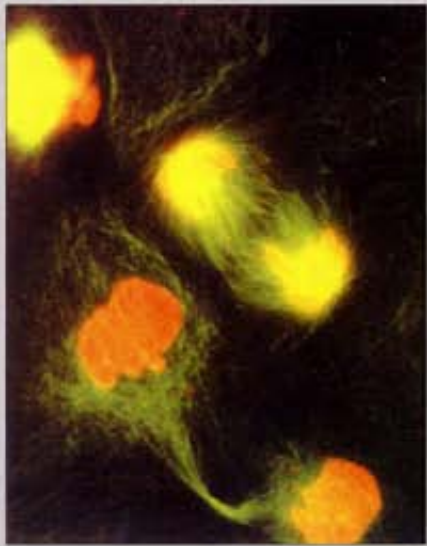
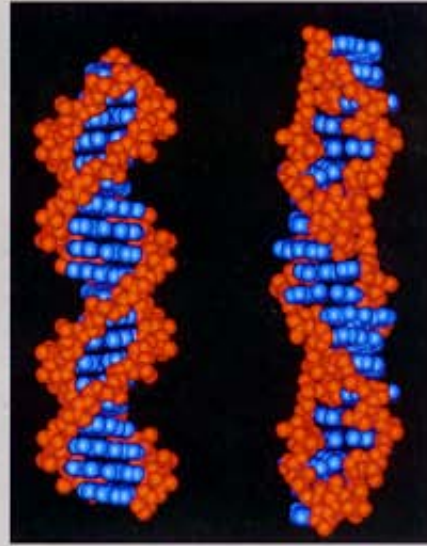


GENETIKA



Robert F. Weaver
Philip W. Hedrick

PANEM

Robert F. Weaver
University of Kansas

Philip W. Hedrick
Arizona State University

GENETIKA



PANEM

Áttekintő tartalomjegyzék

Előszó	xi
1. fejezet. Bevezetés	1
1. rész. Mendeli genetika	17
2. fejezet. A mendeli genetika alapjai	18
3. fejezet. A mendeli genetika kiterjesztése és alkalmazásai	42
4. fejezet. A kromoszómák és az öröklődés	73
5. fejezet. A genetikai kapcsoltság	104
2. rész. Molekuláris genetika	129
6. fejezet. A gének biokémiája	130
7. fejezet. A gének replikációja és rekombinációja	154
8. fejezet. A transzkripció és szabályozása prokariótákban	185
9. fejezet. Az eukarióta genom szerveződése és működése	219
10. fejezet. A transláció	255
11. fejezet. Génmutáció	295
12. fejezet. Mozgó genetikai elemek	322
13. fejezet. A baktériumok és a fágok genetikája	340
14. fejezet. Fejlődésgenetika	369
15. fejezet. Génklónozás és génmanipuláció	415
16. fejezet. A génklónozás gyakorlati alkalmazása és a genetikai térképezés	448
17. fejezet. A gének és a rák	482
18. fejezet. Extranukleáris öröklődés	504
3. rész. Populációgenetika	531
19. fejezet. Bevezetés a populációgenetikába	532
20. fejezet. A populációgenetika gyakorlati alkalmazásai	557

Tartalomjegyzék

Előszó	xi		
1. fejezet. Bevezetés	1		
A genetika három ága	2		
Mendeli vagy transzmissziós genetika	2		
A Mendel-törvények	3		
Az öröklődés kromoszómaelmélete	4		
Genetikai rekombináció és térképezés	8		
A rekombináció közvetlen bizonyítékai	9		
Molekuláris genetika	9		
A DNS felfedezése	9		
A gének anyaga: DNS	12		
A fehérjék és a gének kapcsolata	12		
A gének szerepe	13		
Miért érdemes genetikát tanulni?	14		
Összefoglalás	15		
1. RÉSZ. MENDELI GENETIKA	17		
2. fejezet. A mendeli genetika alapjai	18		
A hasadás elve	19		
Mendel kísérleti eredményei	19		
Mendel magyarázata	22		
A független kombinálódás elve	26		
A valószínűség	28		
Az összegzési szabály	28		
A szorzási szabály	28		
A feltételes valószínűség	29		
Binomiális eloszlás	29		
A villás elágazás módszere	31		
Az illeszkedés vizsgálata	33		
Mendeli öröklődés emberi jellegekre	35		
Recesszív jellegek	36		
Domináns jellegek	37		
Kidolgozott feladatok	38		
Összefoglalás	39		
Kérdések és feladatok	39		
3. fejezet. A mendeli genetika kiterjesztése és alkalmazásai	42		
Dominancia	43		
Teljes dominancia	43		
Részleges dominancia	43		
Kodominancia	44		
Letalitás	44		
Pleiotrópia	45		
Penetrancia és expresszivitás	46		
Egy gén – sok allél	48		
Nemhez kapcsolt gének	50		
		Többgénes rendszerek és az episztázis	54
		Genotípus–fenotípus kapcsolatok	57
		Mennyiségi jellegek	58
		Átlag és variancia	60
		A kvantitativ tulajdonságok modellje	62
		A genetikai variancia és az örökölhetőség becslése	63
		Az emberi rasszok és az intelligencia	66
		Genetikai tanácsadás	66
		Az apaság kizárása	67
		Kidolgozott feladatok	69
		Összefoglalás	70
		Kérdések és feladatok	70
		4. fejezet. A kromoszómák és az öröklődés	73
		Ivaros szaporodás	74
		A kromoszómák felépítése	75
		Mitózis	78
		Profázis	80
		Metafázis	80
		Anafázis	81
		Telofázis	81
		Meiózis	81
		Meiózis I. fázis	82
		Meiózis II. fázis	83
		Spermatogenezis és oogenezis	83
		Gének és kromoszómák	85
		Kromoszómális változások	88
		A kromoszómaszerkezet változásai	88
		Kromoszómaszám-változások	93
		Különböző fajok kromoszómái	99
		A kromoszómák és az ivarmeghatározás	100
		Kidolgozott feladatok	101
		Összefoglalás	102
		Kérdések és feladatok	102
		5. fejezet. A genetikai kapcsoltság	104
		Kapcsoltság	105
		Egy fizikai magyarázat	105
		Rekombinációs gyakoriság	108
		A genetikai térkép	108
		Hárompontos keresztezések	109
		Interferencia	111
		Kapcsoltság emberben	113
		Szomatikus sejthibridizáció	115
		Négyfonalas crossing over	116
		Tetrádanalízis	117
		Inverziók és a rekombináció	117
		Egyenlőtlen crossing over	120
		Térképtávolság és fizikai távolság	123
		Kidolgozott feladatok	125
		Összefoglalás	126
		Kérdések és feladatok	126

2. RÉSZ. MOLEKULÁRIS GENETIKA	129		
6. fejezet. A gének biokémiája	130		
Az örökítő anyag természete	131		
Baktériumtranszformáció	131		
A polinukleotidok kémiai szerkezete	134		
A DNS szerkezete	137		
A kísérleti háttér	137		
A kettős hélix	138		
RNS-gének	141		
Nukleinsavak fizikai kémiája	141		
A DNS szerkezeti változatai	141		
Különböző méretű és alakú DNS-molekulák	145		
A gének működése	149		
A génexpresszió vázlatos áttekintése	150		
Kidolgozott feladatok	150		
Összefoglalás	152		
Kérdések és feladatok	152		
7. fejezet. A gének replikációja és rekombinációja	154		
A DNS-szintézis alapvető mechanizmusa	155		
Szemikonzervatív replikáció	156		
Szemidiszkontinuus replikáció	156		
A DNS-szintézis kezdő lépései	157		
A replikáció kétirányú	157		
Különálló DNS-fragmentumok összekapcsolása	157		
Összegzés	158		
A DNS-replikáció mechanizmusának kísérleti bizonyítékai	159		
A replikáció szemikonzervatív	159		
A replikáció szemidiszkontinuus	160		
Az RNS-primer	162		
A replikáció kétirányú	163		
Egyirányú replikáció	166		
A DNS-replikáció enzimeit	167		
A fonalak szétválasztása	167		
A replikáció iniciációja	170		
Az elongáció	171		
A termináció	173		
A replikáció pontossága	176		
Az RNS-genomok replikációja	177		
A rekombináció mechanizmusa	177		
A rekombináció típusai	177		
A homológ rekombináció modellje	178		
A génkonverzió	182		
Kidolgozott feladatok	183		
Összefoglalás	183		
Kérdések és feladatok	184		
8. fejezet. A transzkripció és szabályozása prokariótákban	185		
A transzkripció alapjai	186		
A hírvivő RNS felfedezése	186		
A transzkripció alapfolyamatai	186		
A transzkripció részletes ismertetése	189		
Az RNS-polimeráz kötődése a promoterekhez	190		
Az <i>E. coli</i> promotereinek közös bázisszekvenciái	190		
A génműködés egységei: az operonok	191		
A <i>lac</i> operon	191		
A <i>trp</i> operon	197		
A transzkripció terminációja	200		
Az inverz ismétlődő szekvenciák és a hajtűk	202		
A termináció egy modellje	203		
A ρ terminációs faktor	203		
A transzkripció időbeli kontrollja	204		
A gazda RNS-polimerázának módosítása	204		
A T7 fág által kódolt RNS-polimeráz	205		
A transzkripció kontrollja a sporogenezis során	206		
Az <i>E. coli</i> fertőzése lambda-fággal	207		
Specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások	213		
Hélix-fordulat-hélix motívumok a lambda-hoz			
hasonló fágok represszoraiban	214		
A Cro és a lambda-represszor hélix-fordulat-hélix eleme	214		
A <i>trp</i> represszor DNS-kötő eleme	215		
Kidolgozott feladatok	215		
Összefoglalás	217		
Kérdések és feladatok	217		
9. fejezet. Az eukarióta genom szerveződése és működése	219		
A kromatin szerkezete	220		
A nukleosómák a kromatinszerveződés első szintjét alkotják	220		
A nukleosómákból álló fűzér további kondenzációja	222		
A kromatin szerkezete és a génműködés	223		
Az RNS-polimerázok és szerepük	224		
A promoterek	225		
Az RNS-polimeráz II által felismert promoterek	225		
Az RNS-polimeráz I által felismert promoterek	227		
A polimeráz III promoterei	228		
A transzkripció szabályozása	229		
Erősítő és csillapító szekvenciák	229		
Az RNS-polimeráz II transzkripciós faktorai	230		
Az RNS-polimeráz I transzkripciós faktorai	231		
A polimeráz II génspecifikus transzkripciós faktorai	232		
Promoter elemekkel kapcsolatba lépő transzkripciós faktorok	232		
Enhancer régiókkal kapcsolatba lépő transzkripciós faktorok	232		
A génspecifikus transzkripciós faktorok szerkezete	234		
A génszerkezet és a génműködés kapcsolata	239		
Megszakított gének	239		
A kis nukleáris RNS-ek szerepe a splicing folyamatában	243		
A splicing lasszó alakú köztes terméke	243		
Alternatív splicing	244		
Az RNS érésének más eseményei	247		
A riboszomális RNS-prekurzorok rövidítése	248		
A poli(A)-végek	249		
A poliadeniláció	250		
Sapkaképződés az eukarióta mRNS-en	251		
Kidolgozott feladatok	252		
Összefoglalás	253		
Kérdések és feladatok	254		

10. fejezet. A transláció	255	Kidolgozott feladatok	318
A fehérjék szerkezete	256	Összefoglalás	320
A fehérjék funkciói	256	Kérdések és feladatok	320
A gének és a fehérjék kapcsolata	256		
A riboszómák a fehérjeszintézis színhelyei	260	12. fejezet. Mozgó genetikai elemek	322
A riboszómák spontán összeszerelődése	261	Bakteriális transzpozonok	323
A riboszómák fehérjéinek szerepe	264	Inszerációs szekvenciák: a legegyszerűbb transzpozonok	324
A poliszómák	265	Összetett transzpozonok	325
A transfer-RNS, az adapter molekula	266	Az áthelyeződés mechanizmusai	326
A tRNS adapter funkciója	266	A transzpozonok mint mutagének	328
A tRNS másodlagos szerkezete	267	Baktériumok helyspecifikus rekombinációja	329
A tRNS háromdimenziós szerkezete	267	Az eukarióták mozgó genetikai elemei	332
Az aminosavak kapcsolódása a tRNS-hez	268	A mozgó genetikai elemek első példái	332
Az aminoacil-tRNS szintetázok specifikitása	269	Élesztő és <i>Drosophila</i> transzpozonok	333
A genetikai kód	271	Retrovírusok	334
A genetikai kód átfedésmentes	271	A transzpozonok és a kromoszómák mutabilitása	337
A kód vesszőmentes	271	Kidolgozott feladatok	338
A kód tripletekből áll	272	Összefoglalás	338
A kód megfejtése	273	Kérdések és feladatok	338
Különös bázispárok a kodon és az antikodon között	274		
A kód csaknem univerzális	275	13. fejezet. A baktériumok és fágok genetikája	340
A transláció mechanizmusa	277	A baktériumokkal végzett kísérleti munka alapjai	341
Iniciáció	277	A bakteriális konjugáció	343
Elongáció: aminosavak kapcsolása a növekvő polipeptidlánchoz	280	Bakteriális DNS-átadás	343
Termináció: a kész polipeptid leválása	286	Hfr törzsek	345
A transláció szabályozása	288	Térképezés megszakított konjugációval	346
A prokarióták translációs szabályozása	288	A konjugáció teljessé válása	350
Az eukarióták translációjának szabályozása	290	Genetikai térképezés <i>E. coli</i> val	350
Kidolgozott feladatok	292	F' plazmidok	351
Összefoglalás	292	A <i>cis-transz</i> komplementációs teszt	352
Kérdések és feladatok	293	Transzdukció	354
		A T-páros fágok genetikája	358
11. fejezet. Génmutáció	295	A T-páros fágok felépítése és szaporodása	358
A génmutációk típusai	296	Fágfenotípusok, fággenetika	360
A szomatikus mutációk és az ivarsejtek mutációi	296	A finomszerkezet térképezése	362
Morfológiai mutációk	297	A <i>cis-transz</i> teszt alkalmazása az <i>rII</i> régióban	363
Az anyagcserét érintő mutációk	297	Kidolgozott feladatok	365
Letális mutációk	298	Összefoglalás	366
Kondicionális mutációk	298	Kérdések és feladatok	367
A mutációk hatása az örökítő anyagra	299		
Misszensz és nonszensz mutációk	299	14. fejezet. Fejlődésgenetika	369
A spontán mutációk	301	A sejt differenciáció genetikai alapjai	370
A kémiai mutagenézis	306	Mozaikos fejlődés és regulatív fejlődés	371
Sugárzások által indukált mutációk	308	Determinánsok	372
Csendes mutációk	309	Induktorok	374
A reverzió	309	Morfogének	374
A DNS hibáinak kijavítása, a reparáció	311	A génműködés szabályozásának szintjei	375
A DNS károsodásainak közvetlen kijavítása	311	A transzkripciós szabályozás	376
Excíziós reparáció	312	Poszttranszkripciós szabályozás	378
A mismatch reparáció	313	A transzkripciós szabályozás	378
A mutáció hatásának megszüntetése a DNS javítása nélkül	313	Poszttranszlációs szabályozás	379
A reparációs rendszer hibáinak súlyos következményei	315	Szabályozási mechanizmusok a transzkripció szintjén	379
A mutagének kimutatása	316	Génatválasztás hormonokkal	379
		A növényi gének fényindukciója	381
		A determináció	382

Gének aktiválódása az egyedfejlődés során és a DNáz-túlérzékenység	382	A Dushenne-féle izomdisztrófia	475
Az 5S rRNS-gének szabályozása <i>Xenopus laevis</i> -ben	384	DNS-ujjlenyomat és DNS-tipizálás	475
A DNS-metiláció szerepe	385	A DNS-ujjlenyomatok és a DNS-tipizálás kriminalisztikai alkalmazása	477
A <i>Drosophila</i> fejlődésgenetikája	386	Kidolgozott feladatok	478
Embriogenezis	386	Összefoglalás	480
A génaktivitás hierarchiája	389	Kérdések és feladatok	480
A jelátvitel	400	17. fejezet. A gének és a rák	482
Az episztázis és a fejlődés	404	A rákos sejtek jellegzetességei	483
Determináció a fonálféregben	407	A rák okai	483
Génátrendeződés a fejlődés során	407	A karcinogén anyagok mutagének	483
Az immunglobin gének átrendeződése	408	A vírusok és a rák	485
A <i>Trypanosoma</i> burokfehérjéjének átrendeződése	409	A tumorvírusok molekuláris genetikája	486
Genomikus bevéődés (imprinting)	410	A celluláris protoonkogének átalakulása onkogénekké	489
Kidolgozott feladatok	412	A protoonkogének funkciói	493
Összefoglalás	413	Az onkogének termékei és a növekedési faktorok	494
Kérdések és feladatok	414	A <i>c-src</i> protein-tirozin-kinázt kódol	494
15. fejezet. Génklónozás és génmanipuláció	415	A <i>c-Ha-ras</i> gén egy G fehérjét kódol	495
Génklónozás	416	Az onkogének termékei mint transzkripciósfaktorok	497
A restrikciós endonukleázok szerepe	416	Az onkogének és a növekedés szabályozása	498
Vektorok	417	A tumorszupresszor gének	498
Specifikus klón azonosítása specifikus próbával	425	A testi sejtek genetikája	498
cDNS klónozása	425	A malignus fenotípus mint recesszív tulajdonság	498
Módszerek a klónozott gének működtetésére	426	A retinoblasztóma génje	499
Expressziós vektorok	427	A p53 gén	501
Műveletek klónozott génekkel	431	Egyéb tumorszupresszor gének	501
Fehérjemérnökség klónozott génekkel (protein engineering)	431	Összefoglalás	502
A klónozott gének mint próbák	433	Kérdések és feladatok	502
A gének bázissorrendjének meghatározása	436	18. fejezet. Extranukleáris öröklődés	504
A DNS-szekvenálás a géntérképezés végállomása	440	Citoplazmatikus öröklődés	505
Fizikai térképezés	441	Kloroplasztiszok génjeinek öröklődése	505
Kidolgozott feladatok	441, 444	A csodatölcsér levélszínének nem-mendeli öröklődése	506
Összefoglalás	445	A mitokondriális gének öröklődése	509
Kérdések és feladatok	445	Az „anyai hatás” és az anyai öröklődés	512
16. fejezet. A génklónozás gyakorlati alkalmazása és a genetikai térképezés	448	Géntérképezés a mitokondriumokban és a kloroplasztiszokban	514
Klónozott gének termékeinek felhasználása	449	Az élesztő mitokondriális genomjának rekombinációs térképezése	514
Fehéjték – új korszak a gyógyszergyártásban	449	Térképezés az élesztő petite mutánsaival	514
Továbbfejlesztett oltóanyagok és az AIDS	449	Kidolgozott feladatok	517
Klónozott gének alkalmazása a gyógyászatban és a mezőgazdaságban	450	Kloroplasztiszgének térképezése	517
Beavatkozás az emberi öröklődő betegségekbe	450	A sejtorganellumok molekuláris genetikája	518
Az emberi génterápia problémái	451	A kloroplasztisz cirkuláris DNS-e	518
Klónozott gének alkalmazása a mezőgazdaságban	452	A kloroplasztisz genom molekuláris térképezése	519
Transzgenikus szervezetekből nyert fehérjék	454	A mitokondriális genom molekuláris térképezése	522
Genetikailag manipulált természetű növények	455	A mitokondriumok és a kloroplasztiszok eredete	526
Az emberi genom térképezése	457	Az endoszimbionta elmélet	527
A nagyméretű genomok térképezésének eszközei	458	A „közös” DNS	528
Knock-out állatok	465	Összefoglalás	528
Emberi betegségeket okozó gének térképezése	468	Kérdések és feladatok	529
A Huntington-kór	468		
A cisztás fibriózis génjének azonosítása	472		

3. RÉSZ. POPULÁCIÓGENETIKA	531		
19. fejezet. Bevezetés a populációgenetikába	532		
A genetikai variabilitás	533	Neutralitás	561
A genetikai variabilitás mérése	535	Molekuláris óra	562
A Hardy–Weinberg-szabály	537	Molekuláris törzsfák	563
A khi-négyzet próba	540	Az mtDNS felhasználása rokonsági viszonyok elemzésére	565
A multiplex allélia	540	Multigén családok	566
Az X-kromoszómához kapcsolt gének	541	A természetvédelem genetikai vonatkozásai	566
A beltenyésztés	542	A termesztett növények	566
Az öntermékenyítés	542	A beltenyésztéses leromlás	568
A beltenyésztési együttható	543	A genetikai változatosság elvesztése	569
A beltenyésztési együttható kiszámítása	543	Állattenyésztés és növénynemesítés	570
A mutáció	545	A mesterséges szelekció	570
A genetikai sodródás	545	Beltenyésztett vonalak	572
A génáramlás	547	A heterózis	573
A természetes szelekció	549	A peszticidrezisztencia	575
Az egyik homozigóta ellen irányuló szelekció	550	A peszticidrezisztencia fontos tényezői	575
Heterozigóta előny	552	Néhány példa a peszticidrezisztenciára	576
Kidolgozott feladatok	554	A peszticidrezisztencia kontrollja	577
Összefoglalás	554	Kidolgozott feladatok	578
Kérdések és feladatok	555	Összefoglalás	578
		Kérdések és feladatok	578
20. fejezet. A populációgenetika gyakorlati alkalmazásai	557	Függelék	
Az öröklődő emberi betegségek előfordulása	558	A) A fejezetek végén található feladatok megoldása	581
A mutáció és a szelekció egyensúlya	558	B) Ajánlott irodalom	602
A betegség gyakoriságát befolyásoló egyéb tényezők	559	A felhasznált képek és illusztrációk forrása	607
A molekuláris evolúció	561	Név- és tárgymutató	609

ELŐSZÓ

A könyvünket azzal a szándékkal írtuk, hogy alaptankönyvként szolgáljon az egyetemeken és főiskolákon genetikát tanuló hallgatók számára. Az írás során szembekerültünk azzal a minduntalan visszatérő szerkesztési kérdéssel: Mivel célszerű kezdeni a tudományterület bemutatását, a mendeli vagy a molekuláris genetikával? A hasonló témájú tankönyvek rendszerint a mendeli vagy transzmissziós genetikát tárgyalják először, és csak azt követi a molekuláris genetika. Mások a molekuláris szintű megközelítést helyezik előtérbe, megint mások az arany középutat választják, és nem különítik el a két területet egymástól. Hiszen nem hagyható figyelmen kívül az a tény, hogy a molekuláris biológia robbanásszerű fejlődésen ment keresztül az utóbbi években, ugyanakkor alapismeretei kiforrottak, letisztázódtak.

Annak ellenére, hogy a korszerű genetika csodálatos keveréke a klasszikus és a molekuláris módszereknek, mégis azt gondoljuk, hogy létjogosultsága van a kétféle megközelítés szétválasztásának, főként akkor, amikor olyan diákoknak szánjuk a könyvet, akik most ismerkednek először ezzel a tudománnyal. Hosszas vívódás után úgy döntöttünk, hogy a könyv írásakor a hagyományos, történeti felépítést követjük. Úgy tűnik számunkra, ez az út sokkal inkább lehetővé teszi az elméletek logikai sorrendben való bemutatását, kezdve az öröklődés kérdéseiről alkotott korai, egyszerű elképzelésekkel, és fokozatosan haladva az összetett, molekuláris szintű magyarázatok felé. Mindezen felül a genetika tanítása számunkra élvezetet jelent, hiszen hasonlít egy izgalmas történet elbeszéléséhez, és mindenki tudja, hogy nem túlságosan szerencsés egy történetet a közepén kezdeni.

Ugyanakkor megpróbáltuk a könyvet oly módon szerkeszteni, hogy a tárgyat oktató kollégáinknak ne kelljen feltétlenül követniük az egyes fejezetek sorrendjét, hanem saját elképzeléseiknek megfelelően csoportosíthatják az anyagot.

Az 1. fejezet rövid bevezető a genetika történetébe, amely érinti a klasszikus és a molekuláris genetika legfontosabb kérdéseit. A fejezet elolvasása után a hallgatók már birtokába kerülhetnek azoknak a molekuláris szintű alapismereteknek, amelyek szükségesek a mendeli genetika megértéséhez. Ugyanakkor a másik megközelítést választók számára a fejezet betekintést nyújt az öröklődés alapelveibe.

A 2–5. fejezet a klasszikus, más néven transzmissziós genetikával foglalkozik. A 2. fejezet a mendeli öröklődést mutatja be, míg a 3. fejezet az attól eltérő törvényszerűségeket tárgyalja. A 4. fejezetet a kromoszómák bemutatásának szenteltük, végül a genetikai kapcsoltságot taglaló 5. fejezet zárja a könyv klasszikus genetikával foglalkozó első nagy egységét. Mindezek mellett itt térünk ki azoknak a statisztikai módszereknek az ismertetésére, amelyek elengedhetetlenek a kísérletek eredményeinek értékeléséhez, értelmezéséhez.

A könyv második nagy egysége foglalkozik a molekuláris biológiával. Azon belül a 6–12. fejezetekben kerítettünk sort az alapismeretekre, nevezetesen a DNS szerkezetére, replikációjára, transzkripciójára, illetve a fehérjészin-

tézisre, a translációra. Itt mutatjuk be a prokarióta és az eukarióta genom legfontosabb jellemzőit és a mutáció természetét.

A 13–18. fejezetek már a génműködés speciális vonatkozásaival foglalkoznak, így a genetikai manipulációval, a génklonozással, a baktériumok és a fajok genetikájával, a mozgó genetikai elemekkel, a fejlődésgenetikával, a rákbetegségek örökléstani kérdéseivel és az extranukleáris öröklődéssel, azaz a plazmidszok és a mitokondriumok genetikájával.

A tankönyv harmadik, egyben utolsó egysége egy újabb nagy területtel, a populációgenetikával foglalkozik, kitér a molekuláris szintű evolúció és a természetvédelmi genetika kérdéseire is.

Kiemelten fontosnak tartjuk a könyvben szereplő kísérleti vonatkozásokat. A genetika, más természettudományokhoz hasonlóan, nem pusztán tények halmaza, sokkal inkább a jelenségekkel kapcsolatos kérdések feltevésének és azok megválaszolásának sajátos módja. Éppen ezért, ahol csak lehetőség adódott rá, bemutattuk azokat a kísérleti módszereket és eredményeket, amelyek elvezettek jelenlegi genetikai ismereteinkhez. Törekedtünk arra, hogy a tananyag megértését minél több ábrával, grafikonnal, táblázattal segítsük. Ezzel párhuzamosan könyvünkben igyekeztünk kiemelt hangsúlyt helyezni a problémamegoldásra. Minden egyes fejezetben szerepelnek kidolgozott feladatok, amelyek a fejezet anyagát az alkalmazás szintjén kérik számon. Mindezek mellett a fejezetvégi kérdések között vannak olyanok is, amelyek hipotetikus kísérletek tervezését és értékelését igénylik a hallgatóktól. Ugyancsak kiemelt figyelmet fordítottunk a humángenetikai vonatkozások bemutatására, a genetika és az orvostudomány kapcsolatára, valamint a legújabb, éppen ezért számos nyitott kérdést is tartalmazó tudományos eredmények ismertetésére.

Tisztában vagyunk azzal, hogy a genetika, különösen annak molekuláris vonatkozásai, nem tartoznak a könnyen elsajátítható ismeretek közé, ugyanakkor azt is tapasztaltuk, hogy hallgatóink sokkal jobb eredményt érnek el akkor, ha igyekezünk érthető és világos képet festeni arról, milyen kérdéscélpontokkal és módszerekkel dolgoznak a genetikusok. Könyvünk célja is pontosan ez.

Robert F. Weaver és Philip W. Hedrick

ELŐSZÓ A MAGYAR KIADÁSHOZ

Hiánypótló művet tart kezében a tisztelt Olvasó, hiszen sok év telt el az utolsó magyar nyelvű, a klasszikus és a molekuláris genetika, valamint a populációgenetika kérdéseit is tárgyaló, egyetemi és főiskolai tankönyv megjelenése óta. Ez idő alatt a genetika tudománya, különösen annak molekuláris biológiai vonatkozásai, rendkívül sokat fejlődtek, nagyon nagy változáson mentek keresztül. Ugyanakkor ezt a fejlődést nem kísérte az egységes magyar nevezéktan kidolgozása. A magyar tankönyvekben, folyóiratokban ugyanarra a fogalomra, jelenségre számos szakkifejezés született, éppen ezért biztosan előfordulnak a fordításban olyan kifejezések, amelyek eltérnek egy-egy tudományos műhely szóhasználatától. Ez azonban nem lehet akadály a megértésnek, mivel a könyvben minden fogalom részletes magyarázattal szerepel. Néhány helyen meghagytuk az angol terminológiát, mert egyértelműen az terjedt el a magyar szaknyelvben is.

A könyv kiadása nagyon sok előkészületet igényelt. A fordítás első változata a mű előző kiadása alapján készült. Időközben a szerzők alaposan átdolgozták és bővítették könyvüket, ennek megfelelően a magyar kiadást is módosítani kellett.

Ebből következően mindenkinek rengeteg többletmunkát jelentett, aki részt vett a magyar nyelvű kiadás megjelenésében. A fordítók, lektorok, szerkesztők kiemelkedő és gondos munkája mellett ezúton is szeretnénk köszönetet mondani Török Judit kézirat-előkészítőnek a szakkifejezések helyesírásának ellenőrzéséért, Dudás Editnek a javítások pontos átvezetéséért, a Repro-Miló Stúdióknak a gondos tördelésért és nyomdai előkészítésért.

Külön szeretnénk megköszönni az ITSZB türelmét és nem utolsó sorban anyagi támogatását, ami nélkül ez az alap(tan)könyv nem jelenhetett volna meg magyar nyelven.

A Kiadó

1.

F E J E Z E T

Bevezetés

Tanulási program

- 1 A genetika három ága.
- 2 A mendeli vagy transzmissziós genetika alapjai.
- 3 A molekuláris genetika alapjai.

*Megszólítanak, mert ők én vagyok már;
gyenge létemre így vagyok erős,
ki emlékszem, hogy több vagyok a soknál,
mert az összejtig vagyok minden ős –
az Ős vagyok, mely sokasodni foszlik...*

József Attila



1.1. ábra. Gregor Mendel

Az Amerikai Természettudományi Múzeum Könyvtárszolgálatának engedélyével.
A negatív száma 219467

Mendel arra a következtetésre jutott, hogy az egyes tulajdonságok öröklődése részecskékhez, saját szóhasználatával élve faktorokhoz kötött, és a szülők-ből faktorok (genetikai egységek) jutnak át az utódokba. A faktorokat ma **géneknak** nevezzük. (A legfontosabb genetikai szakkifejezéseket, például a gént, a genotípust és a fenotípust Wilhelm Johannsen dán botanikus javaslatára vezették be az 1900-as évek elején, de a könnyebb érthetőség kedvéért Mendel kísérleteinek leírásakor használjuk ezt a terminológiát is.)

Mendel keresztezési kísérleteiben meghatározott tulajdonságokat (pl. mag alakja és színe, virágszín stb.) vizsgált, gondosan megszámlolta az utódnemzedékekben a különböző megjelenésű, azaz **fenotípusú** (pl. sárga, gömbölyű mag, fehér szirom) egyedeket, és eredményeiből fontos következtetéseket vont le. A fenotípus kifejezés a görög „phenomenon” – megjelenés szóból származik, a magas növésű borsó például magas fenotípust mutat. A fenotípus egy szervezet megfigyelhető, mérhető, kimutatható tulajdonságainak egész készletét is jelentheti.

A MENDEL-TÖRVÉNYEK

Mendel észrevette, hogy egy tulajdonsághoz több, különböző faktor tartozhat. Ez, mai szóhasználattal élve, azt jelenti, hogy az egyes tulajdonságokat meghatározó géneknek többféle változatuk, **alléljuk** lehet. A borsó magja például sárga vagy zöld színű, a magszínt meghatározó gén egyik allélja sárga, másik allélja zöld színt alakít ki. Továbbá, az egyik allél lehet **domináns** a másik, ún. **recesszív** allél felett. Ebben az esetben a sárga magszínt kialakító allél a domináns. Mendel mindezt zöld és sárga magvú borsók egymás közti keresztezésével mutatta ki. Az első utódnemzedékben (F_1) minden egyed sárga magvú volt. (A rövidítés a latin *filius* – fiú, *filia* – leány szóból származik. Az első filiális generáció, az F_1 a szülők közvetlen leszármazottait, fiait és leányait jelenti.) Amikor Mendel az F_1 sárga borsókat önterméke-

nyítéssel szaporította, újra megjelent néhány zöld magvú egyed. Az F_1 egyedek öntermékenyítésével kapott második utódnemzedékben (F_2) a sárga, illetve a zöld magot hozó egyedek aránya közelített a 3:1-hez.

Mendel mindebből arra a következtetésre jutott, hogy a zöld magszínt kialakító faktornak (allélnak) meg kellett őrződnie az F_1 nemzedék egyedeiben, még akkor is, ha nem volt hatása a magszíntre, nem jutott érvényre a fenotípusban. Magyarázata szerint a szülői nemzedék egyedei két példányban tartalmazzák a magszínt kialakító faktort (gént), vagyis a szülők a vizsgált jellegre nézve **diploidok**. A **homozigóta** egyedek ugyanannak a faktornak (génnek) két megegyező kópiáját (allélját) tartalmazzák, tehát két sárga, illetve két zöld színt kialakító faktor (allél) van bennük. A **heterozigóták** két különböző faktort (allélt) tartalmaznak a vizsgált tulajdonságra nézve. A fent vázolt első keresztezésben a szülők homozigóták voltak, míg az F_1 egyedek mindannyian heterozigóták. Mendel azt is kifejtette, hogy az ivarsejtek minden faktorból (allélból) csak egy-egy példányt hordoznak, azaz **haploidok**. A homozigóták ezért olyan ivarsejteket, vagyis **gamétákat** termelnek, amelyek csak egyféle faktort (allélt) tartalmaznak a vizsgált jellegre nézve, míg a heterozigóták ivarsejtjeiben bármelyik faktor (allél) előfordulhat.

Mindez magyarázatot ad a sárga és zöld magvú borsók keresztezésének eredményére. A sárga magvú szülői egyedek gamétái csak sárga magszínt kialakító allélt örökítenek, míg a zöld magvúaké csak zöld színt kialakítót. Tehát az összes F_1 egyed egy-egy sárga, illetve zöld színt meghatározó allélt örökölt. A zöld színt meghatározó allél nem veszett el, csak recesszív a sárga színt kialakító, domináns alléllal szemben, így az F_1 valamennyi egyede sárga magvú és heterozigóta. Amikor Mendel ezeket a heterozigóta egyedeket öntermékenyítéssel szaporította, azok egyforma mennyiségben termelték a sárga, illetve a zöld színt kialakító allélokat hordozó gamétákat, ami lehetővé tette a zöld fenotípus újbóli megjelenését az F_2 nemzedékben.

Tegyük fel, hogy van két zsákunk, és mindkettőben azonos számú sárga és zöld golyó. Ha a zsákokból kiveszünk egy-egy golyót, és párba állítjuk őket, kellően nagy számú próba után a következő eredményt kapjuk: a kihúzott párok 1/4-e sárga/sárga, 1/4-e zöld/zöld, a fennmaradó 1/2-ed pedig sárga/zöld szinkombinációjú lesz. Ugyanígy viselkednek a sárga és a zöld színt kialakító allélok is. Figyelembe véve, hogy a sárga színt meghatározó allél a domináns, az utódoknak csak 1/4 része lesz zöld magvú (zöld/zöld kombináció). A sárga fenotípusú egyedek aránya 3/4, ezek legalább egy sárga színt kialakító allélt örököltek. Ezért alakul ki 3:1-es fenotípus arány a második (F_2) utódnemzedékben.

Mendel hét tulajdonságot követett nyomon, és azt találta, hogy az azokat meghatározó faktorok (gének) egymástól függetlenül öröklődnek. Ha két tulajdonságot vizsgált, amelyeket két-két faktorpár (allélpár) örökölt (pl. sárga és zöld magszín, illetve gömbölyű és szögletes alakú szem, ahol a sárga és a gömbölyű a domináns jellegek) az F_2 nemzedékben 9:3:3:1 arányban kapott sárga/gömbölyű, sárga/szögletes, zöld/gömbölyű, illetve zöld/szögletes fenotípusú egyedeket.

Az egyes tulajdonságokat kialakító géneknek több különböző változatuk, alléljuk lehet. Előfordul, hogy az egyik allél domináns a másik felett, így a vizsgált gén két különböző alléljával rendelkező heterozigóta egyedek a domináns allél által meghatározott fenotípust mutatják. A recesszív allél hatása akkor jut érvényre, ha homozigóta formában fordul elő.

1.2. ÁTTEKINTÉS

A sejtciklus és a mitózis

A sejtciklus

Az eukarióta sejtek élete, a **sejtciklus** alapvetően két szakaszra osztható, az interfázisra és az osztódásra (Á.1.2.(a) ábra). A maganyag osztódását (mitózis) a citoplazma kettéválása (citokinézis) követi, a folyamat eredményeként két utódsejt, más szóval leánysejt képződik (Á.1.2.(b) ábra). A négy szakaszból álló mitózis a teljes sejtciklusnak csak kis részét jelenti, életének legnagyobb részében a sejt növekedési, ún. interfázisban van. Az **interfázis** három szakaszra osztható, a G_1 , az S és a G_2 szakaszokra. A G_1 fázis („gap” = rés) a mitózis után következik, a növekedés, az intenzív anyagcsere időszaka. Az ezt követő S fázisban történik a DNS-szintézis, a sejtmag DNS-állományának megkettőződése. A G_2 szakaszban a mitotikus osztódást közvetlen megelőző anyagcsere-folyamatok játszódnak le. Egyes speciálisan differenciálódott sejtípusok nem osztódnak, megrekednek az interfázis ún. G_0 szakaszában.

Mitózis

A mitózis a sejtciklusnak az a része, amelyben a sejtmag DNS-állománya megkezdődik, majd a sejtplazma kettéválásával két leánysejt keletkezik, amelyek kromoszómaszáma megegyezik a kiindulási sejtével (G_1). A mitózist négy szakaszra oszthatjuk: elő- (profázis), közép- (metafázis), utó-

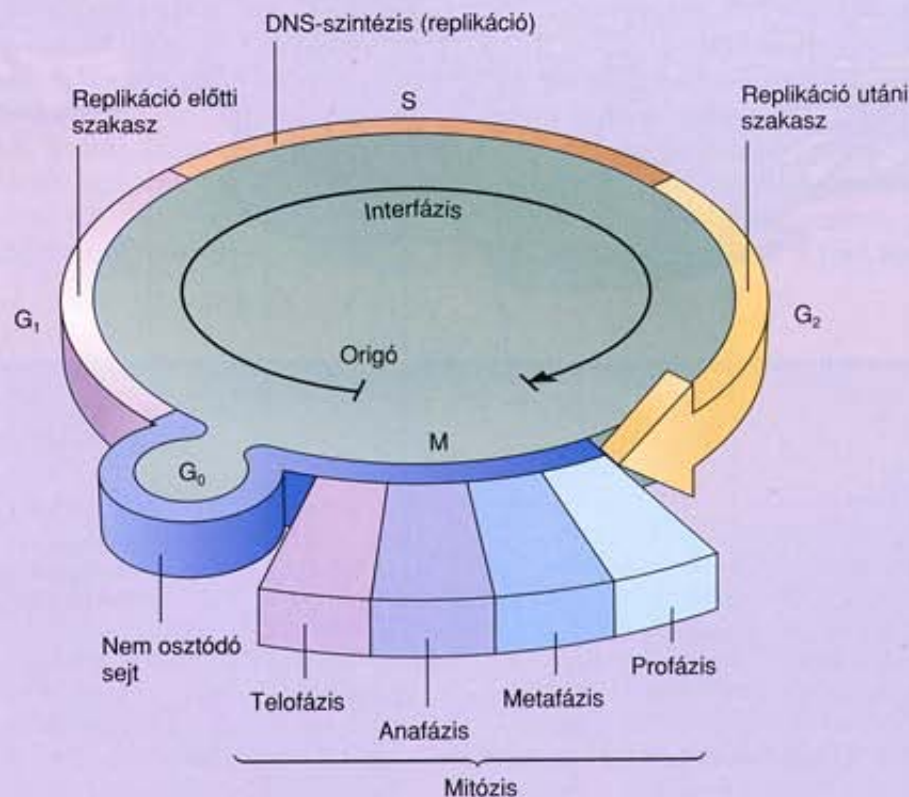
(anafázis) és végszakaszra (telofázis). Az egyes szakaszok jól jellemezhetők a kromoszómák szerkezetének alakulásával.

Profázis Az interfázis G_2 szakaszának végén a kromoszómák már megkettőződtek, mindegyikük két-két testvérkromatidából áll, amelyek a centromeronnal kapcsolódnak egymáshoz. A profázis a mitózis kezdetét jelenti, amikor a kromoszómák rövidülnek, kondenzálódnak. A centriolumok elválnak egymástól, és kialakul az osztódási orsó.

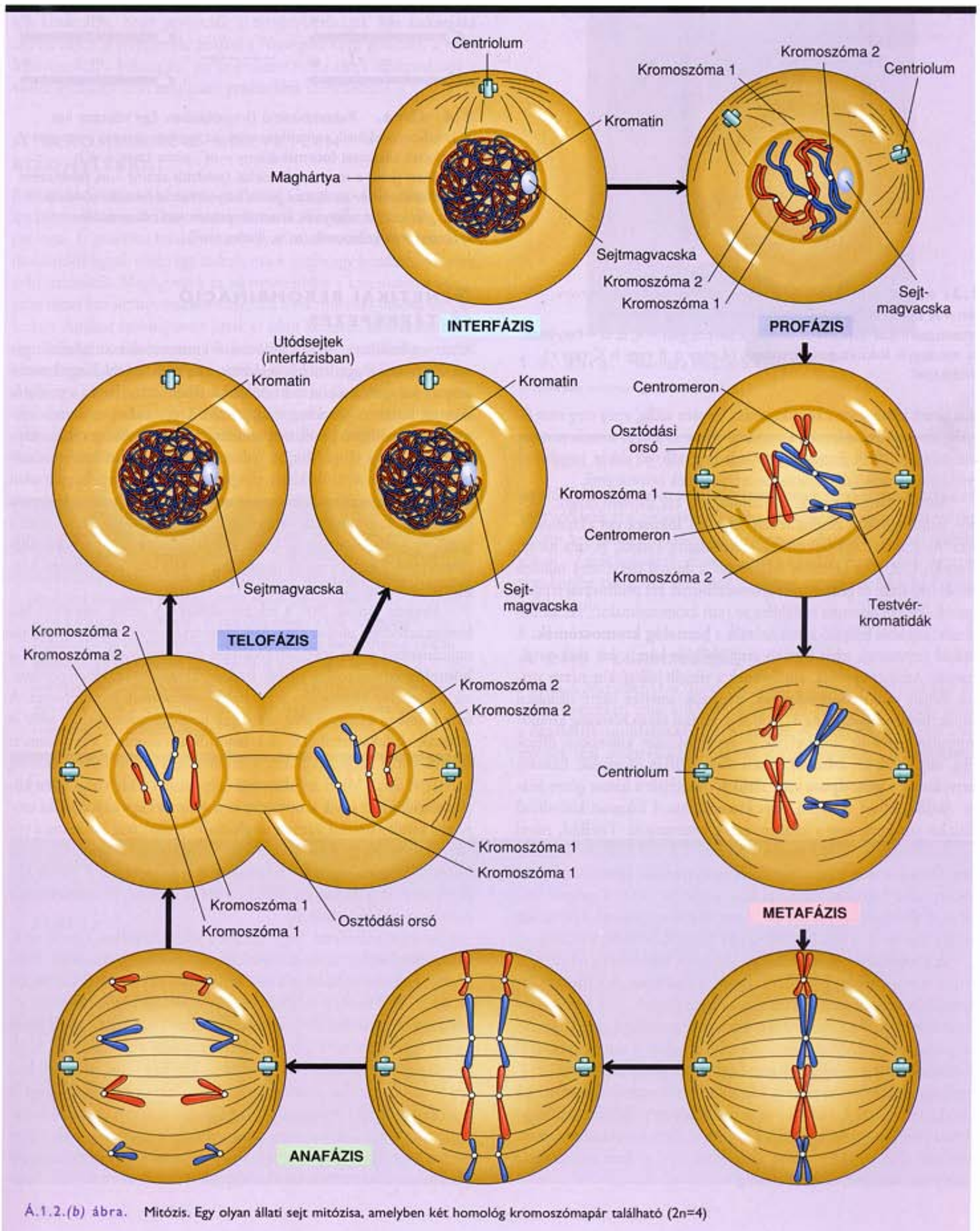
Metafázis Az osztódási orsó húzófonalai a kromoszómák centromerontjához kapcsolódnak, a maghártya lebomlik. A húzófonalak a kromoszómákat fokozatosan a sejt középső síkja felé mozgatják.

Anafázis Az osztódási orsó fonalai megrövidülnek, ennek hatására a kromoszómák testvérkromatidái a centromeronnal elválnak egymástól, és a sejt két ellentétes pólusára, a centriolumok felé mozognak. Az elvált testvérkromatidákat leánykromoszómáknak is nevezik.

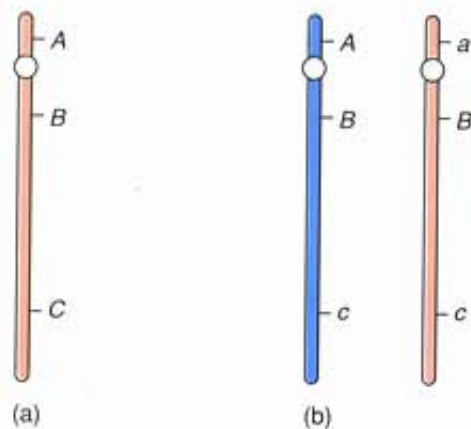
Telofázis A két kromoszómakészlet eléri a sejt ellentétes pólusait, megkezdődik letekeredésük, kialakul körülöttük a maghártya. A folyamat a citokinézissel, vagyis a sejtplazma befűződésével végződik. Az osztódás eredménye két utódsejt (leánysejt).



Á.1.2.(a) ábra. A sejtciklus. Egy eukarióta sejt sejtciklusának szakaszai. Azoknak az eseményeknek az együttesét, amelyek a sejtosztódás (mitózis) kezdetétől a következő sejtosztódásig lejátszódnak, **sejtciklusnak** nevezik



Á.1.2.(b) ábra. Mitózis. Egy olyan állati sejt mitózisa, amelyben két homolog kromoszómapár található ($2n=4$)



1.3. ábra. (a) Egy kromoszóma sematikus ábrája, három gén – A, B, C – helyének feltüntetésével. (b) Egy homológ kromoszómapár sematikus ábrája, a három gén – A, B, C – helyének és mindegyik lokusz genotípusának (A vagy a, B vagy b, C vagy c) jelölésével

nem sietett levonni ezt a következtetést, egészen addig, amíg meg nem figyelte két másik tulajdonság, a miniatűr szárny és a sárga testszín nemhez kötöttségét is (1910). Ennyi azonban már elegendő volt ahhoz, hogy meggyőződjön az öröklődés kromoszómaelméletének helyességéről.

Mielőtt továbblépnénk, tisztáznunk kell két alapvető dolgot. Először, minden génnek meghatározott helye, ún. **lokusza** van a kromoszómán. Az 1.3. ábra egy hipotetikus kromoszómát ábrázol, és rajta három génnek (A, B, C) a helyzetét. Másodsor, a diploid szervezetek minden különböző alakú és génsorozatú kromoszómának két példányával rendelkeznek (kivéve bizonyos esetekben az ivari kromoszómákat). Az azonos génsorozatokból felépülő kromoszómák a **homológ kromoszómák**. A diploid szervezetek tehát legtöbb génjükből két kópiát, két allélt tartalmaznak. Azok az egyedek, amelyeknek a vizsgált jelleg(ek)re nézve azonos alléljaik vannak **homozigóták**, míg azok, amelyek eltérő allélokkal bírnak, **heterozigóták**. Az 1.3.(b) ábra például olyan homológ kromoszómapárt mutat be, amelyeknek az egyik lokuszán különböző allélok (Aa), míg másik két lokuszán azonos allélok (BB és cc) vannak. Ennek a szervezetnek a **genotípusa** vagy allélikus összetétele a három génre nézve: AaBBcc. Mivel az egyed a két kromoszóma A lokuszán különböző allélokat tartalmaz, erre a lokuszra nézve heterozigóta. Továbbá, mivel mindkét kromoszóma B lokuszán a domináns B allél található, heterozigóta domináns azon a lokuszon. C lokuszán mindkét kromoszóma a recesszív c allélt hordozza, ezért arra heterozigóta recesszív. Végezetül, mivel az A allél domináns az a felett, a szervezet fenotípusosan a domináns jelleget mutatja az A és a B tulajdonságra nézve, C-re pedig a recesszívet.

A *Drosophila* fenotípusában megfigyelhető változatosság lehetőséget nyújt két másik fontos genetikai fogalom: a **vad típus** és a **mutáns** kifejezések bevezetésére. A vad fenotípus a leggyakoribb, vagy legalábbis az általánosan elfogadott standard fenotípusa egy populáció egyedeinek. A szó jelentéséből adódó tévedések elkerülésére (vad – nem tenyésztből származó) sok szerző inkább a **standard típus** megjelölést tartja követhetőnek. *Drosophila* esetében a vörös szem és a normál méretű szárny jelenti a vad típust. A *white* és a *miniature* gének megváltozása, mutációja okozza a mutáns egyedeken a fehér szemszínt, illetve a miniatűr szárnyat. A mutáns allélok – mint a fenti két esetben is –, gyakran recesszívek a vad típussal szemben, de nem mindig.



1.4. ábra. Rekombináció *Drosophilában*. Egy nőstény két X kromoszómájának sematikus rajza, az egyik (piros) a két gén vad típusú alléljaival (normál szárny – m^+ , piros szem – w^+); a másikon (kék) a mutáns allélokkal (miniatűr szárny – m , fehér szem – w). Peteéréskor az X-szel jelölt helyen rekombináció történik a két gén között, melynek eredményeként két rekombináns kromoszóma keletkezik (m^+w , illetve mw^+)

GENETIKAI REKOMBINÁCIÓ ÉS TÉRKÉPEZÉS

Könnyen belátható, hogy a különböző kromoszómákon lokalizált gének egymástól függetlenül öröklődnek, míg azok, amelyek egy kromoszómán helyezkednek el – hasonlóan a fehér szemszín és a miniatűr szárnyat kialakító génekhez – kapcsolatos. Ugyanakkor az azonos kromoszómán található gének nem mindig mutatnak teljes genetikai kapcsoltságot. Ezt a tényt Morgan fedezte fel, amikor ivari kromoszómához kötődő gének öröklődését vizsgálta. Annak ellenére, hogy a *white* és a *miniature* gének az X kromoszómán helyezkednek el, csak az utódok 65,5%-ában mutattak kapcsoltságot, míg az utódok 34,5%-ában a szülői egyedekétől eltérő, új kombinációk jelentek meg. A **rekombináns** egyedek tehát a szülői típusokhoz képest más összetételben hordozták a vizsgált allélokat.

Hogyan jönnek létre a rekombinánsok? A válasz már 1910-ben körvonalazódott, amikor a meiózis (gamétaképződés) mikroszkópos tanulmányozása során átkereszteződéseket (crossing over) mutattak ki a **homológ** kromoszómák között. Ezek az átkereszteződések eredményezik a homológ kromoszómák megfelelő szakaszainak kicserélődését. A fenti példában a heterozigóta nőstények petesejtképzése során a *white* és *miniature* allélokat tartalmazó X kromoszóma, valamint a vörös szem és normál szárny alléljait hordozó X kromoszóma között történt crossing over (1.4. ábra). Mivel az átkereszteződés valahol a két vizsgált gén között alakult ki, az egyik kromoszómán a *white* allél egy kapcsolódási csoportba került a normál szárnyat meghatározó alléllal, míg a másikon a vörös szemszín alléla a *miniature* alléllal. Mivel a folyamat az allélok új kombinációját eredményezi, **rekombinációnak** nevezzük. (Lásd az 1.3. Áttekintést és a hozzá kapcsolódó ábrát a meiózis folyamatáról és a crossing over kialakulásáról.)

Morgan feltételezte, hogy a gének a kromoszómákon egymás után, sorrendben helyezkednek el, hasonlóan egy gyöngyosor szemeihez. E hipotézis és a rekombinációról szerzett kísérleti eredményei alapján kimondta: minél távolabb található két gén egymástól a kromoszómán, annál nagyobb rekombinációjuk esélye. Ez érthető is, hiszen a távoli gének között egyszerűen több a hely az átkereszteződés kialakulásához. A. H. Sturtevant ezt a hipotézist kiterjesztette, mivel úgy vélte, hogy kell lennie olyan matematikai összefüggésnek, amely leírja a két gén távolsága és a gének közötti rekombináció gyakoriságának viszonyát. Állításának igazolására az ecetmuslicával végzett rekombinációs kísérletek eredményeit használta fel. Ezzel megteremtette a **genetikai térképezés** napjainkig is alkalmazott módszerének elméleti alapjait. Az 1930-as évekre más kuta-

tók kimutatták, hogy ugyanezek a törvényszerűségek más **eukarióta** szervezetekre is érvényesek, például a *Neurospora* nevű gombára, a vetyeményborsóra, a kukoricára, sőt az emberre is. Az elvek alkalmazhatók a valódi sejtmagot nem tartalmazó **prokarióta** szervezetekre is.

A REKOMBINÁCIÓ KÖZVETLEN BIZONYÍTÉKAI

Barbara McClintock (1.5. ábra) és Harriet Creighton 1931-ben közvetlen bizonyítékát is adták a rekombinációnak. Vizsgálataikhoz a kukorica citológiai és genetikai módszerekkel egyaránt azonosítható speciális kromoszómáját (egyik végén egy csomó, másik végén egy hosszabb nyúlvány volt) használták. Megfigyelték az átkereszteződést a kromoszóma jellegzetes részei között, ugyanakkor vizsgálták a rekombináns utódok megjelenését. Amikor crossing overt láttak az adott kromoszómaszakaszok között, mindig sikerült kimutatniuk a rekombinációt genetikailag is. Ezzel bizonyították, hogy közvetlen összefüggés van a kromoszóma egy szakasza és egy gén között. Rövid idővel McClintock és Creighton kukoricán végzett vizsgálatai után C. Stern megfigyelte a jelenséget ecetmuslicában is. Így növényekben és állatokban is találtak közvetlen és közvetett bizonyítékot a rekombinációra.

Az öröklődés kromoszómaelmélete szerint a gének lineárisan helyezkednek el a kromoszómákon. Ennek magyarázata, hogy egyes tulajdonságok kapcsoltan öröklődnek, abban rejlik, hogy ezeket a jellegeket meghatározó gének ugyanazon a kromoszómán találhatóak. A meiózis során a két homológ kromoszóma között fellépő rekombináció átrendezheti a szülői allélokat, az átkereszteződés révén a szülőkéhez eltérő kombinációk alakulhatnak ki. Minél távolabb helyezkedik el két gén egymástól a kromoszómán, annál nagyobb közöttük a rekombináció valószínűsége.



1.5. ábra. Barbara McClintock

A Bettmann Archivum gyűjteményéből

MOLEKULÁRIS GENETIKA

Az előzőekben ismertetett kutatási eredmények sokat elárulnak arról, miként adódnak át a gének az utódokba, sőt arról is, hogyan lehet meghatározni helyüket a kromoszómákon, de nem adnak információt felépítésükről és működésükről. Ezek a kérdések már a molekuláris genetika témakörébe tartoznak, amelynek gyökereit ugyancsak Mendel korában kell keresni.

A DNS FELFEDEZÉSE

Friedrich Miescher (1.6. ábra) 1869-ben a sejtmagból kivont egy vegyületkeveréket, amit nukleinnak nevezett el. A nuklein nagy részét a **dezoxiribonukleinsav (DNS)** alkotja. A XIX. század végére a vegyészek már ismerték a DNS és egy rokon vegyület, a **ribonuklein-**

1.3. ÁTTEKINTÉS

Meiózis

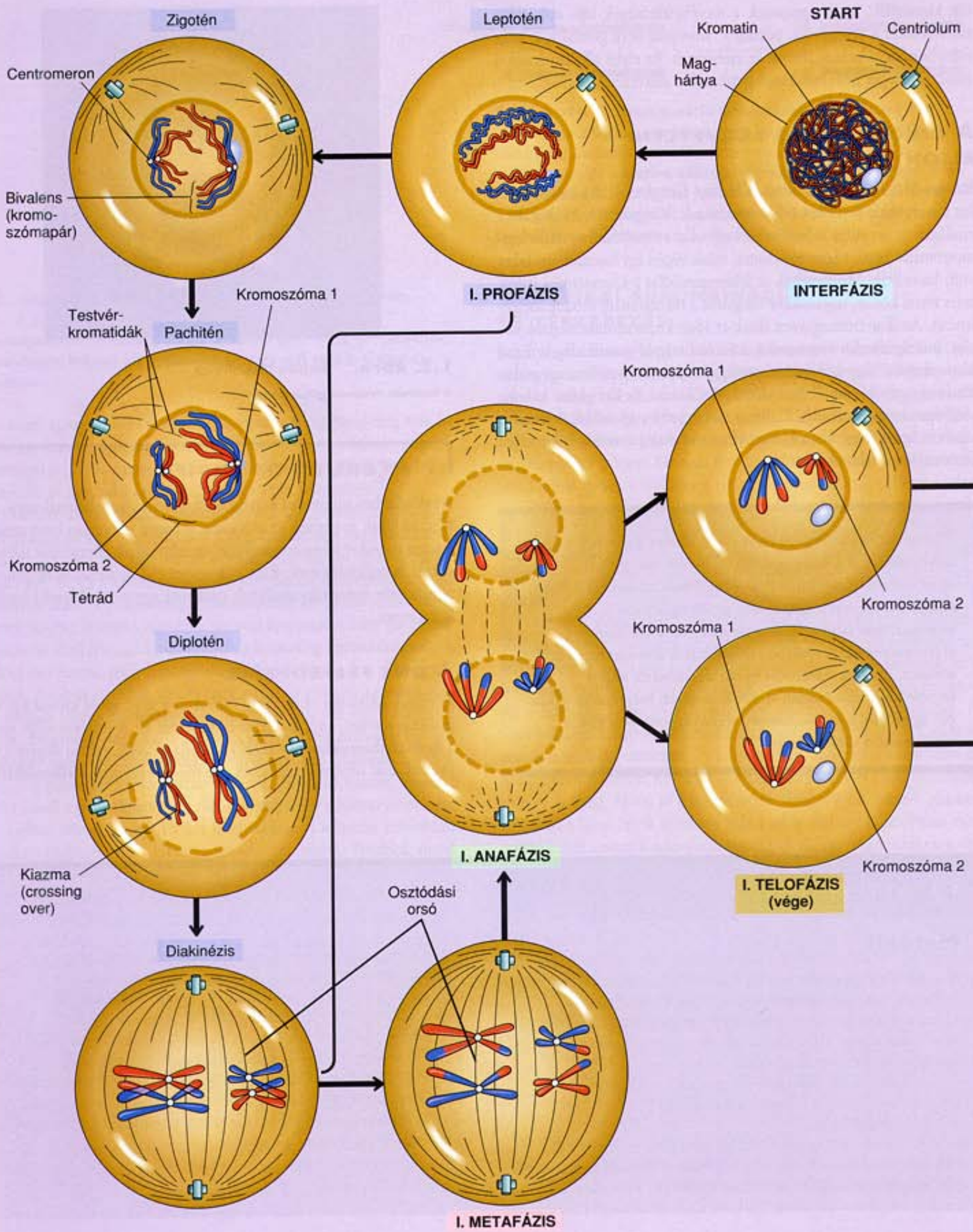
A meiózis lényegében két osztódási szakaszból áll, és olyan utódsejteket (ivarsejtek, spórák) eredményez, amelyekben a kromoszómaszám a kiindulási érték fele. Ha a megtermékenyítés előtt a kromoszómaszám nem feleződne meg, akkor a következő generációban a kromoszómaszám mindig kétszerese lenne az előzőének.

A meiózis során allélcserélődés játszódhat le a homológ kromoszómák között, az átrendeződést eredményező crossing over az I. profázisban történik.

