

PROBLÉMA-MEGOLDÓ TESZTEK MOLEKULÁRIS SEJTBIOLOGIÁBÓL

Szeberényi József

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
2015.



Technikai munkálatok

Árvai Zita

Vecsernyés Mónika

Az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével.

Készült az Európai Unió támogatásával (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).



TARTALOM

Hemoglobin variánsok elektroforetikus viselkedése	1.
Valós idejű polimeráz láncreakció	5.
Célzott géntesztelés	10.
Biszulfit kezelés hatása a genomális DNS-re	15.
A sejtciklus vizsgálata áramlási citometriával	18.
α 1-Antitripszin hiány: egy példa a fehérje-konformáció betegségeire	22.
Vektoriális transzport vékonybél hámsejtekben	31.
Az eritropoietin-receptor expressziós klónozása	34.
Az élesztő két-hibrid rendszer	39.
Egy apoptózist okozó szer hatásmechanizmusának vizsgálata	42.
Egy humán papilloma vírus onkoprotein hatásmechanizmusa	48.
Jelátvitel Philadelphia-kromoszóma pozitív leukémia sejtekben	53.



Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujsechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

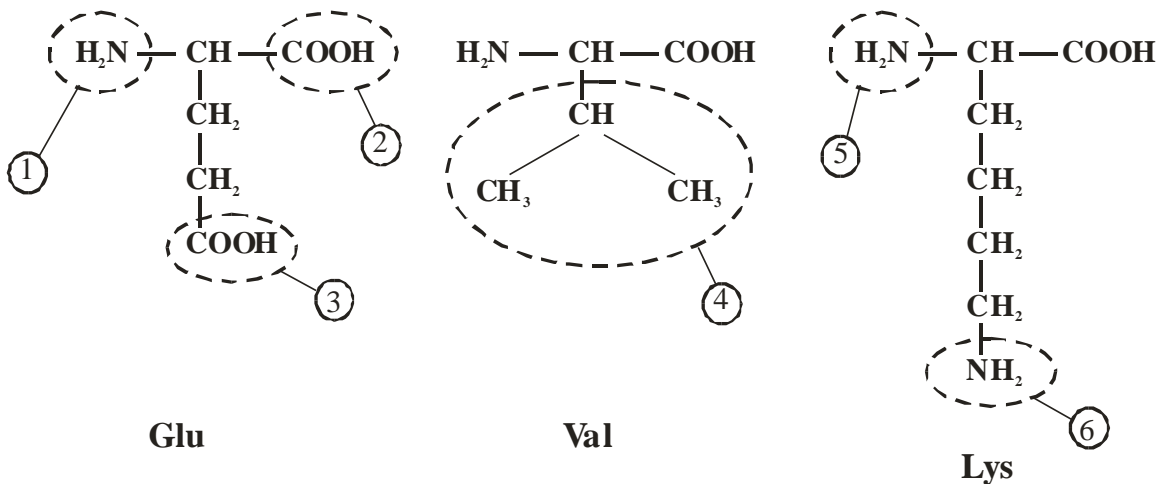
HEMOGLOBIN VARIÁNSOK ELEKTROFORETIKUS VISELKEDÉSE

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*Hemoglobinok * vörösvértestek * retikulociták * aminosavak * α és β globinláncok * elektroforézis * izoelektromos pont * sarlósejtes vérszegénység*

A kísérlet

A felnőtt ember vörösvértestjeiben a hemoglobin A (HbA) a domináló hemoglobin: létfontos fehérje, mely az oxigéntranszportot végzi. Éretlen retikulocitákban szintetizálódik, funkcióját pedig érett eritrocitákban látja el. Két α és két β globin láncból áll, mindegyikhez egy hem molekula kapcsolódik. A hemoglobinopátiák öröklődő betegségek, melyeket az α és β globin génekben keletkező mutációk okozzák. A leggyakoribb hemoglobin variánsok közé tartozik a HbS (sarlósejtes vérszegénységben szenvedő betegek hemoglobinja) és a HbC (enyhébb kórképet okozó hemoglobin). Mindkét betegségben a β globin mRNS 6. kódonját érinti a mutáció: normális β -lánc glutaminsava (Glu) helyett a HbS-ben valin (Val), a HbC-ben pedig lizin (Lys) található ezen a helyen (az aminosavak képletét a 1. ábra mutatja).



1. ábra

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

1. _____ A fehérjeláncba épülés során mely csoportok alkotnak peptidkötést?

- A: az 1. csoport
- B: a 2. csoport
- C: a 3. csoport
- D: az 1. és 2. csoport
- E: mindhárom csoport

2. _____ A fehérjeláncba épülés után mely csoportok lehetnek pozitív töltésűek vizes oldatban?

- A: az 1. csoport
- B: a 2. csoport
- C: az 5. csoport
- D: a 6. csoport
- E: az 1., 5. és 6. csoport

3. _____ A fehérjeláncba épülés után mely csoportok lehetnek negatív töltésűek vizes oldatban?

- A: az 1. csoport
- B: a 2. csoport
- C: a 3. csoport
- D: a 2. és 3. csoport
- E: a 4. csoport

4. _____ A fehérjeláncba épülés után mely csoportok helyezkednek el a hemoglobin molekula belsejében?

- A: az 1. csoport
- B: a 3. csoport
- C: a 4. csoport
- D: a 6. csoport
- E: a 3. és 4. csoport

Mennyiségi összehasonlítás

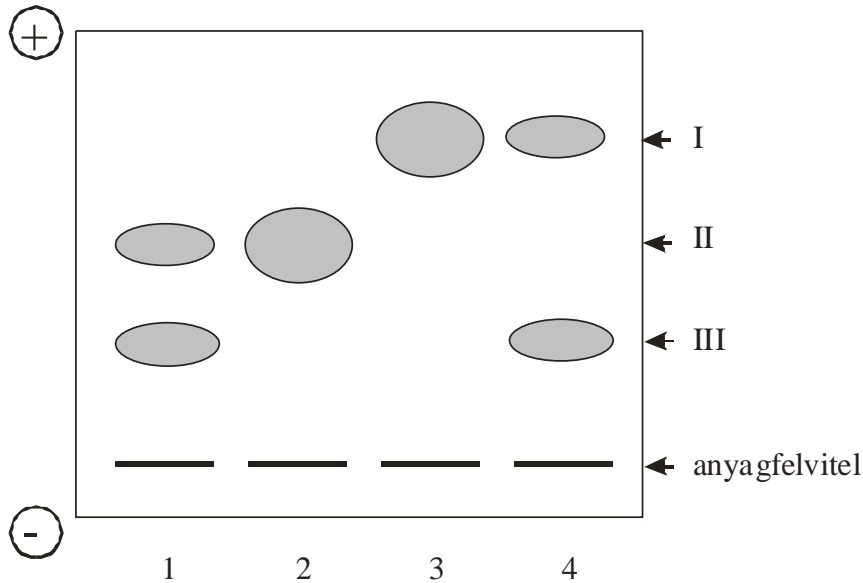
(E kérdéstípusban két fogalmat /A és B/ mennyiségileg kell összehasonlítani.

Jelölések: **A: A nagyobb, mint B**
B: B nagyobb, mint A
C: mindkettő egyenlő, vagy megközelítően azonos)

5. _____ A: a HbA izoelektromos pontja
 B: a HbS izoelektromos pontja

Négy személyből származó vörösvértest kivonatokat elektroforézissel vizsgáltak a tesztben leírt kísérletben. Az elektroforetikus frakcionálás után a membránt fehérjefestékkel festették meg (2. ábra).

Tanulmányozza az ábrákat és oldja meg a tesztkérdéseket! (Vegye figyelembe, hogy az aminosav különbségek nem jelentősen befolyásolják a molekulaméretet: a HbA, HbS és HbC molekulatömege lényegében azonos).



2. ábra

Ábra elemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

A: alátámasztja az állítást

B: ellentmond az állításnak

C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

6. ____ Az elektroforézis körülményei között mindhárom hemoglobin variáns (I, II és III) negatív töltésű volt.
7. ____ Az elektroforézis-puffer pH-ja azonos volt a III. variáns izoelektromos pontjával.
8. ____ Az I. fehérje izoelektromos pontja magasabb, mint a III. fehérje hasonló paramétere.
9. ____ Az 1. és 4. egyed hordozza a HbC mutációt.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

10. ____ Melyik egyednek a legrosszabb a prognózisa?

- A: 1. egyed
- B: 2. egyed
- C: 3. egyed
- D: 2. és 3. egyed
- E: 4. egyed

11. ____ Mely egyed vörösvértestjei tartalmaznak csak mutáns hemoglobint?

- A: 1. egyed
- B: 2. egyed
- C: 1. és 2. egyed
- D: 3. egyed
- E: 4. egyed

12. ____ Melyik állítás írja le legpontosabban a 2. egyed hemoglobin-státuszát?

- A: A hemoglobin struktúrája, funkciója és mennyisége normális
- B: A hemoglobinszintézis normális, de a degradáció fokozott
- C: A hemoglobinszintézis csökkent, a degradáció normális
- D: Ezek a sejtek szekretálják a hemoglobint
- E: A hemoglobin vízdékonysága csökkent

Helyes válaszok

- | | | | |
|----|---|-----|---|
| 1. | D | 7. | B |
| 2. | D | 8. | B |
| 3. | C | 9. | A |
| 4. | C | 10. | B |
| 5. | B | 11. | C |
| 6. | A | 12. | E |

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2004) Problem-solving test: Electrophoretic behavior of hemoglobin variants. Biochem.Mol.Biol.Educ. 32, 350-351.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

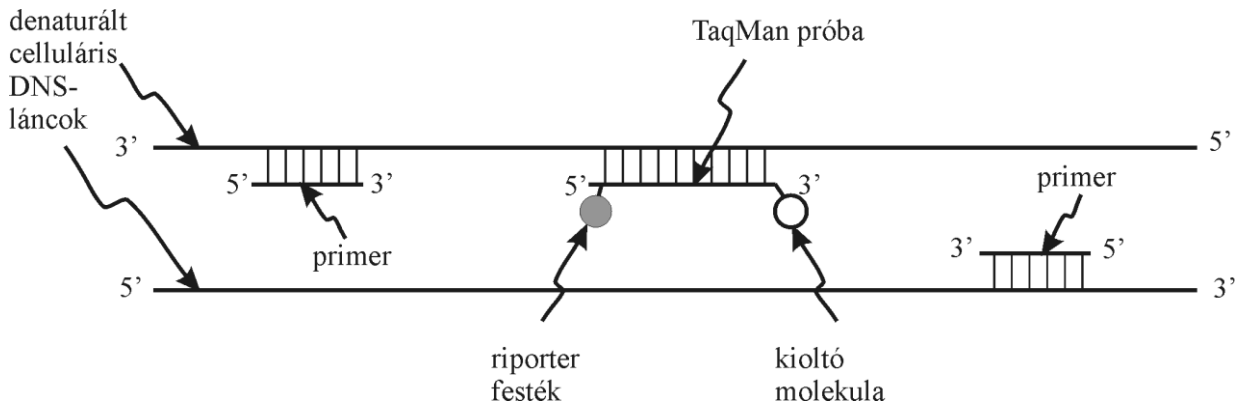
VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*polimeráz láncreakció * DNS amplifikáció * elektroforézis * emlőtumor * HER2 gén * genomiális DNS * in vitro DNS-szintézis * templát * primer * Taq polimeráz * 5'→3' elongációs aktivitás * 5'→3' exonukleáz aktivitás * dezoxiribonukleozid-trifoszfátok */ DNS-szerkezet * proofreading * PCR-apparátus (thermocycler) * fluoreszcencia*

A kísérlet

A hagyományos **polimeráz láncreakció (PCR)** során az amplifikált DNS-régió vizsgálatára a 30-40 ciklusból álló reakció után van lehetőség: a képződött terméket általában elektroforézist követő DNS-festéssel vizsgálják. A **valós-idejű (real-time) PCR** módszer előnye, hogy a folyamat a reakció közben monitorozható: az amplifikáció mértéke minden PCR-ciklus után meghatározható. Erre többféle módszert dolgoztak ki, az egyik legnépszerűbb technika (a **TaqMan-módszer**) elvét az alábbi kísérletben mutatjuk be.



1. ábra: A TaqMan-módszer elve (részletek a szövegben)

Egy műtét során **emlőtumort** távolítottak el. A tumorszövetből és a környező egészséges emlőszövetből is genomiális DNS-t izoláltak, majd a két DNS-minta azonos mennyiségeivel PCR-reakciót végeztek. A reakcióelegyek az alábbi alkotórészeket tartalmazták:

DNS-templát (a genomiális DNS-minták);

2 *primer* nagyszámú kópiája (melyek a HER2-gén egy szakaszára specifikusak és az 1. ábrán bemutatott módon kötődnek a templáthoz);

TaqMan-próba nagyszámú kópiája (az egyik templátlánchoz a két primer között kötődő oligonukleotid, melynek 5'-végéhez egy fluoreszcens festéket /ún. *riporter festék*/, 3'-végéhez pedig egy ún. *kioltó molekulát* kötöttek, ez a próba-molekulában olyan közel van a riporter festékhez, hogy kioltja annak fluoreszcenciáját);

Taq polimeráz (hőrezisztens DNS-polimeráz, 5'→3' elongációs és 5'→3' exonukleáz aktivitással);

a *négy dezoxiribonukleozid-trifoszfát* (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

A bakteriális DNS-replikáció mechanizmusának ismeretében oldja meg az alábbi tesztfeladatokat!

Négyféle asszociáció

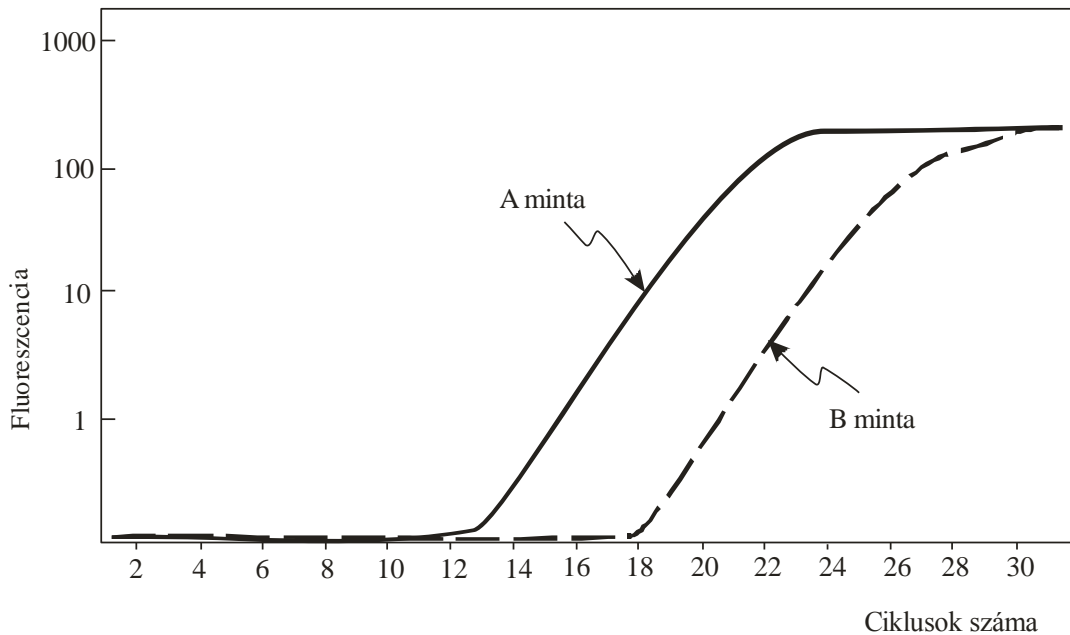
(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: A Taq polimeráz 5'→3' elongációs aktivitása
- B: A Taq polimeráz 5'→3' exonukleáz aktivitása
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

1. ____ Foszfodiészter-kötéseket hoz létre.
2. ____ Foszfodiészter-kötéseket hasít.
3. ____ Hidrogén-kötéseket hasít.
4. ____ Primer-függő.
5. ____ A fent leírt reakcióelegyben mononukleotidokra bontja a primereket.
6. ____ A fent leírt reakcióelegyben mononukleotidokra bontja a TaqMan próbát.
7. ____ Proofreading funkciót lát el.

