

A sejt molekuláris biológiája és genetikája II

2015/16 2. félév

Az első félév végső vizsgaeredménye:

Önkéntes zh-val szerzett
plusz pontok *nélkül*
(a 15 sikeres javítás után):

Plusz pontokkal (20 esetben
eggyel jobb jegy!):

Jeles:	14	25
Jó:	19	13
Közepes:	14	13
Elégséges:	17	13
Elégtelen:	5	5

Gratulálok az évfolyamnak!

A második félév teljesítésének feltételei

A szeminárium elfogadásának feltétele:

- az egész év során 1 db kiselőadás tartása,

Az előadás elfogadásának feltétele: a Dékán Úr által kért 80%-os részvétel

A tananyag elsajátításával megszerezhető jegy több komponensből áll össze.

1. A 2. félév közben szerzett bónuszpontok:

- félév közepén (előre láthatólag közvetlenül a tavaszi szünet előtt vagy után): 3-4, addig megbeszért feladatból kb félórás önkéntes feladatmegoldás, max. 5 pontért.
- félév végén (előre láthatólag az utolsó szemináriumon): további 3 feladatból, hasonló feltételekkel, max 5 pontért.

A két alkalommal megszerzett pontok átlaga plusz pontként számít be az év végi vizsgára kapott jegybe.

2. A vizsgaidőszakban szerzett pontok:

Vizsgadolgozat a vizsgaidőszakban, elméleti kérdések és rövid definíciók (max 25 pont) + feladatok (max 15 pont), összesen max 40 pont (A vizsgafeladatok nagyon hasonlóak lesznek a szemináriumok során megbeszéltekhez).

De figyelem! Érvényes jegyhez a vizsgadolgozattal legalább 20 pontot kell elérni, függetlenül a bónuszpontok számától!

A félév végi jegy kialakításakor az érvényes vizsgadolgozat pontszámához bónuszként hozzáadódik az önkéntes feladatmegoldás során szerzett pontszám, így maximálisan 45 pontot lehet elérni.

Az összpontszám a következő módon váltódik át: **0-20: elégtelen, 21-25 pont: elégséges, 26-30 pont: közepes, 31-35 pont: jó és 36-45 pont: jeles.**

MÁSODIK FÉLÉV

14. Génexpresszió prokariótákban.
15. Génexpresszió eukariótákban.
16. A sejtek kommunikációja: jelátviteli folyamatok.
17. Az idegsejtek molekuláris biológiája, érzékelés.
18. Sejtkapcsoló struktúrák
19. Transzportfolyamatok a sejtben I.
20. Transzportfolyamatok a sejtben II.
21. Sejtváz, sejtmozgások.
22. A sejtciklus és szabályozása.
23. A daganatképződés.
24. Össejtek, sejtpusztulás.
25. Az egyedfejlődés genetikai szabályozása.
- [26. Az élővilág evolúciója a molekuláris vizsgálatok tükrében.]

14. A génexpresszió szabályozása prokariótákban

2016. február 11.

Lippai Mónika

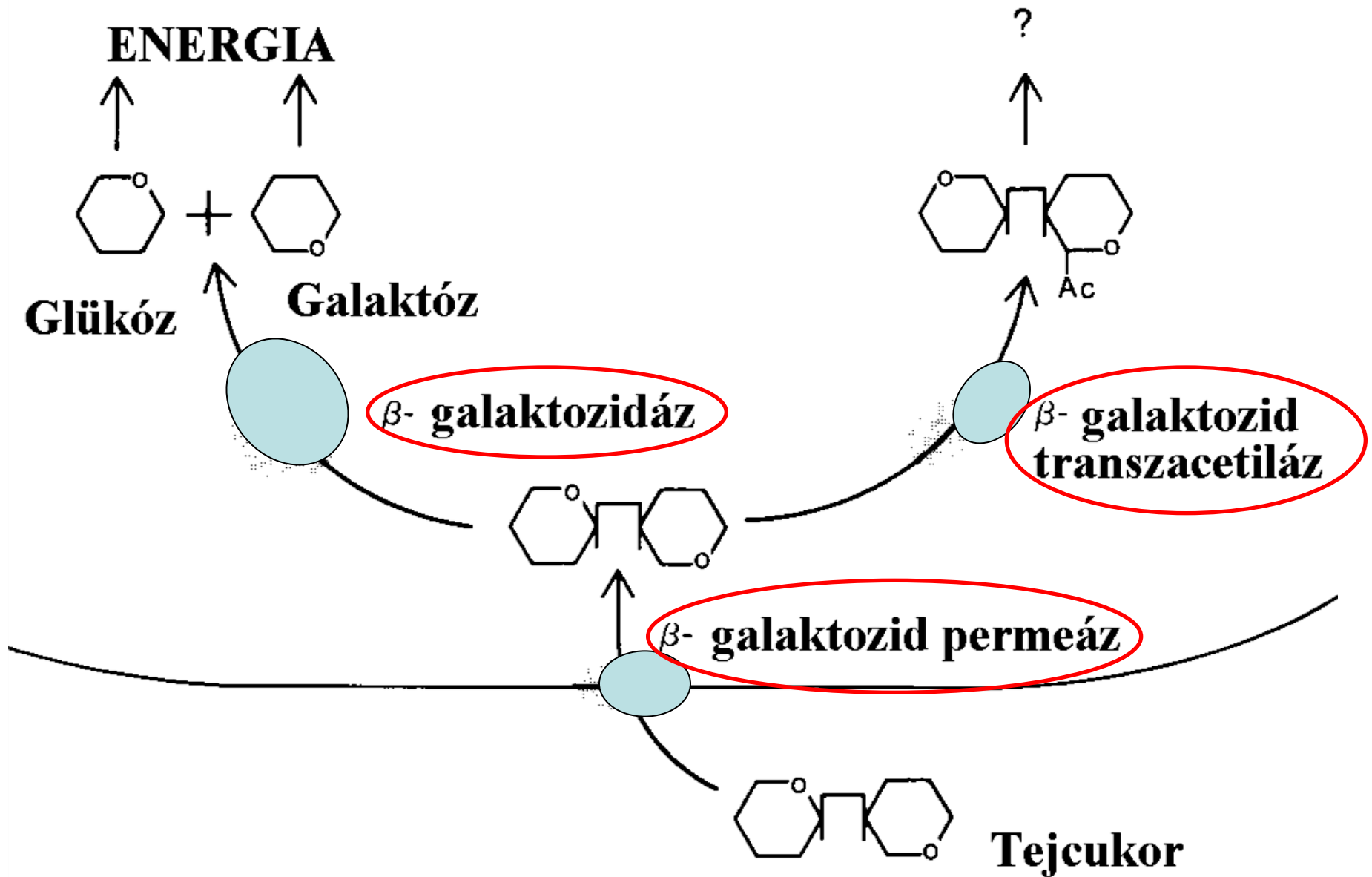
lippai@elte.hu

Az indukálható operon

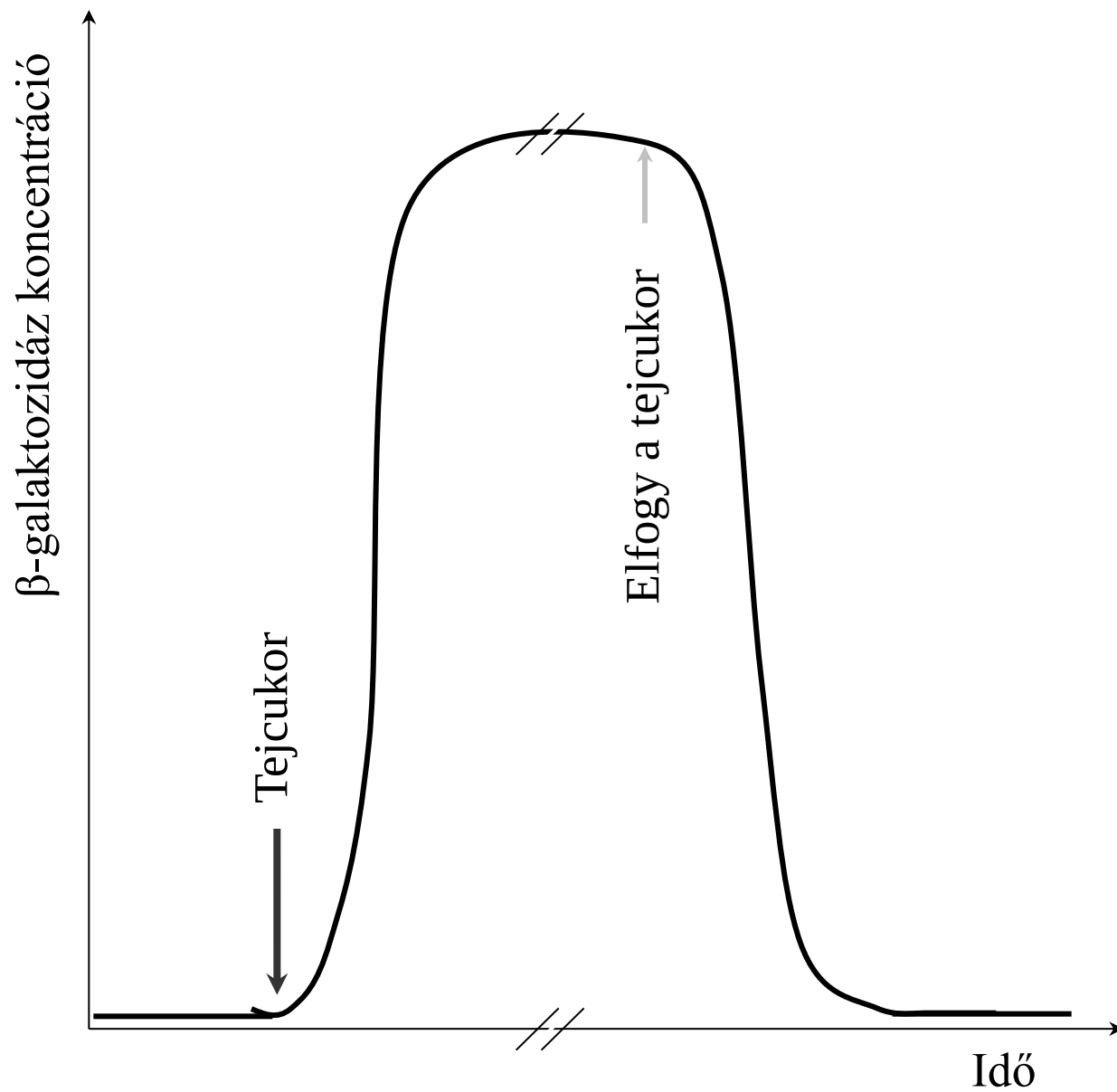


Jacques Monod, André Lwoff, François Jacob; Nobel-díj 1965

A laktóz hasznosításának enzimei : közös szabályozás alatt állnak (egy operon, egy policisztronos mRNS)



