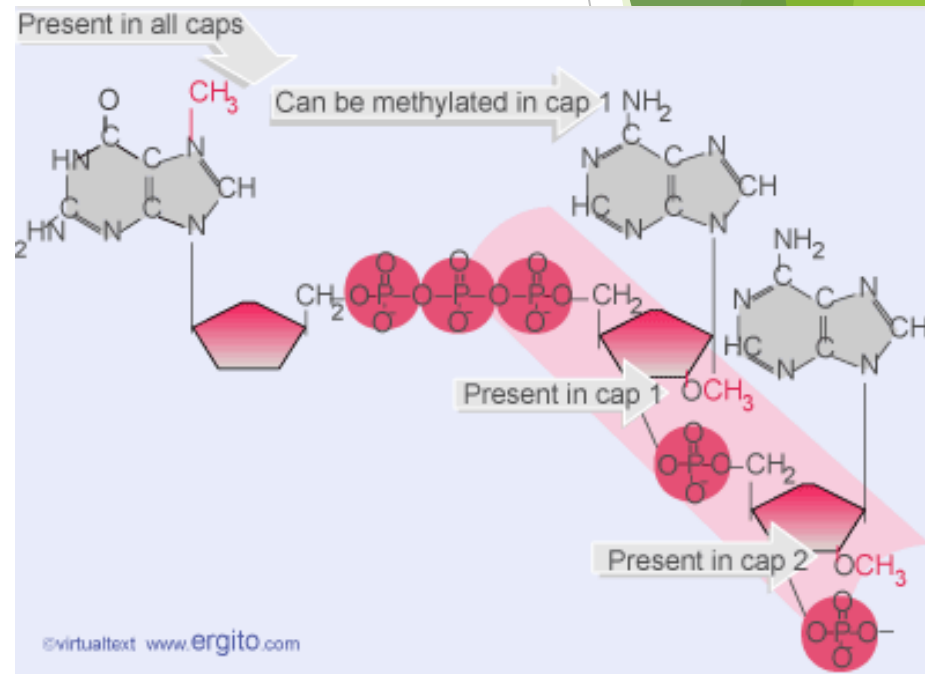
- ▶ lehetővé teszi, hogy a pre-mRNS-ből többféle érett mRNS képződjön
- ▶ különböző szövetekben, vagy a fejlődés különböző szakaszaiban különböző fehérjék keletkezését biztosítja ugyanarról a génről



Az mRNS érése

Az 5' vég módosítása

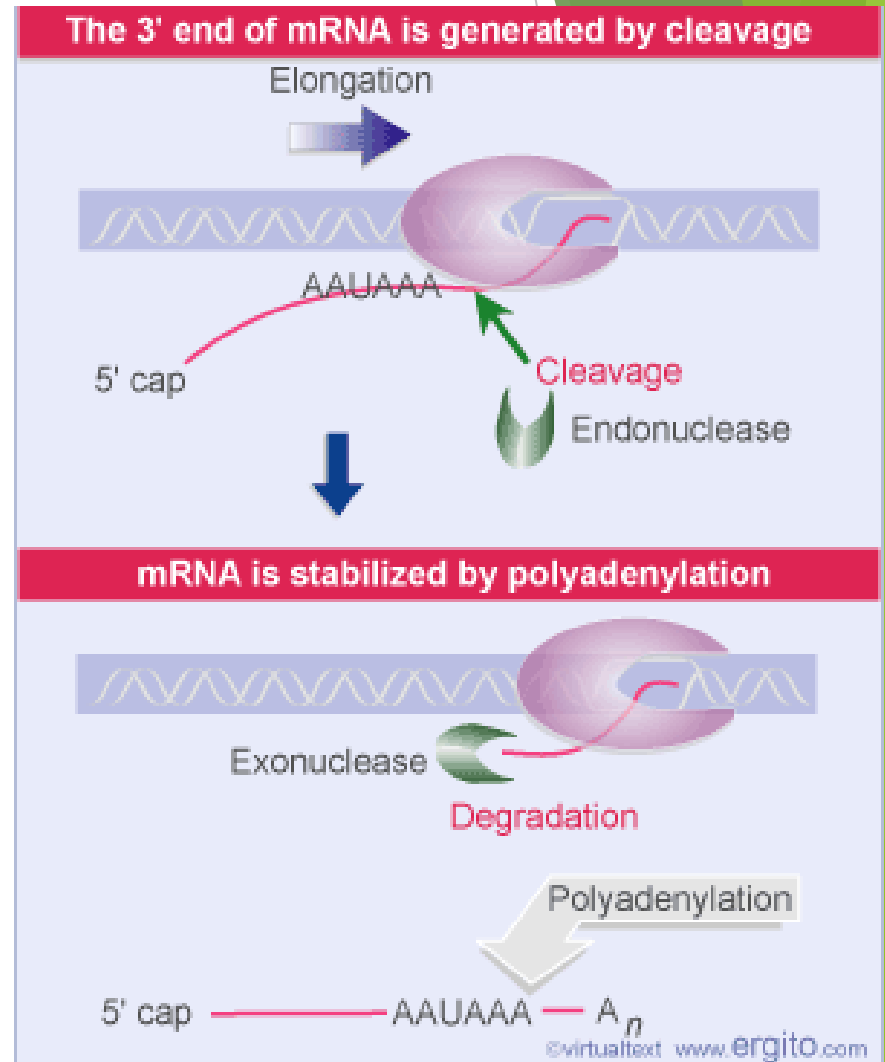
- ▶ Az mRNS 5' végére egy guanozin monofoszfát kerül → CAP
- ▶ védelmet biztosít a lebontással szemben (exonukleázok)
- ▶ stabilabb mRNS jön létre



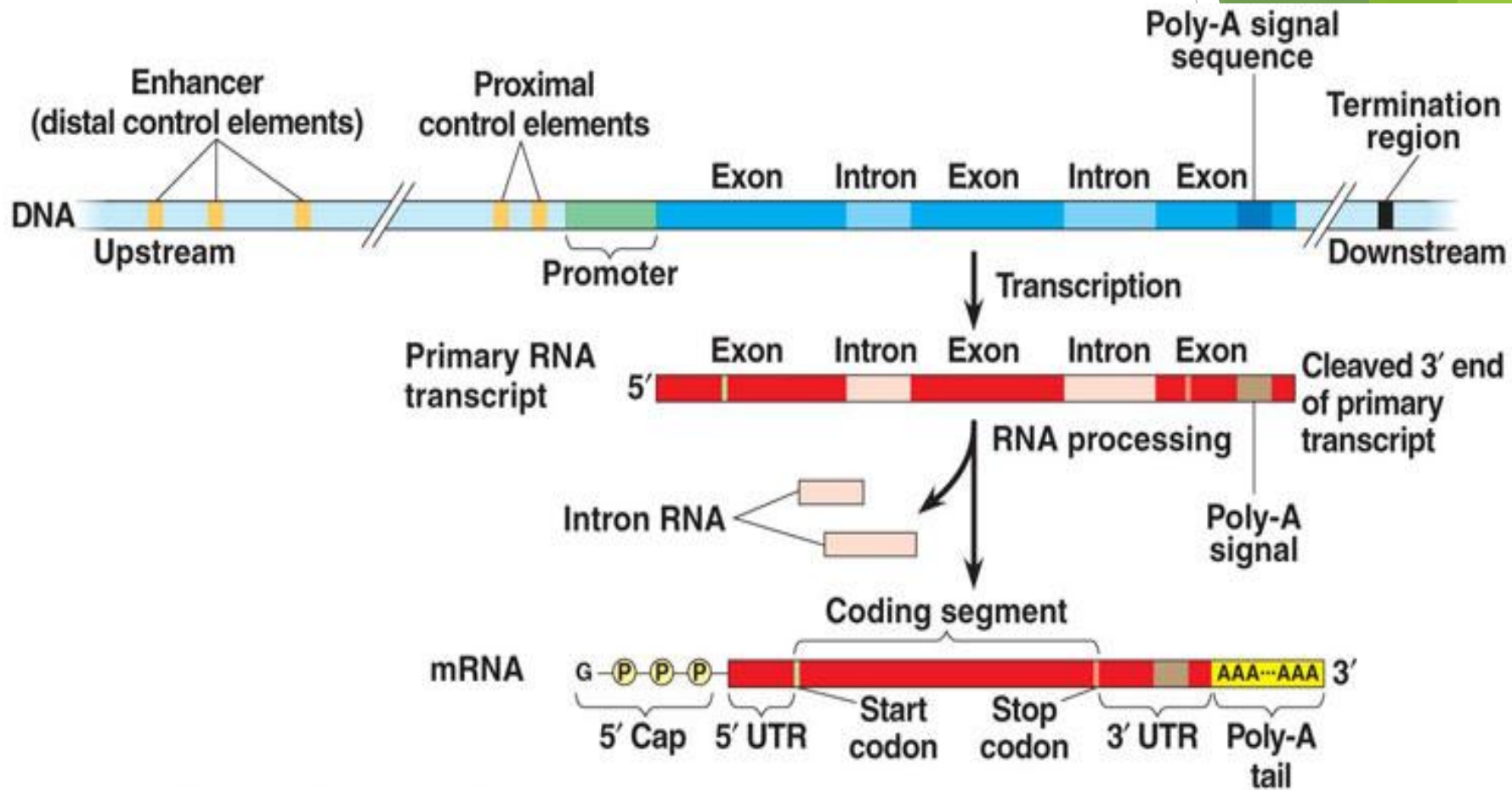
Az mRNS érése

Az 3' vég módosítása

- ▶ Az mRNS végét prokariótákban és eukariótákban is transzkripciós terminációs (lezáró) szignál szakaszok jelöli
- ▶ Ez a poliadenilációs szignál (AAUAAA)
- ▶ RNS vége: a szignál után 10-30 bp-ral
- ▶ A poliadenilációs szignál felismerése után „poli A farok” épül a 3' végre (kb. 200 A)



Az mRNS érése



Az RNS biológiai szerepe

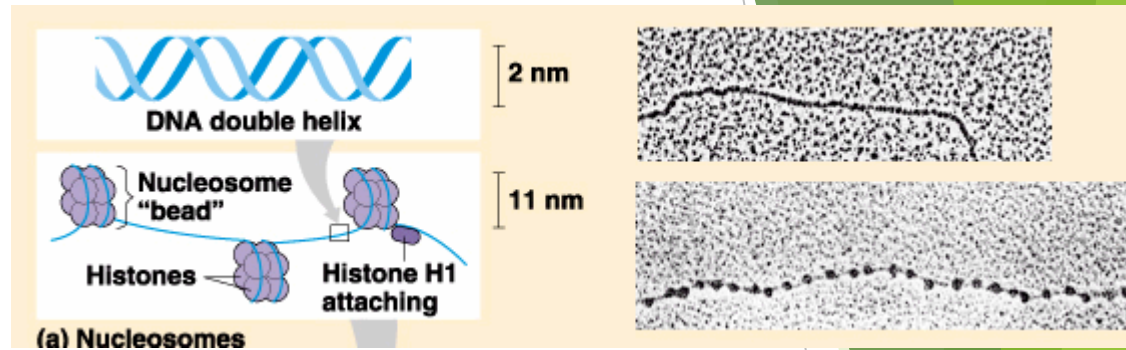
snRNS (kis RNS):

- ▶ Feladata: a kromatin szerkezeti elemei és részt vesznek annak szabályozásában is
- ▶ Védett 5' vége van (5' „sapka”)

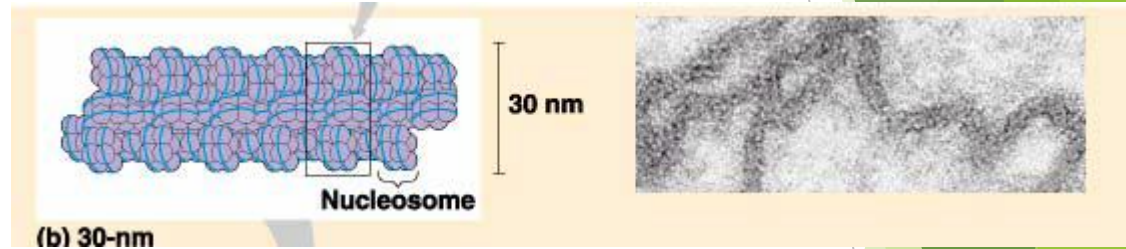
RNS típus	Rövidítés	Funkció	Méret	Szintézis helye	Szerkezeti jellegzetességek
messenger RNS	mRNS	genetikai információ	1000-10000 nukleotid	sejtmag	védett 5' vég, poli (A) farok
transzfer RNS	tRNS	aminosavak transzferje	65-110 nukleotid	sejtmag	sok dupla hélix, sok ritka bázis
riboszómális RNS	rRNS	riboszómák strukturális váza	120-5400 nukleotid	sejtmagvacska	Dupla helikális szakaszok, metilált nukleotidok
kis RNS-ek	snRNS	szerkezeti és szabályozó a kromatinban	100-300 nukleotid	sejtmag	védett 5' vég

A kromatin állomány szerveződése

Nukleoszóma



Szolenoid



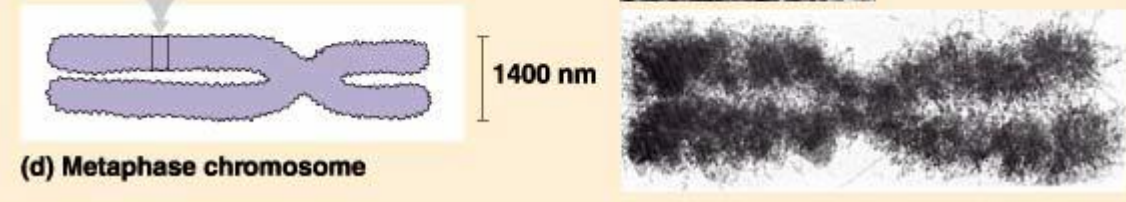
Hurok struktúra



Kromatinköteg



Kromoszóma



A kromatinállomány szerveződése

- ▶ Heterokromatin: Kompakt szerkezet, nem aktív. A DNS-t körülvevő hiszton fehérjék szoros kapcsolata miatt a polimeráz enzim nem fér hozzá a DNS-hez.
 - Konstitutív heterokromatin: sohasem íródik át, irreverzibilisen inaktívvá vált
 - Fakultatív heterokromatin: átíródhat
- ▶ Eukromatin: A hiszton fehérjék nem kötődnek szorosan a DNS-hez, laza szerkezet, aktív, átíródik.
- ▶ Átrendeződhetnek: kromatin remodelling (hiszton acetiláció, metiláció)

Génkifejeződés

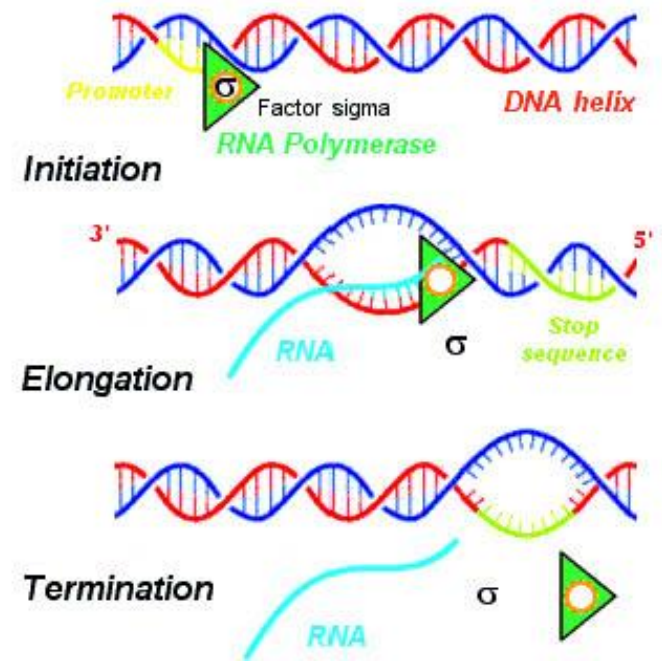
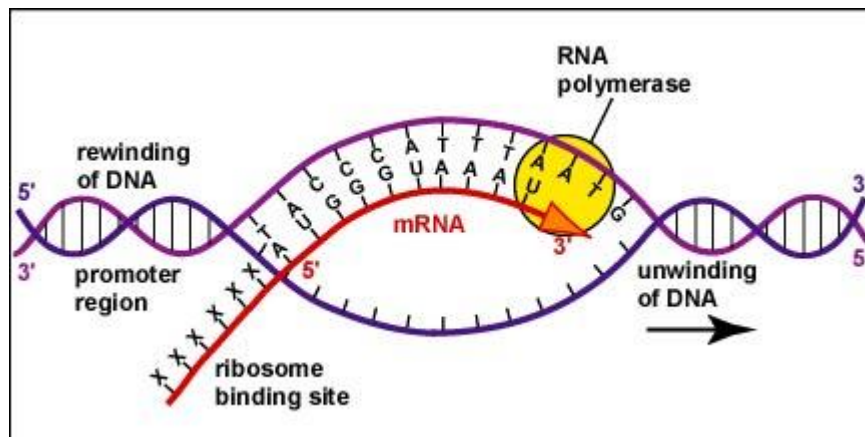
- ▶ Gének átírása mRNS-sé, majd fehérjévé

GÉN -(transzkripció)→ **mRNS** -(transzláció)→ **FEHÉRJE**

- ▶ Genetikai kód: bázishármasok (a beépülő aminosavakat és azok sorrendjét a génekről átíródó mRNS-ek bázissorrendje határozza meg)
- ▶ A genetikai kód (majdnem) **univerzális** (minden élőlényben azonos), **egyértelmű** (egy bázishármas egy aminosavat kódol), **degenerált** (egy aminosavat több bázishármas is kódolhat)
- ▶ A bázishármasok (kodonok) aminosavakat kódolnak
- ▶ 20 aminosav
- ▶ Génexpresszió szabályozása: mRNS és fehérje szinten is történhet

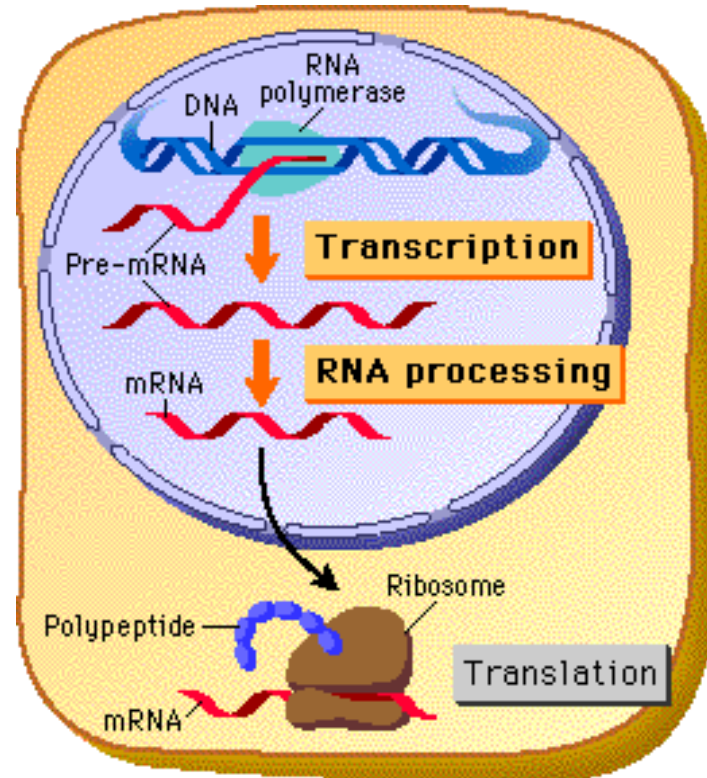
RNS szintézis (transzkripció)

- ▶ Gének átírása mRNS-sé
- ▶ RNS templát függő szintézise
- ▶ Templát: DNS (gén, kódoló szakasz)
- ▶ RNS-polimeráz katalizálja
- ▶ Nukleozid trifoszfátokat épít be 5' -> 3' irányban
- ▶ Újonnan is képes elkezdni a szintézist (nem kell szabad 3' vég)
- ▶ Képes megtalálni az induló pontot (iniciációs hely) és a végpontot (terminációs hely)



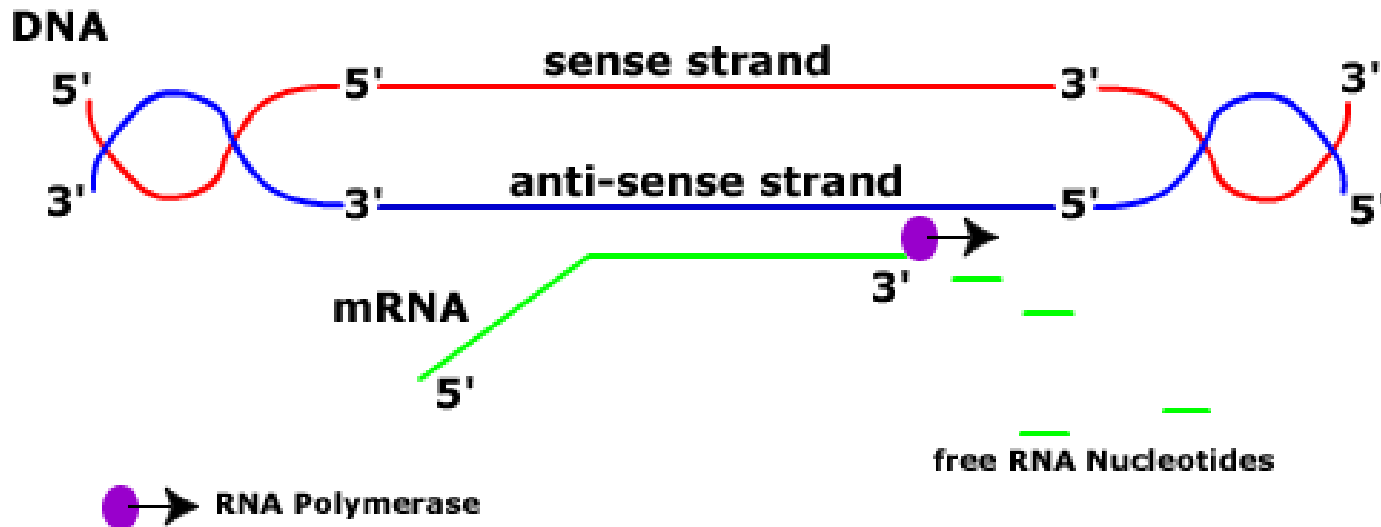
RNS szintézis (transzkripció)

- ▶ A gének átírásának gyakorisága közvetlen kapcsolatban van a génkifejeződéssel
- ▶ A keletkező mRNA közvetlenül fehérjeszintézist irányít
- ▶ Vagy a fehérjeszintetizáló rendszer része (rRNS, tRNS)
- ▶ A transzkripció DNS szálra „szelektív”, vagyis csak 5' -> 3' irányban működik



RNS szintézis (transzkripció)

- ▶ Szensz (értelmes) szál: az a DNS szál, ami templátként szolgál az RNS szintézishez
- ▶ A szensz szál komplementere a képződő RNS-nek
- ▶ A másik szál az antiszensz szál az RNS-sel azonos irányultságú



Génkifejeződés

- ▶ Gének átírása mRNS-sé, majd fehérjévé

GÉN -(transzkripció)→ **mRNS** -(transzláció)→ **FEHÉRJE**

- ▶ Genetikai kód: bázishármasok (a beépülő aminosavakat és azok sorrendjét a génekről átíródó mRNS-ek bázissorrendje határozza meg)
- ▶ A genetikai kód (majdnem) **univerzális** (minden élőlényben azonos), **egyértelmű** (egy bázishármas egy aminosavat kódol), **degenerált** (egy aminosavat több bázishármas is kódolhat)
- ▶ A bázishármasok (kodonok) aminosavakat kódolnak
- ▶ 20 aminosav
- ▶ Génexpresszió szabályozása: mRNS és fehérje szinten is történhet

Kodon

- ▶ Start kodon: a szintézis startpontja
- ▶ AUG = metionin

- ▶ Stop kodon: UAG, UAA, UGA = nem kódol aminosavat (nonsense/terminációs kodon)

- ▶ 61 kodon kódol aminosavat (ezért 61 különböző tRNS-nek kellene lennie, de sokkal több van!)

- ▶ Sok aminosavat több tRNS is szállíthat

Az mRNS bázishármasa

1.	2.				3.
	U	C	A	G	
U	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	U
	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	C
	leucin	szerin	STOP	STOP	A
	leucin	szerin	STOP	triptofán	G
C	leucin	prolin	hisztidin	arginin	U
	leucin	prolin	hisztidin	arginin	C
	leucin	prolin	glutamin	arginin	A
	leucin	prolin	glutamin	arginin	G
A	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	U
	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	C
	izoleucin	treonin	lizin	arginin	A
	metionin*	treonin	lizin	arginin	G
G	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	U
	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	C
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	A
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	G

Olvasási keret

- ▶ A bázishármasok 3 bázisból állnak (triplet)
- ▶ A leolvasás „elvileg” bármelyik bázistól kezdődhet, így három lehetséges olvasási keret van
- ▶ Általában csak egy leolvasási keret aktív, a Start kodon (AUG) határozza meg
- ▶ Az olvasási keret eltolódása megváltoztathatja (Frameshift mutáció!) a fehérje aminosavsorrendjét vagy korai STOP kodont eredményezhet

Ha az olvasási keret jó (nyitott):

- ▶ A START közel van az mRNS 5' végéhez
- ▶ A kodonoknak megfelelő számú aminosav épül be és ugyanennyi peptidkötés alakul ki az aminosavak között
- ▶ A START és a megfelelő STOP kodon azonos olvasási keretbe esik

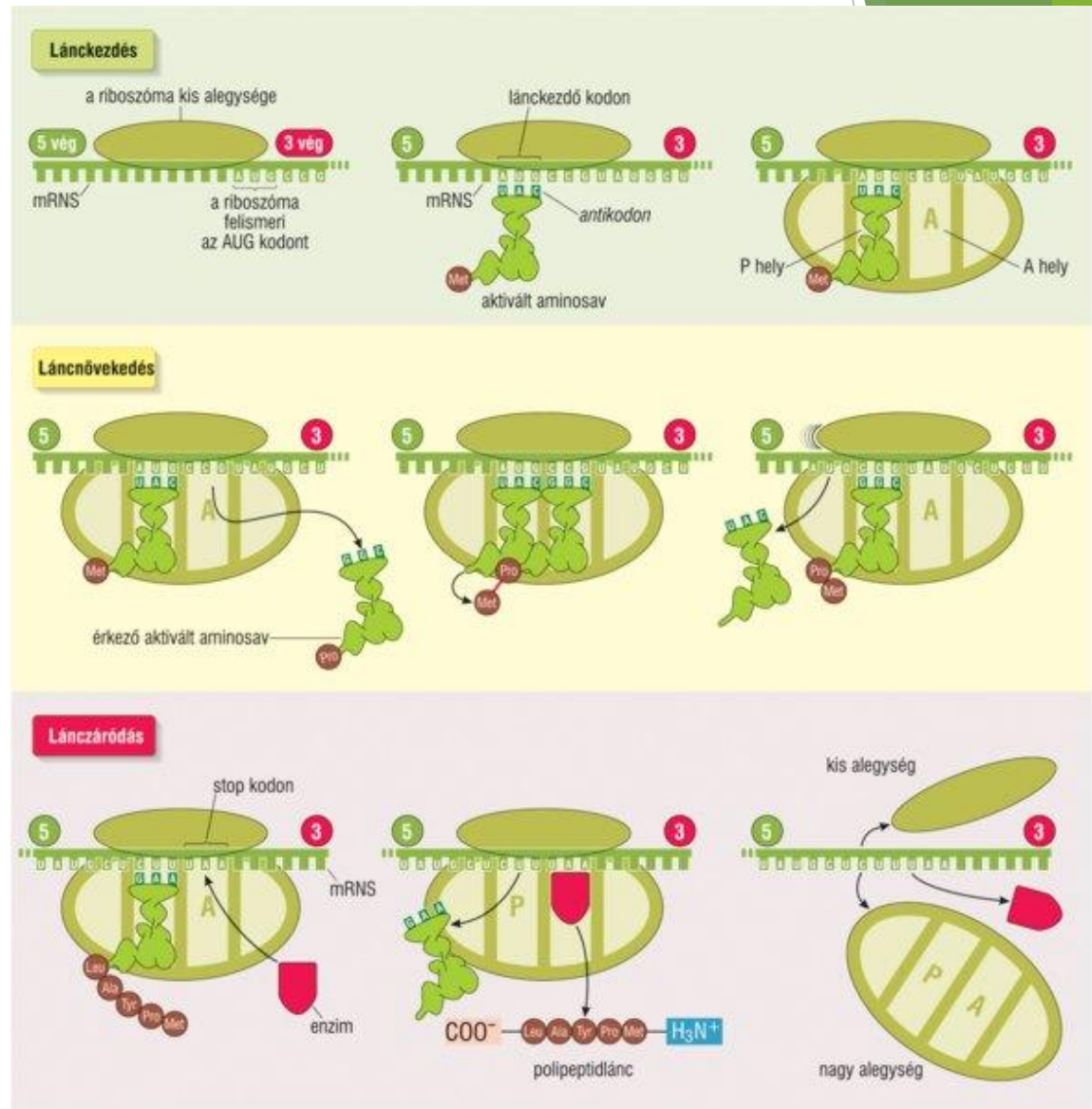
Fehérjeszintézis (transzláció)

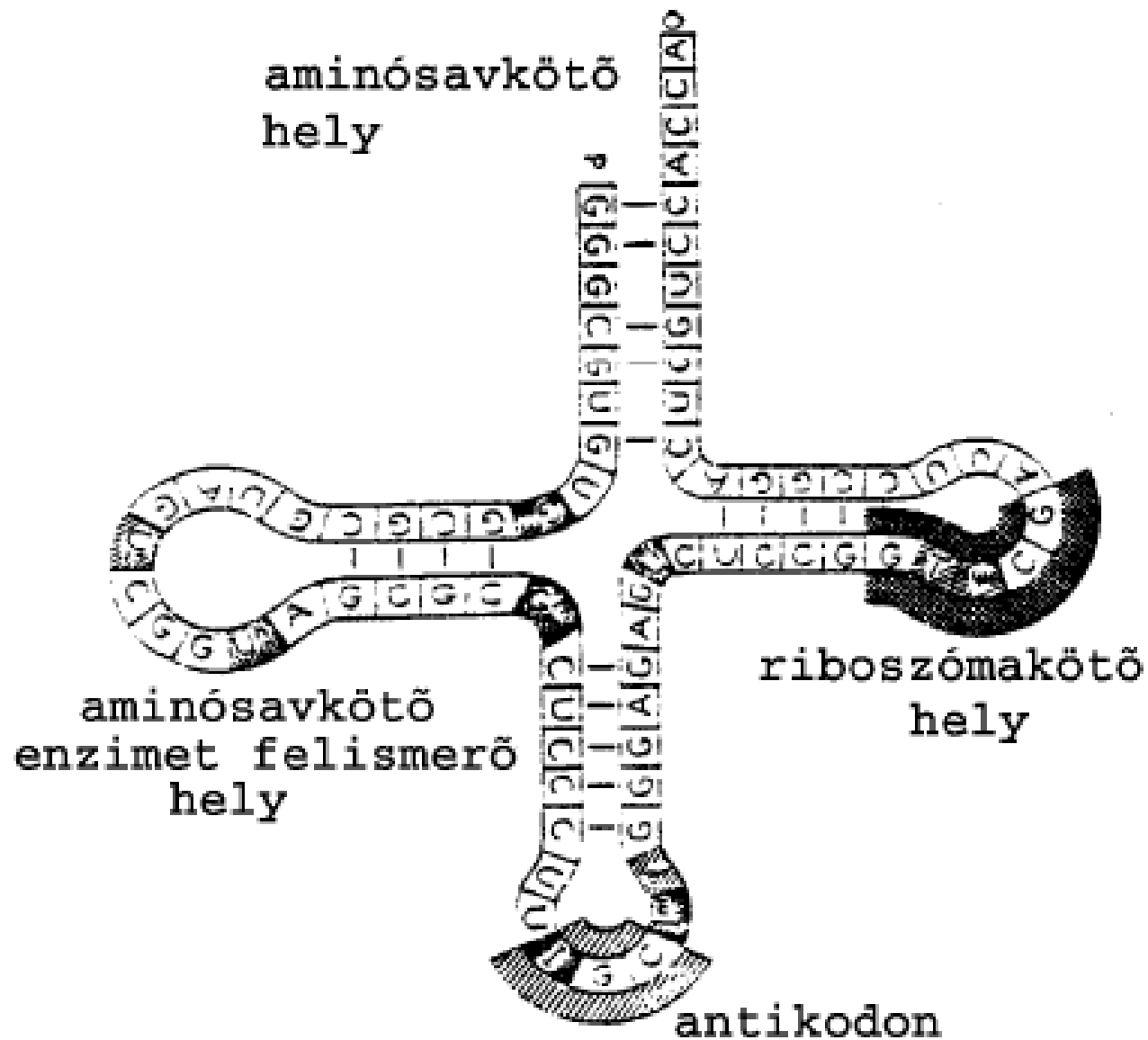
3 szakasz:

▶ Lánckezdés:
INICIÁCIÓ

▶ Lánchosszabbítás:
ELONGÁCIÓ

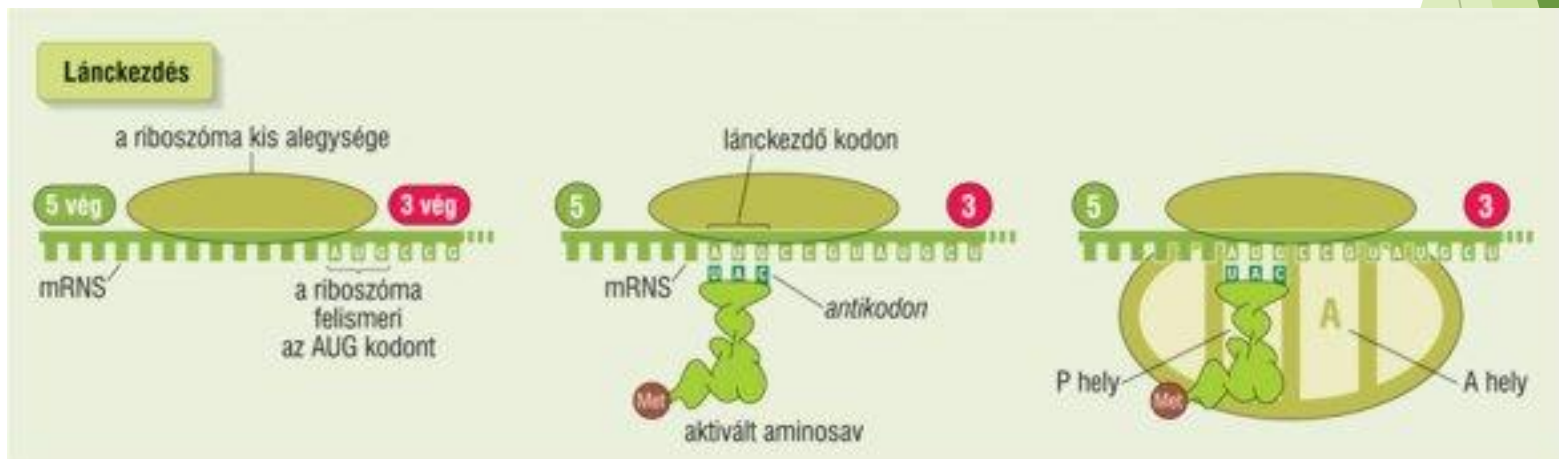
▶ Láncbefejezés:
TERMINÁCIÓ





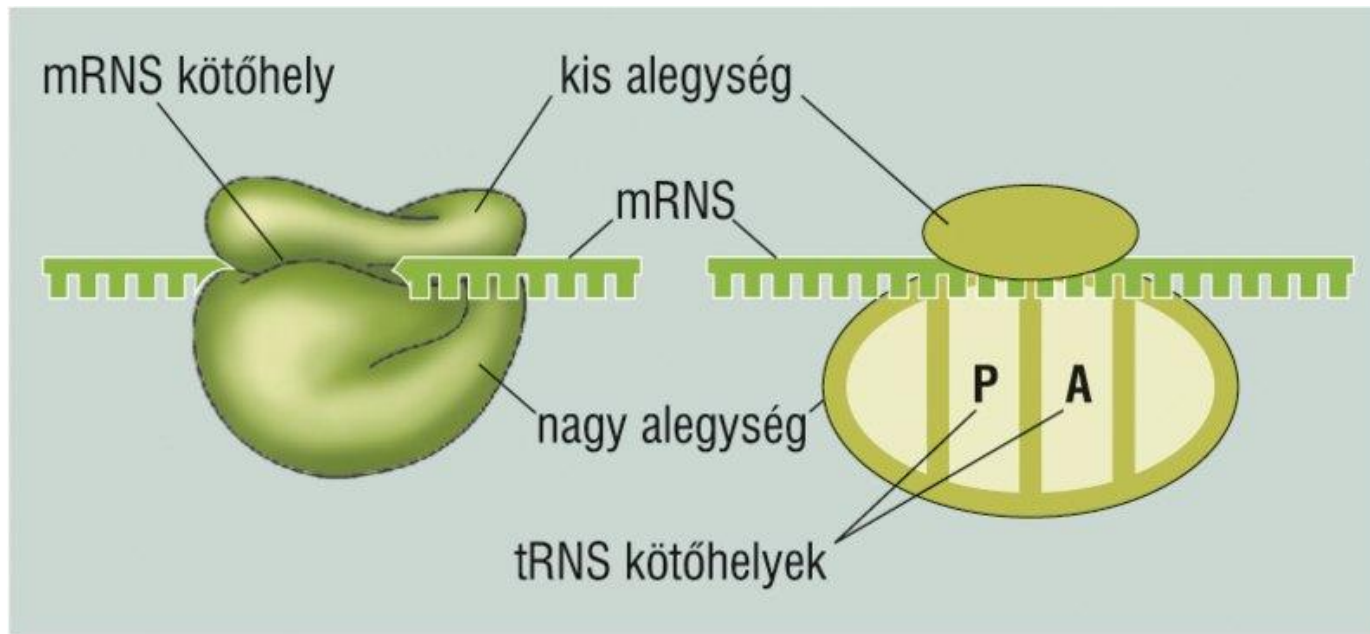
Lánckezdés (iniciáció)

- ▶ Az RNS 5' végén nem kódoló szakaszok vannak (5' UTR = untranslated region)
 1. Az AUG startkodon előtti szakasz elősegíti a riboszóma kis alegységének (40S) kötődését az mRNS-hez (ehhez fehérjékből álló iniciációs komplex is kell)
 2. A lánckezdő start kodonhoz hozzákapcsolódik az első, metionint hordozó (iniciátor) tRNS
 3. Ekkor az iniciációs komplex leválik és a nagy riboszómális alegység (60S) kapcsolódik



Lánchosszabbítás (elongáció)

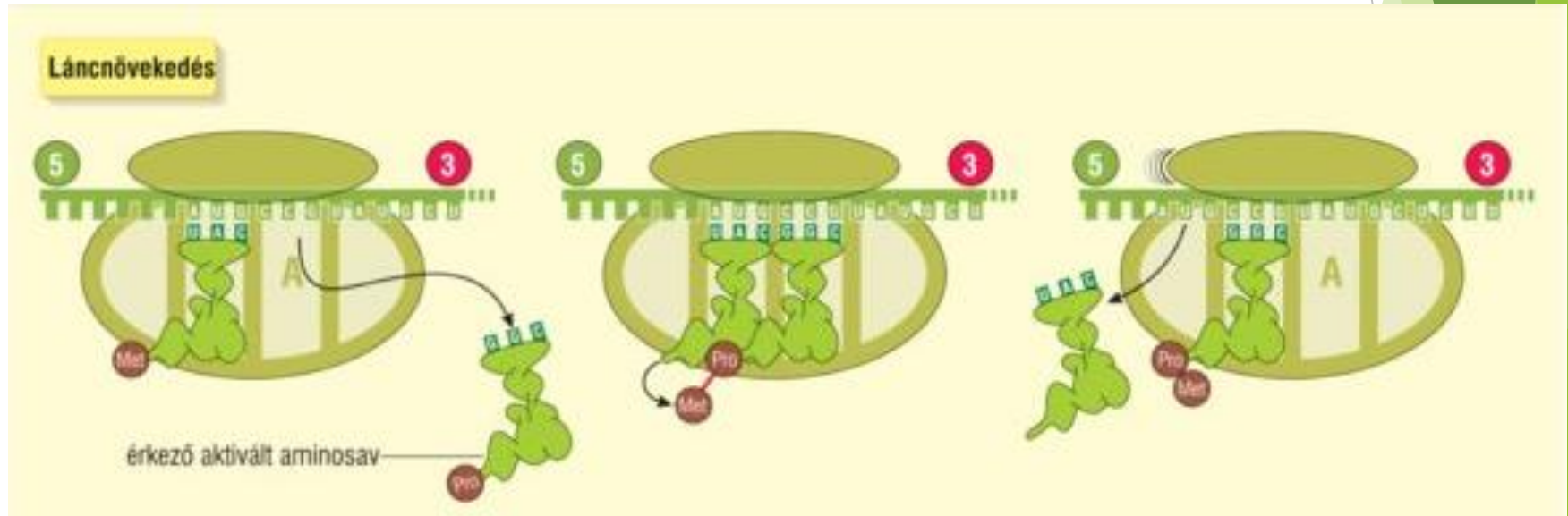
- ▶ A riboszómán P, A és E hely van
- ▶ A (aminoacil): ide kötődik az aminosavat szállító tRNS
- ▶ P (peptidil): peptidkötés kialakítása
- ▶ E (exit): a szabad tRNS (aminosav nélkül) kilép a riboszómából



Lánchosszabbítás (elongáció)

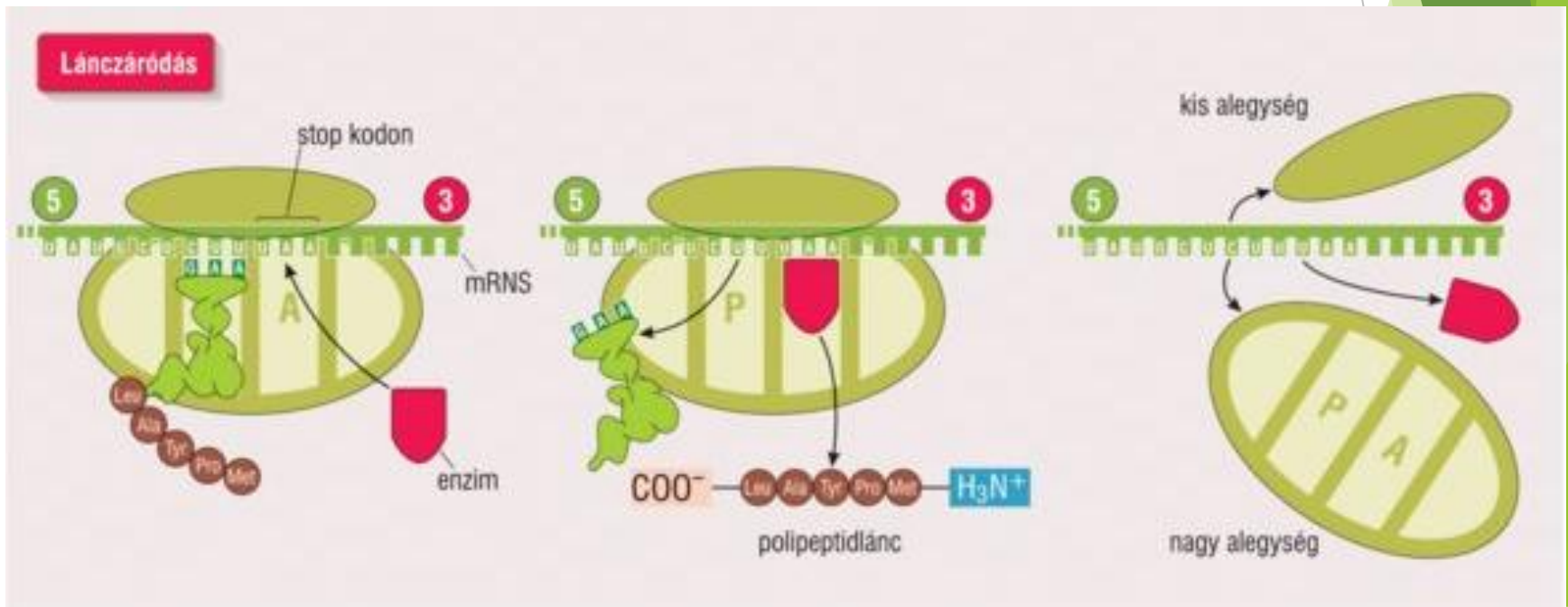
1. Az A helyhez kötődik a polipeptid lánc 2. aminosavát hordozó tRNS (ekkor a lánckezdő metionon a P helyen van)
2. A P helyen levő lánckezdő metionin és a 2. aminosav között kialakul a peptidkötés
3. Transzlokáció: a riboszóma elgördül az mRNS-hez képest. Ekkor az üres első tRNS az E helyen távozik, a második még az aminosavval együtt a P helyre kerül

Energiaigényes!!!