A meiózis, a mitózishoz hasonlóan szakaszokra tagolható (Á.1.3. ábra). Az I. fázis (meiózis I.) részei: az I. profázis (a homológ kromoszómák párt alkotnak, és rekombináció történik köztük), az I. metafázis,

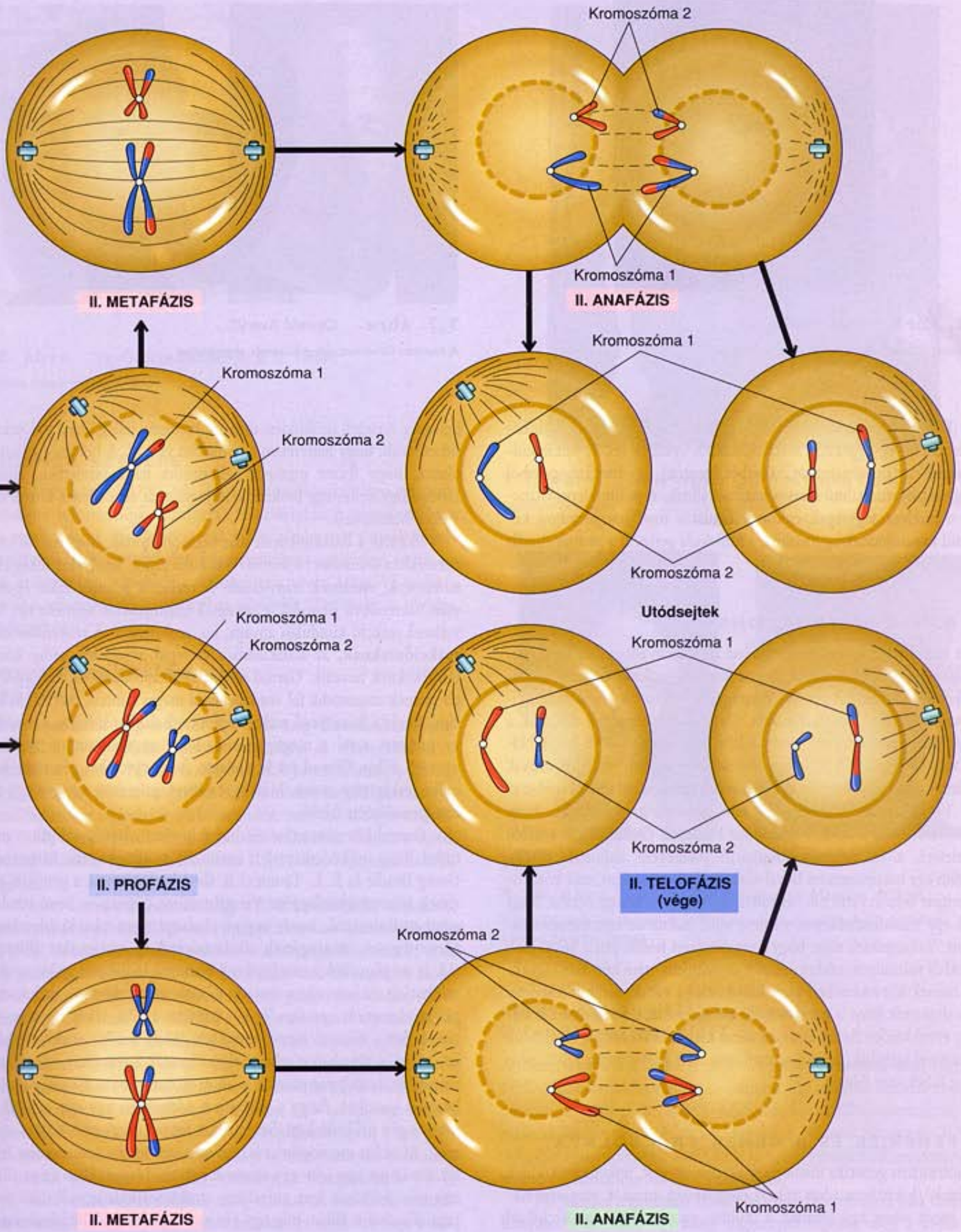
az I. anafázis (a mitózissal szemben nem a testvérkromatidák, hanem a homológ kromoszómák válnak el egymástól, és vándorolnak a sejt ellentétes pólusaira) és az I. telofázis. A mitózishoz hasonló második fázis (meiózis II.) a II. profázisban kezdődik, amit a II. metafázis, a II. anafázis (a kromoszómák testvérkromatidái a centromeronnál elválnak, a leánykromoszómák a sejt ellentétes pólusaira vándorolnak), végül a II. telofázis követ. A meiózis végeredménye négy utódsejt, amelyekben a kromoszómaszám fele a szülői sejtnek. Az Á.1.3. ábrán a szülői sejtnek négy kromoszómája van (két homológ pár), és a keletkező négy utódsejt mindegyikébe 2-2 kromoszóma kerül.

MEIÓZIS I.



Á.1.3. ábra. Meiózis. A számflező osztódás vázlatos áttekintése egy olyan sejtben, amelynek két kromoszómapárja van

MEIÓZIS II.





1.6. ábra. Friedrich Miescher

A Nemzeti Orvostudományi Könyvtár engedélyével

sav (RNS) kémiai összetételét is. Mindkettő hosszú polimer molekula, és kisebb egységekből, nukleotidokból épülnek fel. A nukleotid-egységek egy öt szénatomos cukorból (pentóz), egy foszfátcsoportból és egy nitrogéntartalmú szerves bázisból állnak. A polinukleotid-láncban a nukleotidegységek cukormolekulái a foszfátcsoportokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz, a molekula gerincét a pentóz-foszfát láncolat adja.

A GÉNEK ANYAGA: DNS

Mire az öröklődés kromoszómaelmélete általánosan elfogadottá vált, a genetikusok egyetértettek abban, hogy a kromoszómáknak valamilyen polimerből kell állniuk. Ezt tartották összegegyeztethetőnek a gének lineáris elhelyezkedésével a kromoszómákon. De milyen polimerből állhatnak a gének? Lényegében három választási lehetőség adódott: DNS-ből, RNS-ből vagy fehérjéből. A Miescher-féle nukleon ugyanis – a nukleinsavak mellett – nagy mennyiségben tartalmazott aminosavakból álló fehérjét is.

1944-ben Oswald Avery (1.7. ábra) munkatársaival kimutatta, hogy az örökítő anyag a DNS. Munkájukat Frederick Griffith egyik korábbi kísérletére, a baktériumtranszformáció jelenségére alapozták (1928). Griffith egy baktériumtörzs hővel elölt, eredetileg virulens, azaz kórokozó sejtjeit összekeverte élő, avirulens sejtekkel, és azt tapasztalta, hogy azok egy része fertőzőképes, virulens sejté alakult át, azaz transzformálódott. Valószínűnek tűnt, hogy a virulenciáért felelős gén a hővel elölt sejtekből valamilyen módon átkerült az avirulens, nem kórokozó sejtekbe, aminek következtében azok kórokozóká váltak. Griffith kísérletei nem derítettek fényt a transzformáló anyag kémiai természetére. Jó néhány évvel később Avery és munkatársai kémiai és biokémiai vizsgálatok sorozatával igazolták, hogy a transzformációért felelős anyag DNS, nem pedig RNS vagy fehérje.

A FEHÉRJÉK ÉS A GÉNEK KAPCSOLATA

A molekuláris genetika másik nagy kérdése az volt, miként működnek a gének? A kérdésre adott választ megalapozó munkák megismeréséhez ismét vissza kell térnünk a múltba, egészen 1902-ig. Archibald Garrod ekkor figyelt fel arra, hogy az alkaptonuria nevű ritka, emberi



1.7. ábra. Oswald Avery

A Nemzeti Orvostudományi Könyvtár engedélyével

betegség mendeli öröklődést mutató, recesszív jelleg, ezért valószínűsíthető volt, hogy háttérében egy mutáns gén áll. A betegség jellemző tünete, hogy fekete pigment halmozódik fel a vizeletben, amiről Garrod úgy vélte, egy biokémiai anyagcsereút rendellenes köztes termékéből származik.

Ekkorra a biokémikusok már bebizonyították, hogy az élő szervezetekben számtalan biokémiai átalakulás zajlik, amelyeket fehérjekatalizátorok, **enzimek** irányítanak. A reakciók jelentős része egymás után, sorrendben játszódik le, az egyik enzimreakció terméke egy következő reakció kiindulási anyaga, ún. szubsztrátja. A reakcióláncokat **reakcióutaknak**, az átalakulásban szereplő anyagokat pedig köztes termékeknek nevezik. Garrod szerint az alkaptonuria esetén egy köztes termék szaporodik fel rendellenesen magas szinten, mert az az enzim, amely a következő reakciólépésben átalakítaná, hibás. Összevetve mindezt azzal a megfigyeléssel, hogy az alkaptonuria recesszív mendeli jelleg, Garrod azt feltételezte, hogy egy hibás gén terméke a működésképtelen enzim. Másképpen megfogalmazva: egy gén egy enzim termeléséért felelős.

Garrod következtetése részben feltevésen alapult, valójában nem tudta, hogy működésképtelen enzim áll az alkaptonuria háttérében. Georg Beadle és E. L. Tatum (1.8. ábra) bizonyították a gének és enzimek közötti összefüggést. Vizsgálataikhoz *Neurospora* nevű tömlősgombát alkalmaztak, amely nagyon jó alanya a genetikai kísérleteknek. Mesterségesen, **mutagének** alkalmazásával új mutánsokat állítottak elő, és megfigyelték a mutációknak bizonyos biokémiai utakra gyakorolt hatását. Számos olyan mutánst találtak, amelyekben az általuk vizsgált anyagcsereút egyetlen lépését érintette a hiba, tehát egyetlen enzimet. Azt a hiányzó köztes terméket, amely a hibás enzim terméke lett volna, a táptalajhoz adva, helyreállították a tenyészet normál növekedését, ezzel bizonyították az adott enzim hiányát. Genetikai kísérletekkel igazolták, hogy a változások háttérében egy-egy gén áll. A mutáns gén működésképtelen enzimet termel (vagy nem termel enzimet). Másként megfogalmazva, egy gén egy enzim termeléséért felelős. Ez az ún. egy gén–egy enzim hipotézis. Napjainkban ez az állítás már nem pontosan igaz, mivel egy enzimmolekula egynél több polipeptidláncból is állhat, míg egy gén csak egy lánc előállításának információját tartalmazza.



(a)

(b)

1.8. ábra. (a) George Beadle. (b) E. L. Tatum

AP/Wide World Photos felvételei

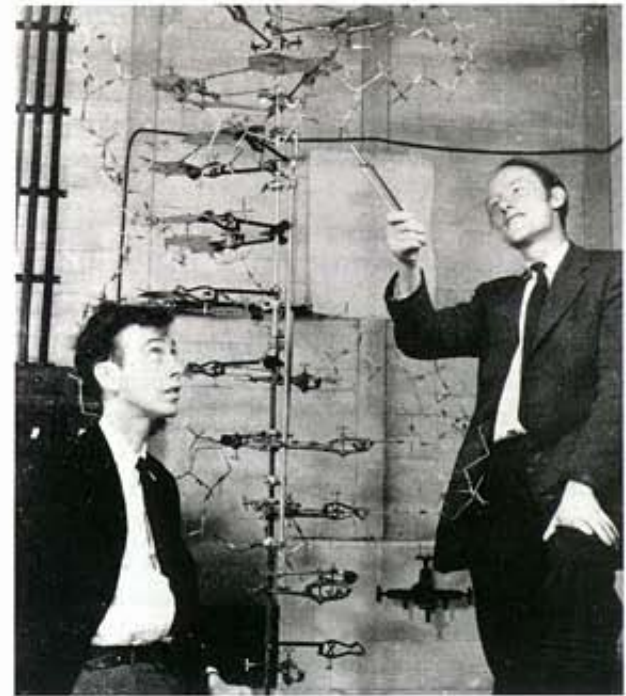
A GÉNEK SZEREPE

Láttuk, hogy a gének DNS-ből állnak, és mindegyikük egy-egy polipeptidlánc információját hordozza. A valóságban a géneknek nem csak egy feladatuk van. Szerkezetük révén alkalmasak a megkettőződésre (replikáció), az RNS és a fehérjeszintézis vezérlésére, végül, de nem utolsósorban a mutációk felhalmozása révén lehetővé teszik a genetikai változatosságot, és ezzel az evolúciót. Tekintsük át röviden mindegyiket.

Hogyan replikálódnak a gének?

Miként kettőződik meg a DNS? A kérdés megválaszolásához ismerünk kell a DNS-molekula pontos szerkezetét és elhelyezkedését a kromoszómában. A DNS szerkezetének titkát James Watson és Francis Crick (1.9. ábra) fejtette meg 1953-ban. A modell megalkotásához felhasználták azokat a kémiai és fizikai adatokat, amelyek addig összegyűltek a DNS szerkezetéről. Ezek közül kiemelkedően fontosak voltak Rosalind Franklin és Maurice Wilkins (1.10. ábra) röntgendiffrakciós vizsgálatai.

Watson és Crick feltételezte, hogy a DNS **kettős hélix** szerkezetű, a molekulát felépítő két DNS-szál csigalépcsőszerűen feltekeredik egymás körül. A bázisok mindkét szálon a hélix belseje felé néznek, és az egyik szálon lévő bázisok párt alkotnak a másik szál bázisaival. A molekulában négyféle bázis fordul elő: adenin (A), guanin (G), citozin (C) és timin (T), és az adenin a timinnel, a guanin a citozinnal képes bázispárt kialakítani. Az egyik szál adeninjével szemben ezért a másik szálon timin, guaninjával szemben pedig citozin áll, és fordítva. Így a két polinukleotid-lánc komplementere (kiegészítője) egymásnak, az egyik szál bázissorrendje egyértelműen meghatározza a másikat. Ez a komplementaritás a megkettőződés (replikáció) biztosítója. A **replikáció** során a két polinukleotid-lánc eltávolodik egymástól, és a szintézist irányító enzimek a régi szálat mintaként (templát) használva, a bázispároképzés (A=T, G=C) szabályait követve, felépítik az új szálat. A replikáció **szemi-konzervatív**, mivel a képződő kettős hélixben az egyik szál régi, a másik pedig új.



1.9. ábra. James Watson (balra) és Francis Crick

Bettmann Archivum



(a)

(b)

1.10. ábra. (a) Rosalind Franklin. (b) Maurice Wilkins

Fotó (a) Cold Spring Harbor. (b) Wilkins professzor engedélyével, King's College, London, Biofizikai Tanszék

Hogyan irányítják a gének a fehérjeszintézist?

A fehérjeszintézishez szükséges információkat a **genetikai kód**, vagyis a DNS-molekula bázissorrendje tartalmazza. Az információátadás első lépésében az egyik DNS-szálról RNS másolat készül (transzkripció). A második lépésben ennek, az ún. hírvivő RNS-nek (messenger RNS, mRNS) a bázissorrendje fordítódik le a fehérjemolekula aminosavsorrendjére a riboszóma felületén (transzláció).

Mi jellemzi a genetikai kódot? Marshall Nirenberg és Har Gobind Khorana (1.11. ábra) egymástól függetlenül fejtették meg a kódot az 1960-as évek elején. A genetikai kódban három bázis alkot egy jelet,

vagyis ez felel meg egy aminosavnak. Az mRNS bázishármasai **kodonok**. A lehetséges 64-féle (4^3) bázis tripletből 61 jelent a valóságban is aminosavat, a fennmaradó három stopjel. A szintézis során a riboszómák „leolvassák” az mRNS bázishármasait, és hozzákapcsolják a megfelelő aminosavat a növekvő fehérjelánchoz. A stopjelnél a szintézis megáll, a kész polipeptidlánc leválik.

Miként halmozódnak fel a mutációk a génekben?

A gének bázissorrendjének megváltozása, a **mutáció** sokféleképpen bekövetkezhet. A legegyszerűbb eset a gén- vagy pontmutáció, amikor egyetlen bázis cserélődik ki egy másikra. Például, ha egy génben a GAG kodon, ami a glutaminsav nevű aminosavat kódolja, GTG-re változik, akkor jelentése is módosul, hiszen ez a bázishármas a valint kódolja. A megváltozott bázissorrendű génről készülő fehérje valint tartalmaz ott, ahol glutaminsavnak kellene lennie. Bár ez a változás csak egyetlen aminosavat érint az általában több száz monomerből álló fehérjében, mégis mélyreható következménye lehet. Ilyen báziscserét mutattak ki az emberi hemoglobin szintéziséért felelős génben, aminek következménye lehet a sarlósejtes vérszegénység nevű betegség. A génekben nagyobb változások is bekövetkezhetnek, például egyes szakaszok kieshetnek (deléción), vagy idegen szakaszok beékelődhetnek (inszerción). Minél nagyobb mértékű a változás, annál valószínűbb, hogy az érintett gén terméke működésképtelen lesz.



1.11. ábra. Har Gobind Khorana (balra) és Marshall Nirenberg.

Bettmann Archivum

Génklónozás

Az elmúlt években a kutatók rájöttek arra, hogyan különíthetnek el, azaz izolálhatnak géneket, miként építhetik be és sokszorozhatják meg azokat más szervezetekben. Mindezeket az eljárásokat összefoglaló néven **génklónozásnak** nevezzük. A klónozott gének nemcsak nyersanyagai a molekuláris genetikai vizsgálatoknak, hanem felhasználásukkal nagy mennyiségben előállítható az általuk kódolt fehérje is. Így állítják elő többek között a gyógyászatban használt emberi inzulint, illetve az egyik véralvadási faktort. Az izolált gének átültethetők növényekbe, állatokba, alkalmazhatók a befogadó szervezet tulajdonságainak megváltoztatására. Felhasználásuk új távlatokat nyit a mezőgazdaságban és az öröklődő emberi betegségek gyógyításában.

A legtöbb szervezet genetikai állománya kettős hélix szerkezetű DNS-ből épül fel. Ezzel a konformációval jól magyarázható a gének replikációja, mutáció- és információhordozó szerepe. A DNS két szála komplementer, így a megkettőződés során mindkét szál mintaként szolgál egy-egy új szál szintéziséhez. A genetikai kódot a gén nukleotid-sorrendje jelenti, ami az információátadás során először mRNS-re íródik át. Az mRNS bázissorrendjének lefordítása a tulajdonságokat kialakító fehérjék aminosavsorrendjére a riboszómákon történik, a fehérjeszintézis folyamatában. A gének bázissorrendjének megváltozása mutációt eredményezhet, mivel módosulhat a fehérjék aminosav-sorrendje, és ezzel működése is. A genetikai változatosságot a mutációk felhalmozódása okozza az élőlények genetikai állományában.

MIÉRT ÉRDEMES GENETIKÁT TANULNI?

Eddig tartott rövid bevezetőnk a genetika tudományába. A történet legfontosabb mérföldköveit az 1.1. táblázatban foglaltuk össze. A soron következő fejezetek részletesen ismertetik majd az itt felvázolt témákat, és betöltik azokat a hiányzó részeket, amelyeket szükségszerűen hagytunk. A tudomány, amellyel ismerkedni kezdenek, lebilincselő. Gyökerei egészen a történelem előtti időkbe nyúlnak vissza, amikor őseink válogatni kezdték a gazdagabban termő gabonaszemeket, az előnyösebb tulajdonságokat mutató állatokat, hogy azokat szaporítsák tovább. Ugyanakkor olyan távlatokat nyit a jövőbe, mint a génterápia. Aligha lehet valami fontosabb ennél eljövendő világunk megértéséhez, hiszen a legmélyrehatóbb változásokat az orvostudományban, a mezőgazdaságban minden bizonnyal a génmanipuláció hozza majd.

A legújabb gyógyszerek között már napjainkban is számos olyan van, amelyek klónozott gének termékei. Ilyen például a cukorbetegség kezelésére használt inzulin, a hipofízis törpenövés kiküszöbölésére alkalmas növekedési hormon, a rákbetegek gyógyításában használt interleukin-2. A tudósok már megtalálták az örökletes cisztás fibrózis és a Duchenne-féle disztrófia (izomsorvadás) hibás génjeit, és azt kutatják, miként lehetne ezeket a betegségeket a normális gén bejuttatásával kiküszöbölni. Vizsgálják azt is, hogyan lehet bizonyos gének beépítésével a természetett növények betegségekkel, kártevőkkel szembeni ellenálló képességét fokozni.

1.1. táblázat. A genetika történetének időrendi áttekintése

1859	Charles Darwin	Megjelenteti <i>A fajok eredete</i> c. művét
1865	Gregor Mendel	Felfedezi a szegregáció és a független öröklődés elvét
1869	Friedrich Miescher	Felfedezi a DNS-t
1900	Hugo de Vries, Carl Correns, Erich von Tschermak	Újra felfedezik Mendel törvényeit
1902	Archibald Garrod	Feljegyzik az első örökletes betegséget
1902	Walter Sutton, Theodor Boveri	Megfogalmazzák a kromoszómaelméletet
1908	G. H. Hardy, Wilhelm Weinberg	Megfogalmazzák a Hardy-Weinberg-szabályt
1910, 1916	Thomas Morgan, Calvin Bridges	Bizonyítják, hogy a gének a kromoszómákon találhatók
1913	A. H. Sturtevant	Genetikai térképet szerkeszt
1927	H. J. Muller	Röntgenbesugárzással mutációt indukál
1931	Harriet Creighton, Barbara McClintock	A rekombináció citológiai bizonyítékát adják
1941	George Beadle, E. L. Tatum	Felállítják az egy gén-egy enzim elméletet
1944	Oswald Avery, Colin McLeod, Maclyn McCarty	Bizonyítják, hogy az örökítő anyag a DNS
1953	James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins	Leírják a DNS szerkezetét
1958	Matthew Meselson, Franklin Stahl	Bizonyítják a szemikonzervatív DNS-replikációt
1961	Sidney Brenner, François Jacob, Matthew Meselson	Felfedezik a messenger RNS-t
1966	Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana	Befejezik a genetikai kód megfejtését
1972	Paul Berg	Előállítja az első élő in vitro rekombináns DNS-t
1973	Herb Boyer, Stanley Cohen	Elsőként alkalmaznak plazmidot DNS-klónozára
1977	Walter Gilbert, Frederick Sanger	Módszert dolgoznak ki a DNS szekvenciájának meghatározására
1977	Frederick Sanger	Meghatározza egy teljes vírusgenom, a OX174 bázisszekvenciáját
1977	Philip Sharp, Richard Roberts és mások	Felfedezik, hogy az eukarióta géneket intronok szakítják meg
1990	Lap-Chee Tsui, Francis Collins, John Riordan	Megtalálták a cisztás fibrózis génjét
1990	James Watson és sokan mások	Elkezdődik a Humán Genom Projekt, az ember teljes genomjának feltérképezésére, a bázissorrend meghatározására
1991	W. French Anderson és sokan mások	Az első sikeres génterápiás eljárás: két leány kezelése, akik súlyos immunhiányos állapotban szenvedtek („bubble-boy” szindróma)
1993	Huntington-kór kutatócsoport	Azonosítják a Huntington-kór génjét
1995	Craig Venter, Hamilton Smith	Meghatározzák két baktérium, a <i>Hemophilus influenzae</i> és a <i>Mycoplasma genitalium</i> genomjának bázissorrendjét. Ezek az első szabadon élő szervezetek, amelyeknek genomját szekvenálták
1996	Több kutatócsoport	Meghatározzák az első eukarióta szervezet, a sütőélesztő (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) genomjának bázissorrendjét

A genetikai manipuláció az előnyök mellett hatalmas kockázatot is jelent, ezért komoly viták folynak arról, szabad-e egyáltalán ilyen eszközöket alkalmaznia az emberiségnek. Mindezek miatt elengedhetetlenül szükséges, hogy tájékozottak legyünk a genetika tudományának alapvető kérdéseiben, hiszen csak így tudunk felelősséggel dönteni ezekben a nagyon fontos kérdésekben. F. H. Westheimer, a Harvard Egyetem nyugalmazott kémiai professzora szerint: „...Az utóbbi negyven év legnagyobb intellektuális forradalma valószínűleg a biológiában zajlott le. Lehet-e ma műveltnek tekinteni valakit, aki nem ért egy keveset a molekuláris biológiához?”

ÖSSZEFOGLALÁS

A genetika tudománya három fő területre osztható. A transzmissziós genetika a tulajdonságok nemzedékről nemzedékre történő átadását tanulmányozza; a molekuláris genetika a gének szerkezetét, működését vizsgálja a molekulák szintjén; a populációgenetika a populációk genetikai összetételét és annak változásait tanulmányozza. A három terület szorosan összefügg egymással.

A tulajdonságokat meghatározó gének különböző változatai az allélok. Egy gén recesszív alléljának hatását a heterozigóta egyedekben elfedheti egy másik, domináns allél. A recesszív allél azonban nem tűnik el, a homozigóta recesszív utódokban hatása érvényre juthat.

A gének egymás után, meghatározott sorrendben helyezkednek el a kromoszómákon. Az egy kromoszómán található gének kapcsoltan öröklődnek, de a meiózis során a homológ kromoszómák között fellépő rekombinációnak köszönhetően a szülőitől eltérő allélkombinációk is kialakulhatnak a gamétákban. Minél távolabb van két gén egymástól a kromoszómán, annál nagyobb a rekombináció valószínűsége.

A gének döntő többségét két polinukleotid-láncból álló, kettős hélix szerkezetű DNS építi fel. A két szál komplementer: az egyik szál bázissorrendje egyértelműen meghatározza a másikat. A replikáció során a két szál elválik egymástól, és a bázispárképzés szabályainak megfelelően mindkettő mellett felépül egy-egy új szál. A gének bázissorrendje határozza meg a tulajdonságokat kialakító fehérjék aminosavsorrendjét. A bázissorrend megváltozása, a mutáció módosíthatja a kódolt fehérje szerkezetét és működését.

1.

R É S Z

Mendeli genetika

- 2** A mendeli genetika alapjai 18
- 3** A mendeli genetika kiterjesztése és alkalmazásai 42
- 4** A kromoszómák és az öröklődés 73
- 5** A genetikai kapcsoltság 104



Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel mitózissal osztódó sejtről. Jól láthatók a kromoszómák és az osztódási orsó

© Conly L. Rieder/BPS/Tony Stone Images

2.

F E J E Z E T

A mendeli genetika alapjai

Tanulási program

- 1 A hasadás elve, amely szerint egy gén különböző alléljai átadódnak egyik generációról a másikra.
- 2 A független kombinálódás elve, amely meghatározza, hogy a különböző gének genetikai változatai miként adódhatnak át az utódokba.
- 3 A Mendel-szabályok leírása valószínűségi modellekkel.
- 4 A khi-négyzet próba alkalmazása genetikai adatokra.
- 5 Genetikai modellek alkalmazhatósága az emberi jelek öröklődésének leírására.

*Gregor Mendel az alatt a tíz év alatt,
amíg a rendház kertjében növényeivel
kísérletezett, az elmúlt ötszáz év talán
legnagyobb biológiai felfedezését tette meg.*

Thomas Hunt Morgan

Az emberek már több évszázada rájöttek arra, hogy a szülők tulajdonságai megjelennek az utódokban, az öröklődés titkát azonban egészen a XX. századig nem sikerült megfejteniük. Az átöröklés mechanizmusára vonatkozóan egészen a XIX. század közepéig elfogadott volt a **pángenezis** elmélete, mely szerint a test különböző részeiből a szülők tulajdonságai valamilyen módon átjutnak az ivarsejtekbe, és keveredésük eredményeként alakulnak ki az utódok jellegzetességei. 1866-ban Gregor Mendel nyilvánosságra hozta megfigyeléseinek eredményeit, és megfogalmazta a tulajdonságok **diszkrét öröklődésének** elvét. Kifejtette, hogy a jellegek öröklődése részecskékhez, faktorokhoz kötött, és ezek a genetikai egységek adódnak át nemzedékről nemzedékre. A mendeli faktorokat ma **géneknek**, különböző változataikat pedig **alléloknak** nevezzük.

Mendel zseniálisan alkalmazta korának kísérleti módszereit. Munkája megalapozta az öröklődés génelméletét, megfigyeléseit a későbbi molekuláris szintű vizsgálatok is megerősítették. Az utóbbi években azon gének közül is vizsgáltak néhányat molekuláris genetikai módszerekkel, amelyeknek öröklődését Mendel tanulmányozta.

A HASADÁS ELVE

Mendel nem véletlenül tudott magyarázatot adni az öröklődés lényegére vonatkozóan, hiszen a kérdéssel már számos kutató foglalkozott előtte is. Sikerét alapvetően három ténynek köszönhetette. Először is felismerte, hogy az öröklődés alapelveinek megértéséhez tapasztalatait írásban kell rögzítenie, és megfigyeléseit matematikai módszerekkel kell elemeznie, értékelnie. Ez az igénye valószínűleg onnan származott, hogy korábban élénk érdeklődést mutatott a fizika iránt, ami akkoriban kvantitatív tudomány volt. Másodsor, szerencsésen választotta meg kísérleti alanyát, a borsót (*Pisum sativum*), mivel ennek a növénynek számos, egymástól jól elkülöníthető jellege van, például magja lehet kerek vagy szögletes, illetve zöld és sárga. Emellett virágai nagyok, könnyen kezelhetők, és az utódok száma is magas. A borsónak már Mendel idejében is sok fajtáját termesztették, a magokat kereskedelmi forgalomban árulták is. Harmadsor, Mendel rájött arra, hogy csak akkor juthat értékelhető eredményre, ha egyszerre csak egy jelleg öröklődését vizsgálja, nem pedig többét, mint ahogyan azzal kortársai próbálkoztak.

Mendel választása, a borsó abból a szempontból is szerencsésnek bizonyult, hogy **tiszta vonalai** állíthatók elő, ami azt jelenti, hogy az utódok tulajdonságai mindenben megegyeznek a szülőkével. Mendel ilyen növények magjait szerezte be kísérleteihez, és azzal is biztosította a tiszta vonalakat, hogy még két éven át a kolostor kertjében szaporította őket, mielőtt kísérleteit elkezdte volna. A borsóra főként **öntermékenyítés** jellemző, vagyis a zigótában összeolvadó női és hím gaméta ugyanarról az egyedről származik, ami beltenyésztettséghez vezet. Önmegtermékenyítés akkor történhet, amikor a megporzás so-

rán a virágporszem (pollen) ugyanannak a virágnak a bibéjére kerül (2.1. ábra).

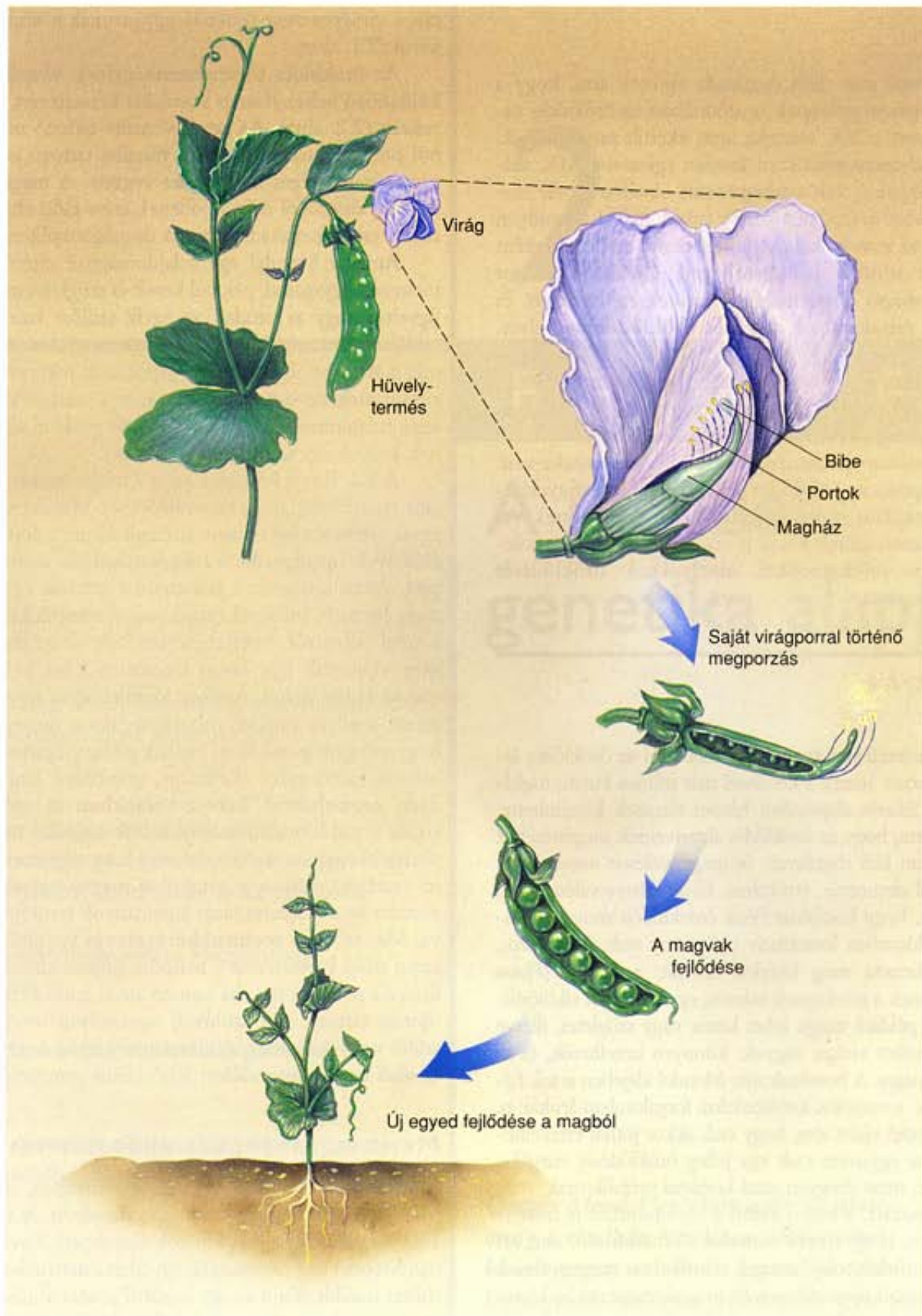
Az öröklődés törvényszerűségeinek vizsgálatához Mendel különböző beltenyésztett vonalakat keresztezett, más szóval hibridizált (2.2. ábra). Az egyik vonalba tartozó növény portokjából pollent juttatott a másik vonalba tartozó növény bibéjére, vagyis mesterséges megporzást végzett. A magtermelésre szánt növény virágaiból még a pollenek érése előtt eltávolította a porzókat, ezzel megakadályozta az önmegtermékenyítést.

Amikor Mendel egy tulajdonságban eltérő vonalakat keresztezett egymással, például kerek és szögletes magvúakat, megfigyelte, hogy az utódok az egyik szülőre hasonlítanak. Azt a szülői típust, amely az utódokon is megjelent, **dominánsnak**, míg a másikat, amelyik nem nyilvánult meg az utódokban **recesszívnek** nevezte. (A *domináns* és a *recesszív* kifejezés eredetileg a tulajdonságokra vonatkozik, de gyakran alkalmazzák a génnek különböző formáira, alléljaira is.)

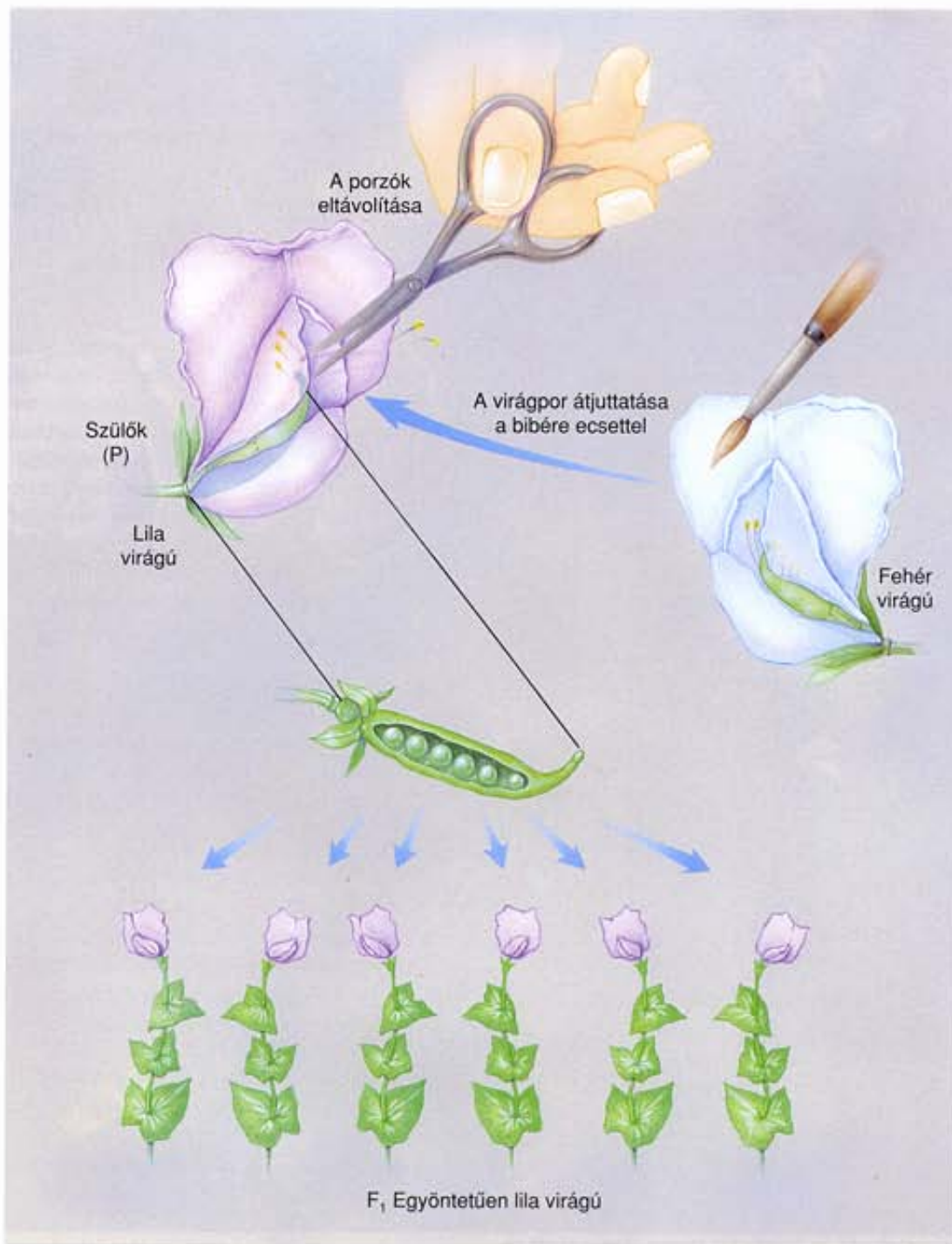
A 2.3. ábra a borsónak azt a 7 tulajdonságát (jellegét, bélyegét) szemlélteti, amelyek öröklődését Mendel vizsgálta. Mind-egyik esetben a bal oldalon ábrázolt forma a domináns jelleg. Az élőlények megfigyelhető tulajdonságainak összessége a **fenotípus**. Általánosságban a fenotípusba tartozik egy szervezet bármely leírható, mérhető tulajdonsága: morfológiai, élettani, biokémiai jellemzői, viselkedése stb. Sőt az is, hogy életképes-e, vagy elpusztul! Egy borsó fenotípusa lehet például gömbölyű magvú és lila virágú. Amikor Mendel olyan növényeket keresztezett, amelyek minden tulajdonságukban megegyeztek, kivéve, hogy az egyik gömbölyű, a másik pedig szögletes magvú volt, az utódok mindegyike domináns, gömbölyű fenotípusú lett. Az ilyen **monohibrid keresztezésekben** az utódok két olyan szülői vonal hibridjei, amelyek csak egyetlen tulajdonságukban térnek el egymástól. Mendel vizsgálatai ugyanarra az eredményre vezettek, amikor a gömbölyű magvú egyedek virágporával porozta be a szögletes magvú példányok termőjét, illetve fordítva. Más szóval a **reciprokkeresztesés** (az első típusba tartozó anyai szülő keresztezése a második típusba tartozó apai szülővel, illetve a második típusba tartozó anyai szülő keresztezése az első típusba tartozó apai szülővel) ugyanolyan utódokat ad. A két szülői vonal keresztezéséből származó utódok adják az **F₁**, vagyis az **első utódnemzedéket** (első filiális generáció).

MENDEL KÍSÉRLETI EREDMÉNYEI

Melyek voltak azok a kísérleti eredmények, amelyek alapján Mendel megérthette az öröklődés alapelveit, és amelyek egészen 1900-ig elkerülték más kutatók figyelmét? További vizsgálataiban Mendel az F₁ nemzedék egyedeit öntermékenyítéssel szaporította tovább, majd az így kapott F₂, azaz a második utódnemzedékben elemezte az utódok fenotípusát. Azt tapasztalta, hogy az F₂ nemzedékben mindkét szülői típus megtalálható, és mintegy háromszor annyi a domináns, mint a recesszív fenotípusú, vagyis az utódok 75%-a domináns, 25%-a recesszív jellegű. Mindezek alapján Mendel elvetette a szülői tulajdonságok keveredésének elméletét, hiszen (1) az F₁ egyedek nem köztes feno-



2.1. ábra. Az öntermékenyítés folyamata

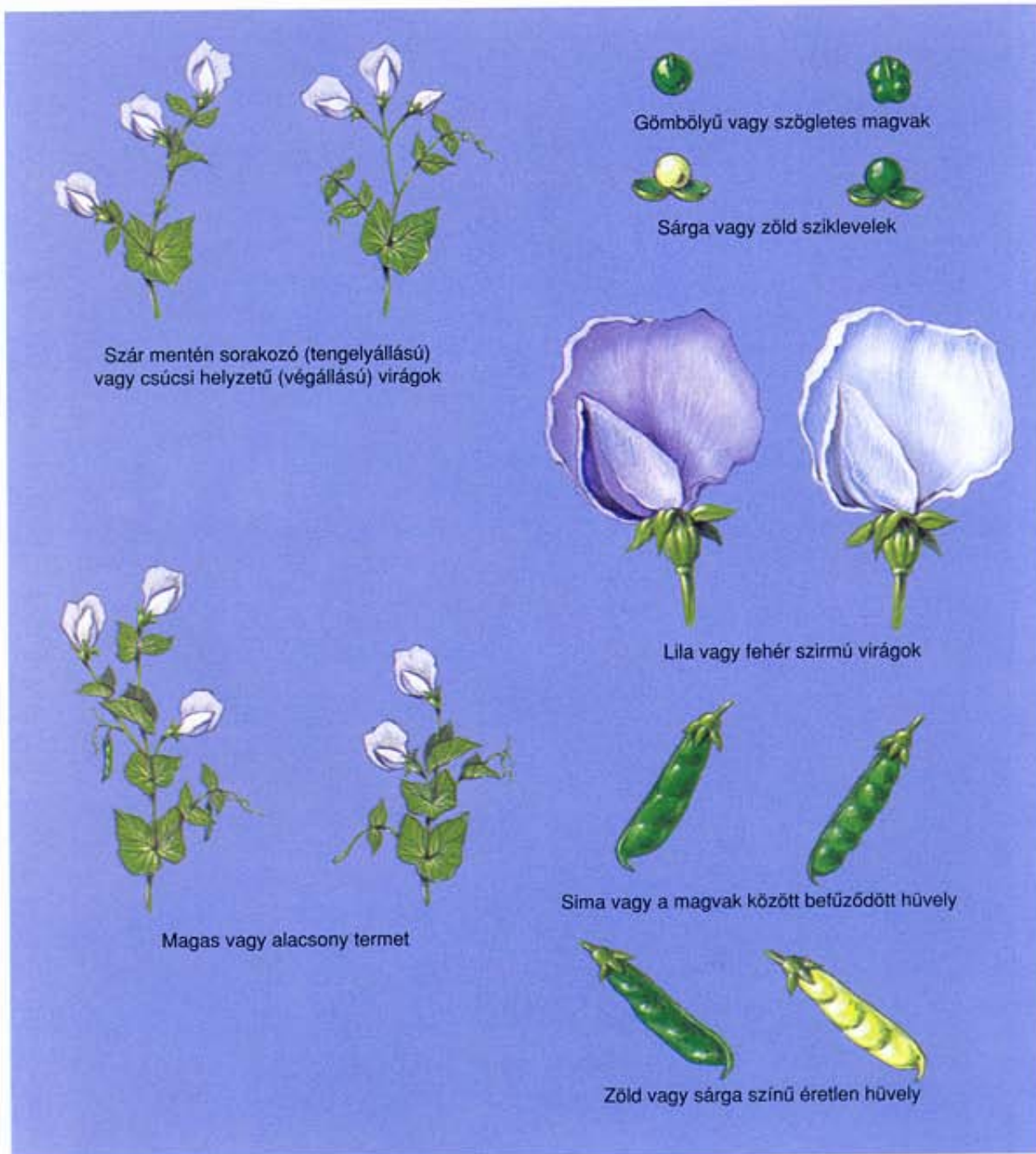


2.2. ábra. A borsó fehér virágú pollenadó (hím) egyedének mesterséges keresztezése lila virágú termős (nőivarú) egyeddel

típusúak voltak, (2) a recesszív fenotípus nem veszett el, hanem változatlan formában megjelent az F₂ nemzedékben.

A Mendel által végzett hét különböző monohibrid keresztezés eredményét a 2.1. táblázat összegzi. Mindegyik esetben igen jó közelítéssel 3:1 volt a domináns és a recesszív fenotípusú egyedek aránya az F₂ nemzedékben. A gömbölyű és szögletes magvú növények keresztezésének F₂ nemzedékében 5474 gömbölyű és 1850 szögletes magvú egyed volt, ami 2,96:1 arálynak felel meg.

Mendel az F₂ egyedek öntermékenyítéssel történő szaporítása után értékelte a következő, F₃ nemzedéket is. Ennek alapján az F₂ egyedek recesszív fenotípust mutató $\frac{1}{4}$ része homozigótának bizonyult, vagyis összes utóduk recesszív lett. Ezzel szemben a domináns fenotípusú $\frac{3}{4}$ résznek csak $\frac{1}{5}$ -a volt tiszta vonalú domináns, $\frac{4}{5}$ -a az F₁ egyedekhez hasonlóan domináns és recesszív utódokat is hozott, mégpedig 3:1 arányban. Összefoglalva az F₃ vizsgálatából kapott eredményeket. Az F₂ egyedei három típusba tartoznak: $\frac{1}{4}$ részük tiszta vonalú



2.3. ábra. A borsó hét tulajdonsága, amelyek öröklődését Mendel vizsgálta. A domináns típust mindegyik esetben a bal oldalon ábrázoltuk

domináns; $\frac{1}{2}$ részük domináns fenotípusú, de domináns és recesszív utódjuk egyaránt lehet; $\frac{1}{4}$ részük tiszta vonalú recesszív (2.4. ábra).

Ezekből a kísérletekből Mendel azt a következtetést vonta le, hogy az ivarsejtek közvetítésével anyagi részecskék, faktorok, mai szóhasználattal **gének** kerülnek át változatlan formában a szülőkből az utódokba. Véleménye szerint ezeknek a faktoroknak több változatuk, korszerű terminológiával **alléljuk** van, amelyek kialakítják az általa megfigyelt különböző fenotípusokat. Feltételezte, hogy minden egyed egy faktornak (génnek) két-két példányát tartalmazza, az egyik kópia (allél) a szülői hím

ivarsejtből, a másik a petesejtből származik. Bár ez a magyarázat ma egyértelműnek tűnik, Mendel korában senki sem fogadta el, vagy nem figyelt fel rá. A továbbiakban a **lokusz** kifejezést is használjuk majd egy gén azonosítására. A lokusz a gén helyét jelenti a kromoszómán.

MENDEL MAGYARÁZATA

Vizsgáljuk meg közelebbről Mendel hipotézisét, amellyel egy bizonyos tulajdonság, nevezetesen a mag gömbölyű és szögletes alakjának öröklődését magyarázta! A mag alakját

2.1. A genetika atyja

Gregor Mendel 1822-ben született, és szülei kisbirtokán nevelkedett Ausztria egyik tartományában. Minthogy családja szegény volt, belépett egy kolostorba, hogy folytathassa tanulmányait. Fizikát és matematikát tanult, amelyek nagyon jó alapot jelentettek későbbi genetikai kísérleteihez. Rendje jóvoltából a bécsi egyetemre került, hogy tanári diplomát szerezzen. Tanulmányait azonban nem fejezte be, hanem visszatért a kolostorba, és éveken át képzés nélkül tanított.

Gyermekkori élményeinek köszönhetően egész életében vonzódott a természethez, növényeket nevelt, méheket, egereket tartott. Különösen érdeklődött az állattenyésztés iránt, de felesesei nem tartották illendőnek, hogy szerzetes létére állatokkal foglalkozzon, ezért borsót és más növényeket termesztett a kolostor kertjében (M2.1. ábra). A kert ma is látogatható a csehországi Brnóban (Brünn), és bár nem borsóval, de más virágokkal szemléltetik is a látogatóknak Mendel szabályait.

Mendel növényekkel végzett kísérletei alapján magyarázatot talált az öröklődés alapelveire. Eredményeiről 1865-ben tartott előadást a Brnói Természettudományi Egyesület ülésén, majd 1866-ban írásban is megjelentette német nyelven „Kísérletek növényhibridekkel” címen. Bár cikke számos könyvtárba eljutott, kortársai nem figyeltek fel hipotéziseire, minden bizonnyal eredményeinek matematikai értékelése miatt. Ugyanabban az időben a témával foglalkozó tudósok többsége sok tulajdonság öröklődését vizsgálta egyszerre, ami olyan bonyolult eredményekhez vezetett, hogy az öröklődés alapelveit nem lehetett kihámozni belőlük. Tény, hogy később Mendelben is kételyek merültek fel következtetéseinek általánosíthatóságával kapcsolatban. Amikor egy másik növényvel, a hölgyállal (*Hieracium* sp.) próbálta megismételni kísérleteit, egészen más eredményeket kapott. Ma már tudjuk a különbség okát: a hölgyáll, a legtöbb növénytől eltérő módon, ivartalanul, apomixissal szaporodik, a pollen genetikai anyaga nem épül be az utódokba.

Mendel 1868-ban a kolostor apátja lett, és 1866-os mesterműve után többé nem számolt be újabb eredményekről. 1884-ben bekövetkezett haláláig ideje nagy részét a helyi hatóságokkal folytatott hadakozás töltötte ki. Titkos szenvedélyeknek is hódolt, mértéktelenül sokat evett, erősen dohányzott.

Sajnos nem érthette meg azt az időt, amikor a tudomány művelői elismerték munkáját. 1900-ban három botanikus, Carl Correns Németországban, Hugo de Vries Hollandiában



M.2.1. ábra. Gregor Mendel, az öröklődés alapelveinek felfedezője kertjében

Bettmann Archivum

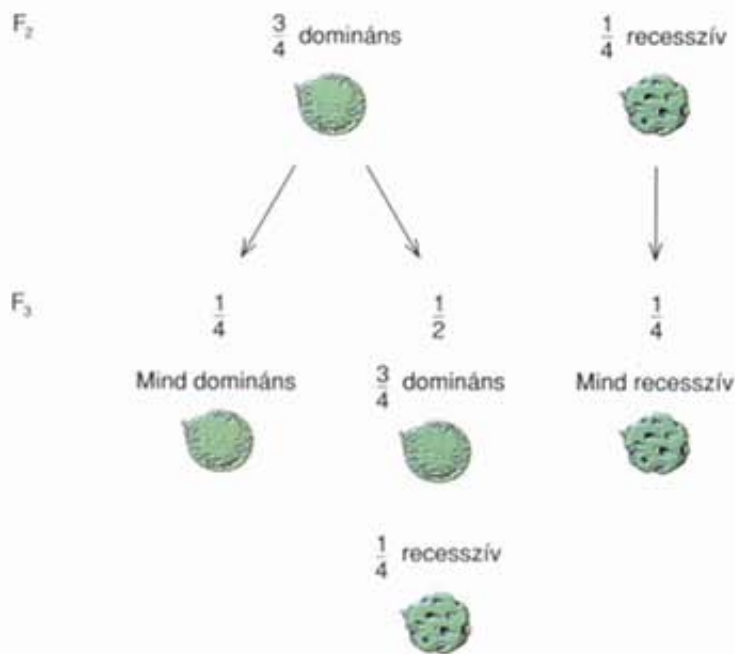
és Erich von Tschermak Ausztriában lényegében újra felfedezte az általa megállapított törvényeket. Mindhárman, egymástól függetlenül jutottak hasonló következtetésekre, ami egyben a modern genetikai kutatások kezdetét is jelentette. Mendel kísérleteit ma a gondosan megtervezett és kivitelezett kutatómunka klasszikus példájaként, írását pedig egy tudományos lángelme nagyszerű megnyilvánulásaként tartják számon.

meghatározó gént jelöljük A -val, amelynek két allélikus formája van, a domináns, gömbölyű fenotípust eredményező A , és a recesszív, szögletes fenotípust adó a . Az egyedek genotípusa háromféle lehet. (Egy diploid egyed szöveti, ún. szomatikus sejtjeinek genotípusát két betűvel vagy más szimbólummal jelöljük, mert egy génnek két kópiáját, két

allélját tartalmazza.) Ezek közül kettő **homozigóta**, azaz a vizsgált génnek két egyforma alléljával rendelkezik. Az egyik gömbölyű magvú AA , a másik szögletes magvú aa genotípusú. A harmadik **heterozigóta**, vagyis a vizsgált génnek két különböző allélja található benne, genotípusa Aa . Fenotípusát tekintve gömbölyű magvú, mivel az A allél do-

2.1. táblázat. Mendel monohibrid keresztezéseinek eredményei

	F ₁	F ₂		F ₂ arány
		Domináns	Recesszív	Domináns:recesszív
<i>Magvak</i>				
Gömbölyű × szögletes	Gömbölyű	5474	1850	2,96:1
Sárga × zöld	Sárga	6022	2001	3,01:1
<i>Hüvely</i>				
Sima × befűződött	Sima	882	299	2,95:1
Zöld × sárga	Zöld	428	152	2,82:1
<i>Virágok</i>				
Bíborlila × fehér	Bíborlila	705	224	3,15:1
Tengelyállású × végállású	Tengelyállású	651	207	3,14:1
<i>Tennet</i>				
Magas × alacsony	Magas	787	277	2,84:1



2.4. ábra. Az F₂ nemzedék öntermékenyítéséből származó F₃ generáció. Figyeljük meg, hogy az F₃-ben minden recesszív egyed homozigóta, míg a domináns fenotípusúaknak csak egy része

mináns az *a* felett. A domináns fenotípusú egyedek genotípusára néha az *A*-jelölést is alkalmazzák, annak jelzésére, hogy második allélja *A* és *a* is lehet, vagyis az egyed genotípusa *AA* vagy *Aa*.

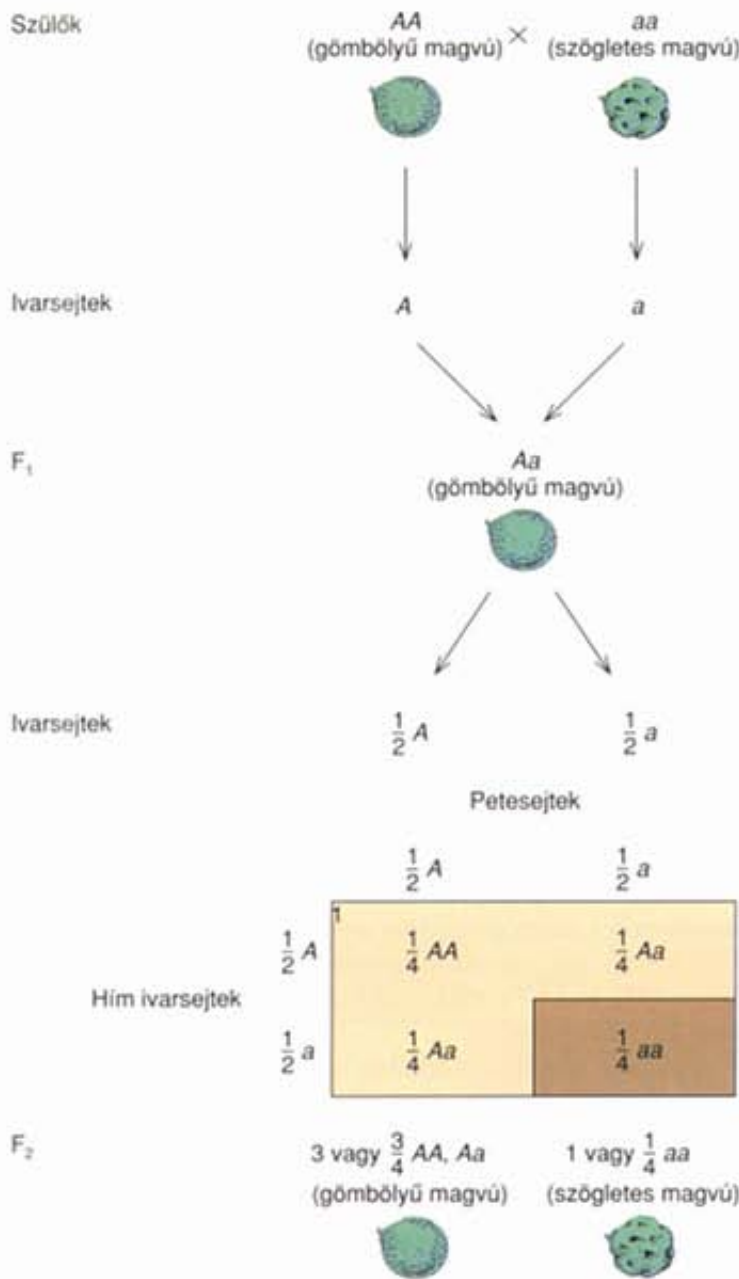
Ha tiszta vonalú gömbölyű és szögletes magvú szülői vonalokból indulunk ki, azok genotípusa *AA*, illetve *aa* (2.5. ábra). Ivarsejtképzéskor az *AA* egyedek *A*, míg az *aa* egyedek *a* allélt tartalmazó gamétákat termelnek. A megtermékenyítés után az F₁ összes egyede heterozigóta *Aa*, és domináns, gömbölyű fenotípusú.

A következő nemzedéket Mendel ezeknek a heterozigótáknak az öntermékenyítésével állította elő. Az eredmé-

nyeket azzal magyarázta, hogy a heterozigóta egyedek egyenlő arányban termelik a két különböző allélt tartalmazó gamétákat, vagyis szülői tulajdonságaik elválnak egymástól. Ez a **hasadás (szegregáció) elve**, amit gyakran **Mendel I. törvényének** is neveznek. (A törvény megjelölés nem túl szerencsés, mert számos kivétel ismert e szabály alól, mint ahogy azt a későbbi fejezetekben látjuk majd. Ennek ellenére a magyar szakirodalomban is gyakran használják az utóbbi fogalmat. Ford.) A 2.5. ábrán látható módon mind a petesejtekbe, mind a hím ivarsejtekbe fele-fele arányban kerül az *A*, illetve az *a* allél. Ennek oka, hogy a gamétaképződést számfelező osztódás, meiózis előzi meg (l. 4. fejezet).

A megtermékenyítés során az így kialakult gaméták négyféleképpen, de egyforma gyakorisággal kombinálódhatnak egymással. Az első lehetőség, hogy mind a hím, mind a női gaméta *A* allélt tartalmaz, és egyesülésük *AA* homozigóta, gömbölyű fenotípusú utódot ad. A második, hogy a hím ivarsejt *A*, a petesejt *a*; a harmadik, hogy a hím gaméta *a*, a női *A* allélt hordoz. Az utód mindkét esetben *Aa* heterozigóta genotípusú, és a domináns, gömbölyű fenotípust mutatja. Végül, a negyedik lehetséges kombinációban mindkét gaméta *a* allélt tartalmaz, egyesülésük pedig *aa* homozigóta genotípusú és szögletes fenotípusú utódot eredményez. Általánosítva, az utódok 1/4 része *AA*, 1/2 része *Aa*, 1/4 része *aa* genotípusú, de az *A* allél dominanciája miatt 1/2 részben gömbölyű (*AA* és *Aa*), 1/2 részben pedig szögletes fenotípusúak (*aa*). Másképpen, a domináns és a recesszív fenotípusú egyedek aránya 3:1. A magyarázat összhangban van a 2.1. táblázatban felsorolt összes monohibrid keresztezés eredményével. Ezen felül a 2.4. ábra F₂ nemzedékének tiszta vonalban termesztendő domináns növényei *AA* genotípusúak, míg a két-féle utódot hozók *Aa* heterozigóták.

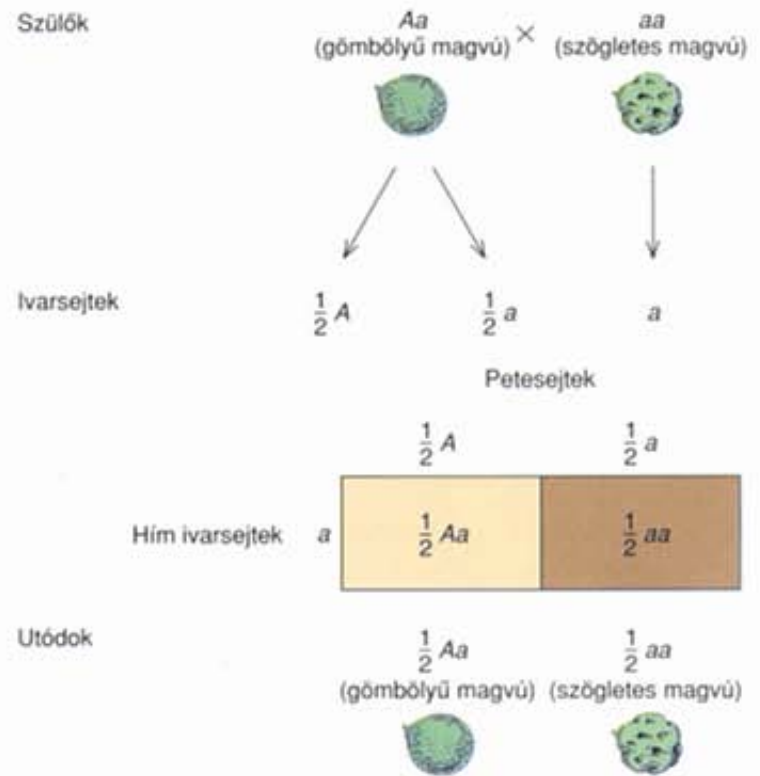
Mendel más kísérletekkel is igazolta a szegregáció elvét. Az egyik esetben az F₁ növényeket az öntermékenyítés helyett visszakeresztelte a recesszív szülői típussal, vagyis **tesztelő keresztezést** (testercross) végzett. Az elnevezés arra utal,



2.5. ábra. A szegregáció elvének genetikai alapjai gömbölyű és szögletes magvú szülői típusok keresztezéséből származó F₂ nemzedékben

hogyan a keresztezés jól alkalmazható a domináns fenotípusú egyedek genotípusának – homozigóta vagy heterozigóta – eldöntésére. Az említett keresztezés egyben **vißzakeresztezés** (backcross) is, mert az F₁ tagját olyan egyeddel keresztezzük, amelyiknek genotípusa megegyezik az egyik szülőével. A tesztelő keresztezés kétféle utódot eredményez, egyenlő arányban (2.6. ábra).

Az egyik szülő, jelen esetben a pollenadó egyed csak recesszív a allélt tartalmazó gamétákat termel. Az anyanövényben viszont egyforma arányban képződnek A , illetve a allélt hordozó petesejtek. A gamétaképzésnél csak az utóbbi esetben történik szegregáció, így az utódok fele domináns (Aa), fele recesszív (aa) fenotípusú.