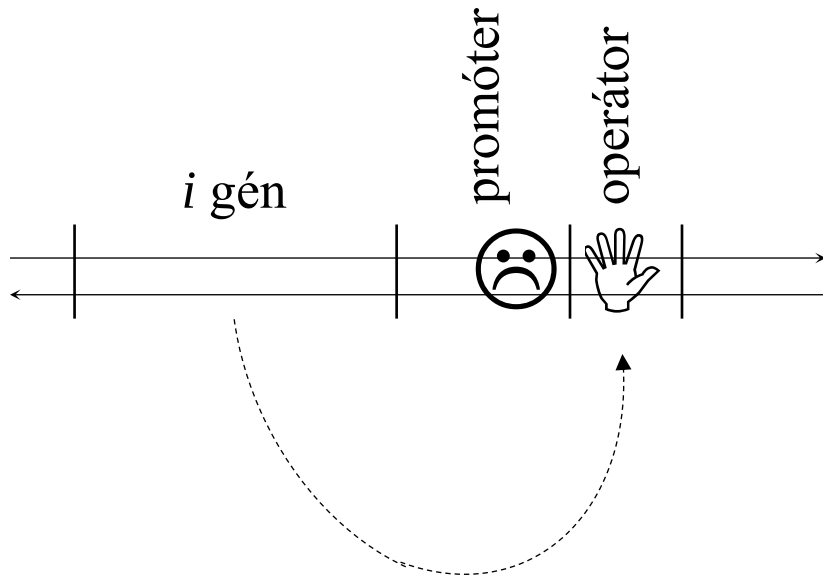
Az enzimindukció jelensége



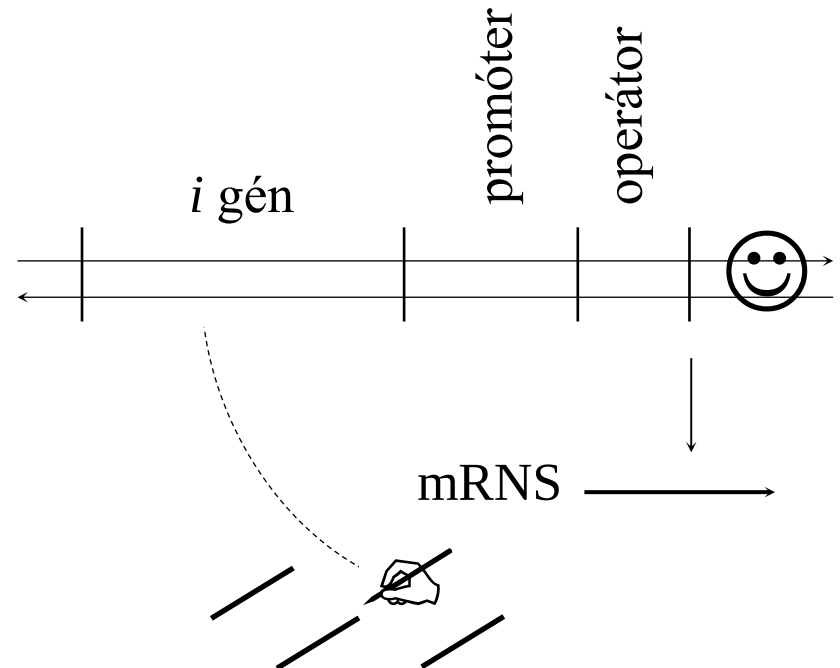
A *lac* operon ki-, illetve bekapcsolásának mechanizmusa

Feltevés: laktóz hiányában valami – egy *represszor* fehérje, az *i* gén terméke - gátolja az operon kifejeződését, amely a szabályozó régió egy specifikus helyéhez (*operátor*) köt.

Nincs tejcukor



Van tejcukor



Szimbólumok:

 a represszor fehérje szerkezete laktóz hiányában
 a represszor fehérje szerkezete laktózkötés után
laktóz

 kötődésben gátolt RNS-polimeráz
 Működő RNS-polimeráz

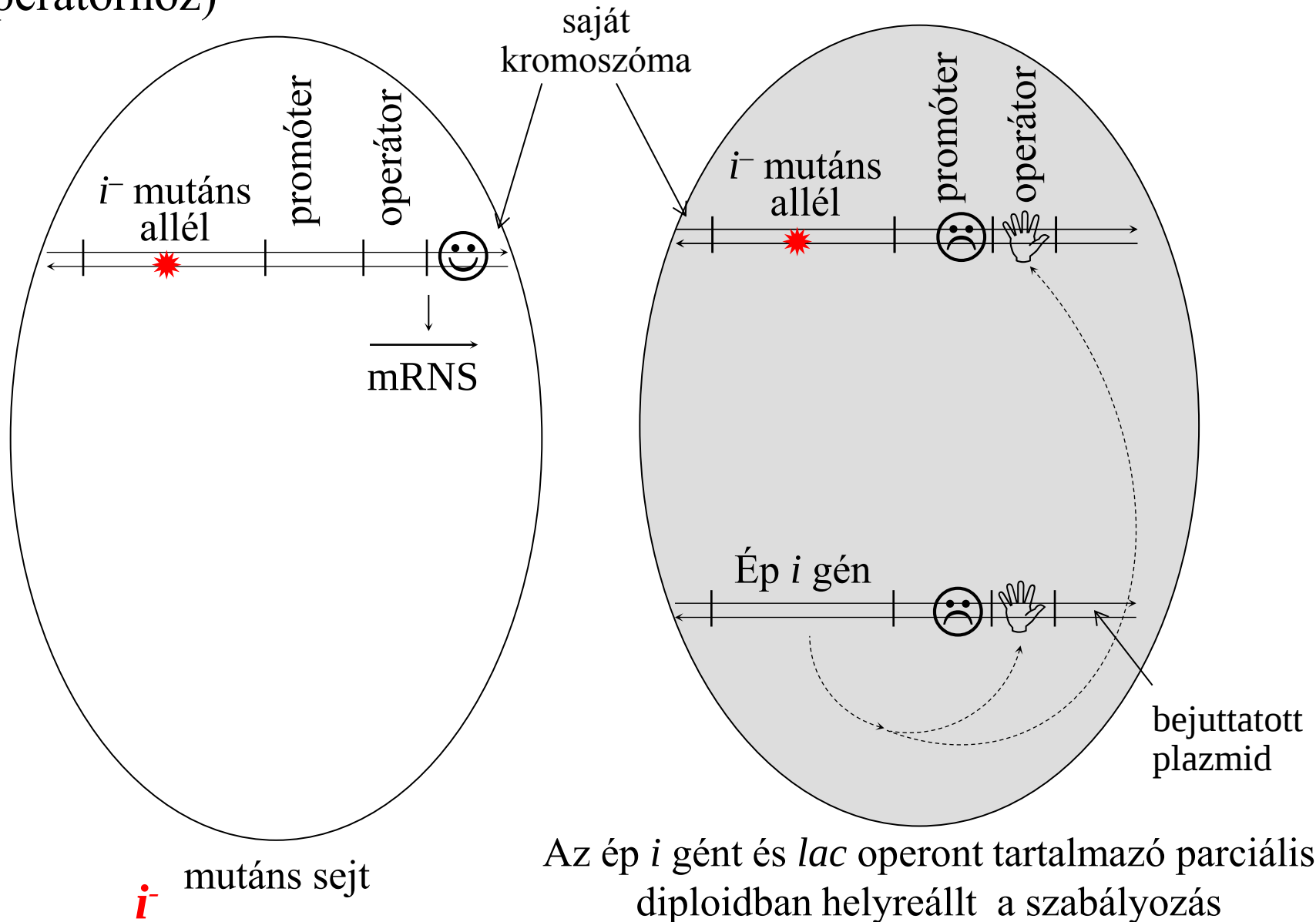
Hogyan jöttek rá a szabályozás pontos mechanizmusára?

Mutáns baktériumtörzseket izoláltak.

- Olyan mutánsokat, amelyekben **tejcukor hiányában is** folyamatos a β -galaktozidáz termelése (azaz a *lac* operon kifejeződése). Mi okozhatja ezt?
- Olyan mutánsokat, amelyekben **tejcukor jelenlétében sincs** β -galaktozidáz (**nem** aktív a *lac* operon). Mi okozhatja ezt?

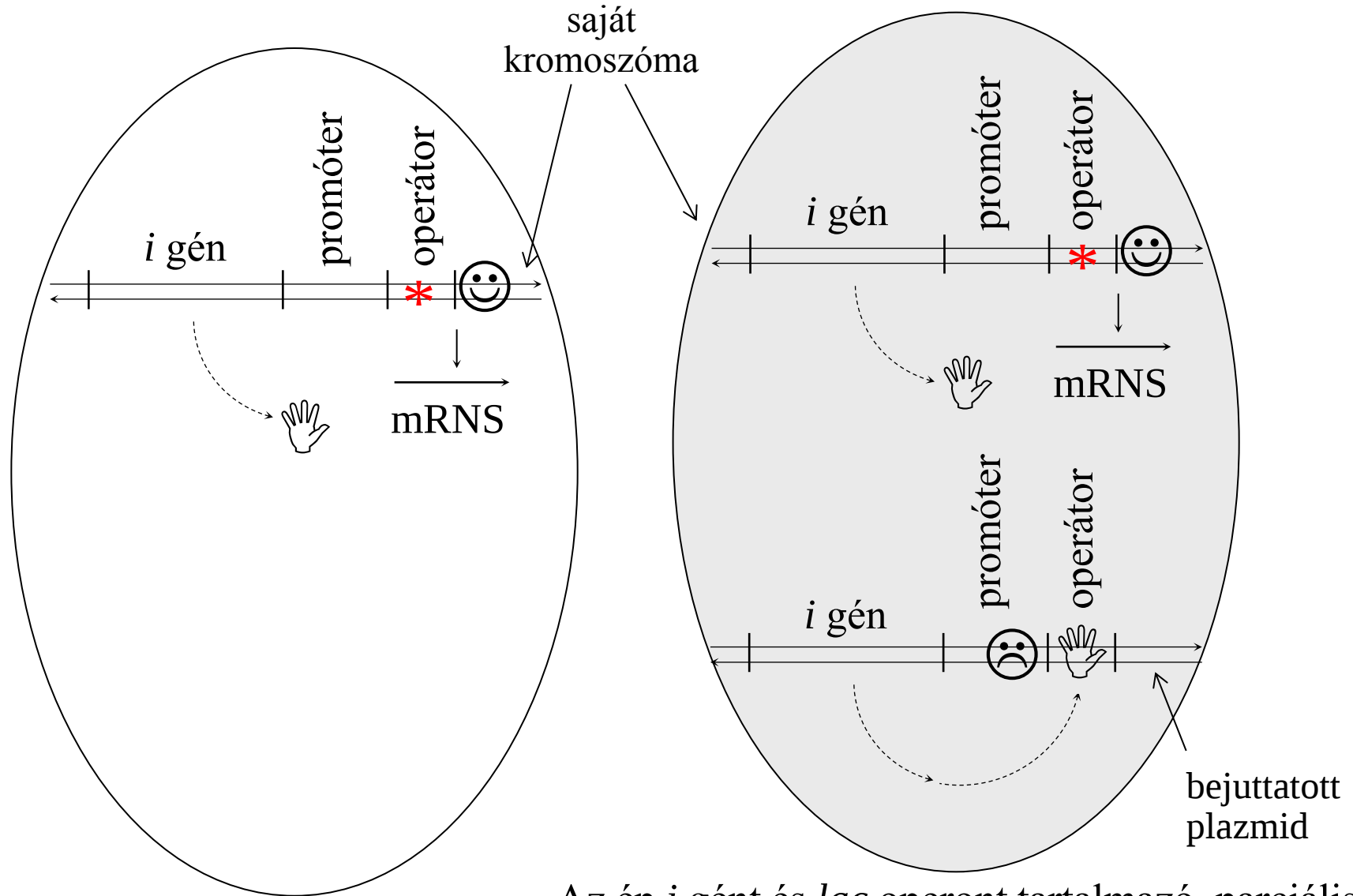
Tejcukor hiányában is van kifejeződés: **Az i^- mutáció**

1. lehetőség: az i represszor nem termelődik (vagy nem képes kötődni az operátorhoz)