Láncbefejezés (termináció)

1. Az elongáció a stop kodonig tart. Az utolsó tRNS és aminosav átkerül a P helyre.
2. Aminosavat szállító tRNS helyett terminációs faktor ismeri fel a stop kodont (minden kodonhoz tartozik egy). A terminációs faktor az A helyre kötődik
3. Enzimatis úton a polipeptidlánc lehasad a P helyen levő tRNS-ről
4. A riboszóma 2 alegysége szétválik (disszociál), az mRNA szabaddá válik



1. DNA Wrapping

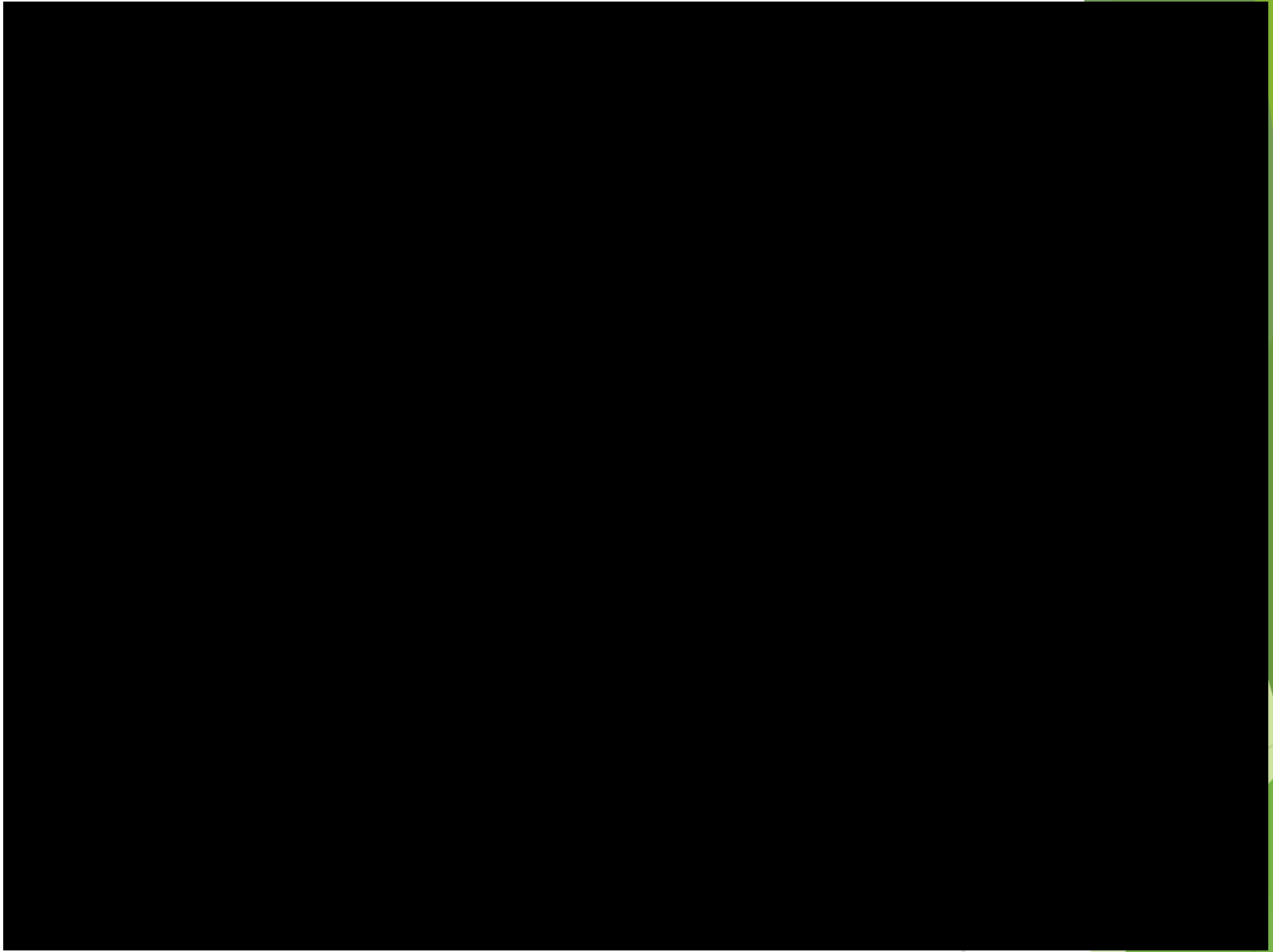
Molecular visualizations of

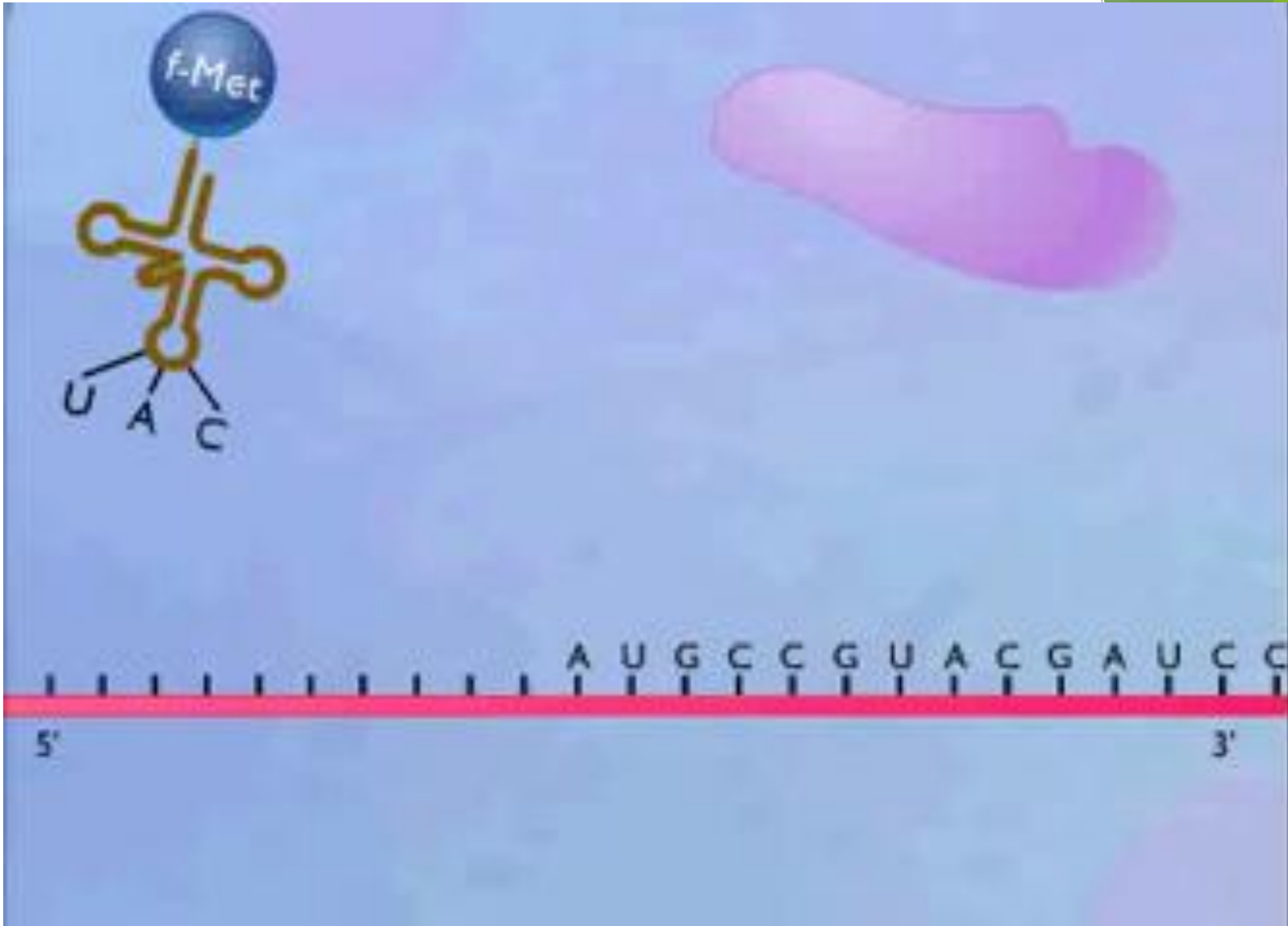
DNA

1. *DNA Wrapping*



www.dnalc.org





Fehérje szint.
Alapfogalmak.
ELISA, RIA

PCR

- ▶ Templát, **primerek**, **nukleotidok (dNTP)**, $MgCl_2$, hőstabil polimeráz (Taq)
- ▶ Denaturáció (A DNS két szála szétválik)
- ▶ Anelláció (**primerek** feltapadása)

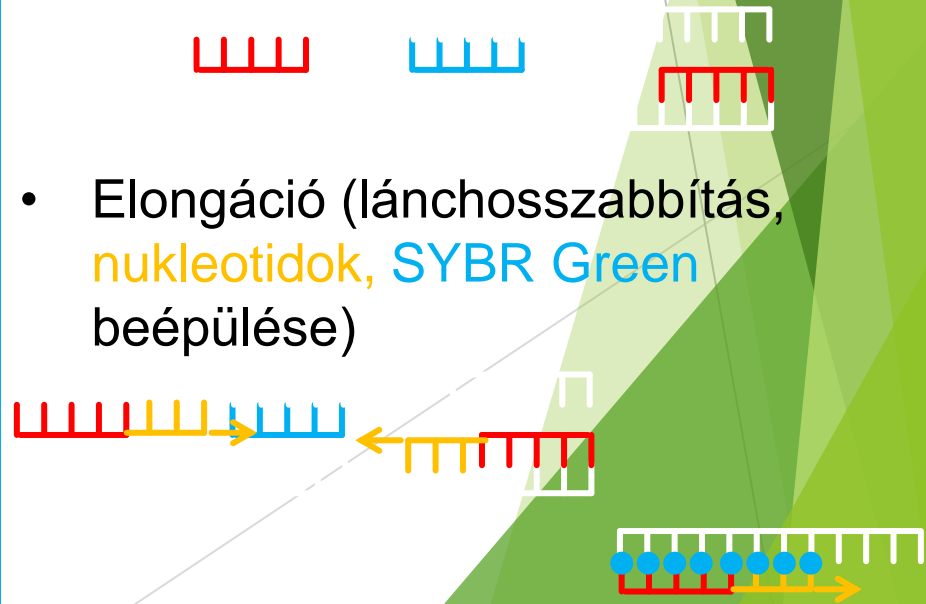


- ▶ Elongáció (láncszabítás, **nukleotidok** beépülése)



Real-time PCR

- Templát, primerek, **SYBR Green/próba**, nukleotidok (dNTP), $MgCl_2$, hőstabil polimeráz (Taq)
- Denaturáció (A DNS két szála szétválik)
- Anelláció (**primerek** és **próba/SYBR Green** feltapadása)
- Elongáció (láncszabítás, **nukleotidok, SYBR Green** beépülése)

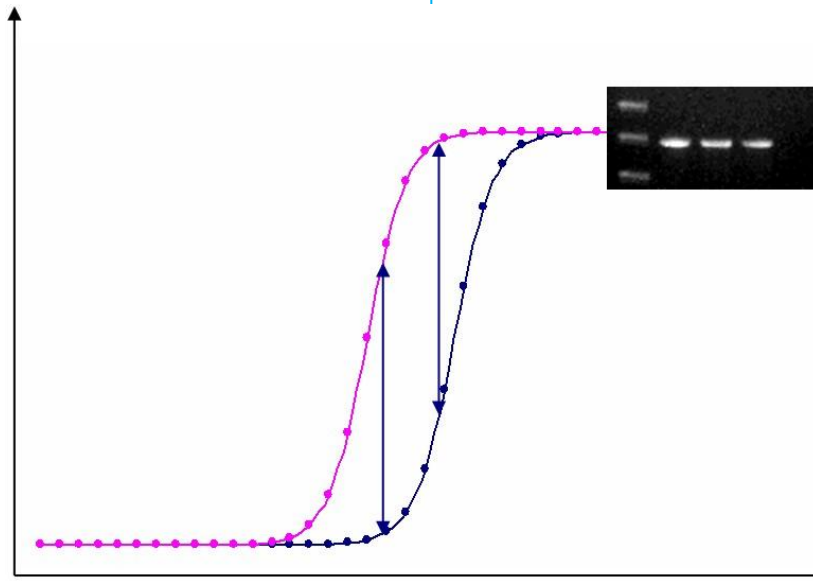


PCR

- ▶ PCR termék kimutatása: csak a folyamat végén (az utolsó ciklus után, amikor a mintákat kivettük a PCR gépből)
- ▶ Csak igen-nem válasz (a kiindulási templát mennyisége nem határozható meg, csak az, hogy tartalmazta-e azt a szekvenciát, amire a primereket terveztük)

Real-time PCR

- PCR termék kimutatása: minden ciklusban (a detektált termék mennyisége 2^n , n =ciklusok száma) (a minták közben a gépen vannak, és a PCR folyamatban van)
- A kiindulási templát mennyisége, így az adott gén kifejeződésének mértéke a mintában jól meghatározható



Génkifejeződés

- ▶ Gének átírása mRNS-sé, majd fehérjévé

GÉN -(transzkripció) → **mRNS** -(transzláció) → **FEHÉRJE**

- ▶ Genetikai kód: bázishármasok (a beépülő aminosavakat és azok sorrendjét a génekről átíródó mRNS-ek bázissorrendje határozza meg)
- ▶ A genetikai kód (majdnem) **univerzális** (minden élőlényben azonos), **egyértelmű** (egy bázishármas egy aminosavat kódol), **degenerált** (egy aminosavat több bázishármas is kódolhat)
- ▶ A bázishármasok (kodonok) aminosavakat kódolnak
- ▶ 20 aminosav
- ▶ Génexpresszió szabályozása: mRNS és fehérje szinten is történhet

Az mRNS bázislármása

1.	2.				3.
	U	C	A	G	
U	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	U
	fenilalanin	szerin	tirozin	cisztein	C
	leucin	szerin	STOP	STOP	A
	leucin	szerin	STOP	triptofán	G
C	leucin	prolin	hisztidin	arginin	U
	leucin	prolin	hisztidin	arginin	C
	leucin	prolin	glutamin	arginin	A
	leucin	prolin	glutamin	arginin	G
A	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	U
	izoleucin	treonin	aszparagin	szerin	C
	izoleucin	treonin	lizin	arginin	A
	metionin*	treonin	lizin	arginin	G
G	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	U
	valin	alanin	aszparaginsav	glicin	C
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	A
	valin	alanin	glutaminsav	glicin	G

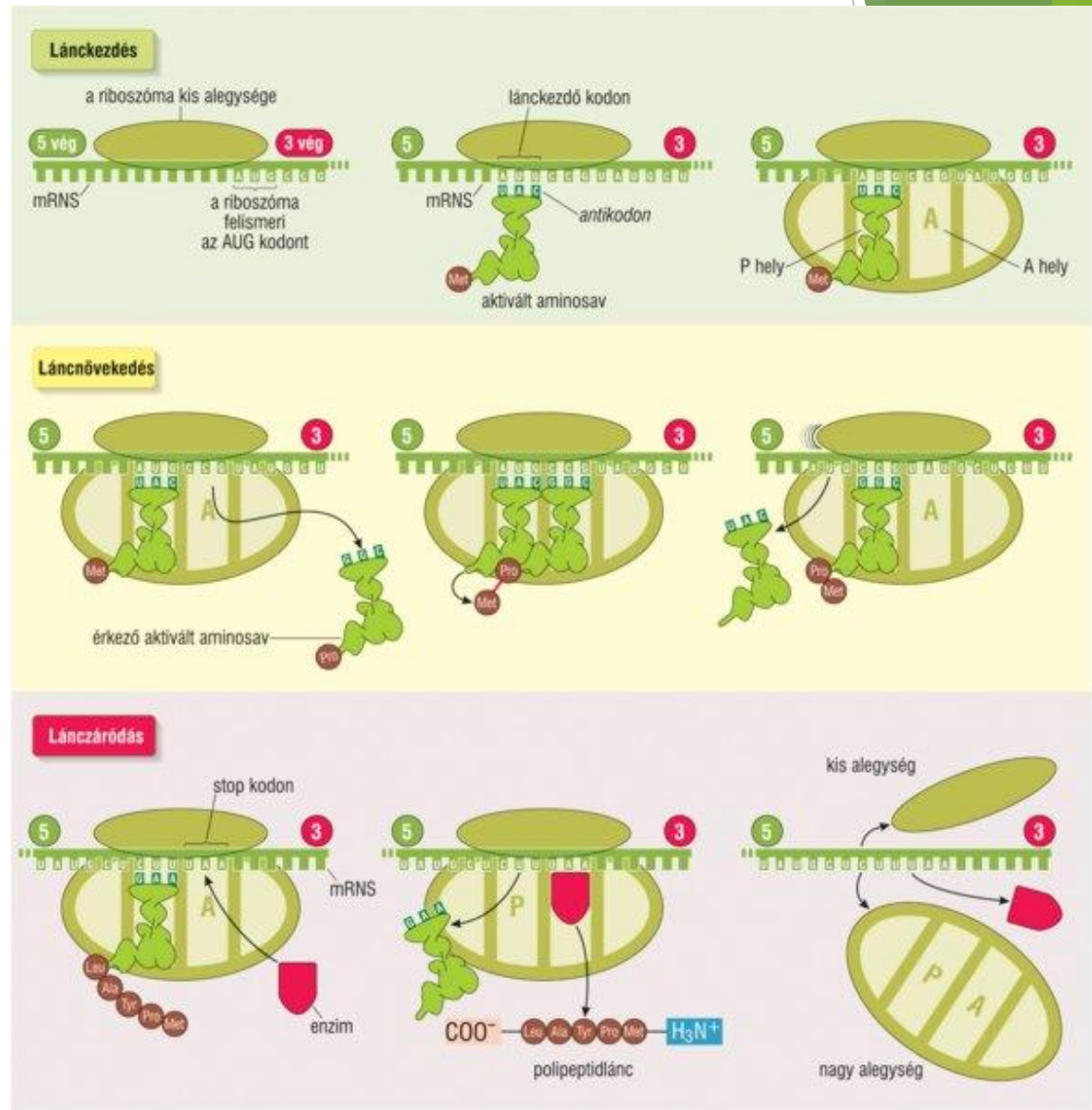
Fehérjeszintézis (transzláció)

3 szakasz:

▶ Lánckezdés:
INICIÁCIÓ

▶ Lánchosszabbítás:
ELONGÁCIÓ

▶ Láncbefejezés:
TERMINÁCIÓ



Miért kellene fehérje szintű vizsgálatok is?

- ▶ Az mRNA expresszió nem mindig felel meg a fehérje expressziónak
- ▶ Bizonyos biológiai minták (pl. szérum, vizelet stb.) nem alkalmasak mRNA expressziós analízisre
- ▶ Poszttranszlációs változások: nem lehet egyértelműen következtetni a DNS szekvencia alapján
- ▶ A fehérjék lokalizációjára és kölcsönhatásaira is lehet következtetni

Transzláció (fehérje) szintű változások okai

Mutációk:

- ▶ Frameshift mutáció (az olvasási keret eltolódik)

.ACG .UCU .AAA .UAC .CGU .UAA .GCU GGA GCC UCG GUA
.THR .SER .LYS .TYR .ARG

↑
stopkodon

.ACG .UCA .AAU .ACC .GUU .AAG .CUG .GAG .CCU .CGG .UAG
.THR .SER .ASN .THR .VAL .LYS .LEU .GLU .PRO .ARG

↑
mutált régió
stopkodon

- ▶ Nonszensz mutáció (aminosavkód stop kodonra cserélődik)
- ▶ Missense mutáció (aminosav csere)
- ▶ Sense mutáció (továbbolvasó mutáció, a stop kodon aminosavkódra cserélődik)
- ▶ Silent mutáció (a kodon cserélődik, de ugyanazt az aminosavat kódolja)

Transzlációs (fehérje) szintű változások okai

A fehérjeszintézisben résztvevő egyik komponens gátlása
(pl. antibiotikumok, toxinok hatására)

Sejtanyagcsere gyengülése vagy fokozódása, sejtpusztulás

Poszttranszlációs módosításokban bekövetkező zavar

Minden a fehérje szintig eljutó, transzkripciós (mRNS) szinten
zavart okozó mechanizmus

Poszttranszlációs módosítások (modifikációk)

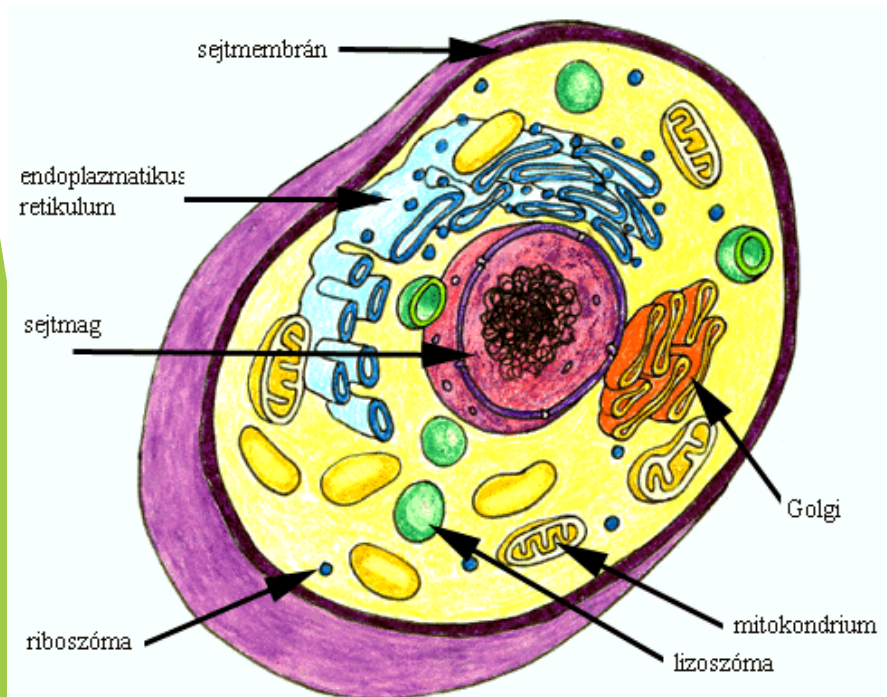
A fehérjeszintézis után a polipeptidlánc enzimatis és nem enzimatis módosításokon esik át

Csoportok a fehérjéhez kapcsolódnak, leválnak, másodlagos kötések alakulnak ki, stb. (a fehérje végleges funkciójának elnyeréséhez és célba jutásához kell)

Enzimatis:

- N- és C-terminális módosítások (pl. lánckezdő metionin eltávolítása, acetiláció)
- Aminosav oldalláncok módosítása (karboxiláció, metiláció)
- Szénhidrát láncok hozzáadása
- Limitált proteolízis
- Prosztetikus csoport hozzáadása
- ...

Nem enzimatis: oxidáció, szerkezetváltás, diszulfid-hidak kialakulása...



Poszttranszlációs módosítások hatásai

Enzimatis

- ▶ Mennyiség: élettartam
- ▶ Szerkezet: 1D, 2D, 3D, 4D
- ▶ Stabilizáció
- ▶ Aktivitás
- ▶ (Immun)felismerés
- ▶ Lokalizáció: (mikro)kompartmentalizáció
- ▶ Kölcsönhatás más, kis- vagy nagymolekulákkal

Nem-enzimatis

- ▶ Denaturáció
- ▶ Funkcióvesztés
- ▶ Aggregáció

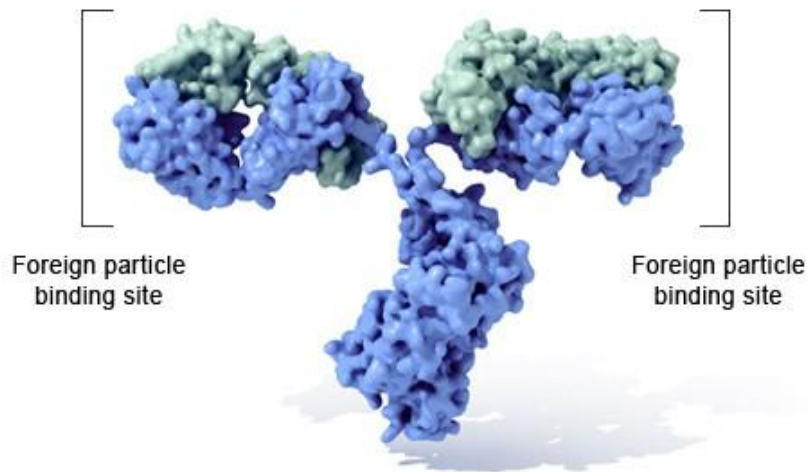
Antigének, antitestek

- ▶ **Antigén:** minden struktúra (sejt, molekula), amit az immunrendszer felismer és immunválaszt vagy immuntoleranciát vált ki
- ▶ **Antitest = ellenanyag** Globin természetű fehérjék, immunglobulinok (Ig).
- ▶ Az antitest egy olyan fehérje, ami egy molekulát képes felismerni és ahhoz hozzá kötődni.
- ▶ A B-limfociták, pontosabban az azokból differenciálódó plazmasejtek termelik. (az immunrendszerhez tartoznak) Képesek egy a test számára nem kívánatos anyag felismerésére és megjelölésére.

Antigének, antitestek

- ▶ Az immunglobulinok jellegzetes doménstrukturájú polipeptidláncokból fölépülő molekulák, melyeknek a felismerésben és a válaszreakciókban van fontos szerepük.

Immunoglobulin G (IgG)



IgG



IgE



IgD



IgM

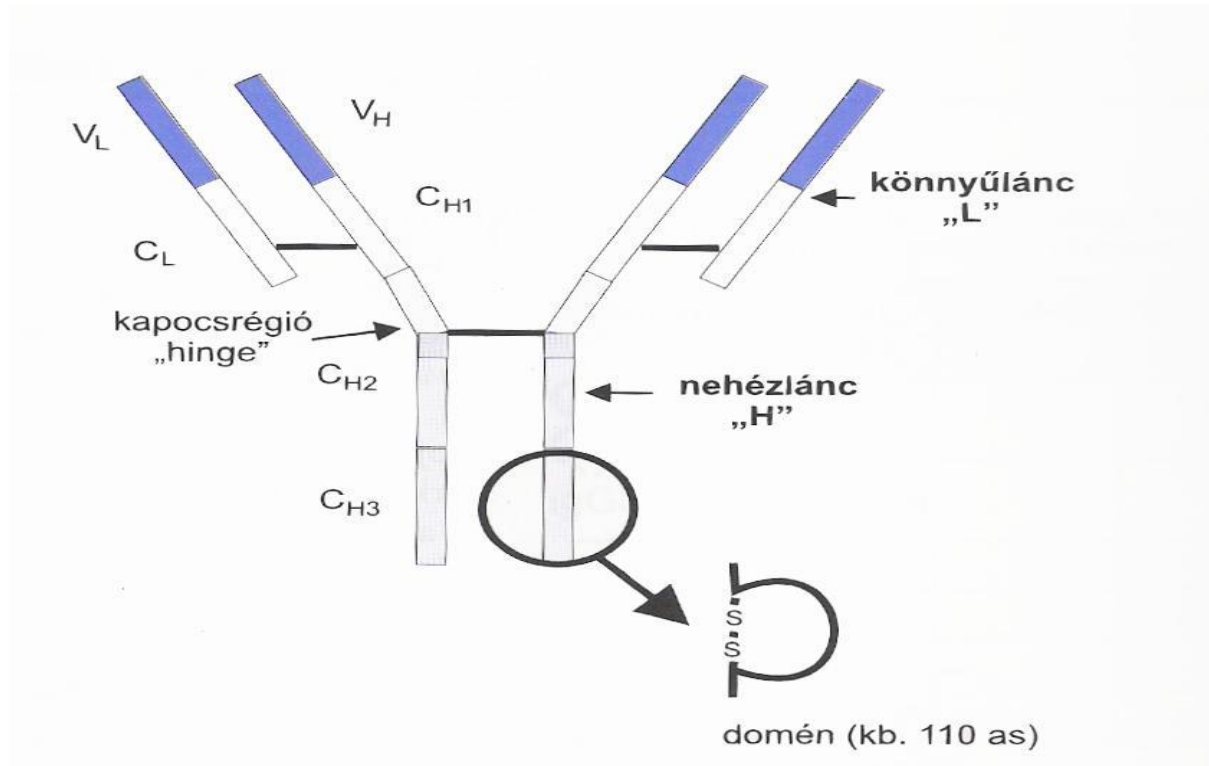


IgA

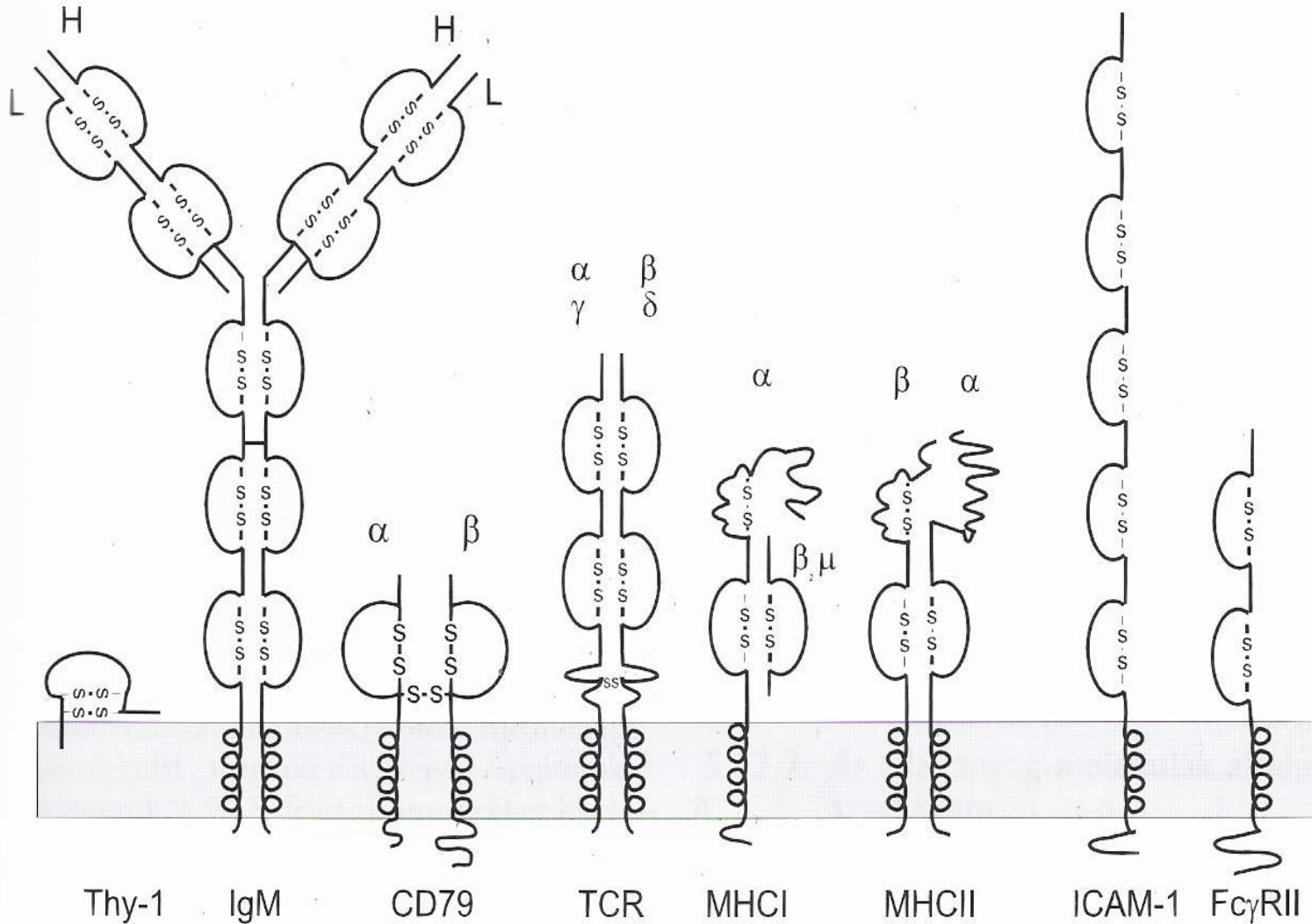


Az ellenanyagok szerkezete

- ▶ Az Ig-molekulák szerkezetére egy négy polipeptidláncból álló, heterodimer egység jellemző, amelynek felépítésében két, egymással azonos könnyű és nehéz polipeptidlánc vesz részt.



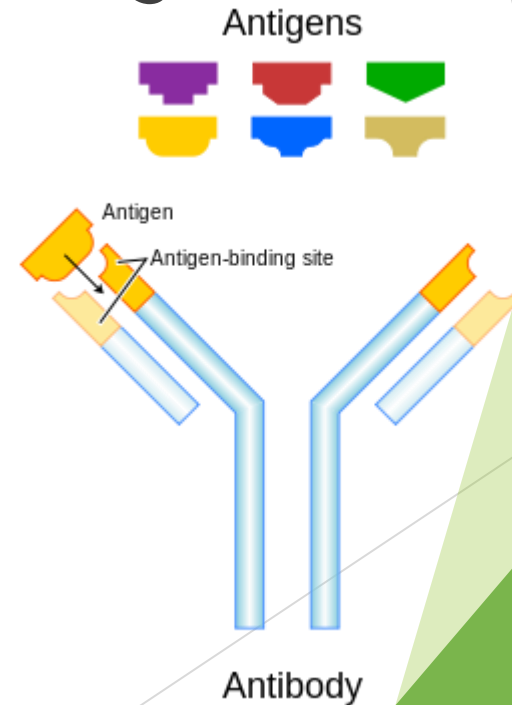
Az ellenanyagok szerkezete



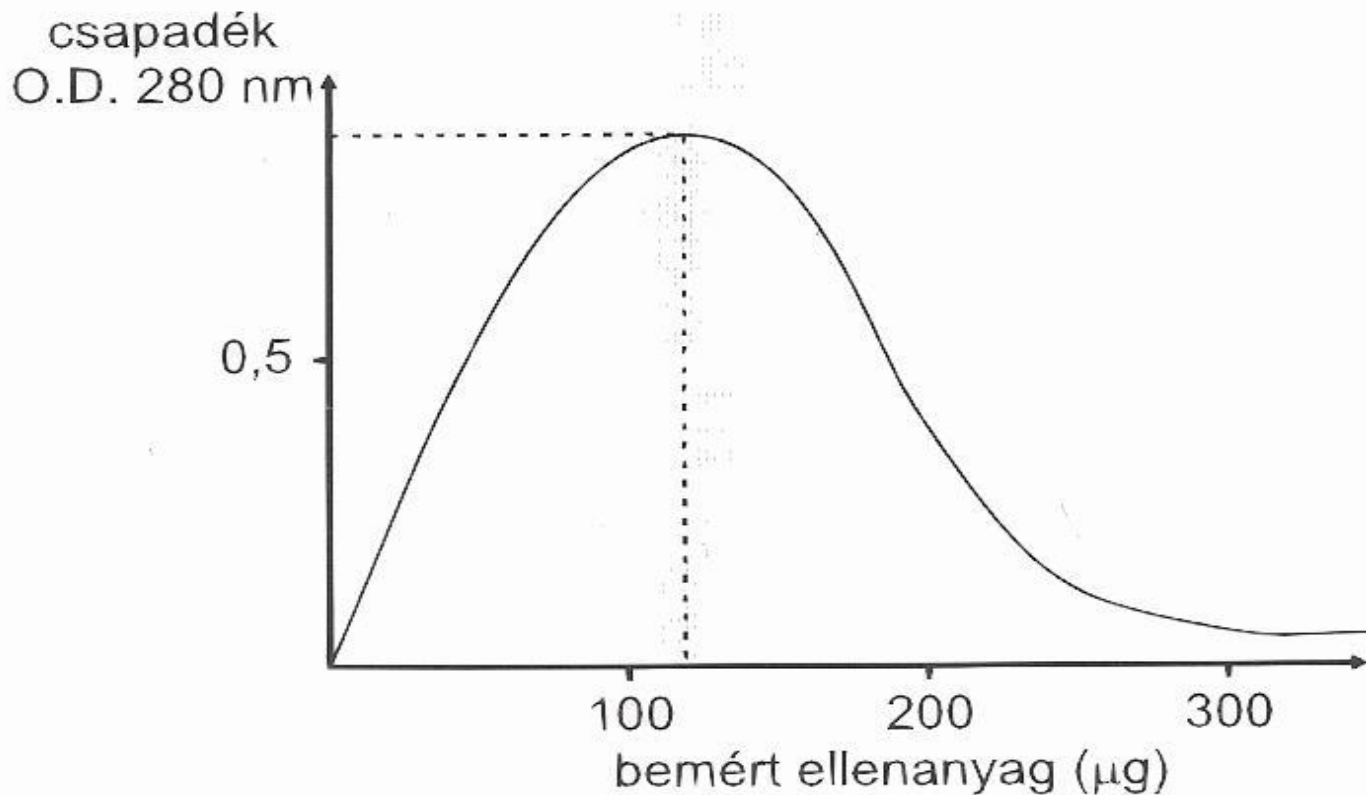
Az antigénkötő hely

Az antigénkötő hely kialakításában a V_L és V_H hipervariábilis részek egyaránt részt vesznek. Az antigénkötő hely a molekulák felszínén található, „zseb” formában.

Az antigén-antitest kapcsolódás legfőbb jellemzősége a specifitás.

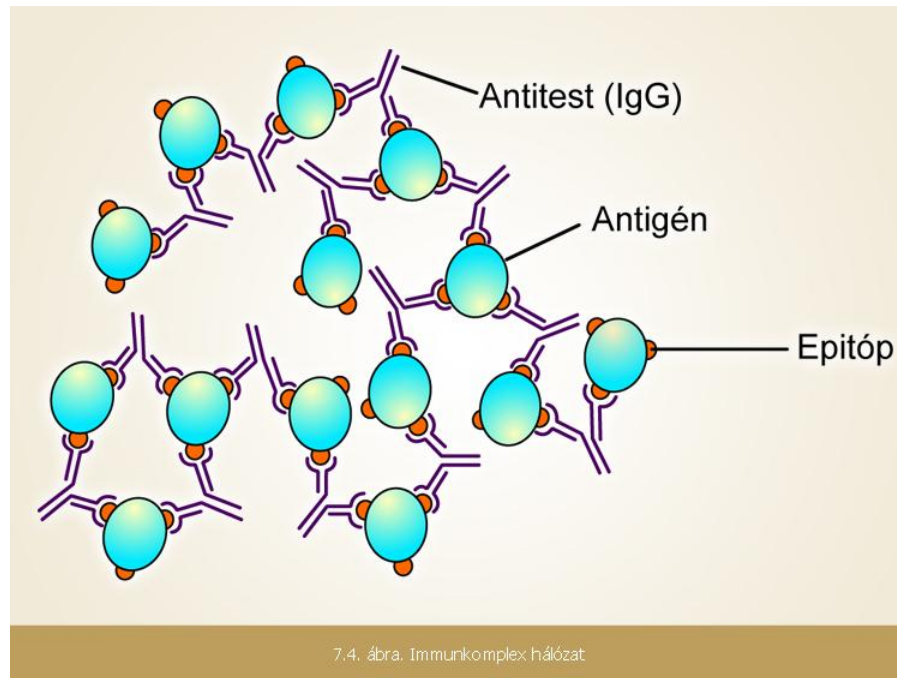


- **Precipitáció:** az oldott antigén és a specifikus ellenanyag kölcsönhatásának eredményeképpen immunkomplex képződik, melyben az antigén-és ellenanyag-molekulák aránya változó.



Precipitációs görbe

- ▶ **Agglutináció:** létrejön ha nem oldott antigének, hanem részecskék reagálnak ellenanyagokkal, az antigén-antitest felületén zajlik le.
- ▶ Az agglutináció annak a következménye, hogy az Ig-molekulák egyik antigén-kötő helye az egyik, a másik antigén-kötő helye a másik sejt felületén lévő epitóphoz kapcsolódik.



Antigén-antitest kapcsolat

- ▶ Az antigén és az antitestek között másodlagos kölcsönhatások, kötések alakulnak ki (H-híd, elektrosztatikus vonzóerők, ionos kötések)
- ▶ Úgy kapcsolódnak, mint ahogyan a kulcs (antigén) illik a zárba (antitest)
- ▶ A kapcsolódás reverzibilis, és az affinitás erőssége a hőmérséklettől, a pH-tól és az oldhatósági viszonyoktól függ.
- ▶ Ha ezek a körülmények változnak, az ugyanazon antigénnel és antitesttel végzett vizsgálatok (pl. ELISA) eltérő eredményeket adnak.

Alkalmazott ellenanyagok

- ▶ Ellenanyagok szintén csoportosíthatók mint elsődleges (primer) vagy másodlagos (szekunder) ellenanyagok.
- ▶ Primer ellenanyagok az érintett antigén ellen termeltetik.
- ▶ A másodlagos ellenanyagokat az elsődleges ellenanyagok ellen termeltetik egy más emlős fajban (pl. anti-humán kecske IgG).