A reakcióelegyeket a fluoreszcencia folyamatos mérésére alkalmas PCR-készülékben inkubálták. A 2. ábra a ciklusonként mért relatív fluoreszcencia-értékeket mutatja a tumoros (A) és a normális (B) minta esetében.

Tanulmányozza az ábrát és oldja meg az alábbi tesztfeladatokat!



2. ábra: Emlőtumor szövetből (A) és a környező egészséges emlőszövetből (B) izolált DNS templáttal végrehajtott valós-idejű PCR vizsgálat eredménye (részletek a szövegben).

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

8. _____ A PCR-reakció előrehaladásával egy ponton mindkét reakcióelegyben nő a fluoreszcencia. Milyen folyamattal magyarázható ez?

- A: A TaqMan próba molekulák nukleotidokra esnek szét
- B: A TaqMan próba molekulák kisebb oligonukleotidokra esnek szét
- C: A TaqMan próba molekulák egészben leválnak a templátlánchról
- D: A TaqMan próba molekulák primerként szolgálnak a Taq polimeráz számára
- E: A TaqMan próba molekulák beépülnek az újonnan szintetizált DNS-láncba

Mennyiségi összehasonlítás

(E kérdéstípusban két fogalmat /A és B/ mennyiségileg kell összehasonlítani.

- Jelölések: **A: A nagyobb, mint B**
B: B nagyobb, mint A
C: mindkettő egyenlő, vagy megközelítően azonos)

9. _____ A: Szabad primer molekulák az A mintában a 4. ciklus után

10. ____ B: Szabad primermolekulák az **A** mintában a 10. ciklus után
 A: Szabad primermolekulák az **A** mintában a 10. ciklus után
 B: Szabad primermolekulák a **B** mintában a 10. ciklus után
11. ____ A: Szabad TaqMan-próba molekulák száma az **A** mintában a 10. ciklus után
 B: Szabad TaqMan-próba molekulák száma a **B** mintában a 10. ciklus után
12. ____ A: Szabad TaqMan-próba molekulák száma az **A** mintában a 18. ciklus után
 B: Szabad TaqMan-próba molekulák száma a **B** mintában a 18. ciklus után
13. ____ A: Riporter festék-mononukleotid komplexek száma az **A** mintában a 18. ciklus után
 B: Riporter festék-mononukleotid komplexek száma a **B** mintában a 18. ciklus után
14. ____ A: Az amplifikálódott HER2 fragmentumok száma az **A** mintában a 20. ciklus után
 B: Az amplifikálódott HER2 fragmentumok száma a **B** mintában a 20. ciklus után
15. ____ A: Az amplifikálódott HER2 fragmentumok száma az **A** mintában a 30. ciklus után
 B: Az amplifikálódott HER2 fragmentumok száma a **B** mintában a 30. ciklus után

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ (**A, B, C, D, E**) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

16. ____ Miért nem mérhető fluoreszcencia a mintákban az első PCR-ciklusokban?
- A: Mert a Taq-polimeráz lebontja a TaqMan-próba molekulákat
 B: Mert a Taq-polimeráz lebontja a primermolekulákat
 C: Mert nincs DNS-szintézis
 D: Mert a kioltó molekulák valamennyi riporter-festék molekula fluoreszcenciáját gátolják
 E: Mert a fluoreszcencia-detektáló műszer nem elég érzékeny
17. ____ Mi lehet az oka annak, hogy a fluoreszcencia a mintákban a 30. ciklus után már nem emelkedik?
- A: Mert elfogytak a primerek
 B: Mert elfogyott a TaqMan-próba
 C: Mert elfogyott a templát-DNS
 D: A és B
 E: A, B és C
18. ____ Mi történhetett a HER2 génnel az emlődaganatban?
- A: Kópiaszáma kb. 30-szorosára nőtt
 B: Kópiaszáma kb. 5-szörösére nőtt
 C: Kópiaszáma kb. 30-szorosára csökkent
 D: Kópiaszáma kb. 5-szörösére csökkent

E: Expressziója kb. 5-szörösére csökkent

Helyes válaszok

1.	A	7.	D	13.	A
2.	B	8.	A	14.	A
3.	D	9.	A	15.	C
4.	A	10.	B	16.	E
5.	D	11.	B	17.	D
6.	B	12.	B	18.	A

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2009) Problem-solving test: Real-time polymerase chain reaction. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* 37, 250-251.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

CÉLZOTT GÉNKIIRTÁS

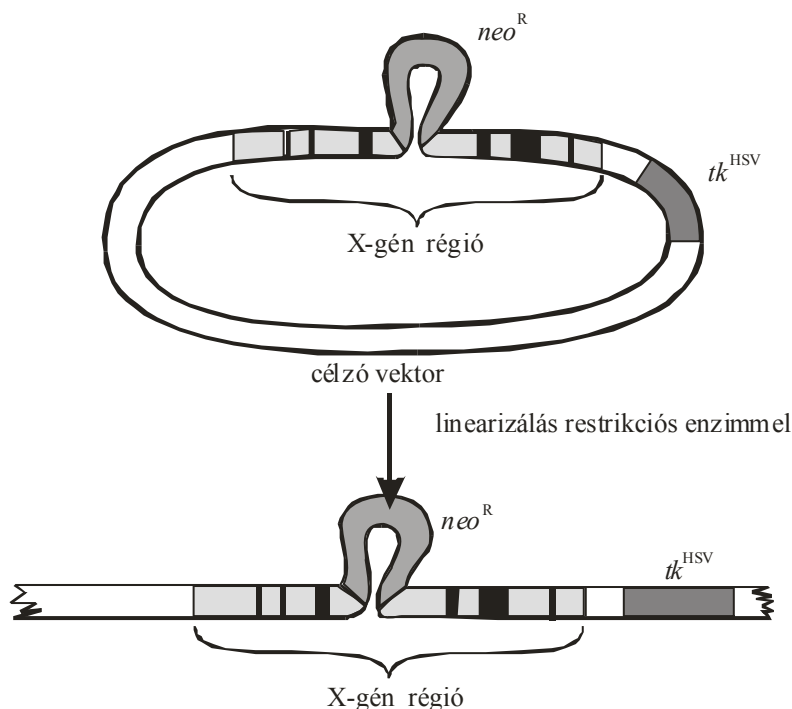
Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*mutáció * vector * plasmid * replikációs origo * promoter * intronok/exonok * open reading frame * transzfekció * cirkuláris és lineáris DNS * DNS integráció * homológ rekombináció * DNS-replikáció * génexpresszió * heterozigóta * homozigóta*

A kísérlet

A gének biológiai szerepének vizsgálatára mutációval történő inaktivációjuk a legalkalmasabb módszer. Ezt a módszert régóta használták vírusok, baktériumok, élesztősejtek, ecetmuslica esetében, magasabbrendű szervezetekben azonban sokáig reménytelennek látszott. Specifikus gének célzott inaktivációja („kiütése”, K. O. mutációja) egérben kétségkívül a modern biológia egyik legjelentősebb teljesítménye. Az alábbi teszt 2007 egyik Nobel-díjasa, Mario Capecchi K. O. mutációs eljárását [1] mutatja be, a tesztkérdések helyes megoldásával értelmezheti a módszer elvét.

Az eljárás során a megcélzott gén (nevezzük X-génnek) egy részét úgynevezett K. O. vektorba, (célzó vektorba) építik be (1. ábra). A vektor plazmid, mely nem tartalmaz emlős replikációs origót, de két szelektálható markert hordoz. A neo^R -gént, mely a sejteket rezisztenssé teszi az erősen toxikus fehérjeszintézis-gátló Geneticinnel szemben, az X-génszakasz egyik fehérjekódoló exonjába építik be. A neo^R -gént erős emlős promoterrel látják el.



1. ábra: A cirkuláris (fent) és linearizált (lent) célzó vektor szerkezete (fekete régiók: az X-gén exonjai; világosszürke régiók: az X-gén intronjai).

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

1. ____ Mi lehet a következménye a neo^R -gén beépítésének az X-gén exonjába?

A: Serkenti a célzó-vektor replikációját emlős sejtekben

B: Serkenti az X-fehérje termelését

C: Megszakítja az X-mRNS kódoló régióját

D: A és B

E: A és C

2. ____ Mi a jelentősége annak, hogy a neo^R -génhez emlős promotert kapcsoltak?

A: Hogy a neo^R -gén expresszáldjon a célzott génkiírtáshoz használandó sejtekben

B: Hogy gátolják az X-gén expresszióját

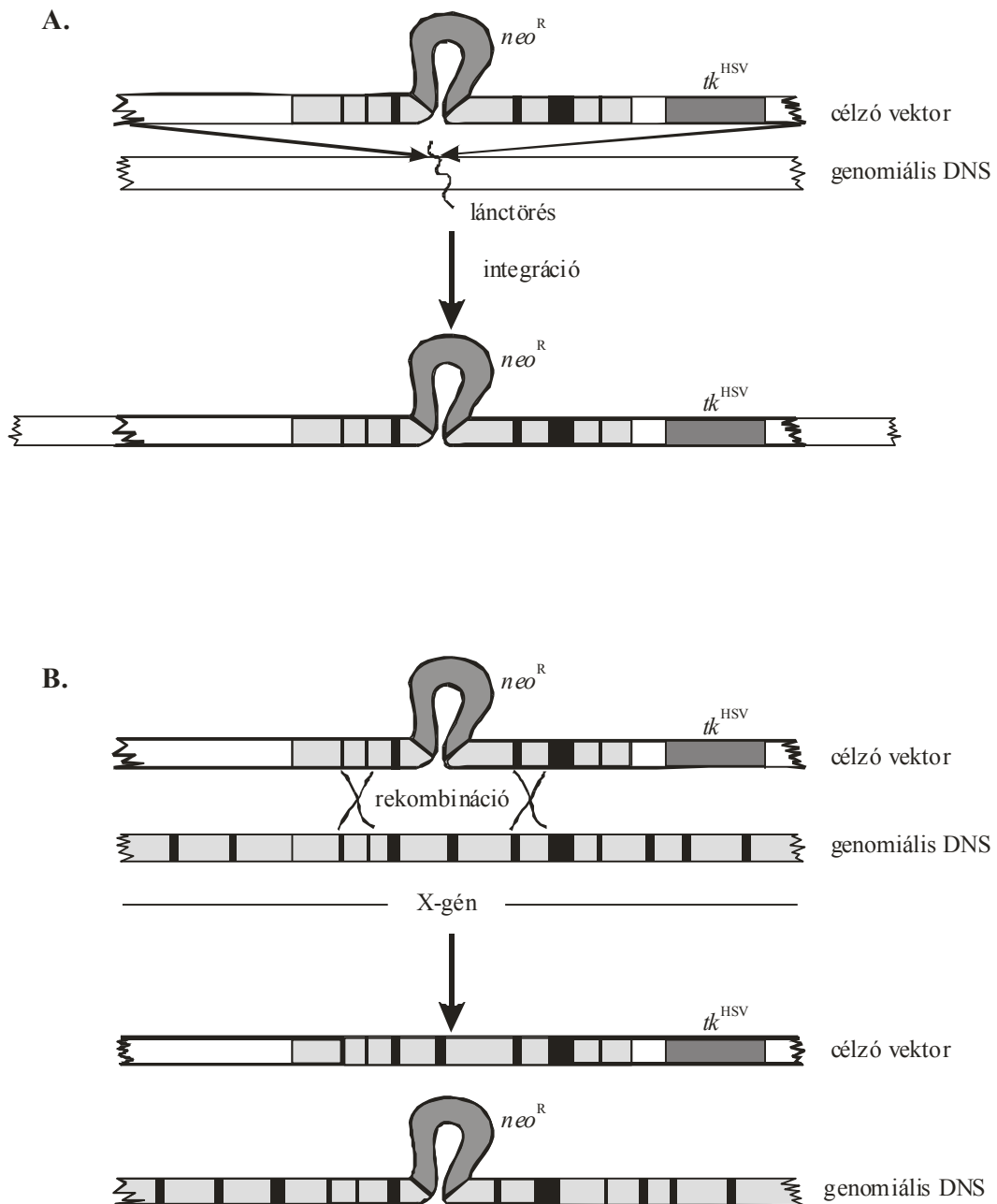
C: Hogy serkentsék az X-gén expresszióját

D: A és B

E: A és C

A célzóvektor másik szelekciós markere a tk^{HSV} -gén, a herpes simplex vírus timidin-kináz génje, amely emlős sejtekben expresszáldva sejtpusztulást okoz, ha a sejteket a Ganciklovir nevű antivirális szerrel kezelik.

Egér sejtenyésztési sejteket a célzóvektor nagyszámú linearizált kópiájával kezelik olyan körülmények között, amelyek elősegítik a DNS bejutását a sejtbe. (Az alább leírt kapcsolatok az idegen DNS és a sejt genomja között hatékonyabban létrejönnek lineáris, mint cirkuláris DNS-sel.) Sok sejt nem vesz fel DNS-t vagy ha igen, az idegen nukleinsav gyorsan lebomlik bennük. Néhány sejtben azonban a célzóplazmid kölcsönhatásba kerül a genommal. Kétféle genetikai folyamat játszódhat le (2. ábra). Az esetek többségében a lineáris DNS véletlenszerűen integrálódik a genom kettősláncú töréshelyeibe (2A. ábra). Sokkal ritkábban, a K.O. vektor X-génjének szakaszai megtalálják a hasonló szekvenciájú régiókat a genomban, fizikai kapcsolatba kerülnek velük és homológ rekombináció megy végbe köztük (2B. ábra). Ha a homológ rekombináció a neo^R -gén mindkét oldalán bekövetkezik, ez a régió átkerül a genomiális X-génbe, miközben a megfelelő normális szekvenciák a plazmid részévé válnak. A célzott génkiírtás kulcs lépése ennek a két genetikai jelenségnek integráció vagy homológ rekombináció a megkülönböztetése.



2. ábra: A célzóvektor véletlenszerű integrálódása (A) és homológ rekombináció a K. O. vektor és az X-gén között (B).

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ (A, B, C vagy D) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: Sejtek véletlenszerű integrációval (mint a 2A. ábrán)
- B: Sejtek homológ rekombinációval (mint a 2B. ábrán)
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

3.____ A sejtciklus S-fázisa során replikálják a neo^R -gént.

4.____ Kifejezik a neo^R -gént.