2.6. ábra. A szegregáció elvének genetikai alapjai tesztelő keresztezésben. Csak az anyanövény ivarsejtképzésekor történik szegregáció, ennek eredményeként az utódok fele gömbölyű, fele szögletes magvú

2.2. táblázat. A borsóval végzett megismételt keresztezések eredményei

Kutató neve	Sárga	Zöld	F ₂ arány
<i>(Domináns:recesszív)</i>			
Mendel (1865)	6022	2001	3,01:1
Correns (1900)	1394	453	3,08:1
Tschermak (1900)	3580	1190	3,01:1
Bateson (1905)	11902	3903	3,05:1
Darbishire (1909)	109060	36186	3,01:1
Összesítve	131958	43733	3,02:1

Miután Mendel öröklődésre vonatkozó szabályait 1900-ban újra felfedezték, kísérleteinek reprodukálásával, illetve más, hasonló vizsgálatokkal is sikerült igazolni a szegregáció elvét, mind növények, mind pedig állatok körében. Több kutató is megismételte a sárga és zöld magvú borsófajták keresztezését, és meghatározta az F₂ nemzedék megoszlását (2.2. táblázat). Mendelhez hasonlóan, a domináns:recesszív fenotípusok aránya minden esetben jól közelített a 3:1-hez. A méréseket összesítve, 175 691 egyedet figyelembe véve az arány 3,02:1.

Minthogy az állatok körében az öntermékenyítés csak igen ritkán fordul elő, két különböző F_1 egyedet vagy testvéreket kell keresztezni ahhoz, hogy a hasadási arányt vizsgálni lehessen az utódokban. A mendeli alapelvek általános érvényességét számos kutatónak sikerült igazolnia egerekkel, galambokkal, ecetmuslicákkal végzett kísérletekben. Az emlősök tulajdonságai közül elsőként az egerek albinizmusának öröklődését vizsgálta William Castle és Lucien Cuénot. Bár van, aki azt állítja, hogy Mendel valójában különböző szörzetszínű egerekkel végzett, de titokban tartott kísérleteiből vonta le első következtetéseit az öröklődés alapelveire vonatkozóan, és csak később igazolta azokat veteményborsóval is!

Mendel volt az első tudós, aki bebizonyította, hogy az öröklődés alapja egy gén alléljainak szegregációja. Eltérő származási vonalba tartozó borsónövények keresztezéséből származó F_1 egyedeket öntermékenyítéssel szaporított, és megállapította, hogy az F_2 nemzedékben a szülői tulajdonságok újra megjelennek, a domináns és a recesszív fenotípusok aránya 3:1. A hasadás elvét kiterjesztve megállapította, hogy a heterozigóta egyedek egyenlő arányban termelik a kétféle allélt tartalmazó gamétákat.

A FÜGGETLEN KOMBINÁLÓDÁS ELVE

Az eddig elemzett kísérletekben olyan keresztezések szerepeltek, amelyekben a különböző származási vonalba tartozó egyedek csak egy bélyegben különböztek, vagyis egy gén eltérő alléljait tartalmazták. De mi a helyzet abban az esetben, ha a szülők nemcsak egy, hanem két tulajdonságban, azaz két génben térnek el egymástól? Mendel ilyen kísérleteket is végzett, amikor már tisztában volt egy-egy tulajdonság öröklődésének szabályaival. **Dihibrid keresztezéseinek** eredményét figyelembe véve fogalmazta meg a **független kombinálódás elvét**, amit **Mendel II. törvényeként** is említenek.

Egyik kísérletében tiszta vonalú, gömbölyű és zöld magvú egyedeket keresztezett ugyancsak tiszta vonalú, szögletes és sárga magvú egyedekkel (2.3. táblázat). Az F_1 egyedek mindkét jellegre nézve domináns fenotípusúak voltak, azaz gömbölyű és sárga magvakat hoztak. Az F_1 öntermékenyítésével kapott F_2 -ben négyféle fenotípus jelent meg, legnagyobb arányban a mindkét jellegre nézve domináns fenotípusú (bidomináns) egyedek szerepeltek. A csak az egyik jellegre nézve domináns egyedek (sárga és szögletes, illetve zöld és gömbölyű magvú) kisebb, de egymáshoz hasonló arányban jelentek meg. A legkevesebb utód a mindkét jellegre nézve recesszív (birecesszív) típusba tartozott (zöld és szögletes magvú). Mendel más tulajdonságokat választva megismételte a ki-

2.3. táblázat. Mendel dihibrid keresztezésének eredményei

Generáció	Magtípus	Egyedszám	F_2 arány
Szülők	Gömbölyű, zöld és szögletes sárga	–	–
F_1	Gömbölyű, sárga	–	–
F_2	Gömbölyű, sárga	315	9,84
	Szögletes, sárga	101	3,16
	Gömbölyű, zöld	108	3,38
	Szögletes, zöld	32	1,0
		<u>556</u>	

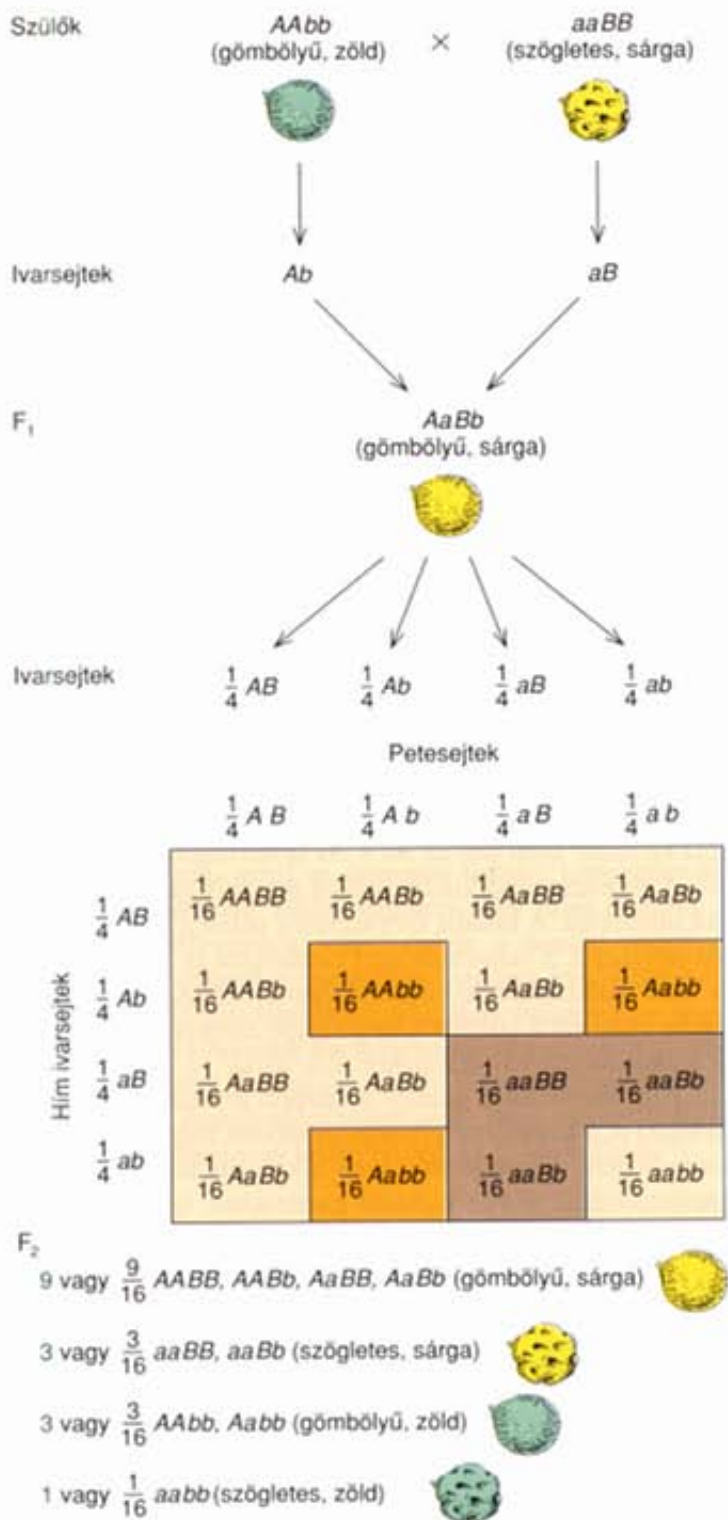
sérletet, és tapasztalatai szerint a négyféle fenotípus aránya minden esetben közelített a 9:3:3:1-hez. A 2.3. táblázat adatait 32-vel, azaz a birecesszív kategória egyedszámával elosztva az arány 9,84:3,16:3,38:1-nek adódik.

Mielőtt az egész jelenségre magyarázatot keresnénk, nézzük meg, miként érvényesül a szegregáció elve ezekben a keresztezésekben! Határozzuk meg a gömbölyű és szögletes fenotípusok arányát az F_2 -ben: 423 gömbölyű (315 + 108, a sárga és zöld magvú kategóriákat összesítve) és 133 szögletes (101 + 32). Ebből a gömbölyű:szögletes arány 2,96:1, ami megegyezik a szegregáció elve alapján várható értékkel. Hasonló eredményt kapunk a magszín esetében is: 416 a sárga (315 + 101) és 140 a zöld (108 + 32) magvú egyed, arányuk pedig 2,97:1.

Ezután a mendeli modellen keresztül elemezzük, miből adódik F_2 -ben a Mendel által előre megjósolt 9:3:3:1-es hasadási arány (2.7. ábra). A keresztezésben szereplő F_1 egyedek mindkét génre heterozigóták ($AaBb$), mivel az egyik szülőtől domináns, a másiktól recesszív allélt örökölték. A szegregáció elve szerint ivarsejtjeikben az A és az a allélok gyakorisága $\frac{1}{2}$. Hasonlóan $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{2}$ a gamétákban a másik gén két alléljának (B és b) gyakorisága is. Azoknak az ivarsejtnek a gyakorisága azonban, amelyek mind az A , mind a B allélt tartalmazzák, csak $\frac{1}{4}$. Az A és a B domináns allélok együttes megjelenésének esélye egy gamétában ugyanis az A és a B gyakoriságának szorzata, azaz $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$.

Feltéve, hogy ugyanez az elv érvényesül mind a him és a nőivarú egyedekben a négy lehetséges gaméta (AB , aB , Ab , ab) kialakulásakor, a keresztezés várható eredményét 4×4 -es mátrixban vagy táblázatban írhatjuk fel (2.7. ábra). A mátrixot R. C. Punnett angol genetikus után **Punnett-táblázatnak** is nevezik, aki először alkalmazta a módszert genetikai keresztezések eredményének áttekinthető leírására. Az F_2 nemzedékben a különböző fenotípusú egyedek várható arányának meghatározásakor Mendel feltételezte, hogy a gaméták véletlenszerűen egyesülnek, mint ahogy ez volt a hipotézise a szegregáció elvének megfogalmazásakor is.

A mátrix mindegyik elemének azonos a valószínűsége, így gyakoriságuk is egyenlő, $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$. Az utódok genotípusát az



2.7. ábra. A független kombinálódás elvének genetikai alapjai az F_2 nemzedékben. A 4×4 -es mátrixban minden cella azonos valószínűséget jelent. Kombinációjuk adja az F_2 nemzedék fenotípusának 9:3:3:1-es hasadási arányát

összeolvadó gaméták határozzák meg, például az AB és Ab gamétákból képződő utód genotípusa $AABb$ lesz. Hat esetben a gaméták két különböző kombinációja azonos genotípust eredményez az F_2 -ben. Az $AABb$ genotípus kialakulhat például Ab petesejt és AB hím ivarsejt, valamint AB petesejt és Ab hím ivarsejt összeolvadásával is.



2.8. ábra. Kukoricacső, amelyben a szemek alakja és színe a független kombinálódást szemlélteti

© Carolina Biological Supply Company/Phototake

A megegyező genotípus kategóriák összevonása után $\frac{9}{16} : \frac{3}{16} : \frac{3}{16} : \frac{1}{16}$, azaz 9:3:3:1 arány adódik. A 16 cella közül csak az egyik birecesszív – ez a legkisebb kategória. Az egyik jellegre nézve domináns típusokra 3-3 cella esik, például két $Aabb$ és egy $AAbb$, mindegyikük gömbölyű és zöld magvú. A fennmaradó kilenc cellára kétszeresen domináns fenotípusok esnek, teljessé téve a 9:3:3:1 arányt.

A kukorica szemtermés színének és alakjának kialakításában több gén is részt vesz. A bíbor színt meghatározó allél például domináns a normál, sárga színt kialakítóval szemben, a zsugorodott szemet eredményező allél viszont recesszív a normál, sima terméshéjat kialakítóval szemben. A 2.8. ábrán látható kukoricacsővön különösen jól megfigyelhető a két jelleg független kombinálódása. Minden egyes kukoricaszem önálló megtermékenyítés révén alakul ki, tehát együttesen az F_2 nemzedéket jelentik. Közelít-e a képen látható cső esetében a négy fenotípus kategória (bíbor-sima, bíbor-zsugorodott, sárga-sima, sárga-zsugorodott) a 9:3:3:1-es arányhoz?

A független kombinálódás alapját, vagyis, hogy a különböző kromoszómán található gének véletlenszerűen válnak szét a gaméták kialakulását megelőző meiózis során, Mendel nem ismerte. (A meiózist a 4. fejezetben ismertetjük részletesen.) Ráadásul nem minden tulajdonságpárra igaz a független öröklődés, és ezt a tényt Mendel nem fedezte fel. Az 5. fejezetben tárgyaljuk a genetikai kapcsoltságot, az azonos kromoszómán található gének öröklődését, ami kivételt jelent Mendel II. törvénye alól.

A szegregáció és a független kombinálódás elvének mélyebb megértéséhez célszerű megismerni a valószínűség-számítás és a statisztika alapjait. Áttekintésük után kitérünk arra, hogyan alkalmazhatók Mendel kísérleteire.

A független kombinálódás elve (Mendel II. törvénye) kimondja, hogy a különböző gének alléljai egymástól függetlenül öröklődnek, ami dihibrid keresztezésekben 9:3:3:1-es hasadási arányt eredményez az F_2 nemzedékben.

A VALÓSZÍNŰSÉG

Hogyan érthetjük meg Mendel felfedezéseit általánosított formában? Ennek egyik módja, ha közelebbről megvizsgáljuk a szegregáció és a független kombinálódás elvét, és összevetjük azokat a valószínűség-számítás néhány alaptételével. Mendel birtokában volt ezeknek az ismereteknek, amelyek egyértelműen fontos szerepet játszottak az öröklődés általános modelljének kidolgozásában.

Valamely esemény **valószínűségét** (probability), (P) úgy definiáljuk, hogy az eseményt alkotó kedvező kimenetek számát elosztjuk az összes kimenetek számával. Ha például egy érmét tízszer feldobunk, és az eredmény négy fej és hat írás lesz, akkor a fej relatív gyakorisága $\frac{4}{10} = 0,4$, az írásé pedig $\frac{6}{10} = 0,6$. A két esemény közül az egyik biztosan bekövetkezik, ezért a relatív gyakoriságok összege $\frac{4}{10} + \frac{6}{10} = 1$. A kapott gyakorisági értékek a fej, illetve az írás megfigyelt valószínűségei egy tíz feldobásból álló sorozatban. Ha az érme szabályos, tehát azonos eséllyel eshet bármelyik oldalára, és nagyon sokszor próbálkozunk, a gyakorisági érték mind a fej, mind az írás esetében megközelítőleg 0,5 lesz. Azt a számot, amely körül egy esemény relatív gyakorisága ingadozik, az esemény valószínűségének nevezzük.

AZ ÖSSZEZÉSI SZABÁLY

A fej és az írás jó példája az **egymást kizáró eseményeknek**. A két lehetséges kimenetel közül csak az egyik következhet be, az érme nem eshet egyszerre a fej és az írás oldalra is, csak az egyikre. *Két vagy több egymást kölcsönösen kizáró esemény bekövetkezésének valószínűsége az egyes események valószínűségének összege.* Ez az **összezési szabály**.

$$\begin{aligned} P(\text{fej vagy írás}) &= P(\text{fej}) + P(\text{írás}) \\ &= \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \\ &= 1 \end{aligned}$$

ahol $P(\text{fej})$ a fej, $P(\text{írás})$ az írás valószínűsége.

Amennyiben az eseménynek kettőnél több kimenetel van, akkor a két esemény valószínűségének összege kisebb 1-nél.

Genetikai példa az eddigiekre a heterozigóta (Aa) egyedek ivarsejtképzése. A meiózis során az eltérő allélokat (A , illetve a) hordozó kétféle gaméta kialakulásának valószínűsége egyenlő. Az A gaméta képződésének valószínűsége $\frac{1}{2}$, és ugyancsak $\frac{1}{2}$ az a gamétáé is:

$$\begin{aligned} P(A \text{ vagy } a) &= P(A) + P(a) \\ &= \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \\ &= 1 \end{aligned}$$

A SZORZÁSI SZABÁLY

Vizsgáljuk meg két egymástól független esemény együttes előfordulásának valószínűségét. Ebben az esetben a **szorzási szabály** érvényesül, amely szerint *két független esemény együttes bekövetkezésének valószínűsége egyenlő egyedi valószínűségeik szorzatával*. Ha két különböző érmét dobunk fel egyszerre, egy ötforintost és egy kétforintost, mi a valószínűsége annak, hogy mindkettő fej oldalára esik? Az ötforintos esetében a fej valószínűsége $\frac{1}{2}$, és ugyancsak $\frac{1}{2}$ a kétforintos esetében. A két esemény együttes valószínűsége:

$$\begin{aligned} P(\text{két fej}) &= P(\text{fej ötforintos}) \times P(\text{fej kétforintos}) \\ &= \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{4} \end{aligned}$$

Erre a szabályra megfelelő genetikai példa két heterozigóta egyed keresztezéséből származó utódgeneráció vizsgálata. Például tudni szeretnénk, milyen valószínűséggel származik homozigóta recesszív utód (aa) az $Aa \times Aa$ heterozigóták keresztezéséből. A recesszív utód kialakulásához mindkét gamétának a allélt kell hordoznia. A hasadás elve szerint a petesejt $\frac{1}{2}$ és a hím ivarsejt ugyancsak $\frac{1}{2}$ valószínűséggel tartalmazza az a allélt. Ezért az aa utód kialakulásának valószínűsége $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$. Mendel figyelembe vette ezt a szabályt a szegregáció elvének kidolgozásakor és a hasadási arányok felírásakor (2.5. ábra).

Alkalmazhatjuk a szabályt a dihibrid keresztezések F_2 generációjára is, a különböző genotípusú utódok megjelenésének valószínűségére. Feltételezzük, hogy a két gén alléljai függetlenül kombinálódnak az F_2 -t kialakító gamétákban, így a szorzási szabállyal meghatározhatjuk a különböző allélkombinációjú gaméták kialakulásának valószínűségét. Annak az esélye, hogy a gamétába egy A és egy B allél kerüljön:

$$P(A \text{ és } B) = P(A) \times P(B) = \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$$

Hasonlóan:

$$\begin{aligned} P(A \text{ és } b) &= P(A) \times P(b) = \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4} \\ P(a \text{ és } B) &= P(a) \times P(B) = \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4} \\ P(a \text{ és } b) &= P(a) \times P(b) = \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4} \end{aligned}$$

Ahhoz, hogy meghatározzuk a gaméták kombinációjával kialakuló F_2 generáció egyes genotípusainak a valószínűségét, ismét a szorzási szabályt kell alkalmaznunk. Az $AABB$ genotípus kialakulásának valószínűsége például:

$$\begin{aligned} P(AB \text{ petesejt és } AB \text{ hím ivarsejt}) &= P(AB) \times P(AB) \\ &= \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \\ &= \frac{1}{16} \end{aligned}$$

A továbbiakban vizsgáljuk meg, miként határozhatjuk meg két különböző független esemény együttes bekövetkezésének valószínűségét. Ehhez ismét alkalmaznunk kell az összegzési szabályt. A probléma lényegének megértéséhez térjünk vissza az érmével való dobás példájához, és számítsuk ki, mi a valószínűsége annak, hogy két érmét egyszerre feldobva, két fej vagy két írás lesz az eredmény.

$$\begin{aligned} P(\text{két fej vagy két írás}) &= P(\text{két fej}) + P(\text{két írás}) \\ &= P(\text{fej}) \times P(\text{fej}) + P(\text{írás}) \times P(\text{írás}) \\ &= \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{4} + \frac{1}{4} \\ &= \frac{1}{2} \end{aligned}$$

Vegyük észre, hogy a kedvező események ebben az esetben – például a két fej – maguk is két részletből tevődnek össze!

Visszatérve egy monohibrid keresztezés F_1 nemzedékének hasadási arányához, az AA genotípus valószínűsége $\frac{1}{4}$, az Aa -é $\frac{1}{2}$, az aa -é ismét $\frac{1}{4}$. Az AA és az Aa egyaránt domináns fenotípusú, így a domináns fenotípus valószínűsége az összegzési szabály alapján:

$$\begin{aligned} P(AA \text{ vagy } Aa) &= P(AA) + P(Aa) \\ &= \frac{1}{4} + \frac{1}{2} \\ &= \frac{3}{4} \end{aligned}$$

Mind a szorzási, mind az összegzési szabályt kiterjeszthetjük kettőnél több eseményre. Például egyszerre négy érmét feldobva, a négy fej bekövetkezésének valószínűségét a szorzási szabállyal jósolhatjuk meg (független események együttes bekövetkezése): $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = (\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$. Hasonlóképpen, annak valószínűsége, hogy egy bizonyos lapot kihúzzunk egy tizenhárom lapos szabályos kártyasorozatból (ász, kettes, hármás, ..., király), $\frac{1}{13}$, ha csak egy színt vesszünk figyelembe. Annak valószínűsége pedig, hogy valamelyik figuris kártyát (bubi, dáma vagy király) húzzuk ki: $\frac{1}{13} + \frac{1}{13} + \frac{1}{13} = \frac{3}{13}$.

A FELTÉTELES VALÓSZÍNŰSÉG

Mint már említettük, egy eseménynek kettőnél több kimenetele is lehet. Egy szabályos, hatoldalú kockával azonos valószínűséggel dobhatunk 1-, 2-, 3-, 4-, 5- vagy 6-ot. Azaz a dobásnak 6 kimenetele lehet, és mindegyik valószínűsége $\frac{1}{6}$. Az esetek felénél várható páros szám (2, 4 vagy 6). Mi a valószínűsége annak, hogy amikor páros számot dobunk, akkor az éppen 2? *Az olyan valószínűség, amely adott körülményektől függ, az ún. feltételes valószínűség.* Annak valószínűsége, hogy 2 legyen a kockán, feltéve, hogy páros számot dobtunk:

$$\begin{aligned} P(2 | \text{páros}) &= \frac{P(2)}{P(\text{páros})} \\ P(2 | \text{páros}) &= \frac{\frac{1}{6}}{\frac{1}{2}} \\ &= \frac{1}{3} \end{aligned}$$

Vagyis egy esemény – jelen esetben a páros számok – teljes valószínűsége további eseményekre osztható. A feltételes valószínű-

ség tehát egy esemény bekövetkezésének valószínűsége, feltéve, ha a másik esemény már bekövetkezett.

Mendel az F_2 nemzedék elemzésénél a feltételes valószínűséget alkalmazta a heterozigóták arányának meghatározására a domináns fenotípusú utódok között:

$$\begin{aligned} P(\text{heterozigóta} | \text{domináns}) &= \frac{P(\text{heterozigóta})}{P(\text{domináns})} \\ P(\text{heterozigóta} | \text{domináns}) &= \frac{\frac{2}{4}}{\frac{3}{4}} \\ &= \frac{2}{3} \end{aligned}$$

Vagyis a domináns fenotípus $\frac{2}{3}$ -a várhatóan heterozigóta, $\frac{1}{3}$ -a várhatóan homozigóta. Ugyanezt a logikát alkalmazhatjuk például annak becslésére, hogy egy egészséges ember, akinek testvére recesszíven öröklődő betegségben szenved, milyen valószínűséggel hordozó, azaz heterozigóta a kérdéses jellegre.

BINOMIÁLIS ELOSZLÁS

Végül tekintsük át, mi a valószínűsége annak, hogy egy adott méretű csoportban, például testvérek között, bizonyos számú egyed egy adott típusba tartozik, míg a többiek egy másikba. A valószínűség meghatározásához a szorzási szabály kiterjesztését használjuk. Először számoljuk ki egy bizonyos eseménysor előfordulásának valószínűségét, amikor három esemény történik, és mindegyiknek két alternatívája lehetséges. Vegyük példaként ismét az érme feldobását, és az egymást követő dobások száma legyen három. Az eseménysornak nyolcféle kimenetele lehetséges:

	FFI	IIF	
FFF	FIF	IFI	III
	IFF	FIH	

Lehet mindhárom dobás fej; lehet kétszer fej és egyszer írás, mint a második csoportban; lehet kétszer írás és egyszer fej, mint a harmadik csoportban; végül lehet mindhárom írás. Ha a sorrendet nem vesszük figyelembe, akkor a kimenetek száma négy.

A fej, illetve az írás valószínűsége $\frac{1}{2}$, így például a második csoport FIF kimenetelének valószínűsége a szorzási szabály alapján:

$$\begin{aligned} P(\text{FIF}) &= P(F) \times P(I) \times P(F) \\ &= \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{8} \end{aligned}$$

A két fej és egy írás dobásának valószínűsége, ha nem vesszük figyelembe a sorrendet, az összegzési szabállyal becsülhető, a három sorrend valószínűségének összeadásával:

$$\begin{aligned} P(2 \text{ fej}, 1 \text{ írás}) &= P(\text{FFI}) + P(\text{FIF}) + P(\text{IFF}) \\ &= \frac{1}{8} + \frac{1}{8} + \frac{1}{8} \\ &= \frac{3}{8} \end{aligned}$$

Mindezek alapján, a három fej dobásának valószínűsége $\frac{1}{8}$, két fejé és egy írásé $\frac{3}{8}$, két írásé és egy fejé szintén $\frac{3}{8}$, három írásé $\frac{1}{8}$. Az egész eseménysoré pedig $\frac{1}{8} + \frac{3}{8} + \frac{3}{8} + \frac{1}{8} = 1$.

Általánosítsuk ezt a problémát. A dobásnak két kimenetel-le lehetséges, a fej és az írás, amelyek valószínűsége legyen p , illetve q . Mivel a két kimenetel közül az egyik mindenképpen bekövetkezik, $p + q = 1$. N különböző, egyenként két kimenetelű eseményt figyelembe véve, mi a valószínűsége, hogy az egyik kimenetel x , a másik $N-x$ számú lesz? Előző példánkban $N=3$, mert háromszor dobunk az érmével, és $x = 2$ (2 fej), illetve $N - x = 1$ (egy írás). Az általános egyenletet a **binomiális eloszlás** írja le (binomiális, mert két alapeset van):

$$P(x \text{ egyik típusú esemény az } N \text{ összes eseményből}) = C p^x q^{N-x}$$

A képletben a C a binomiális együttható, azoknak a sorrendeknek a számát jelenti, amelyek ugyanazt az általános elrendeződést eredményezik (pl. három különböző sorrend eredményezhet két fejet és egy írást, tehát $C = 3$).

A binomiális koefficiens az alábbi képlet alapján a legtöbb általunk vizsgált esetben kiszámítható:

$$C = \frac{N!}{x!(N-x)!}$$

ahol a $!$ a faktoriális jelöli. Megállapodás szerint, $0! = 1$; $1! = 1$; $2! = 2 \times 1 = 2$; $3! = 3 \times 2 \times 1 = 6$ és így tovább. Például, ha $x = 2$ és $N = 3$, akkor

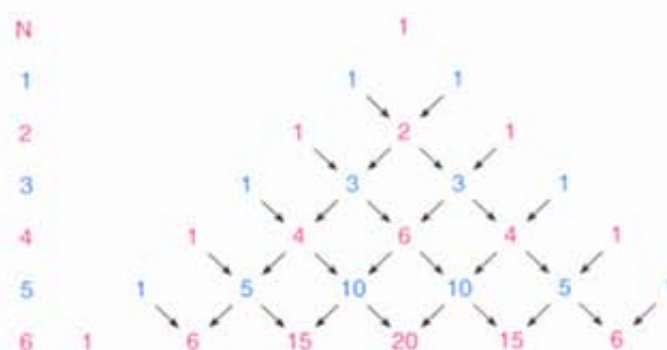
$$C = \frac{3!}{2!(3-2)!} = \frac{3 \times 2 \times 1}{2 \times 1 \times 1} = 3$$

Tehát ugyanazt az eredményt kaptuk, mint az előbb, amikor az összes lehetőséget leírtuk.

A binomiális együtthatót Pascal-háromszög segítségével is meghatározhatjuk (Pascal XVII. századi francia matematikus, filozófus). Ebben a felírásban egy adott szám a felette levő sor két számának összege (2.9. ábra). Vegyük példaként az $N = 3$ esetet, és nézzük a Pascal-háromszög 4. sorát. Ebben a sorban az első szám $C = 1$, amely annak az esetnek az együtthatója, amikor mindegyik kimenetel az egyik típusba tartozik a két lehetséges közül (pl. három fej, tehát $x = 3$, $N - x = 0$). A sor második száma $C = 3$, jelentése $x = 2$ (két fej) és $N - x = 1$ (1 írás). A harmadik szám $C = 3$, jelentése $x = 1$ (egy fej) és $N - x = 2$ (2 írás). Végül a negyedik szám $C = 1$, jelentése $x = 0$ (nincs fej), $N - x = 3$ (3 írás).

A binomiális eloszlást felhasználhatjuk, annak becslésére, hogy meghatározott számú utód között várhatóan hogyan alakul a nemek aránya. Egy család 4 gyereket szeretne ($N = 4$), mi a valószínűsége annak, hogy mindegyikük lány lesz ($x = 4$)? Azaz, mi a valószínűsége annak, hogy N eseményből $x = 4$ és $N - x = 0$? A születendő gyermek $\frac{1}{2}$ valószínűséggel lehet fiú, és $\frac{1}{2}$ valószínűséggel leány. Ezért

$$P(4 \text{ lány } 4 \text{ gyermekből}) = C \left(\frac{1}{2}\right)^4 \left(\frac{1}{2}\right)^0$$



2.9. ábra. A binomiális együttható (C) kiszámítása különböző N értékekre Pascal-háromszöggel. A vízszintes sorokban álló számok megadják C értékét $x = N, N - 1, N - 2$ stb. esetén

A binomiális együttható a képletből:

$$C = \frac{4!}{4!0!} = 1$$

Illetve a Pascal-háromszögről leolvasva, $N = 4$, $x = 4$, akkor $C = 1$. Mivel bármely szám 0-adik hatványa 1:

$$P(4 \text{ lány } 4 \text{ gyermekből}) = (1) \left(\frac{1}{2}\right)^4 (1) = \frac{1}{16}$$

Ezután nézzünk egy valamivel bonyolultabb esetet. Négy testvér között, milyen valószínűséggel várható két lány? Vagyis $N = 4$, $x = 2$ és $N - x = 2$. A binomiális eloszlást alkalmazva:

$$P(2 \text{ lány } 4 \text{ gyermekből}) = C \left(\frac{1}{2}\right)^2 \left(\frac{1}{2}\right)^2, \text{ ahol}$$

$$C = \frac{4!}{2!2!} = 6$$

ezért:

$$P(2 \text{ lány } 4 \text{ gyermekből}) = 6 \left(\frac{1}{2}\right)^2 \left(\frac{1}{2}\right)^2 = \frac{6}{16} = \frac{3}{8}$$

$C = 6$, mert hat lehetséges születési sorrend van két lány (L) és két fiú (F) esetében: FFLL, FLFL, FLLF, LFFL, LFLF és LLFF.

A tárgyalat valószínűségeket más esetekre is alkalmazhatók. Macskák körében a fehér folt megjelenése a szőrzetben, elsősorban a mellkason, egy gén által meghatározott jelleg. A fehér foltosság allélja (A) domináns a folt nélküli szőrzetet kialakító allél (a) felett. A szőrzethosszúságot egy másik gén örökíti, melynek a B domináns allélja rövid, b recesszív allélja pedig hosszú szőrzetet eredményez. A 2.10. ábrán látható macska mellkasán és lábán fehér foltos, genotípusa tehát AA vagy Aa , és rövid szőrű, így erre a jellegre nézve BB vagy Bb genotípusú. Milyen fenotípusok és milyen arányban várhatók, ha mindkét génre nézve heterozigóta macskákat keresztezünk?

A 2.11. ábra szemlélteti az utódok várható fenotípus gyakoriságait a szegregáció és a független öröklődés elve alapján. Az utódok legnagyobb része ($\frac{9}{16}$) a szülői fenotípust mutatja, tehát fe-



2.10. ábra. Rövid szőrű, fehér foltos macska

© H. Reinhard/OKAPIA/Photo Researchers, Inc.

hét foltos és rövid szőrű, míg a kölykök $\frac{1}{16}$ -od része mindkét jellegben eltér szüleitől, vagyis folt nélküli és hosszú szőrű.

Erre az esetre is alkalmazhatjuk a valószínűségi elveket. Mi a valószínűsége, hogy két heterozigóta macska négy kölyke közül mindegyik hosszú szőrű (bb) és fehér foltos lesz ($A-$)? Vagyis $N = 4$, $x = 4$, $N-x = 0$:

$$\begin{aligned} P(4 \text{ fehér foltos, hosszú szőrű } 4 \text{ kölyökből}) &= [P(bb A-)]^4 \\ &= (\frac{1}{4})^4 \\ &= 0,0012 \end{aligned}$$

Tehát nagyon kicsi az esélye egy ilyen alomnak, hozzávetőleg egy az ezerhez. (Ilyen esetben arra is lehet gyanakodni, hogy tévedés történt, és a kan hosszú szőrű volt!)

A mendeli genetika megértéséhez szükséges a valószínűség néhány alapelveinek ismerete: (1) a szorzási szabály kimondja, hogy két független esemény együttes előfordulásának valószínűsége egyedi valószínűségeik szorzata; (2) az összegzési szabály szerint két, egymást kölcsönösen kizáró esemény előfordulásának valószínűsége egyedi valószínűségeik összege; (3) a feltételes valószínűség egy esemény bekövetkezésének valószínűsége, feltéve, ha egy másik esemény már bekövetkezett; (4) a binomiális eloszlás, amely megadja, hogy N számú eseményből, amelyek mindegyikének két kimenetele van, mi a valószínűsége, hogy az egyik kimenetel x , a másik $N-x$ számú lesz.

Szülők
(fehér foltos,
rövid szőrű)



Ivarsejtek

$$\frac{1}{4} AB \quad \frac{1}{4} Ab \quad \frac{1}{4} aB \quad \frac{1}{4} ab$$

Petesejtek

$$\frac{1}{4} AB \quad \frac{1}{4} Ab \quad \frac{1}{4} aB \quad \frac{1}{4} ab$$

	$\frac{1}{4} AB$	$\frac{1}{4} Ab$	$\frac{1}{4} aB$	$\frac{1}{4} ab$
$\frac{1}{4} AB$	$\frac{1}{16} AABB$	$\frac{1}{16} AABb$	$\frac{1}{16} AaBB$	$\frac{1}{16} AaBb$
$\frac{1}{4} Ab$	$\frac{1}{16} AABb$	$\frac{1}{16} AAbb$	$\frac{1}{16} AaBb$	$\frac{1}{16} Aabb$
$\frac{1}{4} aB$	$\frac{1}{16} AaBB$	$\frac{1}{16} AaBb$	$\frac{1}{16} aaBB$	$\frac{1}{16} aaBb$
$\frac{1}{4} ab$	$\frac{1}{16} AaBb$	$\frac{1}{16} Aabb$	$\frac{1}{16} aaBb$	$\frac{1}{16} aabb$

$\frac{9}{16} A-B-$ (fehér foltos, rövid szőrű)



$\frac{3}{16} A-bb$ (folt nélküli, rövid szőrű)



$\frac{3}{16} aaB-$ (fehér foltos, hosszú szőrű)



$\frac{1}{16} aabb$ (folt nélküli, hosszú szőrű)



2.11. ábra. Kétszeresen heterozigóta, fehér foltos és rövid szőrű macskák keresztezéséből várható utódok hasadási aránya

A VILLÁS ELÁGAZÁS MÓDSZERE

Az előzőekben bemutatott megközelítés talán a legjobb módja, hogy szemléltessük a különböző genotípusú utódok valószínűségét két gén esetén. Három vagy több gén vizsgálatkor jól alkalmazható a **villás elágazás módszere**, mivel minden kategóriára megadja a valószínűségeket, de egyszerre csak egy génnel foglalkozik.

A módszer azon a feltevésen alapul, hogy a rendszer minden génje függetlenül öröklődik. Vegyük példaként a veteményborsó már ismertett dihibrid keresztezését (2.12. ábra). Az utódokat először két kategóriára osztjuk, gömbölyű ($\frac{1}{2}$) és szögletes ($\frac{1}{2}$) magvúakra, az egyik gén szerint. Ezt követően ezen a két kategórián belül már a másik gén alapján osztályozunk ($\frac{1}{2}$ sárga, $\frac{1}{2}$ zöld). Ezek kombinációjával kapott fenotípus kategóriák valószínűségét megkapjuk, ha az egyes fenotípusok gyakoriságát összeszorozzuk. Például a szögletes és sárga magvú kategória várható aránya $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$.

A módszer kettőnél több génre is jól alkalmazható. Vegyük példának ismét a macska szőrzetszínének öröklődését, de bővítjük ki a rendszert egy harmadik génnel (C) is. A a homozigóta egyedek ún. elmosódott színűek, a $C-$ genotípusúak pedig telt, élénk színűek. Ez a gén okozza például a szürke és fekete szín közötti különbséget, a szürke szín a recesszív, a fekete a domináns allél jelenlétében alakul ki. Egy $aaBbCc$ és egy $AABbca$ genotípusú macska keresztezéséből milyen valószínűséggel kapunk fehér foltos, hosszú szőrű, élénk színű kölyköket? A problémát megoldhatjuk a villás elágazás módszerével (2.13. ábra). A valószínűség $\frac{1}{8}$, amit az ábra harmadik sorából határozhatunk meg. A kérdésre válaszolhatunk a szorzási szabály alkalmazásával is:

$$\begin{aligned} P(\text{fehér foltos, hosszú szőrű, élénk színű}) &= P(A- bb C-) \\ &= P(A-) \times P(bb) \times P(C-) \\ &= \frac{1}{2} \times 1 \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{4} \end{aligned}$$

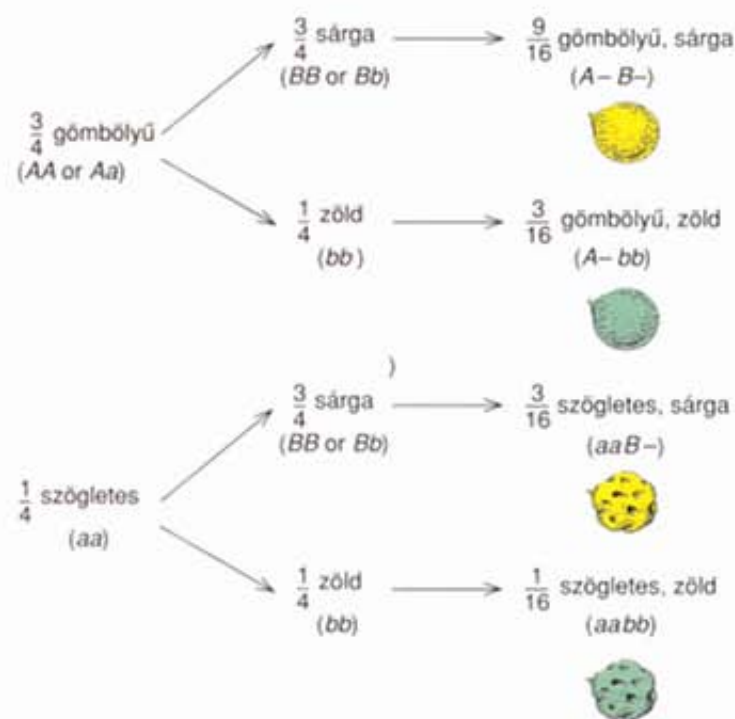
Azt is megmondhatjuk, milyen valószínűséggel születik ugyanennek a szülőpárnak $AaBbCc$ genotípusú kölyke? Ebben az esetben:

$$\begin{aligned} P(AaBbCc) &= P(Aa) \times P(Bb) \times P(Cc) \\ &= \frac{1}{2} \times 1 \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{4} \end{aligned}$$

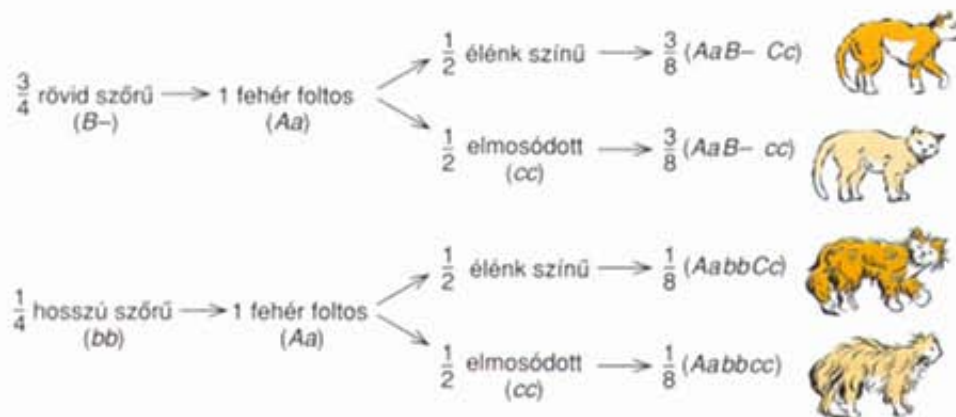
A villás elágazás módszere nagyszámú gén esetén is használható a lehetséges geno- és fenotípusok valószínűségének becslésére, feltéve, ha azok függetlenül öröklődnek.

A gének domináns alléljait gyakran nagybetűvel jelölik, a recesszívet pedig kicsivel, (pl. A és a). A mutációk száma azonban meghaladhatja az ábécé betűinek számát. Ezért például a *Drosophila melanogaster* egyik csökevényes szárnyú, recesszív mutánsát vg jellel szimbolizálják (*vestigial* – csökevényes). A gén normál allélját sem nagybetűvel jelölik, hanem vagy vg^+ , vagy egyszerűen $+$ jelet használnak, és mindkettő a **vad típusú**, azaz a nem mutáns allélt jelenti. A normál fenotípusú, de az adott génre nézve heterozigótákat vg^+vg vagy $+vg$ jelöléssel írják fel. A mutánsok is lehetnek dominánsak, mint például a *Drosophila* pöndörödött szárnyú Cy (*curly*) mutánsa, ahol is a dominanciát a nagybetű jelzi (2.14. (a) ábra). A heterozigóta Cy^+ szárnya pöndörödött, mivel a mutáns allél domináns a vad típusú allél ($+$) felett.

Alkalmazzuk ezt a jelölést a villás elágazás módszerénél is! (Felírásakor célszerű a különböző gének szimbólumai között egy betűközt kihagyni, a félreértések elkerülése érdekében.) $+vg$ $Cy^+ se se \times +vg ++ +se$ genotípusú egyedeket keresztezünk egymással. Állapítsuk meg, milyen arányban várhatók ebben az esetben pöndörödött szárnyú, tehát a második lokuszra mutáns, a másik két jellegre pedig normál fenotípusú utódok. (A se az ún. *sepia* – barna szemszín okozó mutáns allél jele.)



2.12. ábra. A villás elágazás módszere dihibrid keresztezés esetén

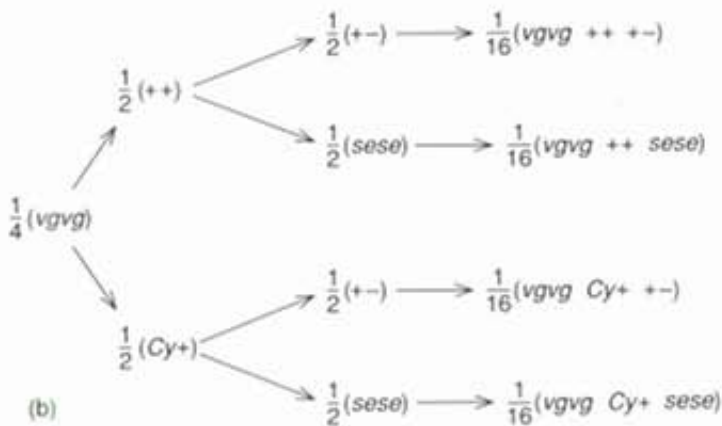
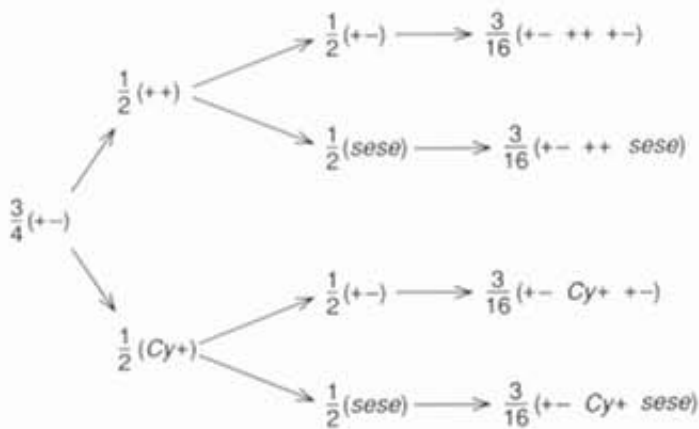


2.13. ábra. A várható fenotípus kategóriák és valószínűségük $aa Bb Cc$ és $AA Bb cc$ genotípusú szülők keresztezésekor



Cy

(a)



2.14. ábra. (a) Pöndörödött szárnyú *Drosophila melanogaster*, mutáns Cy. (b) A *Drosophila* +vg Cy+ sese és +vg ++ +se genotípusú egyedeinek keresztezéséből várható nyolc fenotípus kategória és azok valószínűsége

Az utódok nyolc lehetséges genotípusát és várható gyakoriságukat a 2.14.(b). ábra mutatja be. A kérdéses kategória a harmadik sorban található, a szélső jobb oldali oszlopban. A szorzási szabály alapján:

$$\begin{aligned} P(+ - Cy+ + -) &= P(+ -) \times P(Cy+) \times P(+ -) \\ &= \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \\ &= \frac{1}{8} \end{aligned}$$

A valószínűségek szorzási szabályán alapuló villás elágazás módszere nagyszámú gén esetében is alkalmazható az utódok várható geno- és fenotípusának becslésére, feltéve, ha a vizsgált gének függetlenül öröklődnek.

AZ ILLESZKEDÉS VIZSGÁLATA

Hogyan használhatjuk fel a valószínűségeken alapuló becsléseket a genetikai vizsgálatokban? Mint láttuk, Mendel F_2 -ben mért adatai nagyon közel voltak az elméletileg várható 3:1 arányhoz (2.1. táblázat). De mi a helyzet akkor, ha egy mérésben nagyobb eltérést tapasztalunk? Véletlen esemény áll-e a háttérben, vagy pedig hipotézisünk volt helytelen? Ezeknek a kérdéseknek az eldöntésére szolgálnak a statisztikai tesztek, amelyek segítségével megállapíthatjuk, hogy a kísérletben kapott eredmények mennyire egyeznek meg az elméletileg várttal, mennyire illeszkednek ahhoz. Mendel nem alkalmazott ilyen próbákat, hiszen azokat csak évtizedekkel később fejlesztették ki, de más kutatóknak nagy segítséget jelentettek a mendelitől eltérő öröklődést mutató jellegek azonosításában.

Az illeszkedés pontosságának megállapítására leggyakrabban a **khi-négyzet próbát** alkalmazzák. Ebben a statisztikai eljárásban minden kategória mért, *megfigyelt adatát* (például a domináns és recesszív utódok) összevetik a hipotézis (itt a hasadás elve) alapján várt, számított, *becsült értékkel*. Lényeges, hogy a próbában nem a megfigyelt, illetve becsült gyakoriságokat, hanem a megfigyelt és becsült értékeket vetjük össze, tehát a számításokat minden egyes kategóriánál külön-külön végezzük el, és csak azután összegezzük az adatokat. Az eltérés mértékének becslésére, függetlenül az eltérés irányától, a tapasztalt (T) és az elméletileg várt (E) adatok különbségének négyzetét használjuk. Ezt az értéket standardizáljuk azzal, hogy elosztjuk az adott kategóriában elméletileg várható mennyiséggel. A khi-négyzet (χ^2) próba képlete:

$$\chi^2 = \sum \frac{(T - E)^2}{E}$$

ahol a Σ (görög nagy szigma) azt jelzi, hogy az összes kategóriát összegezzük.

A módszert Mendel egyik backcross kísérletének adataival szemléltetjük. Ebben a kísérletében Mendel F_1 lila virágú növényeket (Aa) keresztezett fehér virágúakkal (aa). A 166 utód között 85 lila és 81 fehér virágú volt. A hasadás elve alapján az elméletileg várható érték mindkét kategóriában 50-50%, vagyis $166 \times 0,5 = 83$ egyed. Vegyük észre, hogy a tapasztalt, illetve az elméletileg várt értékek összegének értelemeszerűen meg kell egyezniük! Az összeg ebben az esetben 166. Ezekkel az adatokkal meghatározhatjuk a khi-négyzet értékét (2.4. táblázat).

A lila, illetve a fehér virágú kategóriáknál a khi-négyzet megállapításához szolgáló adat $(2)^2/83$, illetve $(-2)^2/83$, vagyis

2.4. táblázat. Khi-négyzet próba Mendel backcross adatainak elemzésére

Virág-szín	Tapasztalati értékek	Elméletileg várt értékek	$\frac{(T-E)^2}{E}$
Lila	85	166(0,5) = 83	$\frac{2^2}{83} = 0,05$
Fehér	81	166(0,5) = 83	$\frac{(-2)^2}{83} = 0,05$
	166	166	$\chi^2 = 0,10$

mindkét esetben 0,05. Figyeljük meg, hogy négyzetre emelés nélkül az egyik kategória eltérése pontosan kiegyenlítené a másik kategóriáét! A két osztályra kapott értékeket összeadva kapjuk meg a khi-négyzetet, azaz $\chi^2 = 0,10$. Ez meglehetősen alacsony, jelezve a várt és megfigyelt értékek csekély eltérését, ezzel a hipotézis helyességét. De valójában hogyan lehet eldönteni, mennyire kicsi vagy nagy ez az eltérés?

A kapott khi-négyzet érték szignifikanciáját megállapíthatjuk, ha összevetjük a khi-négyzet táblázatban szereplő, azonos szabadságfokkal jellemezhető elméleti adattal. A **szabadságfok** statisztikai kifejezés, a szabadon választható, független értékek számát jelenti a gyakoriságeloszlásokban. Az illeszkedési tesztekben, így a khi-négyzet próbában is rendszerint eggyel kisebb, mint az összehasonlításra kerülő értékpárok száma. Másképp fogalmazva, a szabadságfok azoknak a kategóriáknak (itt fenotípus osztályoknak) a száma, amelyek függetlenek egymástól. Két kategória esetén például a szabadságfok 1. Ez a korlátozás abból ered, hogy amennyiben az összes egyedek száma adott (előző példánkban 166), és a két kategória közül az egyikbe 85 tartozik, a másikban már csak 81 lehet.

Tegyük fel, hogy ellenőrizni kívánjuk Mendel hipotézisének helyességét a hasadás elvére vonatkozóan, és több ismétlésben elvégezzük a kísérletet. Mindegyik mérésre kiszámolva a khi-négyzetet, megkapjuk a khi-négyzet értékek elméleti eloszlását. Az esetek egy kis részében előfordulhat, hogy a khi-négyzet nagy, mert a megfigyelt és becsült értékek távol esnek egymástól. Legtöbbször azonban a két érték közeli, így a khi-négyzet értéke kicsi.

Ahelyett, hogy megadnánk a khi-négyzet értékek teljes elméleti eloszlását, kiemelünk néhány fontosabb adatot (2.5. táblázat). Ezek azok a kritikus khi-négyzet értékek, amelyeknél a véletlenből adódóan csak ritkán kapunk magasabb értéket, ha hipotézisünk helyes. Az összehasonlításához legtöbbször két valószínűségi értéket (0,05 és 0,01) választanak. Amennyiben a kapott khi-négyzet meghaladja a 0,05, illetve 0,01 valószínűség alatt a táblázatban szereplő elméleti értéket a megfelelő szabadságfoknál, a kísérlet eredménye *szignifikánsan*, azaz statisztikailag igazoltan eltér az elméletileg várttól.

2.5. táblázat. Elméleti χ^2 értékek valószínűségei adott szabadsági fok¹ mellett

Szabadság-fok	Valószínűség				
	0,9	0,5	0,1	0,05*	0,01**
1	0,02	0,46	2,71	3,84	6,64
2	0,21	1,39	4,60	5,99	9,21
3	0,58	2,37	6,25	7,82	11,34
4	1,06	3,86	7,78	9,49	13,28
5	1,61	4,35	9,24	11,07	15,09
6	2,20	5,35	10,64	12,59	16,81
7	2,83	6,35	12,02	14,07	18,48
8	3,49	7,34	13,36	15,51	20,09
9	4,17	8,34	14,68	16,92	21,07
10	4,86	9,34	15,98	18,31	23,21

¹ A 0,05 és a 0,01 valószínűségi értékek (szignifikanciaszintek) statisztikailag megbízhatók, illetve nagyon megbízhatók, jelölésük *, illetve **

Ilyen esetben hipotézisünket el kell vetnünk. Az 5%-os valószínűségi érték (szignifikanciaszint) azt jelenti, hogy a véletlen folytán húsz esetből legfeljebb egyszer ($\% = 0,05$) kaphatunk azonos vagy nagyobb khi-négyzet értéket hipotézisünk helyessége esetén. 1%-os valószínűségi érték választásakor a hibahatár kisebb, 100 esetből mindössze 1, tehát a hipotézis csak akkor helyes, ha 100 mérésből csak 1 mutat nagyobb eltérést a véletlen hatására.

A lila és fehér virágú borsók esetében két kategória van, tehát a szabadságfok 1. A számított vagy megfigyelt khi-négyzet 0,1, ami jóval kisebb, mint az 5%-os választott valószínűségi értéknél szereplő elméleti adat (3,84). Tehát azt mondhatjuk, hogy a megfigyelt khi-négyzet érték nem tér el szignifikánsan az elméletileg várttól, a mért értékek *illeszkednek* a hasadási elv alapján várt értékekhez. Azt azonban nem állíthatjuk, hogy mindez bizonyítja a szegregáció elvét, a statisztikai próbák nem bizonyítanak egy hipotézist. De az a tény, hogy nagyszámú hasonló keresztezést végeztek, és azok megfeleltek a hasadás elvének, biztosak lehetünk abban, hogy ez a folyamat felelős ezeknek a géneknek az öröklődéséért.

Térjünk vissza Mendel dihibrid keresztezéséhez, és vizsgáljuk meg, hogy a megfigyelt fenotípus-eloszlás megfelel-e a független öröklődés hipotézisének. Alkalmazzuk a khi-négyzet próbát, és először számoljuk ki az elméletileg várható egyedszámokat minden egyes kategóriában. A kísérletben 556 utód szerepelt, így a négy fenotípus kategória várható egyedszámait megkapjuk, ha ezt az értéket megszorozzuk $\frac{1}{16}$ -dal, $\frac{3}{16}$ -dal, $\frac{3}{16}$ -dal és $\frac{1}{16}$ -dal (2.6. táblázat). A khi-négyzet formula alkalmazásával, a négy kategória értékének összegzésével a khi-négyzet 0,48. Az előző, egy génes példához hasonlóan ez is nagyon alacsony érték. Ebben az esetben azonban négy kategória van, ezért a szabadságfok 3. A 2.5. táblázatból leolvasható, hogy 5%-os választott valószínűségi értéknél a számított khi-négyzetnek el kellene érnie vagy túl kellene lépnie a 7,82-t ahhoz, hogy az eltérés szig-

2.6. táblázat. Dihibrid keresztezés khi-négyzet próbája

Mag-típus	Tapasztalati értékek	Elméletileg várt értékek	$\frac{(T-E)^2}{E}$
Gömbölyű, sárga	315	556(%) = 312,8	$\frac{(2,2)^2}{312,8} = 0,02$
Szögletes, sárga	101	566(%) = 104,2	$\frac{(-3,2)^2}{104,2} = 0,10$
Gömbölyű, zöld	108	556(%) = 104,2	$\frac{(3,8)^2}{104,2} = 0,14$
Szögletes, zöld	32	556(%) = 34,8	$\frac{(-2,8)^2}{34,8} = 0,22$
	556	556	$\chi^2 = 0,48$

nifikáns legyen a várt és tapasztalt adatok között. A 0,48 sokkal kisebb ennél, tehát arra következtethetünk, hogy a kísérlet eredménye megfelel a független öröklődés hipotézisének.

Nem szabad azonban megfeledkeznünk arról, hogy a khi-négyzet számításánál nem a gyakoriságokkal, hanem a várt és megfigyelt értékekkel kell számolni. A próba csak azokban az esetekben használható, ha a várt értékek minden kategóriában eléri vagy meghaladják az ötöt. Amennyiben a várható érték ötnél kisebb, akkor a próba módosított képletét kell használni, vagy pedig a kapott khi-négyzet valamivel nagyobb lehet.

Érdekes tudománytörténeti adat, hogy Mendel mindegyik eredménye nagyon szorosan illeszkedik, és következetesen igen alacsony khi-négyzet értékeket ad. Dihibrid keresztezésben, a hipotézis helyessége esetén a khi-négyzet értéke az eseteknek csak 10%-ában kevesebb 0,58-nál, ráadásul a Mendel által kapott érték még ennél is alacsonyabb, 0,48 volt. Ezért néhány statisztikus úgy vélekedik, hogy Mendel – vagy néhány hallgatója – átalakította egy kicsit az eredményeket, hogy jobban alátámaszsják a szegregáció és a független kombinálódás elvét. Valószínűleg sohasem derül ki az igazság, de ez nem von le semmit Mendel zseniális megfigyeléséből. Meg kell jegyezni, hogy a Mendel-kísérleteket megismétlő kutatók is rendkívül közeli eredményeket kaptak a várthoz (2.2. táblázat).

A khi-négyzet próba a várt és megfigyelt kísérleti adatok illeszkedésének vizsgálatára alkalmas statisztikai módszer. Egy bizonyos kritikus értéknél magasabb khi-négyzet érték azt jelzi, hogy a hipotézis, amelynek alapján a várható eredmények becslése történt, helytelen lehet. Mendel minden kísérleti eredménye szorosan illeszkedik a várt értékekhez, így igen kis khi-négyzet értékeket ad.

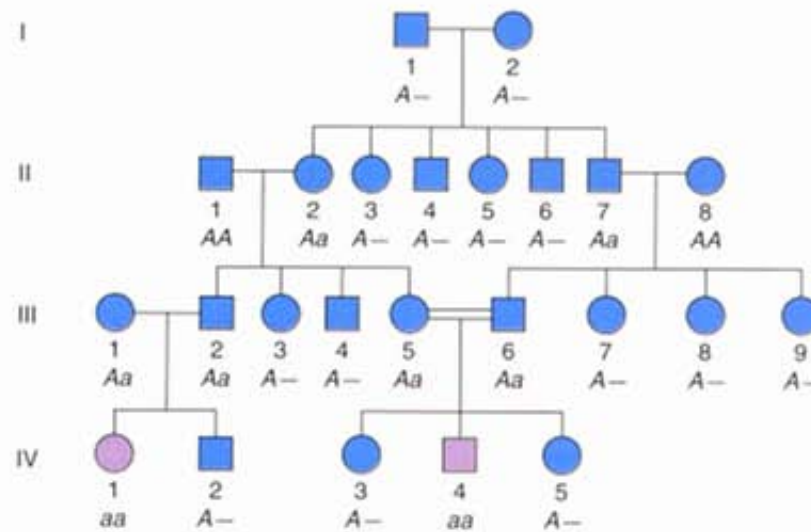
MENDELI ÖRÖKLŐDÉS EMBERI JELLEGEKRE

Ugyanazok az öröklődési mintázatok, mint amelyeket a borsó, az ecetmuslica vagy a macskák példáján láttunk, az ember esetében is megtalálhatók, de sokkal több tulajdonságot érintenek. Victor McKusick 6678 öröklődő bélyeget és betegséget sorol fel 1994-ben megjelent munkájában (*Mendelian Inheritance in Man*). Az egész világon intenzív kutatások folynak a betegségeket okozó gének lokalizálására, és szinte hetente leírnak egy gént a tudományos közleményekben. A jellegek öröklődésének mechanizmusát meglehetősen nehéz felderíteni, mivel a testvérek száma rendszerint kevés, a fejlettebb országokban ritkaságnak számít, ha egy családban tíz gyermek van. (Összehasonlításképpen: a borsó egyetlen keresztezéséből magvak százai származhatnak.) Ennek ellenére, a Mendel-féle arányok alkalmazásával még kis családokban is ugyanazokat az öröklődési mintázatokat figyelhetjük meg.

Mielőtt megismerkednénk az ember mendelező jellegeivel, tekintsük át, milyen alapvető jelöléseket használnak a családfaelemzésekben (2.15. ábra). A családfán a nőket kör, a férfiakat négyzet jelöli. Csúcsára állított rombusz jelképezi azokat, akiknek nemét nem sikerült azonosítani, de ugyanazt a jelölést használják akkor is, ha a nem lényegtelen a jelleg



2.15. ábra. A családfaelemzésekben használt jelölések



2.16. ábra. Recesszív jelleg öröklődését mutató családfa, a családtagok genotípusával. A – domináns, a – recesszív allél, A– – olyan személy, akinél a másik allél típusa nem ismert

genetikai analizisében. A vizsgált bélyeget mutató személy szimbóluma sötétített vagy a többtől eltérő színű. A házastársak jelét egyszeres vízszintes vonal köti össze, de a közeli rokonok közötti ún. rokonházasságot (latin: *consanguineus*) kettős összekötő vonal jelzi.

A gyermekek szimbólumai a szülőket összekötő vonalról ágaznak le, mégpedig a születés sorrendjében, balról jobbra haladva. A generációkat a legidősebbtől a legfiatalabbig római számok jelzik, végül a generációkon belül az egyes személyeket arab számok (2.16. ábra).