Alkalmazott ellenanyagok

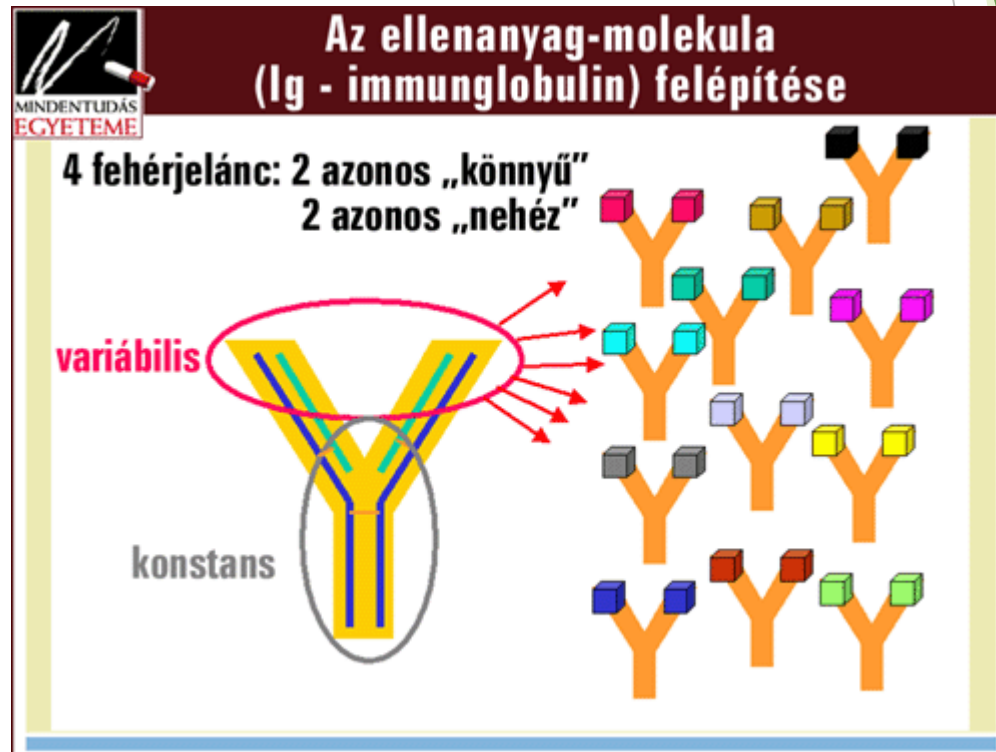
- ▶ A specifikus detektálásra alkalmazott ellenanyag lehetnek poliklonális vagy monoklonális eredetűek.
- ▶ A monoklonális ellenanyagok általában nagyon specifitást nyújtanak (keresztreakciók elkerülhetőek).
- ▶ A poliklonális ellenanyagok a peptid antigének állatokba való ismételt injektálásával (ismétlő oltás) a másodlagos immunválasz eredményeként teljes vérszérumból izolálhatók. Heterogén keverékek, amelyek több epitópot ismernek fel.

Jelölési lehetőségek

- ▶ Biotinnal (avidinhez kapcsolódik)
- ▶ Enzimmel (pl alkalikus foszfatáz vagy tormaperoxidáz (HRP))
- ▶ fluroescens (pl. Alexa Fluor vagy FITC).
- ▶ A fehérje mennyiséget denzitometriás analízissel mérik (A festődés intenzitása korreláltatható a fehérje mennyiséggel).

Immunoassay

- ▶ Biokémiai tesztek melyekben az antigén- antitest kölcsönhatásait használják fel



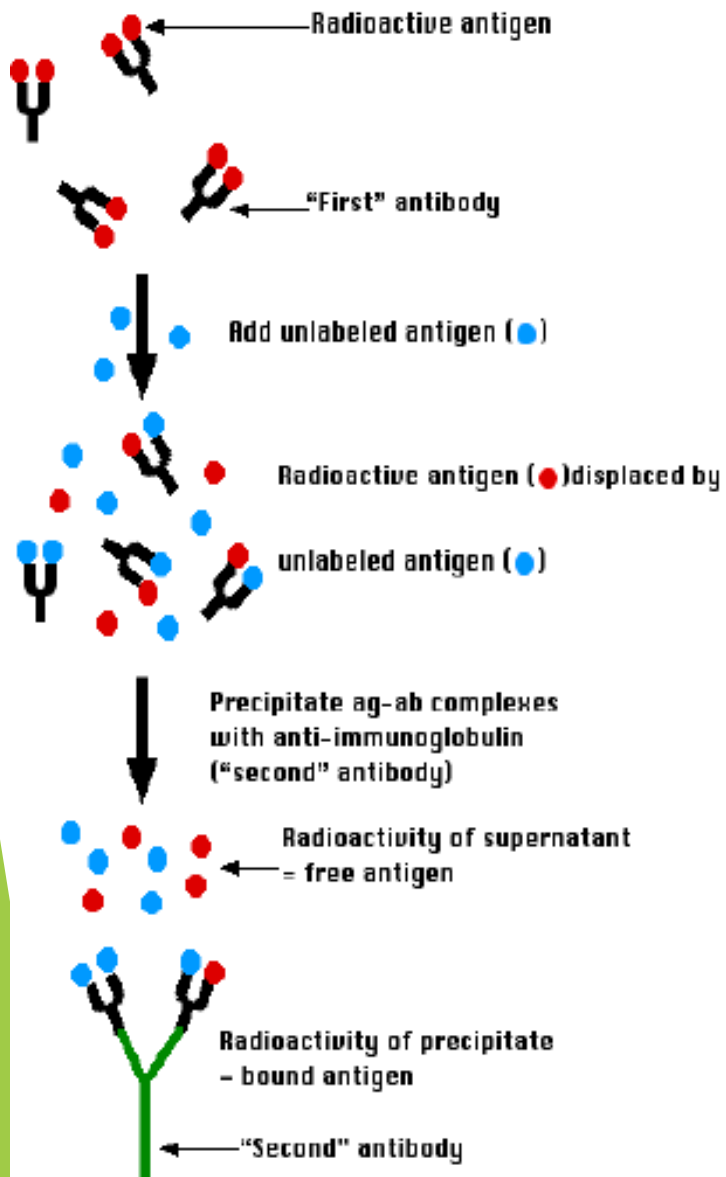
Immunoassay

- ▶ **Kompetitív:** ha az egyik reagens (Ab vagy Ag) jelzett és jelzetlen formája túlsúlyban van a másik reagenshez képest, ezért a jelzett és jelzetlen molekulák versenyeznek
- ▶ **Nem kompetitív:** szendvics módszer
- ▶ **Heterogén** módszerről beszélünk, ha szükség van jelzett anyagok elválasztására; ellenkező esetben a módszer **homogén**

Szendvics módszer

- ▶ két olyan ellenanyag kell, amely a mérendő makromolekula különböző, egymástól elég távoli részletéhez köt
- ▶ az első antitestet egy műanyag felülethez kötik kovalensen/adszorpcióval (a variábilis régió szabad)
- ▶ a mintát a kiszárított műanyag edénybe töltjük (csak annyi antigén, hogy az edény falán levő antitest ne telítődjön), majd inkubálják
- ▶ a mintát kiöntik és öblítés után az edénybe töltik a második, jelzéssel ellátott antitestet feleslegben
- ▶ az antigén az edény falán két különböző antitest között kötve helyezkedik el („szendvics”)
- ▶ a felesleges jelzett anyagot kiöntik és öblítés után mérik a jelzett antitest mennyiségét (jelzés lehet radioaktív, **RIA**)

RIA (Radioimmuno Assay)



- ▶ Általában I^{125} vagy I^{131} izotópot használnak jelzésre, ekkor pl. az antigén egy aromás gyűrűjébe visznek be radioaktív jódot.
- ▶ A mért jelintenzitást - radioaktív beütések száma percenként - ábrázolják a jelzetlen antigén koncentrációja - logaritmusának - függvényében

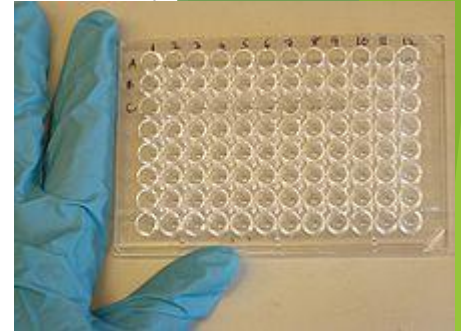
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Fehérje alapú immunoanalitikai módszer

Antigén-antitest reakciók kvantitatív mérésén alapul

A **specifikus reakció valamelyik résztvevőjét** (az antigént vagy az ellenanyagot) **jelöljük** (enzimmel), így a kérdéses alkotó kis mennyisége is kimutatható.

Az immunkomplex **egyik tagját szilárd fázishoz** (polisztrén mikrotiter lemez) **rögzítjük** (ez lehet az antigén vagy az antitest)



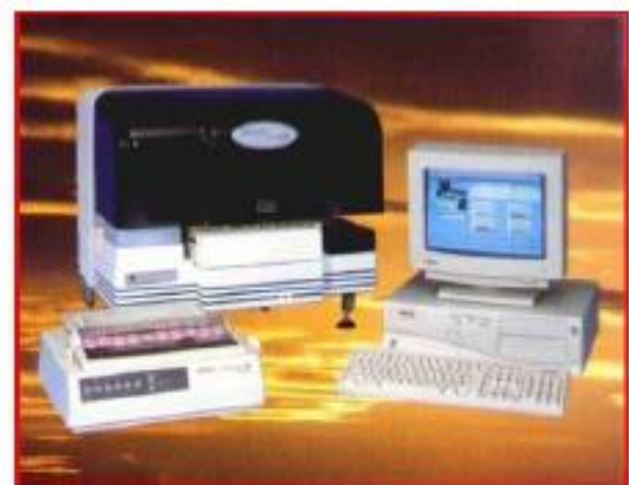
Hozzáadjuk az immunkomplex másik jelzett tagját. Bizonyos reakció idő eltelte után a nem kötődött ligandumot lemoszuk.

Az immunkomplex mennyiségét **konjugált enzimének reakciója** segítségével határozzuk meg.

Stabil szerkezetű enzimek, könnyen hozzáférhető szubsztrátjuk van és amelyet az enzim színes jól oldódó terméké alakít.

(pl. tormaperoxidáz, alkalikus foszfatáz)

Az enzim-szubsztrát reakció mértékét, azaz az átalakult szubsztrát mennyiségét fotometriásan mérjük.



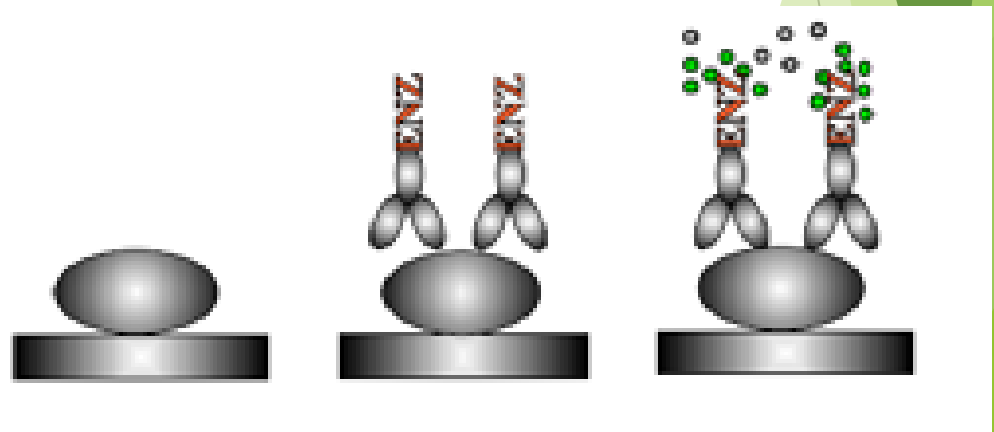
ELISA fajtái

kompetitív vagy **nem kompetitív** immunelemzések

A jelölt reaktáns közvetlenül (**direkt**) vagy közvetten (**indirekt**) kapcsolódhat a meghatározandó antigénhez vagy antitesthez.

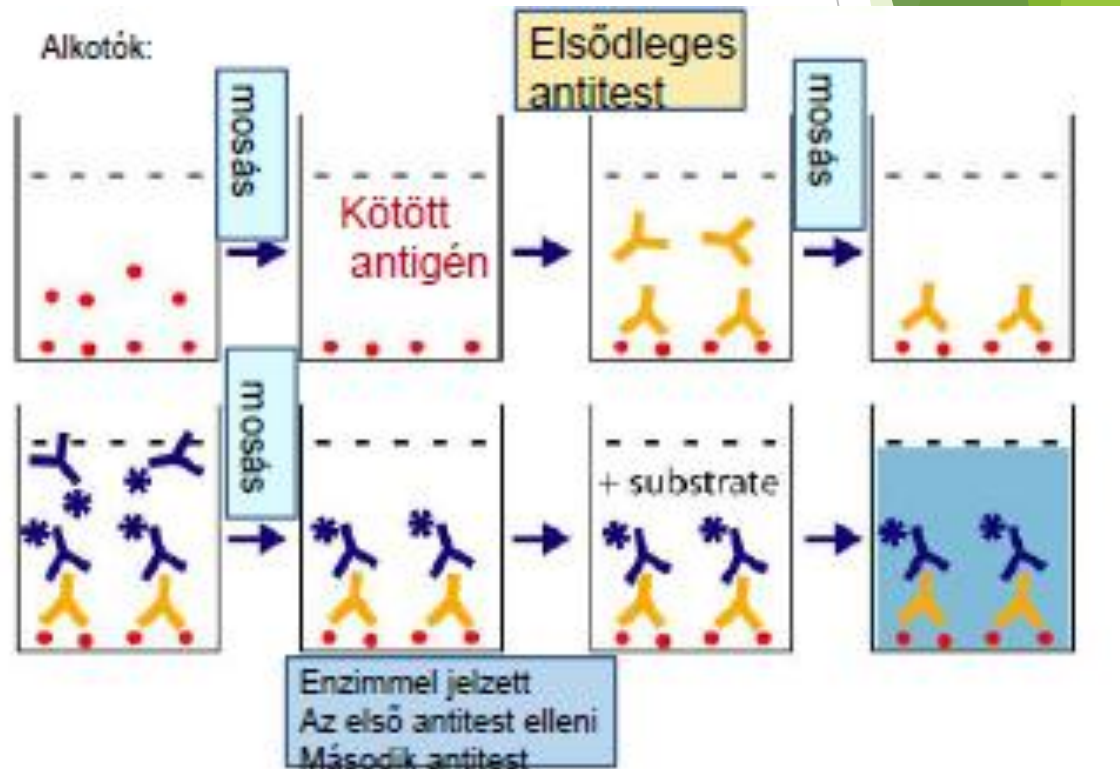
Direkt ELISA:

1. Antigén lemezre rögzítése
2. Inkubálás enzimmel jelölt antitesttel, mosás
3. Szubsztrát hozzáadása
4. Leolvasás



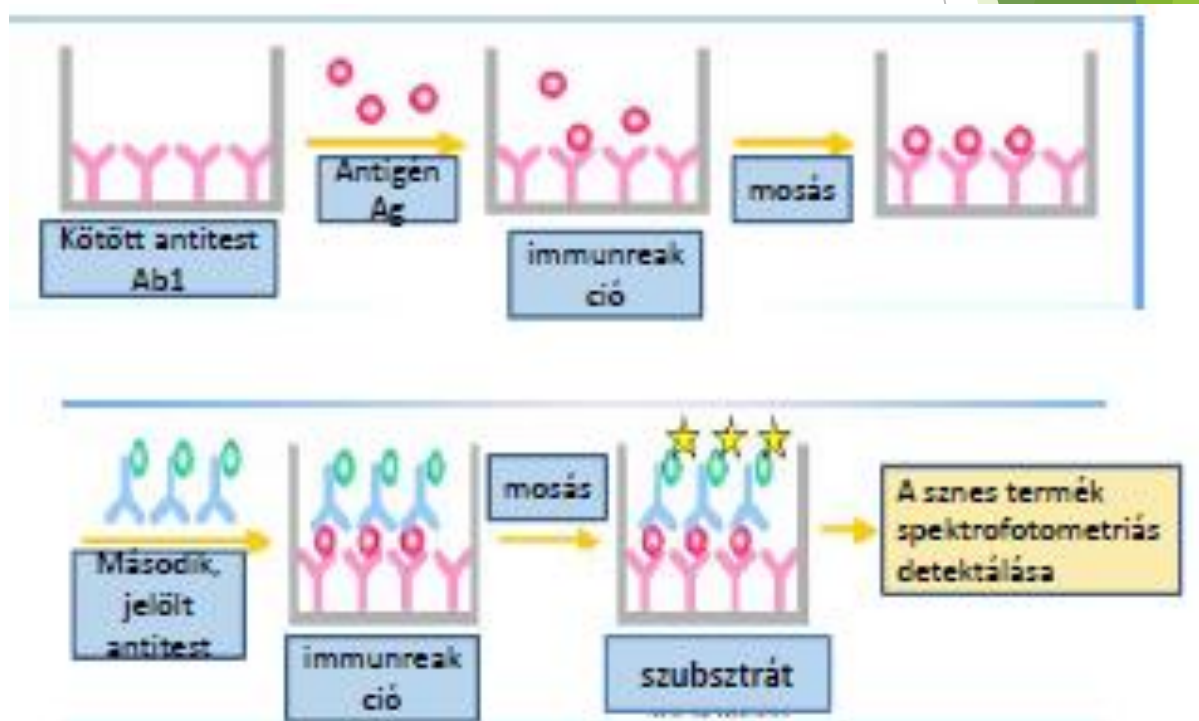
Indirekt ELISA:

1. Antigén lemezre rögzítése
2. Inkubálás elsődleges antitesttel, mosás
3. Inkubálás enzimmel jelölt másodlagos antitesttel, mosás
4. Szubsztrát hozzáadása
5. Leolvasás



Szendvics ELISA:

1. Első antitest a lemezhez rögzítve
2. Antigént tartalmazó minta hozzáadása, inkubálás, mosás
3. Enzimmel jelölt második antitest hozzáadása, inkubálás, mosás
4. Szubsztrát hozzáadása
5. Leolvasás



Immunoassay módszerek

1. Radioimmunoassay (RIA)
2. Immunradiometrikus assay (IRMA)
3. Enzimimmunoassay módszerek (EIA, ELISA, EMIT)
4. Mikrorészecske-enzimimmunoassay (MEIA) pl.: Abbott IMX
5. Fluoreszcenciapolarizációs immunoassay (FPIA) pl. Abbott TDX
6. Abbott AXSYM
7. Fluoreszcencia enzimimmunoassay (FIA, DELFIA)
8. Gázkromatográfia
9. Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)
10. Fotometria, kémiai reakció után
11. Fluorimetria, kémiai reakció után
12. Affinitáskromatográfia immunoassay (ACMIA) pl.: Dade ACA
13. Radiális megoszlási immunoassay (RPIA) pl. Dade STRATUS
14. CEDIA (Clone enzyme directed immunoassay)
15. Lumineszcencia, kemilumineszcencia immunoassay (LIA, SPALT)
16. Elektrokémiai lumineszcencia immunoassay pl.:ELECSYS
17. Lumineszcencia erősített enzimimmunoassay (LEIA, LIEMA) pl.: IMMULITE
18. Többrétegû film (MF-FIA) pl.: OPUS
19. ELFA-technika (Enzyme Linked Fluorescence Assay), pl.: Biomerieux VIDAS
20. Nefelometria, Turbidimetria
21. MTM (multilayer-tesztmodul), ETM (ELISA-tesztmodul) pl.: Behring OPUS

Proteomika

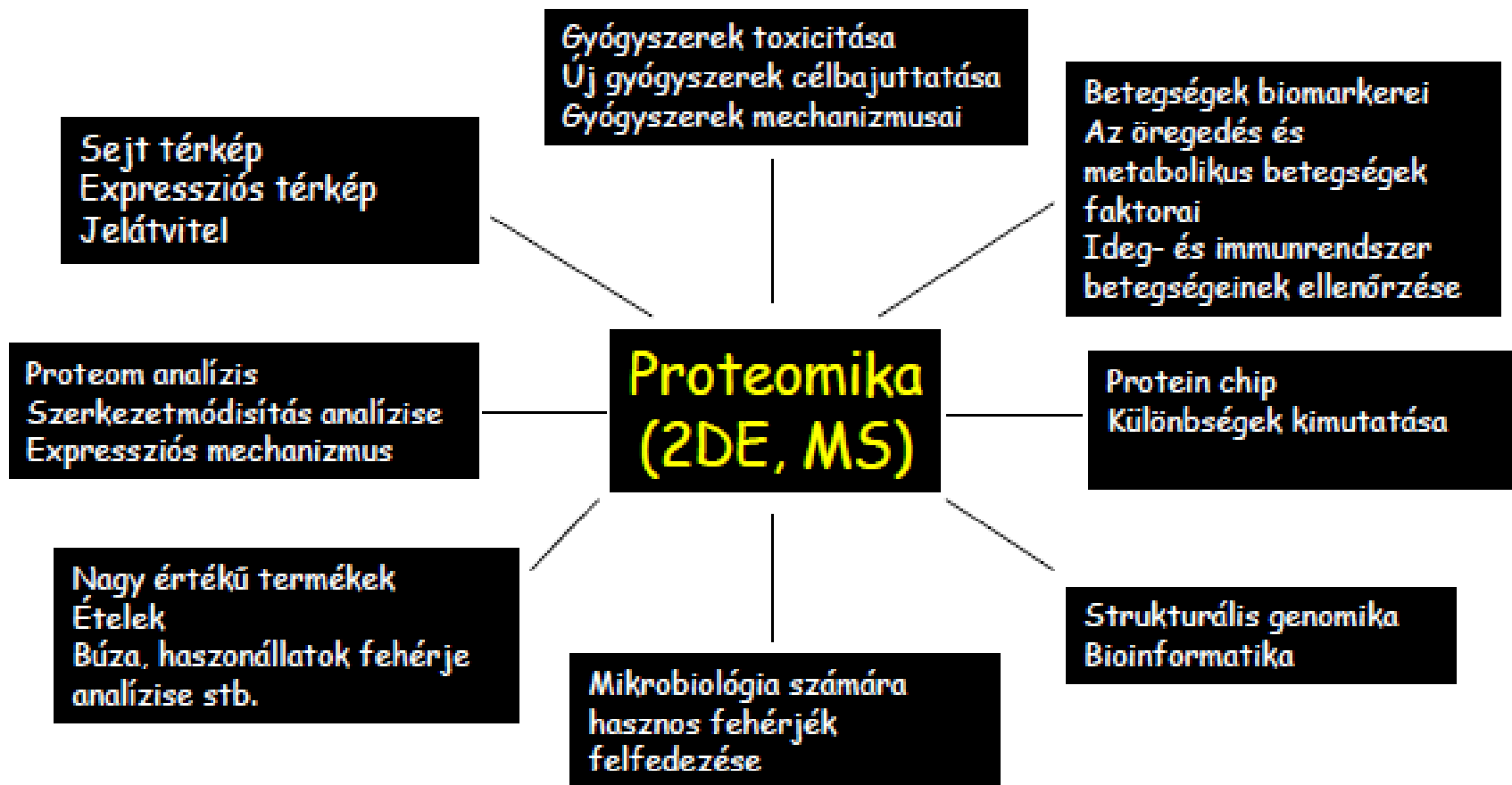
Proteom: Egy szervezet, egy sejt, egy organelum vagy egy vírus összes proteinje, a szervezet teljes fehérjeállománya

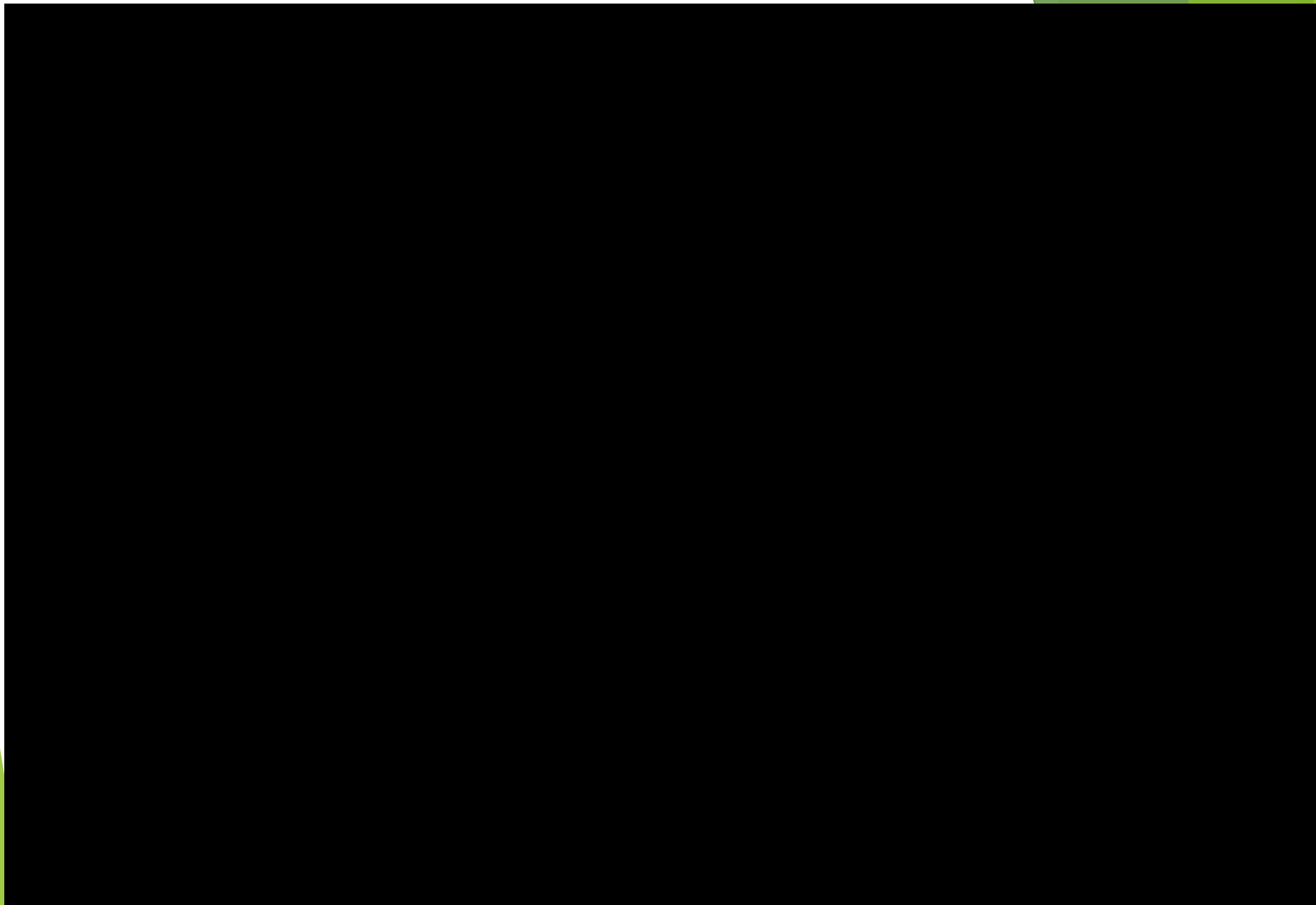
Proteomika:

1. Proteomok kvalitatív és kvantitatív analízise, összehasonlítása különböző körülmények között (kezelt vs. kontroll)
2. Azonosítás (szekvencia, 3D szerkezet) és fehérjemódosítások
3. Kísérleti megfigyelések összegyűjtése adatbázisban
4. A fehérjék alábbi tulajdonságainak meghatározása:

Lokalizáció, módosítások (pl. poszttranszlációs módosítások), kapcsolatok (pl. metabolikus és jelátviteli utak), aktivitás, funkció (predikció és kísérleti eredmények alapján)

A proteomika alkalmazásai





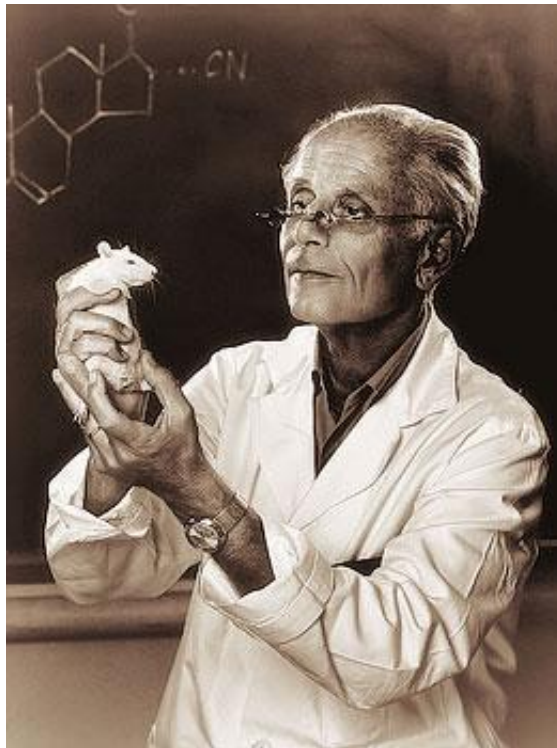
A stresszválasz biokémiai háttere, génkifejeződés megváltozása



Stresszválasz

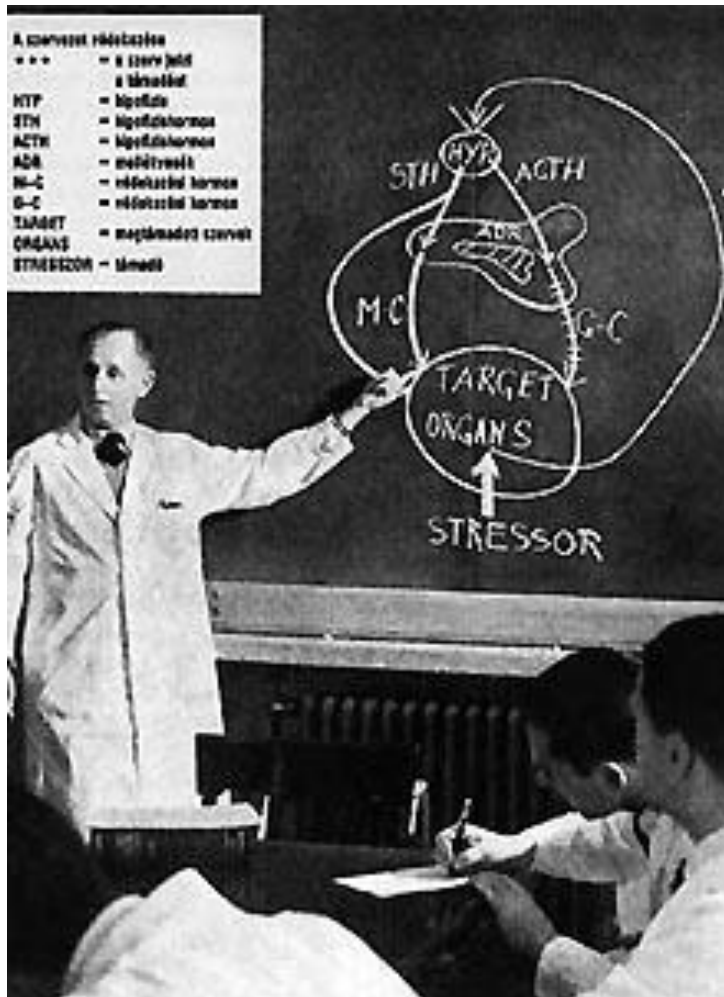


- ▶ Selye János (1936. Nature)
- ▶ A szervezet egészét tekintve értelmezte a stressz folyamatát.



- A stressz az a nem specifikus válasz, amellyel a szervezet reagál a kihívásokra, ingerekre (Selye, 1976).
- nem specifikus: az ingerek - függetlenül az eredetüktől - alkalmazkodásra készítetik a szervezetet.
- **Stresszor**: stresszválaszt kiváltó inger
- **Adaptációs szindróma**: A stresszor hatására bekövetkező testi reakciók összessége.

A stressz meghatározása



- ▶ A stressz egy nem specifikus reakció, mellyel a szervezet reagál minden kihívásra, minden erőteljes ingerre
- ▶ A stressz lehet:
 - ▶ patogén (kóros ill. káros): ez a **distressz**
 - ▶ kellemes, kívánatos: ez az **eustressz**
 - ▶ „a stressz az élet sava borsá” (Selye János)

Megterhelés és igénybevétel, stresszor és stressz

▶ Megterhelés (ok) és igénybevétel (okozat)

- ▶ **Megterhelés:** minden olyan külső hatás és a szervezet belső környezetében lezajló változás, amely befolyásolja a szervezet alkalmazkodási mechanizmusát.
- ▶ **Igénybevétel:** a megterhelések hatására bekövetkező, egyénenként különböző mértékű, jellegű és irányú funkció-változások összessége.

▶ Stresszor (ok) és stressz (okozat)

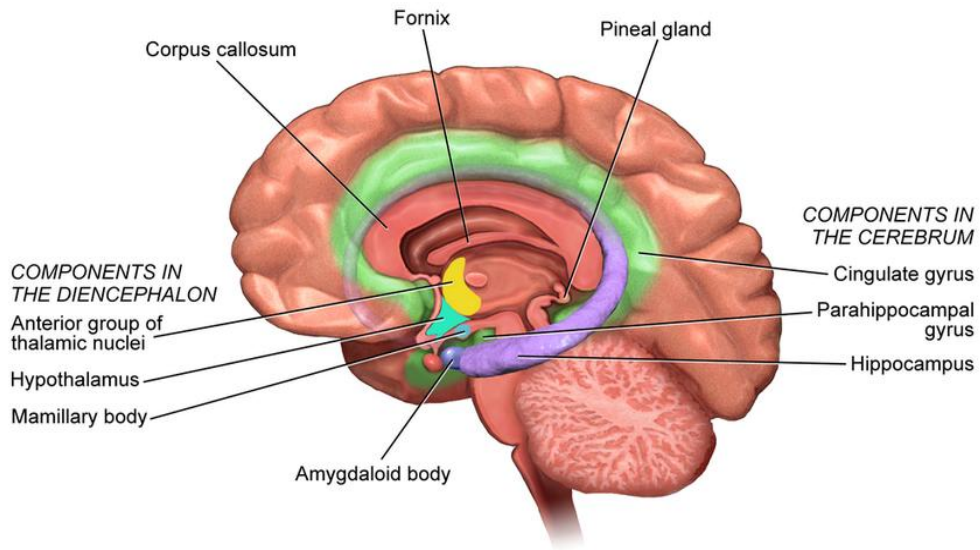
- ▶ **Stresszor:** tragikus esemény
- ▶ **Stressz:** állapot, amelyet az állatra ható stresszorok idéznek elő.



Stresszválasz

- ▶ Elsőként az agy eldönti, hogy stresszhelyzetről van-e szó.
- ▶ Külső ingerek (látás, hallás, szaglás, fájdalomérzet, stb.) és emlékek alapján
- ▶ Ha stresszhelyzet: hipotalamusz (a köztiagynak a talamusz alatti részén található, vékony agyállományból álló lemez) aktiválódik, jeleket küld az agyalapi mirigy, mellékvese kéreg, mellékvese velő felé
- ▶ A hipotalamusz az agy szinte minden részével kapcsolatban áll, kaphat információt (limbikus rendszer, érzőkéreg)

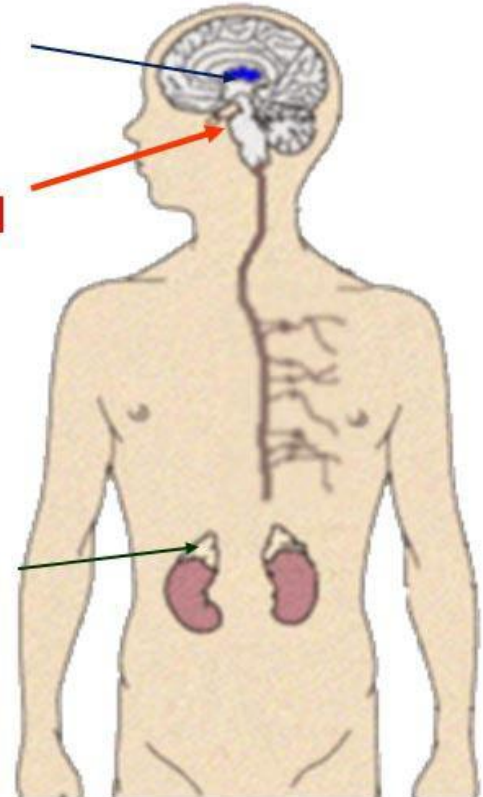
The Limbic System



Hypothalamus

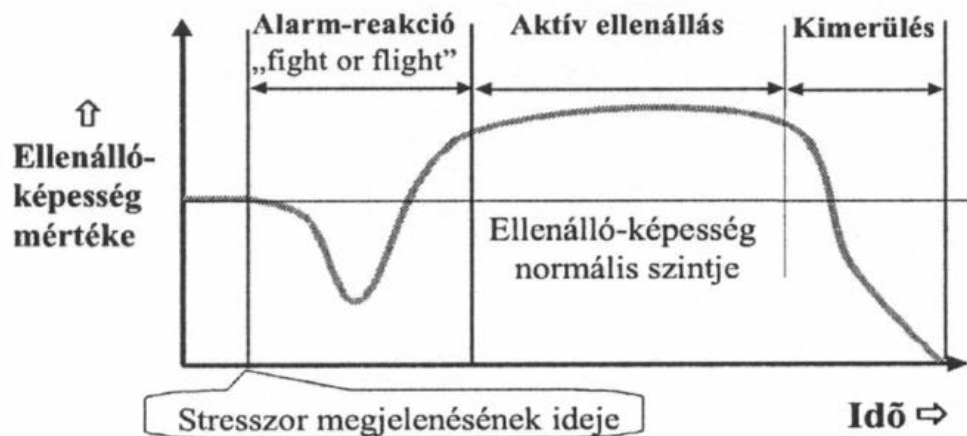
Pituitary gland

Adrenal cortex



Stresszválasz

A Selye-féle általános adaptációs szindróma (GAS) három fázisa

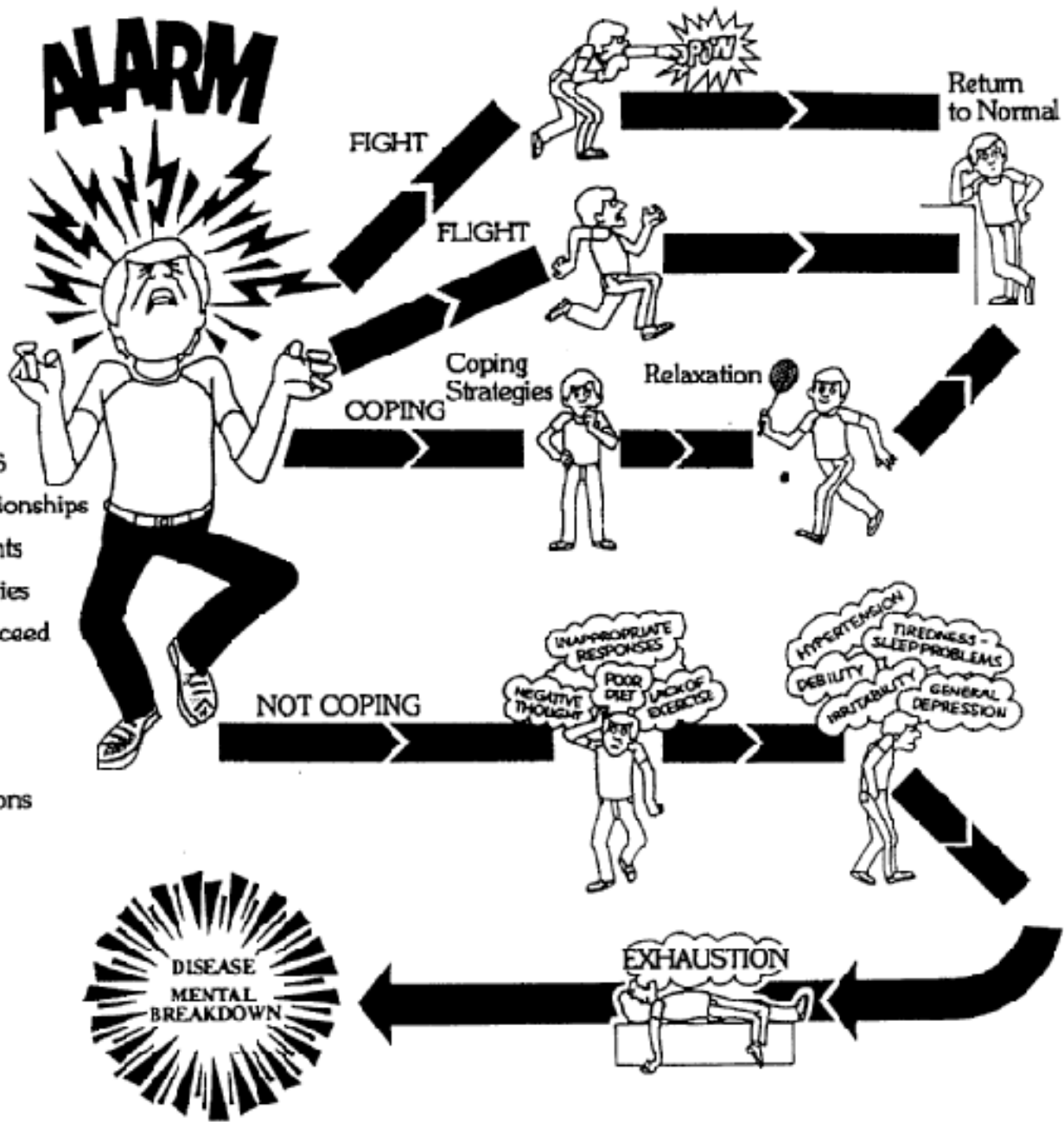


3 fő szakasz:

- ▶ **riasztási fázis:** a szervezet felkészül a fokozott igénybevételre.
- ▶ **aktív ellenállás fázisa:** mozgósítja a tartalékait és így hosszabb-rövidebb ideig képes ellenállni a stresszor hatásának.
- ▶ **kimerülés fázisa:** A stresszor tartós fennállásakor a szervezet tartalékai kimerülnek, rohamos hanyatlás.

ALARM

- STRESSORS**
- Family Relationships
 - Disagreements
 - Money Worries
 - Need to Succeed
 - Exams
 - Friends
 - Decisions
 - New Situations



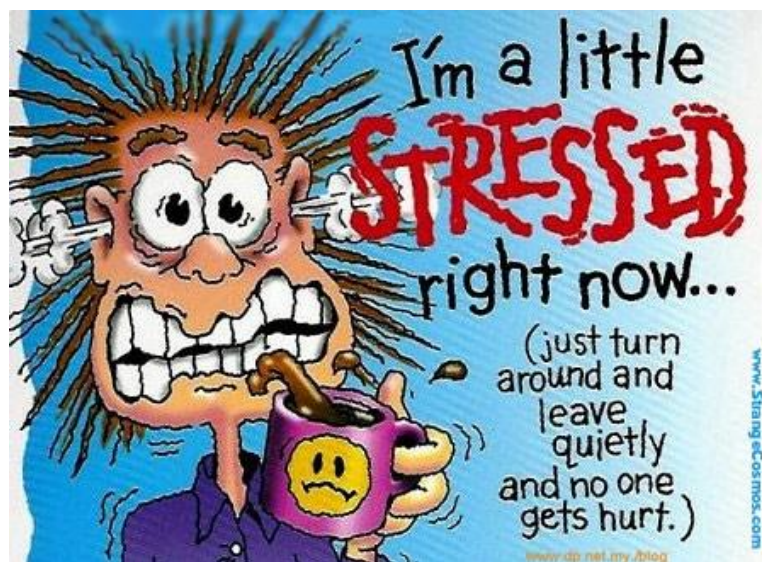
Riasztási (alarm) reakció

- ▶ A szívverés felgyorsul, a szívösszehúzódások ereje nő, így az agy valamint az izomzat számára több vér áll rendelkezésre.
- ▶ Az izmokban az erek kitágulnak.
- ▶ A belekben az erek összehúzódnak.
- ▶ A testnek a pillanatnyi helyzet szempontjából nem lényeges funkciói átmenetileg szünetelnek.
- ▶ Légzés gyorsul
- ▶ A lép összehúzódik, így több vörös vérsajt kerül a keringésbe, javítva az oxigénellátást.
- ▶ Pupillák kitágulnak, így a szemek a fényre érzékenyebbé válnak.