Tejcukor hiányában is van kifejeződés: **Az O^c mutáció**

2. lehetőség: Az operátor hibás, nem képes kötni az i represszorfehérjét

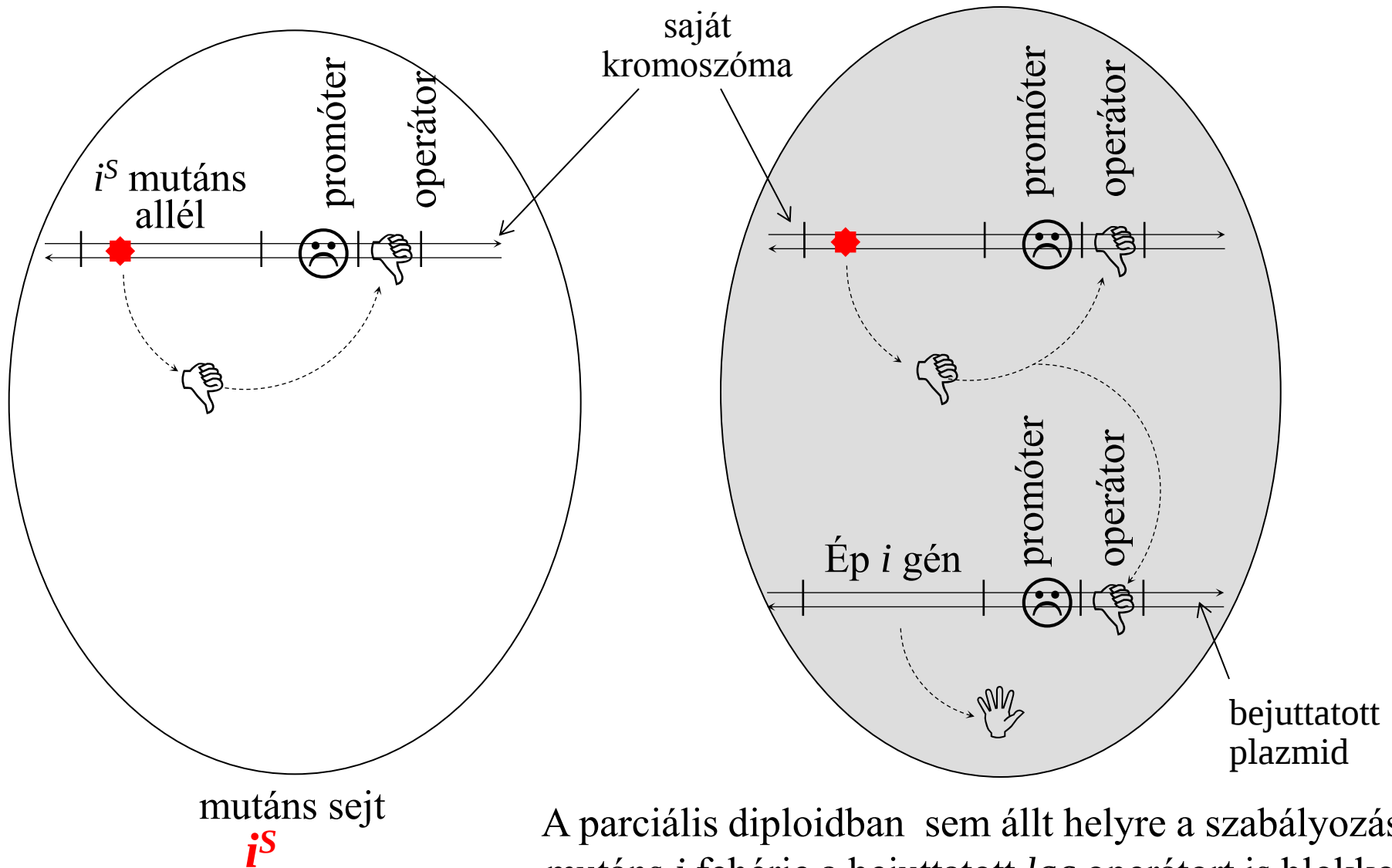


O^c mutáns sejt

Az ép i gént és lac operont tartalmazó parciális diploidban sem állt helyre a normális szabályozás

Tejcukor jelenlétében nincs kifejeződés: **Az i^s mutáció**

lehetőség: Az i represszor-fehérje termelődik, és kötődik az operátorhoz, de nem képes leválni róla laktóz jelenlétében sem

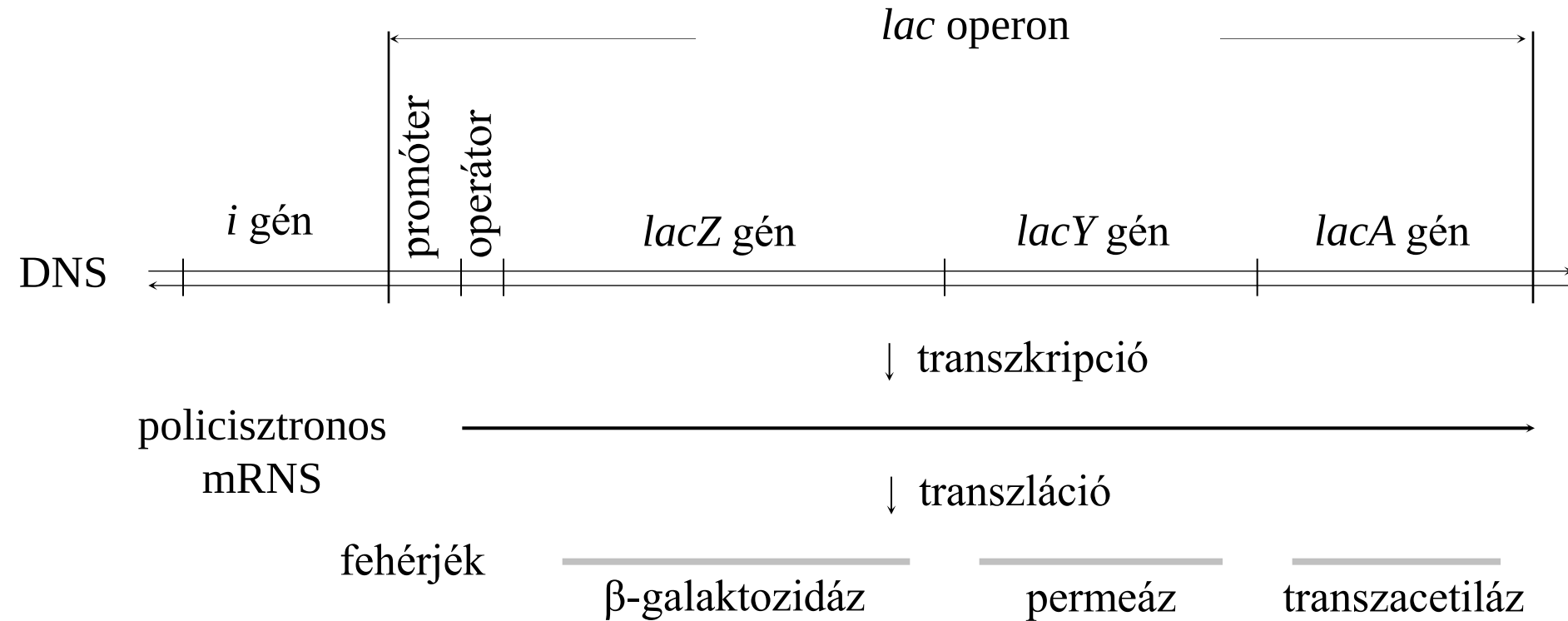


A parciális diploidban sem állt helyre a szabályozás: a mutáns i fehérje a bejuttatott lac operátort is blokkolja

?

Lehet más oka annak, ha **tejcukor jelenlétében sem** fejeződik ki a *lac* operon? → 14.1.-es feladat

A *lac* operon szerveződése

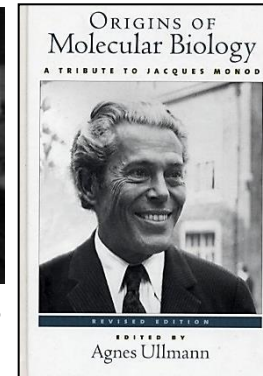


De a történetnek itt nincs vége... Mi van akkor, ha glükóz és laktóz is van a közegben? Miért fektetne be a baktérium feleslegesen energiát a laktóz feldolgozásába, ha van könnyebben hasznosítható glükóz?

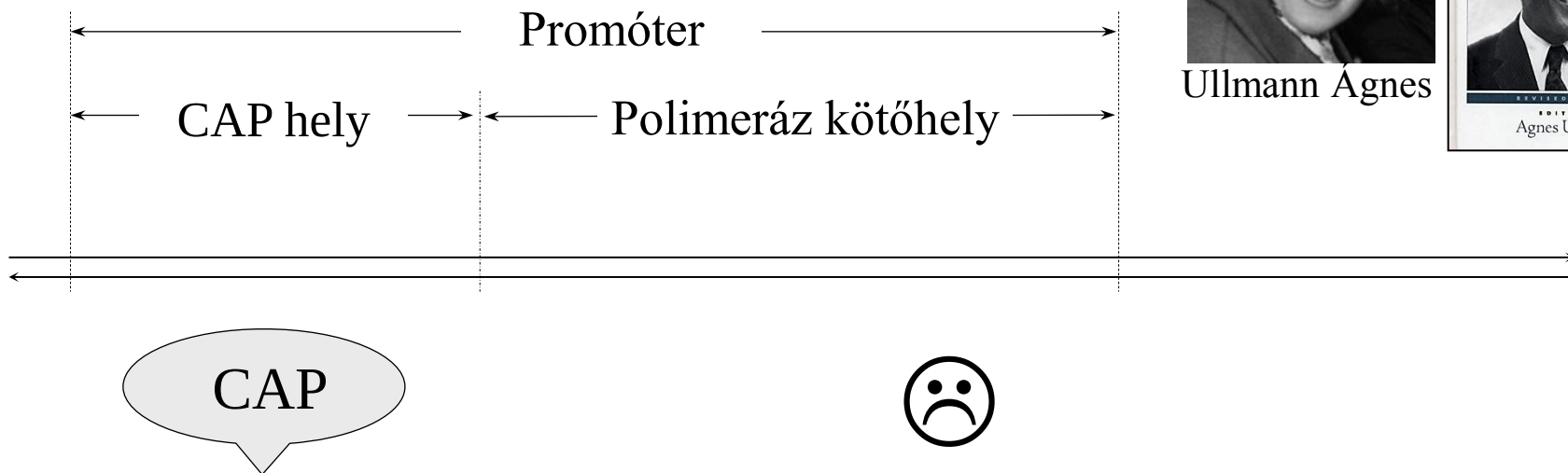
A katabolit-represszió mechanizmusa



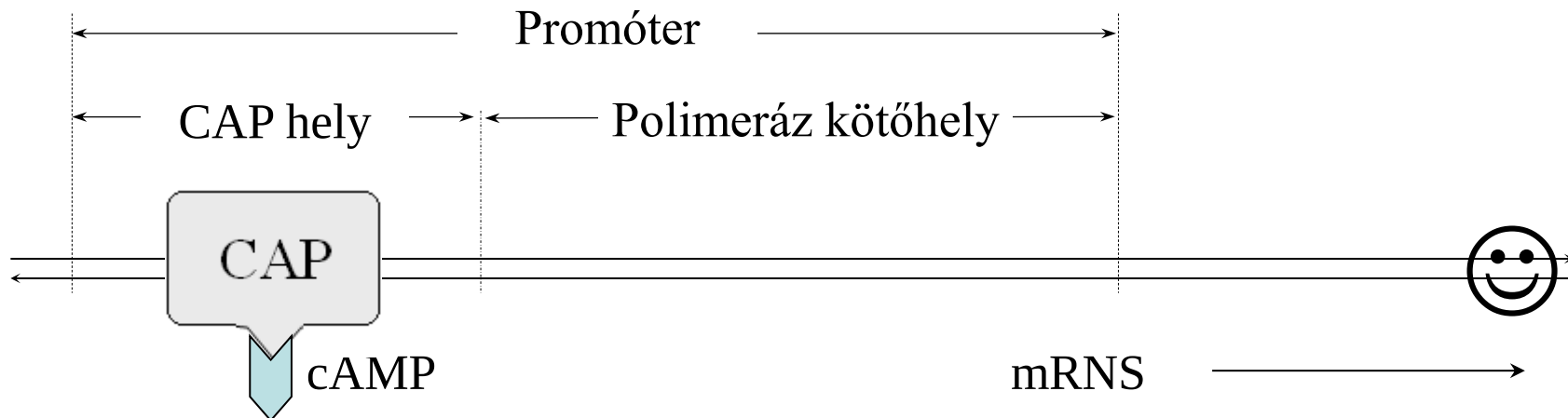
Ullmann Ágnes



- van glükóz:

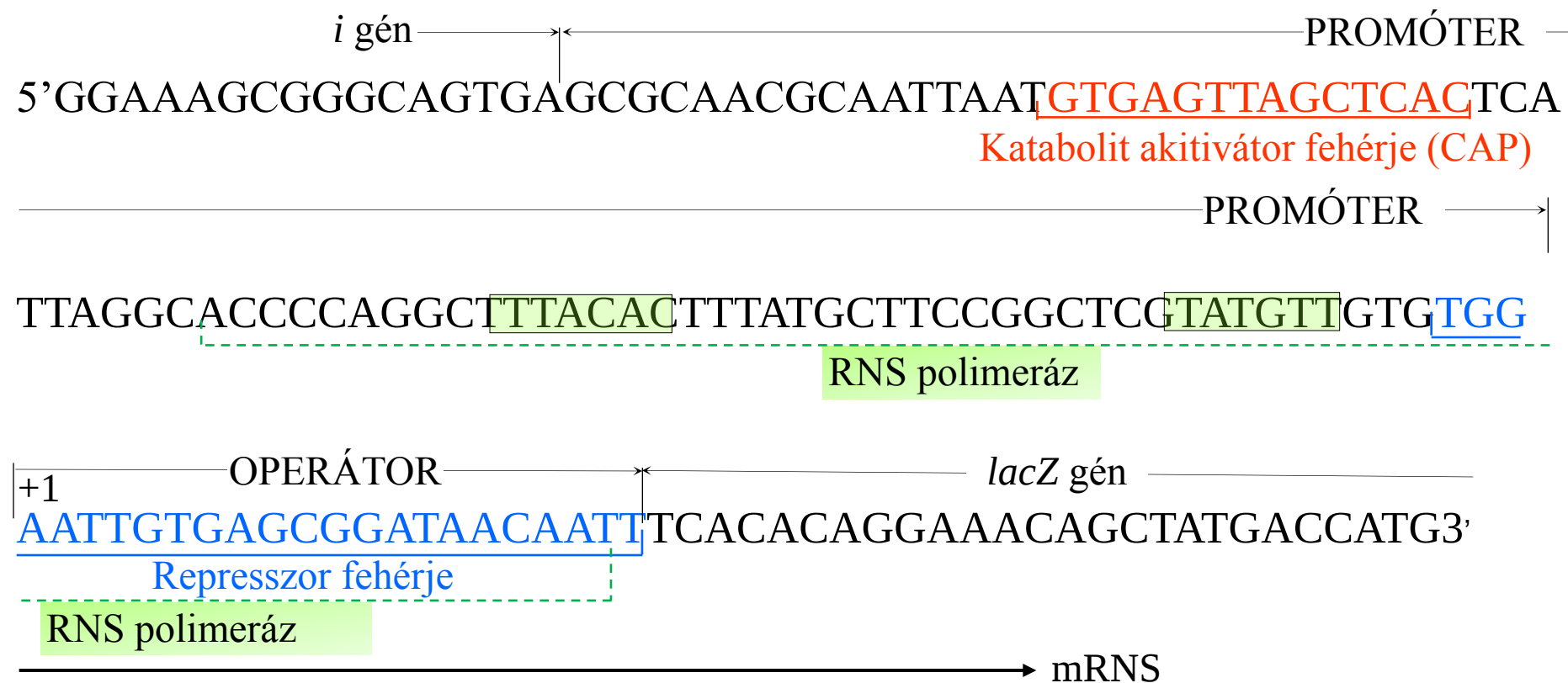


- nincs glükóz – de ezért van cAMP! (Az adenilát cikláz enzim állítja elő, amelyet a glükóz egyébként gátol.)