5.____ Gyorsan lebontják és elvesztik a tk^{HSV} -gént.

6.____ Csak átmenetileg, rövid ideig expresszálják a tk^{HSV} -gént.

7.____ Az X-gén működése gátlódik ezekben a sejtekben.

- A: Geneticin-kezelés
- B: Ganciklovir-kezelés
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

8.____ Elpusztítja azokat a sejteket, amelyek a transzfecció során nem vettek fel idegen DNS-t.

9.____ Elpusztítja azokat a sejteket, amelyekben az idegen DNS degradálódik a citoplazmában.

10.____ Elpusztítja azokat a sejteket, amelyekben a célzóvektor véletlenszerűen integrálódott a genomba (mint a 2A. ábrán).

11.____ Elpusztítja azokat a sejteket, amelyekben homológ rekombináció történt a célzóvektor és a genomiális X-gén között (mint a 2B. ábrán).

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

12.____ Mi jellemző a Geneticin-Ganciklovir kettős szelekciót túlélő sejtekre?

- A: Csak integrált formában tartalmazzák a célzóvektort
- B: Mind véletlenszerű integrációval, mind homológ rekombinációval a genomba került plazmid szekvenciákat tartalmaznak
- C: Heterozigóták az inaktivált X-génre ($X^{+/-}$)
- D: Homozigóták az inaktivált X-génre ($X^{-/-}$)
- E: B és D

Helyes válaszok

- | | | | |
|----|---|-----|---|
| 1. | C | 7. | B |
| 2. | A | 8. | A |
| 3. | C | 9. | A |
| 4. | C | 10. | B |
| 5. | B | 11. | D |
| 6. | B | 12. | C |

IRODALOM

- [1] S. L. Mansour, K. R. Thomas, M. R. Capecchi (19889) Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 248-352.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2008) Problem-solving test: Targeted gene disruption. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* 36, 299-301.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

BISZULFIT KEZELÉS HATÁSA A GENOMIÁLIS DNS-RE

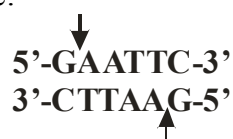
Nézzé át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*polimeráz láncreakció (PCR) * primer * promotor * restrikciós endonukleázok * agaróz gél elektroforézis * etídiumbromid festés * DNS-metiláció * Taq polimeráz * egyedi nukleotid polimorfizmus (SNP) * CpG-szigetek * tumor szuppresszor gének * protoonkogének * epigenetikai szabályozás*

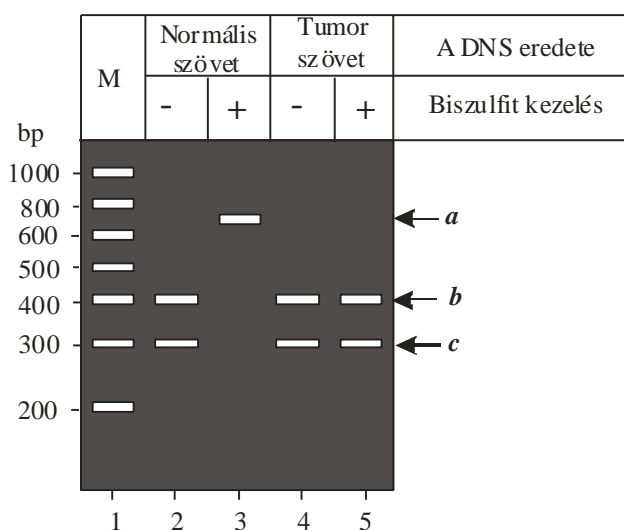
A kísérlet

A tesztben leírt módszert egy fontos, szabályozó jellegű DNS-módosulás kimutatására dolgozták ki. Ebben a kísérletben normális szövetből (2. és 3. minta az 1. ábrán) és tumorból (4. és 5. minta) származó genomiális DNS-minták oldatát két egyenlő részre osztották: a 3. és 5. mintát (ld. 1. ábra) **biszulfittal** kezelték (ez a metilálatlan citozint uracillá alakítja át, míg a metilált citozinok változatlanok maradnak), a 2. és 4. minta kezeletlen kontrollként szolgált. A mintákkal **polimeráz láncreakciót** hajtottak végre, olyan primer-párral, mely egy gén promoterrégiójára volt specifikus. A PCR termékeket *EcoRI* restrikciós endonukleázzal emésztették, a mintákat agaróz gélelektroforézissel frakcionálták, majd etídium bromiddal festették (1. ábra).

(Az *EcoRI* felismerőhelye:



A nyilak a hasítási helyeket mutatják.)



1. ábra: A DNS-minták agaróz gélelektroforézise (részletek a szövegben; M, méretmarker; bp, bázispár).

Tanulmányozza az ábrát és oldja meg a következő tesztfeladatokat!

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: **a** csík
 B: **b** csík
 C: mindkettő
 D: egyik sem

- | | | | |
|--------|--|------------------------------|-------------|
| 1.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek egy ép tartalmazznak. | 5'–GAATTC–3' | szekvenciát |
| 2.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek több szekvenciát tartalmazznak. | 5'–GAATTC–3'
3'–CTTAAG–5' | ép |
| 3.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek egy szekvenciát tartalmazznak. | 5'–GAATTT–3'
3'–CTTAAA–5' | ép |
| 4.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek egy szekvenciát tartalmazznak. | 5'–AAATTT–3'
3'–TTTAAA–5' | ép |
| 5.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek mindkét vége tompa vég. | | |
| 6.____ | Olyan fragmentumok alkotják, melyek egyik vége tompa, a másik pedig ragadós. | | |
| 7.____ | Olyan DNS fragmentumok alkotják, melyek mindkét vége ragadós vég. | | |

Kísérletelemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

- A:** **alátámasztja** az állítást
B: **ellentmond** az állításnak
C: **se nem támasztja alá, se nem mond ellent** az állításnak)

- 8.____ Az eredeti normális DNS molekulában az *Eco*RI felismerőhely mindkét lánc metilált volt.
- 9.____ Az eredeti tumor-DNS molekulában az *Eco*RI felismerőhely mindkét lánc metilált volt.
- 10.____ Az uracil-tartalmú DNS-láncok templátul szolgálnak a *Taq* polimeráz számára.
- 11.____ A *Taq* polimeráznak DNS metiltranszferáz aktivitása is van.
- 12.____ A templát-DNS-ek biszulfid kezeléssel gátolta a polimeráz láncreakciót.
- 13.____ A kísérletben vizsgált *Eco*RI felismerőhelyhez mindkét oldalon C≡G bázispár csatlakozik.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

14. _____ Mi lehet a leírt módszer orvosbiológiai jelentősége?

- A: Egyedi nukleotid-polimorfizmusok (SNP-k) kimutatása a genomiális DNS-ben
- B: A promoter-régiók CpG-szigetein bekövetkező kémiai módosulás vizsgálata
- C: A nukleoszomális hisztonok módosulásainak kimutatása
- D: B és C
- E: A, B és C

Helyes válaszok

- | | |
|------|-------|
| 1. D | 8. B |
| 2. D | 9. A |
| 3. A | 10. A |
| 4. D | 11. C |
| 5. A | 12. B |
| 6. B | 13. A |
| 7. D | 14. B |

Ez a teszt fiktív kísérletet ír le, amely a Zymo Research Catalog (2006/2007) 42. oldalán levő ábráján alapul.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2008) Problem-solving test: The effect of in vitro bisulfite treatment on genomic DNA. Biochem.Mol.Biol.Educ. 36, 66-67, 2008.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

A SEJTCIKLUS VIZSGÁLATA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

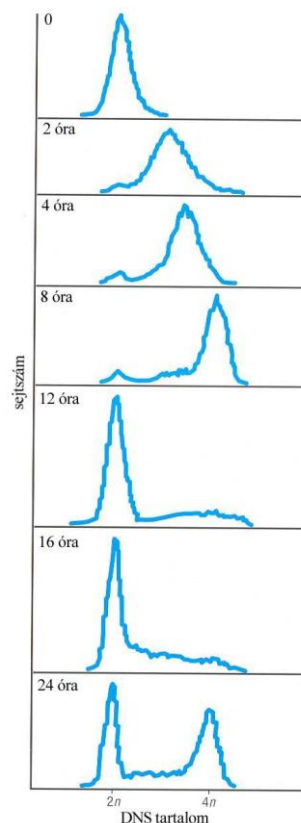
Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

sejtciklus * áramlási citometria * sejtenyésztés * fluoreszcens DNS-festék * diploid és tetraploid sejtek * mitózis * a sejtciklus fázisai * növekedési faktorok * mikrotubulusok * apoptózis * DNS-szintézis * proteaszóma * [³H]timidin * impulzus-jelölés * hisztonok * fehérje-foszforiláció * M-fázis promóciós faktor (MPF) * ciklinek * ciklin-dependens kinázok * szinkronizált sejtenyésztés

A kísérlet

Humán daganatsejt kultúrákat olyan szerrel kezeltek, mely a sejtciklus meghatározott szakaszában hat. A kezelést követően a szert kimosták a tenyészetekből (ez felel meg a 0 órának) és a sejteket a szaporodásukhoz optimális körülmények között tartották. Az ábrán megjelölt időpontokban azonos számú sejtből álló tenyészeteket fluoreszcens DNS-festékkel festettek, majd áramlási citometriás vizsgálatot végeztek. Az ábra mutatja az áramlási citometriás görbéket.

Ismételje át a sejtciklusra vonatkozó ismereteit, tanulmányozza az ábrát és oldja meg az alábbi tesztfeladatokat!



1. ábra: Emberi daganatsejt tenyészetek áramlási citometriás vizsgálata (a kísérleti részletek a szövegben)

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

1. ____ Az alábbi kezelések közül melyik idézheti elő a 0 órának megfelelő helyzetet?
 - A. Növekedési faktor kezelés
 - B. A mikrotubulus-működést gátló kezelés
 - C. Kezelés apoptózist indukáló szerrel
 - D. Kezelés DNS-szintézist gátló szerrel
 - E. Kezelés proteaszóma-gátlóval

2. ____ Melyik kultúra jelölődne a legerősebben rövid [³H]timidin kezelés után?
 - A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. A 24-órás tenyészet

3. ____ Melyik tenyészet sejtjei tartalmazzak a legnagyobb mennyiségű hisztont?
 - A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. Nincs különbség a sejtek között

4. ____ Melyik tenyészet sejtjei tartalmazzak a legnagyobb mértékben foszforilált H1 hisztont?
 - A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. Nincs különbség a sejtek között

5. ____ Melyik tenyészet sejtjeiben legmagasabb az MPF aktivitás?
 - A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. A 24-órás tenyészet

- 6.____ Melyik tenyészet sejtjei tartalmaznak a legkisebb mennyiségű ciklin B-t?
- A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. A 24-órás tenyészet
- 7.____ Milyen időpontban osztódtak a sejtek?
- A. 0 óránál
 - B. 4 és 8 óra között
 - C. 8 és 12 óra között
 - D. 24 óránál
 - E. Nem volt sejtosztódás a kísérlet időtartama alatt
- 8.____ Melyik kultúra a legkevésbé szinkronizált?
- A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 2-órás tenyészet
 - C. A 8-órás tenyészet
 - D. A 12-órás tenyészet
 - E. A 24-órás tenyészet
- 9.____ Melyik tenyészet sejtjei tartalmaznak Cdk1 enzimet (az MPF katalitikus alegysége) a legnagyobb mennyiségben?
- A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 8-órás tenyészet
 - C. A 12-órás tenyészet
 - D. A 24-órás tenyészet
 - E. Nagyjából azonos mennyiségű Cdk1-et tartalmaznak
- 10.____ Melyik tenyészet sejtjeiben a legmagasabb a Cdk1 enzimaktivitás?
- A. A 0-órás tenyészet
 - B. A 8-órás tenyészet
 - C. A 12-órás tenyészet
 - D. A 24-órás tenyészet
 - E. Nagyjából azonos mennyiségű Cdk1 aktivitás jellemzi őket

Helyes válaszok

- | | | | |
|----|---|-----|---|
| 1. | D | 6. | D |
| 2. | B | 7. | C |
| 3. | C | 8. | E |
| 4. | C | 9. | E |
| 5. | C | 10. | B |

Ez a teszt David O. Morgan: *The Cell Cycle. Principles of Control.* (Oxford University Press, New Science Ltd., London, UK, 2007) című könyvének 2-18. ábrája alapján készült.

Ezt a tesztet közölte a *Biochemistry and Molecular Biology Education*, itt az *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2007) Problem-solving test: Analysis of the cell cycle by flow cytometry. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* 35, 153-154.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

α 1-ANTITRIPSZIN HIÁNY: EGY PÉLDA A FEHÉRJE-KONFORMÁCIÓ BETEGSÉGEIRE

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*fehérje-konformáció * fehérje-felcsavarodás * proteázok * fehérjeszintézis * fehérje-glikoziláció * glikoproteinek * N-kötésű/O-kötésű oligoszacharidok * endoplazmatikus retikulum * Golgi-apparátus * szekréción út * mikroszómák * impulzus jelölés/izotóp hígítás * SDS-poliakrilamid gélelektroforézis * immunoprecipitáció * chaperone fehérjék * fehérje-transzlokáció*

A kísérlet

Az α 1-antitripszin (α 1-AT) májsejtek által szintetizált és szekretált, az emberi vérplazmában nagy mennyiségben jelen levő **proteáz gátló**. Glikoprotein, mely 3 N-kötésű oligoszacharid láncot tartalmaz. Egyetlen aminosav cseréje (Glu 342→Lys) az autoszomális recesszív öröklődésű **α 1-antitripszin-deficienciát** okozza, melyben a vérplazma α 1-AT szintje 90%-kal csökken. Ennek fő következménye a tüdőknben az elasztáz enzim aktivitásának növekedése, mely a tüdőszövetet roncsoló familiáris emphysema (tüdőtagulást) okoz.

Az alábbi teszt az α 1-AT-deficiencia molekuláris mechanizmusának tisztázását szolgáló kísérletsorozatot ír le. Tanulmányozza a kísérletek leírását, az ábrákon bemutatott eredményeket és oldja meg a tesztfeladatokat! Mindenekelőtt a következő tesztkérdést válaszolja meg!

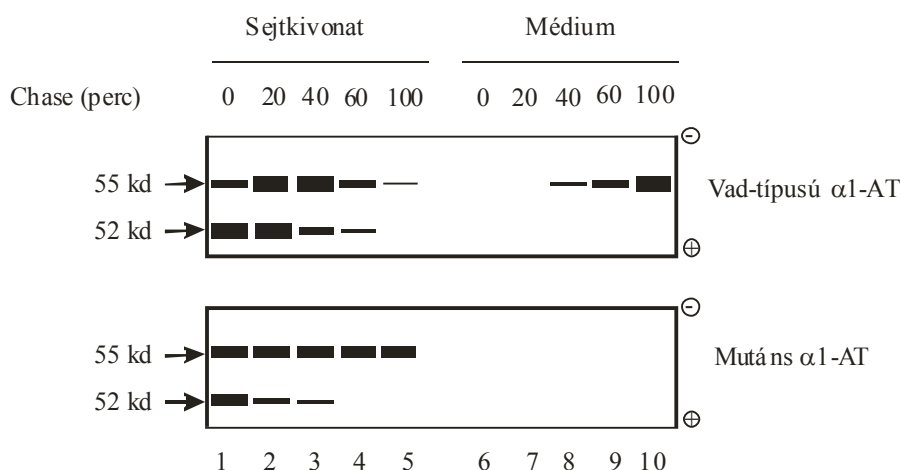
Relációanalízis

(E kérdéstípusban állítások és indoklások szerepelnek. Ezek megítélésében öt lehetőség adódik:

- A: az állítás és az indoklás is igaz és az indoklás helyesen világítja meg az állítást**
- B: mindkettő igaz, de az indoklás nem világítja meg helyesen az állítást**
- C: az állítás igaz, de az indoklás nem**
- D: az állítás nem igaz, de az indoklás önmagában helyes**
- E: az állítás is és az indoklás is helytelen)**

1. ____ A mutáció befolyásolhatja az α 1-AT fehérje konformációját, **MERT** ez az aminosav-csere megváltoztatja a fehérje felszínén a töltésviszonyokat.