RECESSZÍV JELLEGEK

Kövessük végig egy családban egy recesszív jelleg öröklődését (2.16. ábra)! Recesszíven öröklődő emberi betegség például az **albinizmus** – a melanin nevű pigment termelésének hiánya, és a **cisztás fibrózis** (mukoviszcidózis) – a tüdők, a nyál- és a hasnyálmirigy káros nyálkatermelésével járó súlyos rendellenesség. (McKusick összesen 1730 recesszív lokuszt sorol fel.) Ez az egyik leggyakoribb recesszív betegség a fehér bőrű népességben, minden 2000–2500 születésre jut egy érintett. A 2.16. ábrán látható családfán két egyén, a IV-1 és a IV-4 beteg, illetve recesszív genotípusú. Szüleik (III-1 és III-2, illetve a III-5 és III-6) nem betegek, ami jellemző vonás a recesszív jellegek öröklődésében. Nyilvánvaló, hogy a jelleg a szülők heterozigótasága miatt jelent meg, de esetükben a recesszív allél hatását elfedte a domináns allél. A recesszív fenotípus mind a nők, mind a férfiak körében megjelenik.

A recesszív betegségek esetén gyakran megfigyelhető, hogy az érintett személyek szülei rokonok. A fenti családfában például a IV-4 férfi szülei elsőfokú unokatestvérek, vagyis a III-5 és III-6 házaspár nagyszülei (I-1 és I-2) azonosak. (A 16. és a 17. fejezetben részletezzük, miért magasabb a recesszív jellegek gyakorisága rokonházasságokban.) A III-5 és III-6 személyek rokonainak jelentős része az egyszerűség kedvéért nem szerepel a családfán.



2.17. ábra. Albinó hopi indián leány
Field Museum of Natural History, Chicago, Neg. 118.

A recesszív tulajdonságok öröklődését szemléltető családfának más fontos jellegzetességeik is vannak. Ha mindkét szülő mutatja a vizsgált jelet, vagyis homozigóta recesszív, akkor gyermekeik is azok. Egy érintett személy testvéreinek – amennyiben a szülők heterozigóták – megközelítőleg $\frac{1}{4}$ részük

2.7. táblázat. Az emberi tulajdonságok öröklődésének jellemzői

Recesszív jelleg

- (a) A szülők általában nem érintettek.
- (b) Egy érintett személy testvéreinek hozzávetőleg a negyede érintett (feltéve, ha a szülők hordozók).
- (c) Annak a valószínűsége, hogy a születendő gyermek is érintett lesz, $\frac{1}{4}$.
- (d) A recesszív tulajdonság gyakran rokonházasság következménye.
- (e) Két beteg szülőnek nem lehet egészséges gyermeke.

Domináns jelleg

- (a) A tulajdonság minden generációban megjelenik (feltéve, ha legalább az egyik szülő érintett).
- (b) Amikor az egyik szülő érintett, gyermekeinek mintegy fele mutatja a jelleget.
- (c) Annak a valószínűsége, hogy a születendő gyermek mutatja a jelleget, $\frac{1}{2}$.
- (d) A jelleget nem mutató személyeknek nem születik érintett gyermekük (kivéve, ha mutáció történik).
- (e) Előfordulhat, hogy két érintett szülő gyermeke nem mutatja a jelleget.

szintén homozigóta recesszív a mendeli szegregáció elve miatt. Továbbá $\frac{1}{4}$ a valószínűsége annak is, hogy a szülők következő gyermeke ugyancsak homozigóta recesszív lesz. A recesszív jelleg öröklődésének a családfáról leolvasható jellemzőit a 2.7. táblázat összegzi.

Egy adott családban a különböző fenotípusú gyerekek aránya rendszerint nem közelíti meg a mendeli arányokat, aminek oka az, hogy a családok általában kis létszámúak, családfájuk nagy valószínűséggel nem tükrözi a mendeli számarányokat. A probléma megértéséhez vissza kell térnünk a binomiális eloszláshoz. Vizsgáljuk meg hat testvérnek az esetét, akik közül ketőt érint a tulajdonság. Meg kell jelölnünk közülük az ún. **probandust**, akin először azonosították a jelleget, és akitől kiindulva kezdték meg a család genetikai vizsgálatát. Mi a valószínűsége, hogy a probandus öt testvére közül egy szintén recesszív fenotípusú? A hasadási arány adott: $\frac{1}{2}$ domináns (p) és $\frac{1}{2}$ recesszív (q), tehát:

$$P(4 \text{ egészséges, } 1 \text{ beteg}) = C(5,1) \left(\frac{1}{2}\right)^1 \left(\frac{1}{2}\right)^4$$

Ebben az esetben, $C = 5$, tehát:

$$P(4A-, 1aa) = 5 \left(\frac{1}{2}\right)^1 \left(\frac{1}{2}\right)^4 = 0,396$$

Ez meglehetősen magas arány, és a valóságban is ez a leggyakoribb eset az ötgyermekes családok körében. A két következő leggyakoribb összetétel: $P(5A-, 0aa) = 0,237$ és a $P(3A-, 2aa) = 0,264$.

Mielőtt továbblépnénk, két fontos dolgot meg kell még említenünk a recesszív jelleg öröklődését mutató családfáról. Először is, azok a nem rokon személyek, akiknek nincsenek homozigóta recesszív gyermekeik (a 2.16. ábra II-1 és II-8 tagjai) feltételezhetően homozigóták a domináns allélra. Az ilyen személyek is lehetnek heterozigóták, de mivel a legtöbb recesszív allél valóban ritka, nagyobb a valószínűsége a homozigóta domináns genotípusnak. Másodszor, ha van a családban egy recesszív fenotípusú személy, akkor szülei, akik nem mutatják a jelleget, heterozigóták. A hasadási arányok figyelembevételével számoljuk ki, hogy egy ilyen családban, mekkora valószínűséggel lesz egy fenotípusosan nem érintett testvér heterozigóta. Annak a valószínűsége, hogy a testvér heterozigóta $\frac{1}{2}$, annak, hogy egészséges $\frac{1}{2}$, ezért a feltételes valószínűség:

$$\begin{aligned} P(\text{heterozigóta} \mid \text{egészséges}) &= \frac{P(\text{heterozigóta})}{P(\text{egészséges})} \\ &= \frac{\frac{1}{2}}{\frac{1}{2}} \\ &= \frac{1}{2} \end{aligned}$$

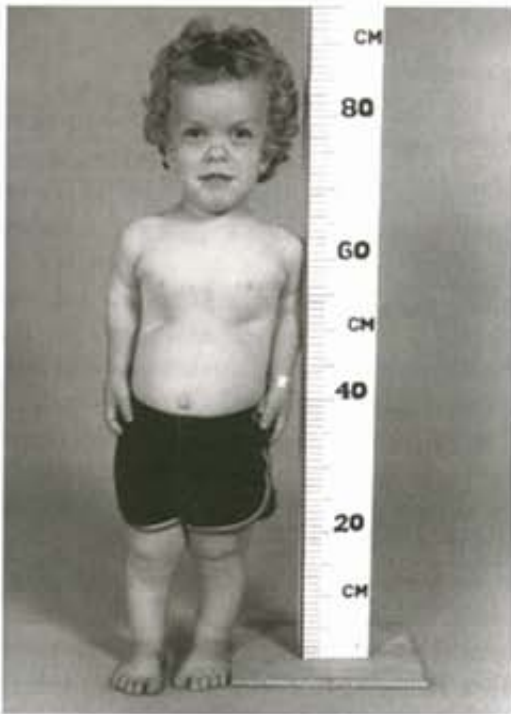
Vagyis egy öröklődő betegségben szenvedő személy testvérei $\frac{1}{2}$ valószínűséggel hordozók (heterozigóták) a vizsgált jellegre.

DOMINÁNS JELLEGEK

Ezután tekintsük át azokat a családfákat, amelyek a domináns bélyegek öröklődését szemléltetik. Az **achondroplázia** (achondroplasia) az emberi törpenövés leggyakoribb típusa (2.18. ábra), a **Huntington-kór** pedig a központi idegrendszer nagyfokú degenerációja miatt lép fel, és tünete az arcizmok, valamint a végtagok izomzatának gyors, csapkodó mozgása (vitustánc). Mindkét betegséget domináns allél alakítja ki. (McKusick összesítésében 4458 domináns lokusz szerepel.) A dominánsan öröklődő jelleg esetén az érintett személy szülei közül legalább az egyik érintett (feltéve, hogy nem mutáció áll a háttérben), és az eltérés minden generációban megjelenik (2.19. ábra).

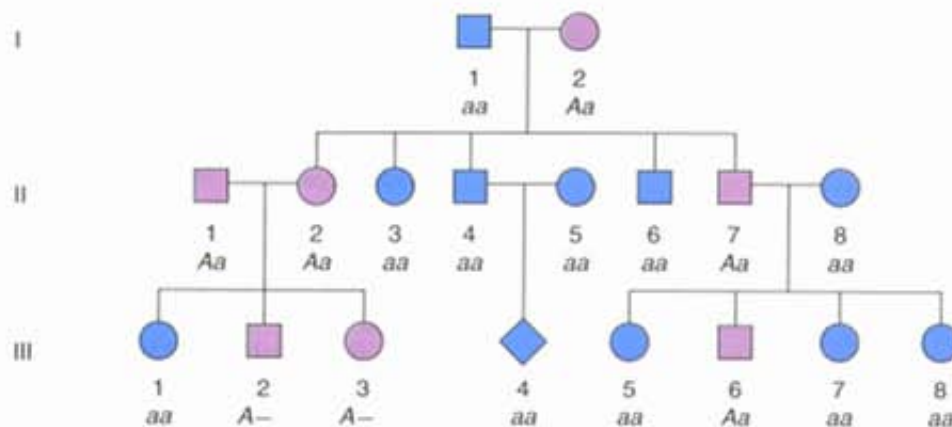
Ez a mintázat annak köszönhető, hogy a beteg gyermek valamelyik szülőjétől öröklő a jelleget okozó domináns allélt. A recesszív fenotípusú személyeknek csak egészséges gyermekeik lehetnek (kivéve, ha mutáció történik). A recesszív jelleg öröklődésétől eltérően, két érintett szülőnek is lehet egészséges gyermeke, ha mindketten heterozigóták. A hasadás elve alapján, amennyiben az egyik szülő beteg, akkor gyermekeinek fele várhatóan szintén beteg lesz. (Lásd a 2.7. táblázatot a domináns tulajdonságok családfájának jellemzőiről.) Az eddigiekhez hasonlóan, azokban az esetekben, amikor a kis létszám miatt eltérés tapasztalható az $\frac{1}{2}$ -es aránytól, alkalmazhatjuk a binomiális eloszlást a valószínűség becslésére.

A 2.7. táblázatban felsorolt jellemzők nem minden jelleg esetében teljesülnek maradéktalanul, és a betegségek öröklődésének más módjai is vannak. A 3. fejezetben több ilyen példát is bemutatunk, a hozzájuk tartozó családfákkal együtt. A 2.16. és 2.19. ábrákon bemutatott családfák nagy létszámúak, ezért meglehetősen könnyen elemezhetők. A legtöbb családfában azonban jóval kevesebb személy szerepel, ezért az öröklésment nem tisztázható biztonságosan.



2.18. ábra. Akondropláziában, a törpenövés leggyakoribb típusában, szenvedő fiúgyermek

Courtesy Dr. Judith Hall



2.19. ábra. Domináns jelleg öröklődését mutató családfa, a családtagok genotípusával. A : domináns, a : recesszív allél, A- : olyan személy, akinél a másik allél típusa nem ismert

Mendel szabályai alkalmazhatók az emberi jellegek öröklődésére is, de mivel a családok rendszerint kis létszámúak, az öröklésment tisztázása sokszor nehézségekbe ütközik. Ugyanakkor néhány általános vonás figyelhető meg a recesszív és a domináns tulajdonságok öröklődésében.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Több kutató is megismételte Mendel kísérleteit, hogy ellenőrizze, megerősítse kutatási eredményeit. Correns és Tschermak például sárga és zöld magvú borsófajtákat kereszteztek, majd az F₁ öntermékenyítése után elemezték az F₂ nemzedéket. Correns az F₂ egyedek között megfigyelt 1394 sárga és 453 zöld, Tschermak pedig 3580 sárga és 1190 zöld magvú utódot. Megfelelnek-e ezek az adatok a hasadás elvének? (Számítsuk ki a khi-négyzet értékét az illeszkedés vizsgálatára!)

MEGOLDÁS

Foglaljuk táblázatba a két keresztezés megfigyelt és becsült adatait, majd határozzuk meg a χ^2 értékét:

	Fenotípus	Tapasztalati értékek	Elméletileg várt értékek	$\frac{(T-E)^2}{E}$
Correns	Sárga	1394	$1847 \times \frac{3}{4} = 1385,25$	0,055
	Zöld	453	$1847 \times \frac{1}{4} = 461,75$	0,166
	Összes	1847	1847	$\chi^2 = 0,221$
Tschermak	Sárga	3580	$4770 \times \frac{3}{4} = 3577,5$	0,002
	Zöld	1190	$4770 \times \frac{1}{4} = 1192,5$	0,005
	Összes	4770	4770	$\chi^2 = 0,007$

A szabadságfok mindkét kísérletben 1, mert csak két fenotípus kategória van. Mivel a χ^2 érték kisebb a 3,84-nél (l. 2.5. táblázat), a mért arányok alátámasztják a hasadás elvét.

2. FELADAT

A független öröklődés igazolására a Mendel-kísérletekben is alkalmazott gömbölyű és sárga magvú, illetve szögletes és zöld magvú, tiszta származékú borsófajtákat kereszteztek egymással. A keresztezésből származó utódok egyikét visszakeresztették egy szögletes és zöld magvú vonalba tartozó növényvel. Ebből a keresztezésből 42 gömbölyű, sárga; 45 gömbölyű, zöld; 46 szögletes, sárga és 45 szögletes, zöld magvú növény származott. Milyen volt az egyes fenotípusokhoz tartozó növények – szülők, utódok – genotípusa? Független öröklődést feltételezve, milyen utódszám várható a négy fenotípus kategóriában? Határozzuk meg a χ^2 értékét, és állapítsuk meg, hogy statisztikailag szignifikáns-e?

MEGOLDÁS

Szülői

nemzedék (P): gömbölyű, sárga (*AABB*) × szögletes, zöld (*aabb*)

Backcross utódok	Fenotípus	Genotípus	Megfigyelt	Elméletileg várt
	Gömbölyű, sárga	<i>AaBb</i>	42	44,5
	Gömbölyű, zöld	<i>Aabb</i>	45	44,5
	Szögletes, sárga	<i>aaBb</i>	46	44,5
	Szögletes, zöld	<i>aabb</i>	45	44,5
Összesen:			178	178

$$\chi^2 = \frac{(42-44,5)^2}{44,5} + \frac{(45-44,5)^2}{44,5} + \frac{(46-44,5)^2}{44,5} + \frac{(45-44,5)^2}{44,5}$$

$$= 0,14 + 0,01 + 0,05 + 0,01$$

$$= 0,21$$

A fenotípus kategóriák száma 4, ezért a szabadságfok három. A kapott khi-négyzet érték (0,21) statisztikusan nem szignifikáns, mert jóval kisebb, mint 7,82 (l. 2.5. táblázat), tehát alátámasztja a független kombinálódás elvét.

3. FELADAT

Egy házaspár gyermeke recesszíven öröklődő betegségben, cisztás fibrózisban szenved. Mi a valószínű genotípusa a jellegre nézve nem érintett szülőknek, illetve a beteg utódnak, ha feltételezzük, hogy ezen a lokuszon *C* a normál allél, és a *c* allél homozigóta formában cisztás fibrózist okoz. Mi a valószínűsége annak, hogy a házaspár második gyermeke nem lesz beteg?

Ma már létezik terápia a cisztás fibrózisban szenvedő betegek kezelésére, így megérthetik a felnőttkort, és gyermekeik is szülehetnek. Ha feltételezzük, hogy egy beteg olyan személlyel köt házasságot, aki nem hordozza a *c* allélt (ami igaz az emberek 95%-ára), mi az esélye annak, hogy gyermekük beteg lesz?

MEGOLDÁS

Mindkét szülő heterozigóta, *Cc*, a beteg gyermek homozigóta recesszív, *cc*. Annak az esélye, hogy a második gyermek

nem szenved ebben az öröklődő betegségben, vagyis genotípusa *CC* ($\frac{1}{4}$) vagy *Cc* ($\frac{3}{4}$) lesz. $\frac{3}{4}$. Ha egy beteg, tehát *cc* genotípusú személy egy *CC* homozigóta domináns egyénnel köt házasságot, gyermekeik egészségesek lesznek, de mindegyikük hordozó, *Cc*.

ÖSSZEFOGLALÁS

Mendel igazolta elsőként, hogy az öröklődés alapja a gének alléljainak szegregációja. Egyetlen tulajdonságukban eltérő borsófajtákat keresztezett, majd az F_1 generáció öntermékenyítésével kapott F_2 nemzedékben a domináns és a recesszív fenotípusok 3:1-es hasadási arányát tapasztalta. Kísérletei alapján fogalmazta meg a hasadás elvét, amely szerint a heterozigóta egyedek egyenlő arányban termelik a két különböző allélt tartalmazó gamétákat. A független öröklődés szabálya (Mendel II. törvénye) kimondja, hogy a különböző gének alléljai egymástól függetlenül öröklődnek, és dihibrid keresztezések F_2 nemzedékében ez a fenotípusok 9:3:3:1 hasadási arányát eredményezi.

A valószínűség elméletének alapelveivel jól magyarázható a mendeli jellegek öröklődése. (1) A valószínűségek összegzési szabálya szerint két, egymást kölcsönösen kizáró esemény előfordulásának valószínűsége egyenlő egyedi valószínűségeik összegével. (2) A valószínűségek szorzási szabálya kimondja, hogy két független esemény együttes bekövetkezésének valószínűsége egyenlő valószínűségeik szorzatával. (3) A feltételes valószínűség egy esemény bekövetkezésének valószínűsége, feltéve, ha a másik esemény már bekövetkezett. (4) A binomiális eloszlás megadja, hogy N számú eseményből, amelyek mindegyikének két kimenetele van, mi a valószínűsége, hogy az egyik kimenetel x , a másik $N-x$ számú lesz.

A megfigyelt és a várt kísérleti adatok illeszkedésének egyik statisztikai tesztje a khi-négyzet próba. Egy bizonyos értéknél nagyobb khi-négyzet azt jelzi, hogy a várt értékek becslésére felállított hipotézis helytelen lehet.

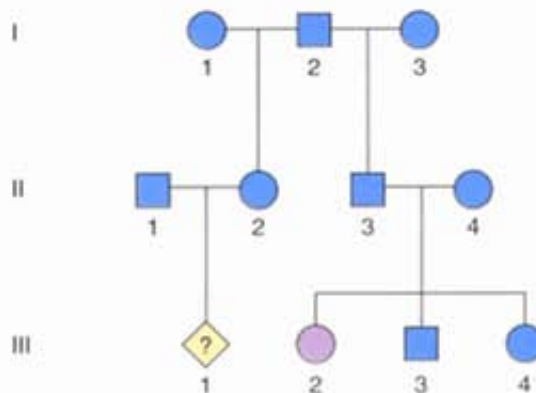
A Mendel-szabályok érvényesek az ember tulajdonságainak öröklődésére is. A családfák elemzése alapján azonosíthatók a recesszív és a domináns jellegek.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

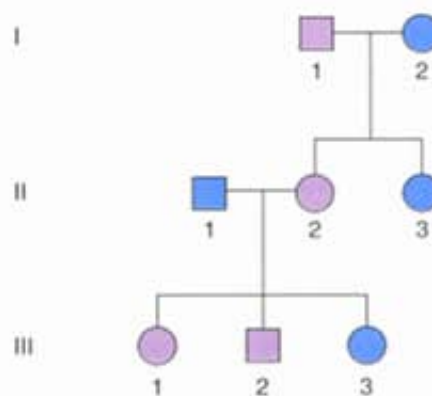
1. Fogalmazza meg Mendel törvényeit!
2. Milyen tulajdonságai miatt volt a veteményborsó szerencsés választás a Mendel-kísérletekhez?
3. Ha lenne egy domináns fenotípusú, gömbölyű magvú (*A-*) borsónövénye, milyen kísérletet tervezne annak eldöntésére, hogy genotípusa *AA* vagy *Aa*? Indokolja meg választát!
4. Tegyük fel, hogy egy nagy ládát feltöltünk 500 piros és 500 kék golyóval, majd a golyókat alaposan összekeverjük. (a) Bekötött szemmel kiemelünk egy golyót a ládából. Mi az esélye annak, hogy a kihúzott golyó piros? (b) A kihúzott golyót visszatesszük

a ládába, majd az előzőhöz hasonlóan két golyót húzunk ki belőle. Mi a valószínűsége annak, hogy az egyik piros, a másik pedig kék?

5. A fenilketonuria örökletes anyagcserezavar. Az érintett személyekben megfelelő diéta hiányában súlyos idegrendszeri károsodás alakul ki. A szülők szinte kivétel nélkül egészségesek, nem mutatják a jelleget. Domináns vagy recesszív módon öröklődik-e a tulajdonság, ha tudjuk, hogy egyetlen gén áll a háttérben? Válaszát indokolja!
6. A Mendel által vizsgált hét különböző bélyeg F_2 nemzedékekre vonatkozó adatai a 2.1. táblázatban találhatók. Számítsa ki a khi-négyzet értékeket a szártengelyen nyíló és a csúcsi helyzetű virágokra, valamint a magas termetű – alacsony termetű tulajdonságokra. Alátámasztják-e az adatok a hasadás elvét?
7. A Mendel-kísérletekből ismert F_1 sárga magvú borsónövényeket zöld magvúakkal keresztezünk (2.1 táblázat). Milyen arányban számíthatunk sárga magvú utódokra? Egy következő kísérletben az F_1 egyedek öntermékenyítésével létrehozott F_2 nemzedék sárga magvú borsóit keresztezzük zöld magvúakkal. A növények hányadrészének várható csak sárga magvú utóda?
8. Egy diáknak van egy kétforintos, egy ötforintos, egy tízforintos és egy húszforintos. Egyszerre feldobja őket, és megnézi melyik esett a fej és melyik az írás oldalára. Mi a valószínűsége, hogy mind a négy esetben fej lesz az eredmény? Ezután újra feldobja az érméket. Mi a valószínűsége, hogy megint csak négy fejet kapjon? Milyen szabály alapján oldható meg a feladat?
9. Két normál pigmentációjú szülő első gyermeke albinó. Ezt a recesszív tulajdonságot a melanin nevű pigment hiánya okozza. (a) A normál allélt jelöljük A -val, az albinizmust kialakítót pedig a -val. Rajzolja fel a családfát, jelölje a személyek feno- és genotípusát. (b) Mi a valószínűsége, hogy a házaspár második gyermeke is albinó lesz? Mi a valószínűsége annak, hogy második gyermekük hordozza az albinó jelleget okozó allélt? Annak ismeretében, hogy a második gyermek nem albinó, milyen valószínűséggel hordozó?
10. Feltételezzük, hogy a lánygyermek születésének valószínűsége 0,5. Mi a valószínűsége annak, hogy egy négygyermekes családban három lány és egy fiú születik? Számítsa ki a valószínűségeket egyrészt úgy, hogy felírja a lehetséges születési sorrendeket, másrészt a binomiális eloszlás alapján. Több emberi populációban a lányok aránya születéskor 0,49. Ezzel az adattal mi a valószínűsége 3 lány és 1 fiú születésének?
11. Mendel tiszta vonalú szögletes, zöld magvú borsót keresztezett tiszta vonalú gömbölyű, sárga magvúval. Azután az F_1 egyedeket visszakeresztelte ugyancsak tiszta vonalú szögletes, zöld magvúakkal, és 31 gömbölyű, sárga magvú, 26 gömbölyű, zöld magvú, 27 szögletes, sárga magvú és 26 szögletes, zöld magvú utódot kapott. (a) Független öröklődést feltételezve milyen arányban várhatóak ezek a típusok? (b) Számolja ki a khi-négyzet értékét, és döntse el, megfelelnek-e az adatok a független öröklődés elvének?
12. Két macskát keresztezünk, az egyik $Aa\ bb\ cc$ a másik $AaBbCc$ genotípusú. A villás elágazás módszerével vezesse le, milyen valószínűséggel várható $aa\ bb\ cc$ genotípusú kismacska? Milyen valószínűséggel születik fehér foltos, rövid szőrű, élénk színű kölyök?
13. Trihibrid keresztezésben, ahol mindkét szülő $AaBbCc$ genotípusú, milyen gyakorisággal várhatunk mindhárom tulajdonságra recesszív utódot? A villás elágazás módszerével vezesse le a feladatot! Mi a valószínűsége az $A- bb C-$ fenotípus megjelenésének?
14. Az alábbi családfa egy ritka genetikai betegség öröklődését mutatja egy család három nemzedékében. Állapítsa meg, hogy a jelleg recesszív vagy domináns módon öröklődik-e. Válaszát indokolja! Milyen a genotípusa a II-3, II-4 és a III-2 személyeknek? Megoldásában alkalmazza az A és a jelölést. Milyen valószínűséggel heterozigóta az I-2 családtag, illetve beteg a III-1 személy?



15. Az alábbi családfa alapján határozza meg, hogy a betegség recesszív vagy domináns módon öröklődik-e? Válaszát indokolja! B és b jelölést alkalmazva, mi lehet a genotípusa a II-1, II-2 és III-3 személyeknek? A II-3 egészséges férfival köt házasságot. Milyen eséllyel lehet beteg gyermeke?



16. Egy asszony ritka, recesszíven öröklődő betegségben, fenilketonuriában (PKU) szenved. Rendszeres diétával, alacsony fenilalanin tartalmú élelmiszerek fogyasztásával elkerülte a tünetek kialakulását. Orvosaitól azt a felvilágosítást kapta, valószínűtlennek tartják, hogy gyermeke örökölné a betegséget, hiszen férje egészséges. Első gyermeke azonban fenilketonuriával született. Mi a legvalószínűbb magyarázat? Ha feltevése igaz,

- milyen valószínűséggel lehet a második gyermek is fenilketonuriás?
17. A Mendel-szabályok vizsgálata során világosbarna egértörzset sötétbarna törzssel kereszteztek. Az F_1 egyedei sötétbarnák voltak. Az F_2 -ben 42 sötétbarna és 15 világosbarna utód volt. Összhangban van-e az eredmény a szegregáció elvével? (Khi-négyzet próbával ellenőrizze!)
 18. Az előző feladatban szereplő F_2 nemzedék 42 sötétbarna egerét világosbarnákkal keresztezték. Közülük harmincnek világos- és sötétbarna utódai egyaránt voltak, tizenkettőnek viszont csak sötétbarnák. Megfelel-e az eredmény a hasadás elvének? (Khi-négyzettel ellenőrizze!)
 19. Három egyforma érme feldobása esetén mi a valószínűsége annak, hogy mindegyik a fej oldalára essen? Mi a valószínűsége annak, hogy ne legyen mindegyik a fej vagy mindegyik írás (azaz *ne* legyen mind egyforma)?
 20. $AAbb$ és $aaBB$ genotípusú cecetmuslicákat keresztezünk. (a) Írja fel az F_2 nemzedék Punnett-tábláját. (b) Milyen arányban vár $A-B-$, $A-bb$, $aaB-$ és $aabb$ utódokat az F_2 -ben?
 21. A 2.16. ábrán milyen valószínűséggel hordozó (heterozigóta) a IV-2 személy? Mi a valószínűsége, hogy a III-1 és III-2 házaspár harmadik gyermeke beteg lesz?
 22. A 2.19. ábrán látható családfa egy domináns betegség öröklődését szemlélteti. A III-2 személy milyen valószínűséggel lehet AA genotípusú? A III-1 és a III-6 jelzésű pár születendő gyermeke, milyen eséllyel örökli a domináns tulajdonságot?
 23. Egy meglehetősen gyakori veleszületett süketnémaság esetén rendszerint az egyik vagy mindkét szülő érintett. Mit gondol, domináns vagy recesszív-e a jelleg?
 24. Két beltenyészett patkánytörzs keresztezéséből származó F_2 generációban 50 példány mindkét jellegre nézve domináns fenotípusú: $A-B-$. Ezek $aa\ bb$ egyeddel való tesztelő keresztezésének eredményéből becsülje meg, hány lehet a kétszeres heterozigóta ($AaBb$)?
 25. Tétélezzük fel, hogy az év minden hónapjában azonos számú gyermek születik. Mi az esélye annak, hogy két véletlenszerűen kiválasztott személy éppen áprilisban született? Mi a valószínűsége, hogy két személy ugyanabban a hónapban született?
 26. Egy genetikus magas és alacsony termetű borsófajtákat keresztezett. Az F_1 egyedei egyöntetűen magas termetűek voltak. Az F_1 öntermékenyítésével kapott F_2 -ben 153 magas és 48 alacsony termetű volt. (a) Mi volt a szülők, az F_1 és az F_2 egyedek genotípusa? (b) Számítsa ki az F_2 fenotípus arányát!
 27. Az előző feladatban szereplő F_1 egyedek egy részét tiszta vonalú, alacsony termetű növényvel keresztezték. Milyen fenotípusú egyedek, és milyen arányban várhatók az utódok között?
 28. A 2.8 ábrán látható kukoricacső egy dihibrid keresztezés F_2 generációját képviseli. (a) A szemek színét meghatározó génre nézve Rr (bíbor színű) növény öntermékenyítésével az F_2 -ben \times bíbor színű (RR vagy Rr) és \times sárga (rr) várható. Számolja le a csővön látható szemeket, és állapítsa meg a kapott arányt. (b) A magvak alakját meghatározó génre nézve Ss (normál endospermiumú) növény öntermékenyítésével az F_2 -ben várható \times normál (SS és Ss) és \times zsugorodott szem. Számolja meg a szemeket és állapítsa meg a szem teltségére vonatkozó hasadási arányt. (c) Kategorizálja a szemeket mindkét tulajdonságra nézve, és adja meg az egyes fenotípusok hasadási arányát. Az (a) és (b) feladatrészen számolt arányok igazolják-e a szegregáció elvét? A (c) részben kapott arányok tükrözik-e a független öröklődést? Mindhárom arányra határozza meg a khi-négyzetet!
 29. RR genotípusú egyed milyen valószínűséggel képez R allélt tartalmazó gamétát? Mi a valószínűsége ugyanennek Rr genotípusú egyed esetén? Két Rr genotípusú egyed keresztezéséből milyen arányban várhatók RR genotípusú utódok?
 30. (a) Egy $AaBb$ genotípusú szülőnél mi a valószínűsége az AB , Ab , aB , ab gaméták képződésének? (b) Ha a másik szülő $aabb$ genotípusú, milyen gyakorisággal várhatók a keresztezésből $AaBb$, $Aabb$, illetve $AABb$ utódok?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

3.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A teljes dominancia, a részleges dominancia és a kodominancia különbségei.
- 2 A pleiotrópia és penetrancia hatásai.
- 3 A multiplex allélia.
- 4 A nemhez kötött tulajdonságok öröklődése.
- 5 A poligénes tulajdonságok öröklődése.
- 6 A mennyiségi jellegek genetikai alapja.
- 7 A heritabilitás becslése.
- 8 A genetikai tanácsadás alapjai.
- 9 Az apaság kizárásának genetikai alapjai.

A mendeli genetika kiterjesztése és alkalmazásai

Egy egyed fenotípusa mindaz, amit megfigyelhetünk: a szervezet felépítése és működése – röviden, ahogyan érzékszerveinkkel felfogjuk az élőlényt... Genotípusa annak az örökítő anyagnak az összessége, ami szüleitől és más őseitől származik.

Theodosius Dobzhansky
orosz származású, amerikai genetikus

Mendel kísérleteinek eleganciája részben abban is rejlik, hogy megfigyelései és hipotézisei között teljes volt a megegyezés. Munkájának újrafelfedezése után azonban kiderült, hogy az egyszerű Mendel-féle modell nem minden esetben felel meg a kísérleti eredményeknek. Ebben a fejezetben azokat a jelenségeket vesszük szemügyre, amelyek miatt szükségessé vált a transzmissziós vagy mendeli genetika kiterjesztése, kibővítése. Mindezek mellett kitérünk a genetikai tanácsadás és az apasági vizsgálatok kérdéseire is. A genetikai kapcsoltságot, amely eltérést eredményez a mendeli öröklődéstől, az 5. fejezetben tárgyaljuk.

DOMINANCIA

A Mendel által vizsgált hét tulajdonság mindegyikében az egyik allél domináns volt a másik felett, így az F_2 generációban a domináns:recesszív arány 3:1-nek adódott. (Az eddigiekhez hasonlóan a *domináns* és *recesszív* megjelölést mind az allélokra, mind pedig a tulajdonságokra vonatkozóan használjuk.) Mendel a dominanciát a szegregációhoz és a független kombinálódáshoz hasonlóan az öröklődés alapelveihez sorolta. Nem sokkal később, néhány évvel 1900 után azonban a dominancia többféle változatát is leírták.

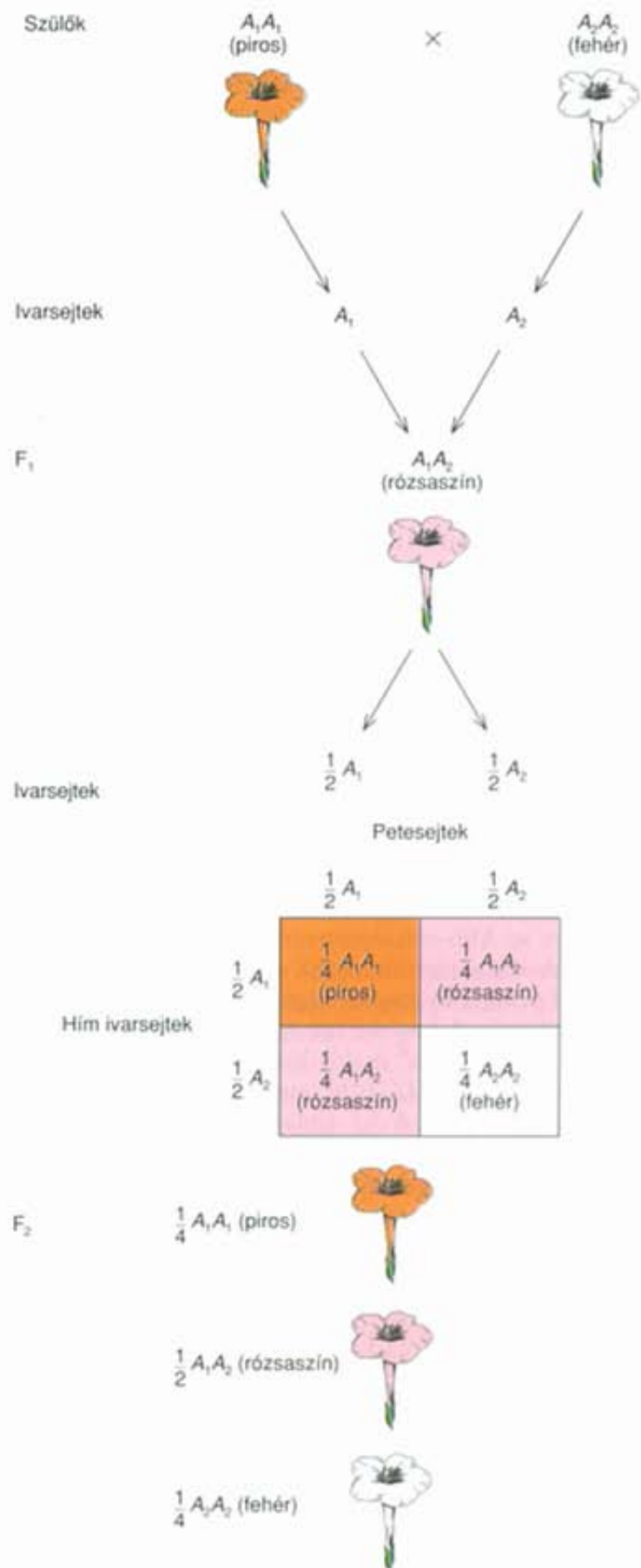
TELJES DOMINANCIA

A legtöbb esetben a normál, más szóval vad típusú allél teljes dominanciát mutat a mutáns alléllal szemben. Mindez érthetőbbé válik majd, amikor közelebbről megvizsgáljuk a génműködés biokémiai hátterét, és látjuk, hogy egy génnek általában egyetlen, működőképes terméket létrehozó kópiája elegendő a vad fenotípus kialakításához. Az ember albinó alléljának például nincsen működőképes génterméke, ezért a homozigóta egyénekben a melanin nevű pigment szintézise egy ponton megszakad. A heterozigótákban a vad allél lehetővé teszi a melanintermelést, ezzel a szabályos pigmentáció kialakulását.

Vannak olyan mutáns allélok is, amelyek dominánsak a normál felett, azaz a vad típusú allél a recesszív. McKusick 1994-es katalógusában 4458 domináns emberi tulajdonság lokuszát említi, sok közülük ritka betegséget okoz. Ilyen például a törpenövés leggyakoribb típusa, az akondroplázia, valamint a végzetes idegrendszeri elváltozással járó Huntington-kór.

RÉSZLEGES DOMINANCIA

Carl Correns a Mendel-szabályok egyik újrafelfedezője, mesterségesen keresztezett piros virágú csodatölcséret (*Mirabilis jalapa*) fehér virágúakkal, és azt tapasztalta, hogy az F_1 egyik szülőre sem hasonlított, a virágok köztes jellegűek, rózsaszínűek voltak (3.1. ábra). Az F_1 öntermékenyítése



3.1. ábra. Piros és fehér virágú csodatölcsér keresztezése. Az F_2 inkomplett dominanciát jelez

után kapott F_2 -ben 1:2:1 ($\frac{1}{4}:\frac{2}{4}:\frac{1}{4}$) volt a piros, a rózsaszín és a fehér virágú egyedek aránya. Első közelítésre ezek az eredmények ugyan eltérnek a mendeli 3:1-es hasadástól, de a fenotípus arány pontosan megfelelt a mendeli 1:2:1-es genotípus arányoknak. Az F_2 -ben egyik szülői tulajdonság sem jelenik meg tisztán, ezért a gén két allélja között részleges, **inkomplett dominancia** van. A genotípusok fenotípusosan is különböznek, a heterozigóták átmenetet mutatnak a homozigóták között, vagyis köztes, intermedier jellegűek. Részleges dominancia esetén mindkét allélt nagybetűvel jelöljük, az elkülönítésre kitévőket alkalmazunk, például A_1A_2 .

Nem mindig egyszerű egy adott genetikai változatban a dominancia típusát meghatározni. Sok esetben a heterozigóták külső jegyeiket tekintve, morfológiailag azonosak a homozigótákkal, de biokémiai szinten inkomplett dominanciát mutatnak. A borsószem alakját meghatározó gén esetében az AA homozigóták és az Aa heterozigóták egyformán gömbölyű magvúak, biokémiai szinten azonban különböznek, a heterozigóták keményítőszemcséi alakra és mennyiségre átmenetet mutatnak a két homozigóta típus között. Éppen ezért pontosan meg kell adni, hogy milyen szinten vizsgáljuk a fenotípust, morfológiailag vagy biokémiai elkülönítést alkalmazunk-e.

KODOMINANCIA

Egyes esetekben a gén mindkét alléljának hatása egyformán megjelenik a heterozigóták fenotípusában. Az allélikus kölcsönhatásoknak ez a típusa, a **kodominancia**. Jól ismert példa erre az AB0-vércsoportrendszer, ahol az AB-vércsoportú emberek vörösvértesteinek sejtmembránjában mind az A-, mind pedig a B-antigén megtalálható (l. később a multiplex alléliánál). A kevésbé ismert MN-vércsoportrendszert egy gén két allélja (L^M és L^N) határozza meg, a lehetséges genotípusok L^ML^M , L^ML^N , L^NL^N (esetenként MM, MN és NN jelölést is használnak). A 3.1. táblázat bemutatja a különböző genotípusok között lehetséges hatféle találkozási kombinációt, feltételezve, hogy a reciprok kombinációk ugyanolyan eredményt adnak. Az utódok várható genotípus arányából

3.1. táblázat. Az MN-vércsoport alapján várható utódok

Szülők	Utódok		
	L^ML^M	L^ML^N	L^NL^N
$L^ML^M \times L^ML^M$	1	–	–
$L^ML^M \times L^ML^N$	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	–
$L^ML^M \times L^NL^N$	–	1	–
$L^ML^N \times L^ML^N$	$\frac{3}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$
$L^ML^N \times L^NL^N$	–	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
$L^NL^N \times L^NL^N$	–	–	1

megállapítható, hogy az öröklődés követi a mendeli szegregációt. A 19. és 20. fejezetben még foglalkozunk olyan természetes allélokkal, amelyek ugyancsak kodominánsak.

A csodatölcsér virágszíne szemléletes példája az inkomplett dominanciának morfológiailag szinten. Mikroszkópos vizsgálatokban azonban kimutatták, hogy a heterozigóta rózsaszín virágok szirmaiban mind a piros, mind a fehér plasztizok jelen vannak, azaz sejtszinten a jelleg kodominanciát mutat.

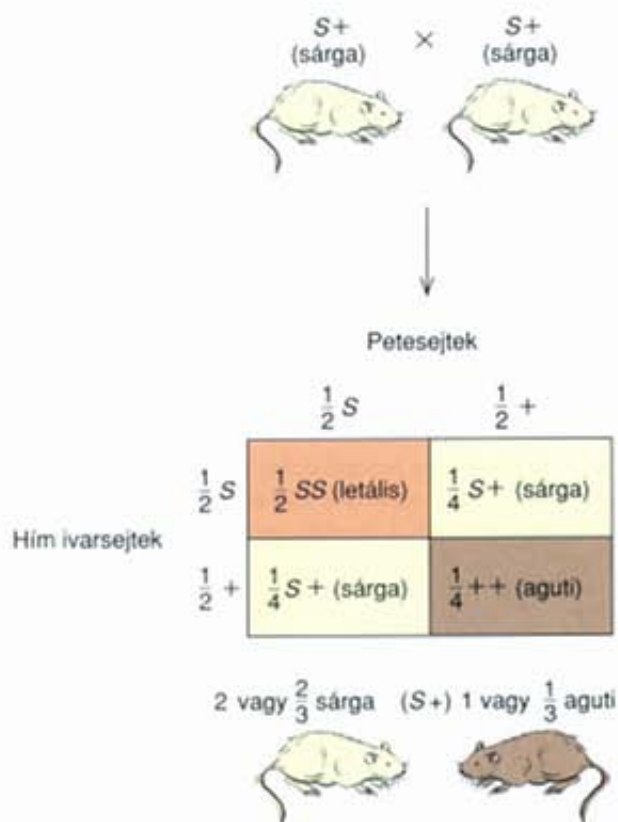
A dominanciának több formája ismert. Teljes dominancia esetén a homozigóta és a heterozigóta egyedek fenotípusa megegyezik, a mutáns és a vad típusú allél egyaránt lehet domináns. A részleges, inkomplett dominancia a heterozigóták átmeneti fenotípusát eredményezi a két homozigóta között. Kodominancia esetén mindkét allél által meghatározott jelleg megnyilvánul a heterozigótákban.

LETALITÁS

A mendeli hasadási arányok valójában a megtermékenyített petesejtekre, a zigótákra igazak. Ezek az arányok az egyedfejlődés során számos jelleg esetén módosulnak az eltérő mortalitás, túlélőképesség következtében. Például a sarlósejtes vérszegénység allélját hordozó heterozigóták utódainak kezdeti, 3:1-es hasadási aránya felnőttkorra jelentősen megváltozik a homozigóta recesszív egyedek nagyfokú halandósága miatt.

Az öröklődő genetikai betegségben szenvedő emberek halandósága szinte minden esetben meghaladja a normál egyedekét. Más élőlényekben is okozhatnak a genetikai adottságok nagymértékű mortalitást. A növényekben egyes gének mutáns alléljai klorofilhiányt eredményeznek, aminek következtében a csiránövény gyorsan elpusztul. Ha a genetikai elváltozás 100%-os halandóságot okoz, a jelleg **letalís**. A letális allélok általában recesszívek, tehát a homozigóta recesszív egyedek nem életképesek. Ismert néhány domináns letális allél is. A Huntington-kór esetében a heterozigóták az érintettek, és a tünetek általában csak felnőttkorban jelentkeznek.

Nem sokkal a Mendel-szabályok újrafelfedezése után, 1904-ben Lucien Cuénot francia genetikus az egerek szőrzet színének öröklődésére végzett keresztezéseket, és eredményei nem egyeztek a mendeli számarányokkal. Megfigyelte, hogy a sárga szín a domináns jelleg a vad, úgynevezett agutival szemben, de két sárga egér keresztezéséből megközelítőleg 2:1 arányban kapott sárga és vad típusú utódokat a várható 3:1 helyett. Sárga és vad típusú egereket keresztezve pedig azt tapasztalta, hogy a sárga egyedek mindegyikének volt néhány aguti utódja is.



3.2. ábra. Két sárga színű egér keresztezéséből 2:1 arányban sárga : aguti színű utódok származnak, mert az SS genotípusú egyedek elpusztulnak

Ebből arra következtetett, hogy mindegyik sárga egér heterozigóta, vagyis a várakozásokkal ellentétben nincs közöttük homozigóta. Később feltételezték, hogy a sárga színt kialakító allél homozigóta formában letális, és az ilyen genotípusú egyedek már az anyaállat méhében elpusztulnak. Ezt sikerült is szövettanilag igazolni, a sárga × sárga keresztezésekből származó embrióknak mintegy $\frac{1}{4}$ -e nem fejlődött ki.

Az öröklésmenet vázlatát a 3.2. ábrán látható, a domináns mutáns allélt S, a vad típusú, recesszív allélt pedig + jelöli. A hasadási arányra elvégezve a khi-négyzet próbát, ebben az esetben statisztikailag szignifikáns eltérést kapnánk, amely szerint a mérés nem felel meg Mendel hipotézisének. A hasadás elve azonban itt is érvényes, a várttól eltérő fenotípusarányt az okozza, hogy az utódok egy része még a méhen belül elpusztul. Sok domináns emberi betegség, így például az akondroplázia, homozigóta formában letális. Ugyancsak jó néhány domináns letális jelleg ismert a *Drosophila* esetében is, egyik a pöndörödött (curly – C_y) szárny.

A fark hiányát a Man-szigeti (Manx) macskában (3.3. ábra) szintén egy domináns allél okozza, amely homozigóta formában letális. Ez a bélyeg először mutációként jelent meg a házimacskák között, 1935-ben Man-szigeten. A jelleget kialakító allél M, a normál m, a fark nélküli egyedek genotípusa Mm. Homozigóta beltenyésztett Manx-törzsek nem léteznek, hiszen az Mm × Mm keresztezésekből mintegy $\frac{1}{4}$ részben normál farkú macskák származnak.



3.3. ábra. Farkatlan Man-szigeti (Manx) macska

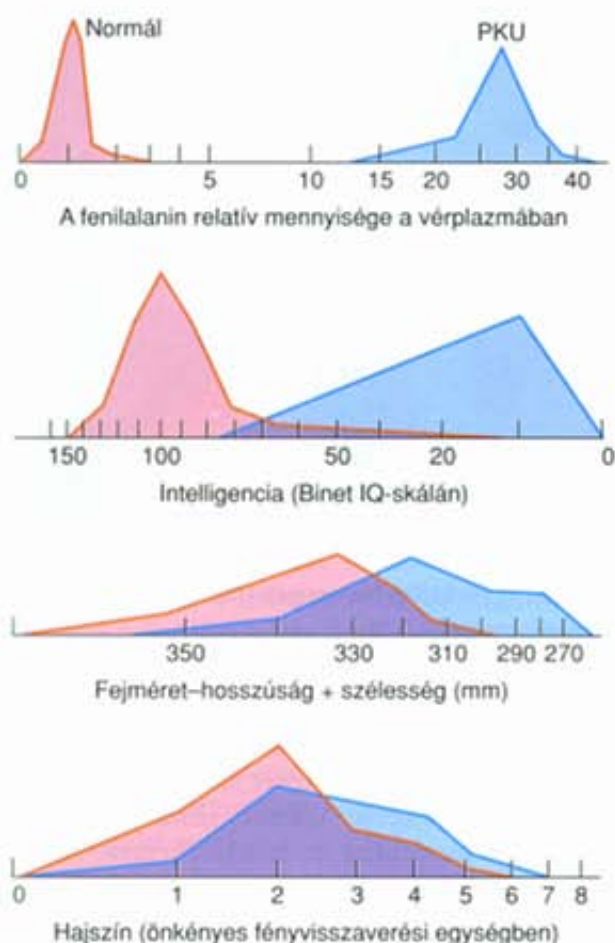
© Robert Percy/Animals Animals/Earth Scenes.

Sok génnek létezik olyan alléja, amelyik hatással van a mortalitásra, de nem letális. Ezeket általában **káros** vagy **ártalmas** alléloknak nevezik. Változó, néhány %-tól csaknem 100%-ig terjedő mortalitást eredményezhetnek. A természetes szelekció (l. 19. fejezet) hatására a nagyobb mortalitású genotípusokból és így alléjaikból kevesebb jelenik meg az utódokban, mint a kisebb mortalitásúak közül.

PLEIOTRÓPIA

Az eddig vizsgált gének alapvető hatásukat valamilyen szembevetendő, jól látható tulajdonságra, például a virágszínre vagy a mag alakjára fejtették ki. Sok génnek vannak azonban másodlagos vagy járulékos hatásai is. Az előzőekben tárgyalt sárga szőrzetszint egy olyan allél okozza, amely több más tulajdonságra is hat, köztük az életképességre, hiszen homozigóta formában letális. Ehhez hasonlóan többféle hatása van a borsószem alakját megszabó génnek, hiszen mint láttuk, befolyásolja a keményítőzárványok számát és alakját. A valóságban a gének többsége nemcsak egy, hanem több tulajdonság kialakításában is szerepet játszik. Mendel is észrevette, hogy a lila, illetve fehér virágszín meghatározó gén befolyásolja a mag színét, sőt összefüggésben van a levélen megjelenő színes foltokkal vagy azok hiányával. Az a jelenség, amikor egy gén két vagy több tulajdonságra is hat, a **pleiotrópia**.

Sok örökletes betegség vagy tünetegyüttes hátterében állnak pleiotróp hatású gének. Ilyen a fenilketonuria (PKU), amely egy gén mutáns, recesszív alléljára homozigóta egyedekben alakul ki. A betegekben hiányzik a fenilalanin nevű aminosav normális anyagcseréjéhez szükséges enzim, emiatt a fenilketonuriás személyek vérében jóval magasabb a fenilalanin szintje, mint az egészségesekben (3.4. ábra). Ez a biokémiai eltérés megfelelő kezelés hiányában egy sor más elváltozást is



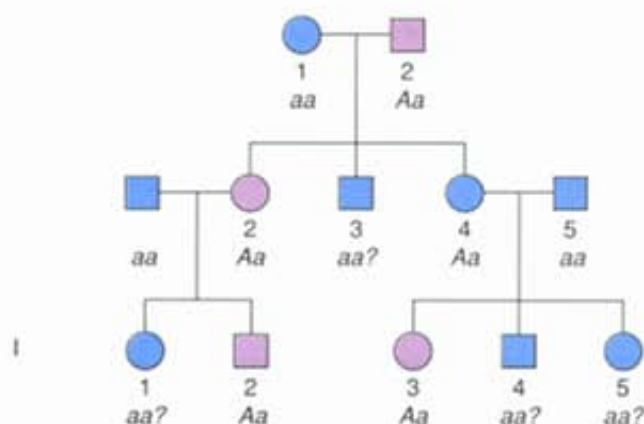
3.4. ábra. Négy különböző tulajdonság alakulása a fenilketonuriás (PKU) és egészséges személyek esetében. A mért értékek jól szemléltetik a gén pleiotróp hatását. A lila szín a két eloszlás átfedését jelzi

okoz, többek között alacsonyabb intelligenciahányadost, kisebb fejméretet, világosabb hajszínt. Mindezek a pleiotróp hatások a biokémiai eltérés következményei. A fenilketonuriás betegek vérében felhalmozódó toxikus anyagok agykárosodást okoznak, és ez áll az alacsony intelligenciahányados és a kisebb fejméret hátterében.

A *Drosophila* számos mutációja is többféle hatást fejt ki a fenotípusra. A mutáns egyedek jó része azonnal felismerhető egy szembetűnő változás miatt, mint amilyen például a fehér szem vagy a *vestigial* szárny. Tüzetesebb vizsgálat után felszínre kerülnek a kevésbé nyilvánvaló eltérések is: a fehér szemszínt okozó (*w - white*) allél egy sor változást okoz a belső szervekben, a *vg (vestigial)* allél pedig a csökevényes szárnyak mellett módosítja a billér és a tüskék alakját.

PENETRANCIA ÉS EXPRESSZIVITÁS

Az eddig megismert géneknek meghatározott genotípus-fenotípus kapcsolatuk van: az *aa* genotípusú borsó például

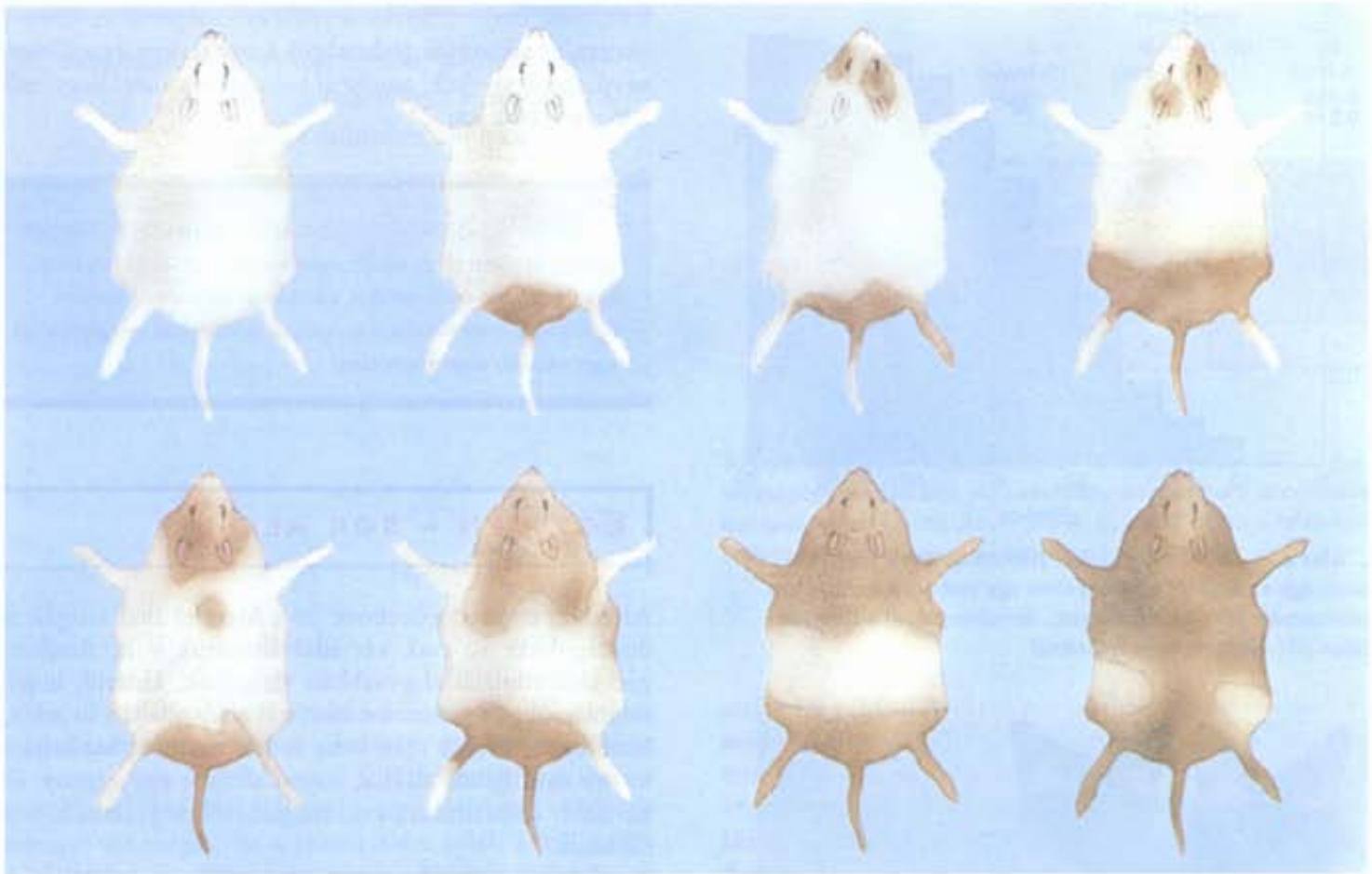


3.5. ábra. A lehetséges fenotípusokat szemléltető családfa egy nem teljes penetranciájú domináns allél esetében. Az érintett személyeket lila szín jelöli. A II-4 személy genotípusa *Aa*, mégsem mutatja a jelet

mindig szögletes magvú. Minden Mendel által vizsgált gén, valamint a már említett vércsoportgének és sok emberi betegség génje ilyen tökéletes öröklődést mutat. Néhány esetben azonban a vizsgált genotípus vagy mutatja, vagy nem mutatja a megfelelő fenotípust. Ez a jelenség a **penetrancia**, ami számszerűen kifejezve az azonos genotípusú egyedek közül azoknak az egyedeknek a %-os aránya, amelyeken a genotípus fenotípusosan is megnyilvánul. Ha a vizsgált egyedek mindegyike ugyanolyan fenotípusú, akkor a gén teljes penetranciájú, a penetrancia szintje 1,0. Ettől eltérő esetekben a gén inkomplett penetranciájú, és a penetrancia értéke meghatározható. Ha például nyolc azonos genotípusú egyed közül csak 5 fenotípusa egyezik meg, a penetrancia $\% = 0,625$.

Egy gén inkomplett penetranciája következményeként egy családfában egy fenotípus átugorhat egy generációt. Így például egy adott nemzedékben megtalálható domináns allél hatása nem jelenik meg a következő generációban, de előbukkan a rákövetkezőben. Ilyen esetet mutat be a 3.5. ábra. A családfa II-4 személyén nem jelentkezik a betegség, de anyja és leánya is beteg. Ez azt jelzi, hogy a II-4 genotípusa *Aa* volt, de az inkomplett penetrancia miatt nem jelent meg a domináns fenotípus. Például a retinoblastoma (szemideghártya-daganat) domináns formájának penetranciája 90% körüli érték.

Ezen túlmenően, ha egy adott genotípus mutatja a várt fenotípust, kifejeződésének mértéke, vagyis **expresszivitása** változó lehet. Egy örökletes betegség esetén az azonos genotípusú személyek nem egyformán érintettek, vannak köztük olyanok, akik gyengébben, illetve olyanok, akik erősebben mutatják a tüneteket. Összegezve az eddigieket: az azonos genotípusba tartozó egyedek lehetnek tünetmentesek, mutathatnak átmeneti erősségű tüneteket, és lehetnek súlyosan betegek. A 3.6. ábrán az *s* allélra homozigóta eger szőrzetének változatos foltossága látható. Figyeljük meg,



3.6. ábra. Az *s* allélra homozigóta egerek foltozottságának alakulása. Minden egyed *ss* genotípusú, de fenotípusuk a változó expresszivitás miatt nagyon eltérő

hogyan a fenotípus széles határok között változhat, akár egy színű fehér is lehet.

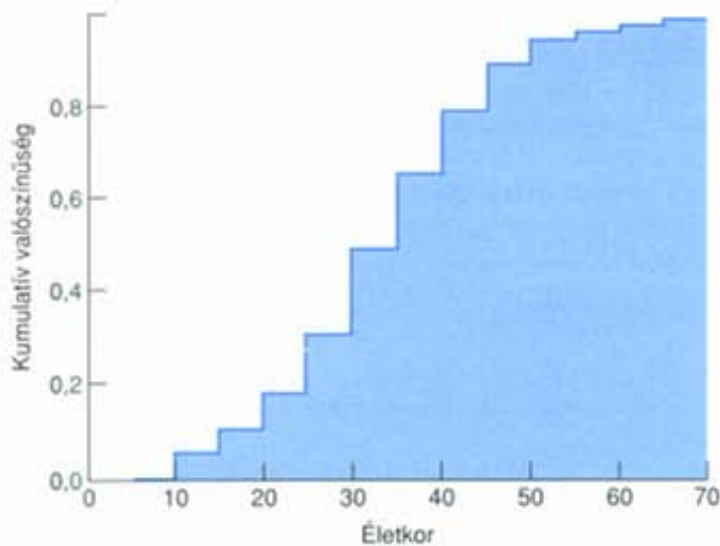
A Huntington-kór változatos expresszivitást mutat a tünetek jelentkezésének időpontjában. Általában a középkorúaknál nyilvánul meg, de ritkán kisgyermekkorban és idős embereknel is felléphet (3.7. ábra). Valószínűleg vannak olyan betegek is, akik valamilyen más ok miatt meghalnak még a tünetek jelentkezése előtt, inkomplett penetranciát és változó expresszivitást eredményezve.

Mi lehet az inkomplett penetrancia és a változó expresszivitás oka? Bizonyos esetekben lehetetlen meghatározni az okokat, de mind a környezeti tényezők, mind pedig más gének befolyásolhatják egy adott gén penetranciáját vagy expresszivitását. A *Drosophila melanogaster* jó néhány génjének alléljai hatnak az életképességre, és magas hőmérsékleten (28 °C felett) letálisak is lehetnek, de csekély vagy semmiféle hatásuk nincs alacsonyabb hőmérsékleten. Ezek az ún. **kondicionális letális** gének, amelyek általában szélsőséges környezeti körülmények között fejtik ki letális hatásukat.

A hőmérséklet erősen befolyásolhatja a növények fenotípusát is. A kankalin virágszíne 24 °C-on nevelve piros, de 32 °C fölött fehér. A sziámi macskák és a Himalája-nyulak szőre söté-

tebb a mancsokon, a füleken és az orron, mert ezeknek a testrészeknek a hőmérséklete a nagyobb mértékű hőleadás miatt alacsonyabb (3.8. ábra). Ha az állatokat magasabb hőmérsékleten tartjuk, a megújuló szőr ezen a területen is világosabb lesz.