A stresszre adott válasz

▶ Akut stressz:

- ▶ a belső egyensúly (homeosztázis) fenntartására irányuló folyamatok aktiválódnak;
- ▶ különböző kimenetele lehet (megbirkózás, elkerülés vagy tartóssá váló stressz);



A stresszre adott válasz

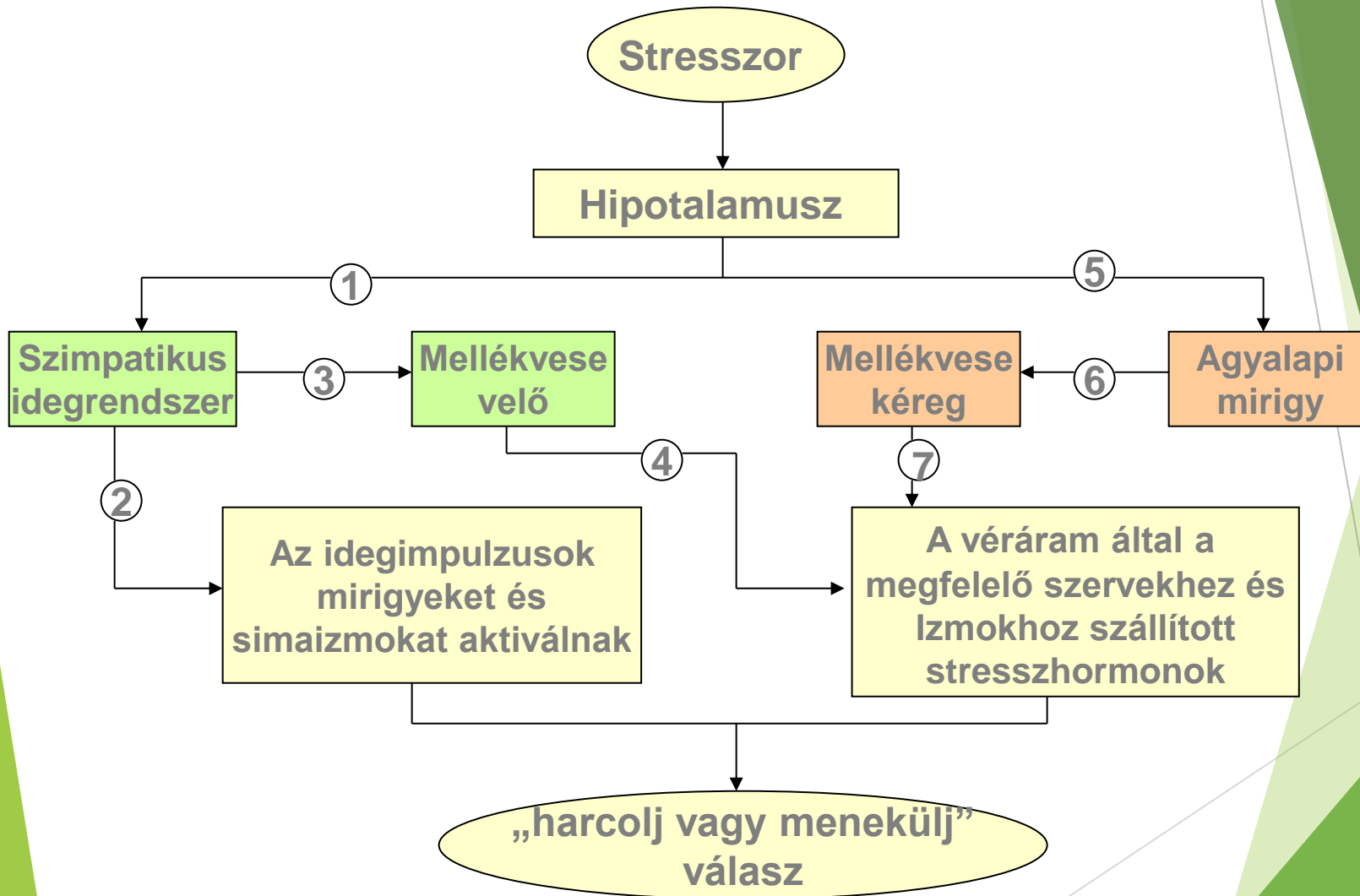
Krónikus stressz:

- ▶ Ha sem menekülés, sem harc nem lehetséges.
- ▶ Emberben főképp pszichoszociális jellegű és nagyon általános.
- ▶ A megküzdési stratégiák döntő fontosságúak.

Krónikus stressz

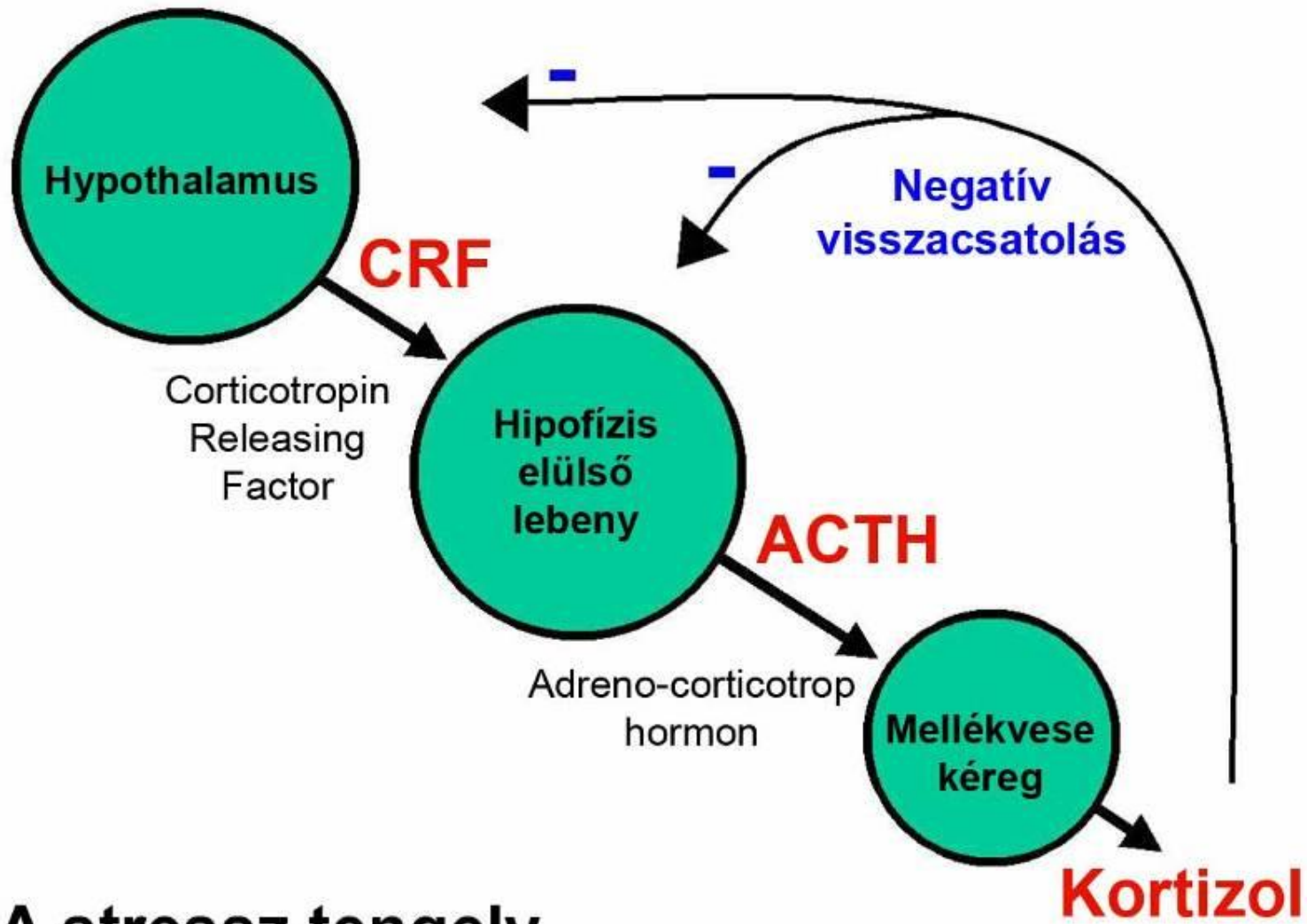
- ▶ Magas vércukor
- ▶ Csontritkulás
- ▶ Emelkedett vérnyomás +magas koleszterin → érlemeszesedés
- ▶ Immunrendszer: működése gyengül
- ▶ Idegrendszer: működése károsodik. Főleg a glükokortikoid receptorokban gazdag területeken (pl. hipokampusz) sejtsugorodás, elhalás következhet be → tanulási és térbeli tájékozódási zavarok.

Az élettani stressz-reakció



A stressz tengely

- ▶ Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
 - ▶ Stressz hatására a hipotalamusz ún. CRF-t (corticotropin releasing factor = „mellékvese serkentést kiváltó faktor”) termel.
 - ▶ A CRF a hipofízis elülső lebenyébe jut, amit ACTH (=mellékvese kéreg serkentő hormon) termelésre serkent.
 - ▶ Az ACTH a vérkeringéssel a mellékvese kéregbe kerül, ahol (többek között) kortizol termelést indít el. (A kortizol az ún. glükokortikoidok csoportjába tartozik.)
- ▶ **Negatív visszacsatolás:** a limbikus rendszerben sok glükokortikoid receptor van.
- ▶ **Akut stressz** esetén a magas kortizol szint legátolja önmaga termelődését.
- ▶ **Krónikus stresszben** stresszhormon szabályozás megváltozik, a kortizol szint tartósan magas marad.



A stressz tengely

Szimpatiko-adreno-medulláris Útvonal (Sympathomedullary Pathway, SAM)



- ▶ Harcolj vagy menekülj válasz
- ▶ A hipotalamusz aktiválja a mellékvese velőállományát
- ▶ A hipotalamusz a vegetatív idegrendszer része, fontos szerepe van a homeosztázis szabályozásában.
- ▶ A mellékvese velőben adrenalin termelődik >> harcolj vagy menekülj válasz

Harcoldj vagy menekoldj vólasz

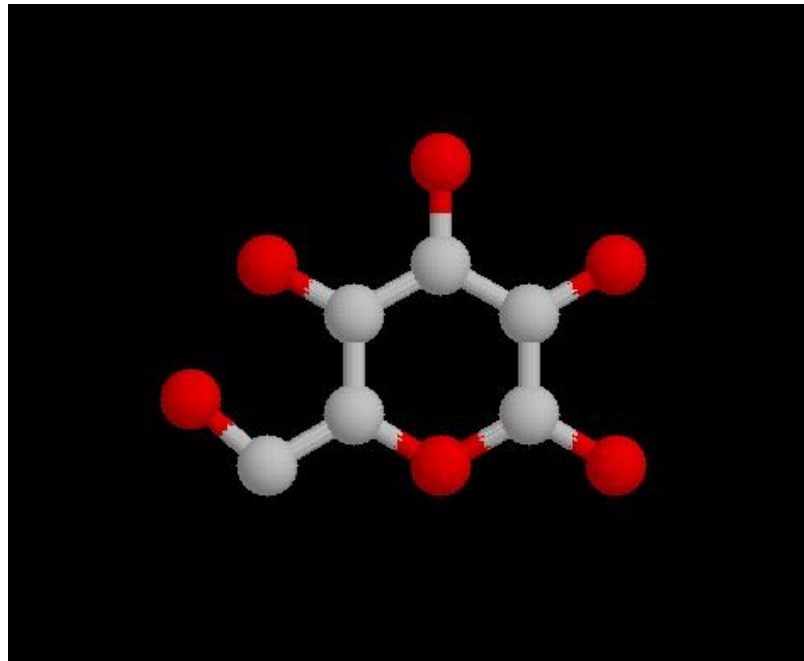
- ▶ Szívverés felgyorsul, a vér az emésztő rendszerbe, bőrbe, izmokba áramlik
- ▶ Légzés fokozódik
- ▶ Emésztés, éhségérzet csökken
- ▶ A máj a glikogénraktárból glükózt szabadít fel
- ▶ A hipotalamusz a hipofízis elülső lebenyéből ACTH felszabadítást idéz elő, ami serkenti a mellékvese kéregállományának kortizoltermelését
- ▶ A kortizol hatására aminosavak és zsírsavak kerülnek a sejtekbe, az agy glükózhoz jut
- ▶ **Küszöb eltér (egyedi különbségek)**

Krónikus stressz, Hipotalamo-hipofízis Rendszer (Hypothalamic Pituitary-Adrenal System, HPA)

- ▶ A hipotalamusz az agyalapi mirigyet hormontermelésre készíti
- ▶ Az agyalapi mirigy adrenokortikotróp hormont termel (ACTH)
- ▶ ACTH a mellékvese kéreg kortikoszteroid termelését indukálja
- ▶ A kortikoszteroidok hatására a szervezet raktáraiból cukor szabadul fel
- ▶ A vércukorszint megemelkedése segít a hosszú távú stressz leküzdésében
- ▶ Immunrendszer szupresszió.

A stressz kimutatására alkalmas markerek

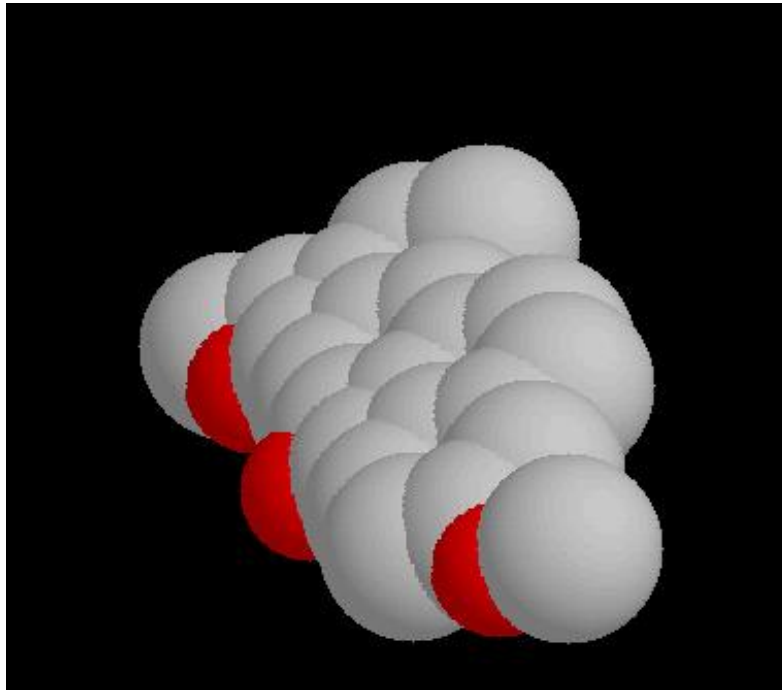
- ▶ Szénhidrátok (vérplazmaglükóz = vércukor)



Hagyományos jodometriás, titrálásos, enzimatisz kolorimetriás módszer, modern fotométerekkel mérhető.

A stressz kimutatására alkalmas markerek

Kortizol

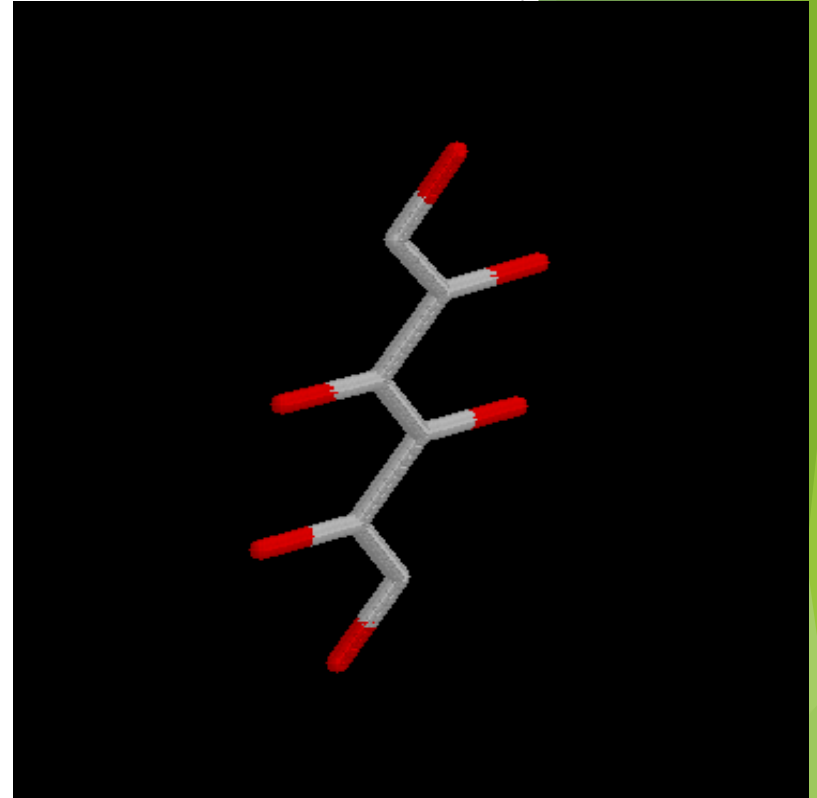


Teszt kitékkel (ELISA, RIA) mérhető

A stressz kimutatására alkalmas markerek

A vér glikozilált fehérjéi

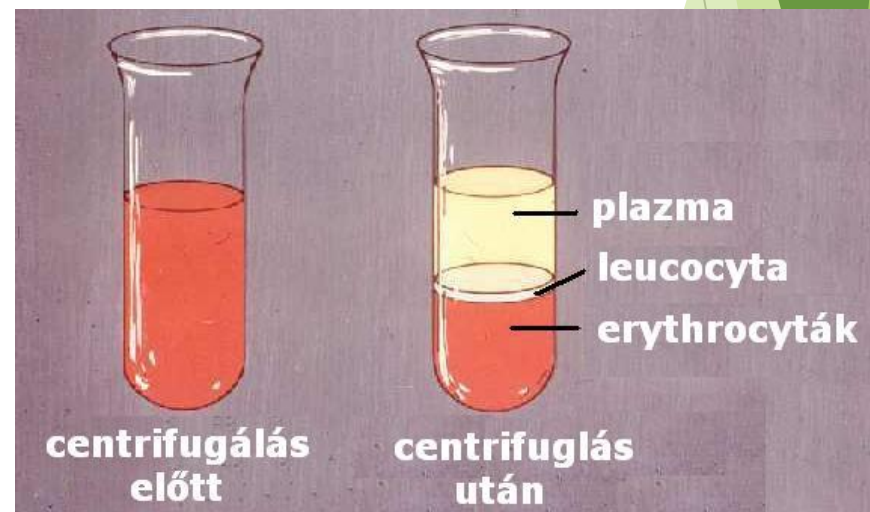
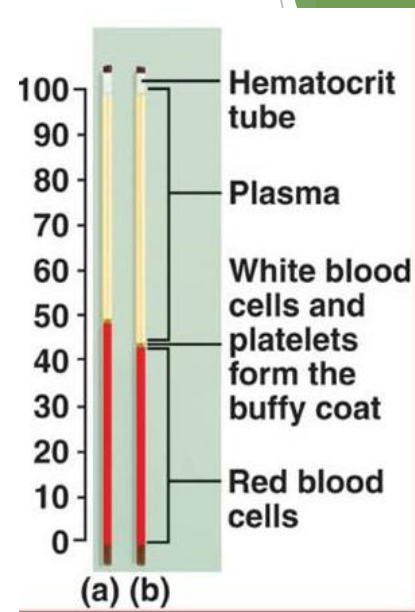
- Glikozilált hemoglobin (GHb)
- Szérum/plazma fruktózamin



Nitroblue-tetrasolium-klorid festékanyaggal történő fotometriás eljárások

A stressz kimutatására alkalmas markerek

- ▶ Vérplazma klorid szintje
- ▶ Laktát (tejsav)
- ▶ Hematokrit érték
- ▶ A lép relatív tömege



Stresszválasz mérése

- ▶ Stresszhormonok mérése
- ▶ Viselkedésvizsgálat (harcolj vagy menekülj válasz)
- ▶ Vércukorszint mérése
- ▶ Glikozilált fehérjék mérése
- ▶ **DE: egyedenként eltérő érzékenység, eltérő válaszreakciók!**

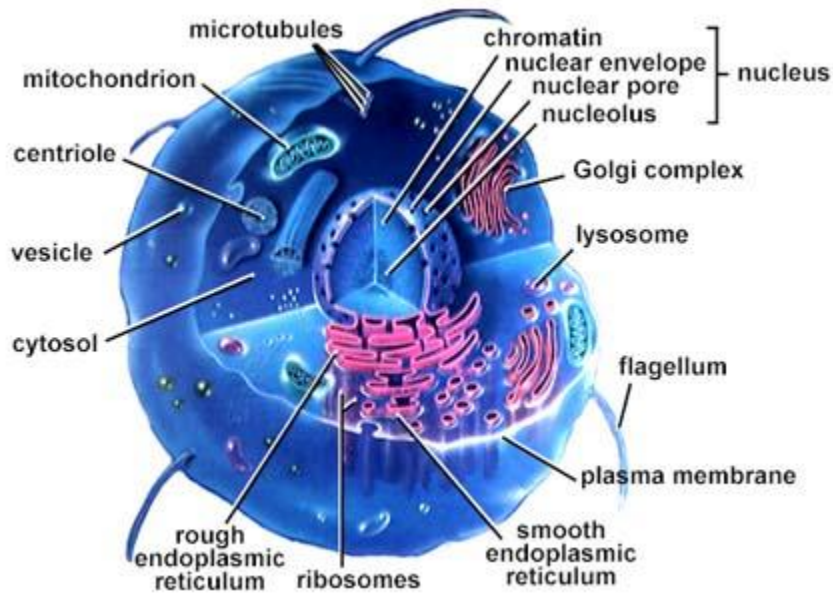


Celluláris stresszválasz

- ▶ Stressz a sejtek szintjén
- ▶ Olyan behatások váltják ki, amelyek károsítják a sejtek makromolekuláit, makromolekuláris rendszereit.
- ▶ A **válaszreakció tranziens és nem stresszor specifikus**, emellett a sejtekben kialakul egy más jellegű válaszreakció is, az ún. homeosztatikus válasz.
- ▶ A **homeosztatikus válasz**: stresszor specifikus érzékelők indítják el, és az a megváltozott környezeti hatás jellegétől függő módon biztosítja az egyensúly helyreállítását és fenntartását. A változások egészen addig fennmaradnak, amíg a környezeti feltételek ismét nem módosulnak.

Celluláris stresszválasz

- ▶ bizonyos elemei evolúciósan nagy mértékben konzerválódtak
- ▶ minden sejtben előforduló, konzervált fehérjék, a stressz fehérje készlet kis része
- ▶ stresszfehérjék nagy része nem konzervált



- Pl. a transzkripció, a sejtciklus, a jelátviteli útvonalak szabályozásában szerepet játszó fehérjék, nagy mértékben különböznek a prokarióta és eukarióta szervezetekben

Stresszfehérjék csoportosítása funkció alapján

- DNS károsodás érzékelése / javítása
- Fehérje károsodás érzékelése / javítása
- Károsodott fehérjék lebontása
- Sejtciklus szabályozása
- Anyagcsere utak szabályozása
 - Redox állapot szabályozása
 - Energia termelés/felhasználás
 - Lipid/zsír sav metabolizmus

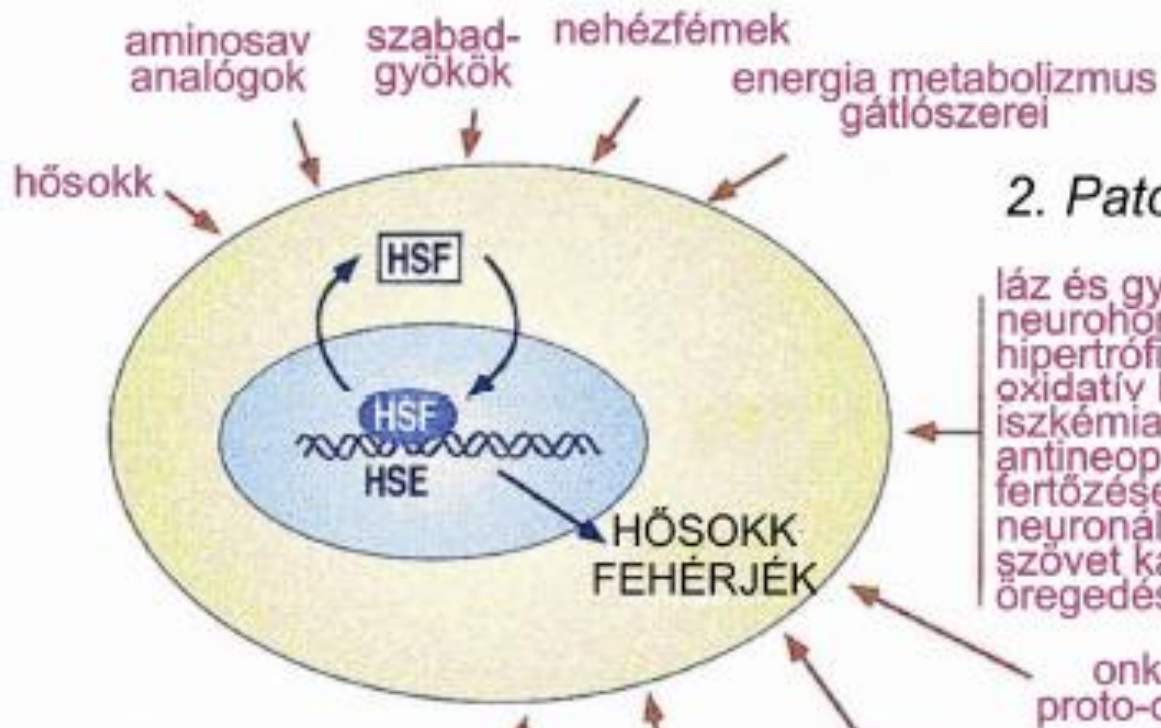
Molekuláris stresszválasz

- ▶ olyan folyamatok aktiválódnak, amelyek segítenek helyreállítani/eltávolítani a károsodott molekulákat
- ▶ időlegesen ellenállóvá teszik a sejteket a stresszorzal szemben
- ▶ apoptózisra ítélik a helyrehozhatatlanul megrongálódott sejteket.
- ▶ A stresszválasz része a sejtek **génexpressziós mintázatának átalakulása**, biztosítja, hogy a túléléshez szükséges védő fehérjék mennyisége megnövekedjen a sejtekben

Hősök fehérjék (Hsp)

- ▶ A hősök fehérjék az egész elővilágban, prokarióta és eukarióta sejtekben előforduló konzervált fehérjék.
- ▶ Drosophila hősök kísérletben fedezték fel
- ▶ A hőstressz során indukálódó géneket hősök géneknek, a fehérjéket hősök fehérjéknek (Hsp) nevezték el.
- ▶ a hősök gének kifejeződését a hőstressz mellett egyéb **környezeti stresszhatások** és **patológias állapotok** is befolyásolják
- ▶ **Normál sejtfolyamatok során is** - sejtciklus, hormonok, növekedési faktorok, az egyedfejlődés / differenciáció - szabályozottan változik

1. Környezeti stresszhatások



3. Stresszhez nem köthető állapotok

sejtciklus növekedési faktorok fejlődés és differenciáció

Hősök fehérjék (Hsp)

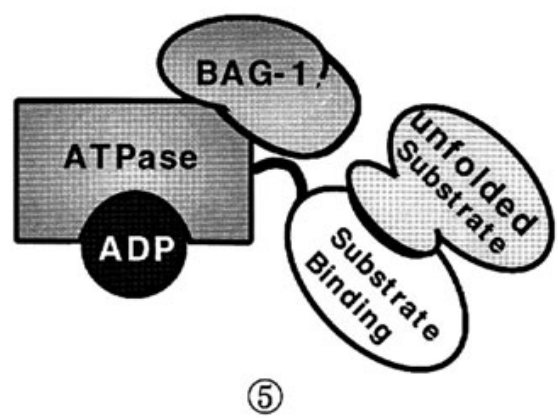
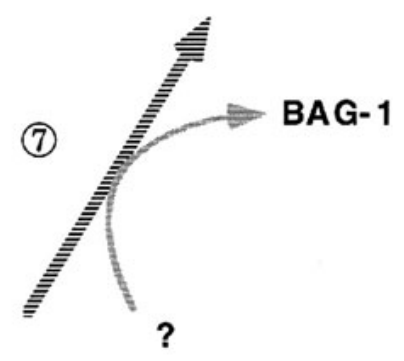
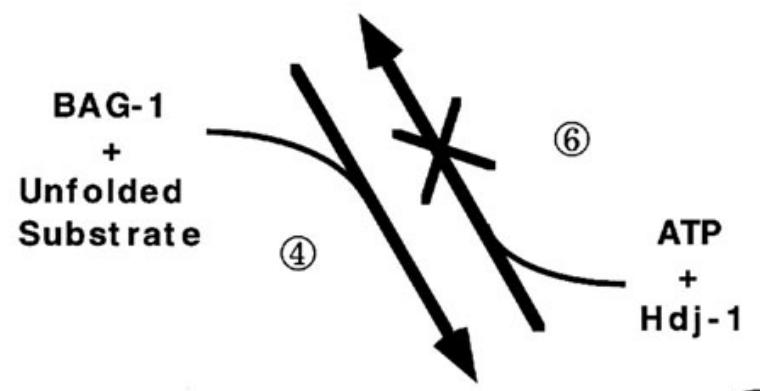
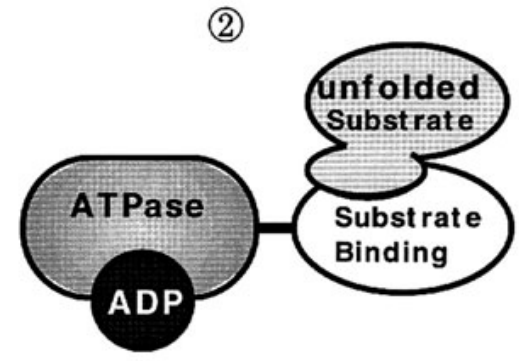
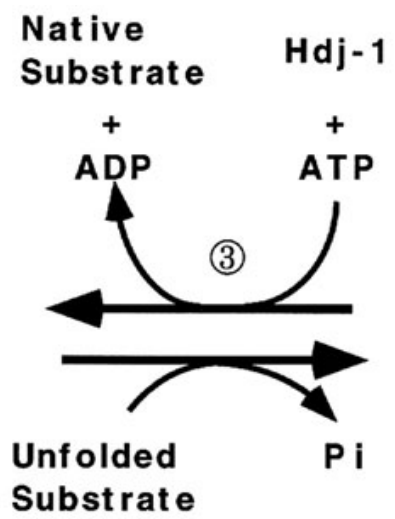
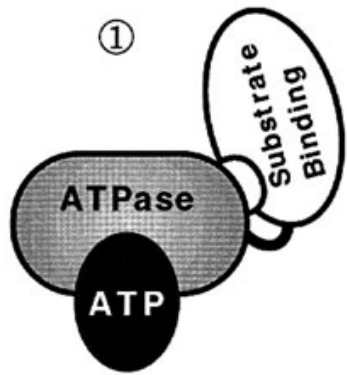
- ▶ Funkciójukat tekintve **molekuláris chaperonok**
- ▶ **Stabilizálják** az instabil konformációjú **fehérjéket**, elősegítik, hogy a nem megfelelően feltekeredett fehérjék **felvegyék** az in vivo **aktív szerkezetet**
- ▶ Nélkülözhetetlen szerepet játszanak a **fehérje homeosztázis** fenntartásában:
 - Naszcens fehérjék feltekerése
 - Fehérjék transzlokációja a sejtorganellekbe
 - Fehérjék aktivitásának módosítása
 - Inaktív, instabil szerkezetű fehérjék stabilizálása
 - Fehérje komplexek összeszerelése
 - Nem megfelelő konformációjú fehérjék újraterelése
 - Fehérje aggregáció elleni védelem
 - Fehérjék kijelölése degradációra
 - Károsodott fehérjék elkülönítése

Hősokk fehérjék (Hsp)

- ▶ Hozzájárulnak ahhoz, hogy a stressz során károsodott fehérjék visszanyerjék működőképes állapotukat, vagy lebontásra kerüljenek, ha a károsodás már nem helyrehozható.
- ▶ Csoportosítás: molekulatömeg alapján
 - Hsp110
 - Hsp90
 - Hsp70
 - Hsp60
 - kis molekulásúlyú Hsp családok

Hsp 70 fehérjecsald

- ▶ az egyik legnagyobb mrtékben **konzerválódott** Hsp
- ▶ **Ko-chaperonokkal** együttműködve egy energiaigényes folyamat során segíti a **szubsztrát fehérjét** a **natív konformáció** elérésében
- ▶ Szubsztrátjai azok a fehérjék, amelyek a felszínükön **hidrofób felületeket** hordoznak
- ▶ Két különböző formában, **ATP-t**, ill. **ADP-t** kötő formában lehet jelen
- ▶ ATP kötésekor a Hsp70 csak kis affinitással kötődik a szubsztrát fehérjéhez, így azok gyorsan cserélődnek
- ▶ ATP hidrolízis során a szubsztrátkötő hely bezáródik, a
- ▶ “bennrekedt” szubsztrát nagy affinitással kapcsolódik az ADP-t kötő Hsp70-hez
- ▶ Szoros együttműködés a fehérje lebontásért felelős rendszerrel

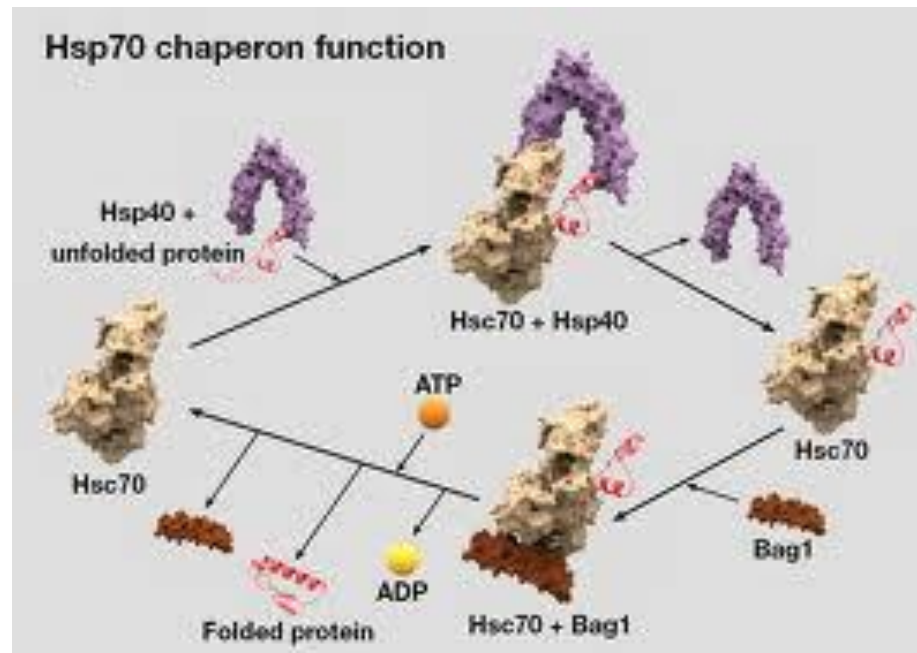


Hsp 70 fehérjecs család

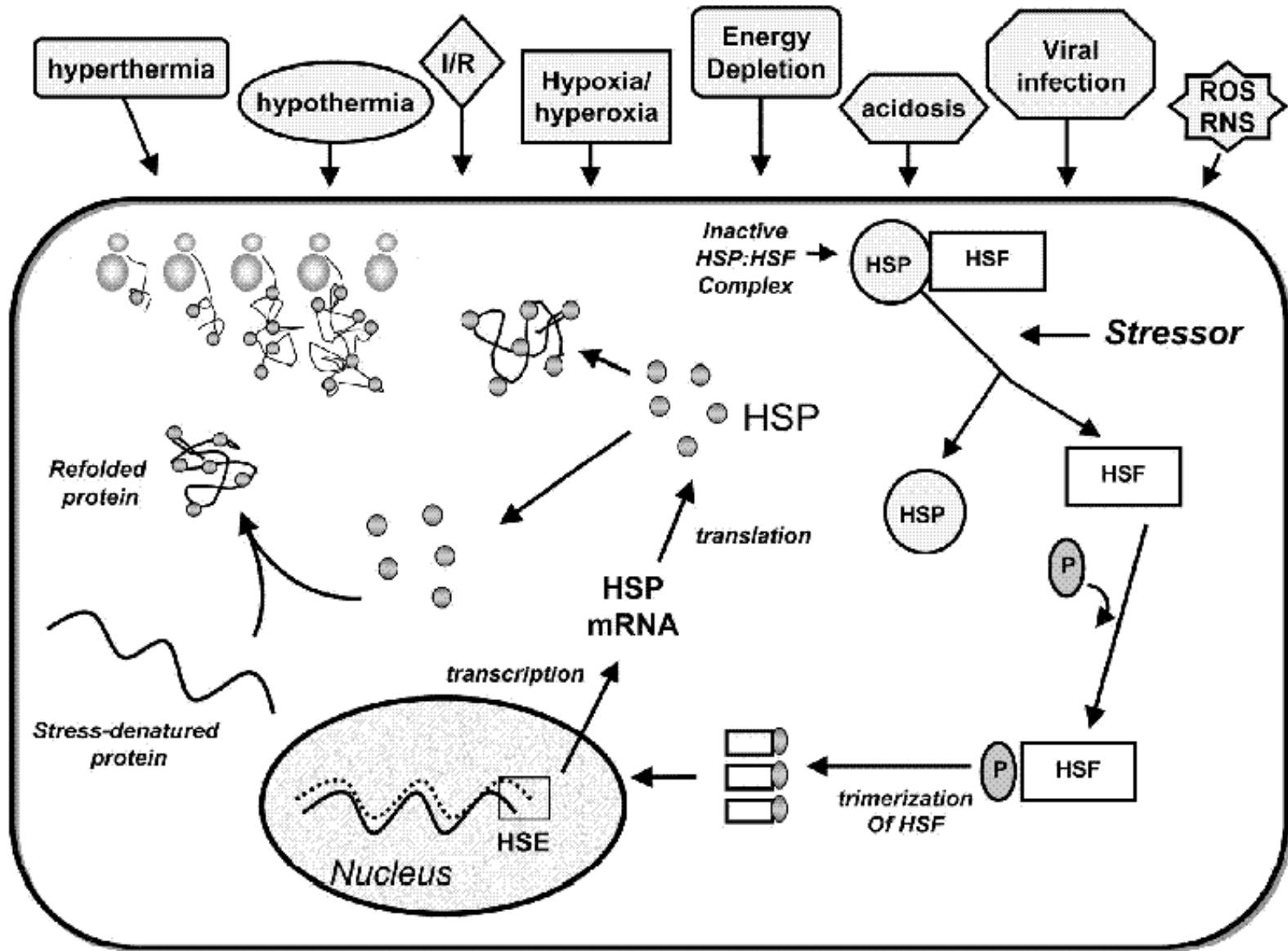
- ▶ Egyre növekvő számban azonosítanak olyan **regulátor fehérjéket**, amelyek **aktivitásának szabályozásában** részt vesznek.
- ▶ Pl. **nukleáris receptorok** (szteroid hormon receptorok), kinázok (Raf, eIF2 α , CiklinB/Cdk1), transzkripciós faktorok (HSF1, Myc, pRb)
- ▶ **szignál transzdukciós folyamatok**, sejtciklus, apoptózis, differenciáció szabályozásában is szerepet játszanak
- ▶ Patológiás állapotok (rákos folyamatok, neurodegeneratív, autoimmun betegségek) kialakulásában is részt vesznek

Hsp 70 fehérjecs család

- ▶ Minden eukarióta sejtben legalább két Hsp70 gén van
- ▶ A Hsp70-1A és Hsp70-1B klasszikus, indukálódó Hsp70 családtagok.
- ▶ A két fehérje a promóter régióban található hősokk elemekben (HSE) és 2 aminosav oldalláncban különböznek



Physiological signals that activate HSP70 expression

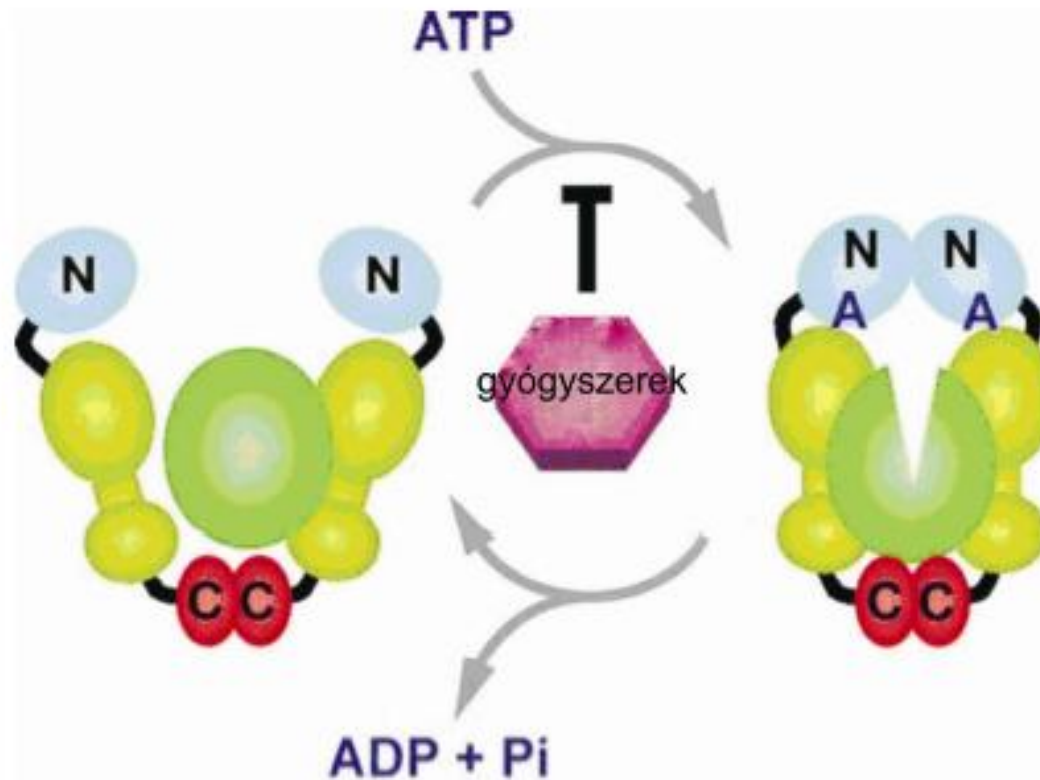


Hsp 90 fehérjecs család

- ▶ nagy mértékben **konzervált** fehérje, prokarióta és eukarióta sejtekben egyaránt megtalálható.
- ▶ igen **nagy mennyiségben** termelődik, a Hsp90 alkotja a citoplazmatikus fehérjéknek közel 1 % - át.
- ▶ számos fehérje térszerkezetének kialakításában és konformációjának szabályozásában részt vesz.
- ▶ A Hsp70-nel ellentétben egy körülhatárolt, jól **meghatározott szubsztrát** körrel rendelkezik, amelyeket a Hsp90 “**kliens fehérjéinek**” neveznek.
- ▶ nagy mértékű specificitás
- ▶ a Hsp90 is **ATPáz aktivitással** rendelkező ATP-függő chaperon.
- ▶ A chaperon funkció ellátásához a Hsp90 fehérjéknek **homodimereket kell** képezniük

Hsp 90 fehérjecsalád

- ▶ A chaperon ciklus alatt ATP hidrolízishez kötött módon váltakozik a molekuláris fogószerű homodimer nyitott és szubsztrátot kötő zárt állapotba



Hsp 90 fehérjecs család

- ▶ a szubsztrát fehérjék kötődéshez szükséges szerkezeti, konformációs sajátosságai nem ismertek
- ▶ A kliensek olyan fehérjék, amelyek a sejtekben inaktív formában vannak jelen, így szerkezetük nem stabil és hajlamosak a denaturációra.
- ▶ chaperonok segítségét igénylik ahhoz, hogy megtartsák az **aktivációra képes, de instabil** konformációt
- ▶ protein kinázok (Akt, Raf1, Cdk4, CKII, Src family), szteroid hormon receptorok, transzkripcióó faktorok (HSF1, p53, HIF1), eNOS, aktin, kalmodulin, az apoptózis folyamatában szerepet játszó Apaf-1, stb. és számos rákos állapot kialakulásában szerepet játszó fehérje
- ▶ a Hsp90 **alapvető sejtfunkciók** működéséhez nélkülözhetetlen

Hsp 90 fehérjecsalád

- ▶ Eukarióták: 4 fehérje, amelyek a sejt más-más kompartmentjeiben fordulnak elő.
- ▶ citoplazma: 2 Hsp90 (Hsp90 α , Hsp90 β)
- ▶ endoplazmatikus retikulum: Grp94
- ▶ mitokondrium: Hsp75/Trap1
- ▶ A citoplazmatikus Hsp90 izoformák egymással 76 %-os homológiát mutatnak.
- ▶ **Stressz** hatására a rövidebb α izoforma expressziója **indukálódik**, a hosszabb β izoforma kifejeződése csak kis mértékben változik meg.