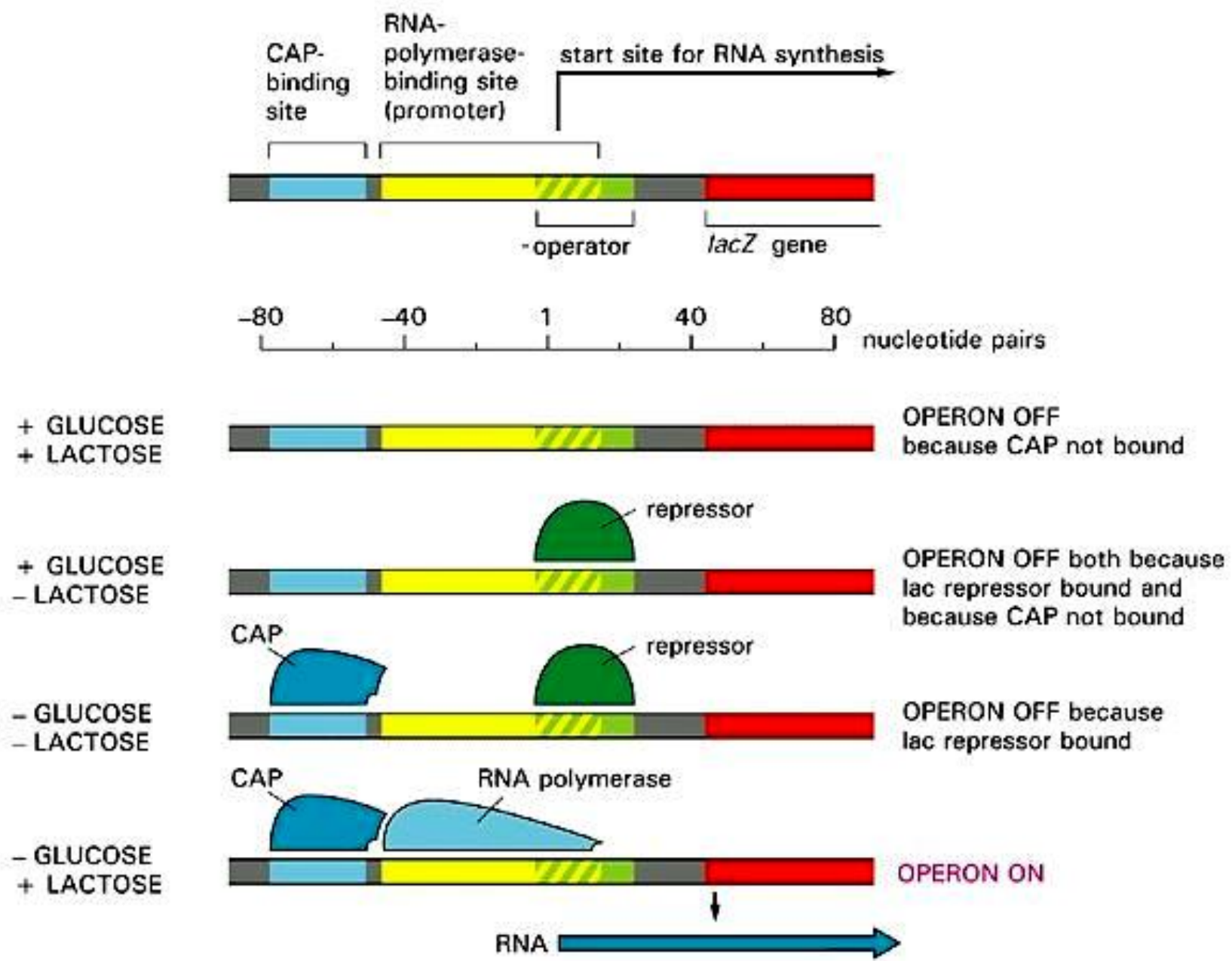


A *lac* operon promóterének szerveződése

Különböző színekkel: az egyes fehérjék kötőhelyei

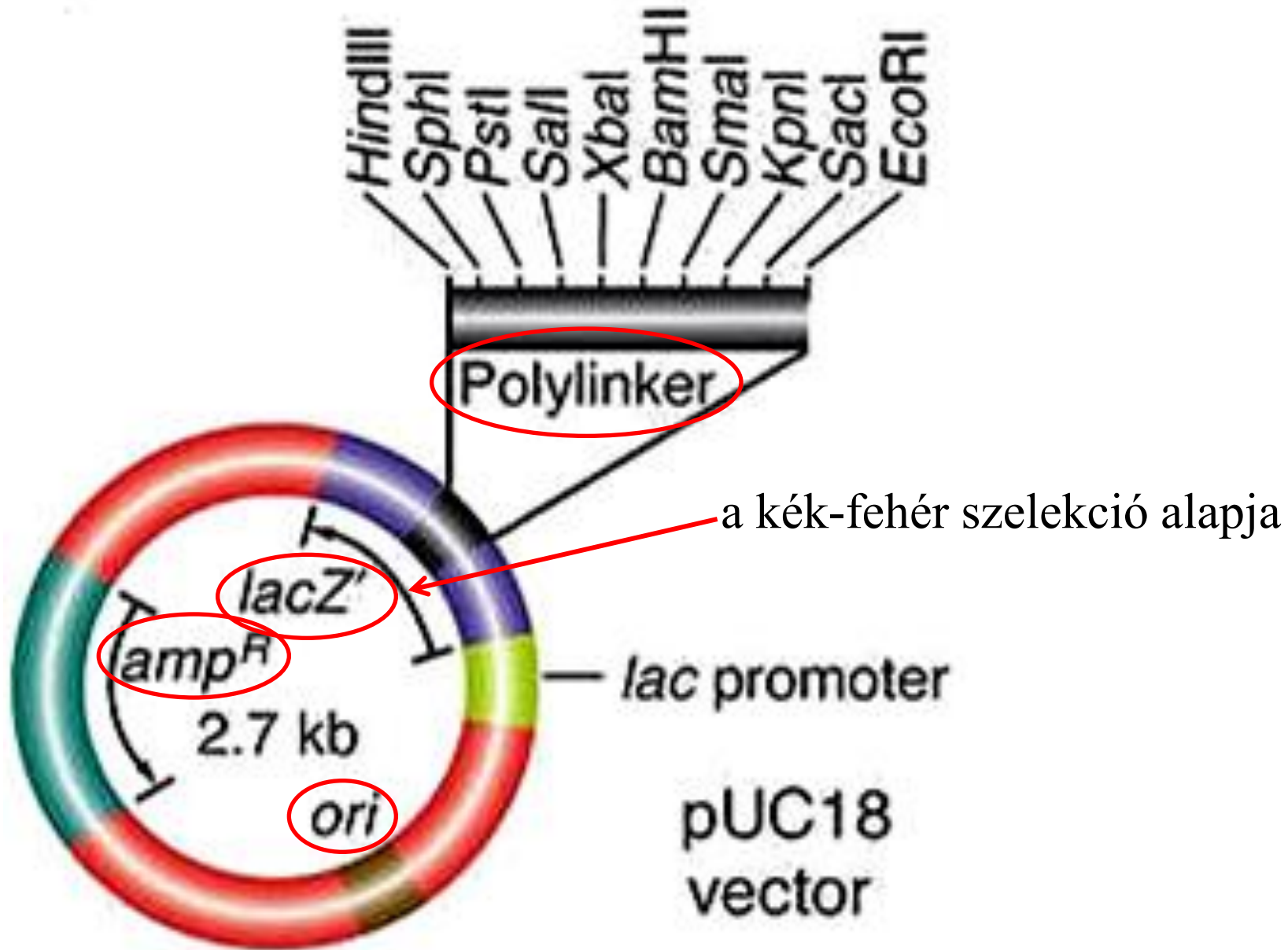


A *lac* operon kettős szabályozása

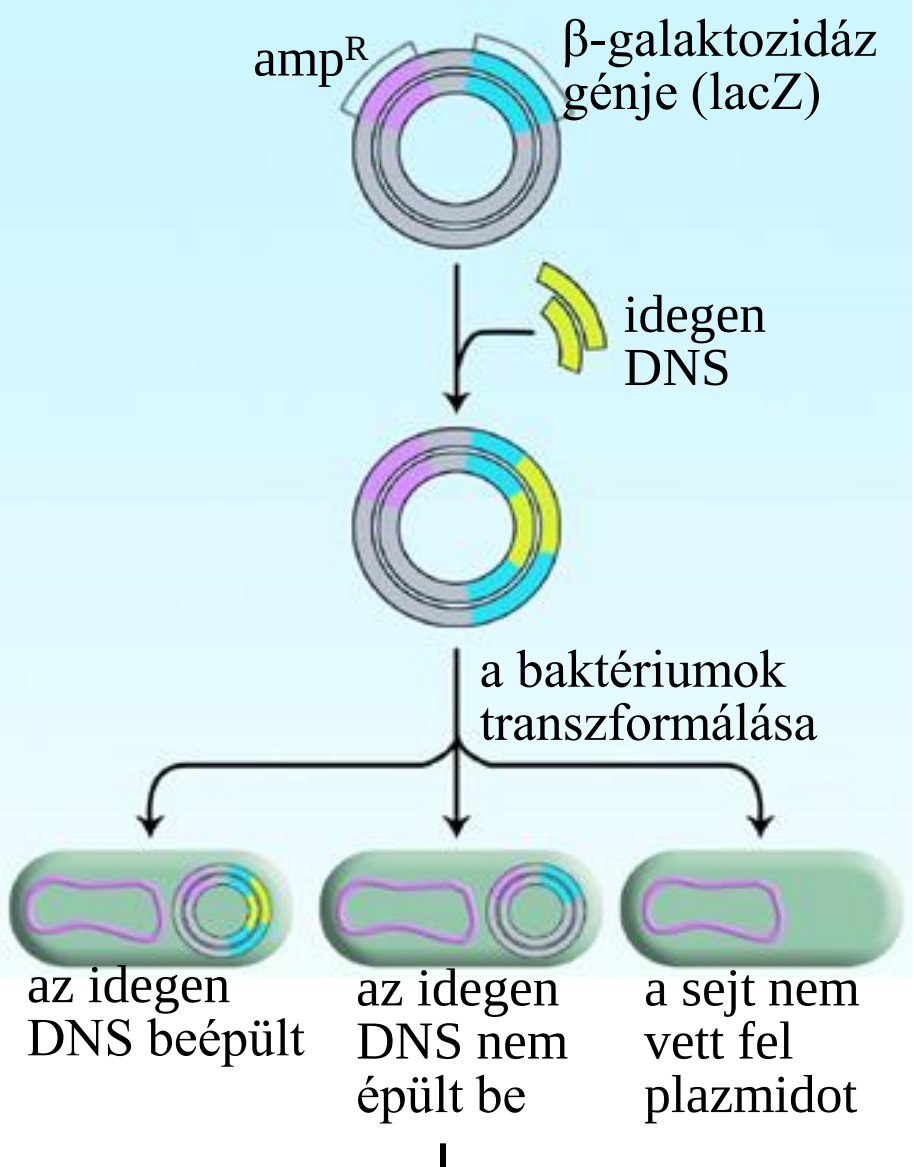


Emlékeztető: a lacZ gén, illetve a lac operon
“haszna” a molekuláris biológiában

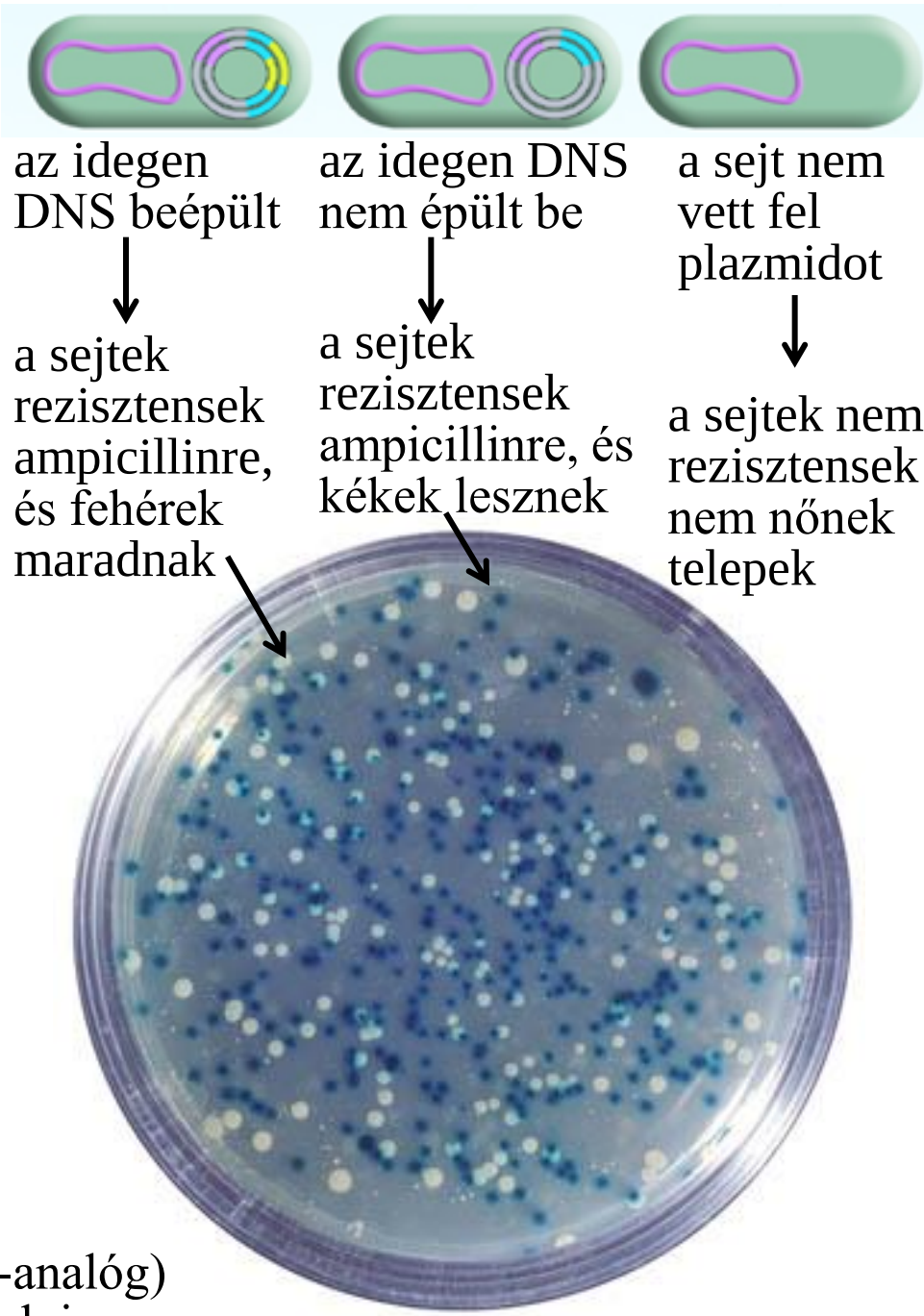
Egy klasszikus klónozó plazmid, amely egyszerűbben biztosítja a rekombinációk kiválasztását



A kék-fehér szelekció



a baktériumokat ampicillin és X-gal (laktóz-analóg) jelenlétében szélesztik és hagyják osztódni



Riporterfehérjék

Géntechnológiai módszerekkel előállítható olyan konstrukció, ahol nemcsak a vizsgálni kívánt fehérje, hanem hozzá kapcsolódva egy könnyen detektálható fehérje (a „riporter”) is kifejeződik. Így nyomon követhetjük az adott fehérjét a sejtben.

A vizsgálandó gén
szabályozó régiója
(promóter)

A vizsgálandó gén
kódoló régiója

mRNS

A vizsgálandó fehérje:
immunreakció nélkül
nem mutatható ki

A vizsgálandó gén
szabályozó régiója
(promóter)

A vizsgálandó gén
kódoló régiója

A riportergén
kódoló régiója

fúziós
mRNS

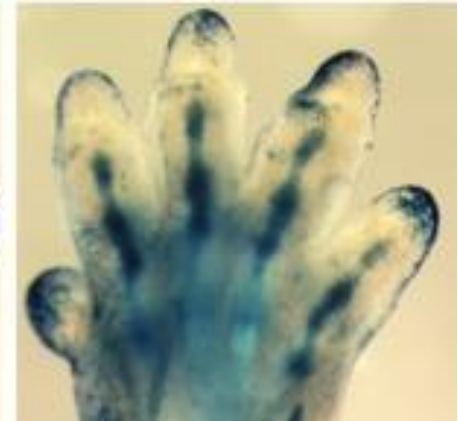
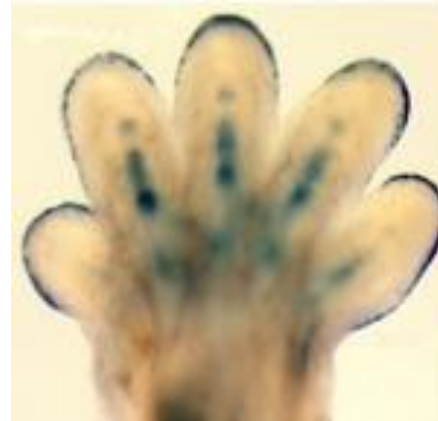
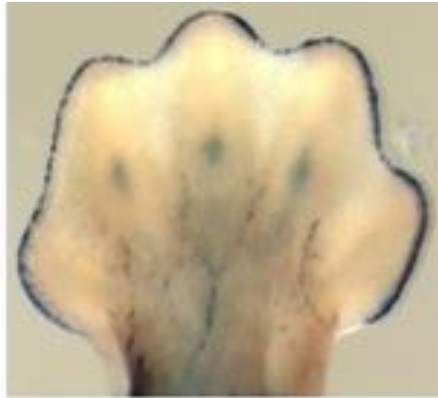
Fúziós fehérje:
jelenléte, lokalizációja
kimutatható

Gyakran használt
riporterek:

- β -galaktozidáz
(enzimreakción alapul)
- Lumineszcens fehérjék
(luciferáz)
- Fluoreszcens fehérjék
(élő sejt is vizsgálható!!)