Mindezen felül más gének alléljai is befolyásolhatják egy adott gén penetranciáját és expresszivitását. Egy tulajdonság expresszivitásában nagyobb mértékű hasonlóság tapasztalható rokonok körében, mint rokoni kapcsolatban nem állóknál, ha a rokon és nem rokon egyedek azonos körülmények között nevelkedtek. Azokat a géneket, amelyek másodlagosan hatnak egy tulajdonság kialakulására, **módosító géneknek** nevezik. A módosító gének lényeges változást okozhatnak a fenotípusban. Az állatok körében például egy gén recesszív allélja a homozigóta egyedekben csökkentheti a pigmentáció erősségét, ami eltérő színmélységet eredményez (l. macskák fekete-szürke színe). Módosító gének hatásának következtében a Man-szigeti macskánál a farkcsigolyák teljesen hiányozhatnak, de kialakulhat néhány összenőtt farkcsigolya is. Sok éven át laboratóriumi körülmények között nevelt *Drosophila*-mutánsok gyakran nem mutatják azt a szélsőséges fenotípust, amelyet először megfigyeltek rajtuk, valószínűleg



3.7. ábra. A Huntington-kór jelentkezésének kumulatív valószínűsége az életkor függvényében egy emberi populációban. Minden személy *Hh* genotípusú volt, de néhányuknál a tünetek korábban jelentkeztek, mint másoknál



3.8. ábra. A sziámi macskák szőrzete sötétebb a mancsokon, a füleken és az orron, mert ezeknek a testrészeknek a hőmérséklete alacsonyabb

© Mary Eleanor Browning/Photo Researchers, Inc.

a mutáns fenotípust módosító allélok megnövekedett gyakorisága miatt.

Rokon jelenség a **fenokópia**, ami bizonyos környezeti tényezők hatására kialakuló fenotípusos, nem öröklődő változás, és a fenotípus valamilyen mutáns genotípust utánoz. Tragikus példája a fenokópiának a Contergan-hatás. Az 1950-es évek végén, a 60-as évek elején Nyugat-Európában feltűnően sok csecsemő született ritka, recesszív rendellenességre emlékeztető végtaghiánnyal. Intenzív vizsgálatokkal sikerült

kimutatni, hogy a fejlődési rendellenességet környezeti hatás okozta, az édesanyák terhességük korai szakaszában Contergan nevű altatót szedtek, amelyről bebizonyosodott, hogy erős teratogén hatása van.

A gének egyes alléljai lehetnek letális hatásúak. Pleiotrópia esetén egy gén több tulajdonság kialakulását is befolyásolja. Egy genotípus nem minden esetben eredményez azonos fenotípust, aminek oka a genotípus inkomplett penetranciája vagy változó expresszivitása.

EGY GÉN – SOK ALLÉL

Az eddig említett géneknek (és a Mendel által vizsgált tulajdonságoknak is) csak két allélváltozatuk volt. Amikor egy gén előfordulását alaposabban vizsgáljuk, kiderül, hogy egy populációban rendszerint kettőnél több allélja van jelen, bár közülük némelyik igen ritka is lehet. A **többszörös**, más néven **multiplex allélia**, vagyis amikor egy génnek kettőnél több allélváltozata van, meglehetősen gyakori a populációkban.

Közismert példa a multiplex alléliára az ember AB0-vércsoportrendszere. (Az emlősök körében a csimpánzok és a szarvasmarhák esetében írtak le hasonló rendszert.) Az AB0-vércsoportrendszer különböző fenotípusait 1900-ban fedezték fel, de a jelenség genetikai hátterét egészen 1925-ig nem sikerült kideríteni a családfaelemzésekkel. Az AB0-rendszerben az allélok három fő típusba sorolhatók (az osztályok maguk is heterogének), amelyeket általában I^A , I^B és I^O -val jelölnék (néha *A*, *B*, *O*). Ha feltételezzük, hogy a női és a hím gaméták csak egyet tartalmaznak a három alléltípusból, akkor kombinációjuk hat különböző genotípust eredményezhet (3.9. ábra).

		Petesejtek		
		I^A	I^B	I^O
Hím ivarsejtek	I^A	$I^A I^A$ (A)	$I^A I^B$ (AB)	$I^A I^O$ (A)
	I^B	$I^A I^B$ (AB)	$I^B I^B$ (B)	$I^B I^O$ (B)
	I^O	$I^A I^O$ (A)	$I^B I^O$ (B)	$I^O I^O$ (O)

3.9. ábra. Az AB0-vércsoportrendszer három alléja hat genotípust határoz meg. Zárójelben a fenotípusok

3.2. táblázat. A homozigóták, a heterozigóták és a lehetséges genotípusok száma multiplex allélia esetén

Allélok	Homozigóták	Heterozigóták	Genotípusok
1	1	0	1
2	2	1	3
3	3	3	6
4	4	6	10
5	5	10	15
6	6	15	21
•	•	•	•
•	•	•	•
•	•	•	•
n	n	$n(n-1)/2$	$n(n+1)/2$

Diploid szervezetekben n számú különböző allél esetén a lehetséges genotípusok száma általában meghatározható az $1 + 2 + 3 + \dots + n$ vagy az $n(n+1)/2$ képlet segítségével (3.2. táblázat). Mindkét kifejezés azt adja meg, hányféle kombináció lehetséges, ha n számú elem (allél) közül kettőt kell kiválasztani úgy, hogy nem számít a választás sorrendje, és az egyes elemek ismétlődhetnek. Az AB0-vércsoportrendszerben a genotípusok száma $1 + 2 + 3 = 6$, vagy $(3)(4)/2 = 6$, mint az a 3.9. ábrán látható. Négy allél esetén az eredmény $(4)(5)/2 = 10$. Ezen kívül a homozigóta genotípusok száma megegyezik az allélok számával (n), a heterozigótáké pedig $n(n-1)/2$. Négy allél esetén a 10 genotípus közül 4 homozigóta és $(4)(3)/2 = 6$ heterozigóta.

Mivel az AB0-vércsoportrendszerben az I^0 allél recesszív a másik kettővel szemben, a fenotípusok száma négy: A-vércsoport ($I^A I^A$ és $I^A I^0$ genotípus), B-vércsoport ($I^B I^B$ vagy $I^B I^0$), AB-vércsoport ($I^A I^B$) és 0-vércsoport ($I^0 I^0$). Az I^A és az I^B allélok kodominánsak, a heterozigótákban AB-vércsoportot eredményeznek. Egy gén alléljai között tehát eltérő dominanciaviszonyok lehetnek.

Az AB0-vércsoportrendszer fenotípusai közötti eltérést a különböző antigének és ellenanyagok okozzák. Az AB0-vércsoportrendszerbe tartozó **antigének** a vörösvértestek felületén található, szénhidrát-oldalláncot tartalmazó fehérjék (glikoproteidok). Az I^A , I^B és I^0 allélokkal rendelkező egyének vörösvérsejtjein lehet A-, B-antigén, illetve egyik sem. Az A- és a B-antigének a szénhidrátlánc terminális részében különböznek egymástól, az I^0 allél által kódolt antigénről pedig hiányzik a terminális cukorrészlet (H-anyag), mert nem működőképes az enzim, amely a terminális láncot hozzákapcsolná a fehérjéhez.

Az **ellenanyagokat**, más szóval **antitesteket** a szervezet immunrendszere termeli az antigénekre adott immunválasz

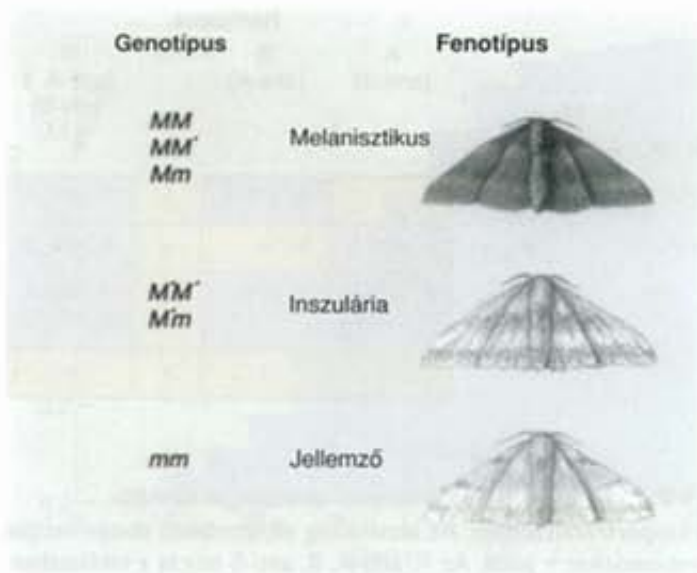
Donor		Recipiens			
		A (anti-B)	B (anti-A)	AB	0 (anti-A s anti-B)
Genotípus	Fenotípus				
$I^A I^A, I^A I^0$	A	+	A, anti-A	+	A, anti-A
$I^B I^B, I^B I^0$	B	B, anti-B	+	+	B, anti-B
$I^A I^B$	AB	B, anti-B	A, anti-A	+	A, anti-A B, anti-B
$I^0 I^0$	0	+	+	+	+

3.10. ábra. Vértömlesztési lehetőségek az AB0-vércsoportrendszerben. Az elméletileg elképzelhető donor-recipiens kombinációkat + jelöli. Az A, anti-A, B, anti-B beírás a táblázatban az antigének és az antitestek közötti reakcióra utal

során. Ha például A-vércsoportú ember vörösvérsejtjeit nyúlba injekciózzuk, az állat immunrendszere anti-A ellenanyagot termel. Az A-vércsoportú emberek vérében anti-B, a B-vércsoportúakéban anti-A ellenanyag van, a 0-vércsoportúakéban mindkettő, az AB-vércsoportúakéban pedig egyik sem. Annak oka, hogy miért vannak anti-A és anti-B ellenanyagok a vérben, nem pontosan ismert, de valószínűleg hasonló antigén természetű baktériumokra adott immunválasz során keletkeznek.

A sikeres vértömlesztéshez figyelembe kell venni a személyek AB0-vércsoportja közötti eltéréseket. Ha egy B-vércsoportú, azaz B-antigént hordozó egyén vérében A-vércsoportú ember kapja, akkor a recipiens vérében lévő anti-B antitestek összekapcsolódnak a bejuttatott vörösvérsejtek B-antigénjével, és kicsapódási reakció (koaguláció) történik, ami súlyos, életveszélyes állapotot idéz elő. A donor és recipiens személyek lehetséges kombinációit a 3.10. ábra tartalmazza. A 0 vércsoportúak általános donorok, mivel vérében nem tartalmaz sem A-, sem B-antigént. Az AB-vércsoportúak pedig általános kapók, mivel vérében nincs sem anti-A, sem anti-B ellenanyag. A 0-vércsoportúak csak 0-vércsoportú vért kaphatnak, mivel anti-A és anti-B ellenanyaguk is van. Az AB-vércsoportúak csak AB-vércsoportúaknak adhatnak vért, mivel a más vércsoportú egyének vagy az anti-A vagy az anti-B vagy mindkét ellenanyagot termelik. A legjobb természetesen az, ha a transfúzió során mindenki a saját vércsoportjának megfelelő vért kapja.

Vannak olyan gének, amelyeknek alléljai fokozatos dominanciasort mutatnak, mint például az emlősök szőrzetszínét, a rovarok és a puhatestűek testszínét meghatározók. Anglia egyes területein a szürke nyírfaaraszó (Biston betularia) populációkban legalább három ilyen allélt mutattak ki. A 19. fejezet végén részletezzük a faj színváltozatainak evolúcióját, amely szoros kapcsolatban áll az iparvidékek légszen-



3.11. ábra. A szürke nyírfaaraszoló hat lehetséges genotípusa a három allél kombinációjából (bal oldali oszlop). A megfelelő fenotípusok a jobb oldalon láthatók

nyezésének alakulásával. A légszennyeződés fokozódása előtt a faj populációiban ezen a lokuszon általánosan jellemző volt a világos színt kialakító recesszív allél (*m*). Egy másik, az előzővel szemben domináns allél (*M'*) sötét mintázatot, míg egy harmadik (*M*) majdnem teljesen fekete, melanisztikus színt határoz meg (3.11. ábra). Az *M* allél domináns a másik kettővel szemben. Ennek megfelelően hat genotípus lehetséges, de csak három fenotípus: a melanisztikus (*MM* *MM'* vagy *Mm*) a pettyezett, ún. insularia (*M'M'* és *M'm*) és a világos (*mm*). Feltételezzük, hogy két heterozigóta, egy melanisztikus *Mm*, illetve egy insularia típusú *M'm* egyed kereszteződik. Az utdók várható genotípusa $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{4}$ arányban *MM'*, *Mm*, *M'm* és *mm*. A dominanciaviszonyok miatt az utódok fele melanisztikus (*MM'* és *Mm*), negyede insularia (*M'm*), negyede pedig világos (*mm*).

Néhány génnek, mint például az emberi HLA-(humán leukocita-antigén) géneknek igen sok alléljuk lehet. A HLA-gének határozzák meg az egyed antigénsajátságait, termékeik a sejthártyához kötött glikoproteidek, az ún. „saját” antigének. A HLA-gének közül a HLA-B-génnek több mint harminc allélja van jelen egyes populációkban, ugyanígy nagyfokú polimorfizmus jellemző a HLA-A-génre is (az allélok jelölése: A1, A2, A3, A11), illetve B5, B7, B8, B12 stb.). A sokféleség eredményeként rendkívül nagy számú genotípus található erre a génre nézve a populációkban. Ezt szemlélteti a 3.2. táblázat, amely megadja a lehetséges genotípusok számát különböző számú allél esetén. A HLA-B-gén harminc allélja 30 homozigóta és 435 heterozigóta [(30)(31)/2] genotípust hozhat létre, ami valóban nagymértékű genetikai változatosságot képvisel.

A HLA-gének igen fontosak a szervátültetések várható sikerének meghatározásában, és kapcsolatban állnak egy sor

Donor	Recipiens		
	A1 A28	A2 A10	A1 A9
A2 A2	A2	+	A2
A1 A28	+	A1, A28	A28
A9 A11	A9, A11	A9, A11	A11
A9 A9	A9	A9	+

3.12. ábra. Négy donor és három рециpiens esetében elvégezhető szervátültetések a HLA-A-típusok figyelembevételével. A lehetséges átültetést + jelöli, a táblázatban szereplő kód a donornak azt az antigénjét jelzi, amely kilökődést eredményezhet

autoimmun betegségre való hajlammal is (inzulindependens diabetes, reumatoid arthritis). Összes alléljuk kodomináns, így a genotípusok és a fenotípusok száma megegyezik. A donor és a рециpiens HLA-B genotípusának (és a közel 20 allélváltozattal bíró HLA-A genotípusának) egyezése nagymértékben növeli a veseátültetés sikerének valószínűségét. A 3.12. ábra három lehetséges рециpiens és négy potenciális donor HLA-A genotípusát mutatja be. Azokat az eseteket, amelyekben nincs összeférhetetlenség + jelöli. Az összes többi helyen egy vagy több olyan antigénje van a donornak, amelyik hiányzik a рециpiensből, ezért az átültetés sikerének kisebb a valószínűsége. A genotípusok igen nagy száma miatt a donorok és a рециpiensek általában különböznek egymástól. A rokon személyek HLA-sajátságai nagyobb mértékben egyeznek egymással, ezért szervátültetés esetén a donor gyakran a rokonok közül kerül ki. Még megfelelő egyezés esetén is alkalmaznak immunszuppresszáns gyógyszereket a szervátültetésen átesett betegek kezelésében, hogy csökkentsék az immunreakciót az idegen antigénekkal szemben.

A géneknek kettőnél több alléljuk is lehet. Diploid szervezetekben multiplex allézia esetén számos különböző genotípus alakulhat ki.

NEMHEZ KAPCSOLT GÉNEK

Az első fejezetben már említettük, hogy a legtöbb gén az autoszómákon található, vagyis olyan kromoszómákon, amelyekből a faj minden diploid egyede egy-egy homológ párral rendelkezik. Mendel szabályainak újrafelfedezése után nem sokkal, a *Drosophilával* folytatott kísérletek során olyan utódnemzedékek jelentek meg, amelyekben a hímekekre és a nőstényekre nem érvényesültek a mendeli arányok. Ezeket a kezdetben érthetetlen eredményeket később azzal magyarázták, hogy a vizsgált

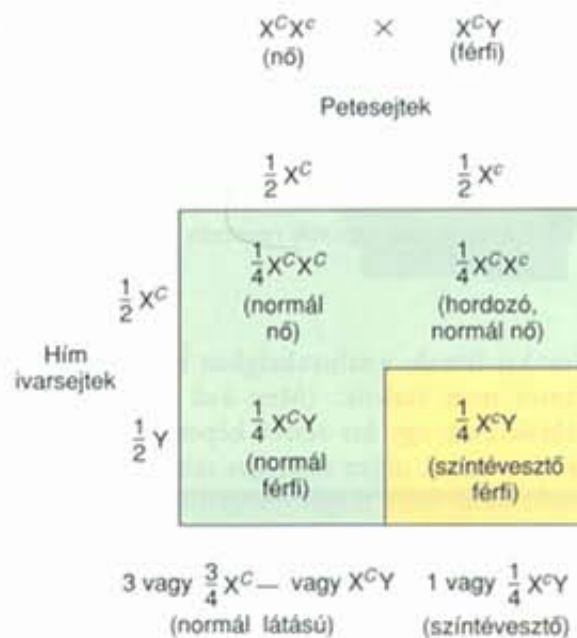
jelleget meghatározó gének nem az autoszómákon, hanem az X-kromoszómán vannak, amelyből a nőstények sejtjeiben kettő, a hímekben pedig csak egy példány van. (A kísérleteket a 4. fejezet részletezi.)

Az emlősökre, néhány rovarra és kisszámú növényre jellemző olyan ivarmeghatározás, amelyben az egyik nem két homológ, a másik két eltérő típusú ivari kromoszómát tartalmaz. (Az ivarmeghatározás részleteit a 4. fejezet tárgyalja.) Emlősökben a nőstényeknek két X (jelölése XX), míg a hímeknek egy X és egy Y (jelölése XY) ivari kromoszómájuk van. Amikor az ivari kromoszómákon lévő gének öröklődését vizsgáljuk, a mendeli autoszómás jellegektől eltérő arányokat tapasztalunk, de az öröklődés alapelveiben nincs különbség.

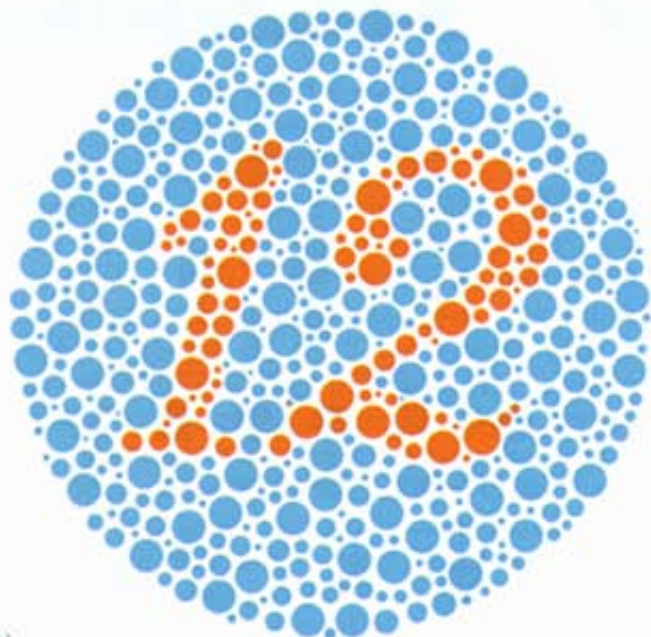
Elemizzük először az X-kromoszóma génjei által meghatározott tulajdonságokat, az ún. **X-hez kapcsolt bélyegeket**. McKusick 161 azonosított lokuszt sorol fel az ember X-kromoszómáján. Ilyen öröklődést mutat például a színvakság, amelyet egy X-kromoszómán található recesszív allél okoz. Jelöljük a két különböző allélt hordozó X-kromoszómát X^C (normál látás) és X^c -vel (színvakság). Nőknél háromféle genotípus lehetséges: $X^C X^C$, $X^C X^c$ és $X^c X^c$, csak az utóbbi genotípus okoz színvakságot, mivel a normál allél domináns. A férfiaknak csak egy X-kromoszómájuk van és egy Y. Az Y-kromoszóma nem tartalmazza a színlátásért felelős gént (csak kevés, az X-kromoszómával allélikus gén található rajta), ezért a lehetséges genotípusok $X^C Y$ (normál látású) és $X^c Y$ (színvak). Egy másik fajta jelölést alkalmazva, az X szimbólumot el-

hagyhatjuk, és rajta levő allélokat ugyanúgy jelöljük, mint eddig. A nők lehetséges genotípusa eszerint CC , Cc , cc , a férfiaké pedig CY és cY .

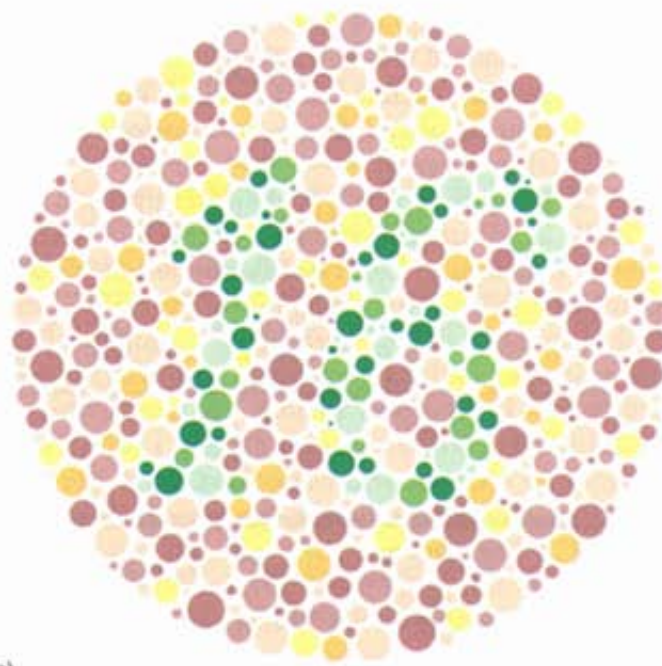
A 3.13. ábrán a színlátás vizsgálatára szolgáló rajzok láthatók. Az ép színlátású emberek mindkét esetben nagymé-



3.14. ábra. A színtévesztés alléljára heterozigóta nő és normális színlátású férfi gyermekeinek lehetséges genotípusai



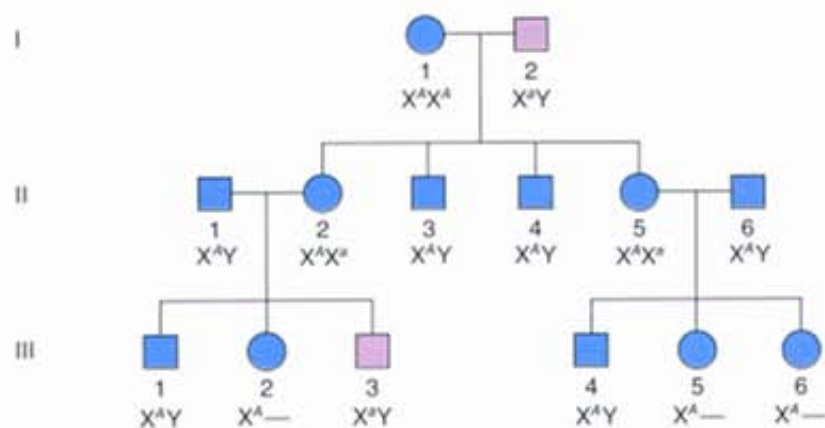
(a)



(b)

3.13. ábra. A színlátás vizsgálatára szolgáló táblák. A normális színlátású személyek az (a) táblán „12”-es, a (b) táblán „16”-os számot olvasnak. A színvakok a (b) táblát nem képesek olvasni

A fenti képek Ishihara: A színlátás vizsgálata c. könyvében jelentek meg (Kanehara & Co., Ltd., Tokió, Japán). Ez a nyomtatási minőség nem alkalmas a színtévesztés megállapítására



3.15. ábra. X-hez kapcsolt recesszív jelleg öröklésmenetét szemléltető családfa

retű számokat látnak, a színvakságban szenvedők a (b) ábrán levő számot nem észlelik. (Meg kell jegyeznünk, hogy a közölt ábrák csak egy kis részét képezik egy vizsgálati sorozatnak, és vannak olyan részleges színlátású – szintévesztő – emberek, akik nem tudják megkülönböztetni a (b) ábra számait, de nem színvakok.)

Nőkben az X-hez kapcsolt gének hasadása nem tér el az autoszómás génektől, a férfiakban azonban a gaméták fele X-, fele pedig Y-kromoszómát tartalmaz. Vizsgáljuk meg, milyen gyermekei lehetnek egy heterozigóta (hordozó) nőnek és egy normál színlátású férfinak (3.14. ábra). A fiúgyermek apjuktól Y-kromoszómát örökölnek. A gyermekek fele várhatóan lány, és mindegyikük normál színlátású (fele-fele arányban homozigóták és heterozigóták). Fiúgyermek születésének esélye ugyancsak 50%, de ők 1:1 arányban lehetnek normál látásúak, illetve színvakok. A normál látású és színvak utódok összesített aránya 3:1, de az autoszómás monohibrid öröklődéstől eltérően az F_2 recesszív fenotípusú egyedek csak a fiúk közül kerülnek ki. Egy családban kevés gyermek születik, de sok család adatait összesítve ilyen lesz a várható eloszlás.

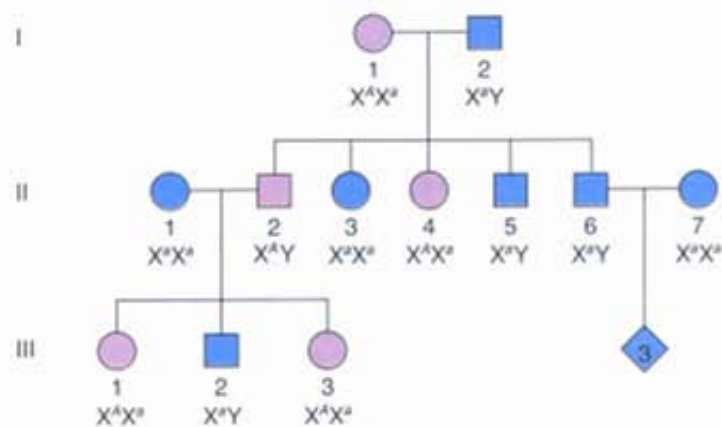
Az X-hez kötött bélyegek öröklődését nyomon követő családfák általában jellegzetesek, és lehetővé teszik az autoszómás tulajdonságoktól való elkülönítést (3.15. ábra). Az X-hez kapcsolt recesszív tulajdonság gyakrabban érinti a férfiakat, mint a nőket. Férfiakban a mutáns allélnak ugyanis már egy példánya elegendő a megnyilvánuláshoz, nőkben viszont két recesszív allélnak kell jelen lennie. Egy ritka mutáns allél esetében viszont csekély a valószínűsége homozigóta nő születésének. Másodszor, az X-hez kötött tulajdonságok rejtve maradhatnak egy generációban, mivel a férfiak az X-hez kapcsolt allélt csak anyjuktól öröklhetik (apjuktól mindenképpen Y-kromoszómát örökölnek), és mint láttuk, az X-hez kötött recesszív jelleg csak kevés nőt érint.

X kromoszómához kapcsolt gének ritka, recesszív alléljai alakítják ki a véralvadási zavarokkal járó hemofília (vérzékenység) több típusát. Ezért a vérzékenység X-hez kapcsolt formái



3.16. ábra. A fénykép II. Miklós cárról, feleségéről, Alexandráról, négy lányukról és fiukról, Alekszej cárevicseről készült. Alekszej hemofiliában szenvedett

Bettmann Archivum



3.17. ábra. X-hez kapcsolt domináns jelleg öröklésmenetét szemléltető családfa



3.18. ábra. Szőrös fülkagylóú férfiak. A tulajdonság valószínűleg Y-kromoszómához kapcsolt
Dr. S. D. Sigamony engedélyével

főként férfiakon jelentkeznek, akik a mutáns allélt egészséges, de hordozó anyjuktól öröklik. Vérékenységben szenvedett Viktória angol királynő számos leszármazottja, jelezve, hogy a királynő heterozigóta lehetett erre az alléllra. II. Miklós orosz cár felesége, Alexandra Viktória királynő unokája volt (3.16. ábra). Fiát, Alekszejt (a képen elől), aki hemofiliában szenvedett, tizennégy éves korában a család többi tagjával együtt kivégezték.

Az X-hez kötött domináns tulajdonságok öröklődése eltér a recesszív jellegektől (3.17. ábra). A családfán látható, hogy a betegség mind a férfiakat, mind a nőket érintheti (esetenként valamivel több nőt), de a beteg személyek utódaiban eltérő megoszlás tapasztalható a két nemnél. A beteg nők gyermekeinek körülbelül a fele beteg, függetlenül az utód nemétől (I-1 asszony és gyermekei), a beteg férfiak (II-2) lányai betegek, fiaik azonban nem.

A nemhez kötött öröklődés utolsó típusa, amit említünk, az Y-kromoszómához kapcsolt gének esete. Embernél kevés bizonyíték van az Y-hoz kötött öröklődésre (McKusick húsznál kevesebb lokuszt említ), és azok is olyan gének, amelyek a nem meghatározásában vesznek részt, vagy homológok az X-kromoszóma egyes génjeivel. Más szervezetekben azonban egy sor Y-hoz kapcsolt gént sikerült kimutatni. Feltehetően egy ilyen gén allélja felelős emberben a szőrös fülkagyló kialakításáért (3.18. ábra). Az öröklődés menetének pontos megállapítása nem egyszerű, mert a tulajdonság megjelenése az életkortól függően erősen változik. Az Y-hoz kötött tulajdonságok jellemzői: (1) csak a hím neműekben nyilvánulnak meg, (2) mindig apáról fiúra öröklődnek. A nemhez kötött jellegek öröklődésének legfontosabb jellegzetességeit a 3.3. táblázat foglalja össze.

Vannak olyan tulajdonságok is, amelyek eltérő módon jelennek meg a két nemben, de nem ivari kromoszómához kötöttek. Egyik típusuk a **nemre korlátozódó** (sex-limited) tulajdonság, amely csak az egyik ivarban nyilvánulhat meg a

3.3. táblázat. Az ivari kromoszómához kapcsolt öröklődés általános jellemzői

X-hez kapcsolt recesszív

- (a) Rendszerint több férfi érintett, mint nő.
- (b) Az érintett férfiak gyermekei általában nem érintettek, ezért a tulajdonság megjelenése „átugrik” egy nemzedéket, amelyben a tulajdonságot nem mutató, de hordozó nő van. Kivételt képez, ha egy érintett férfi, hordozó nővel köt házasságot, ilyenkor leánygyermekükön is megjelenhet a tulajdonság.

X-hez kapcsolt domináns

- (a) Az érintett férfiak leánygyermekei mutatják a tulajdonságot, fiúgyermekük nem.
- (b) Általában az érintett nők gyermekeinek felében jelenik meg a tulajdonság, tekintet nélkül a nemre.

Y-hoz kapcsolt domináns

- (a) A tulajdonság mindig apáról fiúra öröklődik.
- (b) A jelleg csak a férfiakon jelenik meg.

3.4. táblázat. Egy nem által befolyásolt tulajdonság alakulása juhoknál

	<i>HH</i> (Suffolk)	<i>Hh</i> (Hibrid)	<i>hh</i> (Dorset Horn)
Kosok	Szarvatlan	Szarvált	Szarvált
Jerkék	Szarvatlan	Szarvatlan	Szarvált

fenotípusban. Sok ilyen jelleg a szaporodáshoz kapcsolódik, például a szarvasmarhák tejtermelése, a tojásrakás a baromfik körében vagy a peterakás a rovaroknál.

Másik típusba tartoznak a **nem által befolyásolt** jellegek, amelyeket autoszómás gének alakítanak ki, de a két nemből eltérő módon nyilvánulnak meg. Ilyen például a szarvak kialakulását meghatározó gén a kosok és a jerek körében. Néhány juhajtánál (Suffolk) egyik ivar sem visel szarvakat (ún. szarvatlan fajta), míg más fajtáknál (Dorset Horn), mindkét ivar szarvált, de a kosok fejébe sokkal nagyobb (3.4. táblázat). Két ilyen fajta keresztezésekor az autoszómás *H* génre heterozigóta hibridek kosain kinőnek a szarvak, a jereké viszont szarvatlanok. A heterozigótákban a nőtény, illetve a hím nemi hormonok szabják meg, hogy kifejlődnek-e a szarvak, vagy sem. Feltehetőleg a korai kopaszság (a 35. életév előtt kialakuló) öröklődési folyamata hasonló, vagyis a jelleg domináns a heterozigóta férfiakban és recesszív a heterozigóta nőkben.

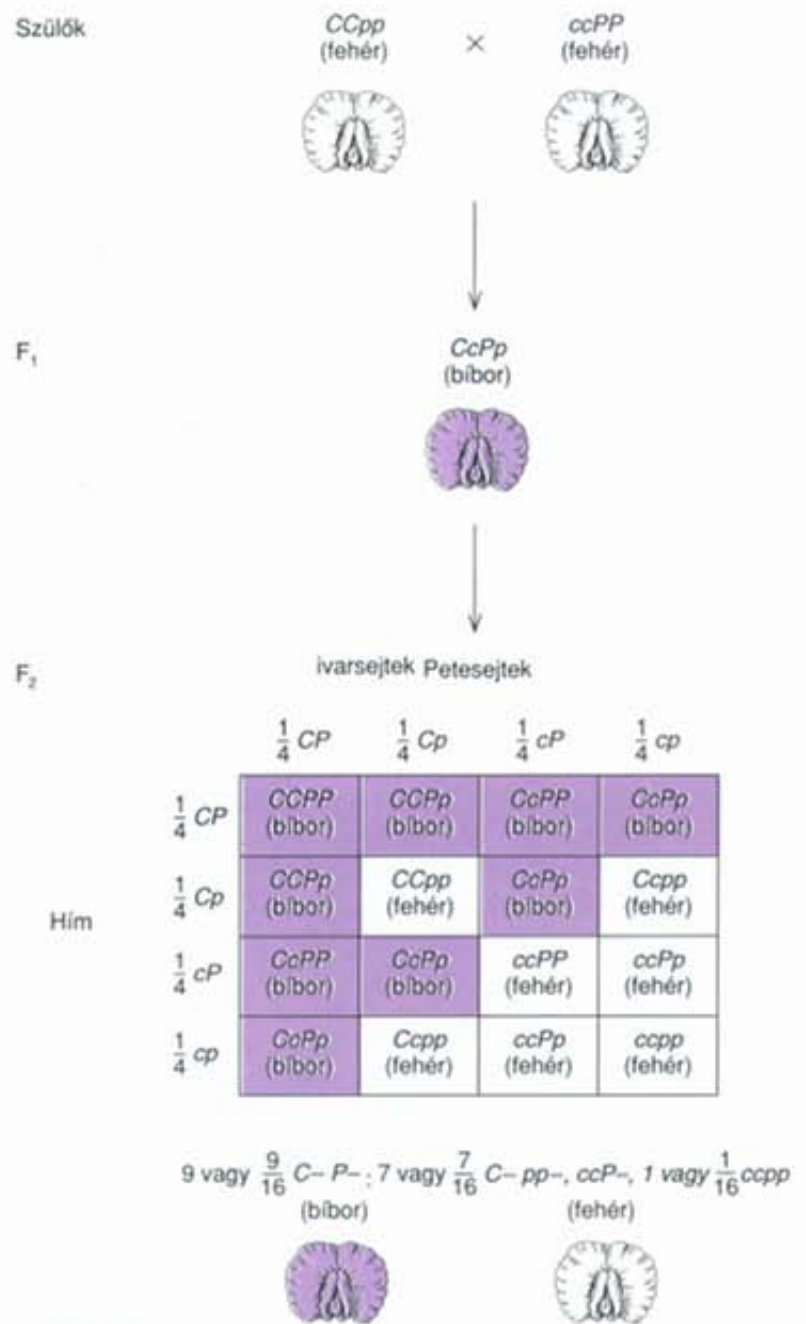
Az X- és az Y-kromoszómákon található gének öröklődése eltér az autoszómás génektől. Az X-kromoszómához kapcsolt recesszív bélyegek csaknem kizárólag a hímekben fordulnak elő, és rendszerint generációkat ugranak át a családokban.

TÖBBGÉNES RENDSZEREK ÉS AZ EPISZTÁZIS

A penetrancia és az expresszivitás tárgyalásakor említettük, hogy egy gén genotípusa által meghatározott fenotípust megváltoztathatják más, ún. módosító gének különböző alléljai. A valóságban sok tulajdonságot befolyásol több gén, amint azt rövid idővel a Mendel-szabályok újrafelfedezése után már megfigyelték. (Mendel dihibrid keresztezéseiben olyan génekkel dolgozott, amelyek különböző tulajdonságokra hatottak, nem ugyanarra.)

Számos esetben ugyanazt a jelleget több gén együttesen alakítja ki, és a fenotípus a gének alléljainak kombinációjától függ. Ilyenkor az allélikus kölcsönhatások mellett, a különböző, nem azonos lokuszokon található gének alléljainak interakcióját is figyelembe kell venni. A többgénekben legalább 2 gén (lokusz) vesz részt a jelleg kialakításában, és a gének közötti kölcsönhatás az **episztázis** (jelentése: *felette álló*), ami nem tévesztendő össze a dominanciával, hiszen az ugyanakkor a lokuszok két alléja között alakul ki.

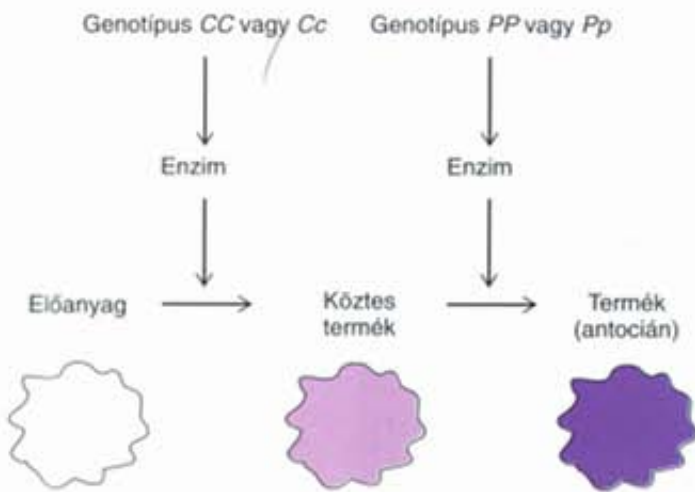
Az episztázis egyik első megfigyelésére két fehér virágú szagosbüköny keresztezésekor került sor (William Bateson és R. C. Punnett kísérlete). Két tiszta származékszerű fajta keresztezéséből az F_1 egyedek váratlanul lila virágokat hoztak (3.19. ábra). Az F_1 öntermékenyítésével kapott F_2 -ben pedig 382 lila és



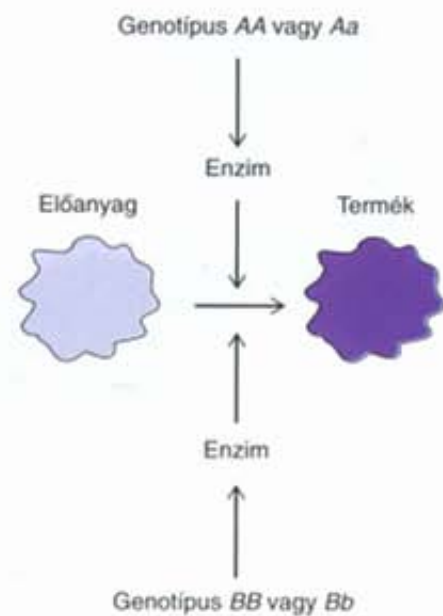
3.19. ábra. Két különböző genotípusú fehér virágú szagosbüköny keresztezéséből származó F_2 nemzedék. A hasadási arány 9:7

269 fehér virágú növény volt, ami 9:7-es arányhoz áll közel. Később más keresztezések is megerősítették ezt a hasadási arányt, amely szerint a fehér virágszint két különböző gén alléljai is kialakíthatják homozigóta recesszív formában. Amennyiben mindkét génnek jelen van egy vagy több domináns alléja, a virág lila (3.19. ábra). Az F_2 tizenhat kategóriája közül kilenc ilyen, a hasadási arány tehát 9:7.

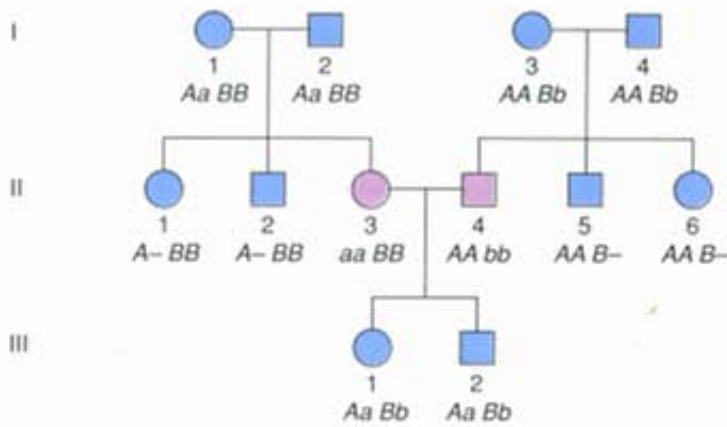
Vizsgáljuk meg közelebbről a fenotípusok biokémiai hátterét! A szagosbüköny virágának pigmentációját az antociánok okozzák. A festékanyagok egymást követő biokémiai reakciók eredményeként keletkeznek, az egyes lépéseket enzimek katalizálják, amelyek különböző gének termékei.



3.20. ábra. A szagosbükköny C és P génjeinek komplementer kölcsönhatása az antociánok szintézisében



3.22. ábra. A kettős génhatás vázlatja. Az A és B gén által kódolt enzimek ugyanazt a biokémiai reakciót katalizálják



3.21. ábra. Egy olyan recesszív fenotípus kialakulását szemléltető család, amely két különböző gén hatására is megjelenhet

Amennyiben a szintézis valamelyik lépése működőképes enzim hiánya miatt nem játszódik le, a pigmentáció nem alakul ki. A folyamat általános vázlatát a 3.20. ábra szemlélteti. Bár a szintézis pontos részletei még nem ismertek, annyi biztos, hogy az antociánok képződéséhez mind a C , mind a P gén enzimtermékei szükségesek. A cc genotípusú egyedben az első enzim nem működőképes, következésképpen a köztes termékhez vezető reakció leáll. Hasonló módon, a pp genotípusú egyedekben a második enzim hiánya miatt a köztes termék nem alakulhat át végtermékké. Vagyis akár cc , akár pp a genotípus, a szintézis megszakad, és a virágszín fehér lesz. A gének episztatikus kölcsönhatásának ez a típusa a **komplementer génhatás**, a két gén együttműködik egy közös végtermék előállításában.

Az ember számos, recesszív módon öröklődő betegsége anyagcserezavarokra vezethető vissza. Ha két szülő ugyanarra a jellegre nézve mutat rendellenességet, de genotípusuk különböző, vagyis a hiba a biokémiai reakciósorozat más lépése-

	$A-B-$	$A-bb$	$aaB-$	$aabb$
Dominancia episztázis nélkül	9	3	3	1
Komplementer génhatás	9	7		
Kettős génhatás	15			1
Recesszív episztázis (aa episztatikus B -felett)	9	3	4	
Domináns episztázis (A - episztatikus bb felett)	12		3	1

3.23. ábra. $AaBb \times AaBb$ keresztezésből származó F_2 hasadási arányok az episztázis különböző eseteiben

it érinti, akkor gyermekük normál fenotípusú lehet. Két süket-néma, de különböző génre nézve homozigóta recesszív személynek születhet ép hallású gyermeke. A 3.21. ábra családfáján a II-3 és II-4 személyek betegek, de más lokuszokon homozigóták. A családfa eltér a monohibrid öröklődéstől, ahol két érintett személy utódai ugyancsak érintettek.

A 9:7 hasadási arány az F_2 -ben csak az egyik lehetséges típusa az episztatikus hatásnak. Más típusú kölcsönhatások esetén az F_2 -ben tapasztalt arányok közelíthetnek a 9:3:4-es, a 13:3-as vagy a 15:1-es értékekhez. Figyeljük meg, hogy ezek a hasadási arányok levezethetők a mendeli 9:3:3:1-es arányból. A 15:1-es hasadás biokémiai alapja az, hogy a végtermék szintézisében közreműködő enzimet két gén is kódolja. Bármelyik gén egyetlen domináns allélja elegendő a működőképes enzim, és így a végtermék kialakulásához (3.22. ábra). Csak a kettős recesszív, $aa\ bb$ genotípusban áll le az anyagcsere-folyamat, és alakul ki a vadtól eltérő fenotípus. Ez a kölcsönhatás típusa a **kettős génhatás**. Feltehetően a két különböző gén hasonló terméket hoz lét-



3.24. ábra. Barna és fekete fenotípusú egerek

© Runk/Schoenberger/Grant Heilman Photography, Inc.

3.5. táblázat. Az egerek szőrzetének genetikai háttere

A és B lokuszok		B és C lokuszok	
Genotípus	Fenotípus	Genotípus	Fenotípus
$A- B-$	Aguti	$B- C-$	Fekete
$A- bb$	Fahéjszinű	$bb C-$	Barna
$aa B-$	Fekete	$B- \alpha$	Albínó
$aa bb$	Barna	$bb \alpha$	Albínó

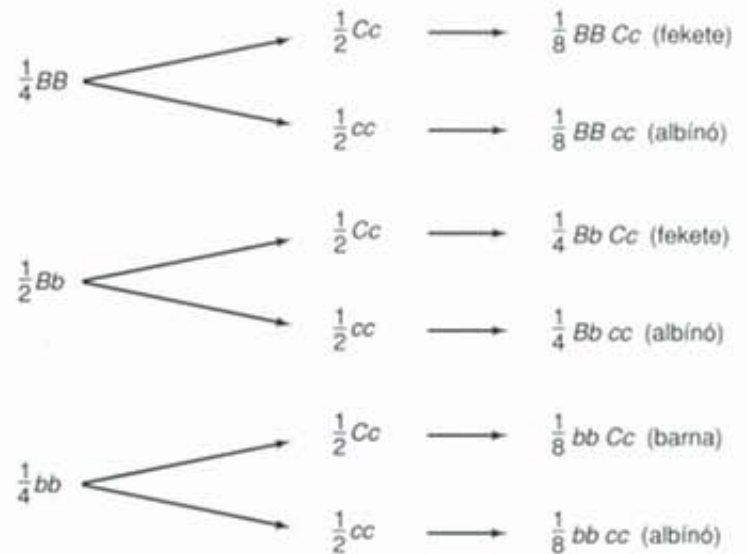
¹A = aguti; B = barna; C = albínó

re, és egyikük duplikációval alakulhatott ki a másiktól az evolúció során (l. 4. fejezet). A kettős génhatás klasszikus példája figyelhető meg egy gyakori gyomnövényen, a pástortáskán (*Capsella bursa-pastoris*). A jelleget kialakító két gén legalább egy domináns alléljának jelenlétében a becőke kerekded, hosszúkas termés csak a homozigóta birecesszív egyedekben alakul ki.

Az episztázis különböző formáit összegzi a 3.23. ábra. Ha mindkét lokuszon dominancia van, nincs episztázis, az F_2 -ben 4 fenotípus jelenik meg, 9:3:3:1 arányban. Az előzőekben tárgyalt kétféle episztatikus hatás, a komplementer és a kettős génhatás, 9:7-es, illetve 15:1-es hasadási aránnyal. Az episztázis további két fajtájában három fenotípus kategória jelenik meg (az ábra két utolsó sora). Vannak-e még olyan fenotípus arányok, amelyek a különböző kategóriák kombinációjával alakíthatók ki, mint például a 12:4 vagy a 9:6:1?

Az emlősök szőrzetszínét gének egész sora befolyásolja. Egereknél legalább 63 gén 148 különböző allélja hat a szőrzet színére (3.24. ábra).

Két szőrzetszín szabályozó génről már volt szó, nevezetesen az egerek sárga színét, illetve a macskák színmélységét kialakító génekről. Más szőrzetszín befolyásoló gének különböző módon közreműködnek a jelleg kialakításában, közülük hármat említünk az episztatikus kölcsönhatások bemutatására.











3.25. ábra. $Bb Cc$ és $Bb cc$ genotípusú egerek keresztezéséből várható utódmegoszlás

A domináns aguti színt az A gén A allélja szabályozza, ami homogén szürke, közelről nézve spriccelt („só-bors”) színt eredményez. Sok emlős természetes populációjában ez a leggyakrabban előforduló szín. Az aguti állatok szőrszálaikat közelről vizsgálva megfigyelhető rajtuk egy sárga sáv, aminek köszönhetően a szőrzet egésze kissé pettyezett, szürkés árnyalatú. Recesszív, nem-aguti (aa) genotípus esetén a szőrszálak egyszínűek.

A B gén különböző alléljai az A géntől függően különböző színeket alakíthatnak ki (3.5. táblázat). A B domináns allél Aa és AA genotípus esetén aguti fenotípust eredményez, de ha a genotípus aa , a szőrzet fekete. Másrészt, a bb genotípus A domináns allél jelenlétében fahéjszinű, míg aa esetén barna színű.

A harmadik, a C gén a pigmentek szintézisét teszi lehetővé. A recesszív genotípus (α) gátolja a pigment szintézist, ezáltal bármilyen szín kialakulását (3.5. táblázat). A $bb \alpha$ genotípus például albínó, mert a α genotípus nem teszi lehetővé a barna szín megjelenését. Két $Bb Cc$ genotípusú egér keresztezéséből 9:3:4-es hasadási arány várható (3.23. ábra 4. sor). Milyen fenotípusarányok várhatók a $Bb Cc$ és a $Bb \alpha$ keresztezéséből? A villás elágazás módszerét alkalmazva az utódnemzedékben várhatóan $\frac{1}{2}$ fekete, $\frac{1}{4}$ barna, $\frac{1}{4}$ albínó fenotípusú egyed lesz, ami 6:2:8 aránynak felel meg (3.25. ábra).

Egy tulajdonság kialakulását egynél több gén is befolyásolhatja, két gén kölcsönhatása a fenotípus kialakításában: az episztázis. Az episztatikus kölcsönhatás révén az F_2 -ben a 9:3:3:1-től eltérő arányok jöhetnek létre.

Fahatár (3040 m)			
Tülevelű erdők (1400 m)			
Tengerpart (100 m)			Életképtelen
Genotípus Környezet	Tengerpart (100 m)	Tülevelű erdők (1400 m)	Fahatár (3040 m)

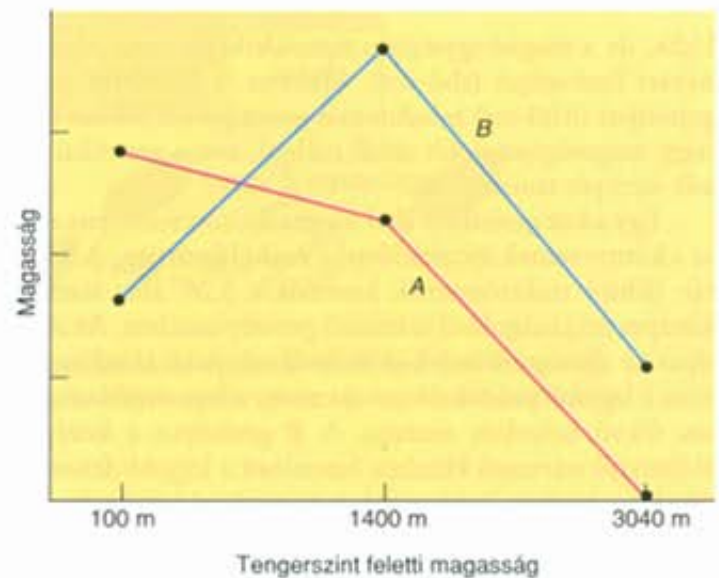
3.26. ábra. Klónozott növények (*Potentilla glandulosa*) fenotípusának alakulása három különböző tengerszint feletti magasságú élőhelyen

GENOTÍPUS–FENOTÍPUS KAPCSOLATOK

A Mendel által vizsgált bélyegek esetében egy adott genotípus-hoz egy meghatározott fenotípus tartozott. Más esetekben a genotípus által kialakított fenotípus módosulhat a genotípus penetranciájától és expresszivitásától függően. Ráadásul a változó megnyilvánulás gyakran környezeti tényezők eredménye, így a pontos fenotípust még adott genotípus-környezet kombináció esetén sem könnyű megjósolni.

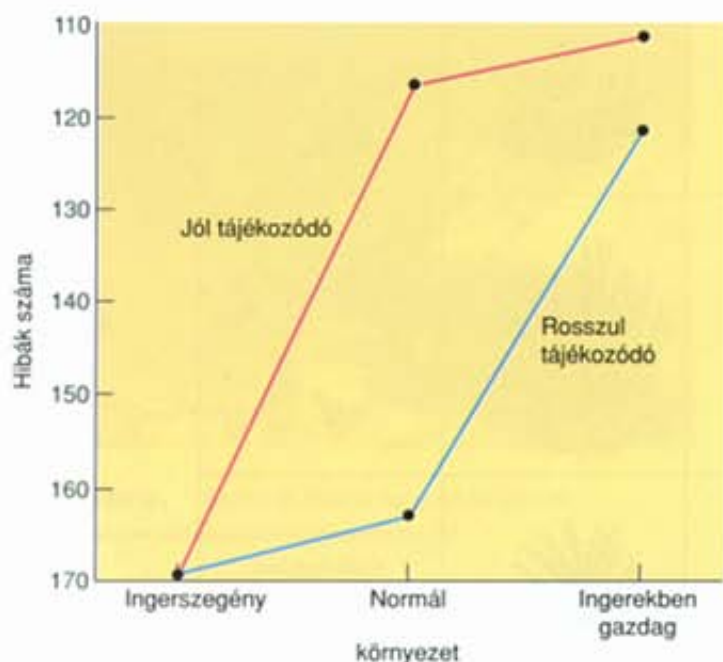
Ideális esetben a környezeti hatás mértékét egy genotípusra meghatározhatjuk, ha genetikailag azonos egyedeket különböző környezetben nevelünk, majd összevetjük fenotípusukat. Emberi vonatkozásban a születésük óta külön nevelt egypetéjű ikrek jelenthetnek ilyen vizsgálati lehetőséget. A környezeti hatások azokon a fajokon tanulmányozhatók a legjobban, amelyek ellenőrzött körülmények között és igen nagy számban nevelhetők.

Az 1940-es években J. Clausen és munkatársai több növényfajon végeztek ma már klasszikusnak számító vizsgálataikat. A környezet fenotípusra gyakorolt hatásának megállapítására **klónokat** (genetikailag azonos egyedeket) neveltek különböző tengerszint feletti magasságokból vett dugványokból. Így például a rózsafélékhez tartozó pimpófaj (*Potentilla glandulosa*) töveit három helyről gyűjtötték: a Csendes-óceán partvidékéről, 100 m tengerszint feletti magasságból; a hegyoldalról, 1400 m-ről és a fahatárról, 3040 m-ről. Vegetatív szaporítással klónokat állítottak elő a növényekből, majd mindegyikükből ültettek a három élőhelyre. Azaz, a há-



3.27. ábra. Két különböző genotípus reakciónormája. A alacsony tengerszint feletti magasságról (tengerpart) származó klón, B a tülevelű erdők zónájából (1400 m) származó klón

rom élőhelyről vett genotípusok mindegyikét háromféle környezetben nevelték, 100, 1400 és 3040 m-en. A 3.26. ábrán látható a kísérletek eredménye. Mindegyik sor egy-egy különböző területről származó genotípust képvisel, míg mindegyik oszlop egy-egy környezetet, amelyben a növényeket nevelték. Jól látható, hogy a növekedésben a genetikai és a környezeti tényezők egyaránt fontosak. A tengerparti genotípus mind az alacsony, mind a mérsékelt magasságú területen megfelelően fej-



3.28. ábra. A labirintusban vétett hibák alakulása két különböző patkánytörzs (jól tájékozódó, rosszul tájékozódó) esetén. Az állatokat háromféle környezetben nevelték

Forrás: Cooper & Zubek *Canadian Journal of Psychology* 12:159-64, 1958

lódik, de a magashegységben nem életképes, ami jelzi a környezet fontosságát (alsó sor). Másrészt, a fáhatárról származó genotípus (felső sor) minden más genotípusnál jobban fejlődik nagy magasságban (jobb oldali oszlop), ami a genetikai tényezők szerepét támasztja alá.

Egy adott genotípus által meghatározott fenotípus alakulása a környezetnek megfelelően, a **reakciónorma**. A 3.27. ábrán látható reakciónormák hasonlóak a 3.26. ábra alacsony és közepes magasságokból származó genotípusaiéhoz. Az *A* genotípus az alacsony fekvésű élőhelyről származó klónhoz hasonlóan a legjobb produkciót az alacsony, a legrosszabbat a magasban fekvő helyeken mutatja. A *B* genotípus a közepes magasságokból származó klónhoz hasonlóan a legjobb fenotípusértékeket a közepes magasságokon mutatja, ehhez képest fenotípusos értéke mind az alacsony, mind a magasban fekvő helyeken jelentősen csökken.

A viselkedést meghatározó gének esetében jelentős különbségek lehetnek az egyes genotípusok reakciónormái között. Bár eddig a viselkedésről mint fenotípusról még nem esett szó, tény, hogy sok mutáns gén befolyással lehet a magatartásra is. A fenilketonuriás betegeknek megfelelő kezelés hiányában például a normálnál alacsonyabb az intelligenciaszintjük, ami megfelelő tesztekkel mérhető.

Egy kísérletben két patkánytörzset hasonlítottak össze, azt vizsgálták, hogy a környezet miként befolyásolja a viselkedést, nevezetesen a labirintusban való tájékozódást. A méréshez használt gyorsan tájékozódó („okos”) és lassan tájékozódó („buta”) patkánytörzseket normál környezeti feltételek mellett, több nemzedéken át végzett szelekcióval állították elő.

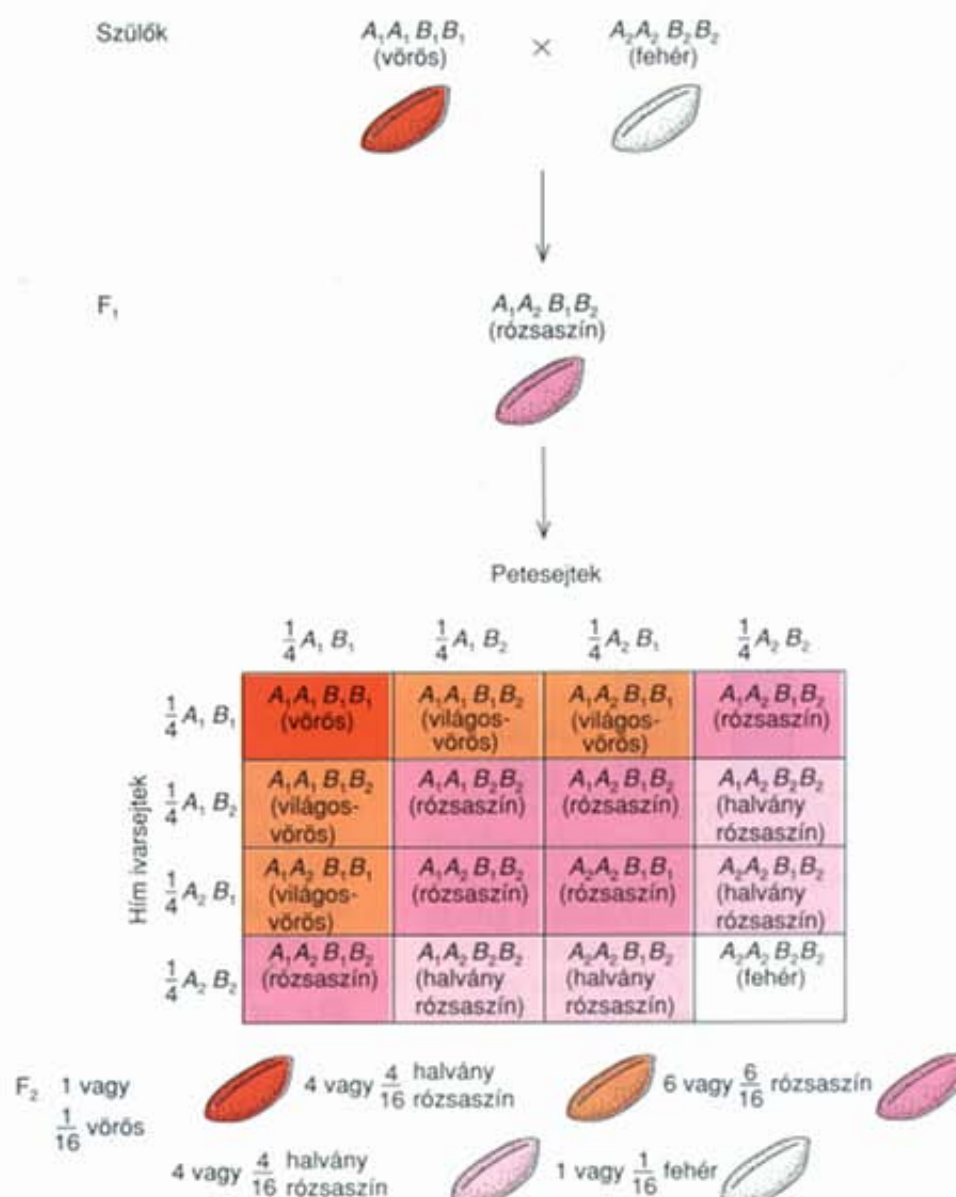
Az „okos” törzs állatai átlagos környezeti feltételek mellett mintegy ötvennél kevesebb hibát vétettek, mint a másik vonalba tartozó egyedek, ami a szelekció hatékonyságát és a két csoport genetikai különbségét is alátámasztotta. Ezután a két törzs egyedeit ingerszegény, átlagos, illetve vizuális ingerekben gazdag környezetben nevelték, majd megvizsgálták reakciónormájukat. Az ingerszegény környezetben nevelt „okos” és „buta” állatok hasonló számú hibát vétettek, míg az ingerekben gazdag környezet jótékony hatással volt a „buta” törzs egyedeire (3.28. ábra). A megfigyelésekből levonható következtetések elgondolkodtatóak: azt sejtetik, hogy a viselkedésben megmutató eltérések csak szűk környezeti határok között jelentkezhetnek és nem általánosíthatók széles környezeti tartományokra.