Hsp 110 fehérjecs család

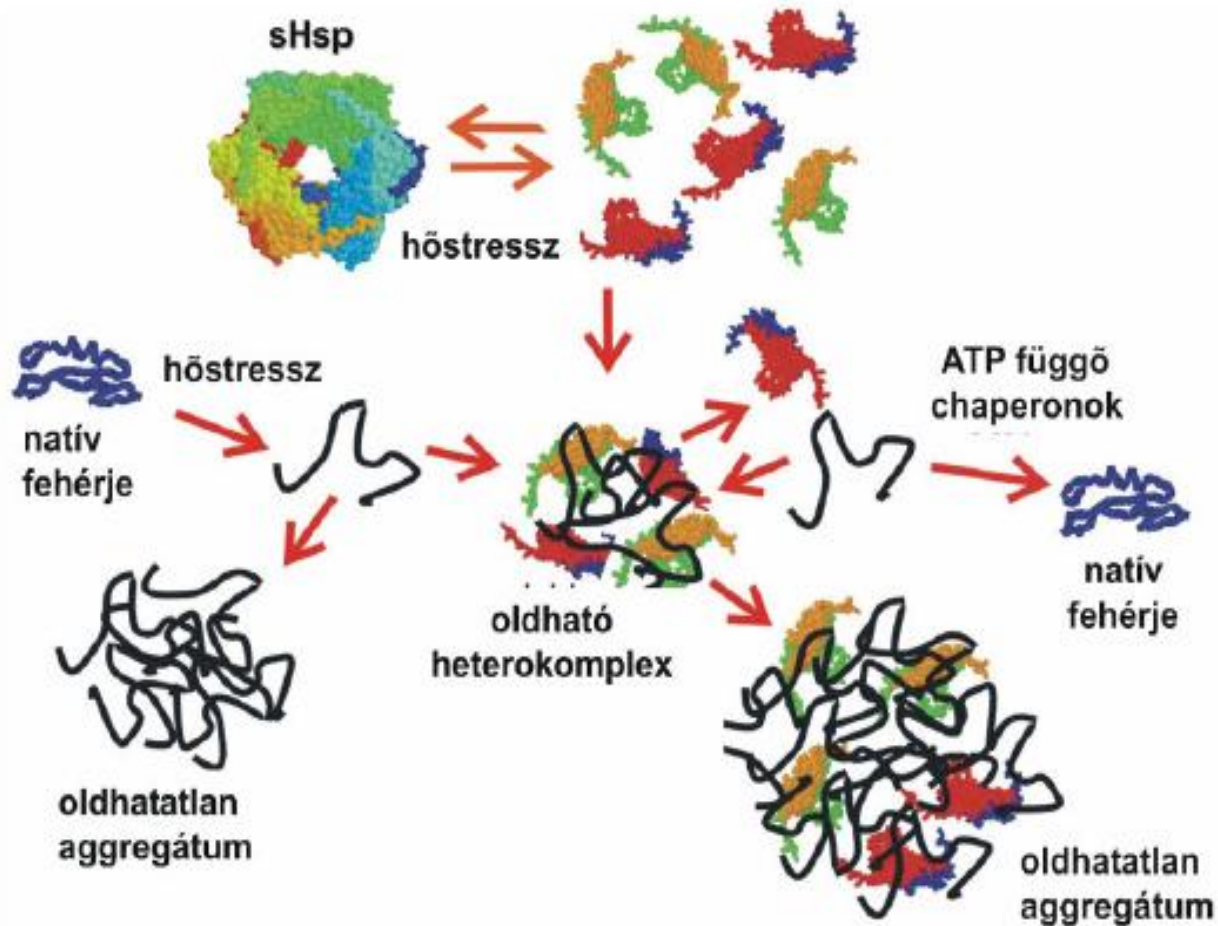
- ▶ tagjai **csak eukarióta** sejtekben fordulnak elő.
- ▶ kevésbé jellemzett csoport, a sejtekben betöltött szerepük is csak a közelmúltban vált ismertté.
- ▶ Szekvencia és szerkezet alapján a Hsp70 családhoz hasonlítanak
- ▶ expressziója stressz, pl. hő sokk, ozmotikus stressz, oxidatív stressz, nehézfémek, dehidratáció hatására indukálódik.
- ▶ Gátolja a stresszorok apoptotikus hatását

Hsp 110 fehérjecsalád

- ▶ Emlős sejtekben 2 (α és β) izoforma, az Apg-1, Apg-2 és a Grp170
- ▶ Grp170 csak az endoplazmatikus retikulumban fordul elő.
- ▶ nem stresszelt állapotban is termelődik
- ▶ minden szövetben és a sejtvonalak jelentős részében kimutatható
- ▶ nagy mennyiség az agyban és a májban
- ▶ Alternatív splice variánsok

Kis molekulasúlyú Hsp-k

- ▶ változatos, 12-43 kDa molekulatömegű fehérjék
- ▶ egy közel 100 aminosavból álló konzervált domént tartalmaznak. Az N-terminális és C-terminális rész változatos szerkezetű
- ▶ változatos méretű (50-700 kDa) és dinamikus felépítésű homo- ill. heterooligomereket hoznak létre.
- ▶ Az oligomerek építőkövei sHsp dimerek
- ▶ ATP-t nem igénylő chaperonok
- ▶ Hidrofób felszínükön keresztül kölcsönhatásba lépnek a részlegesen denaturálódott fehérjékkel
- ▶ megakadályozzák a fehérjék aggregációját



3. ábra A kis molekulásúlyú Hsp-k chaperon funkciója. A sHsp oligomerek stressz hatására kisebb egységekre esnek szét és kölcsönhatásba lépnek a részlegesen denaturálódott fehérjékkel. A sHsp-k ezáltal elősegítik, hogy a fehérjék az energiafüggő chaperon rendszerek számára hozzáférhető, oldott formában maradjanak.

A Hsp indukció szabályozása

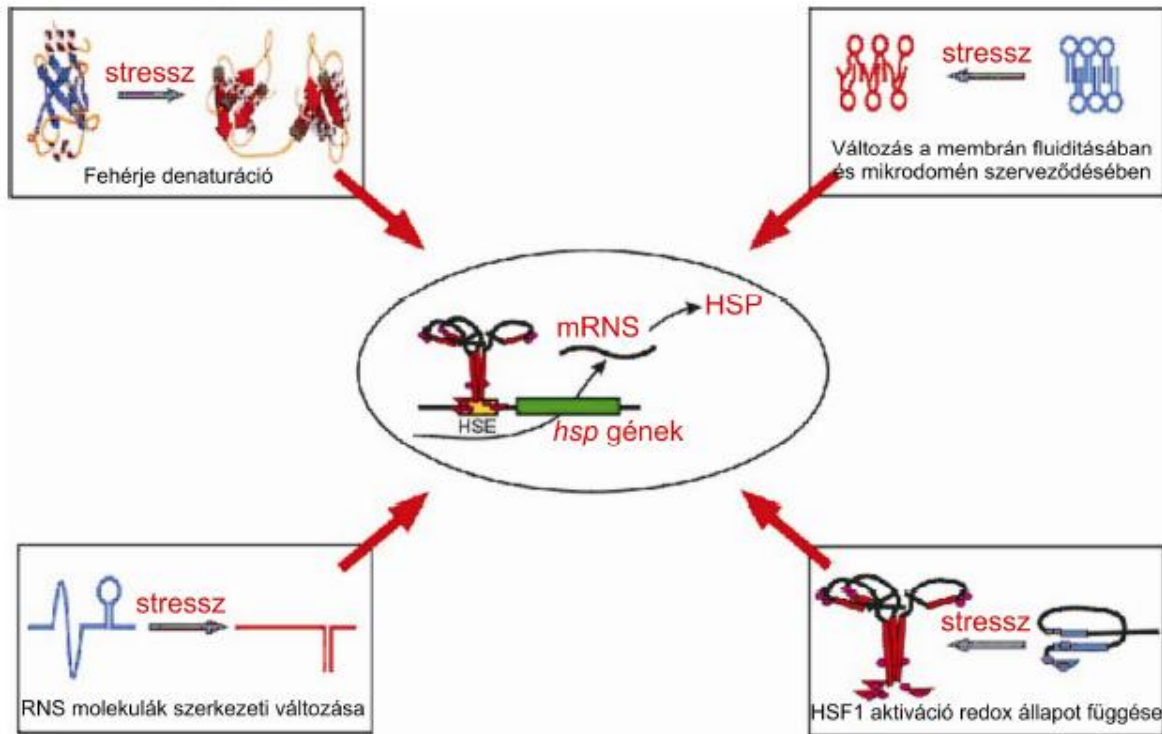
- ▶ elsősorban a transzkripció szintjén történik
- ▶ az un. **hősokk faktorok** (HSF) a hősokk gének transzkripcióját szabályozzák
- ▶ A HSF-ok a stresszválasz mellett a normál sejtműködés szabályozásában is nélkülözhetetlenek- pl. sejtciklus, embrionális fejlődés, differenciáció

Hősök elemek

- ▶ A **stresszindukált** kifejeződést a promóter régióban található **hősök elemek** (HSE) biztosítják a HSF1 szekvencia specifikus kötőhelyei.
- ▶ HSE-k mellett más transzkripciós faktor kötőhelyek is szerepet játszanak

Stresszérzékelő mechanizmusok

- ▶ denaturált fehérjék, mint stressz-szenzorok
- ▶ Emellett alternatív útvonalak (pl. redox állapot érzékelése, RNS konformációváltozás)



Stresszválasz aktivációja

- ▶ szignál transzdukciós folyamat
- ▶ általános lépései:
 - szignál érzékelése
 - jel továbbítása, felerősítése, integrációja
 - effektor molekulák megjelenése/aktivációja

Több jelátviteli útvonal esetében bizonyították, hogy részt vesznek a stresszválasz folyamatában. Pl. ERK, JNK, p38 MAP kináz útvonalak, az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedése, PKB/AKT jelátviteli út

Modellrendszerek II (magasabb
rendű tesztrendszerek):
sejtvonalak, modellszervezetek.
Riporter gének, transzgenikus
élőlények, létrehozásuk és azok
használata a toxikológiában.

Bevezetés

- ▶ A toxikológia az anyagok hatását **egyedekre** nézve vizsgálja
- ▶ Az ökotoxikológia az anyagok **ökoszisztémákra** kifejtett hatását tanulmányozza.
- ▶ Mindkettő **integrált** vizsgálatokat jelent, az alacsonyabb rendűektől a magasabb rendűekig több szervezetet illetve különböző mértékben **komplex tesztrendszer**ek bevonásával.

Miért van szükség modellekre?

- Limitált az emberen vagy magasabb rendűeken elvégezhető kísérletek száma (**etikai** megfontolások, generációs idő, stb.)
- **Szabályozott körülmények** között végezhetőek a kísérletek (állandó környezeti feltételek, stb.)
- A kezelés során alkalmazott **koncentráció** ismert, állandó szinten tartható, szabályozható
- A toxikus anyag **bevitelének** módja megadható (szájon át, bőrön keresztül, stb.)
- A kísérletek **jól ismételhetők**
- Az eredmények humán **extrapolációja** lehetséges
- Jó vizsgálatnál csak az anyag hat és mindig kell kontroll.

Tiered Testing Battery With Triggered Pathways

TIER I

TIER II

TIER III

OECD/SIDS-HPV ENDPOINTS

Acute Toxicity
(Oral, Dermal, or Inhalation)

Bacterial Reverse
Mutation Assay &
In Vitro Cytogenetics

In Vivo Cytogenetics

Chronic
Toxicity/Oncogenicity

Subchronic Toxicity
(28-Day or 90-Day)

Immunotoxicity

Neurotoxicity Screening
Battery

Prenatal Developmental
Toxicity

Developmental
Neurotoxicity

Reproduction

2-Generation Reproduction Study

a

f

f

b

c

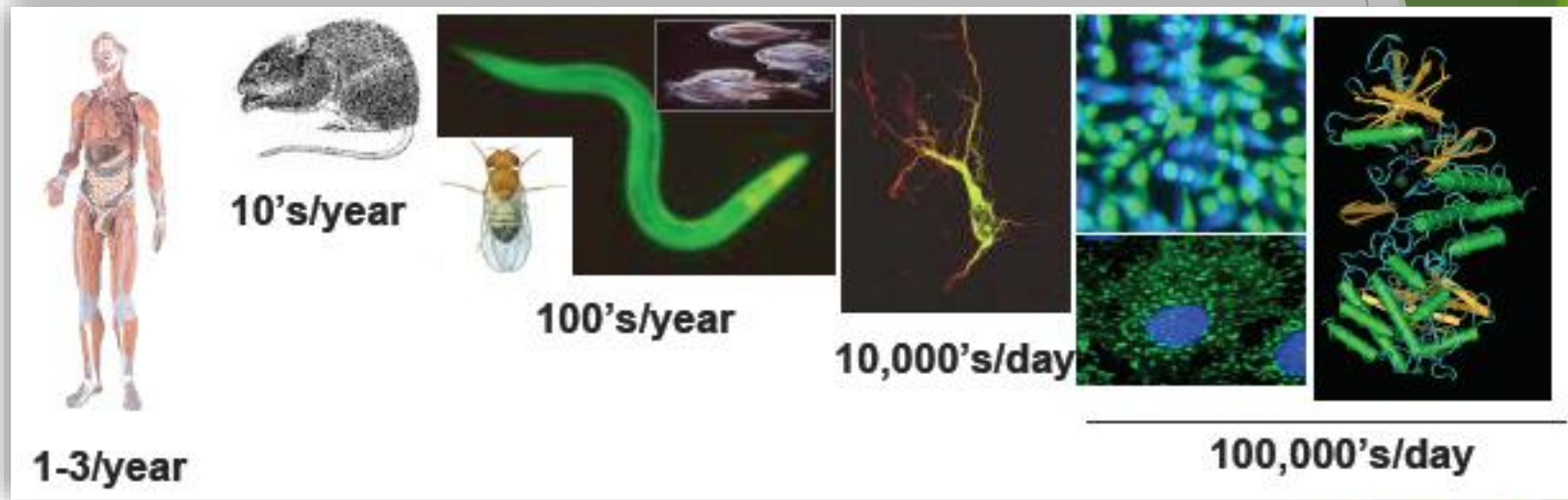
g

d

e

Toxikológiai modellek

	Emlős modellek (pl. rágcsálók)	Gerinctelenek és alacsonyabb rendű gerincesek	Szövet-tenyészetek	Sejt-tenyészetek	Molekuláris szintű vizsg. és modellezés
Humán vizsg.					



Elvégezhető vizsgálatok száma

Humán relevancia

Állatmodellek alternatívái

- *In Vitro* modellek
- Szövettenyészetek („szövetszerű” modellek)
- Számítógépes szimulációk
- Struktúra alapján végzett számítógépes modellezés

Az alternatív modellek követelményei:

- Megbízhatóság
- Legalább olyan jó vagy jobb legyen, mint a helyettesített modell
- **Validált**, sokrétűen tesztelt, a hatóságok által elfogadott modell kell, hogy legyen

Az in vitro rendszerek előnyei

- ▶ Olcsó, reprodukálható, hatékony molekuláris és sejtszintű vizsgálatok.
- ▶ Adott sejttípuson teszik lehetővé a vizsgálatok elvégzését.
- ▶ Szigorúan kontrollált, jól szabályozható körülmények.
- ▶ Szignifikánsan csökkenthető a toxikológiai vizsgálatok során felhasznált állatok száma.
- ▶ Hatékony toxicitás vizsgálatok, emberre vonatkoztatható eredmények.
- ▶ Gyorsaság.
- ▶ A fajok közötti különbségek megértésében, tanulmányozásában fontos modellek.
- ▶ Jól definiált rendszerek
- ▶ Struktúra-aktivitás összefüggés vizsgálatok

Sejtvonalak

- ▶ Előnyei:
- ▶ Sejtszintű folyamatok tanulmányozását teszi lehetővé
- ▶ **Sejtek viselkedésének**, mozgásának vizsgálata, mikroszkópos sejtvizsgálatok és felvételek készítése (cellular imaging) **csak sejtvonalakon** lehetséges
- ▶ Szabályozható, standardizálható körülmények (a szervezet többi sejtje, szervei és az ott zajló komplex folyamatok nem „zavarják” a vizsgálatot)

Sejtkultúrák készítése

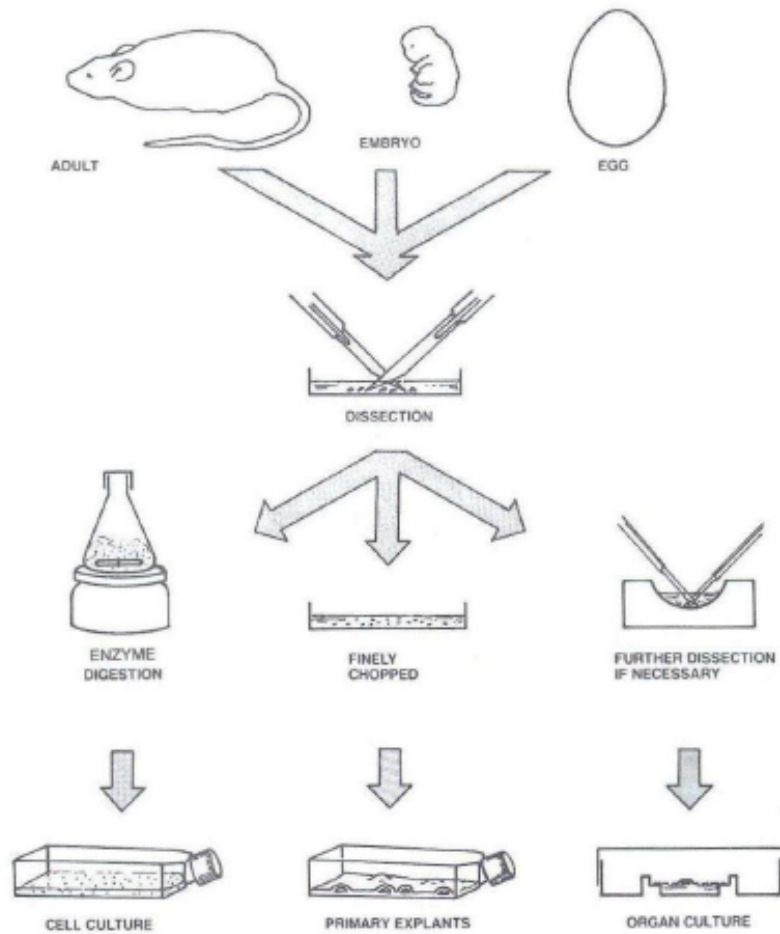


Fig. 1.2. Types of tissue culture.

- Szövet izolálás (szerv explantátum, vér, embrió)
- A sejtek szétválasztása (darabolás szikével, késes homogenizátor, enzimatikus emésztés)
- **Primer sejtkultúra:** Az eredeti szervből / szövetből frissen eltávolított sejtekből készült kultúra
- **Szelekciós hatások** (migrációs képesség, osztódási sebesség, médium, stb.)

Szekunder sejt kultúra, sejt vonal

- **Passzálás:** Bizonyos sejtszám elérése után a sejtosztódás leáll. Ilyenkor új felületet/teret kell adni a sejteknek. A tenyészet egy részét új tenyésztőedénybe visszük át és friss médiumot adunk hozzá.
- **Generációs szám:** osztódási ciklusok száma. Nem egyenlő a passzázs-számmal.
- **Szekunder kultúra:** A primer kultúra sejtjeinek egyszeri passzálása (átoltása) révén jön létre.
- **Sejt vonal:** A primer kultúrából néhány passzálás után kialakult véges élettartamú, korlátolt növekedésű (40-100 passzálás) sejt kultúra.
pl. fibroblaszt tenyészet

Korlátlanul osztódó sejtek

- **Folyamatos sejtvonala:** Korlátlan ideig fenntartható sejt-kultúra, mert sejtjei folyamatosan osztódó képességgel rendelkeznek. Az ilyen sejtekben gyakran a normálnál több kromoszóma van, vagy más genetikai elváltozás van.
- **Korlátlanul osztódó emlős sejtek:**
 - Természetesen előfordulók: őssejtek és csírasejtek
 - Immortalizáció = korlátlan osztódó képesség elnyerése
 - Spontán immortalizáció (pl: hámsejt-, fehérvérsejt-kultúrák)
 - Mutáció vagy vírus okozta immortalizáció (pl: tumorsejtek)
 - Mesterséges immortalizáció (gének bevitele, hibridóma)
- **Sejttörzs:** Megfelelő tulajdonságok alapján szelektált sejtekből kiinduló sejt-kultúra. A sejtek azonos típusúak.

Toxikológiai célszervek

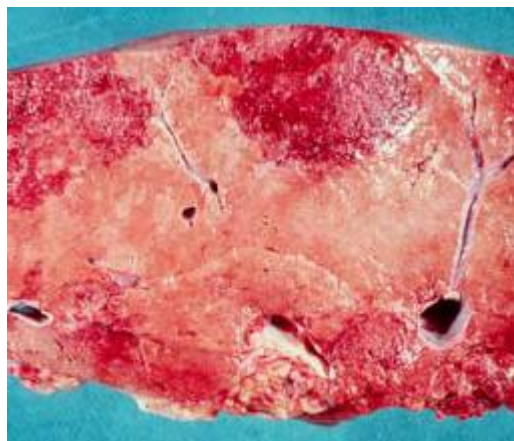
- ▶ Máj
- ▶ Vese
- ▶ Idegrendszer
- ▶ Vérsejtek
- ▶ Kardiovaszkuláris rendszer
- ▶ Bőr
- ▶ Tüdő

- ▶ Target organ toxicity!

Toxikológiai célszervek

- ▶ Az egyes szervekben más-más sejttípusok, más funkció, más enzimek, receptorok, stb.
- ▶ A toxikus anyagok és metabolitok más-más módon hatnak
- ▶ A toxikus anyagok hatása egyszerre több célszervet is érinthet
- ▶ Több toxikus anyag együttesen hathat ugyanarra a célszervre
- ▶ A folyamatok kinetikája szervenként/szövetenként/sejtenként eltér

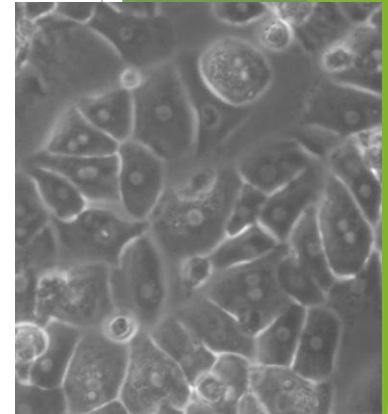
Toxikológiai célszervek: máj



- ▶ Fontos élettani folyamatok központja: bioszintézis, anyagcsere, detoxifikáció, biotranszformáció
- ▶ Hepatotoxicitás mérése:
 - lipidperoxidációs folyamatok sérülése (oxidatív stressz)
 - nekrózis
 - cirózis, fibrózis
 - elzsírosodás
 - epeürülés gátlása
 - májenzimek aktivitásának mérése

Hepatotoxicitás vizsgálat *in vitro* rendszerekkel

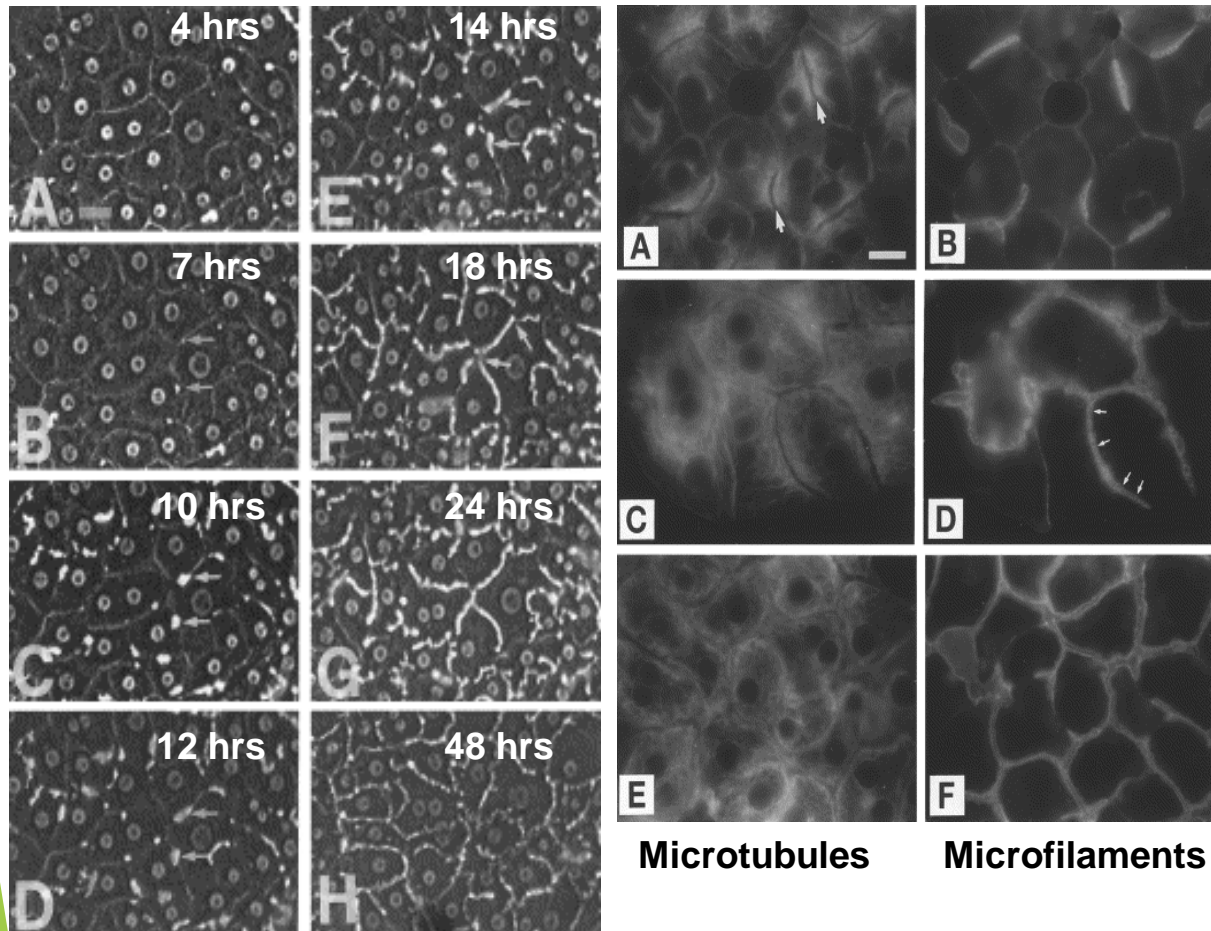
- ▶ Máj: fő toxikológiai célszerv
- ▶ Izolált, perfundált máj
- ▶ májszeletek
- ▶ Májsejtek (hepatocyták) (sejttenyészet)
- ▶ **Mikroszómák** /S9 szubfrakció (mikroszóma = endoplazmatikus retikulum eredetű, **P450** tartalmú vezikulumok, centrifugálással elkülöníthetők)
- ▶ Plazma membrán vezikulumok
- ▶ Májban kifejeződő fehérjék (P450, transzporterek, receptorok)



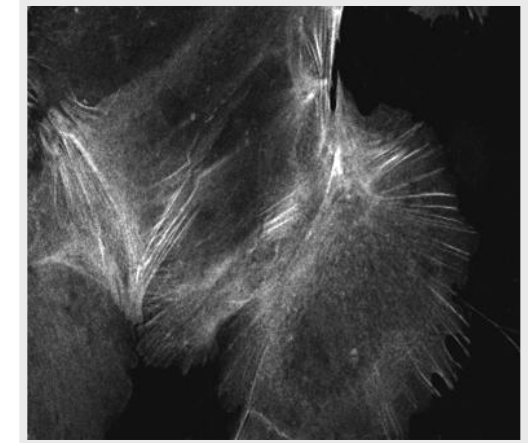
Primer májsejt tenyészetek

- ▶ Májból izolált (intakt) sejtek *in vitro* fenntartása, tenyésztése
- ▶ Hatékony xenobiotikumok metabolizmusa és hepatotoxicitás vizsgálat
- ▶ Megőrzik az élő májszövetre jellemző biokémiai és molekuláris rendszereket
- ▶ Megőrzik az *in vivo* jellemző érzékenységet
- ▶ Megfelelő körülmények között hosszú távon életben tarthatók
- ▶ Fajspecifikus választ adnak

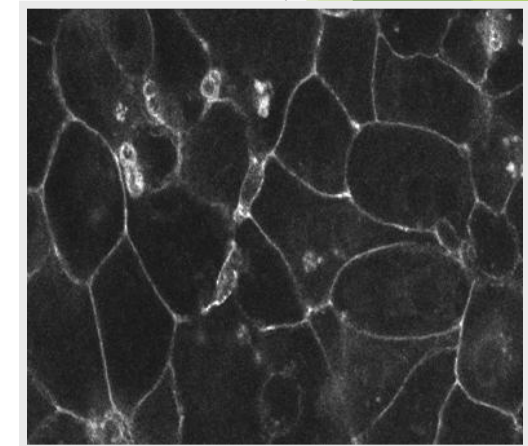
Májsejt tenyésztés



Microfilaments



Low-density



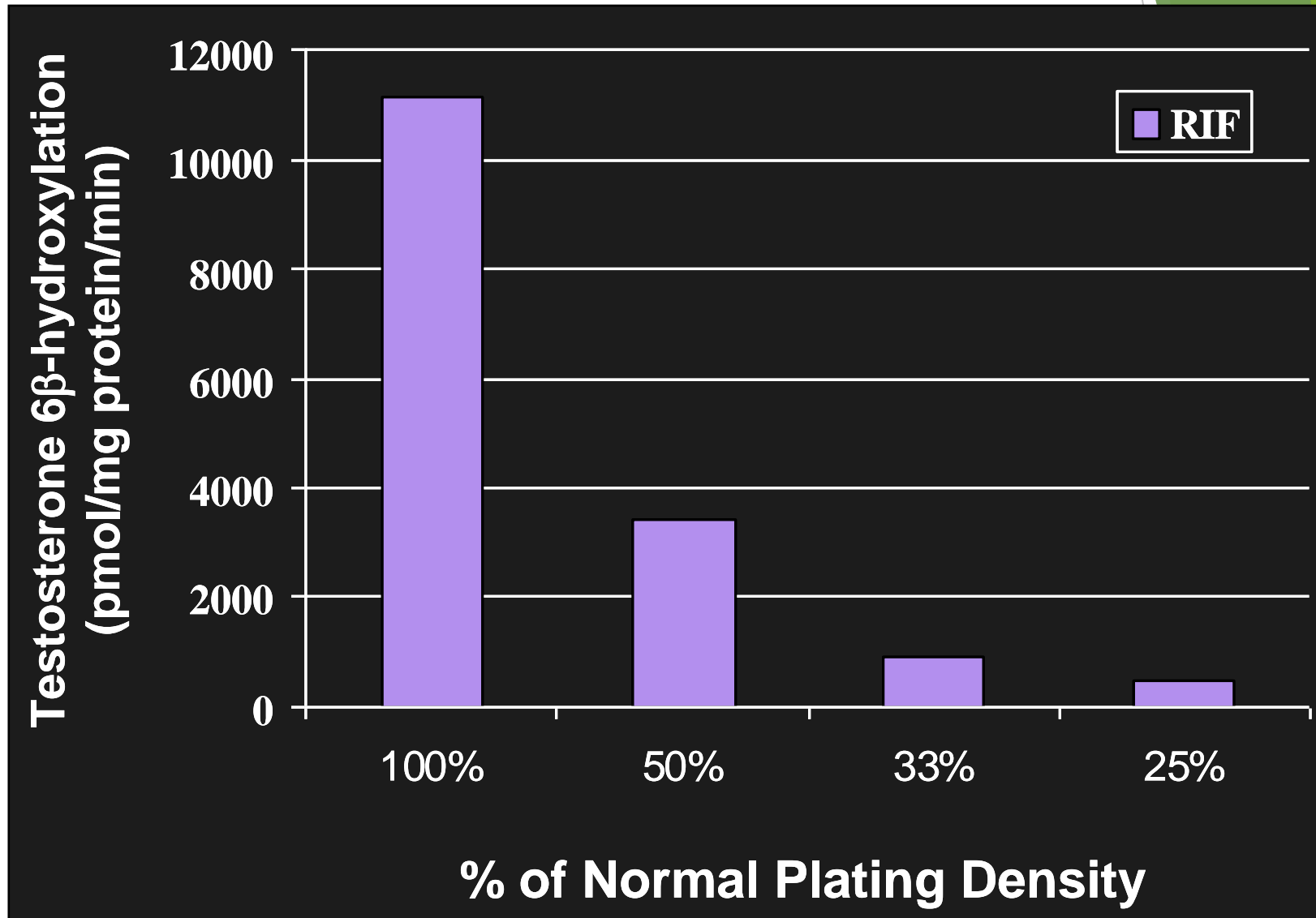
High-density

Time course of Bile Canaliculi development in a culture (high density) of rat hepatocytes from 4 to 48 hr after collagen overlay illustrating the pattern of network formation

Májenzim indukció vizsgálat

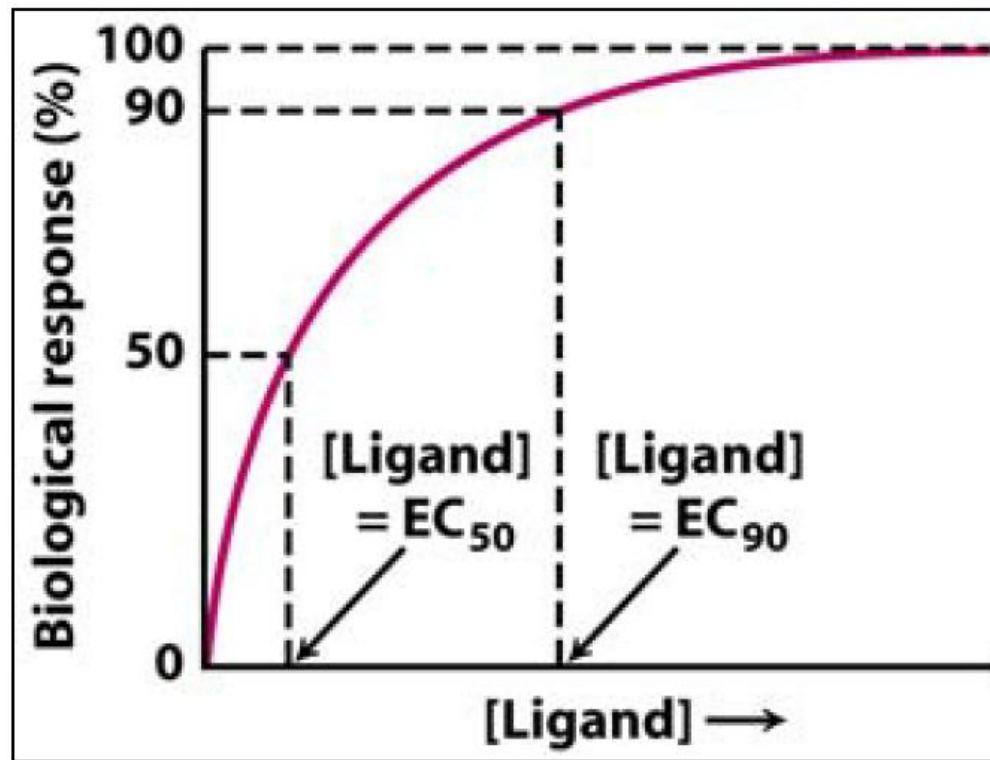
- ▶ *In vivo* állatkísérletek, *ex vivo* elemzés
- ▶ májszeletek
- ▶ Elsődleges májsejt-tenyészetek
- ▶ Sejtvonalak (HepG2, Huh7 /humán karcinóma/)
- ▶ nincs zebradánió májsejt vonal
- ▶ Sejtmagi receptorokhoz való kötődés, affinitás vizsgálat

A sejtsűrűség befolyásolja a P450 indukciót



Indukció kiértékelése

- ▶ **EC₅₀**:
 - ▶ A maximális indukciós szint felének eléréséhez szükséges koncentráció (Effective concentration for 50% maximal induction)



Toxikológiai célszervek: vér

- ▶ Vérszövetek (erythrocyta, leukocyta, thrombocyta)
- ▶ A sejtek működése megváltozik vagy számuk csökken vagy nő
(leukémia, trombocitopénia, granulocitopénia, methemoglobinémia)

Toxikológiai célszervek: vese

- ▶ Fő feladata: filtráció, re-abszorpció, szekréció
- ▶ Nefrotoxicitás mérése:

Porózussá válik

Ozmotikus viszonyok megváltoznak

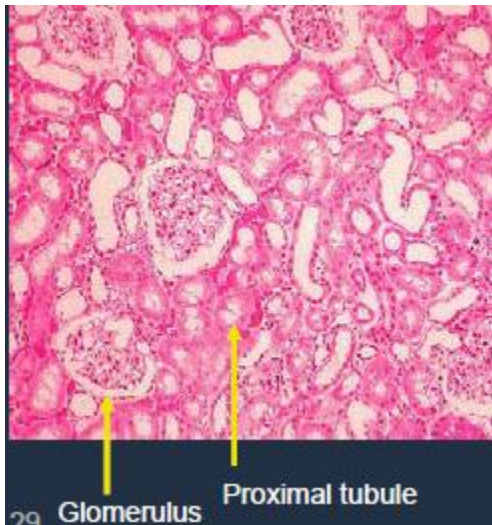
Re-abszorpció sérül (elektrolitvesztés, sóvesztés, tápanyagvesztés, vízvesztés)

Aktív transzport sérülése

Vesekő, nekrózis

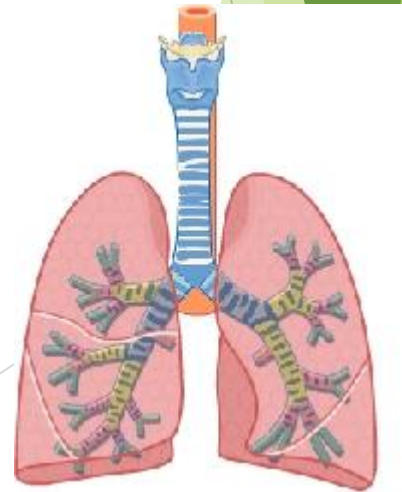
Filtráció csökken

Tubuláris szekréció csökken



Toxikológiai célszervek: tüdő

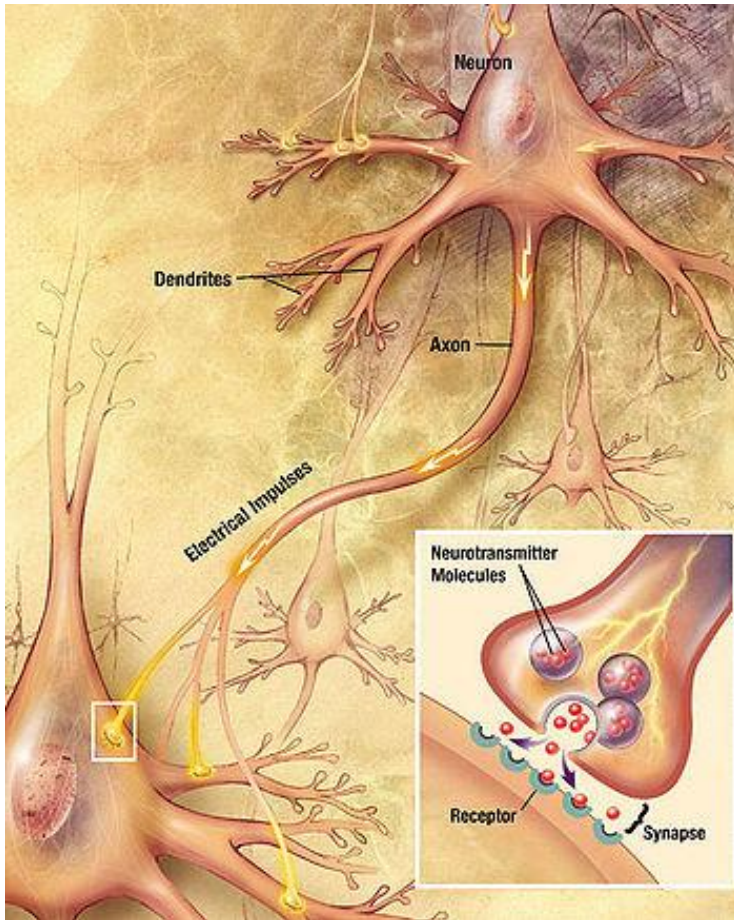
- ▶ Funkció: gázcsere
- ▶ Gyors gázcsere, nagy felület, mukózus felszín miatt érzékeny
- ▶ Karcinogének, allergének, irritatív anyagok, por, citotoxikus anyagok, stb.
- ▶ Pulmotoxicitás mérése: Gyulladás, ödéma, nekrozis, fibrózis, karcinóma...