A β -galaktozidáz, mint riporter

Különböző, a végtagok és a csontok fejlődésében szerepet játszó génekhez kapcsolt β -galaktozidáz riporterek kifejeződése egérben

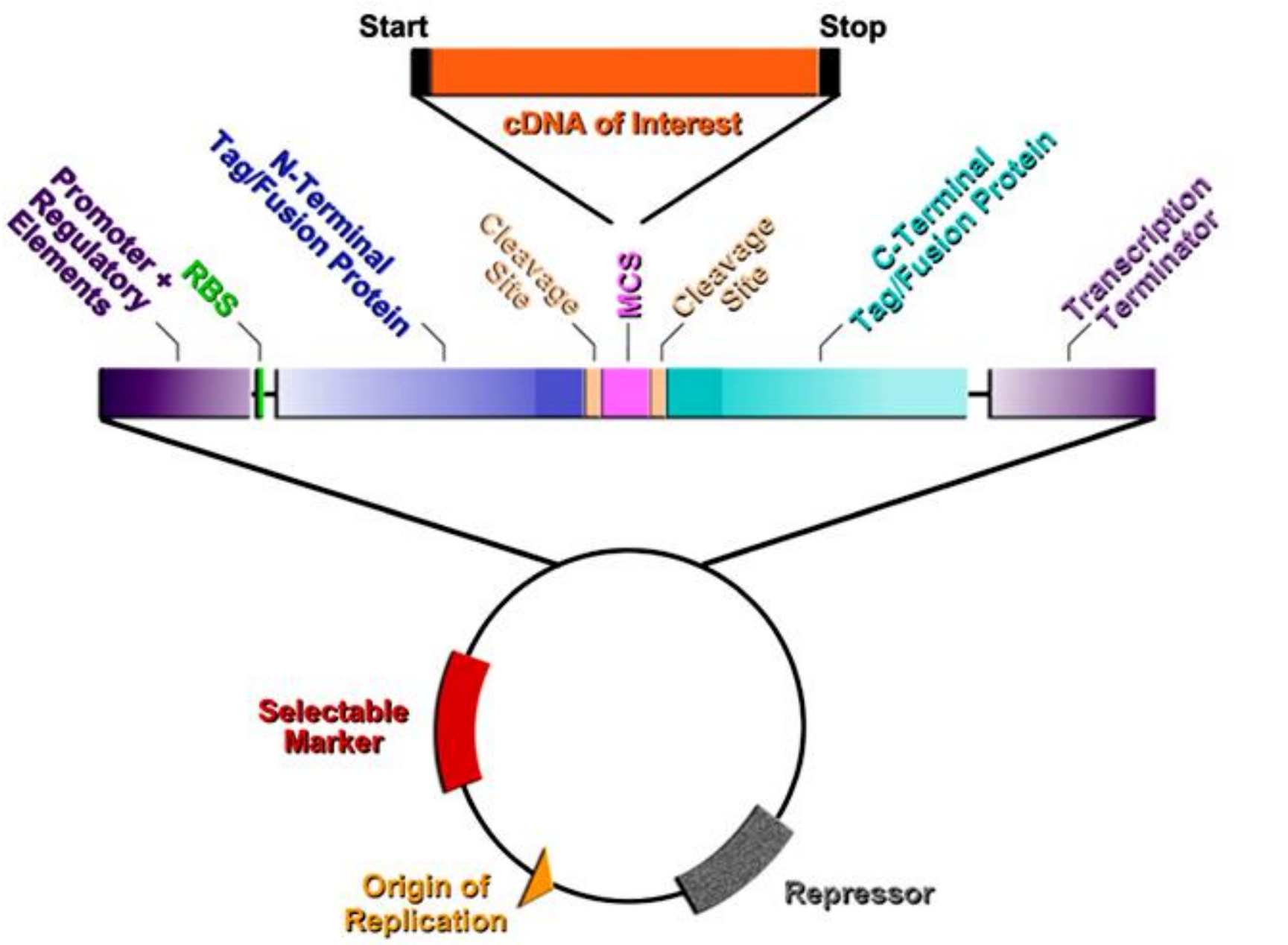


noggin <http://ls.berkeley.edu/node/325>

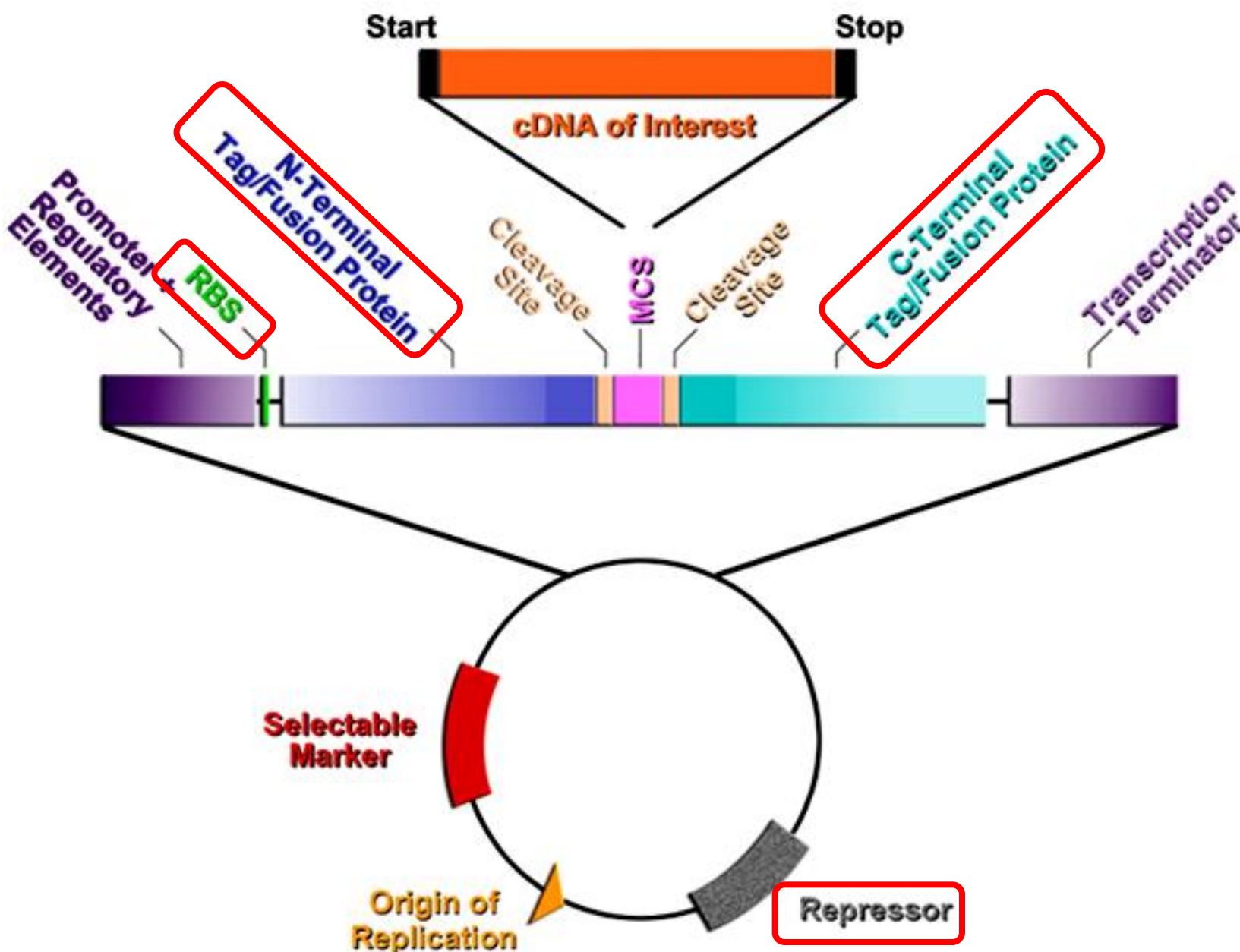


noggin <http://ls.berkeley.edu/node/329>

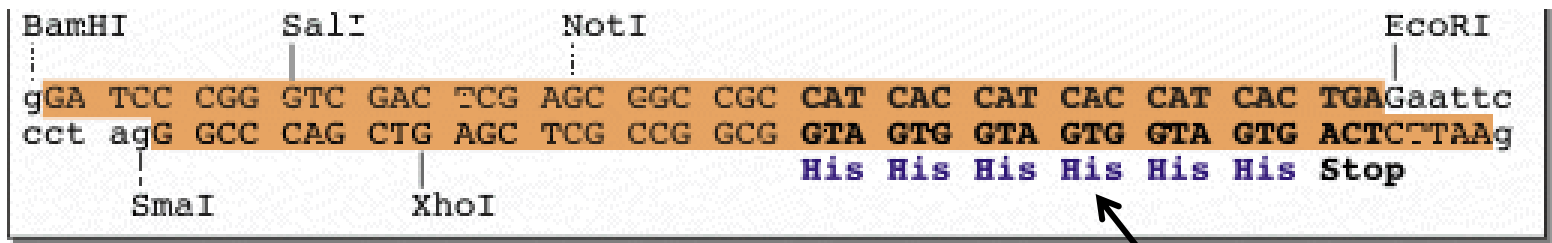
Expressziós vektorok: irányított fehérjetermeltetés



Expressziós vektorok: irányított fehérjetermeltetés



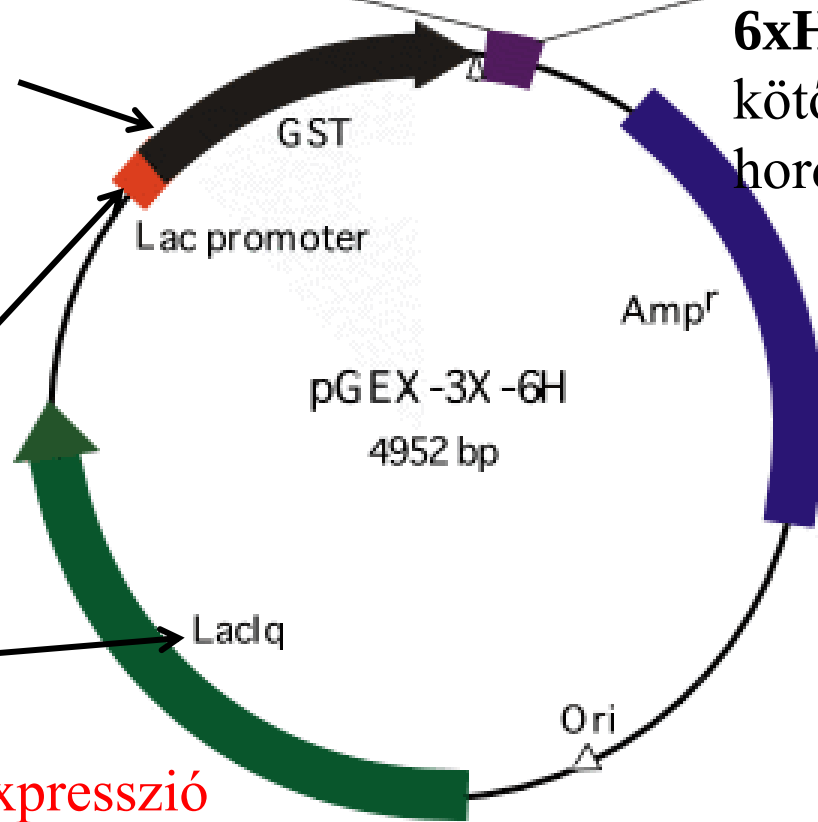
Példa expressziós vektorra



GST: a glutation-S-transzferázt kódolja, amelynek szubsztrátja a glutation
↓
affinitáson alapuló tisztítás