A genotípus és a fenotípus kapcsolata sokszor összetett. Ez a kapcsolat a különböző környezeti feltételek mellett tapasztalható reakciónorma segítségével kvantitatívva tehető.

MENNYISÉGI JELLEGEK

Számos tulajdonság genetikai háttere nem pontosan tisztázott, és nincs is értelme, sőt nem biztos, hogy egyáltalán lehetséges azoknak a géneknek a számát és egyedi hatását pontosan meghatározni, amelyek részt vesznek valamely jelleg kialakításában. Azokat a tulajdonságokat, mint például a magasság, a súly vagy az alak, tehát amelyek fenotípusos értéke valamilyen kvantitatív skálán mérhető, mennyiségi, más szóval **kvantitatív jellegeknek** nevezzük. Bár a fenotípusos érték genetikailag meghatározott, a legtöbb kvantitatív jelleg esetében nincs pontos összefüggés a fenotípusos érték és egy adott genotípus között. Az utóbbi években molekuláris módszerekkel (l. 16. fejezet) sikerült azonosítani néhány olyan gént, ún. kvantitatív bélyegeket meghatározó lokusz (QTL), amelyeknek lényeges hatásuk van egyes összetett humán betegségek kialakulására, illetve a gabonafélék terméshozamára vagy egy sor más jellegre. A kvantitatív bélyegek általános jellemzői: (1) folyamatos eloszlásúak, (2) **poligénese**k, azaz sok gén vesz részt kialakításukban, (3) a környezeti tényezők is befolyásolják megjelenésüket.

A poligén tulajdonságokról az egyik első, jól használható feljegyzést a svéd származású Herman Nilsson-Ehle készítette 1909-ben, amikor kimutatta, hogy a búzaszemek színének alakulását több gén befolyásolja. Eredményeinek értelmezéséhez vizsgáljuk meg a keresztezéseinek genetikai bázisát, ha tudjuk, hogy a színváltozatok kialakításában két gén alléljai szerepelnek. A 3.29. ábra a vörös és fehér szemű búza keresztezéséből származó F_2 nemzedéket mutatja. Az F_1 növények egyöntetűen köztes fenotípusúak voltak, ami részleges dominanciára utalt. Az F_2 -ben azonban a várt három fenotípus kategória helyett öt elkülöníthető fenotípus volt, mert a szülői

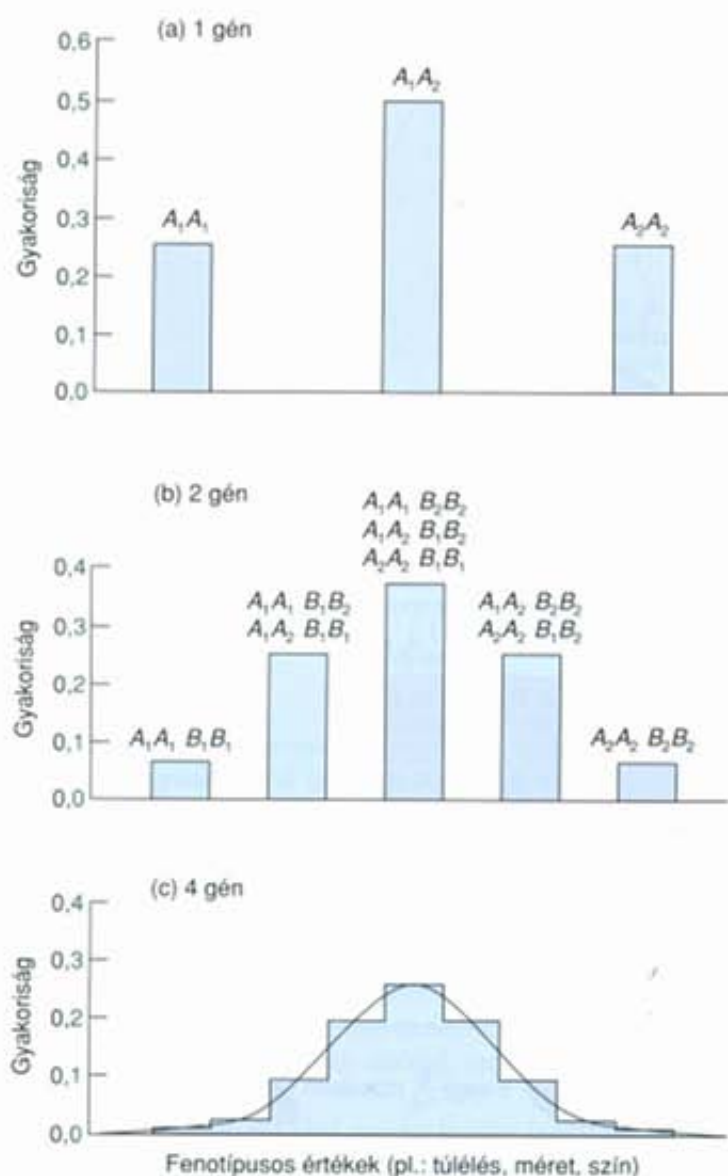


3.29. ábra. Vörös és fehér szemszínű, két génben eltérő búza keresztezéséből származó F₂ nemzedék öt fenotípus kategóriája. Az agrárfelsőoktatásban a búza színének megjelölésére a következő szinonimákat is használják: vörös=piros, halvány vörös= középpiros, rózsaszín=világos piros, halvány rózsaszín=halvány piros.

kategóriák és az F₁ mellett megjelent két újabb osztály is, a halványpiros és világosvörös. Az F₂-ben tapasztalt fenotípus arány (1:4:6:4:1) azzal magyarázható, hogy a jelleget két gén alléljai határozzák meg, mégpedig úgy, hogy a sötétvörös fenotípus négy vörös színt meghatározó allél (alsó indexbe írt egyes szám jelöli), $A_1A_1B_1B_1$ esetén alakul ki. A világosvörös szín akkor jelent meg, amikor a genotípusban csak három vörös színt kialakító allél volt, akár az A , akár a B lokuszon ($A_1A_1B_1B_2$ illetve $A_1A_2B_1B_1$) és így tovább. Ráadásul, a szemtermés színére még egy harmadik gén is hat (a 3.27. ábrán nem szerepel). Mindhárom gén a másiktól függetlenül hat a búzaszem színére, vagyis a fenotípusban különböző gének egyedi hatásai összegződnek.

A kvantitatív tulajdonságok poligénes természetének szemléltetésére feltételezzük, hogy egy tulajdonságot befolyásoló nagyszámú gén hatását úgy tudjuk láthatóvá tenni, ha a fenotí-

pus-eloszlást összevetjük azokkal az esetekkel, amikor egy, kettő vagy négy gén határozza meg a fenotípus értéket, és mindegyik génnek két-két allélja van (3.30. ábra). Az egyszerűség kedvéért tételezzük fel azt is, hogy a heterozigóták pontosan köztes jellegűek, a lokuszok egyes alléljai egyforma gyakoriságúak, és a környezet nincs hatással a vizsgált bélyegre. A poligénes genotípusok gyakorisága kiszámítható, mint az egygénés genotípusok gyakoriságainak szorzata (független lokuszok). A 3.30. ábrából nyilvánvaló, hogy a gének számának egyről négyre történő emelkedésével a kezdetben határozott fenotípus osztályokból álló eloszlás egyre inkább folyamatossá válik. Valójában a pontos genotípus-fenotípus megfeleltetés mindegyik fenotípus osztályban megszűnik már akkor is, ha csak két gén alakítja ki a jelleget. Kétgénés öröklődés esetén a 4:16 arányban szereplő, világosvörös fenotípusérték ugyanis $A_1A_1B_1B_2$, illetve $A_1A_2B_1B_1$ genotípus esetén is kialakulhat.



3.30. ábra. Egy kvantitatív tulajdonság és a fenotípusos eloszlás alakulása, ha a jelleg kialakításában (a) egy, (b) kettő, (c) négy gén vesz részt

A legtöbb kvantitatív bélyegre hat a környezet. Nyilvánvaló, hogy a felnőttkori testméret a legtöbb élőlény esetén függ a rendelkezésre álló tápanyagforrástól. A tápanyag-ellátottság meghatározza például egy beltenyészett egértörzs testméretét, az eltérő fény- és talajviszonyok pedig fenotípusos változatosságot eredményeznek a gyümölcsfák klónjaiban.

Egy populációban a kvantitatív bélyegek, mint például a testméret és a súly, jellemző módon folyamatos eloszlást mutatnak, akkor, ha a mérési módszer megfelelően pontos. Az eloszlás gyakran közelít a normális eloszláshoz (haranggörbe), amelyben a köztes fenotípusértékkel rendelkező egyedek aránya a legnagyobb. Az eloszlás kialakításában a tulajdonságok poligénes jellege és a környezet hatása egyaránt szerepet játszik. A normális eloszlás görbéjének klasszikus példája látható a 3.31. ábrán, amelyen egy 175 hallgatóból álló csoport testmagasság szerinti elrendezésben állt fel.

ÁTLAG ÉS VARIANCIA

Hogyan lehet meghatározni a fenti diákcsoport vagy valamilyen szervezet fenotípusos változatosságát, variációját? A populációk jellemzőinek megállapításához a leíró statisztika nyújt segítséget. Ebben a fejezetrészen röviden bemutatjuk, miként lehet meghatározni az **átlagot** (\bar{x}), egy adatsor középértékét, valamint a **variációt**, a középértéktől való eltérés mértékét.

Vegyük például az n számú különböző növényből álló mintát. Ha az i -edik növény magasságát x_i -vel jelöljük, akkor az átlagos magasság (\bar{x}) a mintában:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

ahol a Σ (görög szigma) jelenti a mintabeli n számú növény magasságadatainak összegét. Ha a minta például öt növényből áll, és $x_1=28$, $x_2=30$, $x_3=27$, $x_4=32$ és $x_5=33$ cm, akkor:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= \frac{1}{5}(x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5) \\ &= \frac{1}{5}(28 + 30 + 27 + 32 + 33) \\ &= 30 \end{aligned}$$

Vagyis ebben a mintában a növények átlagos magassága 30 cm.

Adott mintában az átlag körüli szóródás vagy variancia különböző mértékű lehet. Amennyiben minden növény egyforma magas, akkor nincs szóródás, de ha egyforma számú igen magas és igen alacsony egyed van a mintában, akkor rendkívül nagy lehet a szóródás. A variancia (V_x) az átlag körüli szóródás mértéke, azt fejezi ki, hogy az adatok mennyire térnek el az adatsorozat középértékétől:

$$V_x = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Más szóval, a variancia az átlagtól való eltérések négyzetösszege osztva $(n-1)$ -gyel. A fenti adatok variációját:

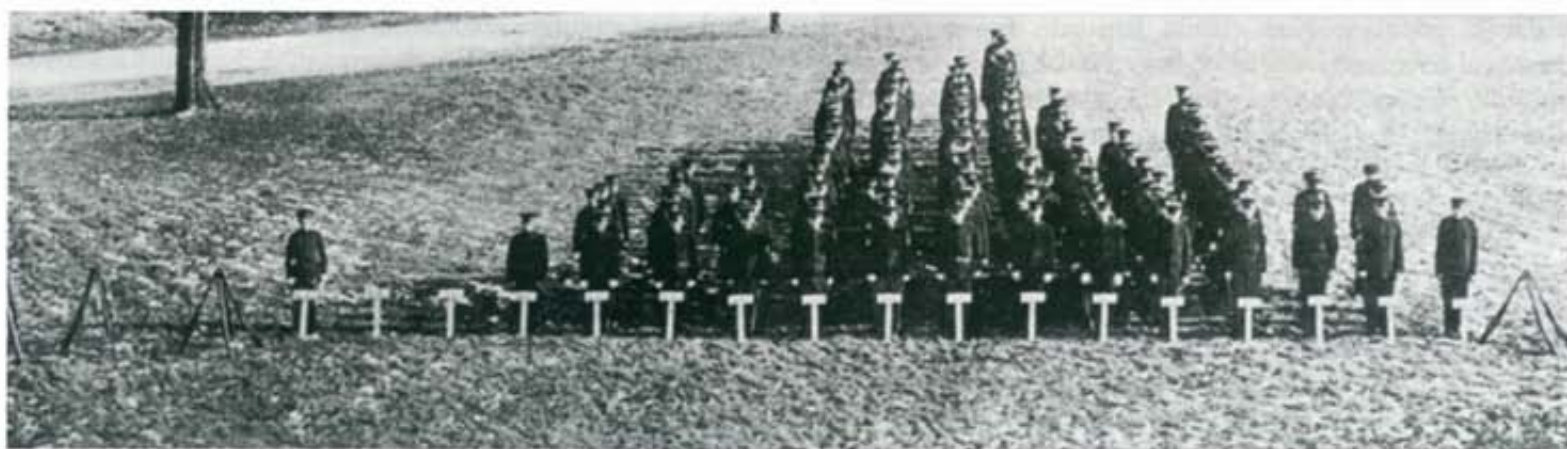
$$\begin{aligned} V_x &= \frac{1}{5}[(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + (x_4 - \bar{x})^2 \\ &\quad + (x_5 - \bar{x})^2] \\ &= \frac{1}{5}[(28 - 30)^2 + (30 - 30)^2 + (27 - 30)^2 + (32 - 30)^2 \\ &\quad + (33 - 30)^2] \\ &= 6,5 \end{aligned}$$

A 3.31. ábrán látható diákok esetében az átlagos testmagasság 170,9 cm, a variancia pedig 47,03.

A variancia mértékskálája nem ugyanaz, mint az átlagé, hiszen a variancia négyzetes érték, ezért szórásnégyzetnek is nevezik. Sokszor a variancia négyzetgyökét, másként a **standard eltérést** (szórás) használják az átlag körüli szóródás jellemzésére. Az előző példára a standard eltérés:

$$\begin{aligned} (V)^{\frac{1}{2}} &= (7,3)^{\frac{1}{2}} \\ &= 2,7 \end{aligned}$$

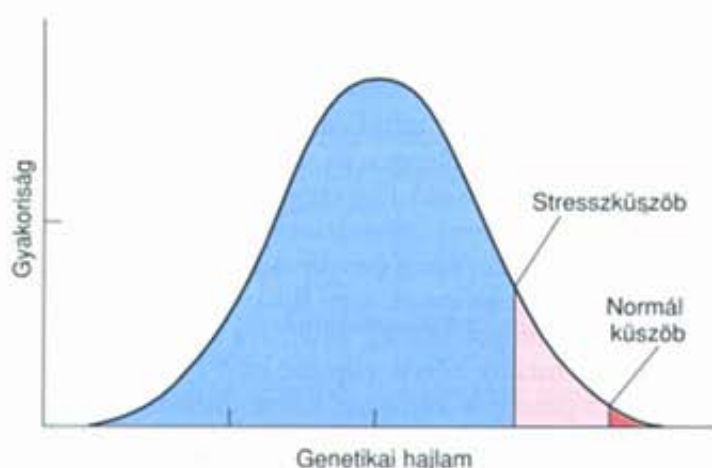
Ha a mért adatok eloszlása haranggörbét ad, azaz normális eloszlású, akkor a mintának körülbelül 95%-a belül van az átlagtól mért két standard eltérésnyi értéken. A diákok példájában a kétszeres standard eltérés 13,72, ezért ezek az értékek:



Egyedszám	1	0	0	1	5	7	7	22	25	26	27	17	11	17	4	4	1
Testmagasság (cm)	147,3	149,9	152,4	154,9	157,5	160,0	162,6	165,1	167,6	170,2	172,7	175,3	177,8	180,3	182,9	185,4	188,0

3.31. ábra. A Connecticuti Mezőgazdasági Főiskola diákjainak magasság szerinti megoszlása

Kongresszusi Könyvtár



3.32. ábra. Egy öröklődő betegségre mutatott genetikai hajlam, azokkal a hipotetikus küszöbértékekkel, amelyek felett az egyedek a beteg fenotípust mutatják

$170,9 - 13,72 = 157,18$ és $170,9 + 13,72 = 184,6$. A 3.31. ábrán látható, hogy a hallgatók igen nagy részének testmagassága ezeken a határokon belüli. Számszerűen 168 diák a 175-ből, vagyis 96%. Csak ketten nem érik el a 158 cm-t, illetve öten magasabbak, mint 185 cm.

Vannak olyan poligénes tulajdonságok is, amelyekre csak diszkrét osztályok léteznek. Ilyen például a madártojások száma a fészkekben, a pikkelyek száma egy hüllőn, a levelek és a virágszirmok száma egy növényen, a bajuszszőrök száma egy egéren. Ezeket a diszkontinuus eloszlású bélyegeket **számolható** vagy **metrikus** (méretekkel meghatározott) tulajdonságoknak is nevezik. Feltételezhetően szintén poligénesek, továbbá a környezet is befolyásolja kialakulásukat. Még szélsőségesebb esetben egy diszkontinuus eloszlású tulajdonságnak két fenotípus kategóriája is lehet, mint például valaminek a megléte vagy a hiánya,

amely bizonyos betegségek (beteg/nem beteg) vagy reprodukív állapotok (termékeny/meddő) esetében látható. Ezekben esetekben az egyik vagy a másik állapot a hátteret jelentő, genetikailag meghatározott hajlam vagy érzékenység eredményeként alakul ki, amelyek viszont már kontinuos eloszlásúak.

Egy adott személy esetében egy genetikai betegség jelenlétét az egyén genetikai hajlama és sajátos környezete határozza meg. A 3.32. ábra egy betegség, például a diabetes normál környezetben való megjelenésének küszöbértékeit mutatja. A populációnak csak viszonylag kis része lépi túl a megbetegedési küszöböt, és betegszik meg (vörös terület). Más környezetben, ahol az elhízás, az alkoholizmus és egyéb tényezők növelik a diabetes valószínűségét, a küszöbérték balra tolódik (stresszküszöb). Ez az eltolódás okozza a betegség gyakoribb előfordulását, mert a rózsaszínnel jelzett területbe tartozók normál körülmények között nem betegednének meg, de stresszkörülmények között igen.

A kutyák csípőízületi diszpláziáját (mely gyakran degeneratív ízületi rendellenességekhez vezet) valószínűleg a genetikai hajlam és a környezeti tényezők kombinációja együttesen alakítja ki. Az eltérés különösen nagy testű kutyafajták körében gyakori, például a német juhászkutyánál és a labrador retrievernél, annak ellenére, hogy a tenyésztők komoly erőfeszítéseket tesznek kiküszöbölésére. A poligénes öröklésment, a diagnózis bizonytalansága (röntgenfelvételek alapján diszpláziának bizonyuló kutyák klinikailag sokszor egészségesek) megnehezíti az elváltozás gyakoriságának csökkentését.

Nagyon fontos tudni azt, hogy a különböző populációkban a kvantitatív tulajdonságok genetikai meghatározottsága jelentősen eltérő lehet. Például a rovarirtó szerekkel kezelt rovarpopulációkban változatos válaszreakciókat tapasztaltak, ami főként egy génre (vagy géncsoportra) vezethető vissza, amely(ek) az egyes peszticidekkel szembeni rezisztenciáért felelős(ek). Ezen kívül az egyes gének, illetve ahogy azok a rezisztenciát ki-

alakítják, populációnként eltérők lehetnek. Így a DDT-vel szembeni rezisztencia oka lehet, hogy vannak gének, amelyek a rovarölő szer hatástalanítására, a DDT zsírtetekben való tárolására hatnak, vagy megakadályozzák, hogy a szer a keringési rendszerbe kerüljön. (A peszticidrezisztencia részletesebb magyarázatát lásd a 17. fejezetben.)

Általánosan elfogadott, a molekuláris genetika újabb eredményeivel is alátámasztott nézet, hogy a kvantitatív tulajdonságokat meghatározó gének lényegében ugyanolyanok (vagy éppen ugyanazok), mint a kvalitatív tulajdonságokat (szín, alak stb.) meghatározók. Semmi nem támasztja alá azt a korábbi feltételezést, hogy a mennyiségi jellegeket valamilyen más típusú gén alakítaná ki. Valójában ismert néhány olyan gén, amely kvalitatív hatásán keresztül kvantitatív tulajdonságot is befolyásol. A kvantitatív bélyegeket meghatározó gének öröklődése követi a Mendel-szabályokat, sok alléllal, változatos dominanciaviszonyokkal és episztatikus kölcsönhatásokkal rendelkeznek.

A mennyiségi jellegek kialakításában sok gén vesz részt, és fontos szerepe van a környezetnek is. A poligénes tulajdonságok fenotípusos eloszlása egy populációban rendszerint folyamatos, de ritkán diszkrét osztályokat is alkothatnak.

A KVANTITATÍV TULAJDONSÁGOK MODELLJE

A mennyiségi tulajdonságok fontosságának megértéséhez és vizsgálatához olyan modellt kell készíteni, amely lehetővé teszi a fenotípusos értékek genetikai és környezeti komponenseinek elkülönítését. Egy genotípus (i) fenotípusos értékét P -vel, a környezetét (j)-vel jelölve:

$$P_{ij} = G_i + E_j$$

ahol G_i az i genotípus genetikai hozzájárulása a fenotípusos értékhez, E_j pedig a j környezet által okozott eltérés. E_j az aktuális j környezettől függően lehet pozitív vagy negatív. Ez az egyszerű modell jól illusztrálja a genetikai-környezeti, másként veleszületett-szerzett alternatívák kérdését, ami sokszor vita tárgya az emberi intelligencia és más bélyegek vonatkozásában is.

Sokszor az egyes populációkban az átlagos fenotípusos értékek eltérők. Általában nem egyszerű annak eldöntése, hogy a különbség genetikai tényezők, környezeti hatások vagy a kettő kombinációjának következménye-e. Néhány következtetést levonhatunk, amennyiben lehetőség van a növény- és állatpopulációk azonos körülmények között történő nevelésére (ún. **közöskert-kísérlet**). Ha a vizsgált populációk tagjai azonos környezetben megtartják fenotípusos sajátosságait, az azt a hipotézist erősíti, hogy a populációk genetikailag különböznek. Ugyanakkor a fenotípusos kü-

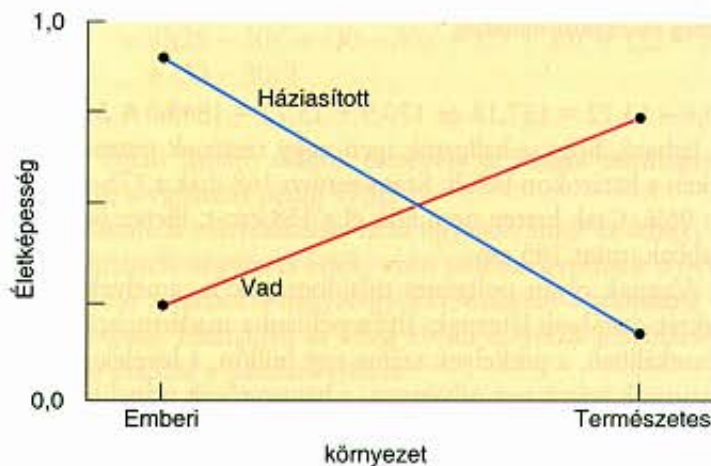
lönbségek eltűnése azt jelzi, hogy kialakulásukban a környezeti tényezők játszották a fő szerepet. A 3.26. ábrán bemutatott kísérletben mind a genetikai, mind a környezeti tényezők fontosak voltak.

A különböző genotípusok eltérő kölcsönhatásban lehetnek környezetükkel a fenotípus kialakításában. Amennyiben ilyen speciális kölcsönhatás áll fenn a genotípusok és a környezet között, a modell kibővíthető a **genotípus-környezet kölcsönhatásának** fogalmával, és a fenotípusos értéket a

$$P_{ij} = G_i + E_j + GE_{ij}$$

összefüggés adja meg, ahol GE_{ij} az i genotípus és a j környezet kölcsönhatásának mértéke. A környezet okozta eltéréshez hasonlóan a genotípus-környezet kölcsönhatás is lehet pozitív vagy negatív.

A patkányok labirintustanulási kísérlete (3.28. ábra) a genotípus-környezet kölcsönhatás egyik szemléletes példája. A bevezetett genotípus-környezet kölcsönhatás komplexitását vizsgáljuk meg két genotípus és két környezet esetében. Előfordul, hogy a két genotípus fenotípusos értéke a két környezetben eltérően alakul, mint például egyes háziállatok (juh) és vadon élő ősiük esetében, ha a természetben vagy az ember közelében nevelik őket. A vadon élő ősi természetes körülmények között mutat nagyobb túlélést, míg a háziásított fajta emberi gondoskodás mellett (3.33. ábra). Egy tulajdonság – itt a túlélési képesség – fenotípusos értéke elsődlegesen az adott genotípus és a speciális környezet kölcsönhatásának függvénye, és nem lehet előre megjósolni, ha nincs előzetes információnk a genotípusról és a környezetről. Csak akkor nincs genotípus-környezet kölcsönhatás, ha a különböző genotípusok vagy fajták reakciónormái párhuzamosak (vagy megközelítőleg azok). Ha a vizsgált környezeti tényező szűk határok között változik, kicsi a valószínűsége annak, hogy a genotípus-környezet kölcsönhatás fontos a fenotípusos változatosság befolyásolásában.



3.33. ábra. A háziásított és a vadon élő állatok életképessége természetes körülmények között, illetve emberi környezetben. A görbe jól szemlélteti a genotípus és a környezet interakciójának hatását

A genetikai modell még pontosabbá tehető, ha a genotípusos értéket két összetevőre bontjuk:

$$G_i = A_i + D_i$$

ahol A_i az additív, D_i a dominancia komponens. Ha a heterozigóta pontosan átmeneti a homozigóták között, akkor a dominancia komponens hozzájárulása nulla; vagyis a genetikai érték egészét az additív komponens adja. A búzaszemek színében a genetikai változatosságot az additív komponens alakítja ki, mint ahogy azt az előzőekben már láttuk. Más szóval a fenotípusos értéket a

$$P_{ij} = A_i + D_i + E_j$$

összefüggés adja meg, feltételezve, hogy a genotípus-környezet kölcsönhatás elhanyagolható.

Ahogy azt már korábban hangsúlyoztuk, a kvantitatív bélyegekre nincs egzakt genotípus-fenotípus összefüggés. Ezért a kvantitatív tulajdonságok vizsgálatokor célszerűbb, ha a populációban fellelhető variabilitást felosztjuk a genetikai és a környezeti tényezők által okozott variabilitásra. Ha a fent megadott alapmodellt használjuk a fenotípusos variancia elemzésére, akkor:

$$V_p = V_G + V_E$$

ahol V_p , V_G és V_E a fenotípusos, a genetikai, illetve a környezeti variancia.

Az előző megközelítést figyelembe véve a fenotípusos variancia vizsgálatokor is elkülöníthetjük az additív, a dominancia és a környezeti komponenseket:

$$V_p = V_A + V_D + V_E$$

ahol V_A az additív, V_D a dominancia komponensek következtében kialakuló variancia.

Ha az egyenletet elosztjuk V_p -vel, akkor megkapjuk a fenotípusos varianciának azt a hányadát, amely az egyes komponensekre jut. Nevezetesen az additív genetikai variancia aránya a fenotípusos varianciához – a **heritabilitás** (h^2):

$$h^2 = \frac{V_A}{V_p}$$

A heritabilitás nagysága fontos az irányított szelekcióra adott válasz (vagyis egy szélsőséges fenotípusra történő szelekcióra való válasz) rátájának és mennyiségének meghatározásában. Értékét a növény- és állatnemesítők még a hozam vagy más tulajdonságok javítására irányuló szelekciós program megkezdése előtt megbecsülik.

A kvantitatív tulajdonságok sajátosságait megérthetjük, ha elválasztjuk egymástól a kialakulásukban szerepet játszó genetikai és környezeti hatásokat, valamint a genotípus-környezet kölcsönhatást. A szűkebb értelemben vett heritabilitás az additív genetikai variancia és a fenotípusos variancia hányadosa.

A GENETIKAI VARIANCIA ÉS AZ ÖRÖKÖLHETŐSÉG BECSLÉSE

A genetikai variancia és a heritabilitás becslésére több különböző megközelítés alkalmas. Néhány szervezetnél kísérletes manipulációval, nemesítéssel csökkenteni lehet, vagy akár ki is lehet küszöbölni a környezeti vagy a genetikai variancia komponenseit. Így meghatározható az egyik vagy a másik tényező szerepe a fenotípusos variancia kialakításában. Vagyis, ha $V_G=0$, akkor $V_p=V_E$, illetve ha $V_E=0$, akkor $V_p=V_G$. A genetikai variancia közel nulla, illetve nulla a beltenyésztett vonalak, klónok, az egypetéjű ikrek és az ugyanazon egyedeken végzett ismételt mérések esetében. A környezeti variancia közelítheti a nullát, ha az összes olyan alapvető tényező, mint például a tápanyag, a nedvesség, a hőmérséklet ismert és gondosan ellenőrzött.

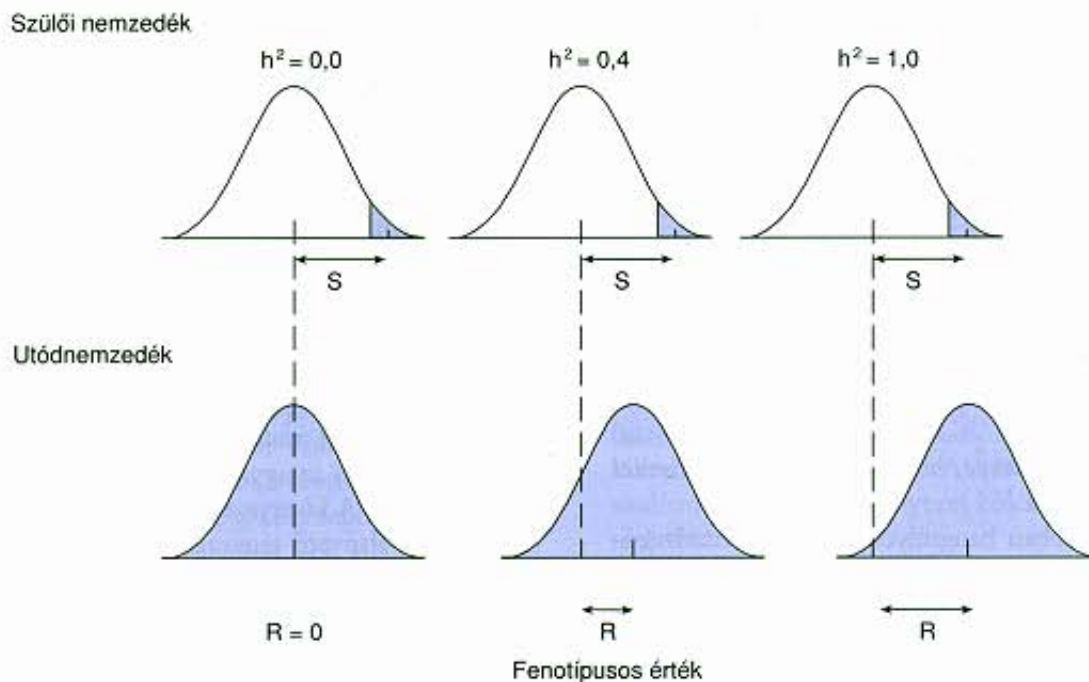
Az egypetéjű ikrek azonos genotípusúak, ezért ha bármilyen különbség van köztük, akkor az csak a környezeti tényezők hatása lehet. Valójában az együtt nevelkedő egypetéjű ikrek környezete is azonos, hasonlóan a genotípusukhoz. A hasonlóság mértékét megállapíthatjuk, ha a különböző bélyegekre meghatározzuk az egyedek közötti **korrelációt**. Ennek legmagasabb értéke 1,0, amikor is az összes egyedpár fenotípusos értéke azonos. Ha a bélyegek teljesen függetlenek, a korreláció 0,0. A 3.6. táblázat első oszlopa együtt nevelt egypetéjű ikrek négy tulajdonságának korrelációját (hasonlóságát) mutatja be. A második oszlop ugyanezen tulajdonságok korrelációját adja meg kétpetéjű, azonos nemű ikreknél. Az értékek közötti különbség a kétpetéjű ikrek kisebb fokú genetikai hasonlóságából ered, mivel náluk átlagosan csak a gének fele közös. A heritabilitást megbecsülhetjük az alábbi kifejezéssel:

$$h^2 = 2(r_M - r_D)$$

ahol r_M az egypetéjű, r_D a kétpetéjű ikrek korrelációja. Ezzel a képlettel a 3.6. táblázat négy tulajdonságának örökölhetősége 0,98 és 0,16 között változik. Vagyis az IQ és a szociális érettségi fok fenotípusos varianciájának legnagyobb része környezeti eredetű, míg az ujjlenyomat bőrléceinek varianciája genetikai.

3.6. táblázat. Négy jelleg korrelációja ikerpárokból

	Korrekcio		Heritabilitás
	Egypetéjű ikrek (r_M)	Kétpetéjű ikrek (r_D)	
Ujjlenyomat bőrlécei	0,96	0,47	0,98
Magasság	0,90	0,57	0,66
IQ	0,83	0,66	0,34
Szociális érettség	0,97	0,89	0,16



3.34. ábra. Különböző heritabilitási értéket mutató populációk fenotípusos átlagának változása. A szülői generációban az árnyékolt terület mutatja a szelektált szülőket. A szaggatott vonalak az összes szülő, a szelektált szülők és az utódok átlagértékeit jelzik

A szelekcióra adott válasz mértéke és mennyisége függ annak a bélyegnek az örökölhetőségétől, amire a szelekció irányul. Ez teljesen nyilvánvaló, ha $h^2=0$ vagy $h^2=1$. $h^2=0$ esetén a fenotípusos variancia nem az additív genetikai varianciából származik. Ennek eredménye, hogy még a szélsőséges szülői fenotípusokra történő szelekció sem változtatja meg a fenotípusos átlagot. Másrészt, ha a $h^2=1$, akkor a teljes fenotípusos variancia az additív genetikai varianciából ered, és a szélsőséges fenotípusok háttérében a genotípus áll. A szülők átlaga és az utódok átlaga közötti különbség a **szelekciós válasz (R)**:

$$R = h^2 S$$

ahol S a **szelekciós differenciál**, a szelektált szülők fenotípusos átlagának és az egész szülői populáció fenotípusos átlagának különbsége. Az egyenletből a heritabilitást kifejezve:

$$h^2 = \frac{R}{S}$$

Ezt a kifejezést **realizált heritabilitásként** is említik, mert a megfigyelt és az összes lehetséges válasz arányát adja meg.

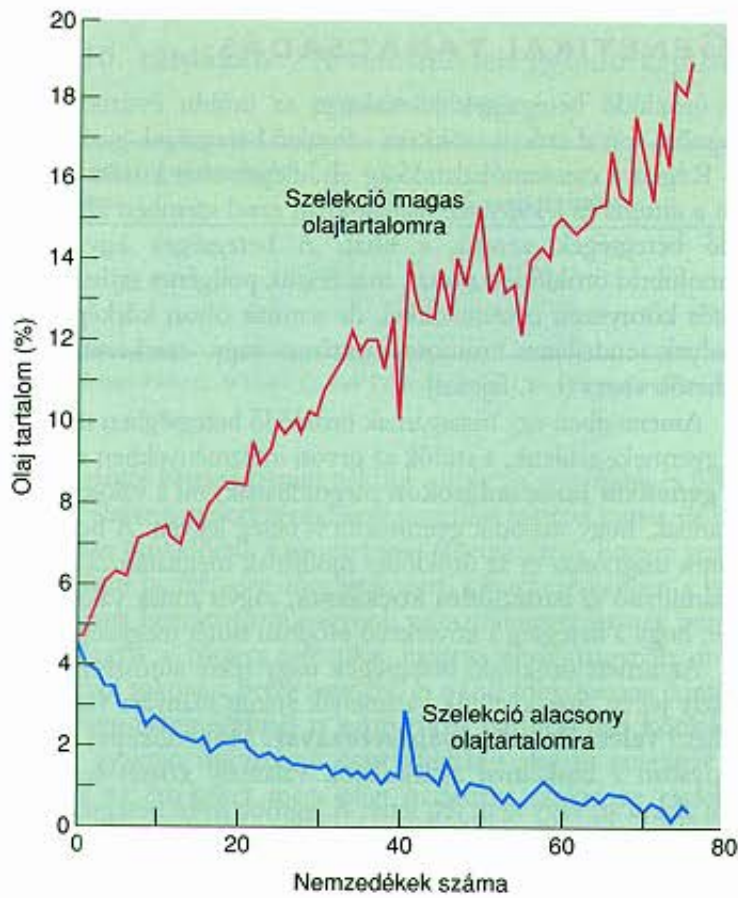
A hatás megértéséhez talán a legjobb út, ha megvizsgáljuk egy szelekciós generáció fenotípusos átlagának várható változását több, különböző heritabilitású tulajdonságnál (3.34. ábra). Figyeljük meg, hogy a szelektált egyedek szélsőséges fenotípusának ellenére (az ábra felső részén kézzel árnyékolt terület), alacsony heritabilitás esetén az utódok átlaga a szülőkéhez hasonló, tehát a válasz kicsi. Ha az örökölhetőség magas, akkor az utódok sokkal inkább hasonlítanak a szelektált szülőkhöz, mint valamennyi szülő eloszlásához.

Sok irányított (vagy mesterséges) szelekciós kísérlet mutat arra, hogy tíztől negyven generáción át figyelemmel

kísérve a fenotípusos értékek változását, az értékek sokszor még a kísérlet befejezése előtt elérik a maximumot. Mindez azt jelzi, hogy a szelekciós válasz több generáción át folytatható, ha kielégítő a kezdeti változatosság, megfelelő a populációméret és hatékony a szelekciós módszer. (Részletesebben lásd a 19. fejezetben.)

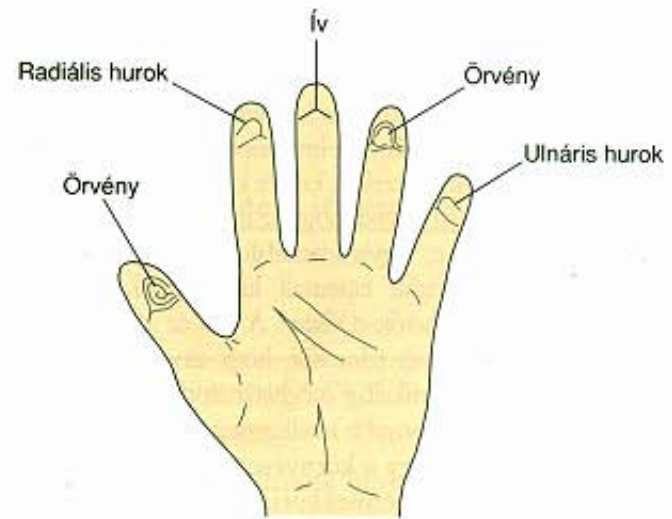
Az egyik leghosszabb szelekciós kísérlet még mindig folyik az Illinoisi Egyetemen, a kukorica fehérje- és olajtartalmára vonatkozóan. Hetvenhat generáció óta folyik irányított szelekció az alacsony és a magas fenotípusos értékekre, és még mindig van előrehaladás, annak ellenére, hogy nagy változásokat értek el a fehérje- és olajtartalomban. A 3.35. ábrán az alacsony, illetve a magas olajtartalomra szelektált vonalak adatai láthatók az első 76 generációban. A százalékos olajtartalom közel négyszeresére növekedett a magas értékre szelektált, és 1% alá csökkent az alacsony értékre szelektált vonalban.

A genetikai variancia és a heritabilitás becslésére használt megközelítések közül talán a legfontosabb a rokonok fenotípusos hasonlóságának vizsgálata. Amennyiben a genetikai tényezők fontosak, azt várhatjuk, vagy a magas fenotípusos értékekkel rendelkező szülők utódai magas, az alacsony értékekkel rendelkező szülők utódai pedig alacsony értékeket mutatnak. Nyilvánvaló, hogy a közeli rokonok több génben egyeznek egymással, mint a rokonságban nem állók vagy a távoli rokonok, ezért fenotípusos hasonlóságuk várhatóan ugyancsak nagyobb. Az egypetűjű ikreknek minden génjük azonos, míg a testvérek génjeinek átlagosan fele, az első unokatestvérek génjeinek mintegy $\frac{1}{8}$ része azonos. Emiatt a közeli rokonok fenotípusos bélyegei között sokkal nagyobb a korreláció, mint távoli rokonok esetében. E megközelítés alapján adja meg a 3.7. táblázat egy sor tulajdonság becslött heritabilitási értékeit különböző szervezeteknél.



3.35. ábra. A magas és az alacsony olajtartalom (%) alakulása egy hosszú időtartamú szelekciós kísérletben

Forrás: Iowa State University Press, Ames, IA, engedélyével



(a)



(b)

(c)



(d)

(e)

3.36. ábra. Az ujjlenyomatok helyzete a kézen (a) és a bőrlécek három alaptípusa: (b) ív; (c) örvény; (d) hurok; (e) ezek kombinációja

3.7. táblázat. Különböző bélyegek örökölhetőségének közelítő értékei öt élőlényben

Élőlény	Jelleg	Heritabilitás
Sertés	Hátszalonna vastagsága	0,55
	Testtömeg	0,3
	Alommagyság	0,15
Baromfi	Tojástömeg	0,6
	Testtömeg	0,2
	Életképesség	0,1
Egér	Farokhossz	0,6
	Testtömeg	0,35
	Alomméret	0,15
<i>Drosophila melanogaster</i>	Kitinszerték száma	0,5
	Testtömeg	0,4
	Peteszám	0,2
Kukorica	Növénymagasság	0,7
	Terméshozam	0,25
	Csőhossz	0,17

Forrás: D. S. Falconer, *Introduction to Quantitative Genetics*, Ronald Press, New York

Az ujjlenyomatokat gyakran használják azonosítási célokra, mivel minden személy ujjlenyomata egyedi. Az ujjlenyomatok elemzésének általános menete a bőrlécek számának meghatározása az ujjbegyeken. A bőrléceknek három alapvető típusuk van: az ív, a hurok és az örvény (3.36. ábra). Az ujjlenyomat redőinek száma és típusa csaknem teljesen genetikailag meghatározott, a környezetnek csekély hatása van a jellegre (3.6. táblázat).

AZ EMBERI RASSZOK ÉS AZ INTELLIGENCIA

A XIX. század végén néhány brit tudós kifejtette, hogy az „alsóbb” néposztályok nagy szaporodási aránya a brit populáció átlagos intelligenciaszintjének csökkenéséhez vezet. A kérdés körül kibontakozó vita alapvető kérdése lényegében az volt, hogy az intelligencia veleszületett vagy szerzett tulajdonság-e, vagyis a társadalmi osztályok tagjainak intellektuális teljesítménye között tapasztalt különbségek genetikai vagy környezeti okokra vezethetők-e vissza? A vita az 1960-as évek végén újra feléledt, amikor ismét felmerült, hogy az emberi rasszok IQ-értékei közti eltérések genetikailag meghatározottak, különös tekintettel az afroamerikaiak alacsonyabb intelligenciaszintjére.

Sok kutató felvetette, hogy a környezeti tényezők, például a táplálkozás (születés előtti, gyermekkori, a vizsgálat ideje alatti), a szülők társadalmi-gazdasági helyzete, a nevelési és a vizsgálati körülmények lényeges hatással vannak az IQ-ra. A fekete és fehér bőrűek IQ-jának összehasonlításakor fontos, hogy ezek a csoportok nemcsak etnikailag különböznek, de nevelésük, oktatásuk, társadalmi-gazdasági helyzetük is eltérő. A szociális tényezők hatásának kiderítésére kézenfekvő, ha összehasonlítjuk az azonos kategóriába tartozó fehérek és feketék adatait.

A 3.8. táblázat felső, illetve alsó társadalmi rétegből származó, hétéves, afroamerikai és fehér bőrű amerikai gyerekek IQ-értékeit tartalmazza. Figyelemre méltó, hogy a felső rétegből származók mindkét csoportnál magasabb értékkel szerepelnek, mint az alsóbb rétegekből származók, ami azt jelzi, hogy a társadalmi-gazdasági háttér lényegesen befolyásolja az intelligenciaszintet. Az azonos társadalmi-gazdasági háttérrel rendelkező, de különböző rasszokba tartozó gyerekek IQ-ja között igen csekély, mindössze 4,2, pont illetve 4,1 pont az eltérés. A különbségek sokkal kisebbek a standard eltérésnél, vagyis a két csoport között a különbség nem szignifikáns, a fehérek és a feketék közötti eltérés nagyrészt az eltérő társadalmi-gazdasági helyzetből adódik.

A genetikai variancia az egyetértő ikrek vizsgálatával becsülhető. A realizált örökölhetőséget a szelekcióra adott válasz nagyságából ítélni lehet meg. Az intelligenciát számos környezeti tényező befolyásolja, az emberi rasszok IQ-értékeinek különbségei általában a környezeti eltérésekre vezethetők vissza.

3.8. táblázat. A társadalmi-gazdasági háttér hatása az IQ-értékekre

Társadalmi-gazdasági háttér	Amerikai feketék	Amerikai fehérek
Magas	100,0 (12,6)*	104,2 (13,4)
Alacsony	91,2 (12,1)	95,3 (12,9)

* A zárójelben lévő számok a standard eltérést jelölik

GENETIKAI TANÁCSADÁS

Az öröklődő betegségek jelentősége az utóbbi évtizedekben megnőtt, mivel erősen csökkent a fertőző betegségek gyakorisága. Régen a csecsemőhalandóság elsődleges okai között szerepelt a diftéria és a kanyaró, napjainkban ezzel szemben az öröklődő betegségek vezetnek a listát. A betegségek egy része monohibrid öröklődést mutat, más részük poligénes sajátság, jelentős környezeti összetevőkkel, de vannak olyan kórképek is, amelyek rendellenes kromoszómaszámra vagy -szerkezetre vezethetők vissza (l. 4. fejezet).

Amennyiben egy házaspárnak öröklődő betegségben szenvedő gyermeke születik, a szülők az orvosi intézményekben működő **genetikai tanácsadásokon** megtudhatják, mi a valószínűsége annak, hogy második gyermekük is beteg legyen. A betegség pontos diagnózisa és az öröklődés módjának meghatározása után kiszámítható az **ismétlődés kockázata**, vagyis annak valószínűsége, hogy a betegség a következő utódban ismét megjelenik.

Az ismert öröklődő betegségek nagy része autoszómás recesszív jellegű. Sok közülük valamelyik enzim hiányára visszavezethető **veleszületett anyagcsere zavar**. Működőképes enzim hiányában a biokémiai átalakulások valamely köztes terméke nem alakul át, vagy nem jön létre. A legtöbb ilyen betegség igen ritka, 10 000 ember közül átlagosan csak egy-egy személynél fordul elő. De mivel sok öröklődő rendellenesség van, halmozódó gyakoriságuk alapvető probléma.

Egy öröklődő betegség fellépésének valószínűsége egy gyermeknél attól függ, hogy szülei vagy más rokonai érintettek-e, és született-e már beteg testvére. A 3.9. táblázatból kiolvasható, mekkora a kockázati értéke annak, hogy recesszív öröklésmenetű betegség esetén olyan szülőknél, akiknek már egy gyermekük betegen született, ismét beteg gyermekük szülessen.

A genetikai tanácsadás abban az esetben is hasznos, amikor egy házaspár nagyon szeretne gyermeket, de esély van rá, hogy gyermekük valamilyen betegséget örököl. Ha mindkét szülőről tudott, hogy egy recesszív betegség allélját hordozzák (a heterozigótia kimutatható a sarlósejtes vérszegénység, a Tay-Sachs-szindróma és más jellegek esetében is), annak valószínűsége, hogy N számú testvér közül egyik sem lesz beteg: $(\frac{1}{2})^N$. Kis létszámú, egy- vagy kétgyermekes családnál ez 0,75, illetve 0,5625, és ezt a kockázatot, néhányan elfogadhatónak tartják.

3.9. táblázat. Autoszómás recesszív jelleg megjelenésének valószínűsége a születendő gyermekén¹

Szülők	Második gyermek érintettsége
Egyik sem érintett	$\frac{1}{4}$
Egyik érintett	$\frac{1}{2}$
Egyik sem érintett, egyiknek érintett gyermeke van	$\frac{1}{4}$
Mindkettő érintett	1

¹ Feltéve, hogy egy érintett gyermekük már van

3.10. táblázat. A veleszületett gyomorkapu-szűkület empirikus kockázati értékei egy angol populációban

Érintett gyermekek száma	Egyik szülő sem érintett	Apa érintett	Anya érintett	Mindkét szülő érintett
0	0,003	0,037	0,051	0,298
1	0,030	0,115	0,135	0,365
2	0,119	0,216	0,231	0,431

Forrás: Bonatti-Pellie C. és Smith C.: *Risk Tables for Genetic Counseling in Some Common Congenital Malformations* J. Med. Genet. 11:374–376. 1974.

Számos betegség, mint például a diabetes, a nyúlszáj és farkastorok, illetve a nyitott gerinc, erős genetikai hátteret mutat, de nem egygénis öröklődésű. Ezek esetében feltételezhető, hogy a genetikai hajlam poligénesen meghatározott, következésképpen a betegek közeli hozzátartozói nagyobb valószínűséggel lesznek érintettek. Vagyis a páciens genetikai hajlama annál nagyobb, minél közelebbi rokona a beteg személy, és minél több rokona érintett.

Ilyen betegségeknel az **empirikus ismétlődési kockázatok** gyakran nagyszámú esettanulmány alapján számítják ki. Ezeket az értékeket meg lehet határozni azokra az esetekre, amelyekben mindkét szülő, az egyik szülő, az egyik testvér stb. érintett. Az empirikus kockázat csak irányadó lehet, mivel a szóban forgó családoknál a speciális genetikai és környezeti adottságok növelhetik, de csökkenthetik is a kockázatot.

A gyomorkapu-szűkület (*stenosis pylori*) olyan veleszületett rendellenesség, amelyben a gyomor és a vékonybél közötti záróizom nem nyílik tökéletesen. Korrekciós műtéteket az 1920-as évek óta végeznek, ezt megelőzően az érintettek csecsemőkorban meghaltak, mert vékonybelükbe nem jutott elegendő táplálék. A műtét után a betegek bélrendszere normálisan működik. A betegség kockázati értékeit a 3.10. táblázat tartalmazza, a szülők és a testvérek érintettségének függvényében. A kockázat, ahogyan azt várni lehet, az érintett testvérek és szülők számával együtt nő. Beteg hozzátartozó híján a kockázat csak 0,3%, két beteg testvér és két beteg szülő esetén a kockázat meghaladja a 40%-ot.

A genetikai tanácsadás során meghatározzák a genetikailag sérült gyermek születésének kockázatát. Az egygénis tulajdonságok előrejelzésére a mendeli öröklődés valószínűségi értékeit, a poligénis tulajdonságokra pedig az empirikus kockázati értékeket alkalmazzák.

AZ APASÁG KIZÁRÁSA

Amikor egy gyermek apja ismeretlen vagy vitatott, az apaság valószínűségének meghatározására jól használhatók a vércsoportok, különböző enzimek, illetve a HLA-típusok. Ezeket az ada-

tokat az Egyesült Államok bíróságain régebben csak akkor fogadták el, ha azok egy személy apaságát kizárták. Napjainkban, a pontosabb genetikai analíziseknek köszönhetően a bíróságok elfogadják azokat az adatokat is, amelyek az apaság valószínűségi fokára vonatkoznak.

Ha egy lokuszra csak néhány allélja van a populációban, akkor nehéz valakit kizárni az apaságból, hiszen sok személy hordozza ugyanazokat az allélokat, így mindegyik lehetne a gyermek apja. A 3.11. táblázat az anya-gyermek genotípus kombinációkat és a kizárható apai genotípusokat tartalmazza az MN-vércsoport lokuszára. Az anya és a gyermek genotípusának ismeretében bizonyos genotípusok kizárhatók a lehetséges apák közül. Ha az anya és a gyermek is $L^M L^M$, az apa vagy $L^M L^M$ vagy $L^M L^N$ lehet, és csak az $L^N L^N$ genotípusúak nem jöhetnek szóba. Figyeljük meg, hogy legtöbbször csak egy genotípus zárható ki, sőt, ha az anya és a gyermek is heterozigóta, akkor egyik sem.

Még sok vizsgált lokusz esetében sem olyan nagy a kizárás valószínűsége, mint azt gondolnánk. A HLA **haplotípusok** (különböző gének összes HLA-allélja egy kromoszómán) és a DNS-markerek – mindkét esetben sok allél lehet egy lokuszra – felhasználása oldhatja meg a problémát. A 3.37. ábra az anya, a gyermek és a két lehetséges apa HLA-haplotípusát mutatja. Az A1 B17 haplotípus például a bal oldalon feltüntetett feltételezett apa egyik kromoszómáján van. (Ezek a haplotípusok generációról generációra megmaradnak, mert a HLA-gének nagyon kö-

3.11. táblázat. Kizárható apai genotípusok, a gyermek és anya genotípusának ismeretében

Anya	Gyermek	Kizárható apai genotípus
$L^M L^M$	$L^M L^M$	$L^N L^N$
	$L^M L^N$	$L^M L^M$
$L^M L^N$	$L^M L^M$	$L^N L^N$
	$L^M L^N$	–
	$L^N L^N$	$L^M L^M$
$L^N L^N$	$L^M L^N$	$L^N L^N$
	$L^N L^N$	$L^M L^M$

3.1. A nagyszülőség kizárása

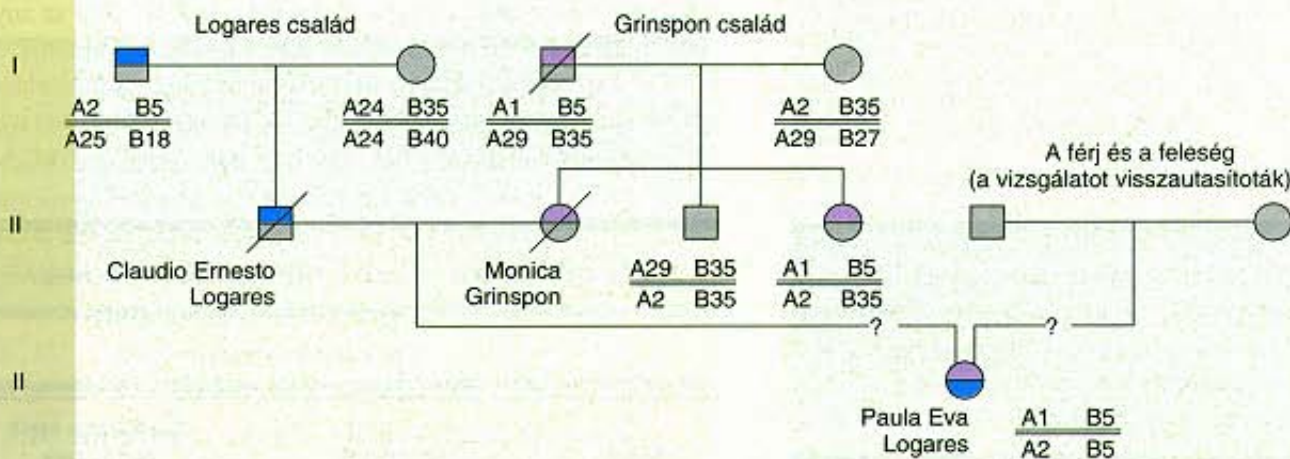
A genetikai információkat hosszú időn át csak a szülők azonosítására használták. A közelmúltban a vizsgálatokat kiterjesztették a nagyszülőkre és más rokonokra is. Nagy lendületet adott a munkának mintegy 9000 argentin ember eltűnése 1975 és 1983 között. Az eltűntek között nagyon sok gyermek volt, akiket a katonaság vagy a csendőrség hurcolt el, vagy akiket elrabolt és fogságban tartott asszonyok szültek. Lilitana Pereyra (M3.1. ábra) akkor került fogságba, amikor öt hónapos terhes volt, és életben hagyták, amíg 1978 februárjában meg nem szülte fiát. Gyermekeinek nem bukkantak a nyomára, valószínűleg a hadsereg hurcolta el.

Úgy tűnik, hogy sok argentin gyermek él olyan házaspárokkal, akik azt állítják, hogy a gyermekek valódi szülei, de az is lehet, hogy gyermekrablók. Ha mind a négy nagyszülő él, és ha a gyermeknek van egy olyan allélja, amelyik egyikükben sem található meg, akkor a nagyszülőség kizárható. De amennyiben a gyermek alléljai a nagyszülőkben is megtalálhatók, a nagyszülőség valószínűsége meghatározható. Ha a kérdéses allél ritka a populációban, a nagyszülőség valószínűsége meglehetősen magas.

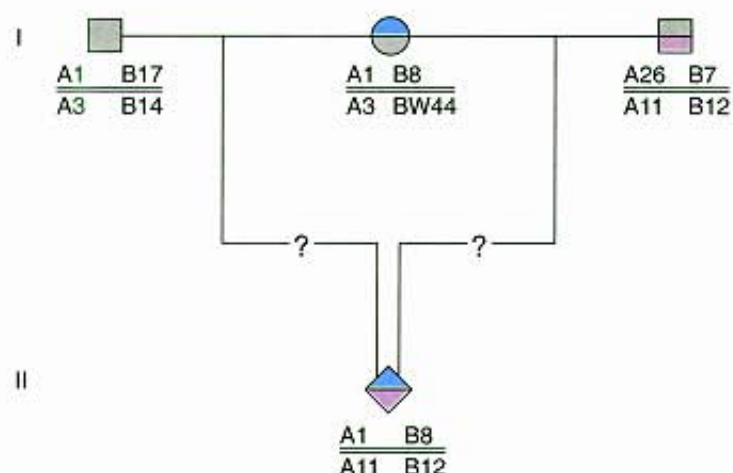
Az M3.2. ábrán egy olyan családfa látható, amelyben a gyermek HLA-típusát megtalálták a feltételezett nagyszülőkben. Az egyik elrabolt gyermekáldozatot, Paula Eva Logarest egy csendőr és felesége nevelte fel. A lány A2 B5 HLA-haplotípusát megtalálták apai nagyapjában. Az anyai nagyapa rekonstruált genotípusa (egy másik gyermekéből) tartalmazta Paula másik, A1 B5 haplotípusát. Nagyon valószínű, hogy ezek a haplotípusok az elhunyt szülőktől származtak. Ezeknek az adatoknak a birtokában 99,9%-os biztonsággal állítható, hogy Paula a Logares és a Grinspon család unokája.



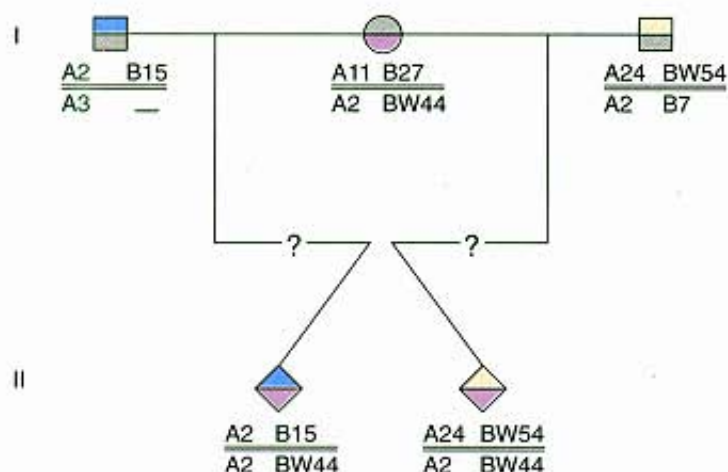
M3.1. ábra. Lilitana Pereyra, az egyik elhurcolt argentin áldozat
Forrás: Dr. Jared M. Diamond. *Nature* 327:552, 1987
Macmillan Magazines Limited



M3.2. ábra. Családfa, amely azt szemlélteti, hogyan lehet azonosítani a feltételezett nagyszülőket néhány személy HLA-haplotípusának ismeretében. Az áthúzással jelölt személyek már nem élnek



3.37. ábra. Egy anyának, gyermekének, és a két feltételezett apának HLA-haplotípusai és -genotípusai



3.38. ábra. Egy anyának, kétpetéjű ikreinek és a két feltételezett apának HLA-haplotípusai és -genotípusai

zel vannak egymáshoz a kromoszómán, vagyis szorosan kapcsolatosak (l. 5. fejezet). A haplotípusokból nyilvánvaló, hogy az anya A1 B8 gamétát termelt, az apa pedig A11 B12 genotípusú.

Ennek alapján a bal oldalon feltüntetett férfi apasága kizárható, a jobb oldalié nem. Ha nincs más férfi, aki apaként szóba jöhet, akkor valószínűleg a II. férfi a gyermek apja, de teljes bizonyossággal ez nem állítható.

Egy megtörtént eset is jól szemlélteti a HLA-rendszer alkalmazhatóságát. Egy apasági keresetben két különböző férfit azonosítottak egy kétpetéjű ikerpár nemzőiként. A genotípusokat a 3.38. ábra foglalja össze. Az ikrek anyjuktól mindkettőn A2 BW44 genotípusú gamétát kaptak, így az egyik testvér az I. férfitől A2 B15, a másik testvér a II. férfitől A24 BW54 genotípusú gamétát kapott. Ebben az esetben az AB0-vércsoportok nem segítettek a helyzet tisztázásán, mert minden személy A-vércsoportú volt.

A közelmúltban fejlesztették ki az ún. **DNS-fingerprint** („ujjlenyomat”) módszert, amely ugyancsak lehetővé teszi az egyéni azonosítást, a származási rokoni kapcsolatok felderítését, a sokallélos lokuszok azonosítását. A módszer részleteit és molekuláris alapjait a 15. fejezetben tárgyaljuk.