Toxikológiai célszervek: bőr

- ▶ A szervezet elsődleges védelmi vonala
- ▶ Dermotoxicitás
- ▶ Toxikus anyagok, fény (UV) hatására dermatitis

Toxikológiai célszervek: idegrendszer



- ▶ Központi idegrendszer: agy, gerincvelő
- ▶ Perifériás idegrendszer: idegsejtek hálózata, szenzoros és motoros kontroll
- ▶ Neuronok és gliasejtek
- ▶ A neurotoxinok gátolhatják a Na/K csatornákat, a neurotranszmitterek kötődését, felszabadulását, mielinhüvely sérülést okozhatnak, morfológiai változások, nekrozis

Sejtvonalalak

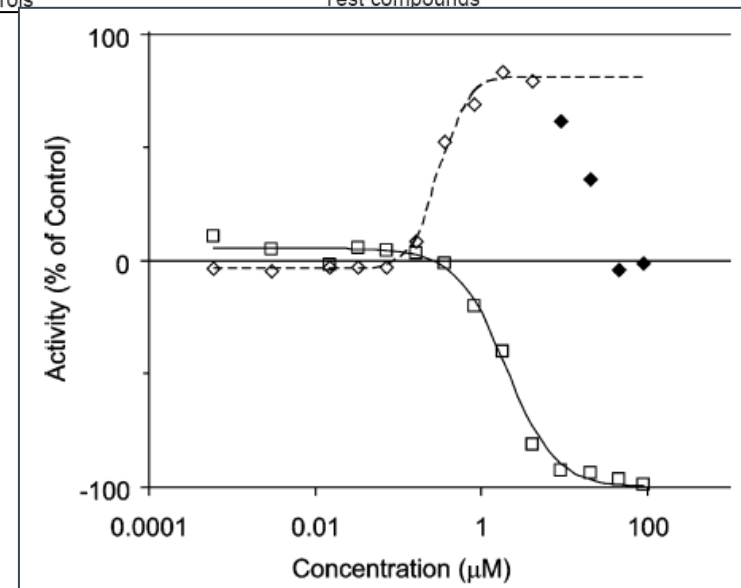
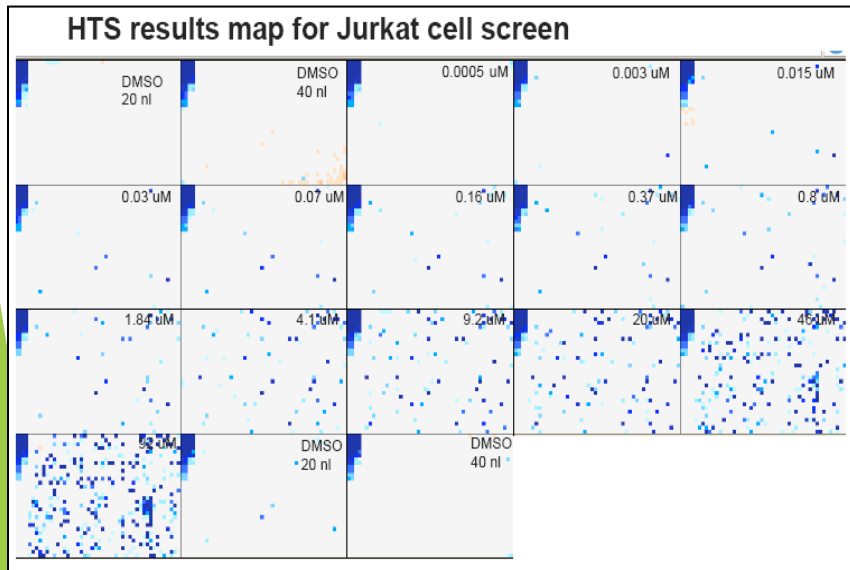
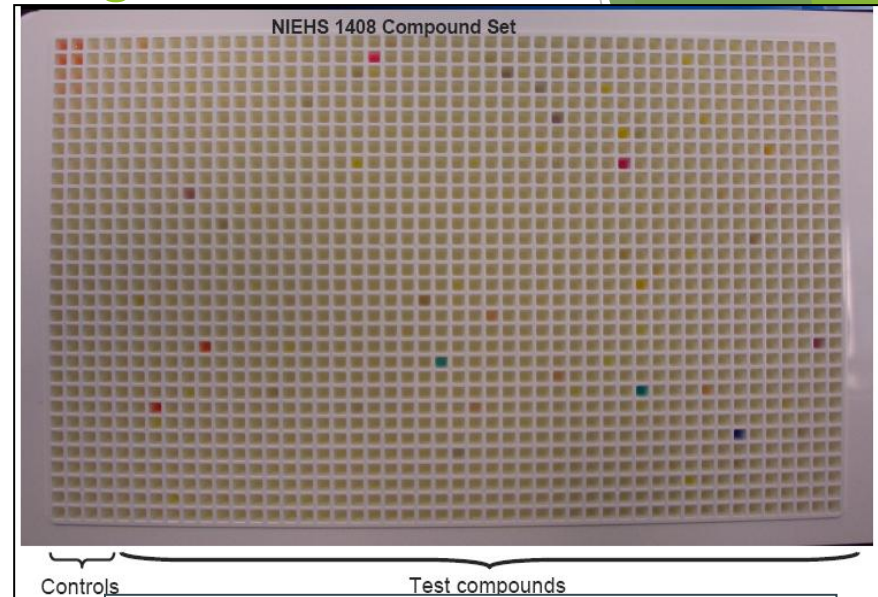
- ▶ Szervből létrehozott primer sejt kultúrák (máj, vese, idegsejtek, szív, vázizomzat, tüdő, vér, csontvelő)
- ▶ Külön-külön a májban lezajló metabolikus folyamatok nincsenek hatással
- ▶ Megoldás: **IdMOC** (Integrated Discrete Multiple Organ Co-culture)
- ▶ Transzgenikus sejtvonalalak

IdMOC (Integrated Discrete Multiple Organ Culture Plate)

- In vivo sejt-kommunikáció modellezése *in vitro*
- az univerzális médiumban a különböző faktorok el tudnak - jutni az egyik sejt-típustól a másikig)

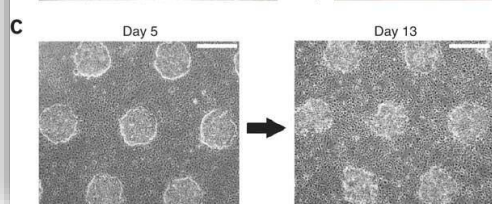
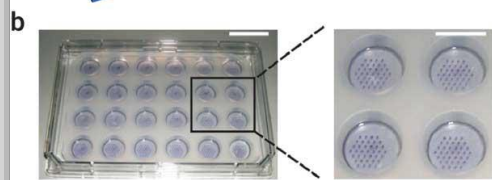
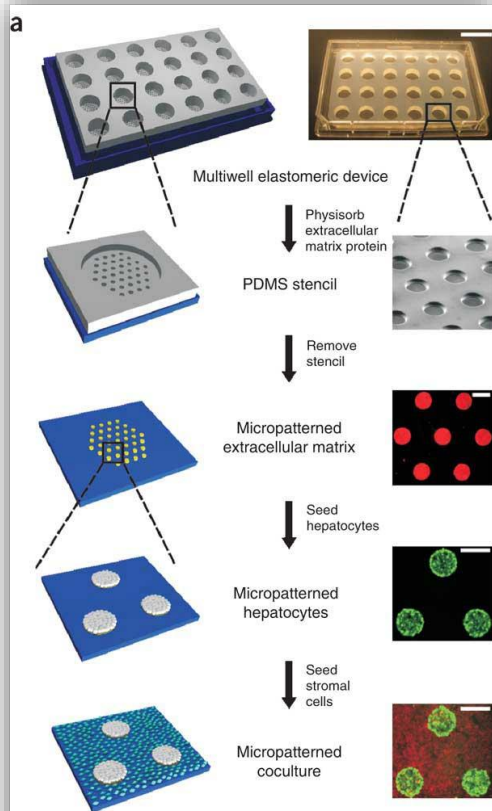


Sejtkultúra alapú, kvantitatív, nagy teljesítőképességű (High Throughput) vizsgálatok



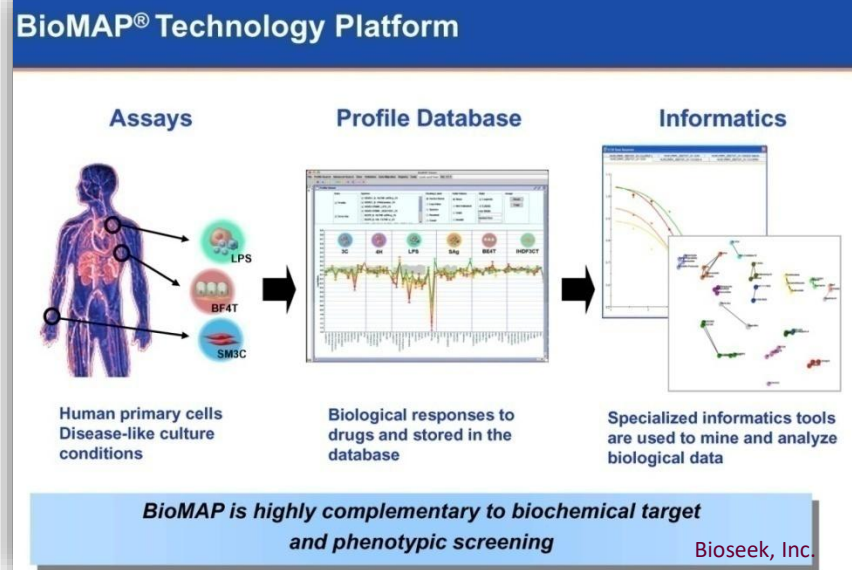
Mesterséges szövettenyésztés alapú vizsgálatok

Microscale liver hepatocyte cultures

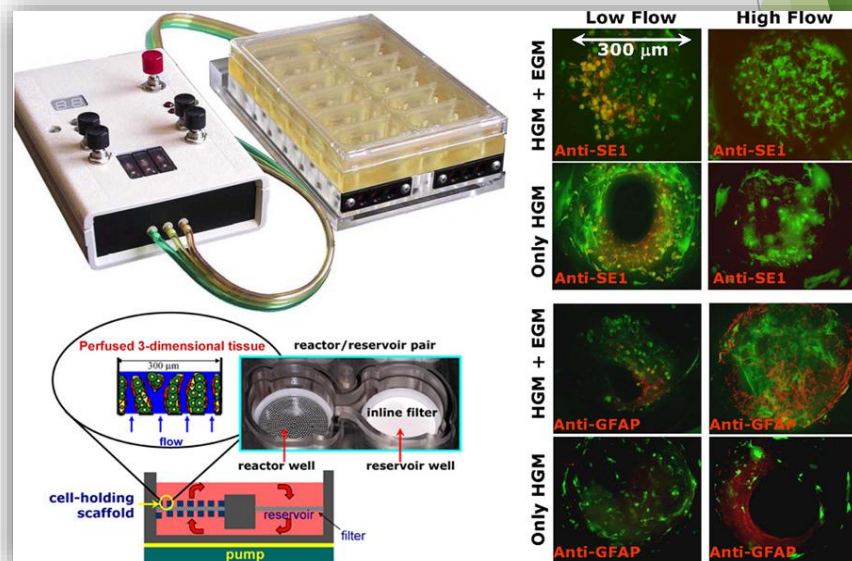


Khetani & Bhatia, Nature Biotechnology (2008)

Cell co-cultures and culture in presence of activators/cytokines



3D Liver Tissue Bioreactor



Data and Images courtesy of L. Griffith (MIT)

Tissue of Origin Immortalization Cell line Differentiation Applications

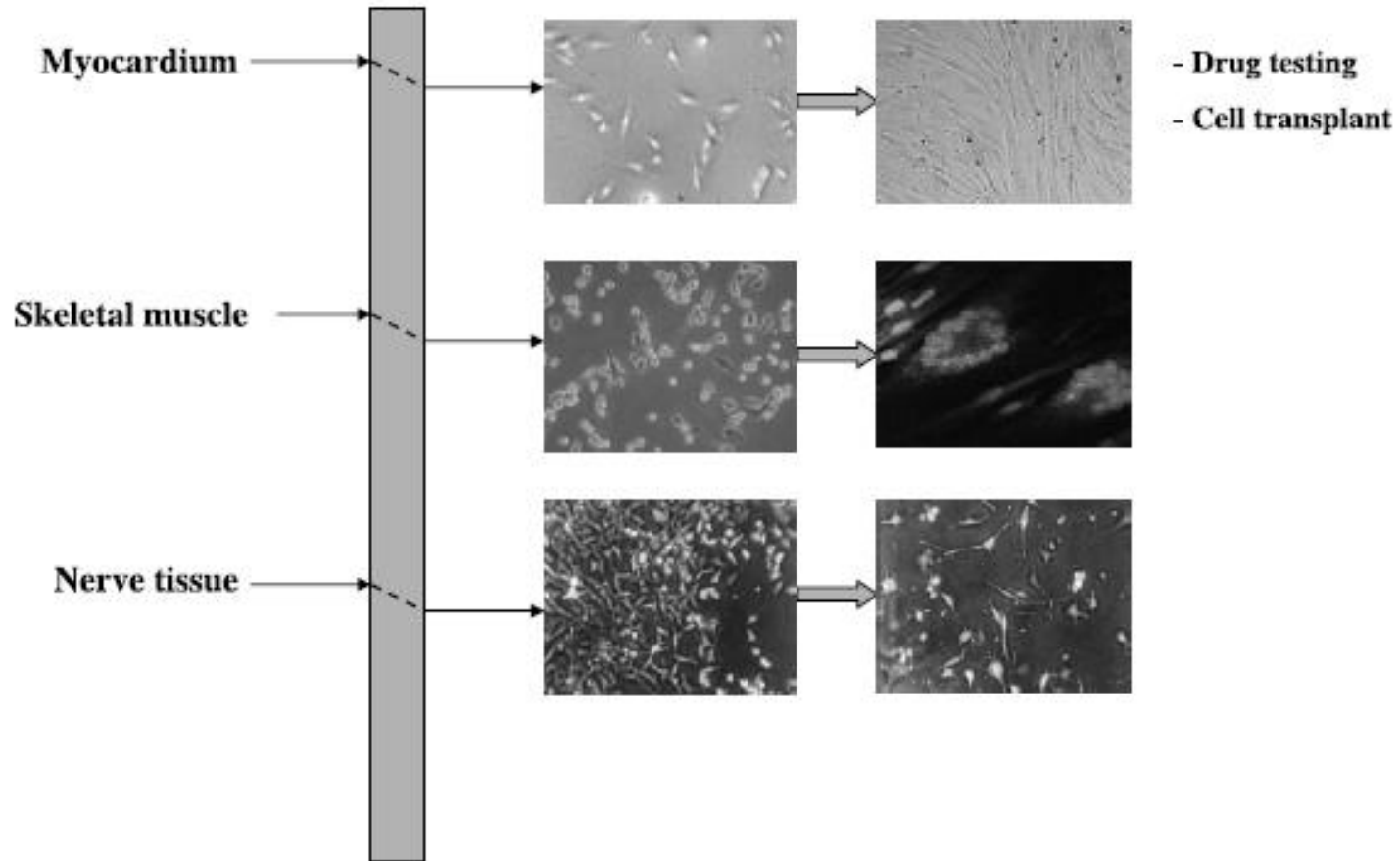
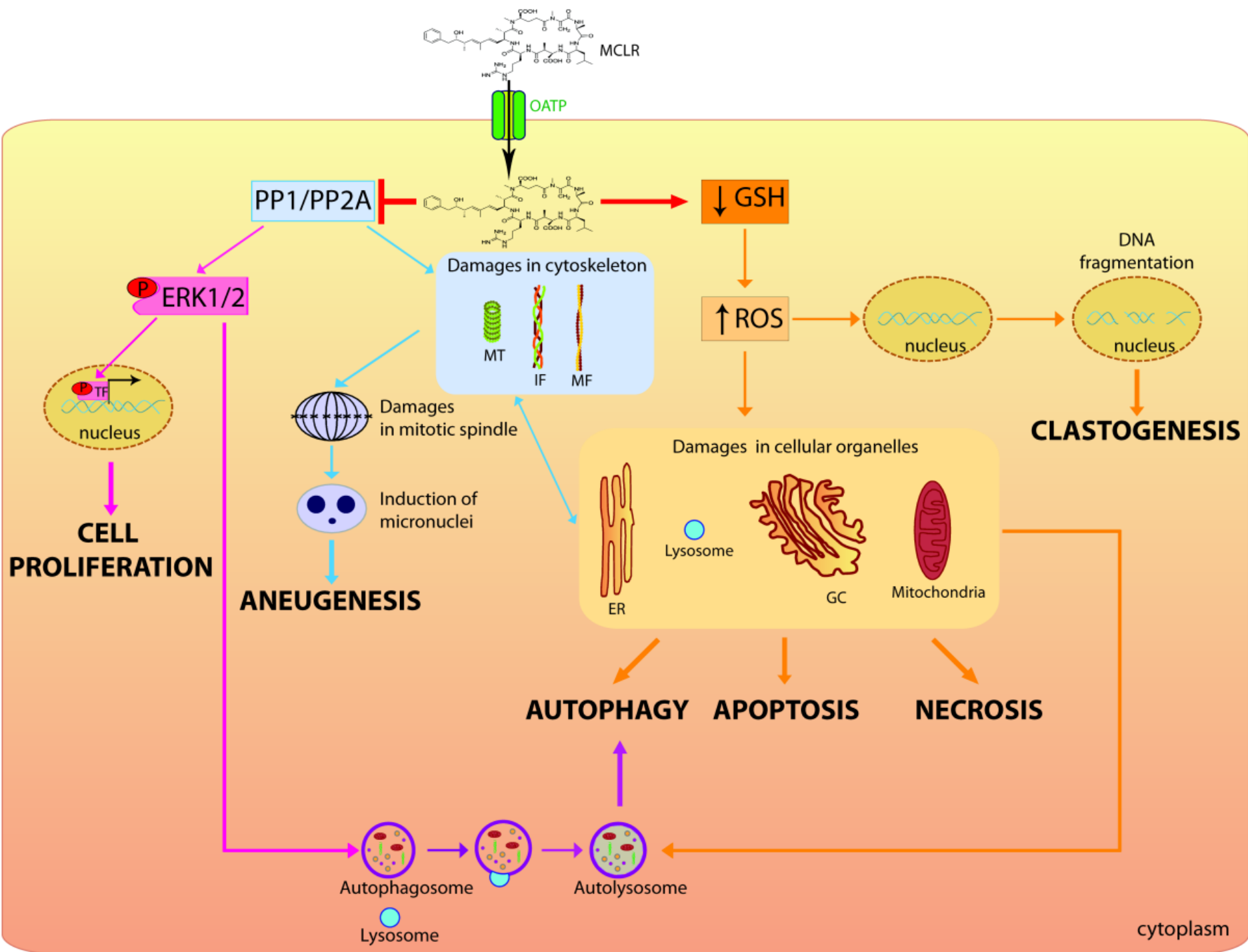


TABLE 1 Brief Description of Some Currently Available Cell Lines from Myocardial Skeletal Muscle and Neuronal Origin

Cell lines	Tissue	Immortalization	Features
H9c2	Subclone of BDIX embryonic rat heart cell line	Spontaneous	Skeletal muscle properties, fusion, response to acetylcholine stimulation.
MHEC5	Mouse heart	Spontaneous, malignant	Endothelial (hemangioendothelioma), tumorigenic. Expresses vascular cell adhesion molecule-1
CMG	Mouse bone marrow stroma	Spontaneous	Forms myotube-like structures, sarcomeres, beating after two weeks. Expression of atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, myosin, desmin and actinin.
RCVC	Adult rat heart muscle	UCHT1 protocol	Muscle markers (myoglobin, α -sarcomeric actin, α -actinin and desmin), mature Ca^{2+} channels.
C2C12	Mouse, skeletal muscle	Spontaneous, after serial passaging	Fusion into terminal mature, contractile myotubes. Expression of ryanodine receptors.
RCMH	Adult human, skeletal muscle	UCHT1 protocol	Expression of muscle specific markers, functional muscle-specific ionic channels, and IP3 receptors. Fusion, forming multinucleated structures.
Neuroblastoma (several)	Mouse brain neuroblastoma C1300	Serial passage	Morphology of mature neurons, expression of tyrosine hydroxylase.
NT2 (Ntera2)	Human, testicular teratocarcinoma	Serial passage	When cultured in retinoic acid, they form hNT postmitotic neurons. Human cell transplant studies have been conducted.
CNh, CTb	Normal (CNh) and trisomy 16 (CTb)	UCHT1 protocol	Neuronal markers, cholinergic phenotype. Functional neurotransmitter receptors (glutamatergic, cholinergic). Down syndrome related anomalies in CTb cells
RCSN	Adult rat substantia nigra	UCHT1 protocol	Neuronal, dopaminergic phenotype. Functional glutamatergic receptors. Reduces rotational behaviour in 6 OH dopamine rats, after striatal implant.

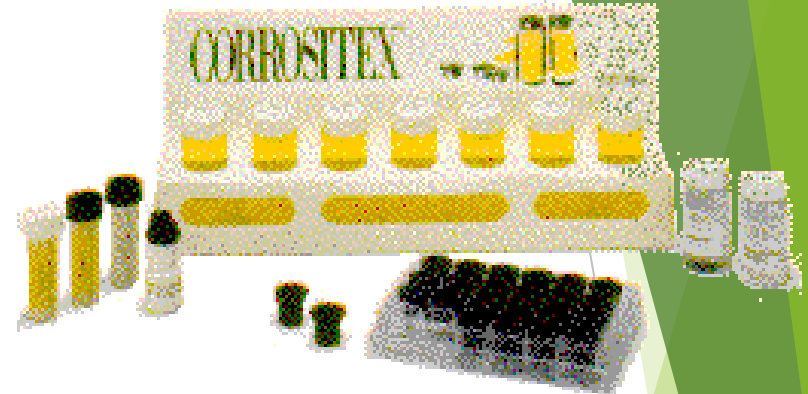


Mesterséges biológiai szövettervezés és előállítás (bőr, tüdő)

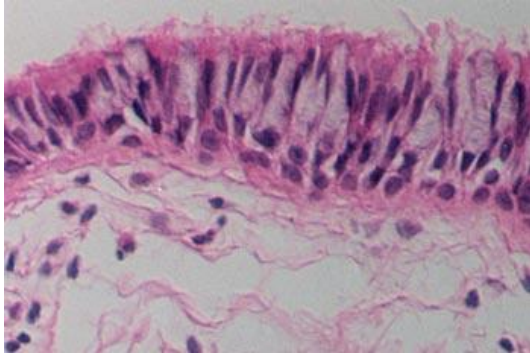
"Corrositex"

Korrozív anyagok bőrre kifejtett hatását modellezzik

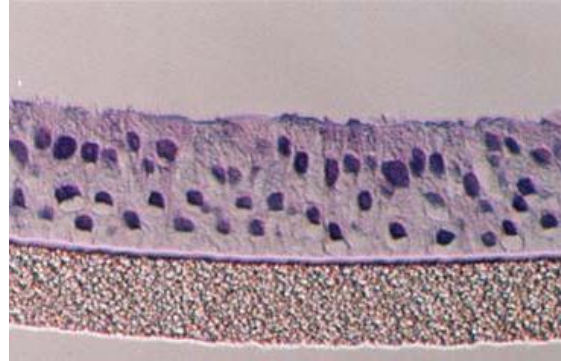
Lényege: oldattal töltött üvegedényeket mesterséges biológiai barrier membrán fed. Korrozív anyagok hatására az üvegedényben lévő vegyület színe vagy állaga megváltozik



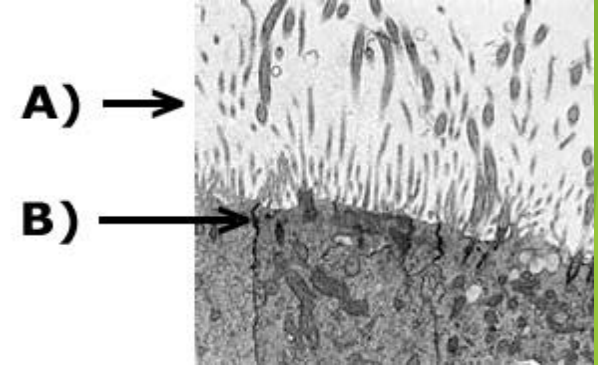
Mesterséges biológiai szövettervezés és előállítás (bőr, tüdő)



Normal human bronchiole (10X)



EpiAirway tissue (10X)



EM micrograph of EpiAirway tissue

Levegő-folyadék interfázison növesztett sejtenyészet (EpiAirway®)

- airway inflammation and irritancy studies (gas phase exposure to volatile materials)
- inhalation toxicity studies
- inhaled drug delivery studies (measurements of trans-epithelial permeability)
- mechanisms of bacterial infections of the respiratory tract
- pharmaceutical prevention of bacterial infections of the respiratory tract
- mechanisms of asthma, cytokine responses, or various airway disorders

Alacsonyabb rendű („egyszerű”) szervezetek

Egysejtűek:

- pl. baktériumok, élesztő
- alapvető sejtszintű folyamatok tanulmányozása
- sejtek közötti interakciók nem vizsgálhatók

Többsejtű gerinctelenek:

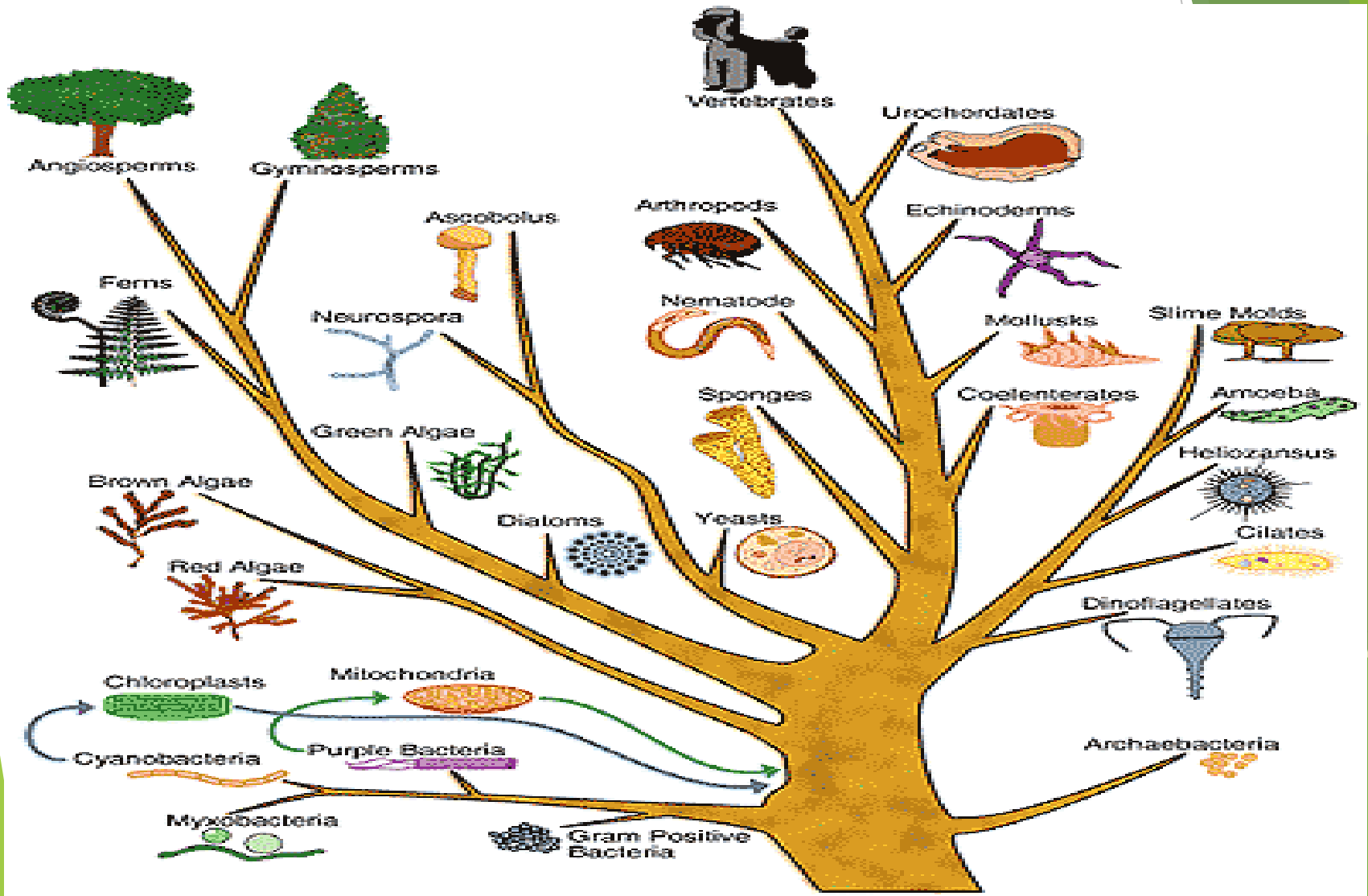
- pl. ecetmuslica (*Drosophila*), fonálférgék (*C. elegans*)
- útvonal elemzés
- csak alapszintű élettani vizsgálatok, a folyamatok jó része nagy mértékben különbözik a magasabb rendűektől

Genotoxicitás vizsgálatok alacsonyabb rendűeken

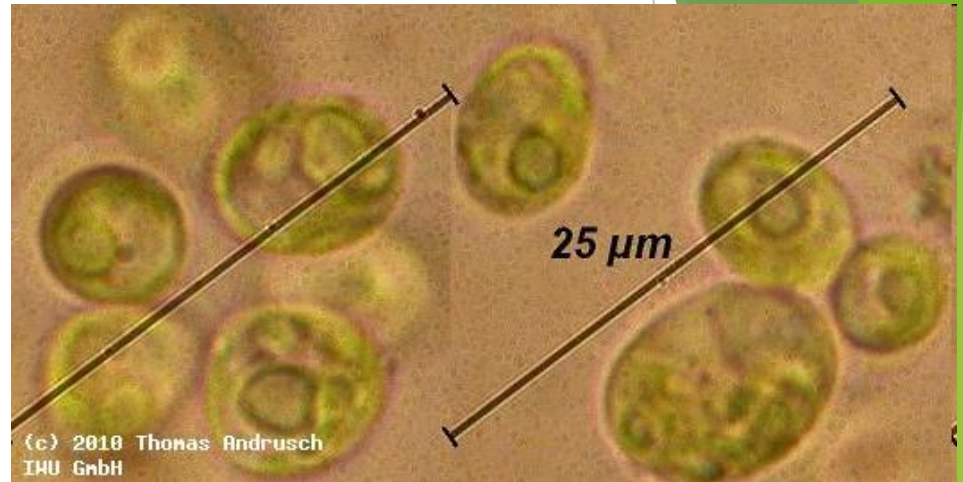
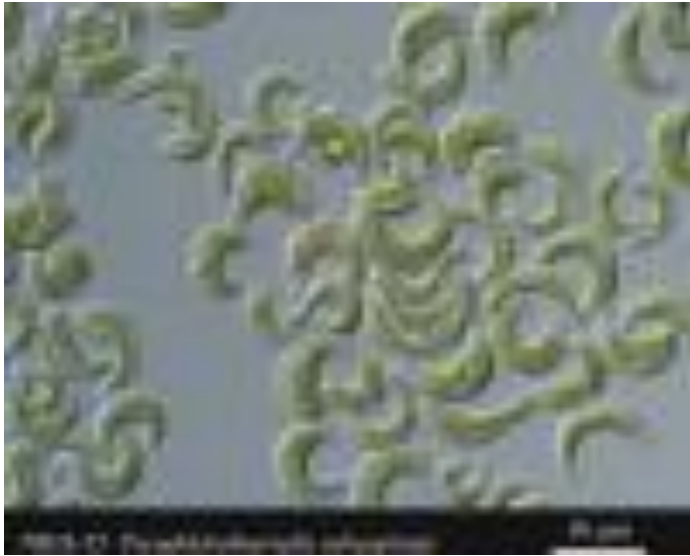
Table 4.4. Genetic and related effects of urethane (ethyl carbamate)

Formation system	Result ^a		Dose (LED or HID) ^b	Reference	
	Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system			
bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> , M45 <i>rec</i> ⁻ , differential toxicity	(+) ¹	(+) ¹	2000	Ashby & Kilbey (1981)
	<i>Escherichia coli polA</i> ⁻ , differential toxicity	(+) ²	(+) ²	2500	Ashby & Kilbey (1981)
	<i>Escherichia coli</i> WP2-WP100, differential toxicity	NT	-	2000	Mamber <i>et al.</i> (1983)
	<i>Escherichia coli gal</i> operon, reverse mutation	(+) ³	(+) ³	2000	Ashby & Kilbey (1981)
	<i>Escherichia coli</i> PQ37 SOS, reverse mutation	-	-	1000	Dayan <i>et al.</i> (1987)
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1536, TA1537, TA98, reverse mutation	-	-	125	Simmon (1979)
yeast	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, reverse mutation	-	+	5000	Hubner <i>et al.</i> (1997)
	<i>Salmonella typhimurium</i> RS112, DEL recombination	+	+	20000	Galli & Schiestl (1998)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3, mitotic recombination	-	-	50000	Simmon (1971)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> P1, forward mutation	-	-	4.6	Loprieno (1981)
plants	<i>Aspergillus nidulans</i> , aneuploidy	+	NT	225	Crebelli <i>et al.</i> (1986)
	<i>Aspergillus nidulans</i> , forward mutation	-	NT	40000	Crebelli <i>et al.</i> (1986)
	<i>Neurospora crassa</i> , aneuploidy	-	NT	100	Griffith <i>et al.</i> (1986)
flies	<i>Drosophila melanogaster</i> , sex-linked recessive lethal mutation	+		35600	Di Paolo (1952)
	<i>Drosophila melanogaster</i> , somatic mutation and recombination	+		890	Osaba <i>et al.</i> (1999)
	<i>Drosophila melanogaster</i> , genetic crossing-over or recombination	+		225	Nivard & Vogel (1999)

Növények



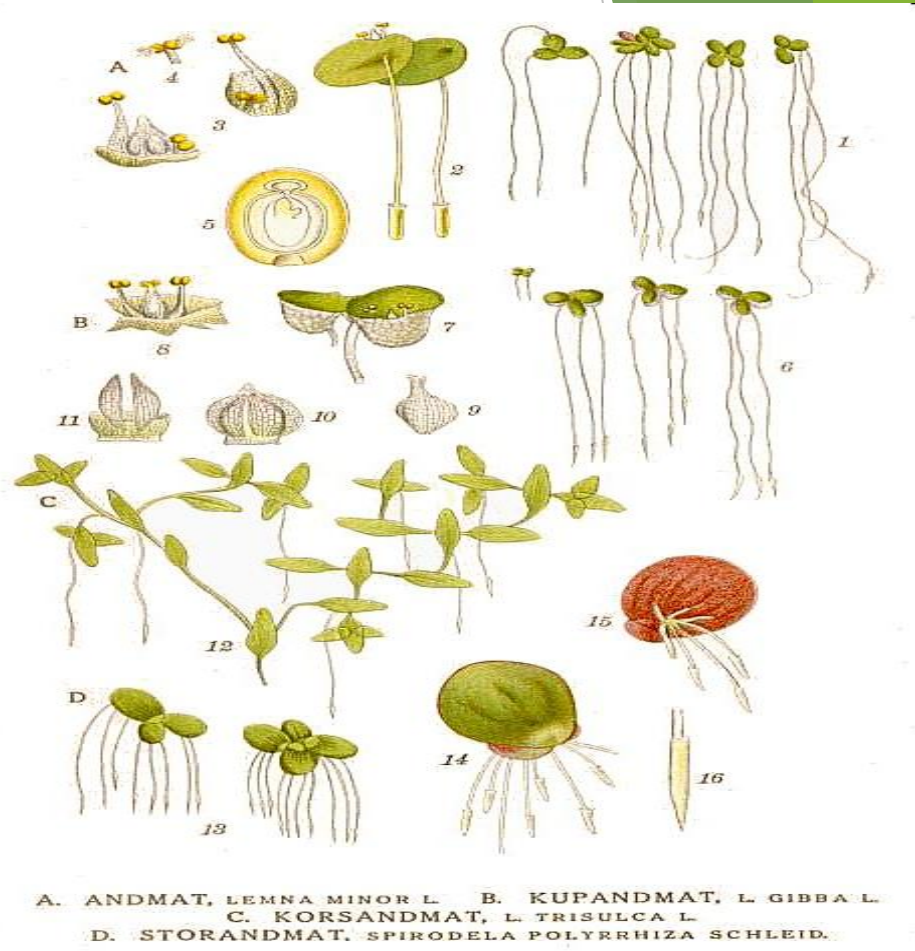
Algák



Növekedés gátláson alapuló teszt: Az algatenyészet sejtkoncentrációját naponta kell mérni; a számlálás történhet mikroszkópos sejtszámlálással, vagy elektronikus részecskeszámlálóval, esetleg optikai denzitás mérésével vagy klorofill-tartalom alapján

Békalencse (*Lemna minor* vagy *Lemna gibba*)

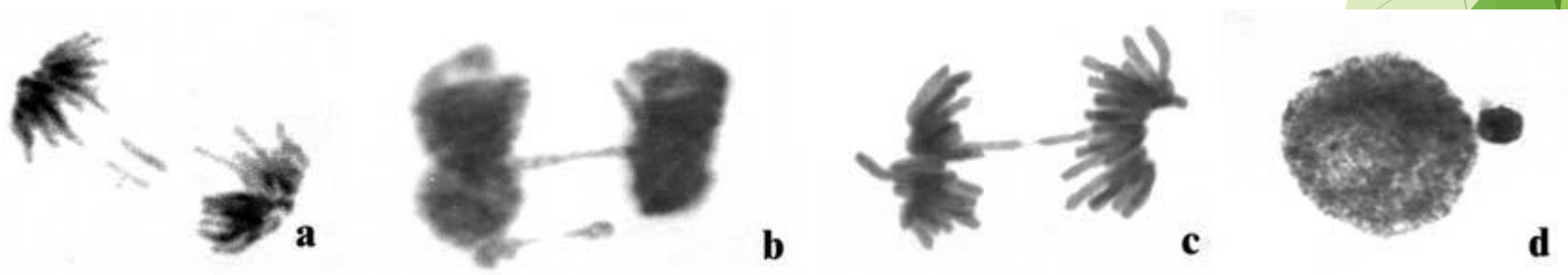
gyors növekedésű, vízi életmódú egyszikű, a zárvatermők közül a legkisebbek közé tartozik.



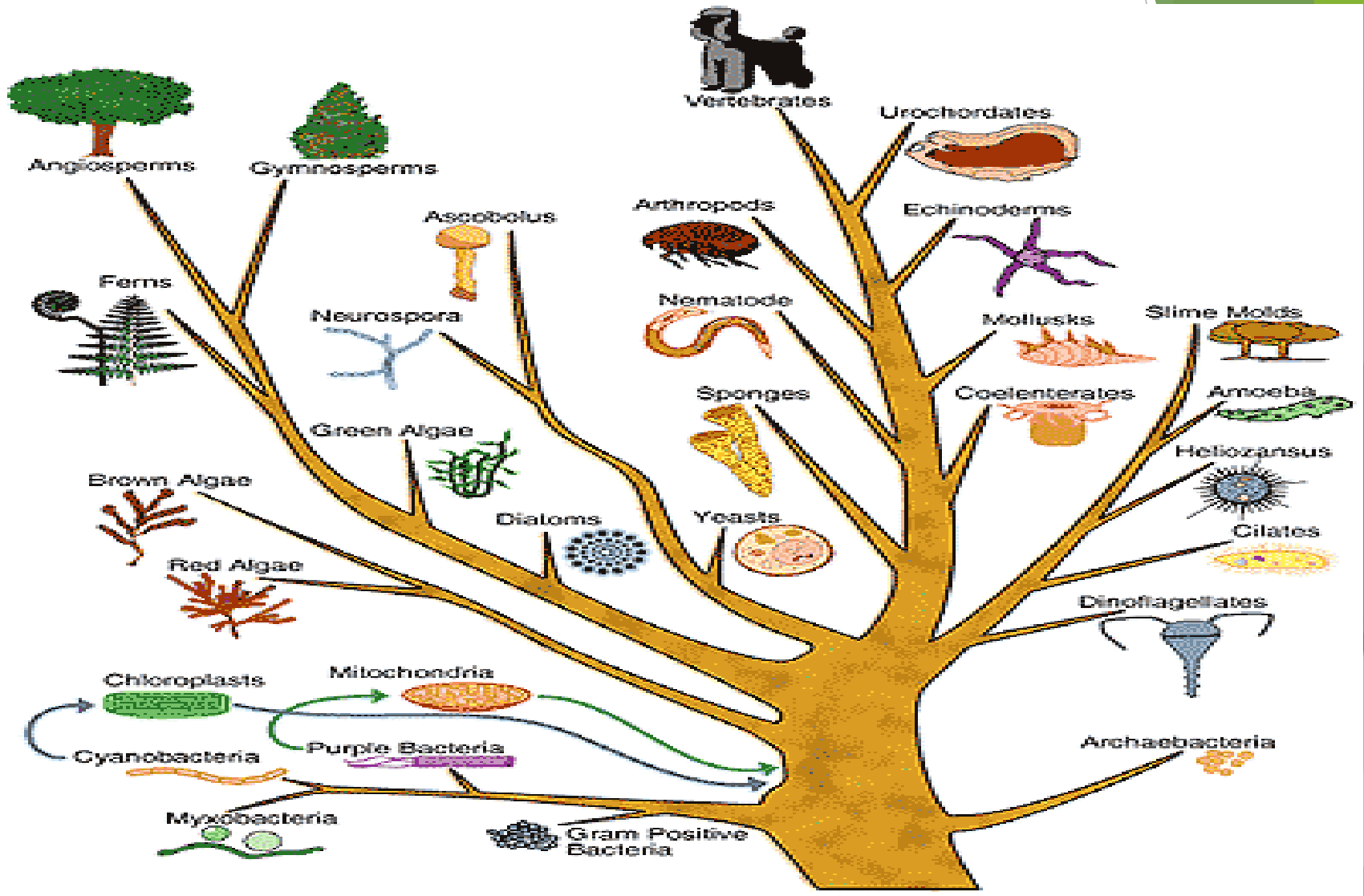
Növekedés gátlási teszt. Végpontok: a levélkeszám, de emellett gyakori tesztelési végpont a teljes levélfelület, a száraz súly és a nedves súly is

Magasabbrendű növények

- ▶ Genotoxicitás vizsgálatok
- ▶ hagyma (*Allium cepa*), lóbab (*Vicia faba*), árpa (*Hordeum vulgare*), vékony zörgfű (*Crepis capillaris*), pletyka (*Tradescantia*), dohány (*Nicotiana tabacum*)...