Az 1. ábra egy kísérlet eredményét mutatja, melyben normális (vad-típusú) vagy mutáns α 1-AT-t expresszáló sejteket pulse/chase/immunoprecipitációs kísérletben hasonlítottak össze [³⁵S] metionin jelölést alkalmazva (részletek az ábraszövegben).



1. ábra: Humán sejtenyészetek által termelt vad-típusú és mutáns α_1 -antitripszin sorsának vizsgálata. A normális (felső ábrarész) és mutáns (alsó ábrarész) fehérjét expresszáló sejtenyészeteket 10 percig [35 S] metioninnal jelölték, majd az ábrán jelölt ideig izotóphigítást (chase) végeztek. Sejtkivonatokat (1-5. minta), illetve ugyanakkora sejszámnak megfelelő tápoldat mintákat (6-10. minta) α_1 -AT elleni antitesttel immunoprecipitáltak. Az immunoprecipitátumokat SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) frakcionálták, majd autoradiográfiát végeztek. (Az elektródok helyzetét a – és + jel mutatja.)

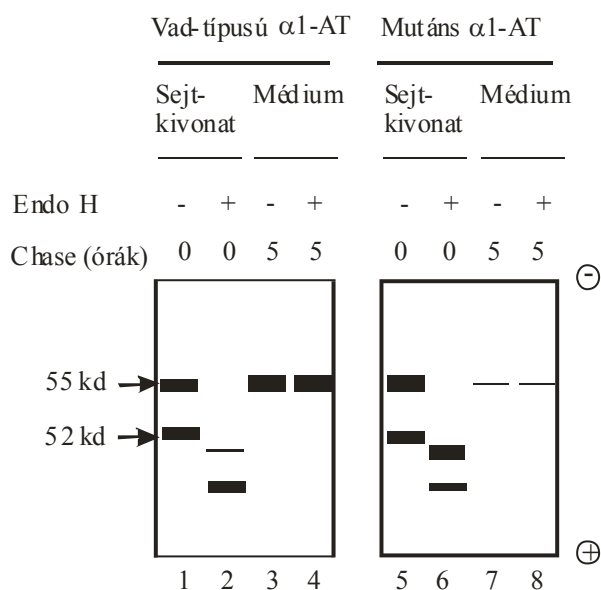
Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

2. _____ Az α_1 -AT mely tulajdonsága vizsgálható ezzel a kísérlettel?

- A: Pontos mennyisége a sejtben
- B: Szintézisének és lebomlásának mértéke
- C: Szekréciójának mértéke
- D: B és C
- E: A, B és C

A 2. ábra kísérletében az α_1 -AT-hez kapcsolódó oligoszaccharid tulajdonságait vizsgálták. **Endoglukozidáz H** (endo H) kezelést alkalmaztak: ez az enzim lehasítja az endoplazmatikus retikulumban készült N-kötésű oligoszaccharidokat (ld. a 4A. ábrát), de nem hasítja az O-kötésű vagy a Golgi-apparátusban átalakított N-kötésű oligoszaccharidokat (részletek a 2. ábra szövegében).



2. ábra: Az endoglukozidáz H hatása a vad-típusú és mutáns α_1 -antitripszinre. A normális (1-4. minta) vagy mutáns (5-8. minta) α_1 -AT fehérjét expresszáló sejtenyészeteken az 1. ábrán leírt módon pulse/chase-jelölést alkalmaztak. Sejt-kivonatokat és tápoldatmintákat endo H nélkül (-) vagy jelenlétében (+) inkubáltak, majd anti- α_1 -AT antitesttel immunoprecipitációt, SDS-PAGE-t és autoradiográfiát végeztek.

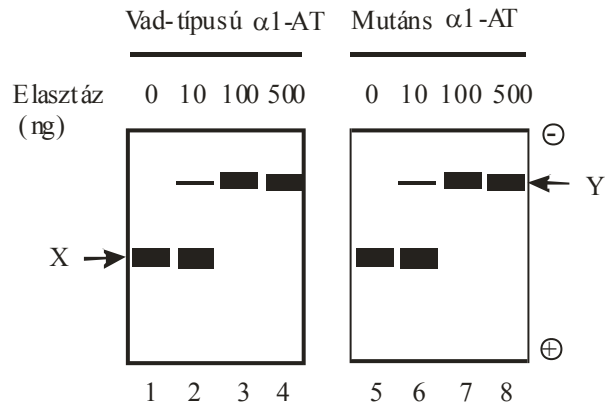
Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: Az 52 kilodalton csík
- B: Az 55 kilodalton csík
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

3. _____ Az α_1 -AT szabad oligoszaccharid lánccainak felel meg.
4. _____ Glikozilált α_1 -AT-t tartalmaz.
5. _____ Az ennek a csíknak megfelelő molekulák a transzláció befejezését követően 10 percen belül eléri a Golgi-apparátust.
6. _____ Az ennek a csíknak megfelelő molekulák szekretálódnak.

A 3. ábra egy, a vad-típusú és mutáns α_1 -AT-t összehasonlító funkcionális teszt eredményeit mutatja.



3. ábra: A normális és mutáns α_1 -antitripszin funkcionális aktivitása. Radioaktívan jelölt vad-típusú (1-4. minta) és mutáns (5-8. minta) α_1 -AT-t növekvő mennyiségű nem-radioaktív elasztáz enzimmel inkubáltak, majd az elegyekkel SDS-PAGE-t és autoradiográfiát végeztek.

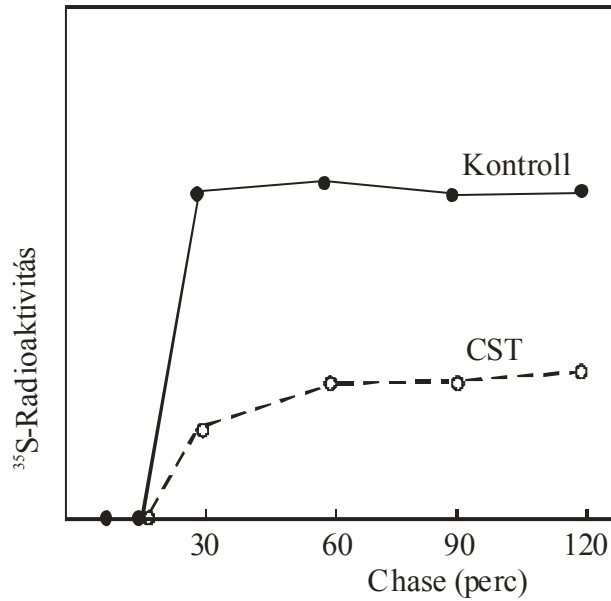
Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

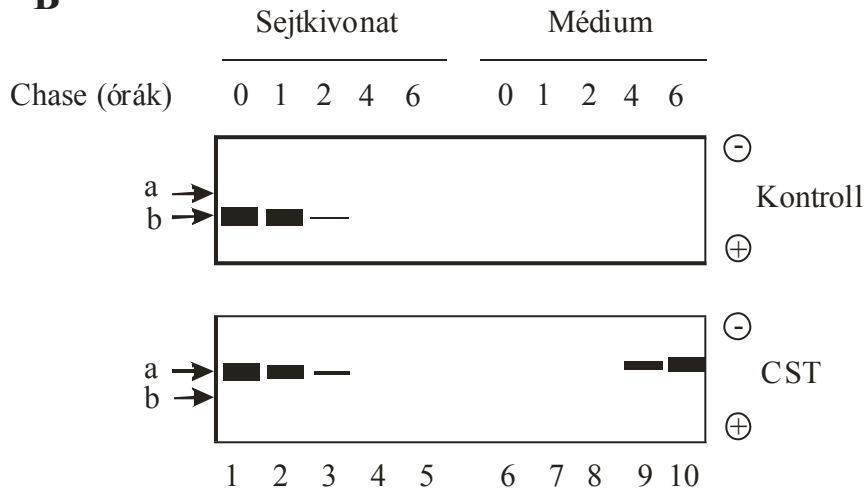
7. _____ Mi a legvalószínűbb magyarázat az α_1 -AT fehérje elektroforetikus mobilitásának változására (X csík \rightarrow Y csík) ebben a kísérletben?

- A: Az elasztáz elhasította az α_1 -AT-t
- B: Az elasztáz az α_1 -AT teljes lebomlását okozta
- C: Az elasztáz stabil komplexet alkotott az α_1 -AT-vel
- D: Az elasztáz eltávolította az oligoszaccharidot az α_1 -AT-ről
- E: Az α_1 -AT az elasztáz molekulák aggregációját okozta

A

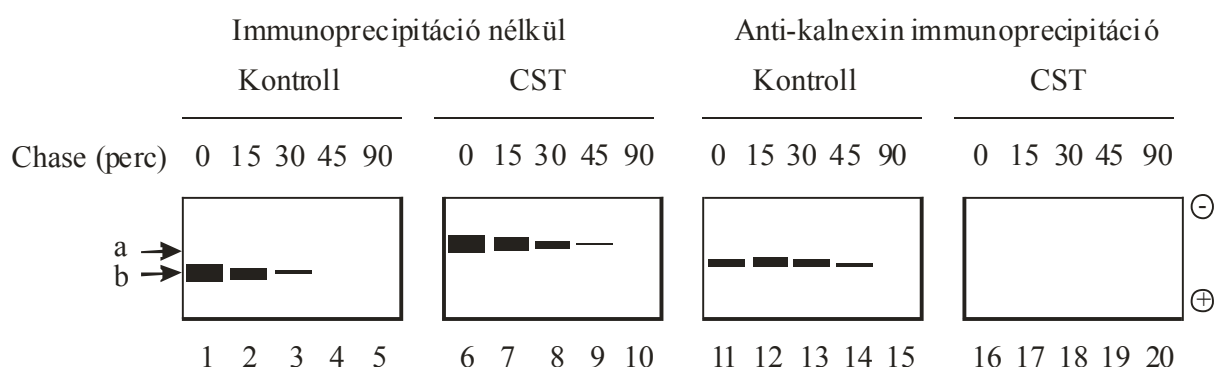


B



5. ábra: *A castanospermine* hatása a vad-típusú (A) és mutáns (B) α_1 -antitripszin metabolizmusára. Sejteken pulse/chase jelölést végeztek [^{35}S] metioninnal CST jelenlétében vagy anélkül. Az α_1 -AT-t a sejtkivonatokban (B, 1-5. minta) vagy a tápoldatokban (A; B, 6-10. minta) vizsgálták az 1. ábránál leírt módon. (Az A és B ábra két külön kísérletből származik, melyeket eltérő körülmények között végeztek. Az a és b csík a 4B. ábra csíkjainak felel meg.)

A 6. ábra *in vitro* mikroszomális transzlokációs kísérlet eredményét mutatja, melyet az endoplazmatikus retikulum chaperone **kalnexin** szerepének a tisztázására végeztek (részletek az ábraszövegben).



6. ábra: *Castanospermine* hatása a mutáns α_1 -antitripszin sorsára egy sejtmentes mikroszomális transzlokációs rendszerben. Sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszerekben pulse/chase jelölést végeztek. A rendszerek mutáns α_1 -AT mRNS-t, [35 S] metionint, mikroszómákat és a transzlációhoz szükséges minden anyagot tartalmaztak, CST nélkül vagy annak jelenlétében. Inkubálás után a mikroszómákat lecentrifugálták és közvetlenül (1-10. minta) vagy anti-kalnexin antitesttel végzett immunoprecipitáció után (11-20. minta) SDS-PAGE-t végeztek. Az ábra a gél autoradiográfiás képét mutatja.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

9. _____ A kalnexin milyen tulajdonságát vizsgálták a kísérletben?

- A: Hatását az α_1 -AT fehérje szintézisére
- B: Hatását az α_1 -AT fehérje glikozilációjára
- C: Hatását az α_1 -AT fehérje transzlokációjára az endoplazmatikus retikulum membránon keresztül
- D: Kötődését az α_1 -AT fehérjéhez
- E: Mind a négyet

Összesítse a kísérletekből levonható eredményeket az alábbi tesztfeladatok megoldásával!

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: Vad-típusú α_1 -AT fehérje
- B: Mutáns α_1 -AT fehérje
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

- 10.____ Génje átíródik a kísérletben vizsgált sejtekben.
- 11.____ mRNS-e transzlálódik a kísérletben vizsgált sejtekben.
- 12.____ Képes az endoplazmatikus retikulumba transzlokálódni.
- 13.____ Glikozilációja az endoplazmatikus retikulumban kezdődik.
- 14.____ Nagyrészt „leragad” az endoplazmatikus retikulumban.
- 15.____ A glukozydáz I szubsztrátuma.
- 16.____ Hozzá tud kapcsolódni a célfehérjéhez.

Kísérletanalízis

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

- A: alátámasztja** az állítást
- B: ellentmond** az állításnak
- C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent** az állításnak)

- 17.____ A castanospermine gátolja a mutáns α_1 -AT fehérje transzlokációját az endoplazmatikus retikulum membránján keresztül.
- 18.____ Az N-kötésű oligoszaccharid disztális glukóz molekulája szükséges az α_1 -AT fehérje szekretálásához.
- 19.____ A sejtmentes mikroszomális rendszerben glikozilálódott az α_1 -AT fehérje.
- 20.____ A glukozydáz I jelen van a mikroszómákban.
- 21.____ A kalnexin szelektíven kötődik a hasítatlan oligoszaccharid prekuzort tartalmazó mutáns α_1 -AT fehérjéhez.
- 22.____ A CST serkenti a mutáns α_1 -AT fehérje felszabadulását a kalnexin-kötésből.
- 23.____ A CST serkenti a mutáns α_1 -AT fehérje szekrécióját.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

24. _____ A kísérletek alapján mit várna α_1 -AT-deficienciában szenvedő betegek CST kezelésétől?