Az apaság kizárhatóságát a genetikai változatok alapján vizsgálják, akkor, ha egy gyermek apja ismeretlen. Rendszerint a vércsoportokat és a HLA-allélokot elemzik, de újabban a bevezették a DNS-fingerprint technikát is.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Egy házaspárnak négy gyermeke van. Az anya A, az apa B, a gyermekek pedig A, B, AB és 0 vércsoportúak. Milyen lehet a szülők genotípusa?

MEGOLDÁS

Ha a gyermekek vércsoportját nem ismerjük, az anya $I^A I^A$ vagy $I^A I^0$, az apa $I^B I^B$ vagy $I^B I^0$ genotípusú lehetne. Ebből négyféle eset adódik, a következő fenotípusmegoszlásokkal:

Anya	Apa	Gyermekek
$I^A I^A$	$I^B I^B$	mindegyik AB
$I^A I^A$	$I^B I^0$	$\frac{1}{2}$ AB, $\frac{1}{2}$ A
$I^A I^0$	$I^B I^B$	$\frac{1}{2}$ AB, $\frac{1}{2}$ B
$I^A I^0$	$I^B I^0$	$\frac{1}{4}$ AB, $\frac{1}{4}$ A, $\frac{1}{4}$ B, $\frac{1}{4}$ 0

Vagyis, csak akkor születhet négyféle fenotípusú gyermek, ha az anya $I^A I^0$, az apa $I^B I^0$ genotípusú.

2. FELADAT

A 3.21. ábrán egy olyan betegség öröklődése látható, amelyet két különböző gén is kialakíthat. Ilyen például a süketnémaság, amelynek háttérben két gén recesszív alléljai is állhatnak. Tételezzük fel, hogy a II-3 (süket) és az I-3 személyhez hasonló genotípusú párnak gyermeke születik. Milyen genotípusú utódok várhatók ebből a kapcsolatból, és mi a valószínűsége annak, hogy a gyermek süket lesz?

A család III-1 és III-2 tagjai ép hallásúak, de szüleik süketek voltak. Milyen arányban várhatók normális hallású utódok a hasonló genotípusú személyek házasságából?

MEGOLDÁS

A II-3 és I-3 személyekhez hasonló genotípusú szülők utódai fele-fele arányban $Aa Bb$, illetve $Aa Bb$ genotípusúak és ép hallásúak.

Az arány kétféleképpen is meghatározható. (1) az $Aa Bb$ genotípusú személyek házasságából származók $\frac{1}{16}$ -a $A- bb$, $\frac{1}{16}$ -a $aa B-$, $\frac{1}{16}$ -a $aa bb$ genotípusú. Az ilyen genotípusú gyermekek süketek, mivel homozigóta recesszívek az egyik vagy mindkét génre. Így az utódoknak $1-\frac{1}{16}$, vagyis $\frac{15}{16}$ része ép hallású. (2) Az utódoknak várhatóan $\frac{1}{16}$ része $A-B-$ genotípusú, tehát ép hallású. Ebből következik, hogy gyermekeik várhatóan $\frac{1}{16}$ arányban lesznek süketek.

3. FELADAT

Számos tulajdonságot sok gén határoz meg, jellemzésükre egyetlen mód van, ha megbecsüljük a fenotípusos varianciának azt a hányadát, amely genetikai eredetű. Ha egy ilyen kvantitatív tulajdonságra, például a kukorica terméshozamára, úgy szelektálunk, hogy a szelekciós válasz 1,4 g/növény, a szelekciós eltérés pedig 3,1 g/növény, mekkora lehet a becsült örökölhetőség? Mit gondol, a következő generációkban végzett szelekció eredményes lehet-e a terméshozam további növelésében?

MEGOLDÁS

A heritabilitás értéke: $h^2 = \frac{R}{S} = \frac{1,4}{3,1} = 0,45$. Minthogy a fenotípusos varianciának csaknem fele genetikai eredetű, várható, hogy a további generációkban végzett szelekció szignifikánsan növeli a terméshozamot.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dominanciának több fajtája van: (1) teljes dominancia esetén az egyik allél elnyomja a másik fenotípusos megnyilvánulását, a mutáns és a vad típusú allél egyaránt lehet domináns; (2) inkomplett vagy részleges dominancia esetén a heterozigóták fenotípusa átmenetet mutat a homozigótáké között, a jelleg intermedier; (3) kodominancia esetén a heterozigótákban a gén mindkét alléja egyformán megnyilvánul.

Mendel eredeti megállapításaihoz képest sokféle változatot fedeztek fel. A gének között vannak letális hatásúak. Pleiotrópia esetén egy gén több tulajdonság kialakításában is részt vesz. Vannak olyan genotípusok, amelyek nem mindig ugyanazt a fenotípust mutatják. A jelenség hátterében a genotípus változó expresszivitása vagy inkomplett penetranciája áll. Egy génnek kettőnél több alléja is lehet, ez a jelenség a multiplex allézia. Diploid szervezetekben multiplex allézia esetén nagyszámú különböző genotípus alakulhat ki. Az X-és az Y-kromoszómán található gének az autoszómás génekétől eltérő öröklésmenetet mutatnak. Az X-hez kapcsolt recesszív bélyegek gyakorisága jóval nagyobb a hím-, mint a nőivarú egyedekben, és a családfákban általában generációkat ugranak át.

Egy tulajdonság kialakításában egynél több gén is részt vehet. Amikor két gén egymással kölcsönhatásban határozza meg a fenotípust, *episztázisról* beszélünk. Az episztatikus kölcsönhatás következtében az F_2 -ben a 9:3:3:1-es hasadási aránytól eltérő megoszlás is kialakulhat. A genotípus és a fenotípus viszonya sokszor meglehetősen összetett. A kapcsolat kvantitatívá tételének egyik módja a különböző környezetben tapasztalt reakciónorma meghatározása. A mennyiségi jellegeket sok gén határozza meg, kialakulásukat befolyásolja a környezet is. A poligénes tulajdonságok eloszlása egy populációban általában folyamatos, de diszkrét

osztályokat is alkothat (beteg-nem beteg; fiziológiai paraméterek határértékei alapján meghatározott kategóriák stb.).

A kvantitatív tulajdonságokat értelmezhetjük, ha genetikai, környezeti és genotípus-környezeti hátterüket meghatározzuk. A szűkebb értelemben vett örökölhetőség (heritabilitás) az genetikai variancia és a fenotípusos variancia aránya. A genetikai variancia hatása jól vizsgálható az egypetűjű ikrek tulajdonságainak elemzésével. A realizált örökölhetőséget a szelekcióra kapott válasz meghatározásával becsülhetjük meg. Az intelligenciát egy sor környezeti tényező befolyásolja, az emberi rasszok között az IQ-ban kimutatható eltérések környezeti különbségekre vezethetők vissza.

A genetikai tanácsadás során meghatározzák az örökletes ártalomban szenvedő gyermek születésének valószínűségét. Egygénes tulajdonságok esetén a mendeli öröklődés hasadási arányai adnak útmutatást, míg a kvantitatív tulajdonságokra az empirikus kockázati értékek az irányadók. Az apasági keresetekben a genetikai változatokat alapul véve próbálják azonosítani a gyermek apját. Az elemzés általában a vércsoportok és a HLA alléljainak elemzésével, újabban a DNS-fingerprint módszerrel történik.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. A Mendel által vizsgált hét tulajdonság mindegyikében teljes dominancia érvényesült. Ez a tény döntő fontosságú volt abból a szempontból, hogy egyszerűbbé tette az öröklődés alapjainak tisztázását. Ma már tudjuk, hogy számos tulajdonság esetén a dominancia nem teljes. Milyen dominanciátípusokat ismerünk? Mondjon példát mindegyikre!
2. Mit jelent a penetrancia és az expresszivitás? Mondjon példát mindkettőre, és fejtse ki részletesen jellemzőiket, hogy bebizonyítsa, tisztában van a két fogalom közötti különbséggel!
3. (a) Egy génnek három alléja van. Hányféle genotípusú lehet egy diploid szervezet erre a génre nézve? (b) Egy másik lokuszon öt allél ismert. Hány homozigóta és hány heterozigóta genotípus lehetséges?
4. (a) Mi a különbség a nemhez kapcsolt, a nemre korlátozódó és a nem által befolyásolt tulajdonságok között? (b) Hogyan határozhatjuk meg, hogy egy bélyeg nemhez kapcsolt vagy nemre korlátozódó?
5. Ha Mendel poligénes tulajdonságokat vizsgált volna kísérleteiben, milyen eredményeket kapott volna az F_2 generációban?
6. A virágszín öröklésmenetének tisztázására két rózsaszín csodatólcsért kereszteztek. Az utódok közül 42 növény piros, 86 rózsaszín, 39 pedig fehér virágú volt. Khi-négyszet próbával határozza meg, megfelelnek-e a számok a Mendel-szabályoknak?
7. Olyan családok adatainak összesítéséből, ahol az egyik szülő vércsoportja N, a másiké MN volt, a gyermekek között

- 84 MN-vércsoportút, 91 N-vércsoportút találtak. Megfelel-e ez a várható értékeknek? (Khi-négyzet próbával igazolja állítását.)
- Írja fel az összes lehetséges keresztezési típust az AB0-vércsoport-rendszerben. (Négy fenotípus esetén tíz különböző keresztezés lehet, feltéve, hogy a reciprok keresztezések egyenértékűek.) Adja meg, milyen fenotípusú utódok és milyen arányban várhatók A- és B-vércsoportú egyének házasságából!
 - Az egerek domináns S génjének öröklésmentét tisztázandó, két heterozigóta sárga egeret kereszteztek, és 56 sárga, valamint 31 vad fenotípusú utódot kaptak. Khi-négyzet próbával állapítsa meg, megfelel-e a 3:1-es mendeli hasadásnak ez az arány! Statisztikailag egyeznek-e az adatok a Cuénot-féle letális modellel?
 - (a) Két Man-szigeti macska keresztezéséből (minden Man-szigeti egyed genotípusa Mm) az utódok hányadrésze lesz farkatlan? (b) Normál farkú nőtény és Man-szigeti kandúr keresztezéséből a kölykök hányadrésze lesz várhatóan farka?
 - Sok kutató szerint a legtöbb gén pleiotróp, több jelleget befolyásol. Ha ön felfedezne egy új öröklődő betegséget, hogyan bizonyítaná annak pleiotróp hatásait?
 - (a) Részletesen magyarázza el a különbséget egy tulajdonság penetranciája és expresszivitása között. (b) Vázoljon fel egy – a Huntington-kór öröklődéséhez hasonló – családfát, amely szemlélteti a jelleg változó expresszivitását. A családfa legalább egy nagyszülőpárból, három gyermekből és öt unokából álljon. A domináns allélt jelölje H -val, a recesszívét pedig h -val. Adja meg az egyes generációk tagjainak geno- és fenotípusát is!
 - (a) Fogalmazzon meg, hogyan igazolná a környezeti tényezők – például a hőmérséklet, a táplálék összetétele – szerepét a *Drosophila* egy recesszív mutációjának expresszivitására! (b) Hogyan mutatná be a módosító gének hatását ugyanerre a mutációra?
 - Az AB0-vércsoportrendszerben elméletileg melyik vércsoport az általános donor, és melyik az általános recipiens? Indokolja a választ!
 - Egy világos alapszínű nőtény szürke nyírfaaraszolót (*Biston betularia*) sötét, ún. melanisztikus himmel kereszteztünk. Az utódok fele melanisztikus, fele pedig pettyezett (*insularia*) fenotípusú lett. Milyen lehetett a szülők genotípusa?
 - (a) B_2B_4 és B_1B_3 genotípusú növények keresztezéséből milyen utódok várhatók, és milyen eloszlásban? (b) Ugyanezt a gént vizsgálva egy keresztezés utódnemzedékében egyenlő számban kaptak B_1B_3 és B_2B_4 egyedeket, más utód a keresztezésből nem származott. Mi volt a szülők genotípusa?
 - Egy A-vércsoportú asszony férje B-, fia pedig 0-vércsoportú. Írja fel a három személy lehetséges genotípusát! Mi a valószínűsége annak, hogy a házaspár második gyermeke is 0-vércsoportú legyen? Mi a valószínűsége AB-vércsoportú gyermek születésének?
 - Egy színvak férfinak és egy normális látású asszonynak van egy színvak lánya. Milyen lehet a szülők és a gyermek genotípusa?
 - Ilyen szülők fiai között milyen arányban várhatók normális színlátásúak?
 - A 3.17. ábra családfája egy X-hez kötött domináns jelleg öröklésmentét mutatja. Ha a III-3 és a II-6 személynek gyermeke születik, milyen arányban várható a következő négy kategória megjelenése: egészséges fiú, beteg fiú, egészséges lány és beteg lány?
 - (a) Milyen F_1 utódok várhatók a fehér szemszín alléljára homozigóta (ww) *Drosophila* nőtény és piros szemű hím (w^+Y) keresztezéséből? (Adja meg a különböző ivarok feno- és genotípusait is!) (b) Az F_1 hímek és nőtények keresztezéséből az F_2 -ben 40 fehér szemű nőtény, 42 piros szemű nőtény, 39 fehér szemű hím és 44 piros szemű hím származott. Khi-négyzet próbával határozza meg, hogy ez az arány megfelel-e az X-hez kötött tulajdonságokra várható értékeknek!
 - A villás elágazás módszerével számítsa ki az öt fenotípus osztály arányait két rózsaszín szemtermésű, $A_1A_2B_1B_2$ genotípusú búza utódnemzedékében. (A 3.29. ábrán talál információt a keresztezésről és egy más módszerrel meghatározott arányokról.)
 - Tételezzük fel, hogy búza szemtermésének színét három gén szabja meg, és $A_1A_2B_1B_2C_1C_2$ genotípusú F_1 növényeink vannak. (a) Villás elágazás módszerével határozza meg milyen genotípus eloszlás várható az F_2 -ben? (b) Tegyük fel, hogy a C gén a többivel azonos mértékben vesz részt a szín kialakításában, és az F_2 egyedei hét kategóriába sorolhatók: 0 (nincs „2”-es allélja, azaz $A_1A_1B_1B_1C_1C_1$), 1 (egy „2”-es allélja van, azaz $A_1A_2B_1B_1C_1C_1$ vagy $A_1A_1B_1B_2C_1C_1$ vagy $A_1A_2B_1B_2C_1C_1$); ... 6 (nincs „1”-es allélja, azaz $A_2A_2B_2B_2C_2C_2$). Ábrázolja grafikusán a hét fenotípus kategóriát, úgy, hogy a vízszintes tengelyen egymástól egyenlő távolságra jelölje be a hét kategóriát (0,1,2, ..., 6), a függőleges tengelyen pedig tüntesse fel gyakoriságukat. (c) Hasonlítsa össze az így kapott görbét az egygénés, illetve a kétgénés eloszlásokkal!
 - Mi a különbség a dominancia és az episztázis között? Miért nem mutatott egyik Mendel által vizsgált tulajdonság sem episztázist?
 - Bateson és Punnett 382 lila virágú és 269 fehér virágú szagosbükkönyt figyelt meg egy keresztezés F_2 nemzedékében. Megfelelnek-e ezek a számok az általuk feltételezett 9:7-es hasadási aránynak? Khi-négyzet próbával döntse el!
 - A 24. feladatban szereplő lila virágú F_1 növényt az egyik szülői típussal keresztezzük. Milyen arányban várhatók fehér virágúak az utódok között?
 - Tételezzük fel, hogy egy beltenyészített albinó egértörzset, amelynek genotípusa $BB\alpha$, kereszteztünk egy barna színű, $bb\ CC$ genotípusúval. (a) Milyen az F_1 egyedek geno- és fenotípusa? (b) Milyen geno- és fenotípus arányok várhatók két F_1 egér keresztezésével kapott F_2 nemzedékben?
 - Az episztázis két lehetséges típusa a kettős génhatás és a komplementer génhatás. Hogyan tudná elkülöníteni,

- melyik szerepel a szagosbükkyön lila és fehér virágszínének kialakításában, ha bármilyen keresztezést elvégezhetne?
28. Ábrázolja grafikonon, hogyan befolyásolja a hőmérséklet a növények magasságát. Ehhez feltételezzük, hogy a hőmérséklet egyformán hat az alacsony és a magas termetű genotípusokra, és a hőmérséklet emelkedésével a növények magassága is nő. Ezután tegyük fel, hogy a túlzottan magas hőmérséklet gátolja a magas genotípusú növények növekedését, így az ilyen genotípusú egyedek kisebbek lesznek alacsony genotípusú fajtársaiknál. Rajzolja fel erre az esetre a két genotípus reakciónormáját!
29. Hasonlítsa össze a következő két fogalmat: poligénes tulajdonságok, kvantitatív tulajdonságok. Az olyan bélyegek, amelyeknek két fenotípus kategóriájuk létezik – például egészséges és beteg – egyénes vagy poligénes sajátságok? Hogyan tudná kísérleti úton meghatározni egy ilyen tulajdonság genetikai hátterét?
30. Kukoricánál a magasság örökölhetősége 0,7. Mesterséges szelekció során gyors vagy lassú szelekciós választ várna? Indokolja állítását!
31. A 3.21. ábrán látható családfa alapján, mi a valószínűsége annak, hogy a III-1 és a III-2 személyek rokonházasságából recesszíven öröklődő betegségben szenvedő gyermek származzon? A II-1 és a II-5 nem állnak rokonságban egymással. Mi a valószínűsége annak, hogy első gyermekük beteg lesz?
32. Egy M-vércsoportú asszonynak MN-vércsoportú a gyermeke. Egy MN-vércsoportú férfiről azt állítja, hogy ő a gyermek apja, de a férfi ezt tagadja. (a) Ennyi információ alapján kizárható-e a férfi apaságának lehetőségét? (b) További vizsgálatokkal megállapították, hogy az asszony B-, a gyermek O-, a férfi pedig AB-vércsoportú. Kizárható-e így az apaság? Magyarázza meg válaszát!

A megoldások a könyv végén találhatók.

4.

F E J E Z E T

A kromoszómák és az öröklődés

Tanulási program

- 1 Miként jellemezhetők a különböző kromoszómák?
- 2 Miért marad változatlan a kromoszómaszám a mitózis folyamán?
- 3 Hogyan feleződik meg a kromoszómaszám a meiózis alatt.
- 4 A gének és a kromoszómák viselkedése párhuzamba állítható.
- 5 A kromoszómaszerkezet négy megváltozása: a duplikáció, a deléció, az inverzió és a transzlokáció.
- 6 A kromoszómaszám változásának két útja: a poliploidia és aneuploidia.
- 7 Az ivarmeghatározás genetikai alapjai.

A figyelmet végül felhívhatom annak valószínűségére, hogy az apai és az anyai eredetű kromoszómák párokba rendeződése, majd azt követő szétválása a redukciós osztódás folyamán... alkotja az öröklődés mendeli törvényeinek fizikai alapját.

Walter Sutton
amerikai genetikus

Annak ellenére, hogy a kromoszómákat, mint sejtalkotókat már a XIX. században megfigyelték, alapvető szerepüket az öröklődésben csak Mendel törvényeinek újrafelfedezése után állapították meg. Walter Sutton 1902-ben az Amerikai Egyesült Államokban és Theodore Boveri Németországban rájöttek arra, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el. Hipotézisük a gének és a kromoszómák viselkedésének analogiáján alapult. Valóban – ahogyan azt később majd látjuk – a kromoszómák meiózis alatti viselkedése az alapja a mendeli házasítás és független kombinálódás törvényeinek.

IVAROS SZAPORODÁS

Mielőtt megismerkednénk a kromoszómaszerkezet alakulásával a sejtosztódás során, tekintsük át röviden az ivaros szaporodás lényegét és a kromoszómák általános szerkezetét. Az eukarióták ivartalanul és ivaroson egyaránt szaporodnak. Az **ivartalan szaporodás** során az egyedek magukkal azonos, új egyedeket hoznak létre. Ez gyakori szaporodási formája a növényeknek és az alacsonyabb rendű állatoknak. Mesterséges formáját, a vegetatív szervekkel történő szaporítást (pl. dugványozást) elterjedten alkalmazzák a kertészetekben. A **szűznemzéssel** (parthenogenezis) szaporodó állatok (pl. levéltetvek, botsáskák) nőtényei megtermékenyítés nélkül hoznak létre utódokat. Ezek az utódnemzedékek genetikailag ugyanolyanok, mint szüleik.

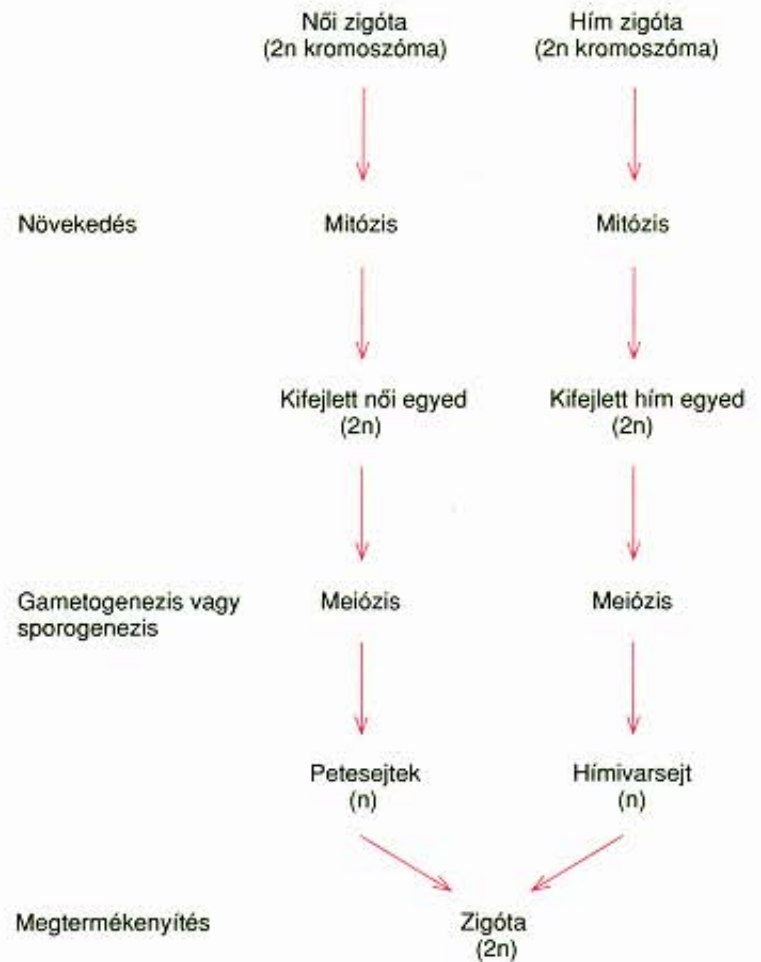
Az **ivaros szaporodás** során az egyedek ivarsejteket (gamétákat) termelnek, amelyek egyesülésével kialakul a **zigóta**, az a sejt, amelyből az utód fejlődésnek indul. Az ivaros szaporodás valamilyen formája majdnem minden élőlényre jellemző, beleértve az alacsonyabb rendű állatokat (4.1. ábra), a növényeket, sőt a baktériumokat is (13. fejezet). Az ivaros szaporodás során a hím és a női gaméta rendszerint külön egyedektől származik, biztosítva ezzel, hogy az utódban mindkét szülő tulajdonságai kombinálódjanak. Kivétel ez alól az öntermékenyítés, amikor ugyanaz az egyed adja mind a hím, mind a női ivarsejtet. A következőkben azt vizsgáljuk, miben rejlik az ivaros szaporodás jelentősége, és az milyen genetikai előnyökkel jár.

Egy ivaros szervezet növekedésének és szaporodásának általános sémája a 4.2. ábrán látható. Vizsgáljuk meg a két zigótát, amelyek közül az egyik hím, a másik női ivarúvá fejlődik. Mindkettő n számú kromoszómából álló készletet örökölt mindkét szülői gamétájától, így teljes kromoszómakészletük $2n$. Az ivarsejt kromoszómaszáma **haploid** (n), a zigótáé pedig **diploid** ($2n$). A haploid készlet mindegyik kromoszómatípusból egy kópiát tartalmaz, és az n kromoszóma mindegyike különböző génsorozatokból áll. A diploid készletben egy bizonyos típusból két-két példány található, a kromoszómapár tagjai az ún. **homológ kromoszómák**.



4.1. ábra. Kacslábú rák ivaros szaporodása

© Heather Angel/Biofotos



4.2. ábra. Ivarosan szaporodó szervezet növekedésének és szaporodásának vázlata, a különböző osztódási szakaszok diploid ($2n$) vagy haploid (n) kromoszómaszámával

A zigóta sejtjeinek száma a **mitózis** során gyarapodik. Ebben a folyamatban a kromoszómák úgy kettőződnek meg (replikálódnak), hogy a leánysejtben a $2n$ kromoszómaszám megmarad. Ez a sejtosztódási típus az ivarérettségig folytatódik, amikor néhány sejt **meiózison** megy keresztül. A meiózis a sejtosztódás másik formája, ennek során keletkeznek az n kromoszómaszámú hím és női ivarsejtek. Ez a folyamat állatokban a **gametogenezis**, növényekben pedig a **sporogenezis** (a növényekben meiózissal először a spórák alakulnak ki). A női (tojás, pete) és a hím ivarsejtek egyesülésével, a megtermékenyítés során keletkeznek a zigóták, amelyekből kifejlődnek az ivarérett egyedek, és a folyamat újra kezdődik.

Minden fajra jellemző a kromoszómaszáma, ami azt jelenti, hogy a fajnak minden egyede általában azonos számú kromoszómával rendelkezik. Ezt a számot általában a diploid vagy $2n$ formában szokás megadni. A 4.1. táblázat felsorol néhány, a genetikai kutatásokban is alkalmazott fajt, például a 20-as diploid kromoszómaszámú kukoricát, a 7-es haploid kromoszómaszámú *Neurospora crassa*-t (ennek a tömlősgom-

4.1. táblázat. Különböző szervezetek diploid kromoszómaszáma

Köznapi név (tudományos név)	Diploid kromoszómaszám
<i>Emlősök</i>	
Ember (<i>Homo sapiens</i>)	46
Csimpánz (<i>Pan troglodytes</i>)	48
Kutya (<i>Canis familiaris</i>)	78
Macska (<i>Felis catus</i>)	38
Ló (<i>Equus caballus</i>)	64
Szamár (<i>Equus asinus</i>)	62
Házi egér (<i>Mus domesticus</i>)	40
<i>Egyéb állatok</i>	
Házi tyúk (<i>Gallus domesticus</i>)	~78
Béka (<i>Rana pipiens</i>)	26
Ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)	104
Ecetmuslica (<i>Drosophila melanogaster</i>)	8
<i>Növények</i>	
Kukorica (<i>Zea mays</i>)	20
Dohány (<i>Nicotiana tabacum</i>)	48
Fenyőfélék (<i>Pinus species</i>)	24
Borsó (<i>Pisum sativum</i>)	14
<i>Gombák</i>	
Sörélesztő (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	17*
Fejespenész (<i>Aspergillus nidulans</i>)	8*
Tömlősgomba (<i>Neurospora crassa</i>)	7*

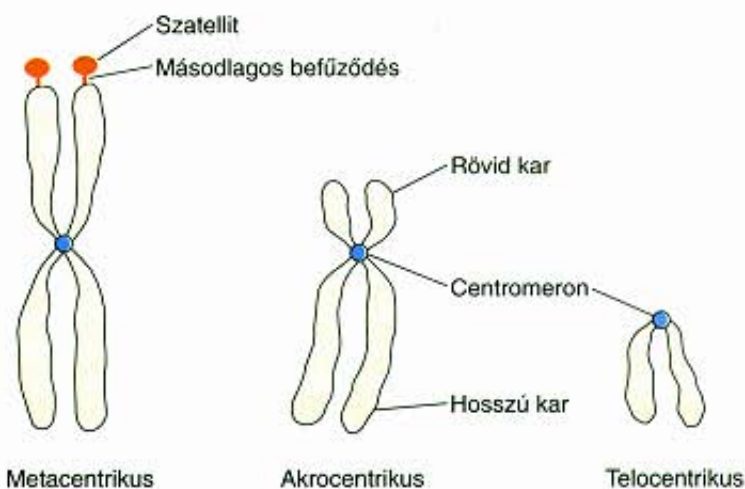
* Haploid kromoszómaszám

bának a haploid életszakasza van túlsúlyban). Az ecetmuslica $2n$ értéke csak 8, míg a pontynak és jó néhány páfránynak 100-nál is több kromoszómája van. Meg kell jegyezni, hogy a rokon fajoknak, mint a csimpánznak és az embernek vagy a lónak és a szamárnak, hasonló a kromoszómaszáma. A hárttyászárnyúak (*Hymenoptera*) rendjében (méhek és darazsak) a nőtények diploidok ($2n$), a hímek pedig haploidok (n). Ezek az ún. **haplodiploid** szervezetek. Bizonyos fajokban található igen kicsi, **szám feletti** vagy **B-kromoszómák**, amelyek száma egyedenként változó lehet. Az általános felfogás szerint ezeken a kromoszómákon nincsenek gének, bár néhány B-kromoszóma befolyásolja a termékenységet. Más fajknál, közöttük sok madárnál, több igen apró, ún. **mikrokromoszóma** található. Méretük és sokaságuk miatt számukat nehéz pontosan megállapítani. Feltételezik, hogy géneket hordoznak és számuk éppúgy állandó lehet, mint a normális kromoszómáké.

A KROMOSZÓMÁK FELÉPÍTÉSE

Ahhoz, hogy a kromoszómákat és funkciójukat jobban megismerjük, a különböző kromoszómákat meg kell tudnunk különböztetni egymástól. Először is, a kromoszómák mérete igen eltérő. A szervezetek szintjén a különbség a 100-szoros értéket is meghaladhatja, a fajon belül egyes kromoszómák gyakran tízszer nagyobbak is lehetnek másoknál. Egy faj **kariotípusának** meghatározásakor felvételt készítenek az egyed egy sejtjének kromoszómáiról, majd a kromoszómákat méretük és alakjuk szerint rendszerezik, és a legnagyobbtól a legkisebbik megszámazzák.

Másodsor, a kromoszómák különbözhetnek a **centromeron** helyzete szerint. A centromeron az a hely a kromoszómán, ahová a sejtosztódás során az osztódási orsó rostjai tapadnak. Befűződési pontként is említik, mert területén a kromoszóma



4.3. ábra. A kromoszómák három alapvető típusa: a metacentrikus, az akrocentrikus és a telocentrikus. Szatellit bármelyik típuson lehet

4.2. táblázat. Nyolc ismert háziállat kariotípusa

	Autoszómás párok			Ivari kromoszómaszám	
	Diploid kromoszómaszám (2n)	Metacentrikus kromoszómák száma	Akrocentrikus vagy telocentrikus kromoszómák száma	X	Y
Macska (<i>Felis catus</i>)	38	16	2	M	M
Kutya (<i>Canis familiaris</i>)	78	0	38	M	A
Sertés (<i>Sus scrofa</i>)	38	12	6	M	M
Kecske (<i>Capra hircus</i>)	60	0	29	A	M
Juh (<i>Ovis aries</i>)	54	3	23	A	M
Szarvasmarha (<i>Bos taurus</i>)	60	0	29	M	M
Ló (<i>Equus caballus</i>)	64	13	18	M	A
Szamár (<i>Equus asinus</i>)	62	24	6	M	A

M = metacentrikus

A = akrocentrikus

Forrás: Ohno: *Veterinary Medical Cytogenetics. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 12:1–31, 1968, valamint Eldridge, F. és Blazak, W. F.: *Horse, Ass, and Mule Chromosomes. Journal of Heredity* 67:361–67, 1976

összenyomódottnak látszik. (A centromeron körüli régiót **kine-tochornak** is nevezik.) Ha a centromeron a középponthez közel található, akkor a kromoszóma **metacentrikus**, ha a vége felé tolódik, **akrocentrikus** vagy **szubmetacentrikus**, és ha a végénél helyezkedik el, akkor **telocentrikus** (4.3. ábra). A centromeron két **karra** osztja a kromoszómát. Az akrocentrikus kromoszómának például egy rövid és egy hosszú karja van, a metacentrikus karjai pedig egyenlő hosszúságúak. Az egér összes kromoszómája telocentrikus, az ember kromoszómái között vannak metacentrikusak és akrocentrikusak, de nincsenek telocentrikusak. A 4.2. táblázat nyolc gyakori háziállat kariotípusát ismerteti, az adatok jól szemléltetik a fajok kromoszómális szinten is megnyilvánuló változatosságát. A centromeronon kívül bizonyos kromoszómákon lehet egy **másodlagos befűződés** is. Ha ez a kromoszóma végéhez közel található, akkor **szatellit** kialakulását eredményezi. A másodlagos befűzések rendszerint a nukleoluszorganizáló régiókat (NOR) jelentik. A kromoszómavég, a **teloméra**, ami a kromoszóma egyéb részétől rendszerint különböző DNS-szekvenciákat tartalmaz.

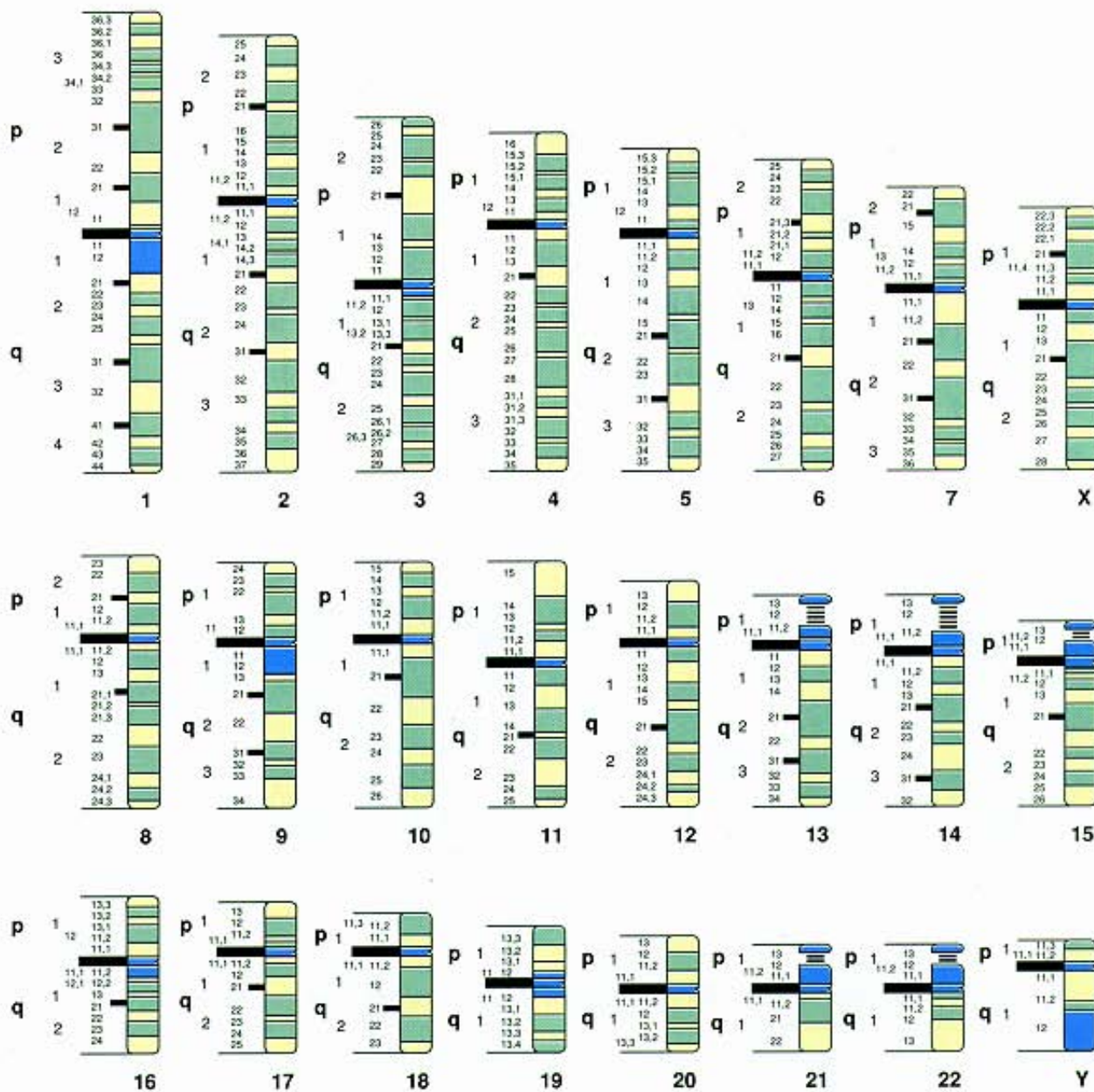
Harmadszor, a kromoszómák speciálisan festődő régiói alapján, különféle vegyszerek segítségével is azonosíthatók. A **kromoszóma** szó jelentése valójában „színes testecske”. Az egyes kromoszómárészek azonosítására többféle festési eljárás is elterjedt. Festődés után a kromoszómákon kromoszómális **sávok** jelennek meg. A sötétebb sávok általában a centromeron közelében vagy a teloméráknál találhatóak, más régiók viszont nem festődnek olyan intenzíven. A sötétben festődő **heterokromatikus** részek (vagy **heterokromatin**) és a gyengén festődő **eukromatikus** részek (vagy **eukromatin**) általában egy faj egyedjeinél és különböző sejtejeinél állandók, ezért alkalmasak az egyes kromoszómák azonosítására.

Az eukromatikus részek igen gyakran egy rendszeres összehúzóds–kiterjedés cikluson mennek át. A heterokromatinnak két típusa van: a **konstitutív** és a **fakultatív**. A konstitutív he-

terokromatin a genom és a sejt állandó része, és nem alakul át eukromatinná. A fakultatív heterokromatin eukromatinná áll, amely a fejlődés bizonyos fázisaiban felveszi a heterokromatin festődési és tömörödési jellemzőit. Bizonyított tény, hogy a konstitutív heterokromatin genetikailag inaktív, a gének legnagyobb részét az eukromatin tartalmazza. Meg kell jegyezni, hogy a G, Q és R sávok (Giemsa, quinacrin és reverz sávok), azok a kromoszómális sávok, amelyek különböző kémiai eljárások alkalmazása után figyelhetők meg a kromoszómákon, nincsenek kapcsolatban a centromeronon található heterokromatinnal.

Embernél (és más fajoknál is) a kromoszómák méretét, a centromeron helyzetét és a sávozási mintázatot használják a kromoszómák azonosítására (4.4. ábra). Humángenetikai vizsgálatokban először 1-től 22-ig, méretük szerint megszámozzák az autoszómákat, majd külön azonosítják az X- és Y-kromoszómákat. Ezután a kromoszómák rövid karját p-vel, hosszú karját q-val jelölik. Végül mindegyik kart részekre osztják, majd ezeket sávokkal azonosítják. Így például a 9q34 jelenti a 9. kromoszóma hosszú karjának 3. régióján a 4. sávot. Ez történetesen az AB0-vércsoportrendszer génjének helye.

Joe-Hin Tjio és Albert Levan 1956-ban állapították meg az ember pontos diploid kromoszómaszámát (2n = 46), ezt megelőzően harminc éven keresztül 48-nak hitték. Azóta a humán citogenetikai ismeretek sokat fejlődtek. A haladás főként olyan új módszerek kifejlesztésének eredménye – mint például az osztódó sejtek tenyésztése, a sejtek duzzasztása alacsony ozmotikus koncentrációnál, majd a sejtek feltörése és a kromoszómák szélesztése. Különböző új festési eljárásokkal mindegyik kromoszóma, sőt a kromoszómák kis részei is azonosíthatók. Biokémiai módszerekkel ma már lehetőség nyílik az egyes gének pontos helyének azonosítására. A 4.5. ábra vázlatosan szemlélteti a *Drosophila melanogaster* X-kromoszómáját. Ennek a fajnak ismert a részletes sávozási mintázata is.

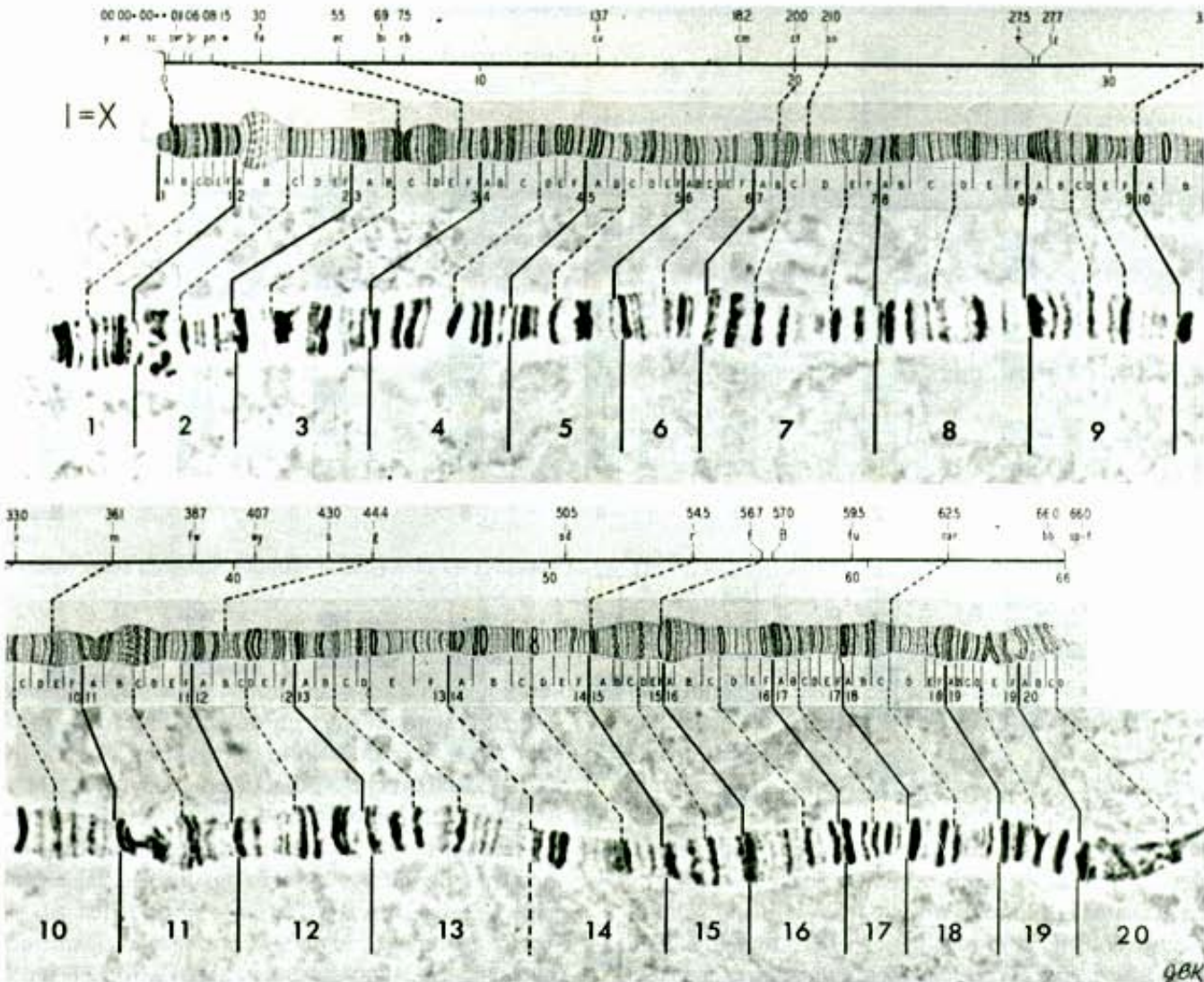


4.4. ábra. A 24 emberi kromoszóma sematikus képe: a vastag fekete sáv a centromeron régiót jelöli, a p és a q a rövid, illetve a hosszú kart. A kromoszómák melletti számok az egyes karok régióit jelölik. A heterokromatinus részek kék színűek (főként a centromeronok és a szatelliták környékén), a sárga vagy a zöld szín pedig más festődő vagy nem festődő régiókat jelent

A *Drosophila*-fajok és más kétszárnyú rovarok nyálmirigyében a kromoszómák rendkívül nagyok és így más kromoszómáknál könnyebben tanulmányozhatók. Ezek az **óriáskromoszómák**, más szóval a **politén kromoszómák**, amelyek százszor hosszabbak, mint a szabályos kromoszómák. Ugyanannak a kromoszómának sok párhuzamosan, szorosan egymás mellé rögzített másolatából állnak. A *D. melanogaster* óriáskromoszómáin több mint ötezer sáv azonosítható, és közülük több mint ezer az X-kromoszómán található. A 4.5. ábra a sávok változatos méreteit, egymáshoz viszonyított helyzetüket mutatja be, amely alapján a speciális kromoszómaszakaszok azonosíthatók. Az X-kromoszóma telocentrikus, a centromeronja a 20-as régió-

óban, a rajz jobb szélén van. A fehér szemszín génje, amelyről később szó lesz, az 1-es régió bal oldalán, a kromoszóma centromeronnal ellentétes végénél található. Ez az a kromoszóma, amelyen először határozták meg a gének pontos helyét, amint arra a következő fejezetben még kitérünk.

A diploid kromoszómaszám fajonként változó. Az egyes kromoszómák méretük, centromeronjuk helyzete és sávozási mintázatuk alapján azonosíthatók.



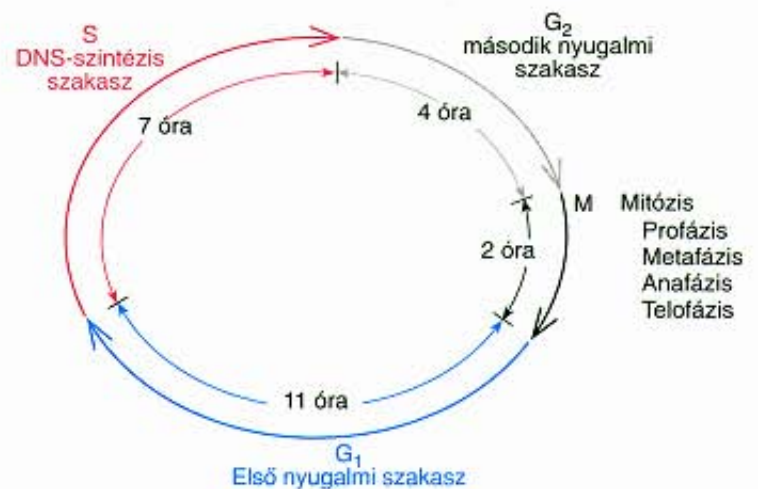
4.5. ábra. A *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájának térképe (felül) és fényképe (alul). A kromoszómát önkényesen 20 egységre osztották és mindegyik régió egy sötét sávval kezdődik

Forrás: Ayala és Kiger (1980): *Modern Genetics*. 141. oldal; Benjamin/Cummings Publishers, R. C. King (1975): *Handbook of Genetics*. Vol. 3, Plenum Press, New York alapján
Fotó: Lefevre (1976): *The Genetics and Biology of Drosophila*. 1:31–66, Academic Press (szerk.: Ashburner és Novitski)

MITÓZIS

A genetika megértéséhez ismernünk kell azt a folyamatot, amellyel az öröklődési információ sejtről sejtre és a szülőtől az utódnak átadódik. Bár a XIX. századi kutatók leírták a kromoszómák viselkedését a sejtosztódás folyamán, nem figyeltek fel a kromoszómák megkettőződésének és mozgásának genetikai fontosságára, következményeire. Csak Mendel szabályainak újrafelfedezése után állapították meg a kapcsolatot a korábbi, a kromoszómákra vonatkozó megfigyelések, valamint a hasadás és a független öröklődés elve között.

Először kövessük nyomon a mitózis egyes lépéseit, amelynek végeredménye kettő, a szülői sejtekével megegyező kromoszómaszámú leánysejt keletkezése. A mitózis (M) egy része, mégpedig rendszerint csak egy rövid szakasa a teljes **sejtciklusnak** (4.6. ábra). A sejtciklus egyes szakaszainak idő-

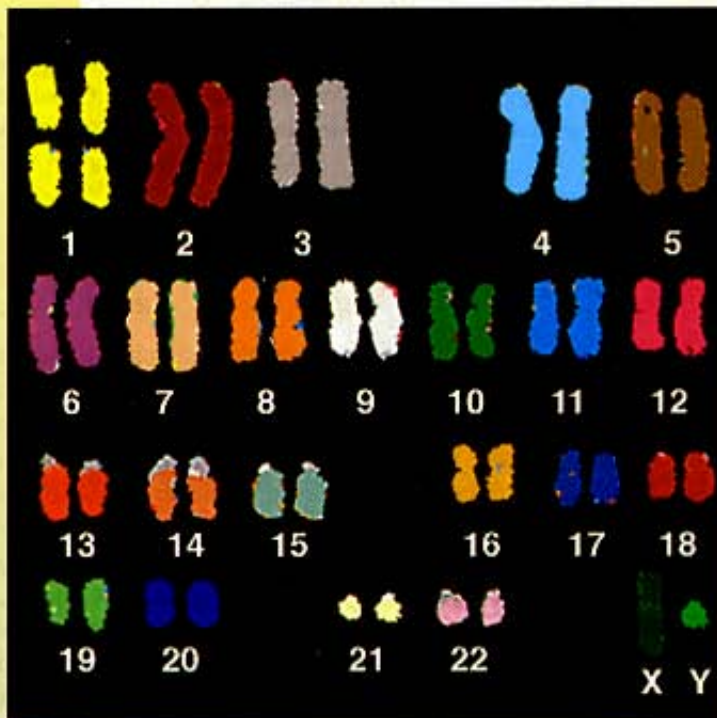


4.6. ábra. Az emberi fehérvérsejtek sejtciklusának vázlata az egyes szakaszok időtartamának feltüntetésével

4.1. Spektrális kariotípus

A közelmúltban számos új, izgalmas technikai eljárást dolgoztak ki a kromoszómák azonosítására. Így például az egyes kromoszómák speciális markereinek meghatározásával lehetőség nyílik a kromoszómák egyedi azonosítására, minden egyes kromoszóma különböző színekben való megjelenítésére, a spektrális kariotípus készítésével.

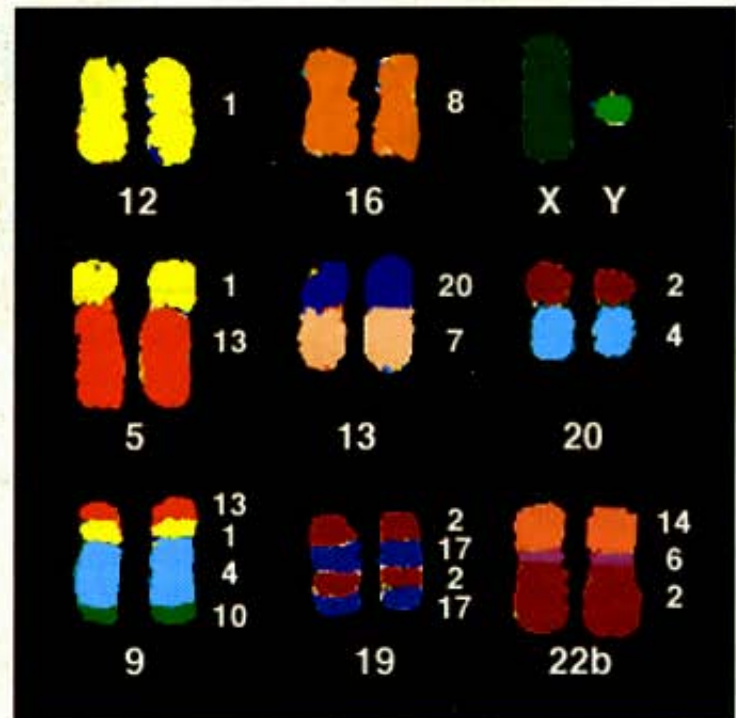
Az M.4.1. ábrán látható az ember 22 pár autoszómája, csökkenő méret szerinti sorrendben és különböző színekben, valamint két ivari kromoszómája, az X és az Y. Az ilyen eljárások segítséget nyújthatnak azoknak a személyeknek a citogenetikai vizsgálatához, akiknek számfeletti vagy hiányzó kromoszómáik, kromoszómarészleteik vannak. Az eljárás felhasználható a rokon fajok kromoszómaszerkezetének tisztázására is (l. 99. oldal). Az M.4.2. ábrán a gibbon (ázsiai elterjedésű emberszabású majom) és az ember kromoszómáinak összehasonlító



M.4.1. ábra. Az ember spektrális kariotípusa

elemzése látható. A felső sorban az a négy kromoszóma szerepel, amelyeknél nincs szerkezeti eltérés a két faj esetében. A gibbon 12-es, 16-os, X- és Y-kromoszómájának szerkezete megegyezik az ember 1-es, 8-as, X- és Y-kromoszómájának felépítésével. A középső sorban láthatók a gibbonnak azok a kromoszómái, amelyek teljes emberi kromoszómakarok transzlokációjának felelnek meg. Így például a gibbon 5-ös kromoszómája az 1-es és a 13-as emberi kromoszóma részeiből állítható össze. Az alsó sorban a bonyolultabb felépítésű kromoszómák szerepelnek: a gibbon 9-es kromoszómája például az ember 13-as, 1-es, 4-es és 10-es kromoszómáinak részleteiből épül fel.

Az M.4.1. és az M.4.2. ábra forrása: Schröck és mtsai: *Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes*. *Science*, 273–495, 1996. július 26. © American Association for the Advancement of Science.



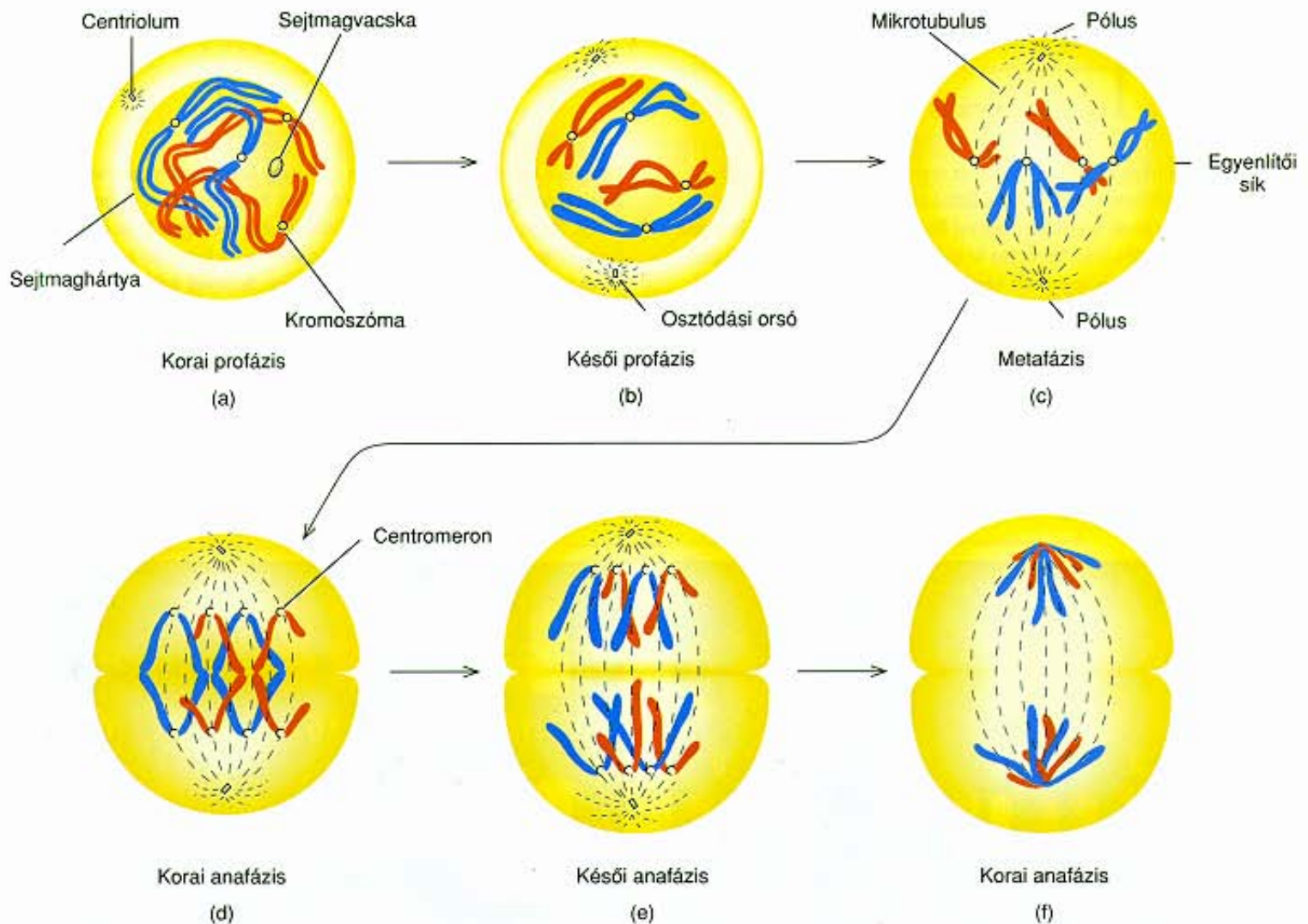
M.4.2. ábra. A gibbon és az ember spektrális kariotípusának összehasonlító elemzése

tartama nagyon változó, fajra, sejttípusra jellemző érték, emellett függ a hőmérséklettől és más környezeti tényezőktől is.

A sejtciklus két osztódás közötti szakasza az **interfázis**, amely három részre tagolható, a G_1 , az S és a G_2 szakaszokra. Az interfázis alatt rendszerint élénk az anyagcsere, ekkor történik a DNS, az örökítő anyag megkettőződése, szintézise. Néhány differenciálódott sejttípus, mint egyes idegsejtek, megrekednek az interfázisban, és nem osztódnak többé. Az osztódás befejeződése után az első nyugalmi szakasz, az ún. G_1 (gap) fázis következik, amelyben a sejt tömege és térfogata nő, élénk az anyagcsere. A G_1 szakaszt az S fázis, a DNS-szintézis szak-

za követi, amikor a sejt DNS-tartalma megkettőződik (a folyamatot a 8. fejezetben tárgyaljuk részletesen). Az S szakasz után a második nyugalmi fázis, a G_2 következik, és ezt zárja a mitotikus osztódás. A szervezet növekedése, fejlődése folyamán a sejtciklus sokszor ismétlődik, és kialakul a sejtek milliárdjaiból álló egyed.

A mitózis is négy szakaszra osztható, amelyek időrendben a következők: előszakasz (**profázis**), középszakasz (**metafázis**), utószakasz (**anafázis**), végszakasz (**telofázis**). Az osztódás egyes szakaszai folyamatosan mennek át egymásba, de mindegyik fázisnak megvannak a jellegzetességei, főként a kromoszómák



4.7. ábra. (a–f) Két pár kromoszóma szerkezetének változása a mitózis során. Az egyik pár kromoszóma akrocentrikus (piros), a másik pár metacentrikus (kék)

szerkezetének változásai alapján. A mitotikus osztódás mechanizmusának megértéséhez vizsgáljuk meg közelebbről az egyes osztódási fázisokat (4.7. és Á1.2.(b) ábra, 7. old.)

PROFÁZIS

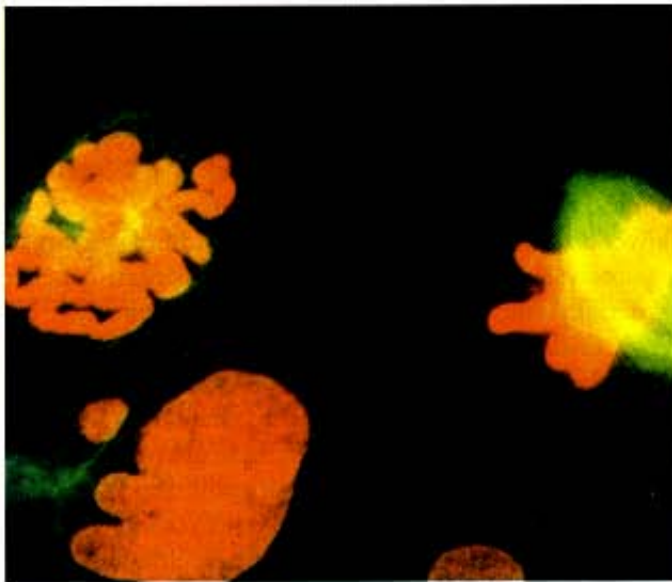
A mitózis kezdetekor (az interfázis G_2 szakaszának végétől) a kromoszómák feltekerednek, kondenzálódnak, így fénymikroszkóppal is láthatóvá válnak. A kromoszómák ekkorra már megkettőződtek és két **testvérkromatidából** állnak, amelyek a centromeronnal kapcsolódnak egymáshoz (4.7.(a) ábra). A kromatidák azonos szerkezetűek, a sejtciklus S szakaszában a DNS-replikáció eredményeként jönnek létre. A testvérkromatidák a centromeronnal összekapcsolódnak, kétkromatidás kromoszómát alkotnak.

A profázis során a **sejtmagvacska** (nucleolus) rendszerint eltűnik, és a mag membránja kezd lebomlani (4.7.(b) ábra). A **centriolumok**, a sejtosztódás szervezésében fontos sejtalkotók elválnak egymástól, és a sejt két ellentétes pólusára vándorolnak.

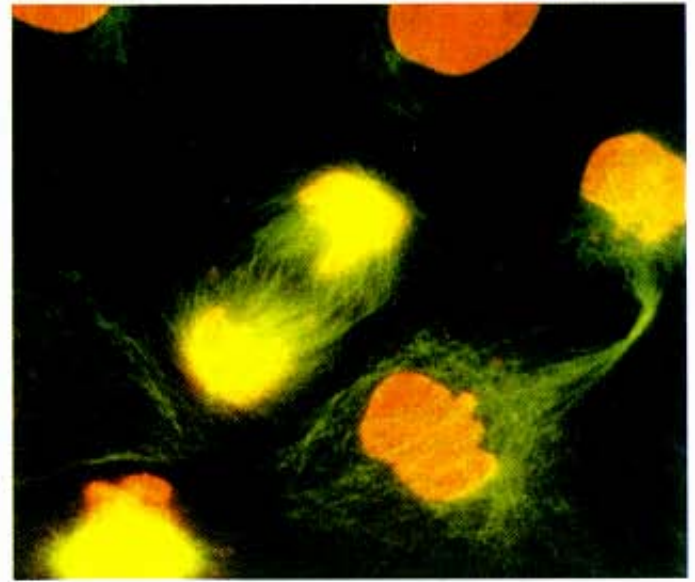
Kialakul körülöttük az **osztódási orsó**, amelynek orsófonalai a sejt pólusaihoz kapcsolódnak (4.8. ábra), míg mások közvetlenül a kinetochorhoz kötődnek. Az osztódási orsónak alapvető szerepe van a kromoszómák mozgásában, szétválásában.