Állatok



Caenorhabditis elegans

- ▶ Szaprofita fonálféreg, talajban, avarban él
- ▶ Olcsó, egyszerű tartás
- ▶ etetés: E. coli-val
- ▶ Hermafrodita
- ▶ 3,5 nap alatt ivaréretté válik
- ▶ Teljes élettartam: 10 nap
- ▶ Sok utódot hoz létre (kb. 300)
- ▶ Kis méretű (1 mm)
- ▶ Áttetsző, anatómiája jól ismert
- ▶ Teljes genomi szekvencia
- ▶ Génjeinek 35%-a homológ az emberével



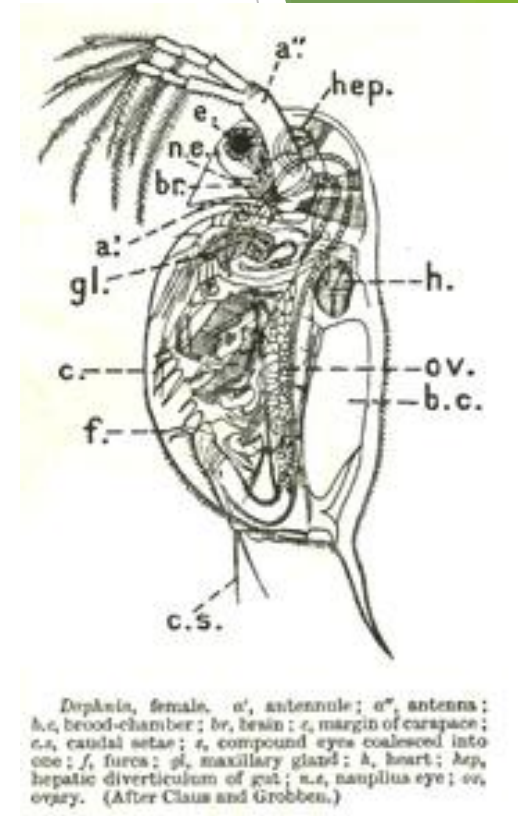
Caenorhabditis elegans

- ▶ Karcinogenitás és mutagenitás tesztek
- ▶ Fejlődéstoxicológia
- ▶ Neurotoxikológia
- ▶ Endokrin rendszer megzavarása



Ágascsapú rákok (*Daphnia magna*)

- Mozgásképtelenség vizsgálata (immobilizációs teszt)



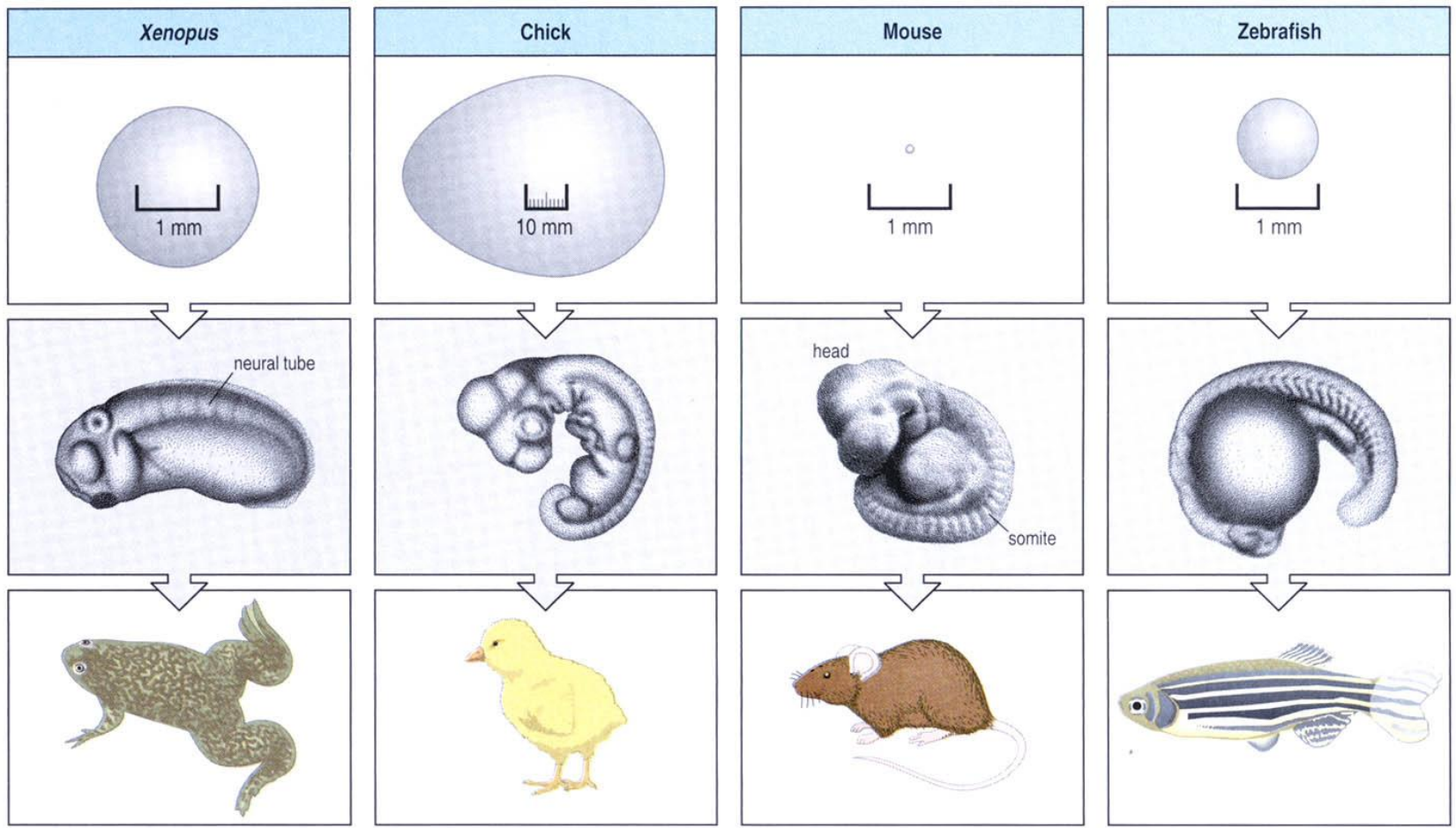
Ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*)

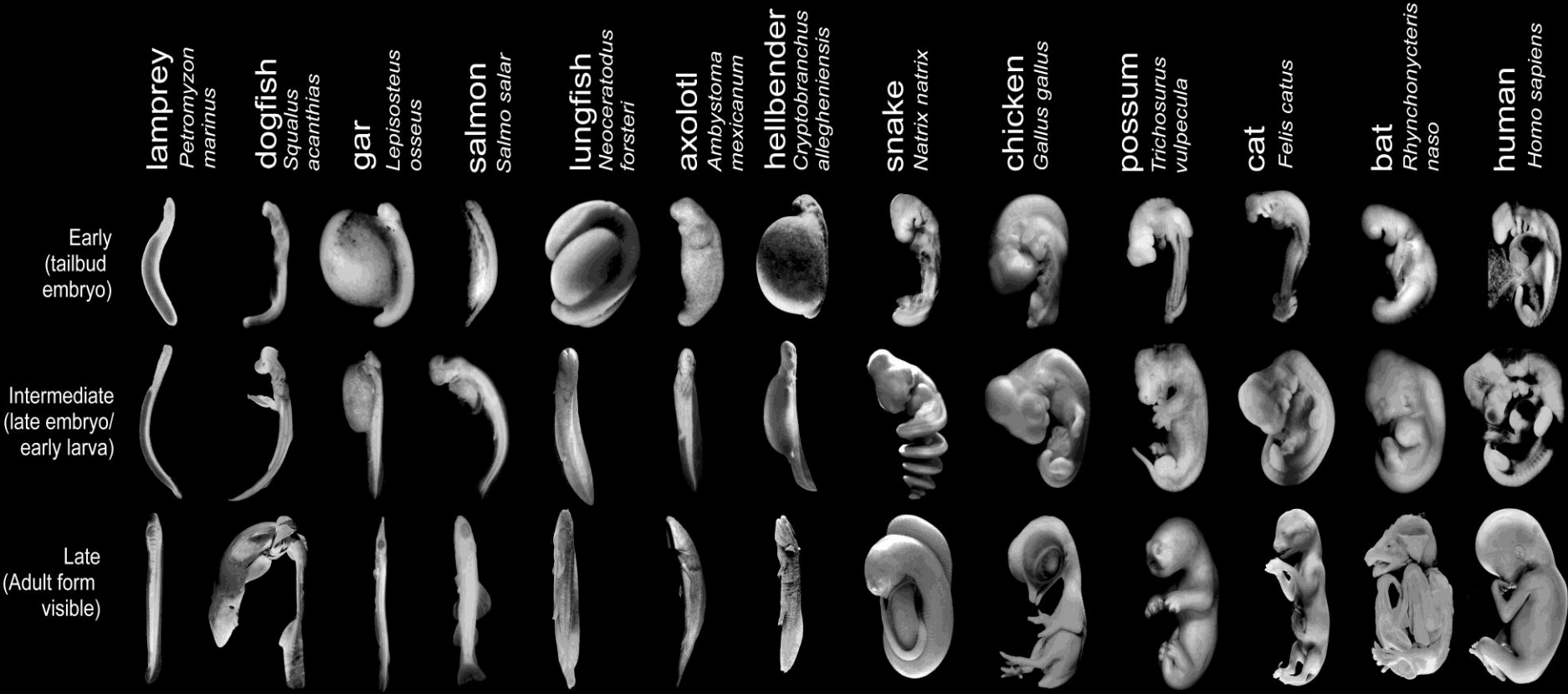


- ▶ Kis méret
- ▶ Olcsó, egyszerű tartás
- ▶ ivarérettség: 12-14 nap alatt
- ▶ Főként mutációk vizsgálata, neurotoxikológia, fejlődéstudomány

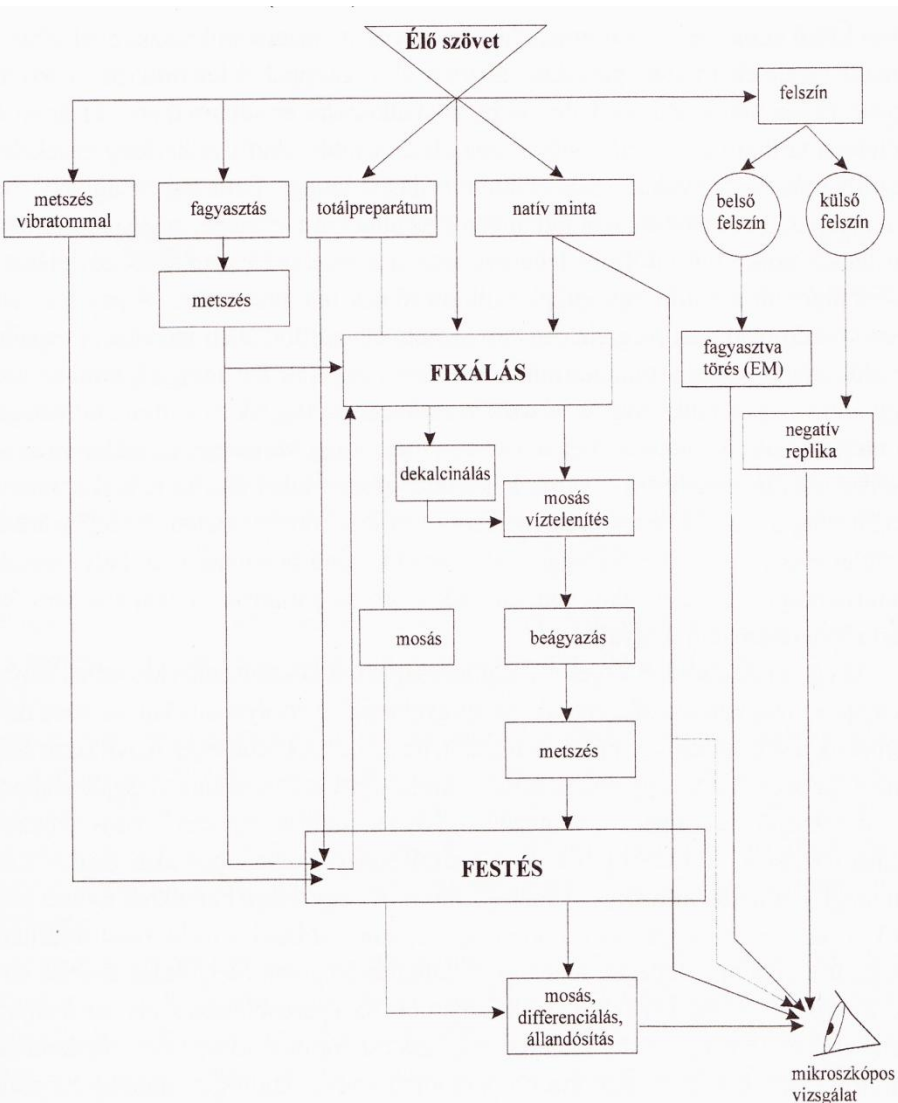


Gerinces modellállatok





Szövetteni metszetek a mérgezéseknek leginkább kitett szervekből



Hematoxilin-eozin festés:

A sejtmagok, a baktériumok, a porcszövet és nyákok kékre, a vörösvértestek narancsvörösre, minden egyéb szövet rózsaszínűre festődik.

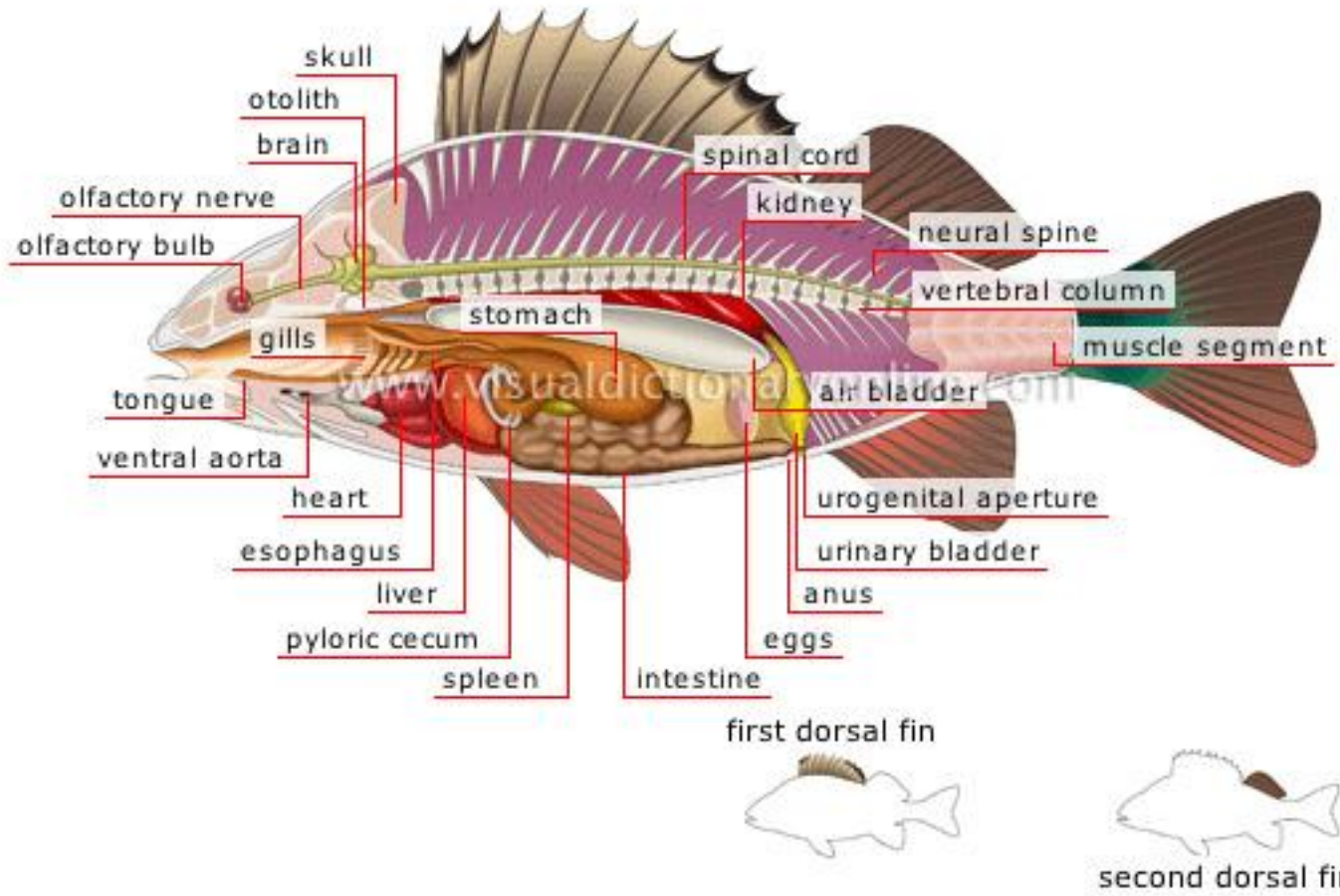
PAS- (periodic acid-Schiff) festés:

A makromolekuláris szénhidrát komponenseket festi meg. A glikogén, fibrinoid, hámnyák, porcalapállomány, amiloid, kolloid, cellulóz, bazális membránok, a hipofízis bazofil sejtjei és a gombák ibolyásvörösre, a kollagénrostok halványvörösre, és a sejtmagok kékre színeződnek.

Grohe – Perls-féle eljárás (1854, 1867):

A ferrivasat tartalmazó elemek kékre, a sejtmagok vörösre, a citoplazmák rózsaszínűre színeződnek.

Halak



Bőr



***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a bőrről
I.: normális vastagságú hámréteg, II.: pikkely, III.: harántcsíktott izomszövet,
IV.: a 10 %-os formalin károsító hatása***

Bőr II



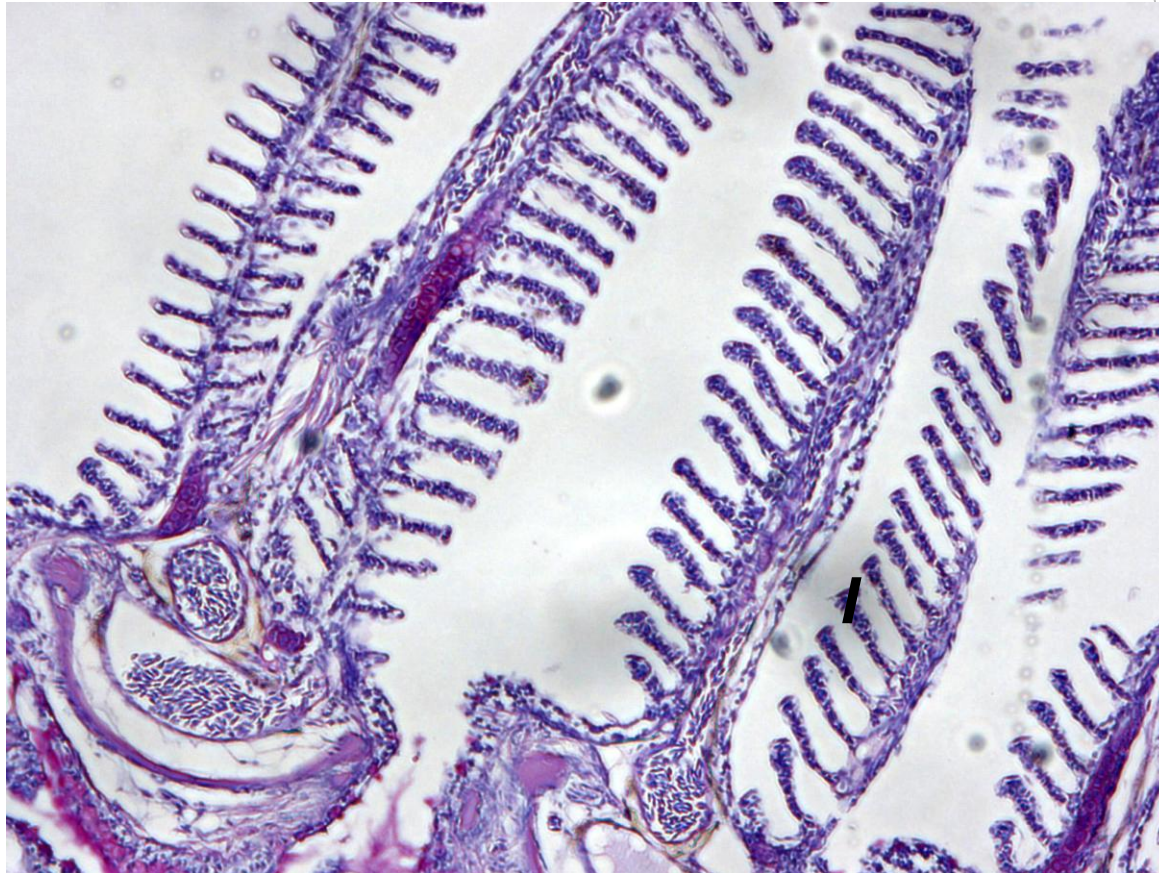
***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a bőrről
I.: hámréteg a pikkelyeken, II.: zsírszövet***

Kopoltyú



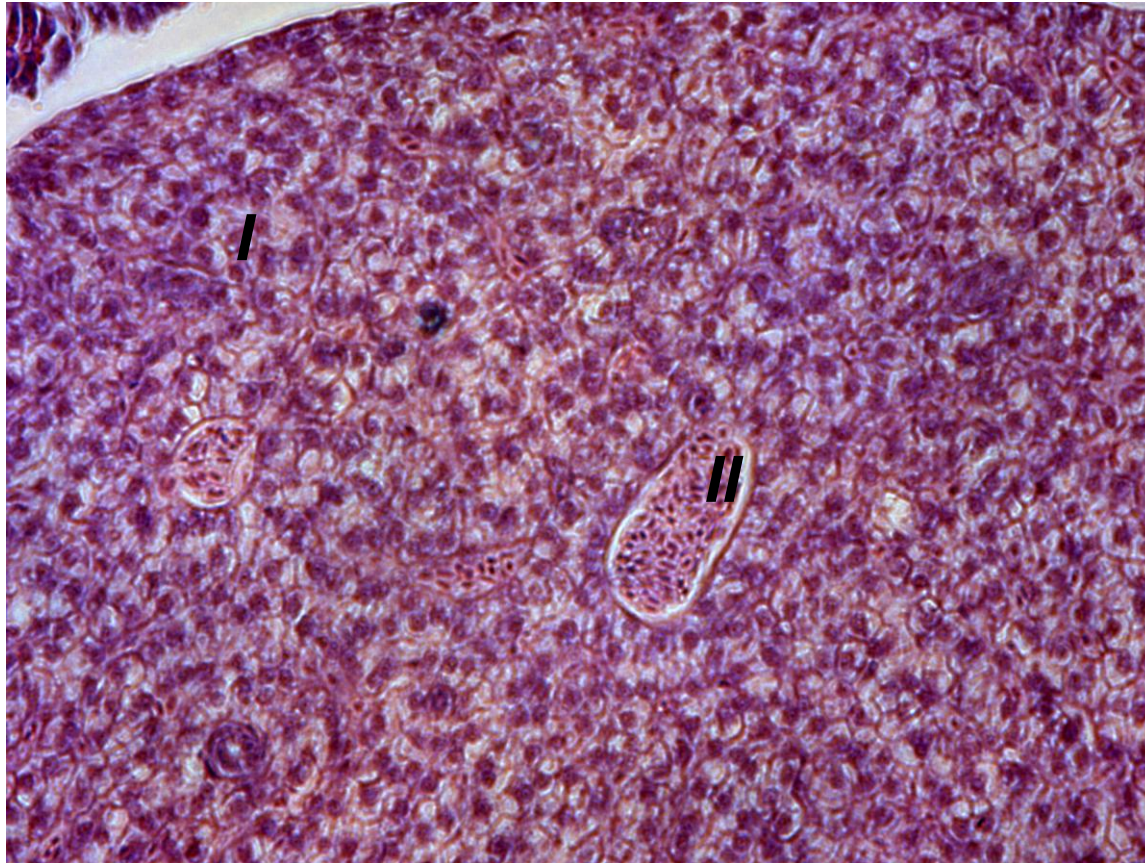
**Tízszerezes nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a kopoltyúról
I.: kopoltyúívek, II.: kopoltyúlemezkék egyrétegű laphámja**

Kopoltyú II



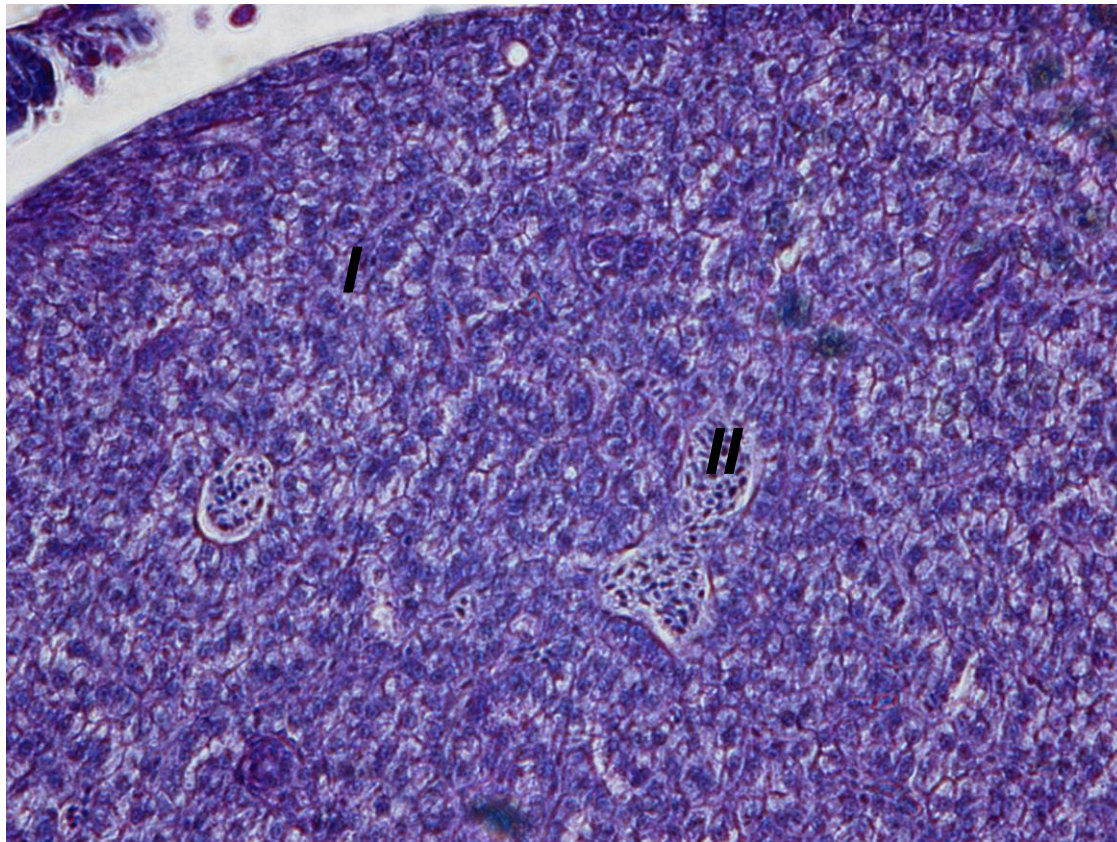
***Tízszeres nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a kopoltyúról
I.: légzőredők egyrétegű laphámja***

Máj



***Húszszoros nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a májról
I.: májsejtek, II.: vérér***

Máj II



***Húszszoros nagyításban készült hosszmetzeti felvétel a májról
I.: májsejtek, II.: vérér***

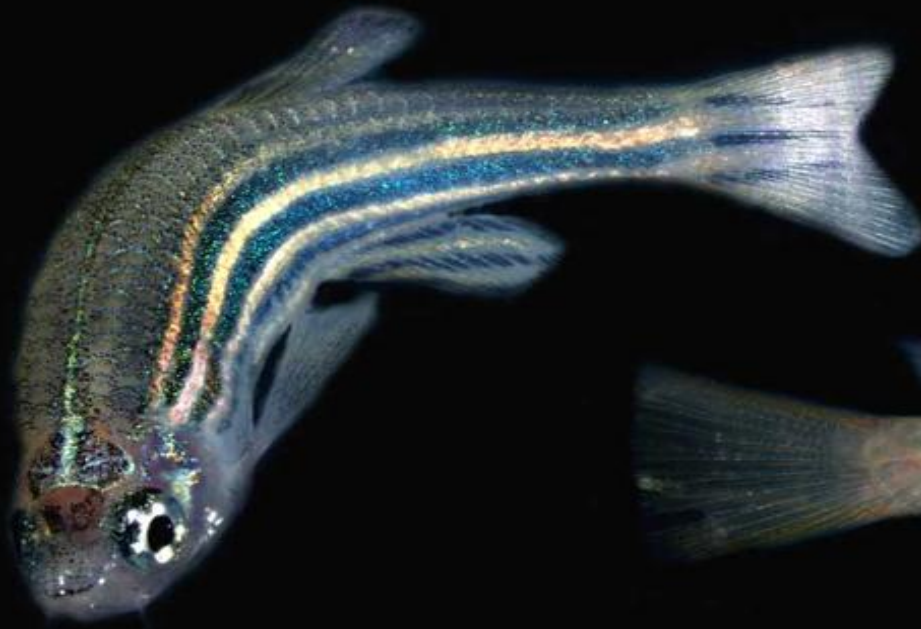
MSz által javasolt fajok

Halfaj	A tesztelési hőmérsékleti tartomány, °C	A halak javasolt testhossza, cm
Szivárványos pisztráng (<i>Salmo gairdneri</i> Richardson), apróállatevő, ragadozó	13-17	5,0±1,0
Fogassülő (<i>Stizostedion lucioperca</i> L.), ragadozó	18-20	5,0±1,0
Szivárványos ökle (<i>Rhodeus sericeus amarus</i> Bloch), apróállatevő	18-23	3,0±1,0
Ezüstkárász (<i>Carassius auratus</i> L.), vegyes táplálkozású	18-23	4,0±1,0
Ponty (<i>Cyprinus carpio</i> L.), vegyes táplálkozású	18-23	4,0±1,0
Harcsa (<i>Silurus glanis</i> L.), ragadozó	20-24	5,0±1,0
Amúr (<i>Ctenopharyngodon idella</i> Cuv. et Val.), növényevő	20-24	5,0±1,0
Fehér busa (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> Cuv. et Val.), planktonevő	20-24	5,0±1,0
Szivárványos guppi (<i>Poecilia reticulata</i> Peters), apróállatevő	23-25	2,0±1,0

+ Zebradánió

OECD által javasolt fajok

Recommended species	Recommended test temperature range (°C)	Recommended total length of test fish (cm) ¹
<u>Brachydanio rerio</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebra-fish	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Pimephales promelas</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead Minnow	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Cyprinus carpio</u> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Common carp	20 - 24	3.0 ± 1.0
<u>Oryzias latipes</u> (Teleostei, Cyprinodontidae) (Temminck and Schlegel) Ricefish	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Poecilia reticulata</u> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Lepomis macrochirus</u> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	21 - 25	2.0 ± 1.0
<u>Oncorhynchus mykiss</u> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Rainbow trout	13 - 17	5.0 ± 1.0



Oryzias latipes
(Beloniformes)

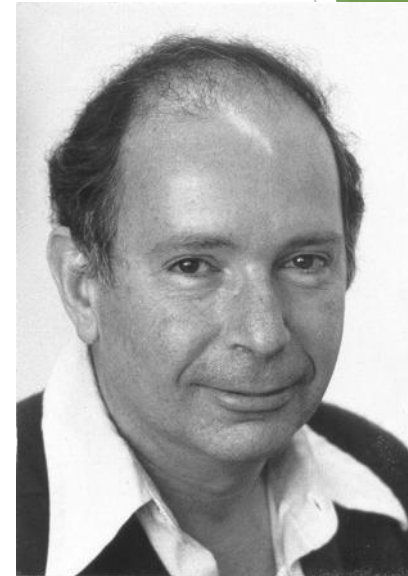


Tetraodon nigroviridis
Takifugu rubripes
(Tetraodontiformes)

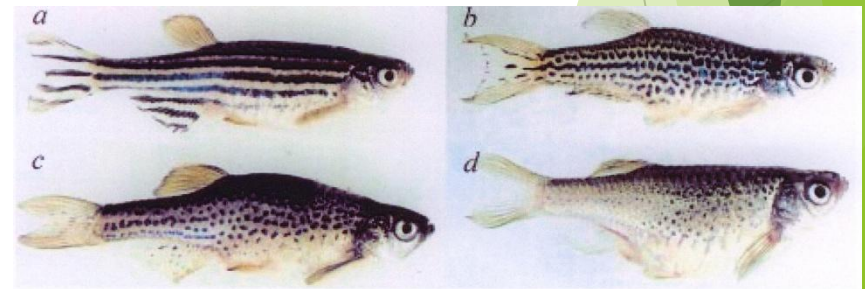
Zebradánió (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822) I.

- India, Burma, Maláj-félsziget, Szumátra
- 22-24 °C (27 °C)
- Nem igényesek a víz kémiai összetételére
- Falánk mindenevők
- Csapathal
- 100-150 ikraszem/ hét (200-400)
- Az ikrahéj nem ragadós, átlátszó
- 48-72 órával a termékenyülés után kikelnek a lárvák
- 3 hónap alatt ivaréretté válnak

- Intenzív rendszerekben, komplett protokollok szerint nevelik

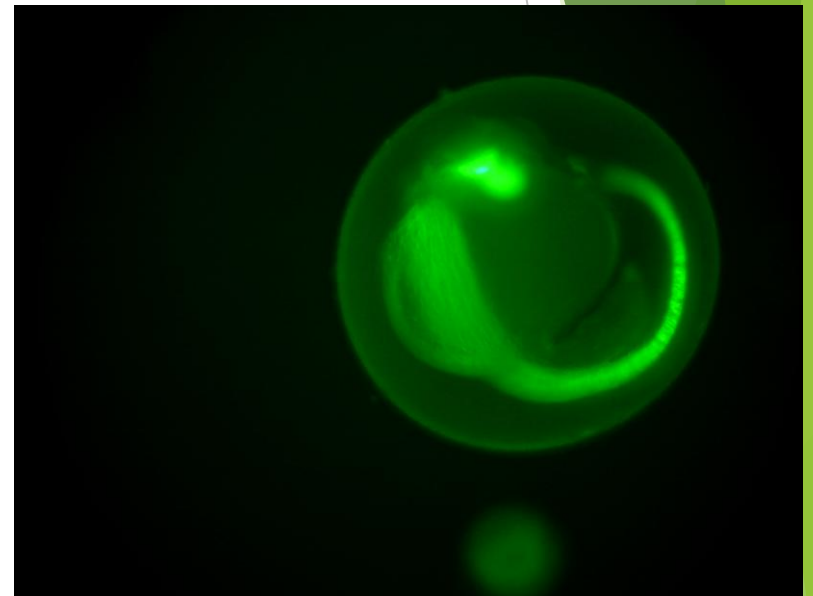


Streisinger György

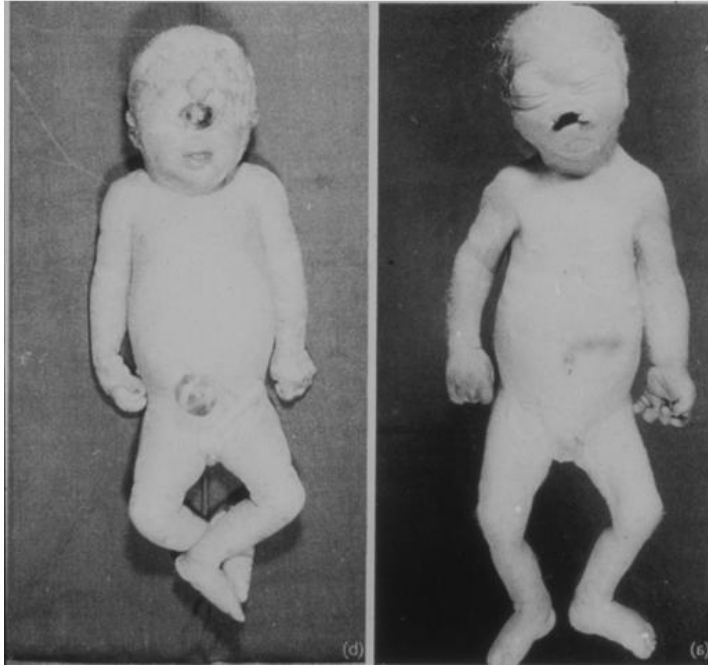


Zebradánió (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822) II.

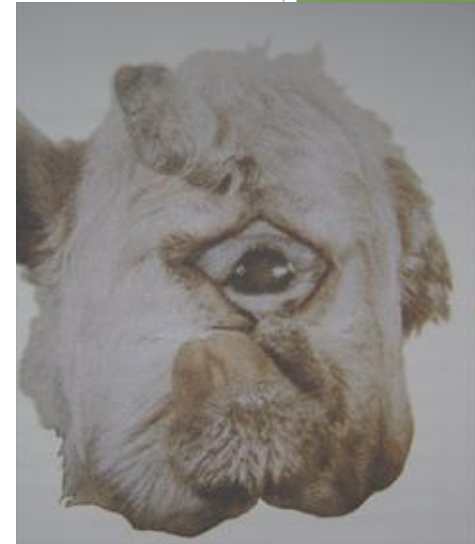
- ▶ Genomméret: 1 700 000 000 bp
- ▶ Kromoszómaszám: 50
- ▶ >4500 mutáns vonal
- ▶ Majdnem teljes génkönyvtár
- ▶ Kezdetben csak fejlődésbiológiai kutatások
- ▶ Kimérakészítés, immunogenetikai vizsgálatok
- ▶ Andro- és ginogenezis
- ▶ Transzgenikus hal előállítás



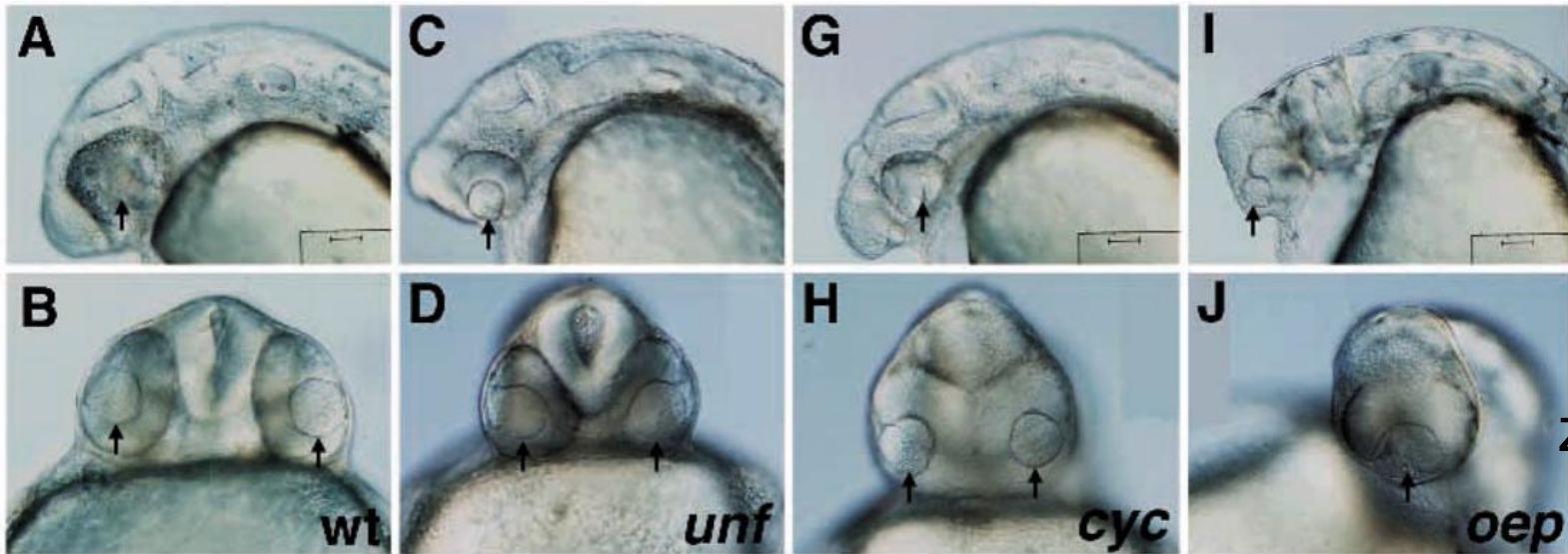
„Általános” embriókori defektusok vizsgálata



ember



juh



zebradánió

Szivárványos guppi (Poecilia reticulata)



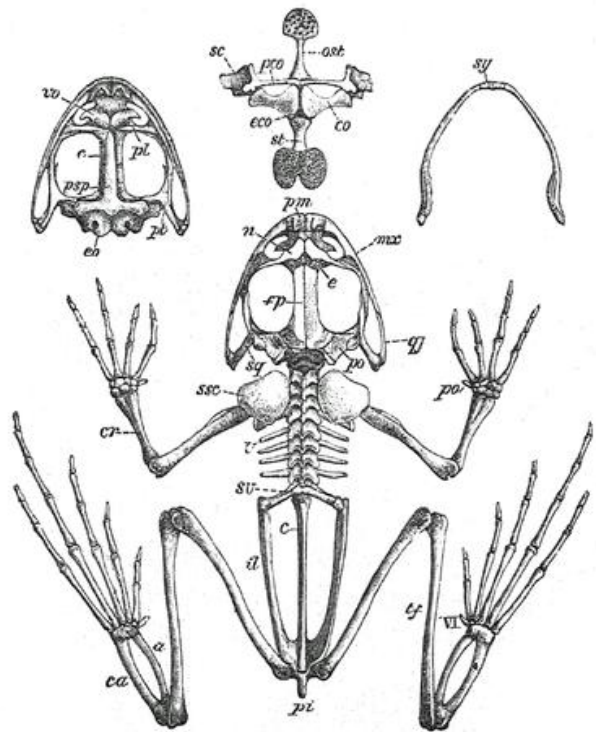
Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*)



Ponty (*Cyprinus carpio*)



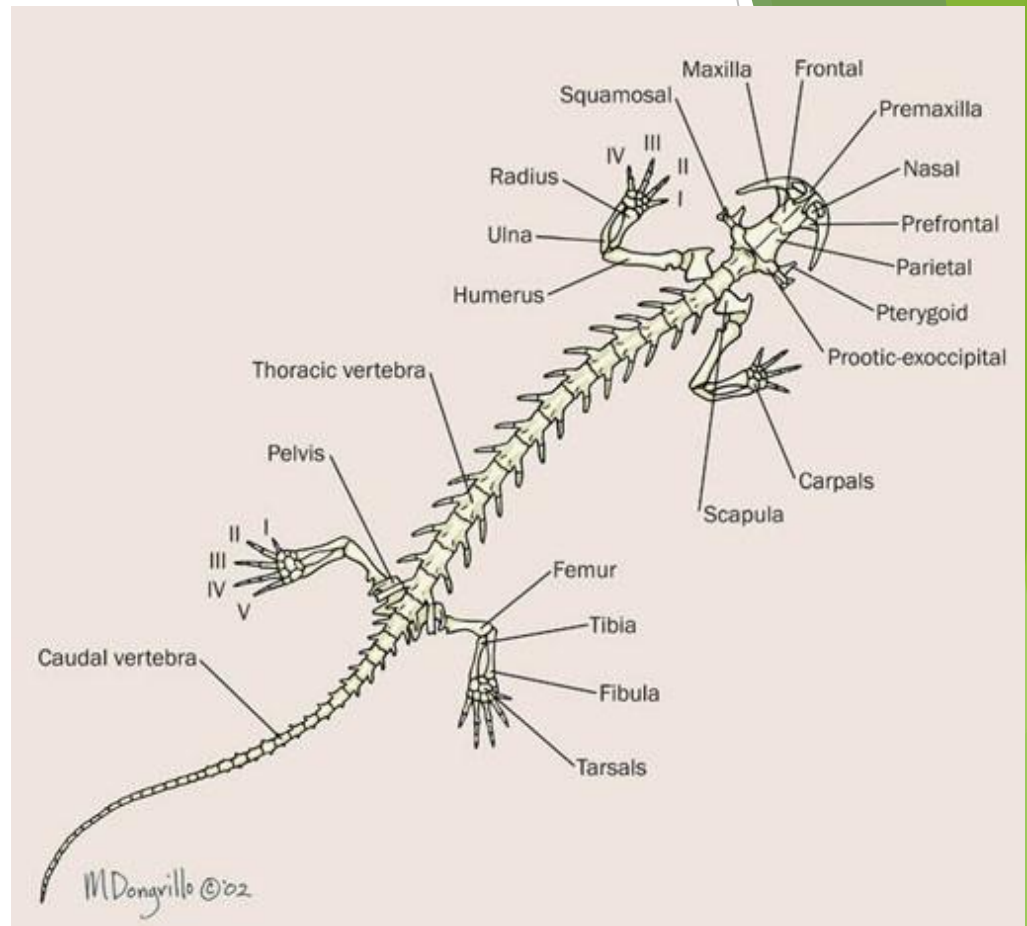
Kételtűek



Skeleton of *Rana esculenta*. (Guide to Reptile Gallery B.M.)