A **lac promóter** után kezdődik a transzkripció

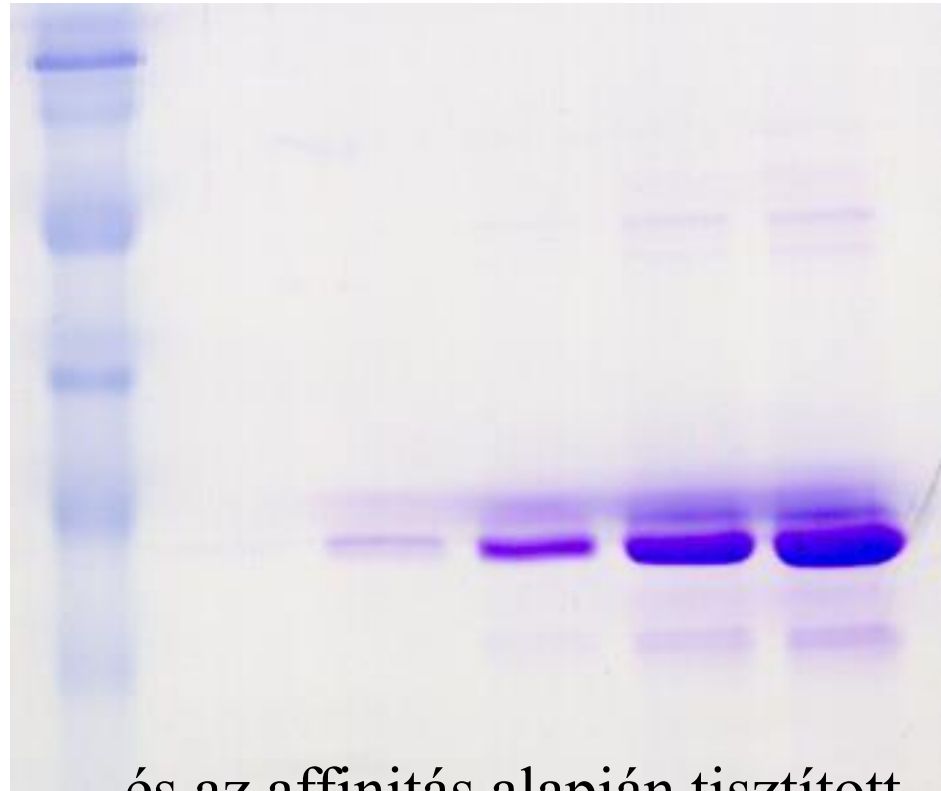
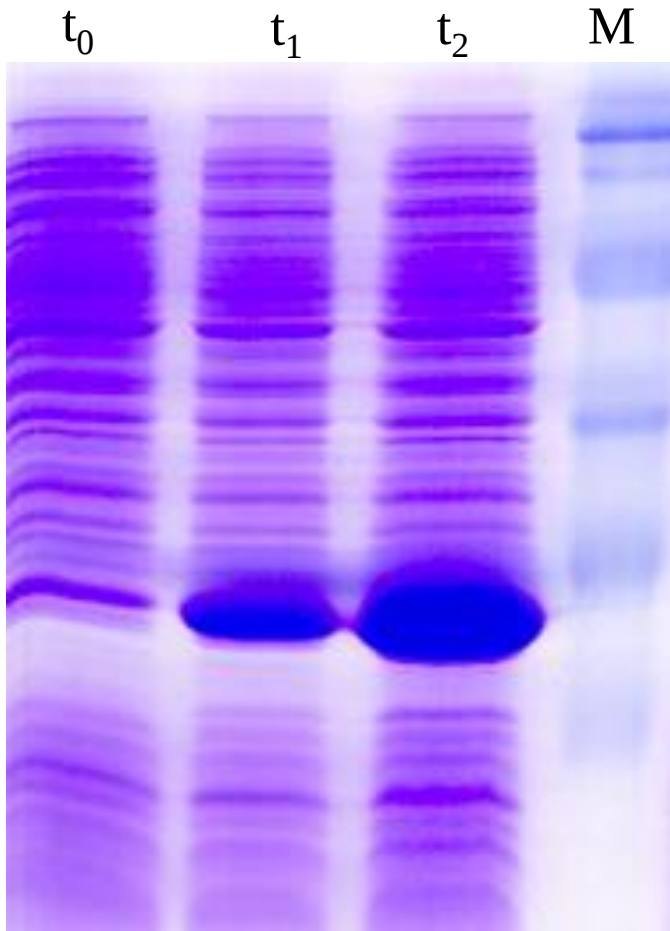
A **lac promóter represszora**
↓
időben irányítható expresszió



6xHis: nagy affinitással kötődik Ni-felszínű hordozókhoz
↓
affinitáson alapuló tisztítás

Egy termelésre fogott baktérium fehérjetartalma SDS-gélelektroforézissel szeparálva:

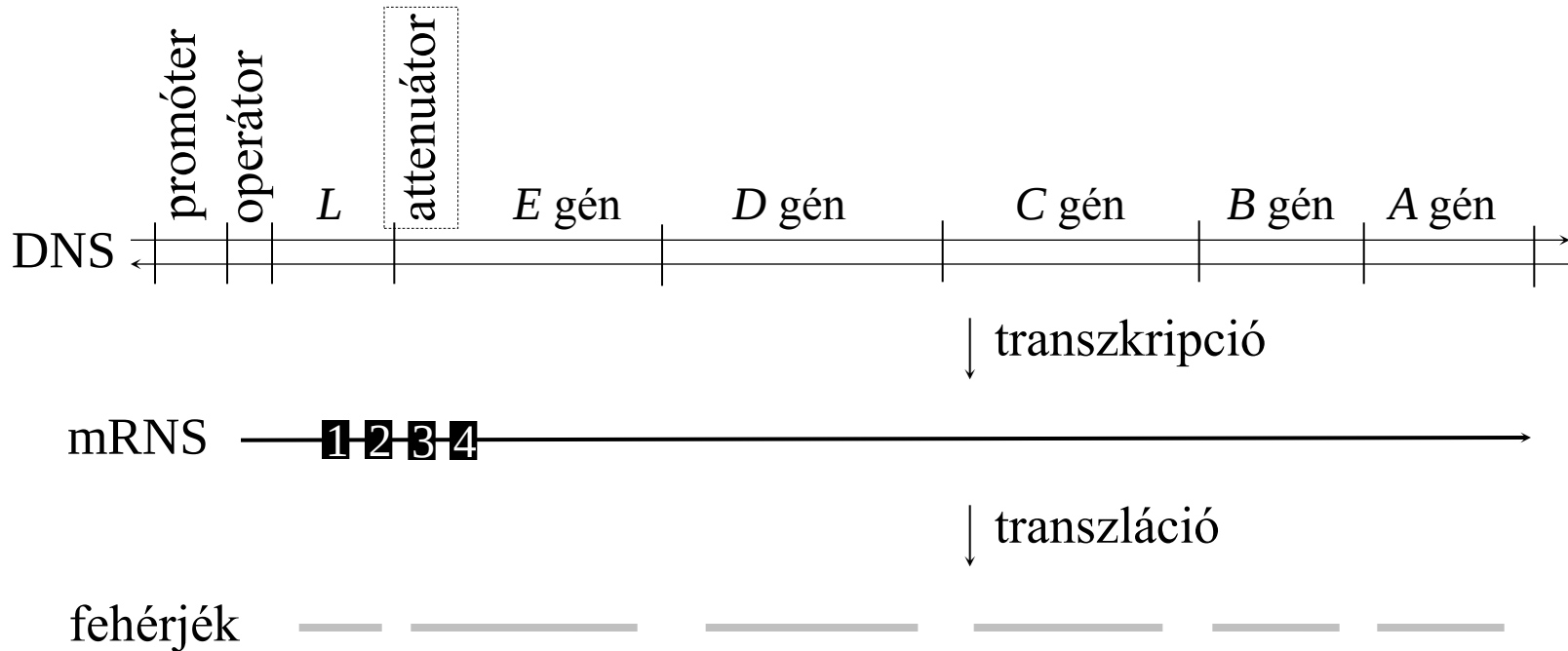
t_0 : indukció (laktóz-analóg hozzáadása) előtt
 t_1 illetve t_2 : indukció után 1 , illetve két órával
(M: molekulasúly-marker)



...és az affinitás alapján tisztított,
mesterségesen termeltetett fehérje

A represszálnható operon

A triptofán operon szerveződése

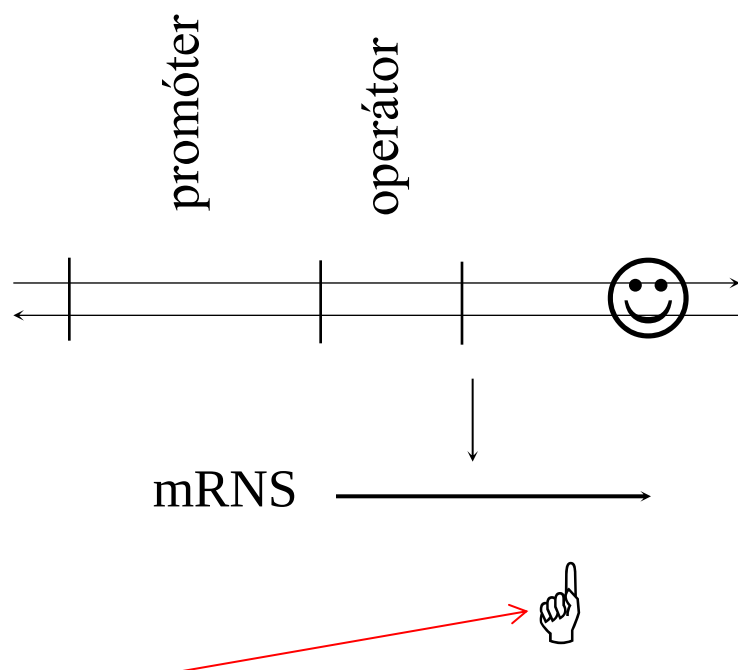


A triptofán operon által kódolt enzimek (A-E) a triptofán szintézisében játszanak szerepet.

A DNS kódoló szakaszának elején (és így a policisztronos mRNS 5' végén) van egy attenuátor nevű szekvencia, amelynek fontos szerepe van a transzkripció szabályozásában.

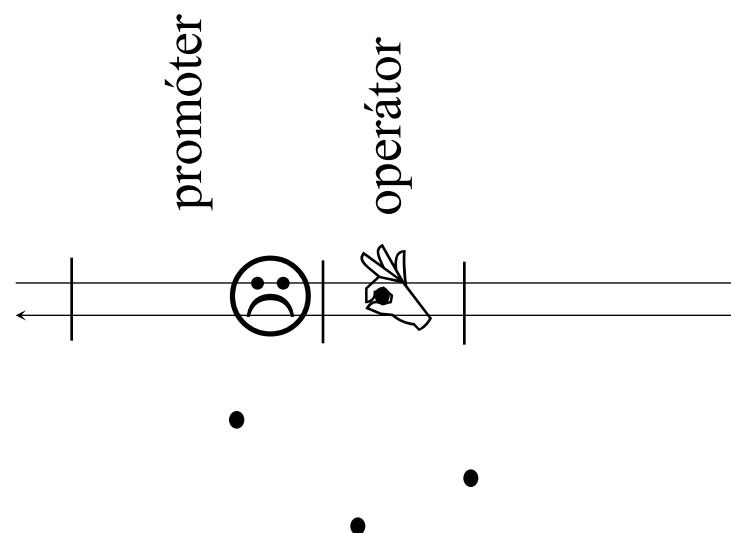
A *triptofán* operon ki-, illetve bekapcsolásának mechanizmusa

Nincs triptofán



represszor: triptofán nélkül nem aktív, nem kötődik az operátorhoz

Van triptofán



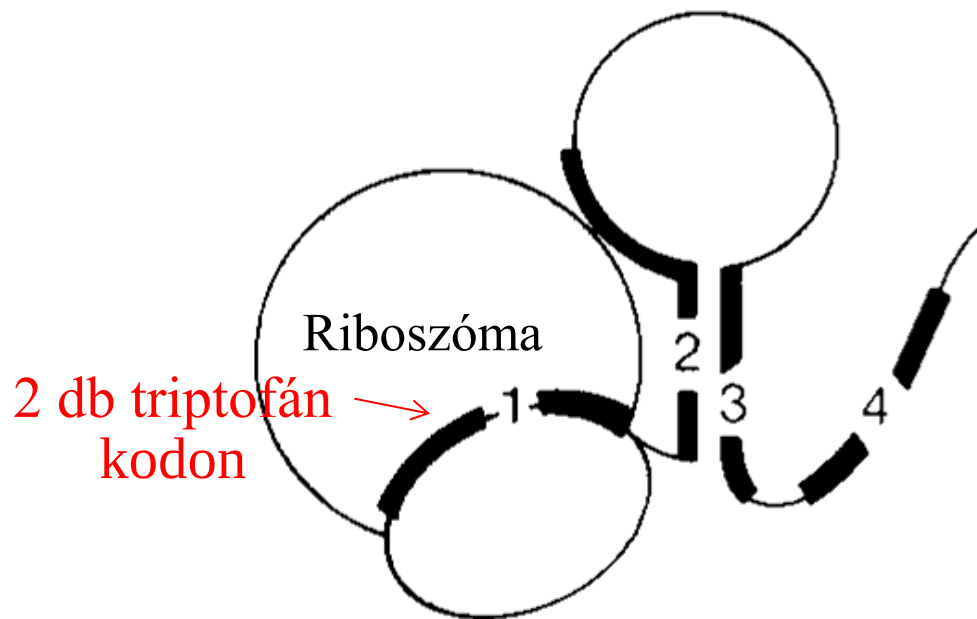
A represszor triptofánhoz kötődve kapcsolódik az operátorhoz – gátolja a transzkripciót

Az attenuáció mechanizmusa



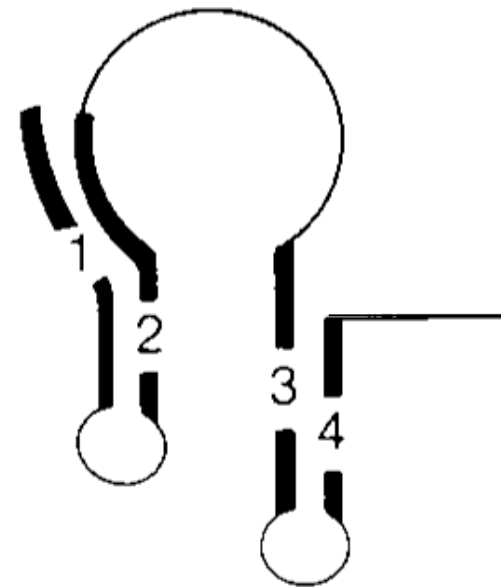
Az egymás melletti szakaszok egymás komplementerei fordított sorrendben.