- A: Vérplazmájukban nőne az α_1 -AT szint
- B: Tüdőtüneteik javulnának
- C: A mutáns α_1 -AT eltűnne a vérükből
- D: A és B
- E: B és C

Helyes válaszok

1.	A	7.	C	13.	C	19.	A
2.	D	8.	E	14.	B	20.	A
3.	D	9.	D	15.	C	21.	B
4.	C	10.	C	16.	C	22.	A
5.	D	11.	C	17.	B	23.	A
6.	A	12.	C	18.	B	24.	D

Irodalom

- [1] V.W. Sasak, J.M. Ordovas, A.D. Elbein, R.W. Berninger (1985) Castanospermine inhibits glucosidase I and glycoprotein secretion in human hepatoma cells. *Biochem. J.* **232**, 759-766.
- [2] J.A.J. Burrows, L.K. Willis, D.H. Perlmutter (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant α_1 -antitrypsin (α_1 -AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in α_1 -AT deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1796-1801.
- [3] N.Y. Marcus, D.H. Perlmutter (2000) Glucosidase and mannosidase inhibitors mediate increased secretion of mutant α_1 -antitrypsin Z. *J. Biol. Chem.* **275**, 1987-1992.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2007) Problem-solving test: α_1 -Antitrypsin deficiency: An example for a protein folding disease. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* 35, 300-304.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

VEKTORIÁLIS TRANSZPORT VÉKONYBÉL HÁMSEJTEKBEN

Nézzé át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*polarizált sejtek * vektoriális transzport * apikális és bazolaterális membrán * tight junction * okkludin * transzmembrán fehérjék * passzív és aktív transzport * glukóz transzporter * Na⁺/glukóz szimporter * Na⁺/K⁺ ATPáz * uniporter * antiporter * facilitált diffúzió*

A kísérlet

A vékonybél fő funkciója kis molekulák (pl. cukrok, aminosavak, nukleozidok) felszívása a vékonybél lumenéből és továbbításuk a kapillárisokba. Ennek az egyirányú, vektoriális transzportnak az alapját a sejthártya polarizált természete alkotja: a sejtmembrán apikális és bazolaterális régiója különböző transzport fehérjéket tartalmaz. Az első tesztkérdések a fentiekkel kapcsolatosak, majd a feladat második felében, egy elképzelt kísérletre vonatkozó kérdéseket kell megoldania.

Többszörös választás

(E kérdéstípusban egy befejezetlen állításhoz vagy kérdéshez egy vagy több megfelelő válasz tartozik.

Jelölések: **A: 1., 2., 3. megfelelő**
B: 1. és 3. megfelelő
C: 2. és 4. megfelelő
D: csak a 4. megfelelő
E: mind a négy megfelelő)

1. ___ A vékonybél hámsejtjeit tight junction-ok tartják össze. Mi jellemző ezekre a képletekre?

1. Megakadályozzák az apikális és bazolaterális membrán-régiók alkotórészeinek keveredését
2. Fő alkotórészeik az okkludin fehérjék
3. Elválasztják a bél lumenét a sejtek közötti tértől
4. Ezek a fő kommunikáló kapcsolatok a sejtek között

A szőlőcukor vektoriális transzportjában szerepet játszó legfontosabb membránfehérjék: a glukóz transzporter, a Na⁺/glukóz szimporter és a Na⁺/K⁺ ATPáz. Mit tud ezekről?

Ötféle asszociáció

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt fogalom speciális jellemzőit kell megállapítani. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: Glukóz transzporter
- B: Na⁺/glukóz szimporter
- C: Na⁺/K⁺ ATPáz
- D: A és C
- E: Mind a három fehérje

2. ____ Transzmembrán fehérje.
3. ____ Facilitált diffúziót folytat.
4. ____ Egyetlen funkciója az aktív transzport.
5. ____ Passzív és aktív transzportot is folytat.
6. ____ Antiporter.
7. ____ Az apikális membránrégióban található.
8. ____ A bazolaterális membránrégióban található.
9. ____ Uniporter.

Egy bakteriális toxinnal kapcsolatos az alábbi kísérlet. A toxin roncsolja a vékonybélsejtek közötti tight junction kapcsolatokat. Kezeletlen, kontroll patkányokat és a baktériumokkal fertőzött állatokat használtak. Milyen különbségek várhatók a két állatesoport között?

Relációanalízis

(E kérdéstípusban állítások és indoklások szerepelnek. Ezek megítélésében öt lehetőség adódik:

- A: az állítás és az indoklás is igaz és az indoklás helyesen világítja meg az állítást**
- B: mindkettő igaz, de az indoklás nem világítja meg helyesen az állítást**
- C: az állítás igaz, de az indoklás nem**
- D: az állítás nem igaz, de az indoklás önmagában helyes**
- E: az állítás is és az indoklás is helytelen)**

10. ____ A toxin csökkenti a glukóz koncentrációját a vékonybél hámsejtekben, MERT a fertőzött állatok vékonybél lumenében a normálnál kisebb a Na⁺ koncentráció.
11. ____ A fertőzött állatok vércukorszintje a normálnál magasabb, MERT a Na⁺K⁺ pumpa aktívabb a sejtjeinkben.

Mennyiségi összehasonlítás

(E kérdéstípusban két fogalmat /A és B/ mennyiségileg kell összehasonlítani.

Jelölések: **A: A nagyobb, mint B**
B: B nagyobb, mint A
C: mindkettő egyenlő, vagy megközelítően azonos)

12. ____ A. A Na^+ /glukóz szimporterek sűrűsége a fertőzött állatok vékonybélhámjának apikális membránjában
 B. A Na^+ /glukóz szimporterek sűrűsége a fertőzött állatok vékonybélhámjának bazolaterális membránjában
13. ____ A. A glukózfelvétel mértéke a kontroll állatok vékonybélhámjának apikális membránján keresztül
 B. A glukózfelvétel mértéke a fertőzött állatok vékonybélhámjának apikális membránján keresztül
14. ____ A. A glukózleadás mértéke a kontroll állatok vékonybélhámjának bazolaterális membránján keresztül
 B. A glukózleadás mértéke a fertőzött állatok vékonybélhámjának bazolaterális membránján keresztül
15. ____ A. A glukózleadás mértéke a kontroll állatok vékonybélhámjának apikális membránján keresztül
 B. A glukózleadás mértéke a fertőzött állatok vékonybélhámjának apikális membránján keresztül
16. ____ A. Az aktív Na^+/K^+ transzport mértéke a kontroll állatok vékonybélhámsejtjének apikális membránján keresztül
 B. Az aktív Na^+/K^+ transzport mértéke a fertőzött állatok vékonybélhámsejtjének apikális membránján keresztül

Helyes válaszok

- | | | |
|------|-------|-------|
| 1. A | 7. B | 13. A |
| 2. E | 8. D | 14. A |
| 3. A | 9. A | 15. B |
| 4. C | 10. C | 16. B |
| 5. B | 11. E | |
| 6. C | 12. C | |

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2006) Problem-solving test: Vectorial transport in intestinal epithelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 34, 449-451.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

AZ ERITROPOETIN-RECEPTOR EXPRESSZIÓS KLÓNOZÁSA

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*citokinek * citokin receptorok * cDNS-tár * cDNS-szintézis * poli(A)⁺ RNS * primer * templát * reverz transzkriptáz * restriktációs endonukleázok * kohezív végek * expressziós vektor * promoter * Shine-Dalgarno szekvencia * poli(A) szignál * DNS-helikáz * DNS-ligáz * topoizomerázok * [¹²⁵I]-jelölés * transzfekeció * SDS-PAGE * β-merkaptóetanol * autoradiográfia*

A kísérlet

Az **eritropoietin (EPO)** citokin, melyet bizonyos vesesejtek termelnek és a vörösvértestek termelését és differenciációját serkenti. Az alábbi teszt az egér **eritropoietin-receptor (EPO-R)** cDNS-ének klónozását és emberi sejtekben történő expresszióját tárgyalja [1].

Egér erythroleukaemia sejtek össz citoplazmatikus poli(A)⁺ RNS-ének felhasználásával expressziós cDNS-tárat hoztak létre. A tár preparálásának első lépése a cDNS-szintézis.

Többszörös választás

(E kérdéstípusban egy befejezetlen állításhoz vagy kérdéshez egy vagy több megfelelő válasz tartozik.

Jelölések: **A: 1., 2., 3. megfelelő**
B: 1. és 3. megfelelő
C: 2. és 4. megfelelő
D: csak a 4. megfelelő
E: mind a négy megfelelő)

1. ___ A poli(A)⁺ RNS-en kívül milyen anyagoknak kell még jelen lennie a reakcióelegyben, hogy az EPO-R cDNS-ét is tartalmazó cDNS-kollekció jöjjön létre?
5. Oligo(dT)
 6. Reverz transzkriptáz
 7. A 4 deoxiribonukleozid-trifoszfát
 8. RNS polimeráz II

A reakció során képződött cDNS-eket kettősláncúvá tették, az Xho restriktációs enzimre specifikus ragadós végeket kötöttek hozzájuk, majd egy emlős expressziós plazmid Xho-helyébe építették be.

2. ___ Milyen szekvenciáknak kell jelen lennie a plazmidban, hogy a beépített cDNS humán sejtekben expresszáldjon?

1. Az Xho hely elé beépített emlős promoter
2. Az Xho hely elé beépített Shine-Dalgarno szekvencia
3. Az Xho hely mögé beépített poli(A) szignál
4. Az Xho hely mögé beépített Shine-Dalgarno szekvencia

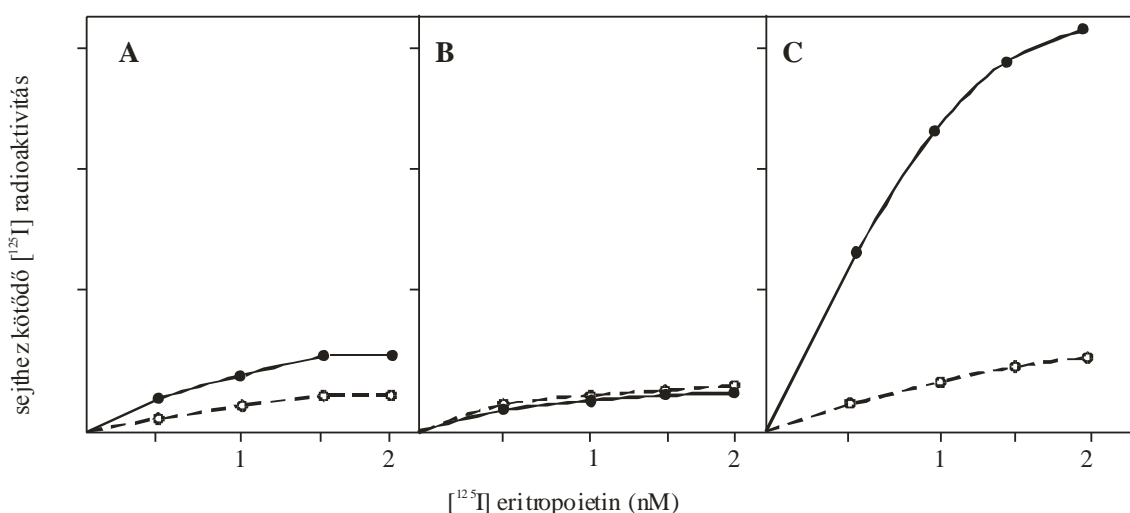
Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

3. ___ Milyen enzimet kell adni a kettősláncú cDNS és az Xho-hasított plazmid keverékéhez, hogy rekombináns plazmidok képződjenek?

- A: DNS helikáz
- B: DNS ligáz
- C: Topoizomeráz I
- D: B és C
- E: A, B és C

A rekombináns plazmidokat egy emberi sejtvonalba transzfektáltak és egy olyan klónt izoláltak, mely szövettenyészetben radioaktív EPO-t kötött. Az 1. ábra olyan kísérlet eredményét mutatja, melyben az eredeti egér sejtek (A), „üres” plazmiddal transzfektált humán sejtek (B), és a kísérlet során előállított humán sejtklón (C) [¹²⁵I] EPO kötését hasonlították össze. A [¹²⁵I] EPO sejthez kötődését (Y tengely) a jelölt hormon különböző koncentrációinál vizsgálták (X tengely), 100 nM jelöletlen („hideg”) EPO hiányában (●—●) vagy jelenlétében (○—○).



1. ábra: [¹²⁵I] eritropoietin kötődése egér erythroleukemia sejtekhez (A), ál-transzfektált humán sejtekhez (B), és a szövegben leírt módon izolált humán sejtklónban (C) (kísérleti részletek a szövegben).

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

4. ___ Mi volt a célja a „hideg” EPO alkalmazásának ebben a kísérletben?
- A: A [¹²⁵I] EPO specifikus kötődésének növelése
 B: A [¹²⁵I] EPO nem-specifikus kötődésének csökkentése
 C: A [¹²⁵I] EPO specifikus és nem-specifikus kötődésének elkülönítése
 D: Az EPO jelátvitel serkentése
 E: C és D
5. ___ Hogyan lehet meghatározni a [¹²⁵I] EPO specifikus kötődését? (Az 1. ábra jelölését használjuk a kérdésben.) A specifikus kötődés:
- A: a ● görbének megfelelő radioaktivitás
 B: a ○ görbének megfelelő radioaktivitás
 C: a ● és ○ értékek összegének megfelelő radioaktivitás
 D: a ● és ○ értékek különbségének megfelelő radioaktivitás
 E: a „hideg” EPO jelenlétében a tenyésztőfolyadékban mért radioaktivitás
6. ___ Mi határozható meg a [¹²⁵I] EPO kötődés mérésével?
- A: Az EPO-R sejtfelszíni lokalizációja
 B: Az EPO-R sűrűsége a sejtfelszínen
 C: Az EPO-R szintézisének mértéke
 D: A és B
 E: A, B és C

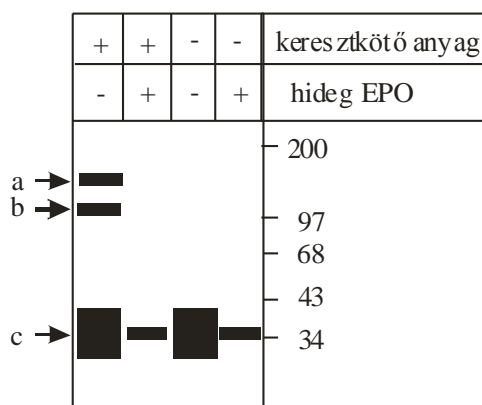
Mennyiségi összehasonlítás

(E kérdéstípusban két fogalmat /A és B/ mennyiségileg kell összehasonlítani.

Jelölések: **A: A nagyobb, mint B**
B: B nagyobb, mint A
C: mindkettő egyenlő, vagy megközelítően azonos)

7. ___ A: Specifikus EPO-kötődés az egér erythroleukaemia sejtekhez
 B: Nem-specifikus kötődés az egér erythroleukaemia sejtekhez
8. ___ A: Specifikus EPO-kötődés az ál-transzfektált humán sejtekhez
 B: Nem-specifikus EPO-kötődés az ál-transzfektált humán sejtekhez
9. ___ A: Az EPO-R sűrűsége az egér erythroleukaemia sejteken
 B: Az EPO-R sűrűsége az 1C. ábra transzfektált humán sejtjein

A kísérlet második részében az 1C. ábra sejteinek tenyészeit 1 nM [125 I] EPO-val inkubálták 100 nM „hideg” EPO jelenlétében (2. és 4. minta a 2. ábrán) vagy anélkül (1. és 3. minta). Inkubálás után a tenyésztőfolyadékot leöntötték és a sejteket EPO-t nem tartalmazó friss médiummal mosták. Ezután a sejteket a **keresztköteket létrehozó** diszuccinimidil szuberát jelenlétében (1. és 2. minta) vagy anélkül (3. és 4. minta) inkubálták. Sejtmembrán frakciókat izoláltak és β -merkaptóetanolt is tartalmazó SDS-poliakrilamid gélben elektroforézist, majd autoradiográfiát végeztek.