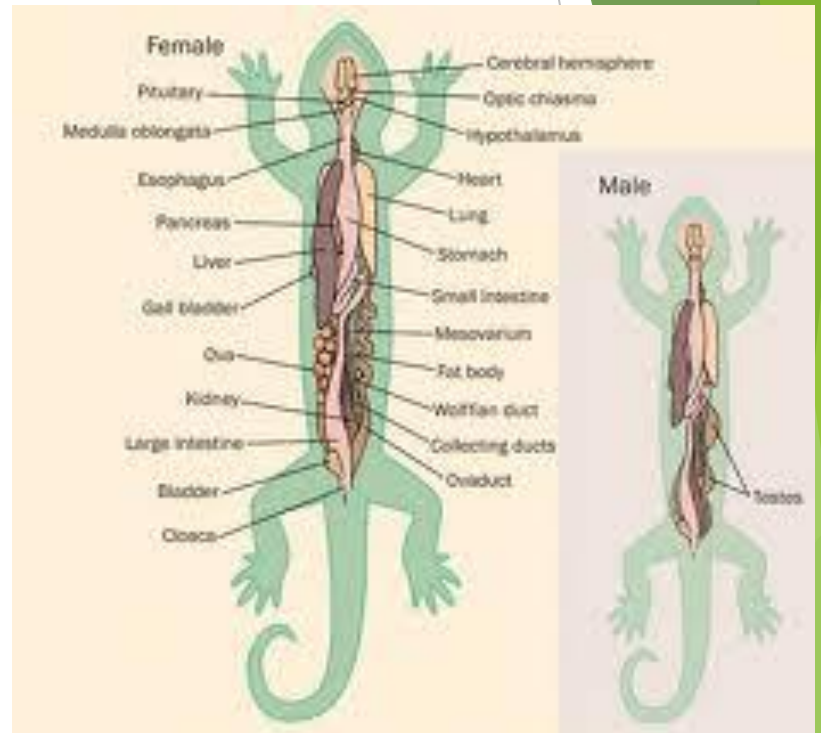
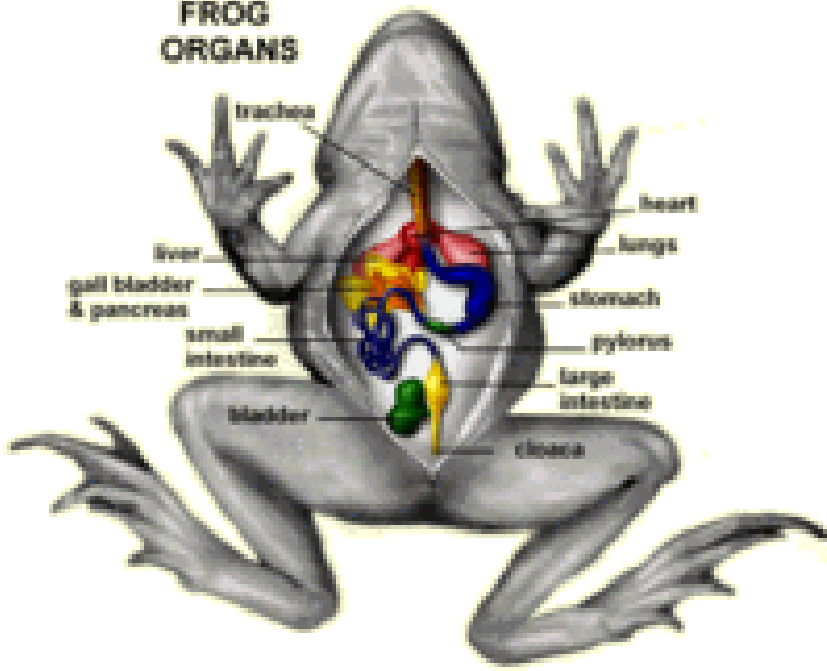
- | | | |
|---------------------|--------------------|----------------------------|
| a. Astragalus. | n. Nasal. | sc. Scapula. |
| c. Coccyx. | ost. Omosternum. | sg. Squamosal. |
| ca. Calcaneum. | pcr. Precoracoid. | ssc. Suprascapula. |
| co. Cornicoid. | pl. Palatine. | st. Sternum. |
| cr. Radius-ulna. | pi. Pubis-ischium. | sv. Sacral vertebra. |
| e. Ethmoid. | pm. Premaxillary. | sy. Symphysial. |
| eco. Epicoracoid. | po. Prootic. | tf. Tibia-fibula. |
| eo. Exoccipital. | po'. Pollux. | v. Dorsal vertebrae. |
| fp. Frontoparietal. | psp. Parasphenoid. | vo. Vomer. |
| il. Ilium. | pt. Pterygoid. | VI. Rudiment of sixth toe. |
| mz. Maxillary. | qj. Quadratojugal. | |

Farkatlan kételtűek



Farkos kételtűek

FROG ORGANS



Karmosbékák (*Xenopus laevis*, *X. tropicalis*)

- Elnevezés: a hátsó lábakon a belső 3 lábujj belső oldalán visszahajló fekete karmok
- Könnyen tartható
- Hosszú élettartam (fogságban 3-20 év)
- nőstény: 9-14 cm, hím: 7-9 cm
- Szexálás: a nőstényeknél kissé kitüremkedő kloáka, a hímeknél a mellső lábak belső oldalán nászpárna



- Ragadozó (férgek, rovarok, kannibalizmus)
- Nyelv és farok nélküli
- teljes mértékben vízi életmódot folytat
- Mindkettőt használják modellállatként, de a *tropicalis* kedveltebb, mert diploid és korábban válik ivaréretté, utóbbi sötétebb
- Klórra rendkívül érzékeny, klórmentes vízben kell tartani!
- Ektoterm
- Főként fejlődéstudományi vizsgálatok



Mexikói axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

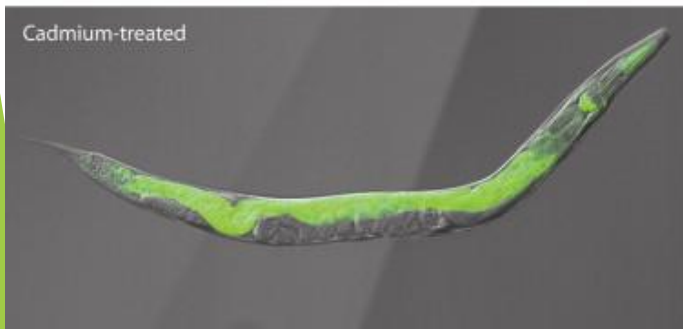
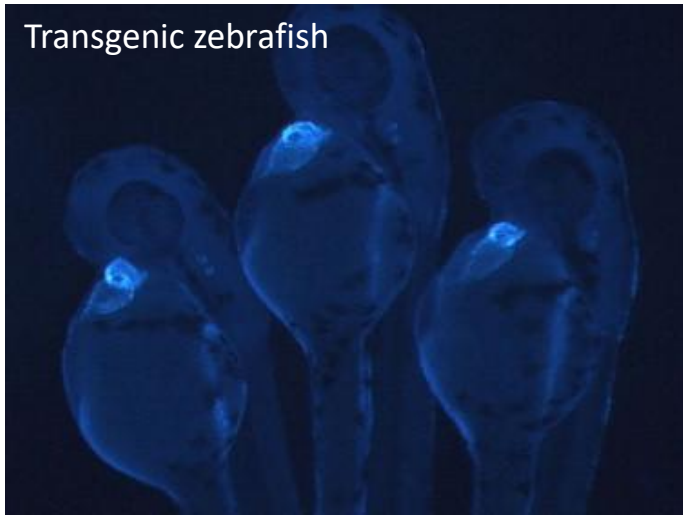


- ▶ Eredeti vadszínű és az albínó változat
- ▶ Az állatok hossza elérheti a 28-30 cm-t.
- ▶ 25 évig is élhetnek.

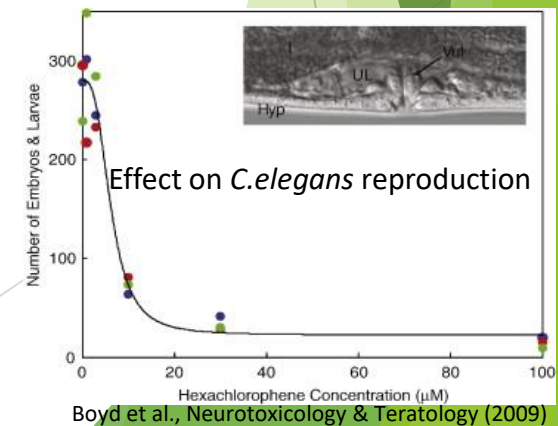
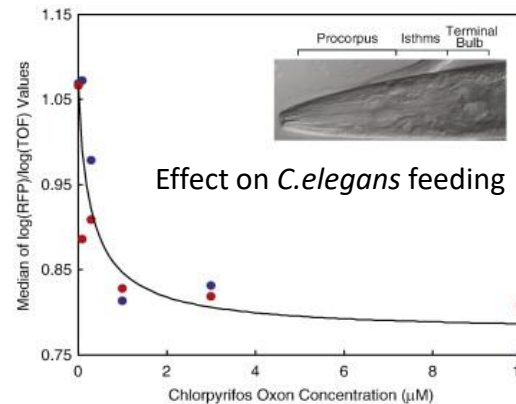
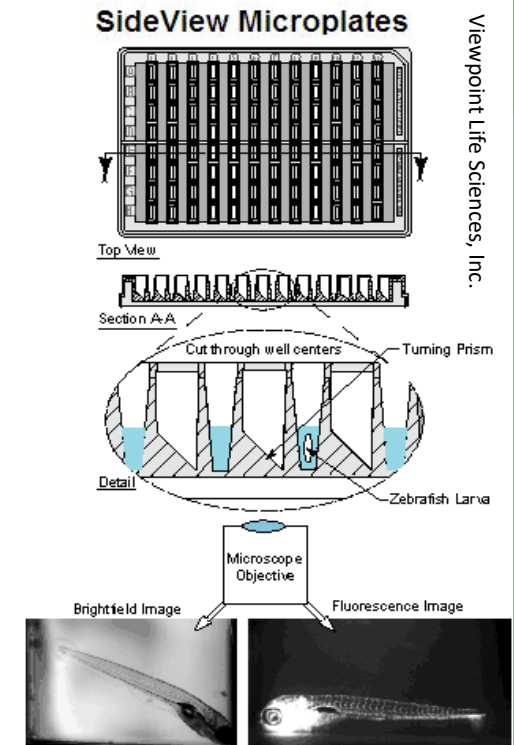
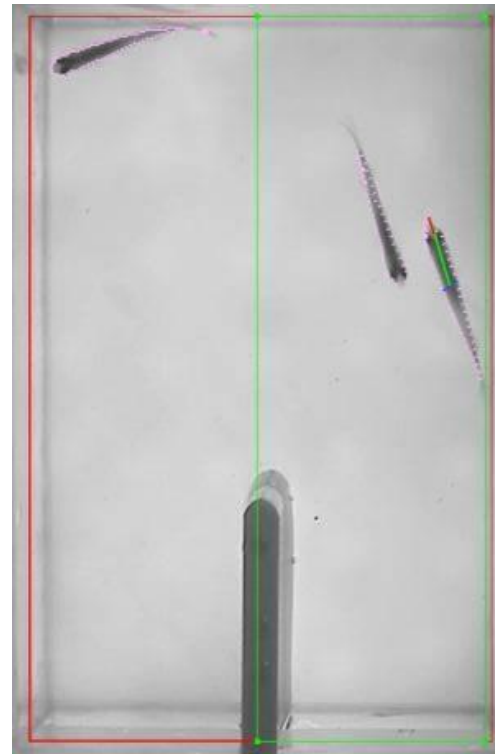
- ▶ Az axolotl lárva állapotban képes a szaporodni.
- ▶
- ▶ Nem elég a nőtényt és a hímét összeengedni. Elengedhetetlen azokat a körülményeket biztosítani, amik az íváshoz szükségesek. Ez általában a hőmérséklet változtatása.
- ▶ A peték száma 300-600 között van

- ▶ Főként fejlődésbiológiai vizsgálatok, endokrin rendszert megzavaró anyagok vizsgálata
- ▶ Nagy regenerációs képesség

Gerincteleneken és alacsonyabb rendű gerinceseken végzett tesztelés

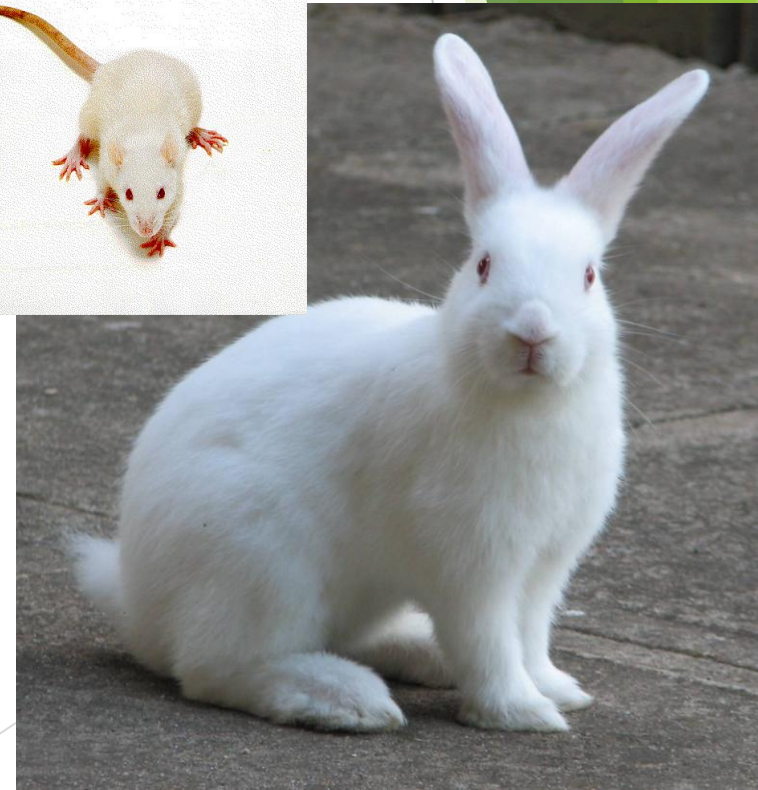


Peterson et al., NeuroToxicology (2008)

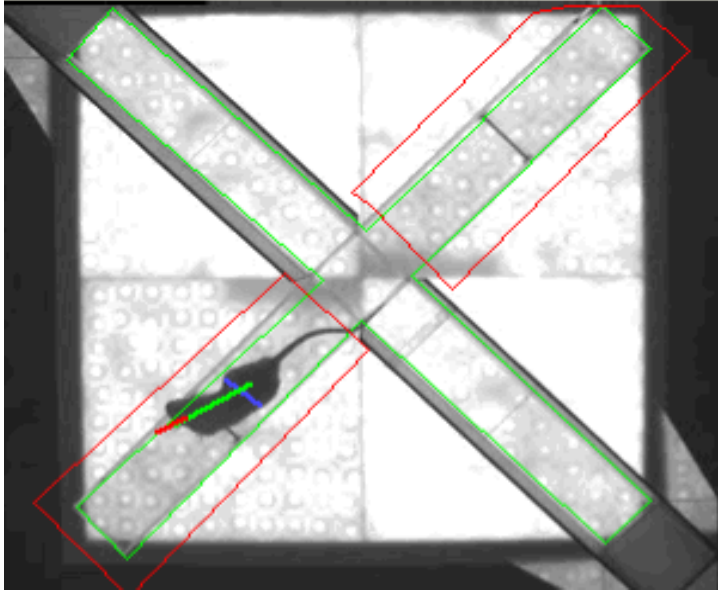


Rágcsálók

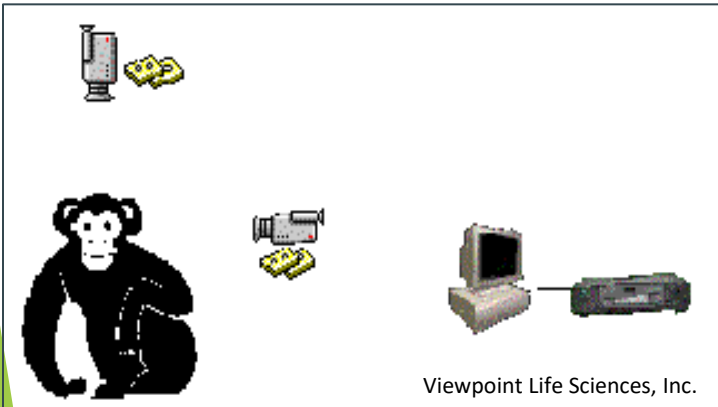
- ▶ Számos teszt
- ▶ Számos beviteli módszer
- ▶ Rengeteg teszt végpont
- ▶ De: szigorú szabályozás!!!
- ▶ Emberi extrapoláció itt a legkönnyebb



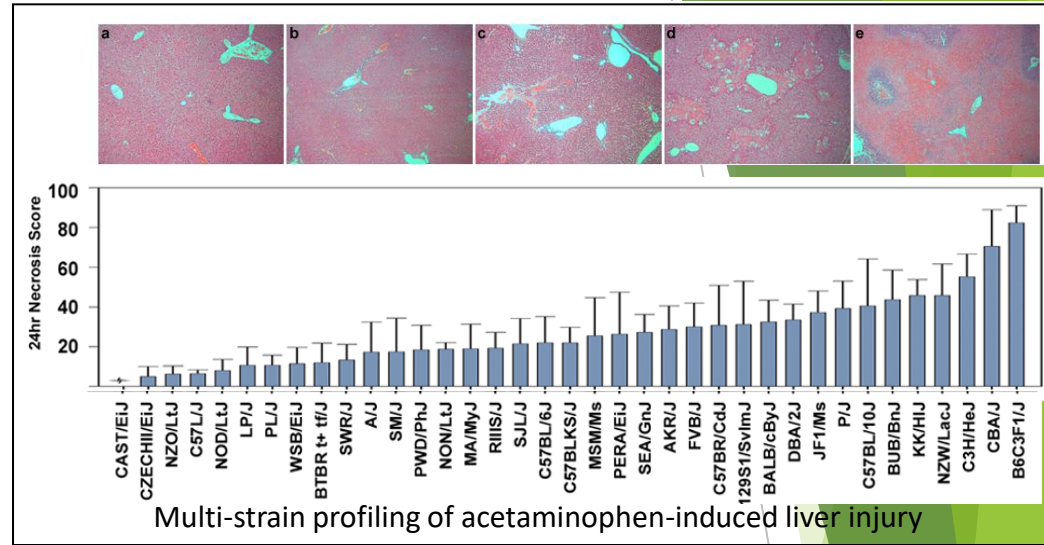
Emlős modelleken végzett tesztelés



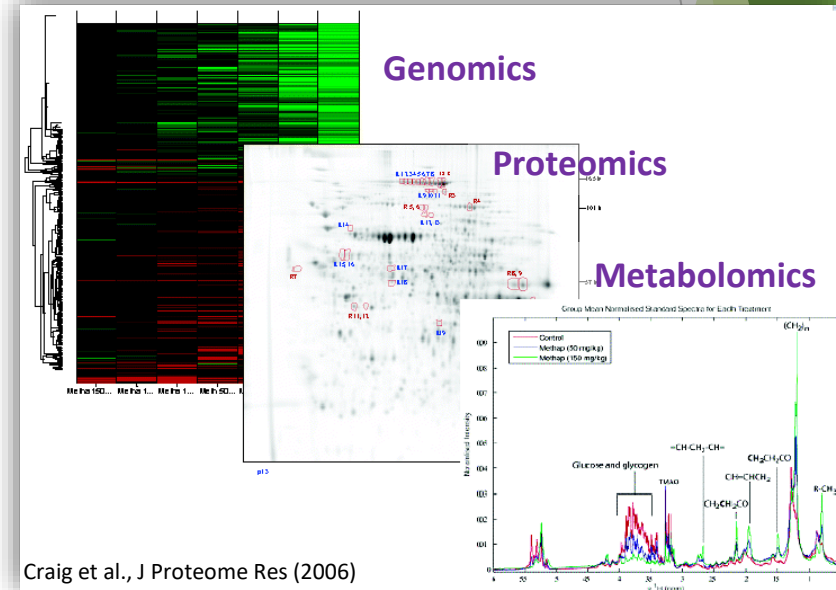
Viewpoint Life Sciences, Inc.



Viewpoint Life Sciences, Inc.



Harrill et al., Genome Research (2009)



Craig et al., J Proteome Res (2006)

Modellállatok és szabályok

- Minden modellállatot felhasználó kutatás szigorú intézményi, tudományos, kormányzati szabályozás alá esik
- **3R stratégia**

Replacement: állatmodellek helyettesítése alternatív modellekkel

Refinement: a kísérleti körülmények „finomítása”, állati szenvedés minimálisra csökkentése

Reduction: minimális számú egyed felhasználása

Transzgenikus állatok

- ▶ Transzgenikusnak nevezzük tágabb értelemben azokat az élőlényeket, melyekbe valamilyen idegen eredetű gént bejuttattak, és szűkebb értelemben a transzgént a **kromoszómáikba stabilan integrálódott** formában hordozó és azt **átörökítő** egyedeket.
- ▶ Ma már több ezres nagyságrendű azon állatoknak a száma, melyekbe valamilyen gént bejuttattak, és annak a kromoszómákba való beépülését és megnyilvánulását (expresszióját) az illető szervezetekben nyomon követték

Típusok

- ▶ Gain-of-function (funkciónyerés) (pl. növekedési hormon gének, stb.)
- ▶ Loss-of-function (funkcióvesztés) (pl. antiszensz RNS, ribozim, stb.) (betegség rezisztens fajták, génműködésben sérült modellszervezetek)
- ▶ Riporter (transzgenezis sikerességének ell., génszabályozás vizsg. /promóter, enhanszer erősség, funkció/)

Felhasználás (kutatásban): Fejlődésbiológia, génszabályozás tanulmányozása, promóter aktivitás vizsg., toxikológia, endokrinológia, szaporodásbiológia, stb.)

ELŐNY: In vivo láthatóvá válnak „molekuláris folyamatok”, elváltozások (pl. fejlődési rendellenességek, vérsejtek, stb.)

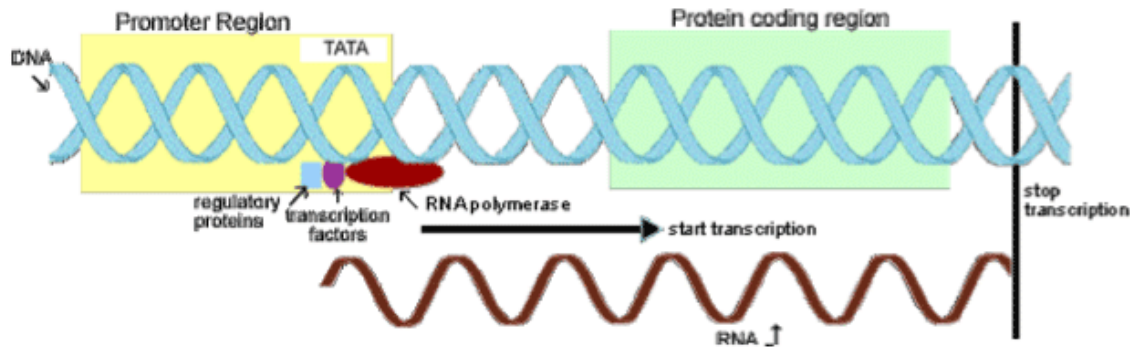
A transzgén konstrukció felépítése



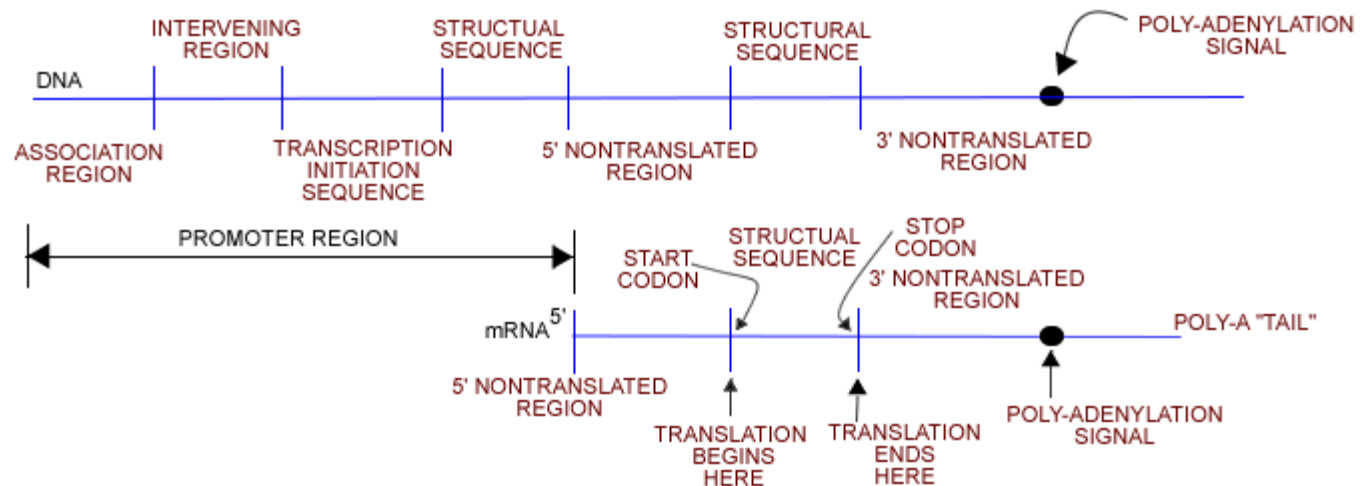
1. A kiválasztott gén fehérjekódoló része és az expressziót meghatározó szekvenciák (promóter, 5' és 3' NTR, poliA...)
2. Szelektálható marker, hogy a transzformált élőlényeket felismerjük
3. Inszerciós szekvenciák, amik a transzgén gazda DNS-be integrálódásához szükségesek

Promóterek

Typical gene organization



Structure of a typical eukaryotic gene



Promóterek

- ▶ **Constitutive promoters**, which induce the expression of the downstream-located coding region in all tissues irrespective of environmental or developmental factors.
- ▶ **Synthetic promoters**, which comprise consensus DNA sequences of common elements of natural promoter regions.
- ▶ **Inducible promoters**, which are only expressed under the presence of factors/compounds. Because their expression is normally restricted to certain plant tissues, they can also be considered as tissue-specific. Based on the nature of the factors that trigger their expression, they are divided into two groups:
 - ▶ **Chemically-regulated**, where chemical compounds, usually not naturally found within plants, switch on promoter activity. Several of the types of promoters discussed in this paper involve chimeric components gathered from human, animal, fungal and bacterial sources.
 - ▶ **Physically-regulated**, where abiotic and external factors such as light, heat, mechanical injury induce promoter activity.
- ▶ **Tissue-specific promoters**, which operate in particular tissues and at certain developmental stages of a plant. They may be induced by endogenous and exogenous factors, so they may be also classified as inducible.

Látható marker gének = Riporter gének

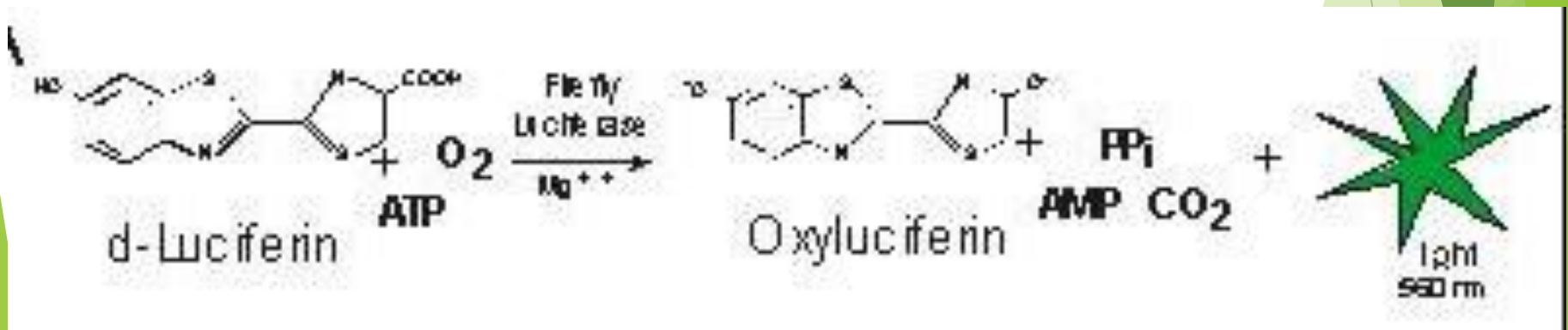
- luciferáz
(szentjánosbogár)
- lacZ

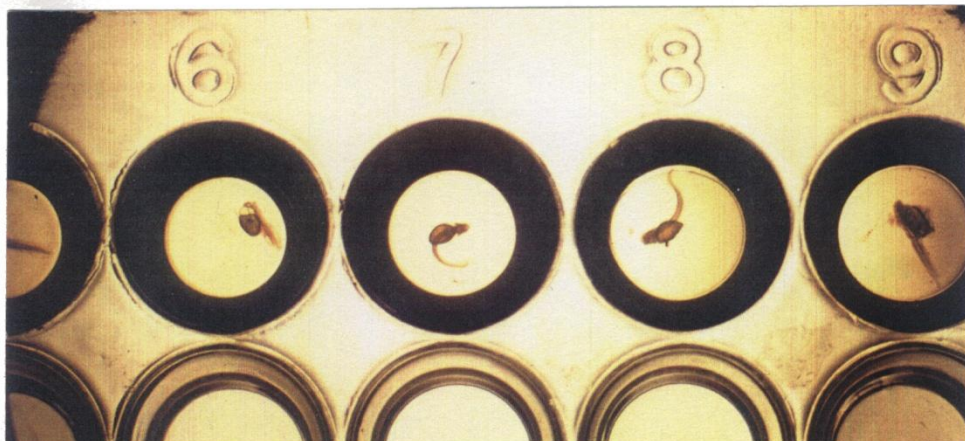
- Fluoreszcens fehérjék:
- GFP (Green Fluorescent Protein=Zöld Fluoreszcens Fehérje) és változatai
(*Aequorea victoria*)
 - dsRed (discosoma red, vörös fluoreszcens fehérje)
(*Discosoma* sp.)



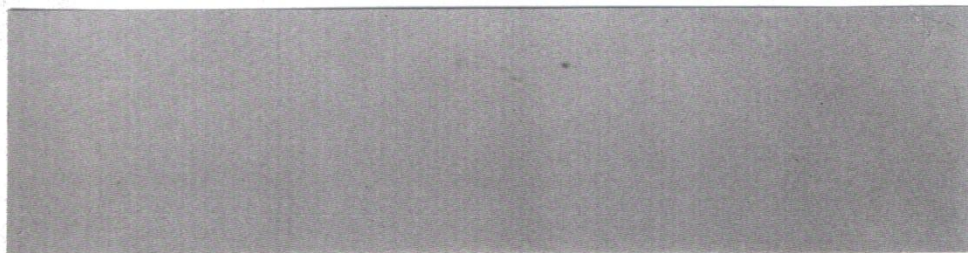
Luciferáz (luc)

- ▶ A szentjánosbogárral rokon bogárfaj (*Photinus pyralis*) luciferáz enzim génje az első általánosan használt riporter
- ▶ A **luciferáz** gén egy biolumineszcens fehérjét kódol, melynek egyszerű szerkezete lehetővé teszi, hogy a legkülönbözőbb szervezetekben használható fel riporterként, így például baktériumokban, emlős szövettenyésztésben, illetve növényi sejtekben.
- ▶ Az enzim **szubsztrátja** egy heterociklusos karboxilsav, a **luciferin**. A luciferáz oxidálja a luciferint, aminek hatására fény (562 nm) szabadul fel.





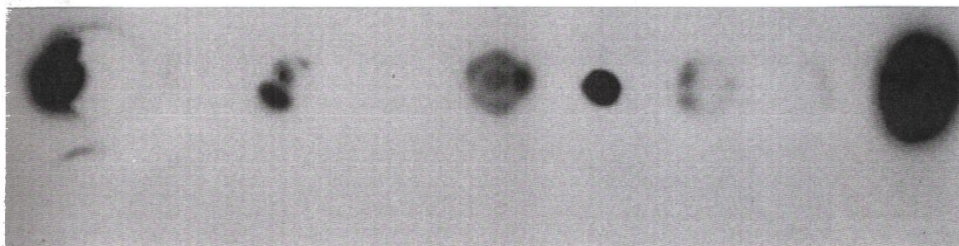
1 2 3 4 5 6 7 8 9



A

K1 K2 K3 K4

1 2 3 4 5 6 7 8 9



B

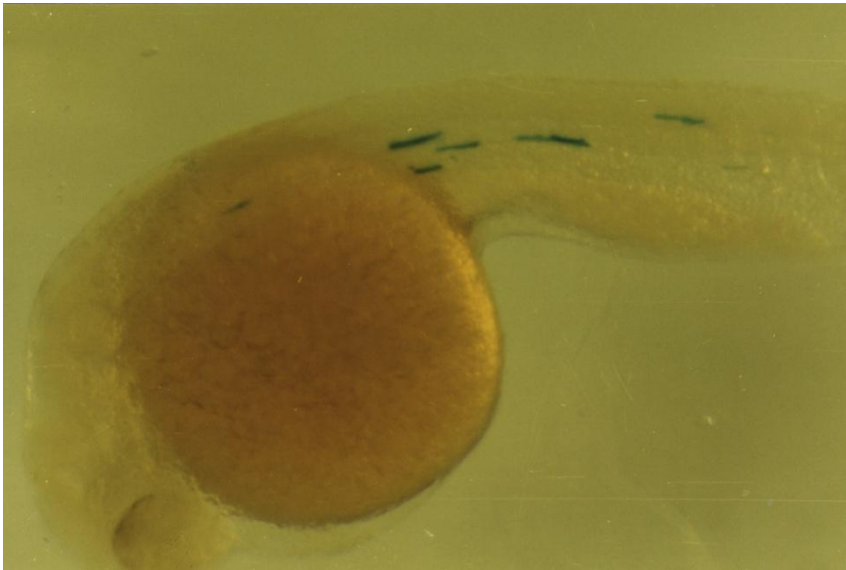
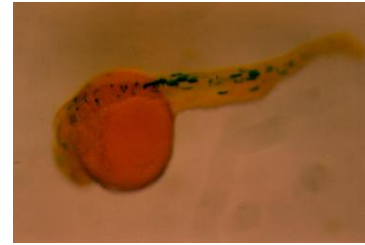
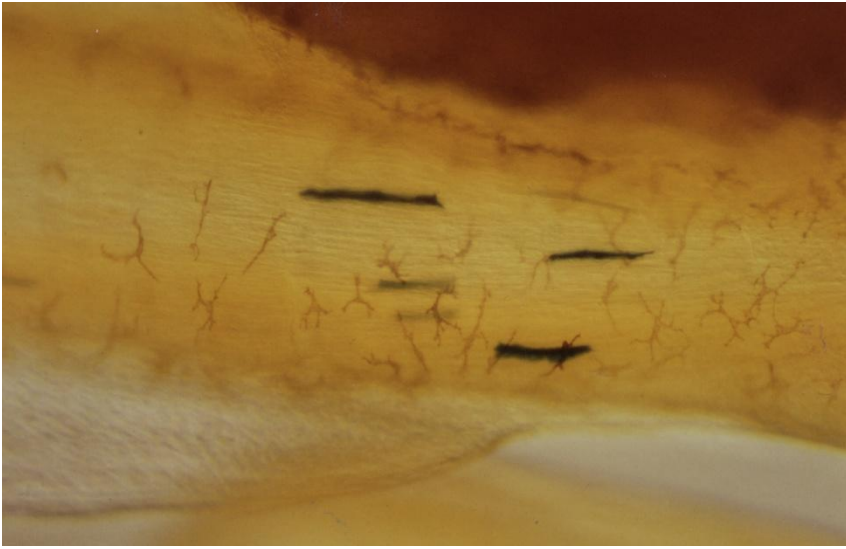
Luciferáz expresszió detektálása
filmen

K1 K2 K3 K4

Müller

B-galaktozidáz (lacZ)

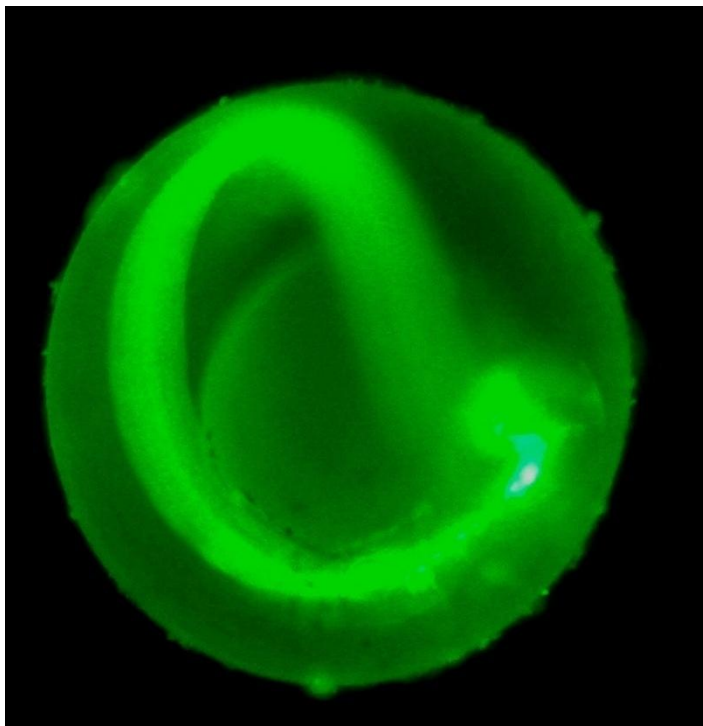
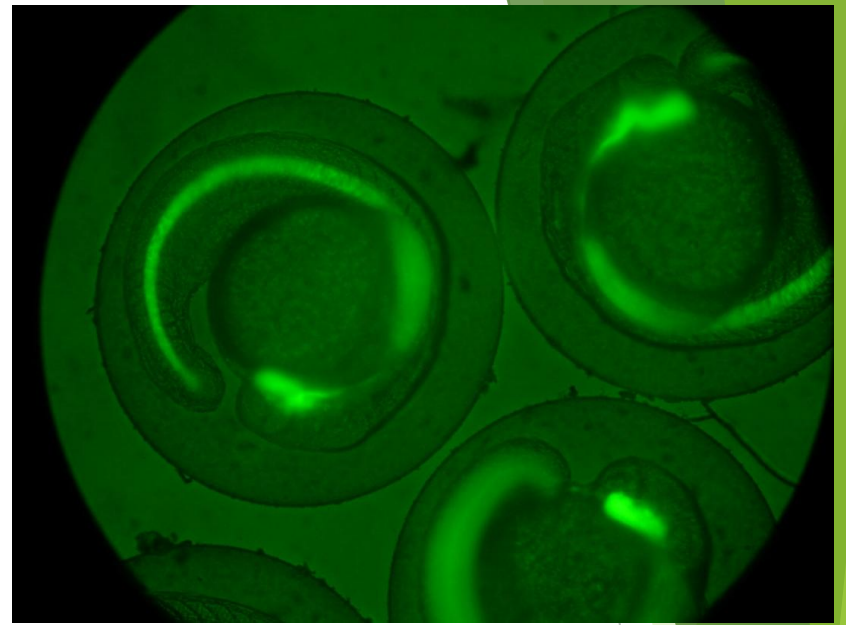
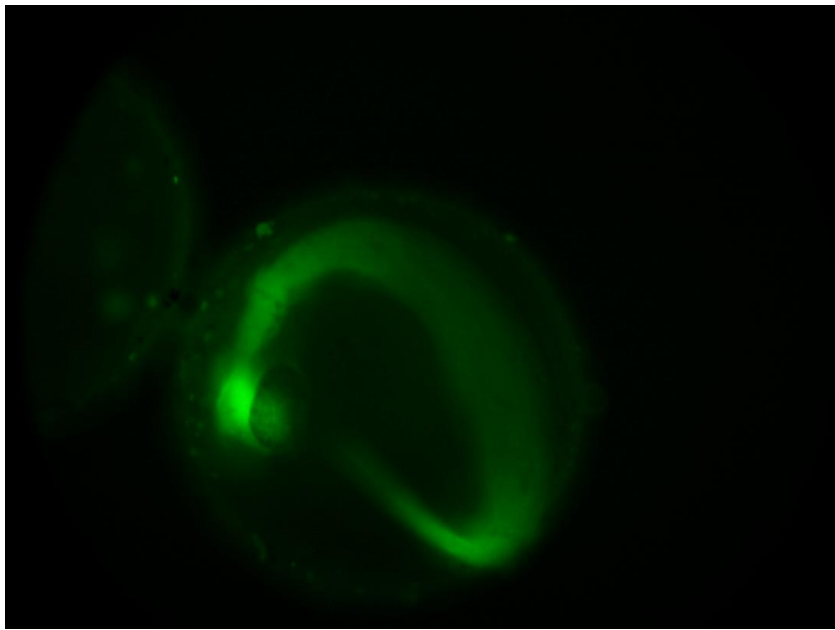
- ▶ A sejtekbe történő transzformációnál gyakorta használatos lacZ gén a B-galaktozidáz enzimet kódolja.
- ▶ Az enzim aktivitása egy hisztokémiai festési eljárással egyszerűen kimutatható in situ.
- ▶ A transzformált sejtekhez, szervezetekhez X-galt (5-bromo-4-kloro-3-indolyl-13-D-galaktozid) adnak, melyről a B-galaktozidáz a galaktozid csoportot lehasítja, s a keletkező molekula az embrió szöveteit intenzív kékre festi, mely vizuálisan jól nyomon követhető.
- ▶ A módszer hátránya az, hogy többnyire csak fixált szövetekben in vitro kimutatásra alkalmas. Ismeretes in vivo detektálás is lipofil fluoreszcens szubsztráttal (fluoreszcein-di-B-D-galaktozid, MG). Az FDG-t a halembriók képesek felvenni, és UV fényvel megvilágítva az enzimreakcióban keletkező fluoreszcens termék nyomonkövethető az embriók sejtjeiben.
- ▶ A lacZ gén egyetlen hátránya, hogy endogén aktivitás zavarja kimutatását, amely a pH-nak 8-ra emelésével csökkenthető, de ez a bélcsatornában élő baktériumok B-galaktozidáz aktivitását nem csökkenti, így ott továbbra is fennmarad a zavaró háttéraktivitás.



B-galaktozidáz expresszió halembrióban

Zöld fluoreszcens fehérje (GFP)

- ▶ Az *Aequorea* medúzából izolálták a zölde biolumineszcenciáját okozó GFP fehérjét.
- ▶ A GFP **nem igényel** sem **szubsztrát** molekulát, sem **kofaktort**, mindössze a megfelelő energiájú fotonokat kell biztosítani a működéséhez.
- ▶ A GFP gén ideális riportergén, amely alkalmas a génexpresszió vizsgálatára mind pro-, mind eukarióta rendszerekben.
- ▶ A GFP abszorpciós maximuma 395 nm-nél van, ami lehetővé teszi, hogy az élő szervezetben megtermeltetett fehérjét a szervezet károsítása nélkül kék fényel megvilágítva *in vivo* teszteljék. Az emittált zöld fény spektrális maximuma 509 nm-nél van.
- ▶ YFP, RFP



GFP+ zd. embriók

A transzgen rendszer típusai

- **Extrakromoszómális** elemek (pl. bakteriális és emlős szövettenyésztésben használt plazmidok)
- **Random módon a genomba integrálódó elemek** (pl. módosított transzpozonok, overexpressziók, vírus-mediált génterápia).

Hátrányok:

inszerciós hely szerint változó expressziós szint

elronthat géneket (ez lehet előny is! pl. mutagenézis transzpozonokkal)

A transzgén rendszerek típusai

Homológ rekombináción alapuló módszerek:

- ▶ célzott génbevitel (pl. eukromatin régióba)
- ▶ génkiütés (knock-out)
- ▶ génkicserélés (knock-in)
- ▶ endogén gén expressziójának megváltoztatása

Hátrány:

- ▶ kicsi a célbatalálás valószínűsége, ezért csak szövettenyészetben érdemes csinálni

Options for Future Toxicity Testing Strategies

Option I In Vivo	Option II Tiered In Vivo	Option III In Vitro/In Vivo	Option IV In vitro
Animal biology	Animal biology	Primarily human biology	Primarily human biology
High doses	High doses	Broad range of doses	Broad range of doses
Low throughput	Improved throughput	High and medium throughput	High throughput
Expensive	Less expensive	Less expensive	Less expensive
Time consuming	Less time consuming	Less time consuming	Less time consuming
Relative large number of animals	Fewer animals	Substantially fewer animals	Virtually no animals
Apical endpoints	Apical endpoints	Perturbations of toxicity pathways	Perturbations of toxicity pathways
	Some <i>in silico</i> and <i>in vitro</i> screens	<i>In silico</i> screens possible	<i>In silico</i> screens