Nincs triptofán



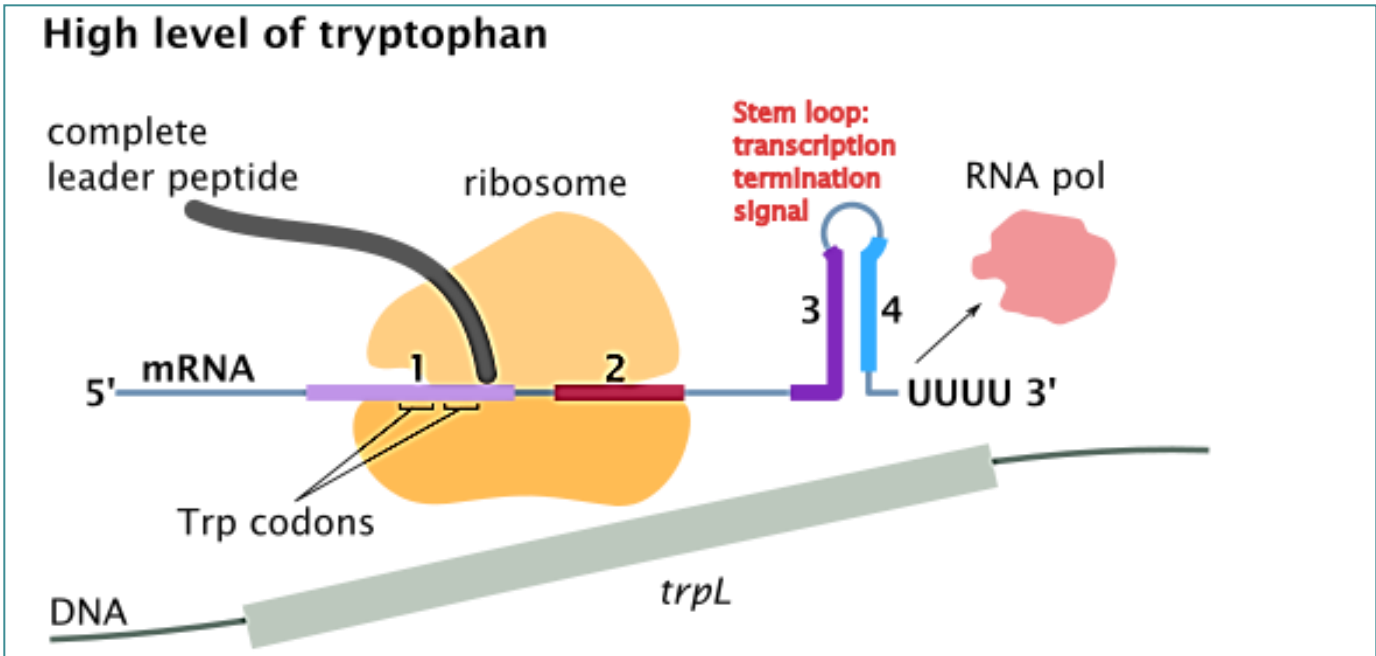
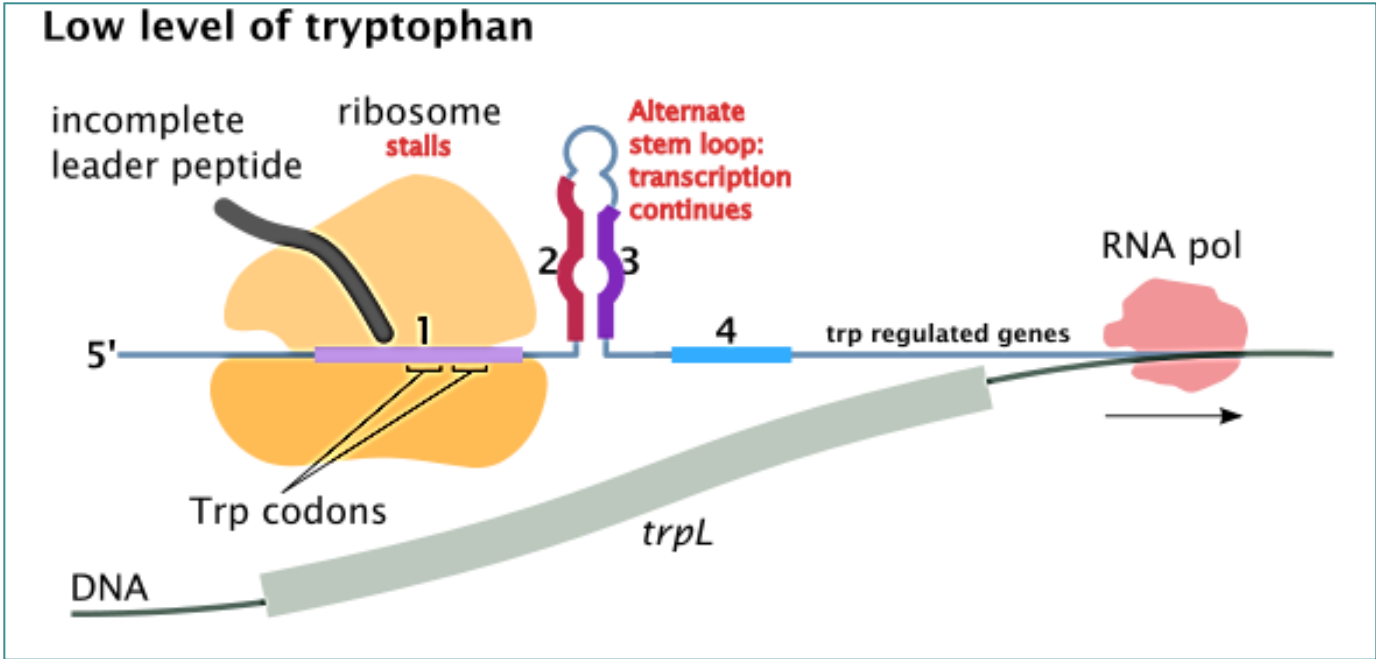
A transzláció lelassul, 2/3 hibridizáció → később folytatódhat az RNS- és fehérjeszintézis

Van triptofán

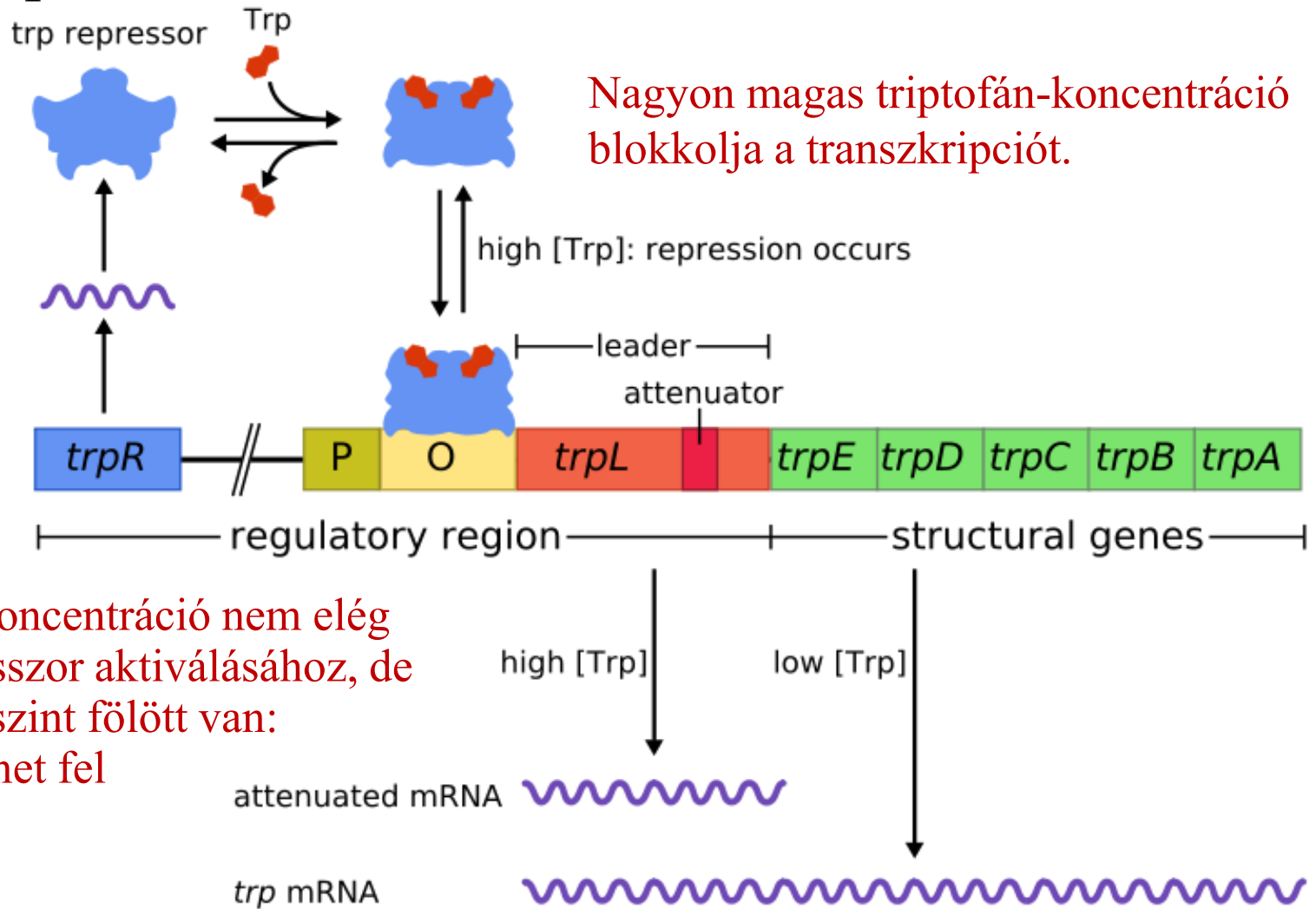


A riboszóma gyorsan „ráfut” a 2. szakaszra, átírja, 2/3 helyett csak 3/4 hibridizáció lehet → terminációs jel az RNS-polimeráznak

Az attenuáció mechanizmusa



A represszor-fehérje és az attenuáció együtt szabályozzák a triptofán operont



Ha triptofán-koncentráció nem elég magas a represszor aktiválásához, de egy bizonyos szint fölött van: attenuáció léphet fel

Az attenuáció jelenségét azóta több represszálható operon (pl. hisztidin, fenilalanin, leucin) esetében felfedezték.