2. ábra: Radioaktívan jelölt eritropoietin keresztköteése humán sejtekben expresszált receptorához (a számok az ábra jobb oldalán molekulásúly értékek kilodaltonban; további részletek a szövegben).

Ábraanalízis

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

A: alátámasztja az állítást

B: ellentmond az állításnak

C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

10. ___ Az *a*, *b* és *c* csíkoknak megfelelő régiók mind tartalmaznak EPO-t.
11. ___ Az *a*, *b* és *c* csíkoknak megfelelő régiók mind tartalmaznak EPO-R-t.
12. ___ A legtöbb jelölt EPO molekula specifikus helyekhez kötődött a sejteken.
13. ___ A legtöbb jelölt EPO molekulát EPO-R-hez kapcsolta a keresztkötező anyag.
14. ___ A natív EPO-R molekulák több alegységből épülnek fel.
15. ___ Az *a* csík diszulfid-hidakkal egymáshoz kötött EPO-EPO-R komplexeknek felel meg.

Helyes megoldások

1.	A	6.	D	11.	B
2.	B	7.	C	12.	A
3.	B	8.	B	13.	B
4.	C	9.	B	14.	C
5.	D	10.	A	15.	B

Irodalom

- [1] A.D. D'Andrea, H.F. Lodish, G.G. Wong (1989) Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* **57**, 277-285.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2008) Tests for problem-based learning: Expression cloning of the erythropoietin receptor. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **36**, 236-238.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

AZ ÉLESZTŐ KÉT-HIBRID RENDSZER

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

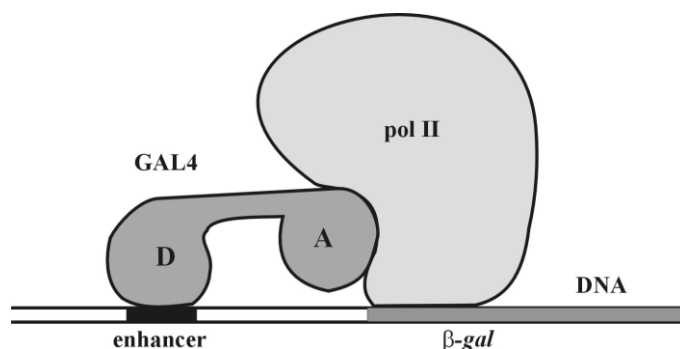
*transzkripciós faktorok * enhancer * promoter * RNS polimeráz * expressziós plazmid * terminátor * hisztidin * transzfekció * sejtenyészet * fúziós fehérje * RNS splicing*

A kísérlet

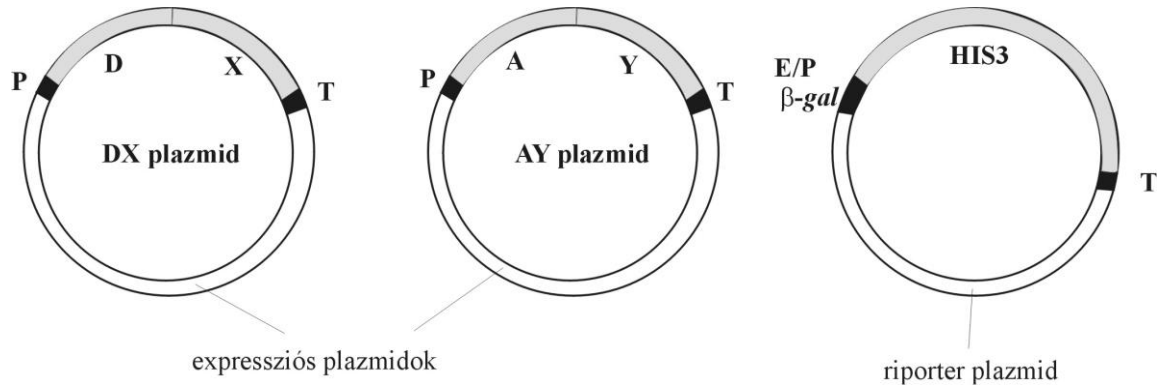
Az alábbi teszt egy nagyjelentőségű molekuláris biológiai módszer, az élesztő **két-hibrid rendszer** elvét mutatja be [1].

Élesztő sejtekben van egy transzkripciós faktor, a **GAL4**, mely szükséges a β -galaktozidáz gén expressziójához. Tartalmaz egy DNS-kötő domént, mely a β -gal gén promoter régiójában levő enhancer szekvenciához kötődik és egy aktivátor domént, ami az RNS polimeráz II kötődéséhez kell (1. ábra).

Az alábbi kísérlet célja két emlős fehérje (a feladatban **X és Y fehérjének** nevezzük őket) vizsgálata az élesztő két-hibrid módszer segítségével. A kísérletben olyan expressziós plazmidokat alkalmaztak, melyek élesztő sejtekben működnek (2. ábra). Az egyik plazmid olyan fúziós gént tartalmazott, melyet a GAL4 DNS-kötő doménjét és az X fehérjét kódoló cDNS alkot. A másik plazmidba a GAL4 aktivációs doménjét és az Y fehérjét kódoló hibrid cDNS-t építettek be. Egy harmadik, ún. **riporter plazmidot** is alkalmaztak a kísérletben: ebbe a *his3* gént vitték be riporter génként, a β -gal enhancer/promoter régiójával együtt. A három plazmidot olyan mutáns élesztősejtekbe transzfektálták, melyek sem a GAL4 gént, sem a *his3*-t nem tartalmazták ($GAL4^-$, $HIS3^-$ mutáns). A sejteket szilárd táptalajt tartalmazó sejtenyészető lemezekben szélesztették hisztidin hiányában és hisztidin jelenlétében (ld. I. táblázat).



1 ábra: A GAL4 transzkripciós faktor szerepe a β -galaktozidáz gén átírásában (D, DNS-kötő domén; A, aktivációs domén; pol II, RNS-polimeráz II; β -gal, β -galaktozidáz gén).



2. ábra: A kísérletben használt plazmid-konstrukciók (P, promotor; T, terminátor; $E/P\beta$ -gal, a β -galaktozidáz gén enhancer/promotor régiója; A és D, a GAL4 aktivációs illetve DNS-kötő doménjét kódoló cDNS; X és Y, az X és Y fehérjét kódoló cDNS). I. táblázat: GAL4⁻ HIS3⁻ élesztősejtek transzfekciója különböző rekombináns plazmidokkal, különböző körülmények között. (A plazmidok leírását a 2. ábra, a kísérlet részleteit a szöveg tartalmazza.)

Transzfekció			Hisztidin a táptalajban	A tenyésztőlemezeken megjelenő telepek száma
DX plazmiddal	AY plazmiddal	riporter plazmiddal		
-	-	-	+	sok
-	-	-	-	egy sem
-	-	+	-	egy sem
+	-	+	-	egy sem
-	+	+	-	egy sem
+	+	+	-	néhány

Tanulmányozza a kísérlet stratégiáját, értékelje az eredményeket és oldja meg a következő tesztfeladatokat!

Kísérletelemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

A: alátámasztja az állítást

B: ellentmond az állításnak

C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

1. ____ A hisztidin élesztőben esszenciális (létfontos) aminosav.
2. ____ A HIS3 gén a hisztidin bioszintéziséhez szükséges enzimet kódol.
3. ____ A riporter plazmid HIS3 génje konstitutívan expresszálódik a transzfektált mutáns élesztő sejtekben.
4. ____ A DX fehérje féléletideje rövidebb, mint a GAL4 fehérjéé.
5. ____ A HIS3⁻ sejtek nem tudják felvenni a hisztidint.

- 6.____ Az élesztő sejtek nem tudják eltávolítani az emlős eredetű pre-mRNS-ek intronjait.
- 7.____ Az X és Y fehérje transzkripciós faktorként működik emlős gazdasejtjeikben.
- 8.____ A β -gal enhancer nem működik a HIS3⁻ sejtekben.
- 9.____ A DX és AY fúziós fehérjék együtt képesek pótolni a transzfektált sejtekből hiányzó GAL4 aktivitást.
- 10.____ A DX fúziós fehérje hozzá tud kapcsolódni a β -gal enhancerhez.
- 11.____ Az AY fúziós fehérje képes az RNS polimeráz II aktiválására.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- 12.____ Milyen molekuláris esemény vizsgálható az élesztő két-hibrid rendszerrel?
- A. A β -galaktozidáz expresszió szabályozása
- B. A HIS3 gén expressziójának szabályozása
- C. Exogén fehérjék (a példánkban X és Y) génregulációs szerepe
- D. Exogén fehérjék (a példánkban X és Y) szerepe az RNS polimeráz II működésében
- E. Exogén fehérjék (a példánkban X és Y) között kialakuló kapcsolat

Helyes válaszok

- | | | | | | |
|----|---|----|---|-----|---|
| 1. | A | 5. | B | 9. | A |
| 2. | A | 6. | C | 10. | A |
| 3. | B | 7. | C | 11. | A |
| 4. | C | 8. | B | 12. | E |

Irodalom

- [1] D.L. Spector, R.D. Goldman, L.A. Leinwand (szerkesztők): Cells A Laboratory Manual. Chapter 69: Two-hybrid System/Interaction Trap. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2006) Problem-solving test: The yeast two-hybrid system. Biochem.Mol.Biol.Educ. 34, 306-307.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

EGY APOPTÓZIST OKOZÓ SZER HATÁS- MECHANIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*apoptózis * Bcl-2 fehérjecsald * anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék * pro-apoptotikus multi-domén Bcl-2 fehérjék * BH3-domén fehérjék * az apoptózis mitokondriális útja * sejtfractionálás * célzott géntkiirtás * Western-blot * citokróm c * töltési kontroll * kaspázok * apoptozóma*

A kísérlet

A legtöbb daganatsejt elveszíti azt a képességét, hogy apoptózissal elpusztuljon. Azok a fehérjék tehát, melyek részt vesznek az apoptózis szabályozásában vagy végrehajtásában, reménykeltő célpontjai daganatellenes gyógyszerek kifejlesztésének. Köztük különösen fontosak a Bcl-2 fehérjecsald tagjai. Három típusuk van: anti-apoptotikus Bcl-2 tagok (pl. Bcl-2, Bcl-x_L), pro-apoptotikus multi-domén Bcl-2 család fehérjék (pl. Bax, Bak) és BH3-domén fehérjék (pl. Bad, tBid; a BH3 a Bcl-2 homológia **3** rövidítése, ez a domén a család minden tagjában jelen van). A külső mitokondriális membrán permeabilitását szabályozzák, ezáltal pedig az apoptózis mitokondriális útját.

Egy potenciális rákellenes szert (106. vegyületnek jelölik) vizsgáltak a tesztben leírt kísérletekben, izolált mitokondriumokon [1]. (Mielőtt hozzálátna a teszthez, gondolja át az apoptózis mitokondriális útját.)

Az alább leírt kísérleteket egér embrionális fibroblasztokból izolált mitokondriumokon végezték.

Egyszerű választás

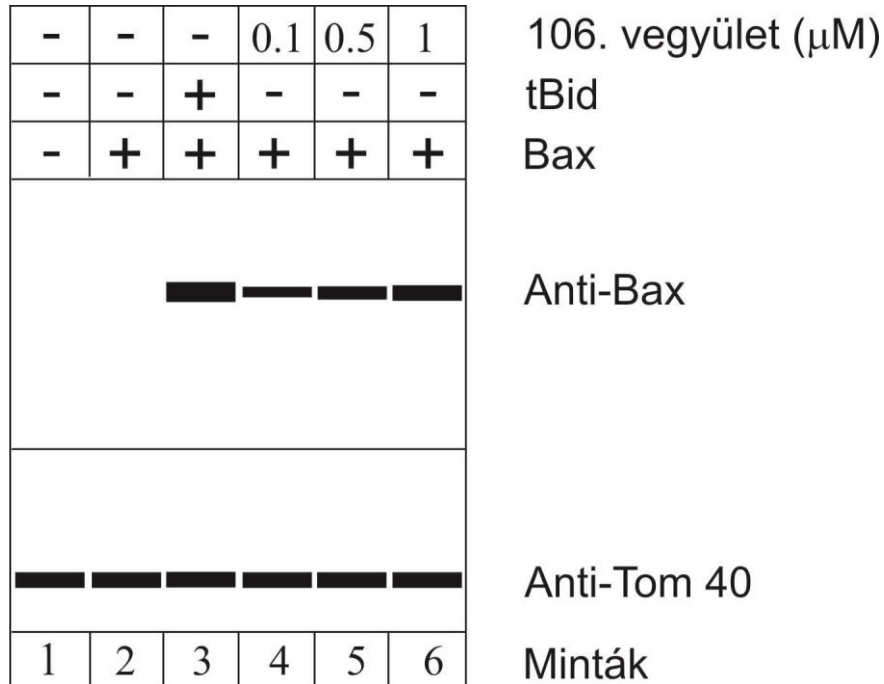
(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

1. ___ Az alábbiak közül melyik eljárás alkalmas tiszta, mitokondrium-frakció kinyerésére?

- A: A homogenátum kis sebességű centrifugálása
- B: A homogenátum közepes sebességű centrifugálása
- C: A homogenátum nagy sebességű ultracentrifugálása
- D: A poszt nukleáris felülúszó közepes sebességű centrifugálása
- E: A poszt nukleáris felülúszó nagy sebességű ultracentrifugálása

1. kísérlet

A mitokondrium-frakciót Bak⁻Bax⁻ sejtekből izolálták (melyekben ezeket a géneket K.O. mutációval kiütötték), majd a mitokondriális mintákat kezelés nélkül inkubálták (az 1. minta az I. ábrán), illetve Bax fehérjét (2-6. minta), tBid fehérjét (3. minta) és a 106. vegyület emelkedő mennyiségét (4-6. minta) adták az elegyekhez (ld. 1. ábra). Inkubáció után a mitokondriumokat lecentrifugálták, fehérjéiket szolubilizálták és Western-blot analízist végeztek anti-Bax és anti-Tom 40 antitesttel. (A Tom 40 a külső mitokondriális membrán fehérjéje.)



1. ábra: Bak⁻Bax⁻ sejtek mitokondriumainak kezelése Bax és tBid fehérjével, illetve a 106. vegyülettel (részletek a szövegben).

2. kísérlet

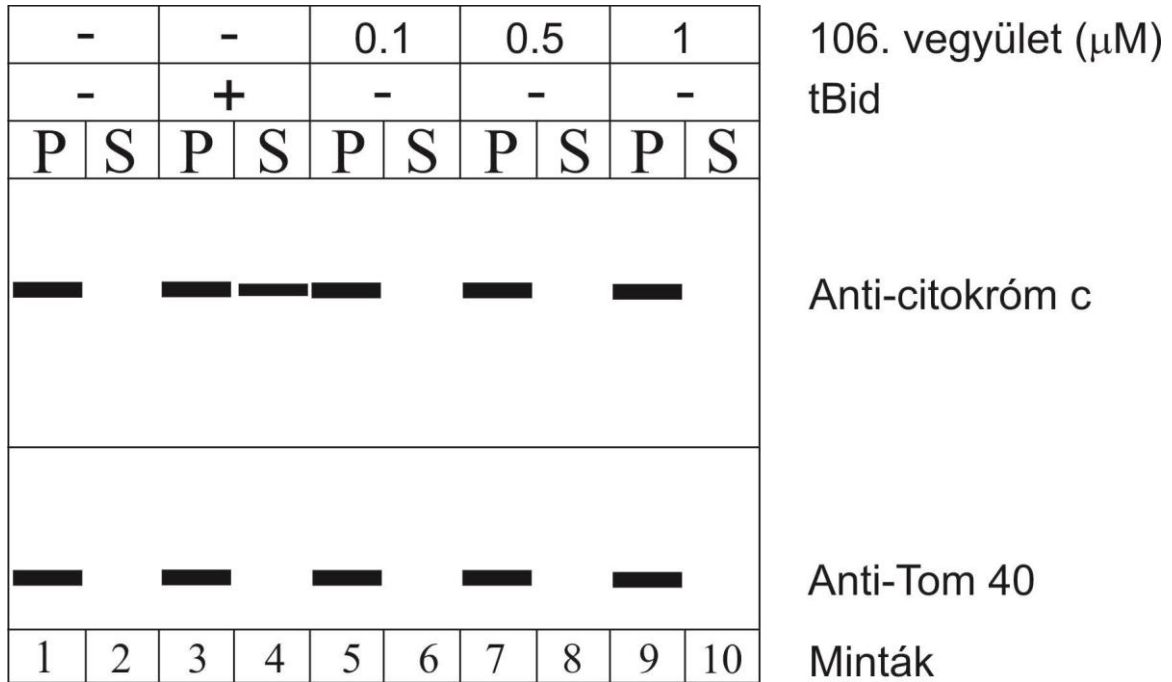
Bak⁻Bax⁻ sejtekből izolált mitokondriumokat Bax fehérjével (3-14. minta a 2. ábrán), tBid-el (5-6. és 11-12. minta), Bcl-x_L-el (9-14. minta) és a 106. vegyülettel kezeltek (az 1-2. minta kontrollként szolgált). A mitokondriumokat lecentrifugálták és az üledékek (az ábrán P jelöli) fehérjekivonatát, illetve a felülúszókból (S) származó mintákat Western-blot analízisnek vetették alá anti-citokróm c és anti-Tom 40 antitesttel (2. ábra).

		-		-		-		-		+		+		+		
		-		-		+		-		-		+		+		Bcl-x _L
		-		-		-		+		-		-		+		106 vegyület
		-		-		+		-		-		+		-		tBid
		-		+		+		+		+		+		+		Bax
		P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	
																Anti-citokróm c
																Anti-Tom 40
																Minták
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	

2. ábra: Bak⁻Bax⁻ sejtek kezelése Bax, tBid és Bcl-x_L fehérjével, illetve a 106. vegyülettel (P: üledék; S: szupernatáns; részletek a szövegben).

3. kísérlet

Hasonló kísérletet végeztek Bak⁺ Bax⁻ sejtek mitokondriumaival (3. ábra). A mitokondriumok kezelést nem kaptak (1-2. minta) vagy tBid fehérjével (3-4. minta) illetve a 106. vegyülettel (5-10. minta) inkubálták őket. A mintákat a 2. kísérlet szerinti módon készítették elő, a 3. ábra a Western-blot eredményét mutatja.



3. ábra: Bak⁺ Bax⁻ sejtek mitokondriumainak kezelése tBid fehérjével, és a 106. vegyülettel (részletek a szövegben).

Tanulmányozza a kísérletek eredményeit és oldja meg az alábbi tesztfeladatokat!

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

2. ___ Milyen céllal használtak anti-Tom 40 antitestet ezekben a kísérletekben?

- A: Töltési kontrollként
- B: A mitokondrium-szerkezet épségének ellenőrzésére
- C: Hogy ellenőrizzék, van-e citoszól szennyeződés a mitokondrium-frakcióban
- D: A és B
- E: A, B és C

Ábraelemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

A: alátámasztja az állítást

B: ellentmond az állításnak

C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

3. ___ Az egér embrionális fibroblasztok fokozottan expresszálják a Bcl-x_L fehérjét.
4. ___ A 106. vegyület serkenti a Bax fehérje transzlokációját a mitokondriumba.
5. ___ A 106. vegyület hatása függ a tBid fehérje jelenlététől.
6. ___ A tBid fokozza a 106. vegyület hatását.
7. ___ A Bax fehérjét expresszáló sejtek várhatóan érzékenyek a 106. vegyület apoptotikus hatására.
8. ___ A Bcl-x_L fehérjét fokozottan expresszáló sejtek várhatóan érzékenyek a 106. vegyület apoptotikus hatására.
9. ___ A 106. vegyület szétroncsolja a mitokondrium külső membránját.
10. ___ A 106. vegyület áteresztővé teszi a mitokondrium külső membránját.
11. ___ A 106. vegyület serkenti a citokróm c transzlokációját a citoszólból a mitokondriumba.

Az alábbi tesztfeladatokat akkor tudja megoldani, ha a kísérletek eredményeinek értelmezését kiterjeszti, extrapolálja az apoptózis egész mitokondriális útjára.

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

A: Bak⁺ Bax⁻ sejtek

B: Bak⁻ Bax⁻ sejtek

C: Mindkettő

D: Egyik sem

12. ___ Ezek a sejtek képesek apoptózissal elpusztulni.
13. ___ A tBid expressziója kaszpáz 9 aktivációhoz vezet bennük.
14. ___ Ezen sejtek kezelése a 106. vegyülettel apoptoszómák képződéséhez vezet bennük.
15. ___ A 106. vegyület kaszpáz 3 aktivációt okoz ezekben a sejtekben.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

16.____ Melyik fehérje a közvetlen célpontja a 106. vegyületnek?

- A: tBid
- B: Bax
- C: Bcl-x_L
- D: Bak
- E: Citokróm c

Helyes válaszok

- | | | | | | |
|----|---|-----|---|-----|---|
| 1. | D | 6. | C | 11. | B |
| 2. | D | 7. | A | 12. | C |
| 3. | C | 8. | B | 13. | C |
| 4. | A | 9. | B | 14. | D |
| 5. | B | 10. | A | 15. | D |
| | | | | 16. | B |

Irodalom

- [1] Zhao G., Y. Zhon, C.O. Eno, Y. Lin, L. DeLeenw, J.A. Burlison, J.B. Chaires, J.O. Trent, C. Li (2014) Activation of the proapoptotic Bcl-2 protein Bax by a small molecule induces tumor cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1198-1207.

Ezt a tesztet közölte a *Biochemistry and Molecular Biology Education*, itt az *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2015) Problem-solving test: Analysis of the mechanism of action of an apoptosis inducing compound.. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* *in press*

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

EGY HUMÁN PAPILOMA VÍRUS ONKOPROTEIN HATÁSMECHANIZMUSA

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*humán papillom vírus * méhnyakrák * onkoproteinek * malignus transzformáció * retinoblastoma fehérje * sejtciklus * ciklin/Cdk komplexek * E2F fehérje * S-fázis gének * enhancer elemek * protoonkogének * tumor szuppresszor gének * radioaktív jelölés * immunoprecipitáció * SDS-PAGE * autoradiográfia * fehérje-foszforiláció és –defoszforiláció * génindukció * agaróz gyöngyök * centrifugálás * Western-blot * a sejtciklus fázisai * generációs idő*

A kísérlet

Harald zur Hausen, 2008 egyik orvosi Nobel-díjasa, fedezte fel, hogy a human papilloma vírus (HPV) egyes típusai okozzák a méhnyakrákot. A HPV 16. típusa (HPV-16) az egyik legrészletesebben tanulmányozott human onkogén vírus [1]. A vírusgenom által kódolt két onkoprotein (E6 és E7) felelős a normális epiteliális sejtek tumorsejteké történő transzformációjáért. A feladatban leírt kísérlet célja az E7 fehérje molekuláris hatásmechanizmusának (nevezetesen viszonyának a retinoblastoma /RB/ fehérjéhez) vizsgálata volt [2].

Mivel a kísérlet nem foglalkozott az RB fehérje vizsgálatával, az E7 onkoprotein hatásmechanizmusának megértéséhez ismernie kell az RB fehérje legfontosabb tulajdonságait. Oldja meg az alábbi feladatokat!

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: RB fehérje nyugalmi sejtekben
- B: RB fehérje proliferáló sejtekben
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

1. ____ A sejtmagokban található.
2. ____ Ciklin/Cdk komplexek által erősen foszforilált.
3. ____ Az E2F transzkripció faktorral komplexálódik.
4. ____ Gátolja az S-fázis gének átírását.
5. ____ Az S-fázis gének enhancer elemeihez kötődik.

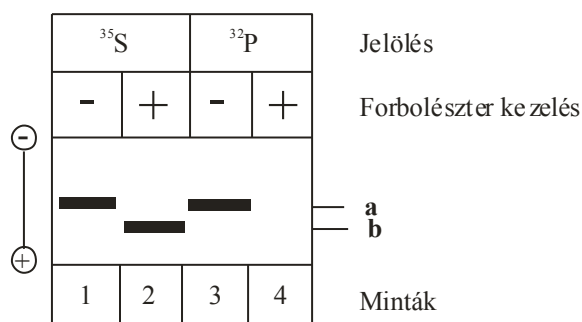
Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

6. _____ Mik az RB fehérje fő jellemzői?

- A: Proto-onkogén fehérje
- B: Tumor szuppresszor-fehérje
- C: A sejtciklus szabályozója
- D: A és C
- E: B és C

Az 1. ábra előkísérlet eredményét mutatja. Human leukaemiás sejtvonal (HL-60) sejteit kezelés nélkül (1. és 3. minta) vagy forbolészter jelenlétében (2. és 4. minta) tenyésztették és [^{35}S] metioninnal (1. és 2. minta) vagy [^{32}P] foszfáttal (3. és 4. minta) jelölték. A sejtextraktumokat anti-RB antitesttel immunoprecipitálták, SDS-poliakrilamid gélelektroforézist, majd autoradiográfiát végeztek.



1. ábra: Forbolészter hatása az RB fehérjére (részletek a szövegben).

Milyen következtetések vonhatók le a kísérlet eredményéből?

Ábra elemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

- A: alátámasztja az állítást
- B: ellentmond az állításnak
- C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

- 7. _____ Az **a** csík a **b** csíkból származó lebomlási termék.
- 8. _____ Kezeletlen HL-60 sejtekben minden RB fehérjemolekula foszforilált állapotban van.
- 9. _____ HL-60 sejtekben az RB fehérjét forbolészter indukálja.
- 10. _____ A forbolészter HL-60 sejtekben az RB fehérje defoszforilációját idézi elő.

Az E7 fehérje funkcióját vizsgáló kísérlet eredményét a 2. ábra mutatja. A human leukaemia sejteket forbolészter nélkül (1-3. minta) vagy annak jelenlétében (4-6. minta) tenyésztették. Sejtkivonatokat preparáltak, majd ezeket olyan agarózgyöngyökkel inkubálták, melyekhez előzőleg kovalens kötással E7 fehérjemolekulákat kapcsoltak. Inkubálás után a gyöngyöket lecentrifugálták, majd anti-RB antitesttel Western-blot vizsgálatot végeztek teljes sejtkivonatokkal (1. és 4. minta), a felülúszókkal (2. és 5. minta) és az üledékekkel (3. és 6. minta).



2. ábra: Sejtkivonatok vizsgálata E7-agaróz gyöngyökkel (részletek a szövegből).

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

11. ____ Mi volt az E7-agaróz gyöngyös módszer alkalmazásának a célja?

- A: Az RB fehérje expressziójának vizsgálata
- B: Az RB fehérje foszforilációjának vizsgálata
- C: Az E7-RB kapcsolatok vizsgálata
- D: A és B
- E: A, B és C

Az alábbi kérdések megválaszolásakor és az E7 fehérje sejtciklusra kifejtett hatásának leírásakor egyesítenie kell az RB fehérjére vonatkozó ismereteit (1-6. tesztkérdés) a kísérlet eredményéből levonható következtetésekkel.

Relációanalízis

(E kérdéstípusban állítások és indoklások szerepelnek. Ezek megítélésében öt lehetőség adódik:

- A: az állítás és az indoklás is igaz és az indoklás helyesen világítja meg az állítást
- B: mindkettő igaz, de az indoklás nem világítja meg helyesen az állítást
- C: az állítás igaz, de az indoklás nem
- D: az állítás nem igaz, de az indoklás önmagában helyes
- E: az állítás is és az indoklás is helytelen)

12. ____ A HL-60 sejtek forbolésztter hiányában G₀-fázisban voltak, **MERT** RB fehérje molekuláik erősen foszforilált állapotban voltak.
13. ____ A forbolésztter kezelés gátolta a HL-60 sejtek proliferációját, **MERT** serkentette az RB fehérje E7 onkoproteinhez kötődését.

Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ (A, B, C vagy D) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- A: A HL-60 sejtek forbolésztter kezelése
- B: Az E7 onkoprotein expressziója HL-60 sejtekben
- C: Mindkettő
- D: Egyik sem

14. ____ Növeli az E2F transzkripciós faktorhoz kötődő RB fehérje mennyiségét.
15. ____ Növeli az S-fázis gének expresszióját.
16. ____ Növeli a sejtek generációs idejét.
17. ____ Növeli a G1-fázisban levő sejtek arányát.

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az egyetlen megfelelőt kell kiválasztania. A választ (A, B, C, D, E) írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

18. ____ Foglaljuk össze az E7 fehérje hatásait, melyek malignus transzformációhoz vezethetnek!
- A: Megköti és hatástalanítja a foszforilálatlan RB fehérjét
 - B: Növeli a funkcionálisan aktív E2F transzkripciós faktor mennyiségét
 - C: „Belöki” a sejteket az S-fázisba
 - D: Növeli a proliferációs aktivitást
 - E: Az összes fenti folyamatot serkenti

Helyes válaszok

1.	C	7.	B	13.	B
2.	B	8.	A	14.	A
3.	A	9.	B	15.	B
4.	A	10.	A	16.	A
5.	D	11.	C	17.	A
6.	E	12.	D	18.	E

Irodalom

- [1] J. Cohen, M. Enserink (2008) Nobel prize in Physiology or Medicine. HIV, HPV researchers honored, but one scientist is left out. *Science*, **322**, 174-175.
- [2] Y. Imai, Y. Matsushima, T. Sugimura, M. Terada (1991) Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *J. Virol.* **65**, 4966-4972.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2015) Problem-solving test: The mechanism of action of a human papilloma virus oncoprotein. *Biochem.Mol.Biol.Educ.* **37**, 118-120.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).

JELÁTVITEL PHILADELPHIA-KROMOSZÓMA POZITÍV LEUKÉMIA SEJTEKBEN

Nézze át az alábbi fogalmakat, mielőtt nekiáll a tesztnek

*reciprok transzlokáció * protoonkogén * génexpresszió * c-Abl * kinázok * transzmembrán fehérje * G-protein * Src fehérje * malignus transzformáció * transzfekeció * immunoprecipitáció * preimmun szérum * [γ -³²P]ATP * cAMP * SDS-PAGE * autoradiográfia * Western-blot * ko-immunoprecipitáció * expressziós vektor * cDNS * átmeneti transzfekeció * riporter gén * riporter plazmid * promoter * Ras fehérje * transzformált góc * extracelluláris szignál-regulált kináz*

A kísérlet

A Philadelphia-kromoszómát a 9. és 22. kromoszóma között bekövetkező reciprok transzlokáció eredményei egyes emberi leukémia sejtekben. A szokatlanul kicsi 22. kromoszóma (Philadelphia- vagy Ph¹-kromoszóma) egy fúziós gént tartalmaz, mely a *bcr*-gén proximális és a *c-abl* protoonkogén (mely eredetileg a 9. kromoszómán helyezkedik el) disztális részéből áll. Ennek a génnek az expressziója egy fúziós fehérjét eredményez, amely biokémiaiilag különbözik a protoonkogén *c-Abl* fehérjétől és krónikus myeloid (CML) vagy akut lymphoid leukémia (ALL) kialakulásához vezet. A tesztben leírt kísérletek [1] célja a Bcr/Abl fehérje által kiváltott jelátviteli folyamatok vizsgálata volt, különös tekintettel a Grb2 adapter fehérje szerepére. Először válaszoljon az alábbi, a protoonkogén *c-Abl* fehérjére vonatkozó tesztkérdésekre!

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

1. _____ Mi jellemző a *c-Abl* fehérjére?

- A: Tirozin protein kináz
- B: Transzmembrán fehérje
- C: Monomer G-protein
- D: A és B
- E: B és C

Oldja meg a következő, az adapter-fehérjék jellemzőit firtató kérdéseket!

Egyszerű választás

(E kérdéstípusban A, B, C, D, E-vel jelölt öt alternatíva szerepel, melyek közül az **egyetlen** megfelelőt kell kiválasztania. A választ **(A, B, C, D, E)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

2. ____ Az alábbi állítások közül melyik írja le legpontosabban az adapter-fehérjék szerepét?
- A: kapcsolat létesítése sejtfelszíni receptorok és intracelluláris célfehérjék között
 - B: kapcsolat létesítése receptor-protein-tirozinkinázok és intracelluláris célfehérjék között
 - C: kapcsolat létesítése receptor-protein-tirozinkinázok és szerin/treonin specifikus fehérjekinázok között
 - D: kapcsolat létesítése tirozinon foszforilált fehérjék és célfehérjék között
 - E: tirozinkinázok aktivitásának szabályozása

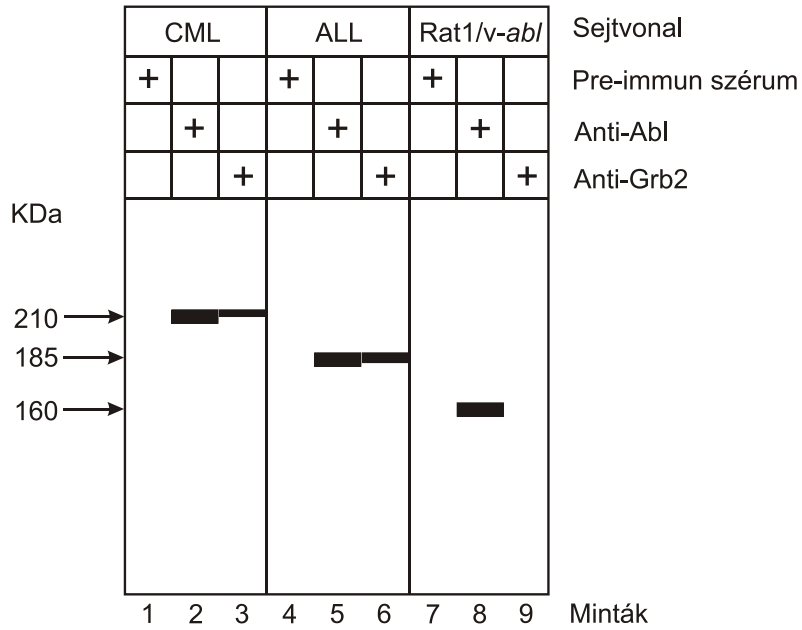
Négyféle asszociáció

(E kérdéstípusban két fogalom azonos, illetve eltérő jellemzőit kell megállapítani. A választ **(A, B, C vagy D)** írja a kérdés mellett lévő vízszintes vonalra!)

- F: SH2-domén
- G: SH3-domén
- H: Mindkettő
- I: Egyik sem

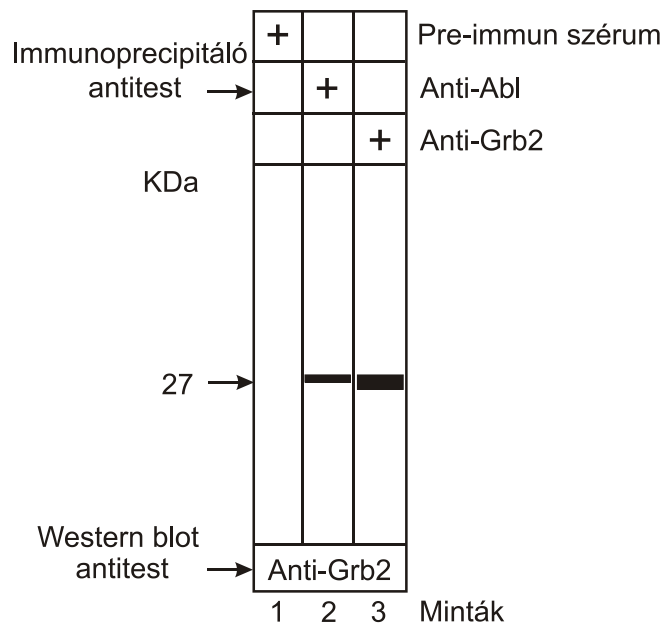
3. ____ Ez alkotja a szteroid-receptorok DNS-kötő régióját.
4. ____ Vele rokon régió jelen van a v-Src fehérjében.
5. ____ Csak azok a fehérjék képesek transzformálni az NIH 3T3 fibroblasztokat, amelyek ilyen doménnel rendelkeznek.
6. ____ Tirozinon foszforilált fehérjerégióhoz kötődik.
7. ____ Minden retrovirális onkoproteinben jelen van.

A kísérlet első részében krónikus myeloid leukémiás (1. ábra, CML), akut lymphoid leukémiás (ALL-1) sejteket és a v-abl onkogénnel transzfektált patkány fibroblasztokat (Rat1/v-abl) vizsgáltak. A sejtekből készült kivonatokat preimmun (kontroll) szérummal (1. ábra, 1., 4. és 7. minta), anti-Abl (2., 5. és 8. minta) vagy anti-Grb2 (3., 6. és 9. minta) antitesttel immunoprecipitálták. A precipitátumokat in vitro [γ -³²P]ATP-vel inkubálták, majd a fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel frakcionálták és autoradiográfiát végeztek.

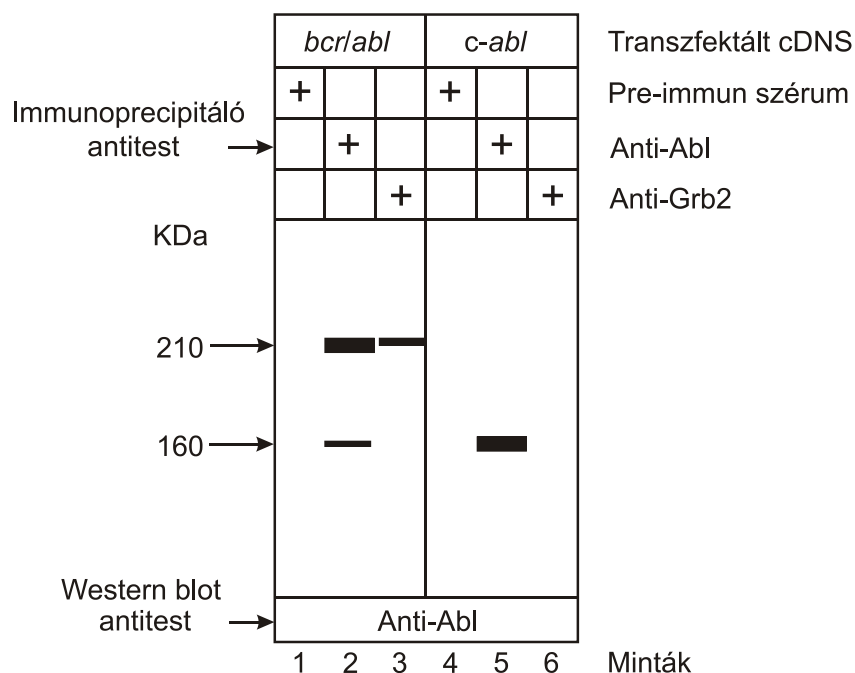


1. ábra (részletek a szövegben).

A kísérlet második részében (2. ábra) CML-sejtkivonatokat preimmun szérummal (1. minta), anti-Abl (2. minta) vagy anti-Grb2 (3. minta) antitesttel inkubáltak, az immunoprecipitátumokat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel frakcionálták és anti-Grb2 antitesttel Western-blot analízist végeztek.



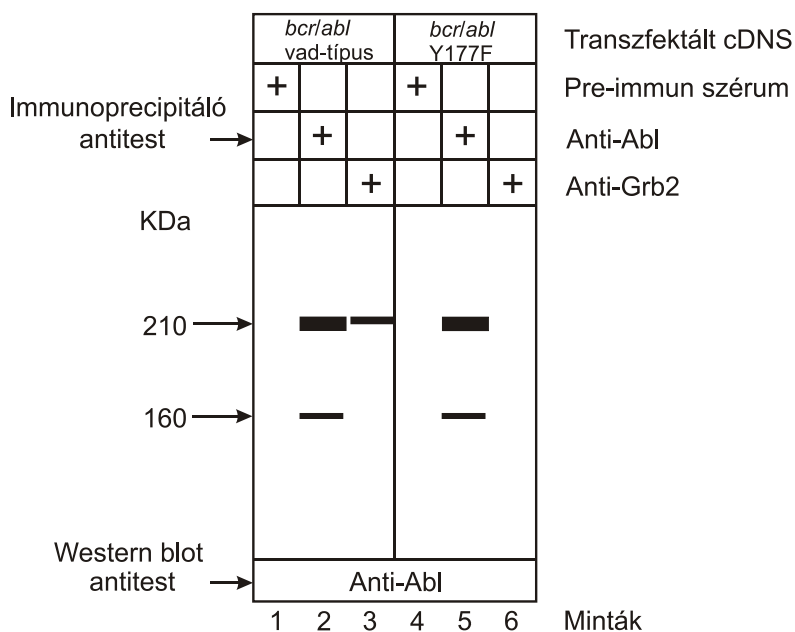
2. ábra (részletek a szövegben).



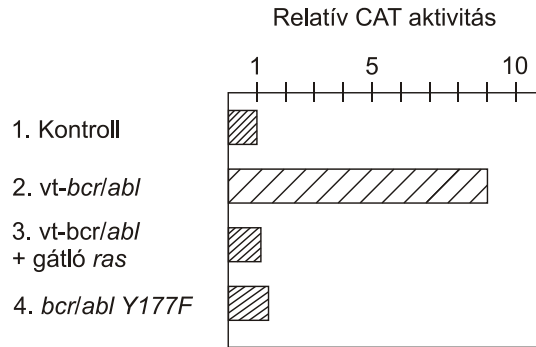
3. ábra (részletek a szövegben).

A 3. ábrán bemutatott kísérletben az előzőkhöz hasonló koimmunoprecipitációs stratégiát alkalmaztak. *bcr/abl* (1-3. minta) vagy *c-abl* (4-6. minta) génnel transzfektált sejtek kivonatát (kontroll), anti-AbI vagy anti-Grb2 antitesttel immunoprecipitálták, majd anti-AbI antitesttel immunoblottot végeztek.

Végül a fúziós fehérje Bcr-régiójának 177. helyén levő tirozin jelentőségét vizsgálták. Olyan mutáns gént állítottak elő, amelyben ezen a helyen fenilalanin szerepel (*bcr/abl* Y177F). Vad-típusú *bcr/abl* és Y177F *bcr/abl*-génnel transzfektált sejtek kivonataival koimmunoprecipitációt végeztek (részleteket lásd a 4. ábrán).



4. ábra



5. ábra

A *bcr/abl* gén génaktivitásra gyakorolt hatását tranziens expressziós kísérletekben vizsgálták (5. ábra). A sejteket olyan (CAT)-riporter plazmiddal transzfektálták, amely promotere *ras*-responzív elemhez kapcsolódott. A kotranszekcióhoz használt egyéb plazmidokat az 5. ábra mutatja. A kotranszfektált sejtekben CAT (kloramfenikol acetiltranszferáz) aktivitást mértek. A *bcr/abl* gének transzformációs aktivitását Rat1 fibroblasztok transzfekciójával vizsgálták. Azonos körülmények között 10^5 transzfektált sejtből a vad típusú *bcr/abl* 37 transzformált kolóniát hozott létre, míg a *bcr/abl* (Y177F) egyet sem.

Tanulmányozza a kísérletet és oldja meg a következő tesztkérdéseket!

Kísérlet elemzés

(Állapítsa meg az alábbi állításokról, hogy a feladatból nyerhető információ:

A: alátámasztja az állítást

B: ellentmond az állításnak

C: se nem támasztja alá, se nem mond ellent az állításnak)

8. ____ A Bcr/Abl fúziós fehérje SH1-domént tartalmaz.
9. ____ A Bcr/Abl fehérje a Grb2-t in vitro tirozinon foszforilálja.
10. ____ In vivo a Bcr/Abl és a Grb2 komplexet képez.
11. ____ A Bcr/Abl és a v-Abl fehérjék ugyanazon jelátviteli utat használva okoznak malignus transzformációt.
12. ____ A Bcr/Abl fehérje nagyobb, mint a v-Abl.
13. ____ A Bcr/Abl fehérje nagyobb, mint a Grb2.
14. ____ Az aktivált c-Abl nem képes a Grb2 fehérjéhez kapcsolódni.
15. ____ A Ras-GDP/Ras-GTP arány Ph^1 -pozitív sejtekben magasabb, mint normális leukocitákban.
16. ____ A CML-t és ALL-t létrehozó transzlokáció során az érintett kromoszómák nem ugyanazon a helyen törnek el.
17. ____ A Bcr/Abl fúziós fehérje transzformációs aktivitása a Grb2-kötéstől függ.
18. ____ A Bcr/Abl fehérje génaktivációs hatását a Ras által közvetített jelátviteli út serkentésével fejt ki.

Helyes válaszok

1.	A	7.	D	13.	A
2.	D	8.	A	14.	C
3.	D	9.	B	15.	B
4.	C	10.	A	16.	A
5.	D	11.	B	17.	A
6.	A	12.	A	18.	A

Irodalom

- [1] A.M. Pendergast, L.A. Quilliam, L.D. Cripe, C.H. Bassing, Z. Dai, N. Li, A. Batzer, K.M. Rabun, C.J. Der, J. Schlessinger, M.L. Gishizky (1993) BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, **75**, 175-185.

Ezt a tesztet közölte a Biochemistry and Molecular Biology Education, itt az International Union of Biochemistry and Molecular Biology engedélyével jelenik meg.

Szeberényi J. (2012) Problem-solving test: Signal transduction in Philadelphia chromosome positive leukemia cells. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **40**, 333-336.

Az Európai Unió támogatásával készült (TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001).