METAFÁZIS

A metafázisban a sejtmag membránja teljesen eltűnik, szabadon hagyva a kromoszómákat a citoplazmában (4.7.(c) ábra). Az osztódási orsó fonalai, a mikrotubulusok a kromoszómák centromerontjához kapcsolódnak, és hatásukra a kromoszómák fokozatosan a sejt középvonalába, az **egyenlítői síkba (metafázissík)** vándorolnak. A kromoszómák szerkezete általában ebben a szakaszban a legtömörebb, így a legalkalmasabb a kariotípus elkészítéséhez. Mivel a testvérkromatidák a centromerontól összekapcsolódnak, ezért a metafázisos kromoszómák – attól függően, hogy metacentrikusak vagy telocentrikusak – X vagy V alakú képletek. Az akrocentrikus kromoszómák a kettő közötti átmeneti formát mutatják.



(a)



(b)

4.8. ábra. (a) Egy profázisos és egy metafázisos sejt képe. (b) Egy anafázisos és egy késői telofázisos sejt képe. Mindkét felvétel immunfluoreszcens eljárással készült. A zöld színt az osztódási orsó mikrotubulusaihoz kapcsolódó ellenanyag adja, a kromoszómák a szelektív kötődésű propidium-jodidtól vörösek

Mark S. Ladinsky, J. Richard McIntosh, University of Colorado, Boulder engedélyével.

ANAFÁZIS

Az anafázis majdnem mindig a legrövidebb szakasza a mitózisnak, és a centromeronok szétválásával kezdődik. Ennek eredményeként a testvérkromatidák elválnak egymástól két, egykromatidás leánykromoszómára. A folyamat lényege, hogy az osztódási orsó fonalai összehúzódnak, és a leánykromoszómákat centromeronjuknál a sejt két ellentétes pólusa felé mozgatják (4.7.(d) és Á1.2. ábra). Ebben a szakaszban a kromoszómák – attól függően, hogy metacentrikus, akrocentrikus vagy telocentrikus szerkezetűek-e V, J, vagy I alakúak.

TELOFÁZIS

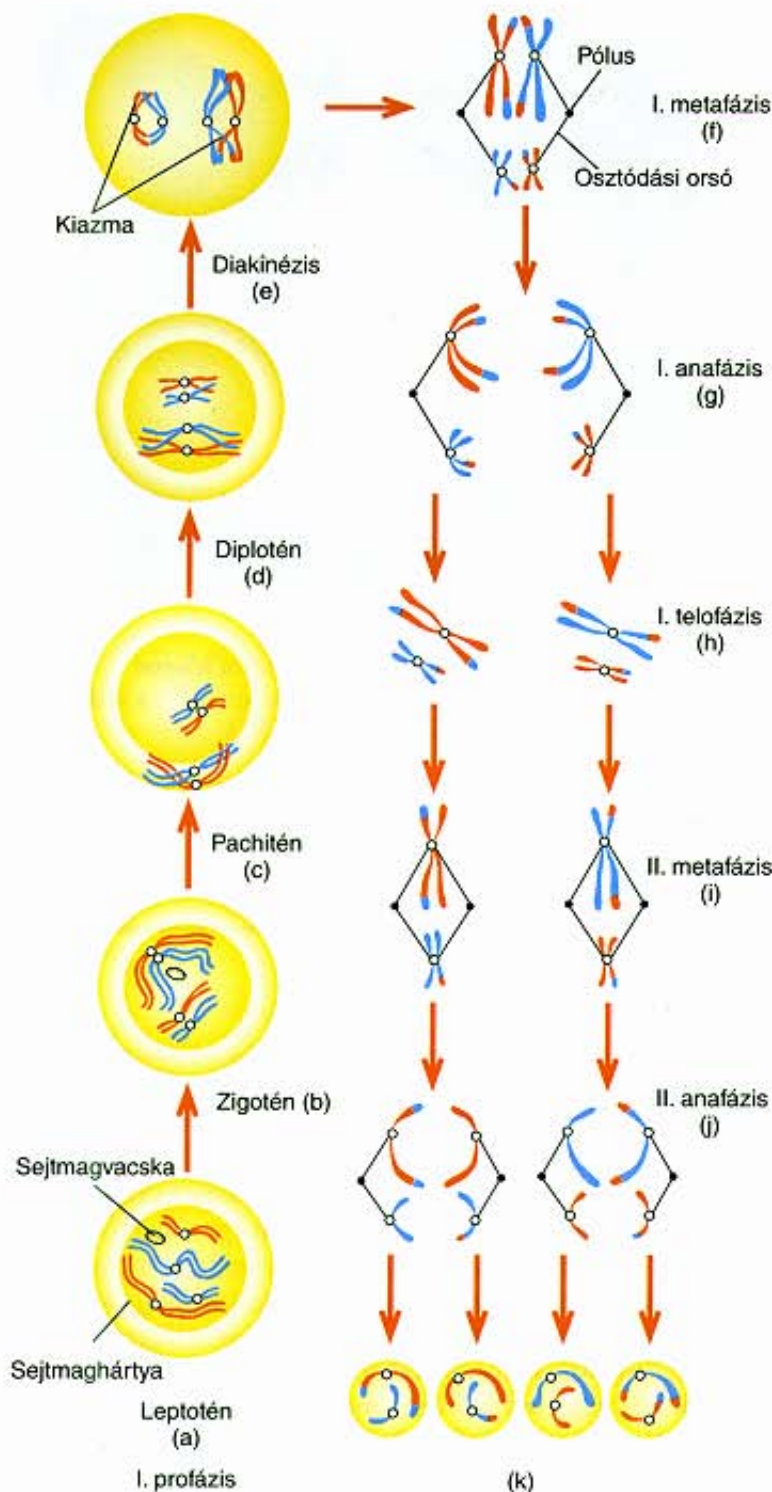
A telofázis a mitózis utolsó szakasza. A leánykromoszómák két csoportja az ellentétes pólusokra ér, ahol elkezdődik kitekeredésük, szerkezetük fellazul. Megkezdődik a sejtmaghártya kialakulása a kromoszómák körül, majd megjelenik a sejtmagvacska is. A sejtosztódás a sejtplazma kettéválásával ér véget (citokinézis). Az állati sejtek esetében a sejhártya befűződik, a növényi sejteknél pedig kifejlődik a sejtlemez, ami kettéosztja a sejtet. A két leánykromoszóma-készlet és a citoplazma is megfeleződik a két utódsejt között, a leánysejtek kromoszómaszáma megegyezik a kiindulási sejtével.

Mitózis két, a kiindulási sejtével azonos kromoszómaszámú leánysejtet eredményező ún. számtartó sejtosztódás. Folyamata négy szakaszra bontható, a profázisra, a metafázisra, az anafázisra és a telofázisra.

MEIÓZIS

A meiózis részletes tárgyalása előtt tekintsük át, miért alapvető fontosságú a folyamat a szervezet genetikai állományának megőrzésében, ugyanakkor genetikai változatosságának biztosításában. Először is, a meiózis az ivaros szaporodó szervezeteknél lehetővé teszi a kromoszómaszám megőrzését. Ha a kromoszómaszám nem feleződne meg a megtermékenyítés előtt, akkor az ivaros szaporodás során mindig megkétszereződne. Másodszor, a meiózis biztosítja, hogy az anyai és az apai eredetű homológ kromoszómák véletlenszerűen kombinálódjanak az ivarsejtekben. Végül, a homológ kromoszómák közötti crossing over a meiózis I. fázisában lehetővé teszi a genetikai információ kicserélődését az apai és az anyai eredetű kromoszómák között, ezzel a különböző gének új allélkombinációit hozza létre. (A crossing overt az 5. fejezet tárgyalja.)

A meiózis két osztódási szakaszból áll (I. és II. fázis), és a szülői kromoszómaszám felével rendelkező sejteket hoz létre. Az **I. fázist** számszerűsítő, **redukciós osztódásnak** is nevezik, mivel ebben a folyamatban feleződik meg a kromoszómaszám a homológ párok szétválásával, úgy, hogy közben a kromoszómák testvérkromatidái együtt maradnak. A **II. fázis**, más szóval **ekvációs osztódás** hasonló a mitózishoz, lényege, hogy a kromoszómák testvérkromatidái a centromerontól elválnak, így a kromoszómaszám változatlan marad (4.9. és Á1.3.(a) ábra).



4.9. ábra. (a-k) A meiózis folyamata két pár kromoszómát tartalmazó sejtben. Az I. főszakaszban a homológ kromoszómák, a II. főszakaszban pedig a kromatidák válnak el egymástól. Az ábrán a két nagyobb méretű vörös és kék, valamint a két kisebb méretű vörös és kék kromoszómák homológok

MEIÓZIS I. FŐSZAKASZ

A mitózishoz hasonlóan, mindkét főszakasz a kromoszómák elhelyezkedése és egyéb sajátosságai alapján, négy fázisra osztható. Az I. főszakaszt megelőző interfázisos periódus a mitózishoz hasonló (G_1 , S, G_2), az S szakaszban a DNS-tartalom megkétszöröződik.

I. profázis

Az egész meiotikus folyamat legösszetettebb része az **I. profázis**, amely öt újabb szakaszra bontható (4.9.(a-e) és Á.1.3.(a) ábra). Az első, a **leptotén** (vékony fonalas) a fénymikroszkópban hosszú fonalként megjelenő kromoszómákkal jellemezhető. Erősen emlékeztet a mitotikus profázis kezdetére.

A következő szakaszban a **zigoténban** a homológ kromoszómák párosával egymás mellé rendeződnek, azonos géneket tartalmazó szakaszaik egymáshoz simulnak. Az egymáshoz oldalirányban csatlakozó homológ párok **szinapszist** alkotnak. Ez az egyik alapvető különbség a mitózis és a meiózis között. A két homológ kromoszóma párosodásával (az ábrán a nagyobb, illetve a kisebb piros és kék kromoszómák) négykromatidás **bivalensek** alakulnak ki. Az I. profázis harmadik szakasza a **pachitén** (vastag fonalas), amelyben a bivalensek rövidülnek, vastagodnak, szinapsziszuk teljessé válik. Ekkor cserélődhetnek ki a homológ kromoszómák egyes szakaszai (rekombináció) az átkereszteződések (**crossing over**) révén. A crossing over kialakulását a homológok párok között kialakuló, fehérjéből és DNS-ből álló **szinaptonémás komplex** teszi lehetővé. (A rekombináció következményeit az 5. fejezetben tárgyaljuk.)

A negyedik szakasz a **diplotén** (kétfonalas), amelyben a homológok a centromeront körülvevő régióban kezdenek elválni egymástól. A testvérkromatidák azonban együtt maradnak a centromeron régióban. A homológ kromoszómáknak általában több, **kiazmának** nevezett részük van, ahol még szorosan kapcsolódnak vagy érintkeznek egymással a párok. A kiazmák a közvetlen fizikai bizonyítékai, a homológ párok között végbement rekombinációnak. Kromoszómakaronként általában legalább egy kiazma található, de a hosszú kromoszómákon akár több is lehet.

Az I. profázis utolsó szakasza a **diakinézis**, amely a kromoszómák megrövidülésével és a kiazmák terminalizációjával jellemezhető, vagyis azzal, hogy a kiazmák a kromoszómavégek felé mozdulnak el. Az I. profázis végére, a mitózishoz hasonlóan, a sejtmaghártya eltűnik.

I. metafázis

Az **I. metafázisban** a kromoszómák homológ párok formájában rendeződnek az egyenlítői síkban (4.9.(f) és Á.1.3.(a) ábra) és az orsófonalakhoz kapcsolódnak. A bivalensek úgy rendeződnek, hogy a centromeronok a metafázisos sík két oldalán, a kiazmák pedig a sík mentén helyezkednek el. Az I. metafázis abban különbözik a mitotikus metafázistól, hogy az utóbbinál a homológ kromoszómák nem kapcsolódnak bivalensekké.

I. anafázis

Az **I. anafázisban** a bivalensek homológ kromoszómáipárjainak két testvércentromeroneja eltávolodik egymástól (4.9.(g) és Á.1.3. ábra), a homológ pár egyik tagja a sejt egyik, másik tagja pedig a sejt másik pólusa felé mozdul el. A homológok elmozdulásával a kiazmák a kromoszómák végeire kerülnek. A mitotikus anafázissal ellentétben az I. anafázisban a testvérkromatidák együtt maradnak.

I. telofázis

Néhány szervezetben a kromoszómák pólusokra történő vándorlása után kialakul a sejtmaghártya, és a sejt két utódsejtre válik szét. Az **I. telofázis** (4.9.(h) és A.1.3. ábra) citológiai részleteit tekintve igen változatos, különösen a növényeknél.

MEIÓZIS II. FŐSZAKASZ

A két főszakasz között rendszerint csak egy rövid interfázis van, az ún. **interkinézis**. Ilyenkor nincs DNS-szintézis, mindegyik sejt a haploid kromoszómakészletet (n) tartalmazza, de mindegyik kromoszóma két testvérkromatidából áll. A következő szakasz, a **II. profázis** gyors, egyszerű, általában a mitotikus profázishoz hasonló. A **II. metafázisban** (4.9.(i) és A.1.3. ábra) a centromerok az orsófonalakhoz kapcsolódnak, a kromoszómák az egyenlítői síkba rendeződnek. A **II. anafázis** kezdetén (4.9.(j) ábra), a mitózis anafázisához hasonlóan, a centromerok elválnak egymástól, majd a leánykromoszómák a sejt ellentétes pólusaira vándorolnak. Mindegyik póluson n számú kromoszóma lesz, és mindegyikük egy kromatidából épül fel. A **II. telofázisban** kialakul a maghártya, az utódsejtek pedig elválnak egymástól.

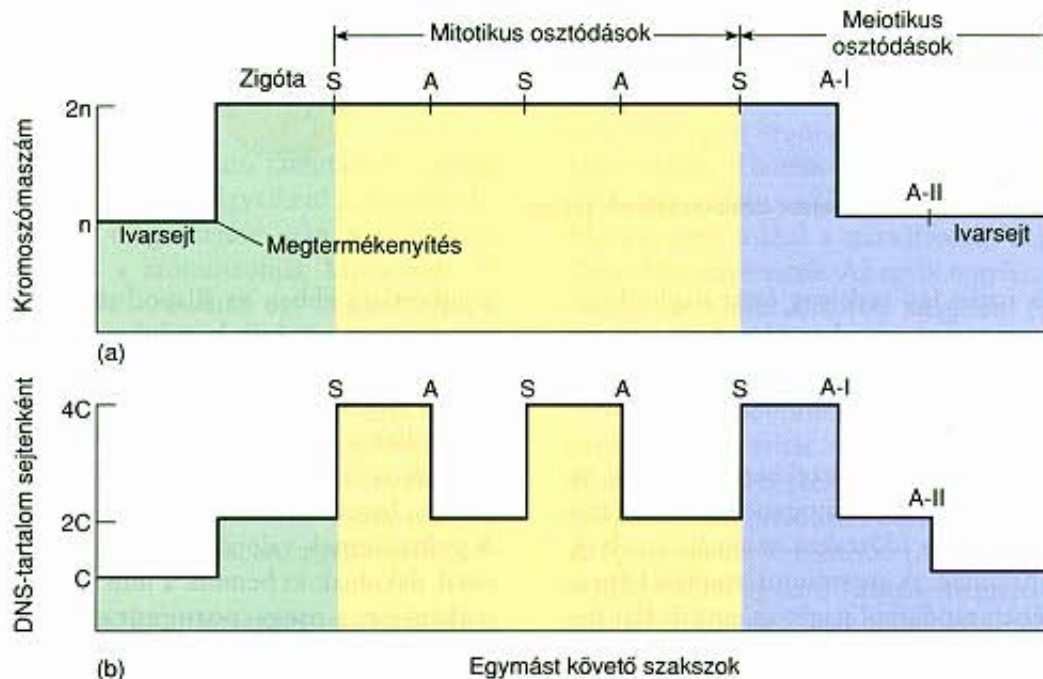
Mielőtt továbblépnénk, vessük össze a mitózis és a meiózis során bekövetkező kromoszómaszám- és DNS-tartalomváltozásokat. (1) A mitózissal ellentétben, a meiózis I. főszakaszában a homológ kromoszómák szinapszist alkotnak, ami lehetővé teszi a rekombinációt és a kromoszómapárok szabályos szétválását. (2) A mitózis és a meiózis kezdetén egyaránt $2n$ kromoszóma van a sejtekben (4.10.(a) ábra), és mindegyik kromoszóma két testvérkromatidából áll. A sejt DNS-tartalma így négyszerese a haploid mennyiségnek (a 4.10.(b) ábrán $4C$ -vel jelölve). A mitózis végére megmarad a $2n$ kromoszóma, de a DNS-tartalom

megfeleződik az utódsejtek között, értéke $2C$ -re csökken. A meiózis I. főszakaszának végére (A-I vagy I. anafázis a 4.10. ábrán) a kromoszómák száma n -re, a DNS mennyisége pedig $2C$ -re csökken. A mitózishoz hasonlóan a II. főszakaszban nem változik meg a sejtenkénti kromoszómaszám, a DNS-tartalom azonban C -re feleződik.

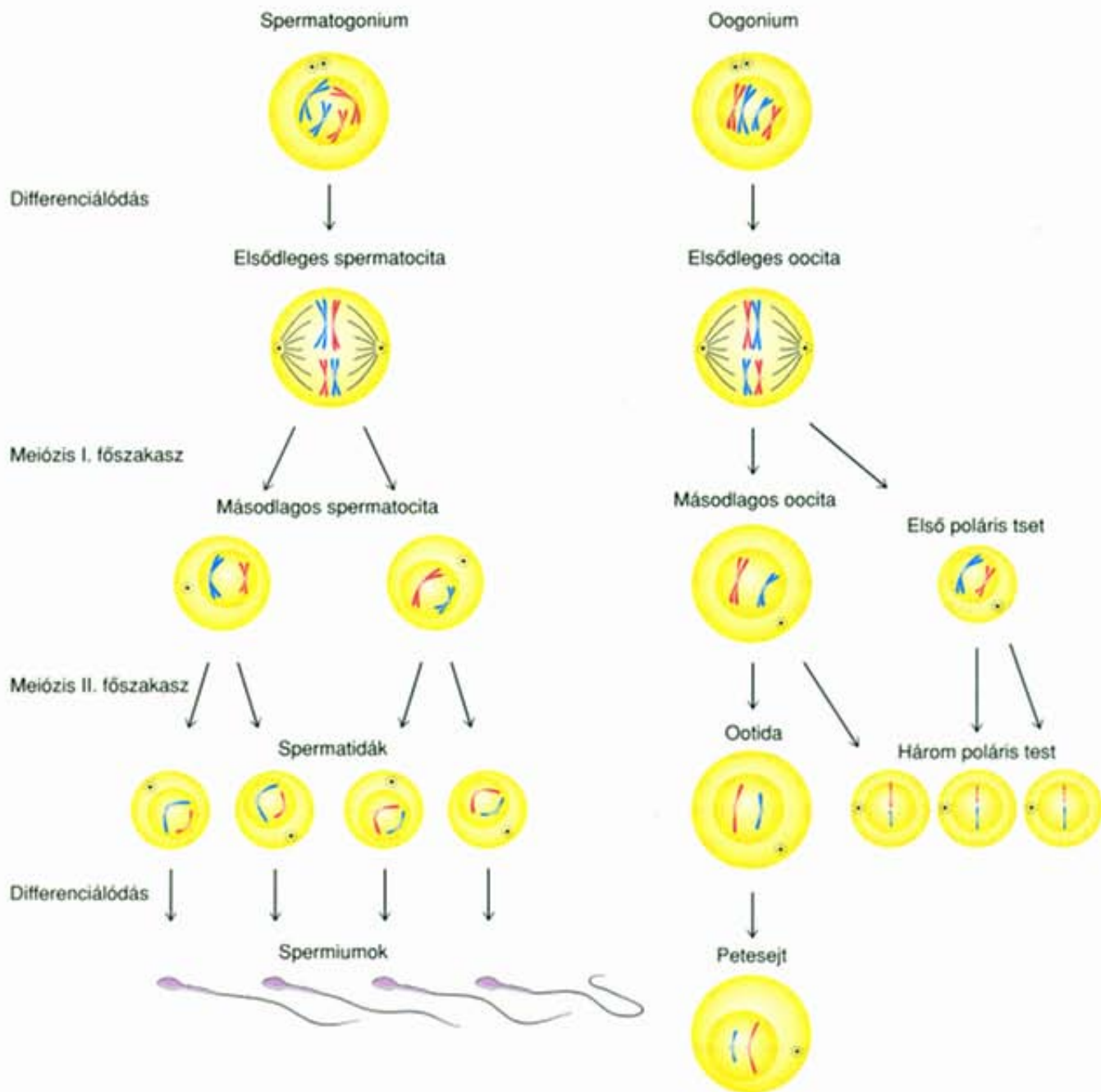
SPERMATOGENEZIS ÉS OOGENEZIS

A sejtmagban lejátszódó események sorrendje a meiózis folyamán hasonló a hím és a női gaméták termelődése során, a citoplazmában lejátszódó folyamatok azonban eltérőek (4.11. ábra). A hím gaméták termelődése állatoknál a **spermatogenezis**, amely a hímek szaporítószerveiben, a **herékben** folyik. A folyamat egy differenciálatlan diploid sejt, a spermatogonium növekedésével indul, amely ezután elsődleges spermocitává fejlődik. Ez a sejt megy át az első meiotikus osztódáson (redukciós osztódás), és ezután két haploid, ún. másodlagos spermocita jön létre. A II. főszakaszban a sejtekből 2-2 haploid spermocita alakul ki. A differenciálódás utolsó lépése a hosszú ostorral rendelkező spermiumok fejlődése a spermaticidokból (4.12. ábra).

Az **oogenezis** a női gaméták képződése, állatok esetében a **petefészekben** megy végbe. A folyamat annyiban azonos a spermatogenezissel, hogy a kiinduló állapot ugyancsak diploid sejt, az oogonium. A citoplazma azonban csak az egyik utódsejt, az egyik ún. másodlagos oocita köré koncentrálódik, a másik sejt és annak származékai (az elsődleges és a másodlagos poláris testek) csak kis mennyiségű citoplazmát kapnak. A meiózis a sejthártya közelében zajlik, ez teszi lehetővé, hogy a poláris testekbe kevés citoplazma kerüljön. A poláris testek a pete felszínén maradnak, és végül dezinteg-



4.10. ábra. (a) A kromoszómaszám alakulása a sejtosztódás különböző szakaszaiban. (b) A sejtek DNS-tartalmának alakulása a sejtosztódás különböző szakaszaiban. Az S a DNS-szintézis szakaszát, az A pedig az anafázist jelöli



4.11. ábra. Az érett hím és női ivarsejtek keletkezésének vázlata

rálódnak. Az oogenezis során így csak egy érett haploid petesejt termelődik, míg spermatogeneziskor négy érett spermium keletkezik. A citoplazma egyetlen sejtbe koncentrálódik, ez biztosítja a tápanyagot a megtermékenyítés után fejlődő embrióknak.

Azokban a kifejlett állati szervezetekben, amelyek az egész év során szaporodnak, a spermatogenezis folyamatos (így például az embernél is), és időszakos azoknál, amelyek csak periodikusan szaporodnak. A spermiumtermelési képesség a legtöbb állat esetében rendkívül nagy: az egyedi élet folyamán sok millió képződik belőlük. A petetermelés intenzitása viszont általában jóval alacsonyabb: nőknél mindössze ötszáz érik meg az élet során. A lánygyermek petefészékében már a születés előtt kialakulnak az elsődleges oociták, és

a pubertásig ebben az állapotban maradnak. A serdülés után havonta egy-egy érik közülük petesejtté és kerül ki a petefészekből az ovuláció során.

A magasabb rendű növényeknél a virágporszem, más néven pollen a **mikrosporogenezis** során alakul ki. A folyamat hasonlít az állatok spermatogeneziséhez, mivel a meiózis ekkor is négy, hasonló alakú és működésű haploid sejtet eredményez. A pollenszemek valójában spórák, és a megporzás során mitózissal alakulnak ki bennük a hím ivarsejtek. A növények petesejtképzése, a **megasporogenezis** fajtól függően nagyon változatos lehet. A haploid ivarsejtek képződését itt is megelőzi a spóra kialakulása. A zárvatermőkre meglehetősen bonyolult kettős megtermékenyítés jellemző. (Részletesebben megtalálható a növénytankönyvekben.)



4.12. ábra. Tengeri sün petesejtje a körülötte nyüzsgő spermiumokkal. A petesejtet csak egy spermium termékenyíti meg

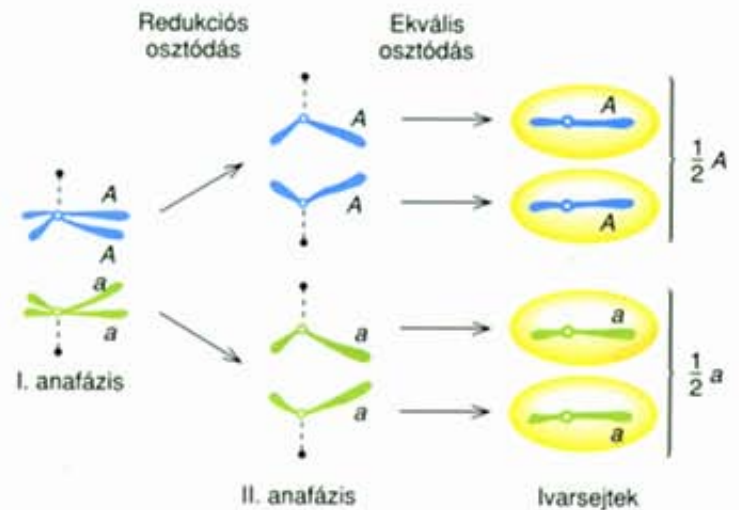
© Francis Leroy, Biocosmos/SPL/Photo Researchers, Inc.

A meiózis két osztódási szakaszból áll. Az I. fázisban redukciós osztódás, mivel a homológ kromoszómák elválását és így a kromoszómaszám megfelelőzését eredményezi. A II. fázisban a testvérkromatidok válnak el egymástól, a kromoszómaszám már nem változik. Állatoknál az érett hím és női ivarsejtek a spermatogenezis, illetve az oogenezis során alakulnak ki.

GÉNEK ÉS KROMOSZÓMÁK

Mint már említettük, sok korabeli kutató rámutatott a gének és a kromoszómák viselkedésében megfigyelhető párhuzamokra. A meiózis folyamatának megismerése után pontosabban megvizsgálhatjuk a gének és a kromoszómák kapcsolatát. A 4.13. ábra a hasadás törvényét szemlélteti egy Aa genotípusú heterozigóta egyedben. A redukciós osztódásnál (meiózis I. fázisban) az eltérő allélokat hordozó homológ kromoszómák két különböző utódsejtbe kerülnek. A két haploid sejt ezután ismét osztódik, de a belőlük képződő leánysejtek már csak egyféle allélt tartalmaznak. A folyamat végeredményeként a gaméták fele A , fele a genotípusú lesz. Másként fogalmazva, az allélok szabályos szegregációja a gamétákban, a redukciós osztódás következménye.

A független kombinálódás kromoszómális magyarázatát a 4.14. ábra és az Á.1.3. ábra adja meg. Vizsgáljuk meg az F_1 kettes heterozigóta $Aa Bb$ gamétaképzését, arra az esetre, amikor a két gén különböző kromoszómákon van. Az I. fázisban két eset lehetséges, mégpedig azonos valószínűséggel. Az első eset-

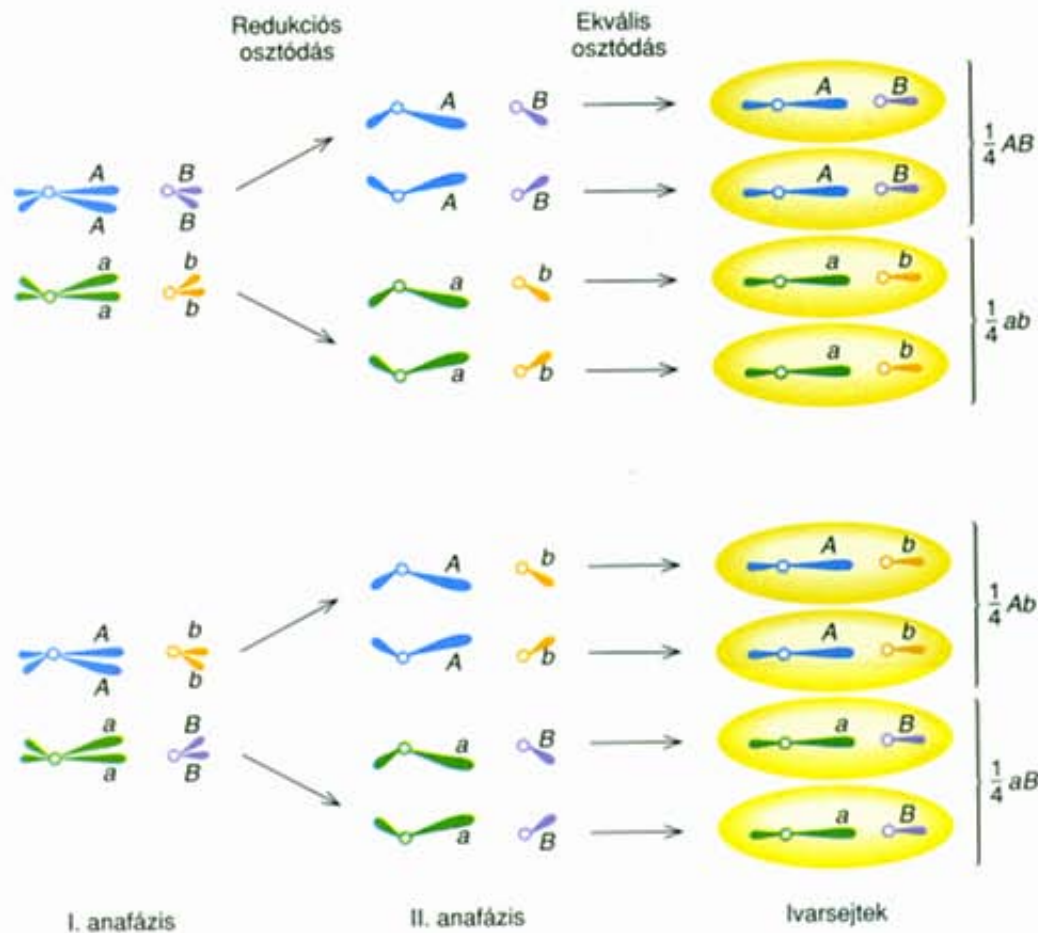


4.13. ábra. A mendeli hasadás elvének kromoszómális alapja, egy Aa genotípusú heterozigótában. Ahogy az ábrán látható, $\frac{1}{2}$ rész A és $\frac{1}{2}$ rész a ivarsejt képződik

ben az A és B allélt, illetve az a és b allélt hordozó kromoszómák vándorolnak a sejt ellentétes pólusaira, míg a másik esetben az A és b , illetve az a és B allélokat tartalmazó kromoszómák különülnek el. A két eset egyforma valószínűséggel következik be, mert az I. metafázisban a centromeronok véletlenszerűen kerülnek az egyenlítői sík egyik vagy másik oldalára. A II. fázisban négyféle gaméta alakulhat ki, méghozzá egyenlő arányban. Tehát a független öröklődés alapja a homológ kromoszómák véletlenszerű szétválása a meiózis I. fázisában. (Meg kell jegyeznünk, hogy ennek az a feltétele, hogy ne legyen rekombináció a lokuszok és centromeronjaik között. Részletesebben lásd az 5. fejezetben a rekombináció tárgyalásánál.)

A gének és a kromoszómák párhuzamos viselkedése erősen alátámasztotta azt a feltételezést, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el, de nem volt közvetlen bizonyíték az egyes gének és az egyes kromoszómák közötti kapcsolatra. Az első ilyen bizonyítékot Thomas H. Morgan kísérletei szolgáltatták, aki 1910-ben a *Drosophilában* leírta az X-hez kapcsolt öröklődést. Morgan nem sokkal a századforduló után kezdte el fenntartani *Drosophila*-tenyészetét. Az egyik tenyészetben a vad típusú (piros szemű) ecetmuslicák között megjelent egy fehér szemű hím is. Ennek a mutáns muslicának a felhasználásával Morgan kísérletesen bizonyította, hogy a gének a kromoszómákon lokalizálódnak.

Morgan több kísérletet végzett, hogy felderítse a kapcsolatot a mutáns fehér szemszín és az ivar között. Piros szemű nőstényeket fehér szemű hímekkel keresztezett, és az F_1 nemzedékben csak piros szemű utódokat kapott. Amikor azonban az F_1 egyedeket keresztezte tovább, azt tapasztalta, hogy az F_2 nemzedékben ugyan a vártak megfelelő, 3:1 a hasadási arány, de a fehér szemű állatok mindegyike hím, nőstény nincs közöttük (4.15. ábra). A vártól eltérő eredményre vezetett a reciprok keresztezés, azaz a fehér szemű nőstények és a piros szemű hímek pároztatása (4.16. ábra). Az F_1 egyedek fele fehér szemű hím, fele pedig piros szemű nőstény lett. Az F_1 egyedek egy-



4.14. ábra. A mendeli független kombinálódás elvének kromoszomális alapja egy $Aa Bb$ genotípusú heterozigótában. A négyféle ivarsejt egyenlő arányban keletkezik. Az ábra felső és alsó részén ábrázolt változat bekövetkezésének valószínűsége a független kombinálódás miatt azonos

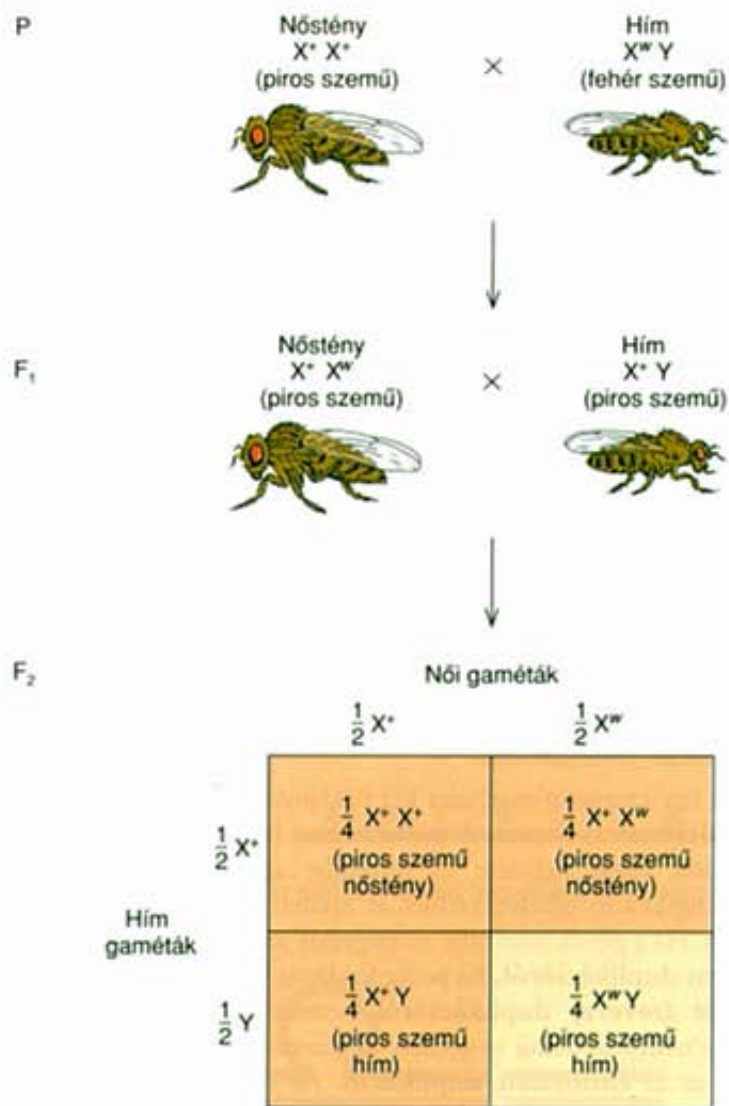
más közti keresztezéséből származó F_2 nemzedékben szintén fele-fele arányban jelentek meg a fehér és a piros szemű utódok.

Akkor már ismert volt, hogy a *Drosophila* hímjei és nőstényei kromoszómáikban is különböznek. A nőstényeknek két X-, a hímeknek pedig egy X- és egy Y-kromoszómájuk van. Morgan feltételezése szerint a keresztezések eredménye azzal magyarázható, hogy a szem színét meghatározó gén az X-kromoszómán helyezkedik el. A keresztezési kísérlet eredményei nyilvánvalóan bizonyították, hogy a fehér szemszín kialakító mutáns allél az X-kromoszómához kapcsolódik.

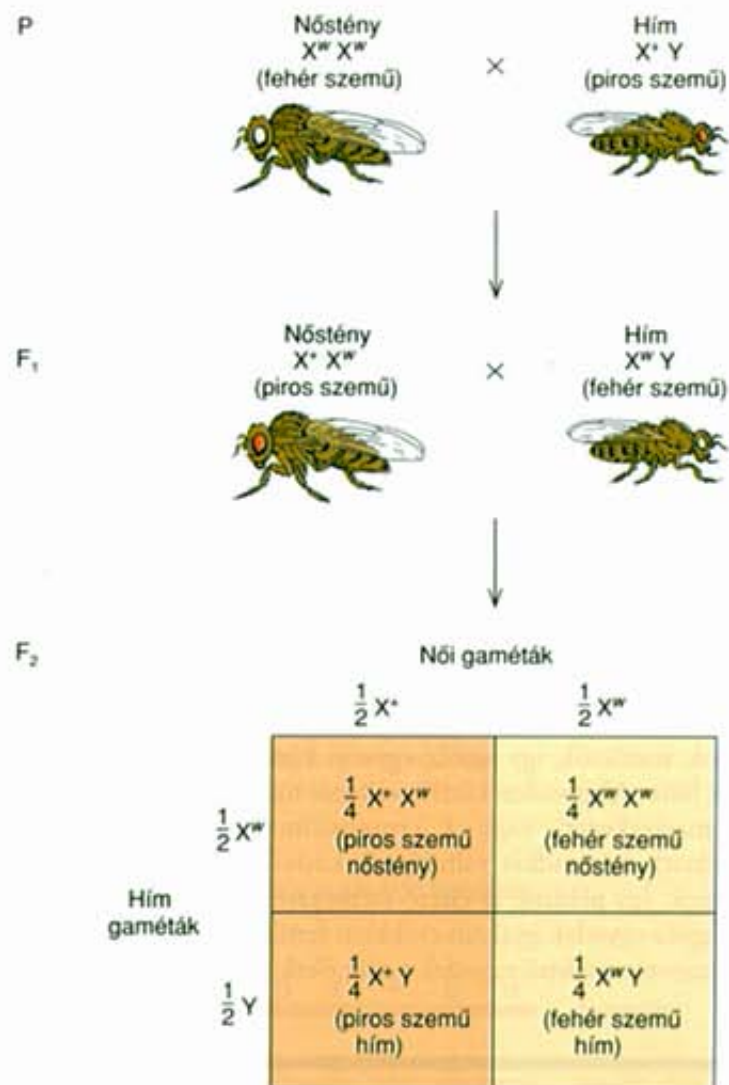
Bár a fehér szemszín alléljának (*white*) és az X-kromoszómának a kapcsolata meggyőzően bizonyította, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el, egy másik kísérletre is szükség volt az egyéb lehetséges magyarázatok kizárása miatt. A döntő bizonyítékot, szintén a *white* gén felhasználásával Calvin Bridges, Morgan egyik tanítványa adta meg 1916-ban. Amikor fehér szemű nőstényeket és piros szemű hímeket keresztezett (4.17. ábra), akkor 2000 F_1 utódból átlagosan egy esetben eltérést tapasztalt a várttól, azaz vagy fehér szemű nőstényt vagy piros szemű hímeket azonosított. Bridges szerint ezek a ritka példányok a meióziban fellépő rendellenes kromoszómaszétválás (pontosabban szét nem válás), az ún. **nondiszjunkció** miatt

keletkezhetnek. Ebben az esetben a nondiszjunkció a nőstényben fordul elő, mégpedig úgy, hogy a két X-kromoszóma nem válik el egymástól, hanem mindkettő ugyanarra a pólusra vándorol, és így olyan peték keletkeznek, amelyekben vagy két X-kromoszóma található, vagy egy sem (4.17. ábra).

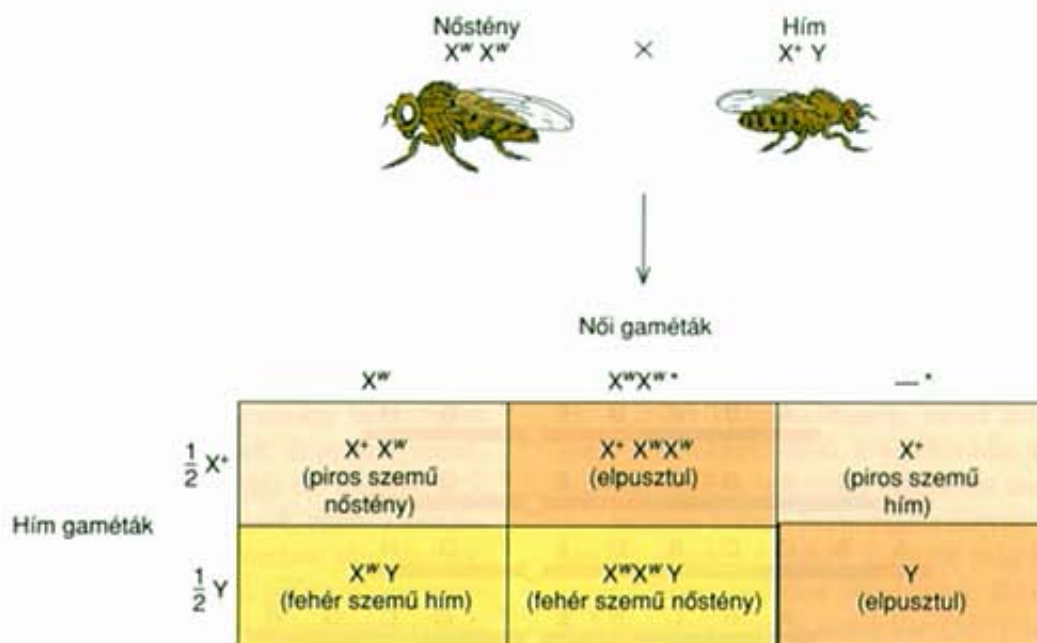
Ha a nőstényben az ivari kromoszómák nem váltak szét, és a hímekben a meiózis szabályos volt, akkor $X^w X^w Y$ genotípusú utódok is létrejöhetnek három ivari kromoszómával. Ilyenek lehettek a nem várt fenotípusú, fehér szemű nőstények. A piros szemű hímek pedig X^w genotípusúak lehetnek, egyetlen ivari kromoszómával. (A *Drosophila* ivarának kromoszomális alapjait a fejezet későbbi részében tárgyaljuk.) E magyarázat szerint a fehér szemű nőstények mindkét X-kromoszómája anyai eredetű volt, míg a piros szemű hímek X-kromoszómája apai eredetű. Bridges a nem várt muslicák kariatípusának vizsgálatával erősítette meg hipotézisét. Azt tapasztalta, hogy a nem várt nőstények XXY-, a hímek pedig X-kromoszómával rendelkeztek. Más szóval, az a felismerés, hogy egy rendellenes öröklésment és egy rendellenes kromoszómaszerelvény között közvetlen összefüggés van, meggyőzően bizonyította, hogy a gének valóban a kromoszómákon helyezkednek el.



4.15. ábra. Piros szemű nőstény és fehér szemű hím keresztezéséből származó F₂ nemzedék ivartól függő fenotípusos hasadási aránya. Minden fehér szemű utód hím.



4.16. ábra. Fehér szemű nőstény és piros szemű hím keresztezéséből származó F₂ nemzedék. A hasadási arány eltér a 4.15. ábrán látható reciprok keresztezésétől



4.17. ábra. Fehér szemű nőstény és piros szemű hím keresztezésének eredménye. A * a ritkán bekövetkező nondiszjunkció eredményeként képződő petesejteket jelöli

A gének és a kromoszómák párhuzamos viselkedése szolgáltatott magyarázatot a hasadás és a független kombinálódás törvényeire. A párhuzamos viselkedés felfedezése hívta fel először a figyelmet arra, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el. A *Drosophila* X-hez kapcsolt jellegeinek öröklődésével foglalkozó kísérletek meggyőzően bizonyították a gének és a kromoszómák kapcsolatát, és fényt derítettek arra is, hogy a nem várt szemszín a meiózisban bekövetkező rendellenes szétválás következménye.

KROMOSZOMÁLIS VÁLTOZÁSOK

Egészen eddig csak olyan egyedekkel foglalkoztunk, amelyeknek szabályos kromoszómakészletük volt. Ugyanakkor, egy szervezetben kromoszomális szinten is bekövetkezhetnek változások, mutációk, így egy faj egyedei között különbségek jöhetnek létre. Alapvetően kétféle változás történhet, vagy a kromoszómaszerkezet, vagy a kromoszómaszám módosul (4.3. táblázat), és mindkét változásnak komoly következményei lehetnek. Így például, az eltérő szerkezetű kromoszómákra heterozigóta egyedek gyakran csökkent fertilitásúak, a megváltozott kromoszómaszámú egyedek pedig életképtelenek vagy sterilek.

4.3. táblázat. Kromoszomális változások típusai

Szerkezeti változások

Duplikációk
Deléciók (vagy kiesések)
Inverziók
Transzlokációk

Számbeli változások

Euploida
Autopoliploida
Allopoliploida
Aneuploida
Monoszómia ($2n - 1$)
Triszómia ($2n + 1$)

A KROMOSZÓMASZERKEZET VÁLTOZÁSAI

A kromoszómaszerkezet megváltozásának négyféle típusa van: a duplikáció (megkettőződés), a deléció (kiesés), az inverzió (megfordulás) és a transzlokáció (áthelyeződés). Amennyiben a kromoszómákon törések következnek be, bármely két eltört kromoszómavég újra egyesülhet. A módosulások sokszor olyan kromoszómatörések eredményei, amelyeknél nem az összetartozó törött végek kapcsolódnak egymáshoz. Az ilyen kromoszómamutációk általában nem gyakoriak, de néhány kutató becslése szerint ezer újonnan képződő ivarsejt közül egynél több hordozhat valamilyen kromoszómamutációt. Hangsúlyozni kell, hogy ezek a kromoszomális változások törések és szabálytalan újrapcsolódások eredményei. A fellépő következmények – amelyeket a következő bekezdésben részletezünk – magyarázatát a normális és a rendellenes kromoszómák szinapsziséban, majd az ezt követő I. és II. anafázisban kell keresni.

Duplikációk

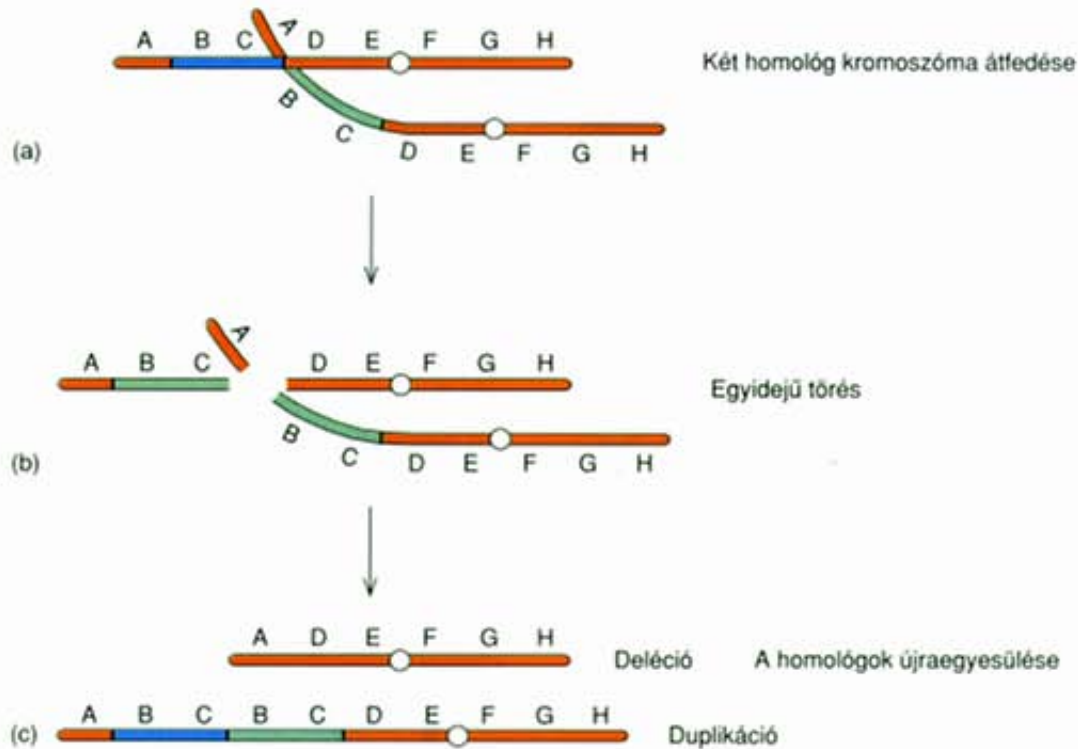
Ha egy kromoszómarészlet két példányban van jelen, azt **duplikációnak** nevezzük. A duplikációkat (4.18. ábra) a megkettőződött régió helyzete és sorrendje alapján osztályozhatjuk. A duplikáció elhelyezkedhet az eredeti szakasz szomszédságában. Ha a gének sorrendje megegyezik az eredetivel, akkor **tandem duplikációról**, ha pedig fordított irányú, akkor **megfordult (reverz) duplikációról** beszélünk. A megkettőződött rész nem feltétlenül az eredeti szegmentum mellett helyezkedik el, ez az **elmozdult duplikáció**. Az elmozdult duplikáció – amint az a 4.18. ábrán látható – lehet ugyanazon a kromoszómán, de másikon is.

A tandem duplikáció keletkezésének egyik lehetséges módját szemlélteti a 4.19. ábra. A homológ kromoszómák átfedik egymást, és ezzel egyidejűleg a karok *különböző* pontjain törések jönnek létre. Ha a homológok újraegyesülnek, akkor az egyik kromoszómán egy tandem duplikáció, a másikon pedig egy deléció keletkezik (4.19.(c) ábra). Ebben az esetben a duplikáció és a deléció reciprokai egymásnak. Az 5. fejezetben bemutatunk egy másik mechanizmust, az egyenlőtlen crossing over-t, amellyel kis duplikációk (és deléciók) jöhetnek létre.

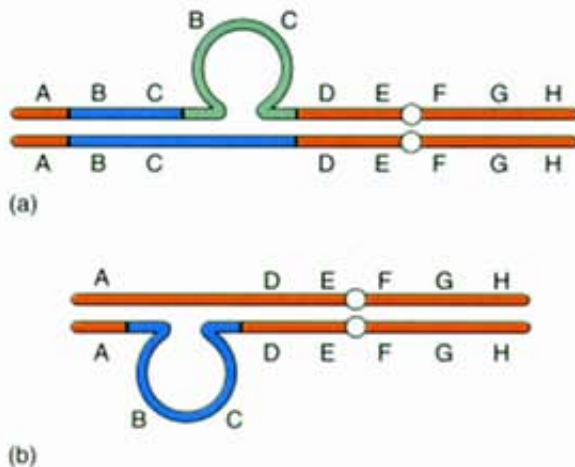
Amennyiben egy szervezet heterozigóta egy duplikációs és egy normális kromoszómára, a megkettőződött résznek nincs olyan homológ szegmentuma, amellyel a meiózisban párosodni tudna. Emiatt a megkettőződött résznél hurok képződhet (4.20.(a) ábra). Egyes esetekben a kromoszóma érintett része



4.18. ábra. Szabályos kromoszóma (felül) és a duplikáció három típusa, a megkettőződött rész (zölddel jelölve) helyzetétől és sorrendjétől függően



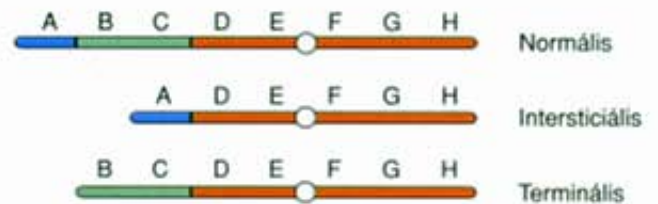
4.19. ábra. (a) Két egymást átfedő homológ kromoszóma (b) egyidejű törése, (c) a deléció és a duplikáció kialakulása



4.20. ábra. (a) Duplikációra vagy (b) delécióra heterokariotípusos egyed kromoszómapárosodása

visszahajolhat és kapcsolódhat ugyanazon kromoszóma megkettőződött szakaszához. Az ilyen kétféle kromozómatípust tartalmazó egyedekre gyakran használják a **heterokariotípusos** jelzőt.

A kisméretű megkettőződött szegmentumokra heterozigóta vagy homozigóta egyedek lehetnek életképesek, de gyakran mutatnak valamilyen fenotípusos hatást (l. a *Drosophila Bar* mutánsa az 5. fejezetben). Amennyiben az egyedek életképesek, akkor a számfeletti génekben a későbbiekben evolúciós változások történhetnek. Úgy vélik, hogy ez történhetett a különböző globin gének esetében is. A globin gének a hemoglobin fehérjekomponenseit kódolják, és valószínűleg egy ősi génből származnak, amely megkettőződött, majd a megkettőződött kópiák eltérő funkciójúak lettek.



4.21. ábra. Normális kromoszóma és a hiányzó szakasz helyzetétől függő kétféle típusú deléció

Deléciók

A hiányzó kromoszómaszakasz a **deléció** vagy a **deficiencia**. A 4.19. ábra a deléció kialakulásának egyik lehetséges útját mutatja be. A deléciónak az a típusa, amikor a kromoszómakar egyik belső darabja hiányzik, az ún. **intersticiális deléció**. Ha a törés a kromoszóma egyik végén következik be, és a homológ darabok nem kapcsolódnak újra, akkor **terminális deléció** jön létre. A letört kromoszómavég, mivel nem tartalmaz centromeront, rendszerint elvész a sejtosztódás során. A 4.21. ábra az intersticiális és a terminális deléciókat szemlélteti.

Számos deléció homozigóta formában letális, mert életfontosságú géneket éríthet. Egyesek még heterozigóta állapotban is rendellenes fejlődést okozhatnak. Közismert példa az ember 5. kromoszómáján a rövid kar (5p) kiterjedt deléciója, amely heterozigóta formában a *Lejeune-kórt* (macskasírási-betegség) okozza. Az érintett újszülöttek sírása macskanyávogásra hason-

lit, koponyájuk kicsi, szellemileg visszamaradottak. Általában még csecsemő- vagy kisgyermekkorban meghalnak.

A deléciós heterozigóták kromoszómái a meiózisban rendszerint szabálytalanul párosodnak. A normális kromoszóma homológ régió hiányában nem képezhet szabályos szinapszist, ezért deléciós hurkot képez (4.20.(b) ábra). A jelenség jól tanulmányozható a *Drosophila* és más szervezetek meiotikus vagy politén kromoszómáin.

A deléciók azonosítására más tulajdonságok is felhasználhatók. Először is, a deléciók – ellentétben más mutációkkal – nem alakulnak vagy mutálnak vissza vad típusúvá. Másodsor, a deléciós heterozigótákban a normális kromoszómán elhelyezkedő recesszív allélok megnyilvánulhatnak, mivel a deléciós kromoszómáról a homológ régió hiányzik. A recesszív allélok ilyen megnyilvánulása a **pseudodominancia**, amit fel lehet használni a kiesett szegmentumok hosszának meghatározására. Tételizzük fel, hogy a B és a C gén deléció következtében hiányzik az egyik kromoszómáról (4.20.(b) ábra), ha a normális kromoszómán, a deléciónak megfelelő szakaszon recesszív mutációk találhatók, akkor meg kell jelenniük (4.22. ábra). Az 5. fejezetben ismertetjük, miként lehet a deléciókkal a kromoszómák génsorrendjét meghatározni.

Duplikáció esetén valamely kromoszómaszakasz egynél több példányban van jelen. A deléció a kromoszóma egy részének hiányát jelenti. Mindkét eltérés okozhat fenotípusos változásokat vagy letalitást, a deléciók következménye általában súlyosabb. A meiotikus kromoszómákon a duplikációs és a deléciós heterozigótákban hurkképződés figyelhető meg.

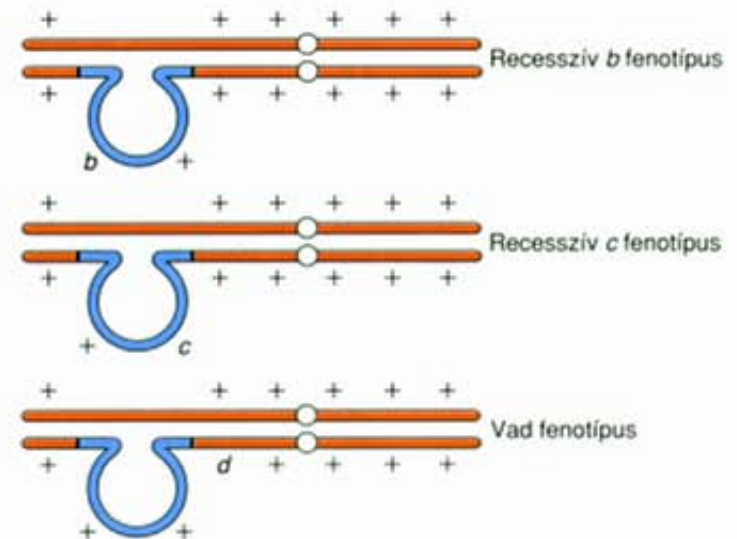
Inverziók

Egy populáció tagjainak homológ kromoszómáin a gének általában azonos sorrendben helyezkednek el. Néhány esetben azonban a sorrend eltérő is lehet. A génsorrend megváltozása az **inver-**

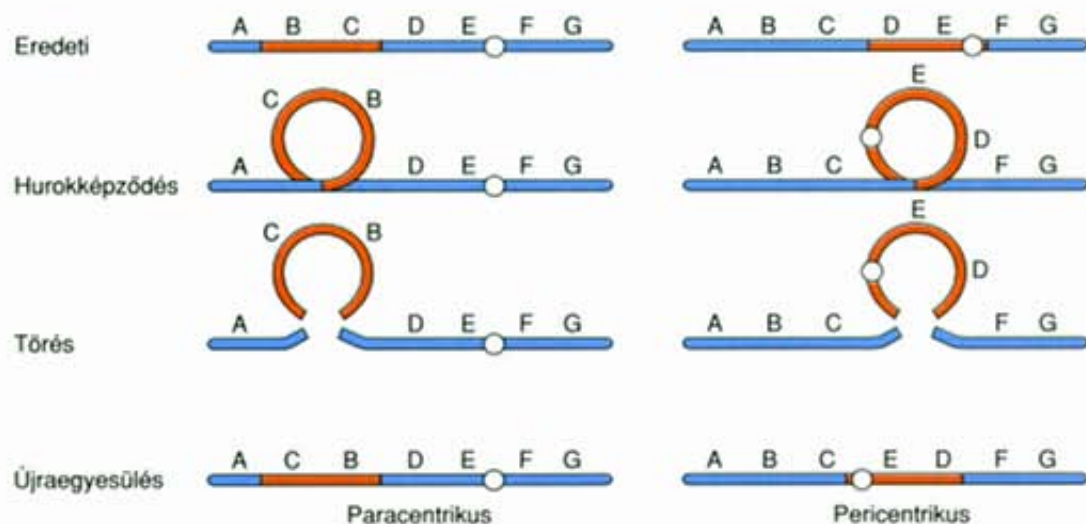
zió, amely a centromeron helyzetéhez viszonyítva kétféle lehet. Ha a megfordult szakasz nem tartalmazza a centromeront, akkor az inverzió **paracentrikus**, ha tartalmazza, akkor **pericentrikus** (görög *para-* = mellett, *peri-* = körül).

Inverziók akkor keletkezhetnek, amikor a kromoszóma két pontján egyidejűleg következik be törés, és ezt szabálytalan újraegyesülés követi. A 4.23. ábra azt szemlélteti, hogyan törhet el egy olyan kromoszóma, amelyen hurok van, és miként illeszkedhet vissza para-, illetve pericentrikus inverziót létrehozva. Figyeljük meg, hogy ez esetben a paracentrikus inverzió az eredetihez hasonló típusú, akrocentrikus kromoszómát eredményez, míg a pericentrikus inverzió, a centromeron helyzetének változása miatt, metacentrikus kromoszómát hoz létre.

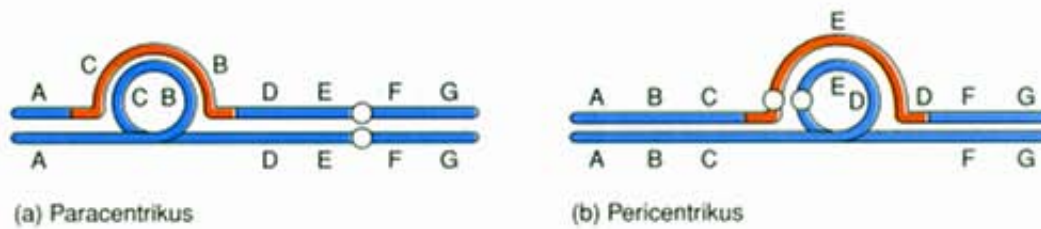
Az inverziós heterozigóták a meiotikus pachitén kromoszómákon látható inverziós hurkok alapján ismerhetők fel,



4.22. ábra. Normális kromoszómájuk B, C vagy D génjében recesszív mutációt hordozó, deléciós heterozigóták

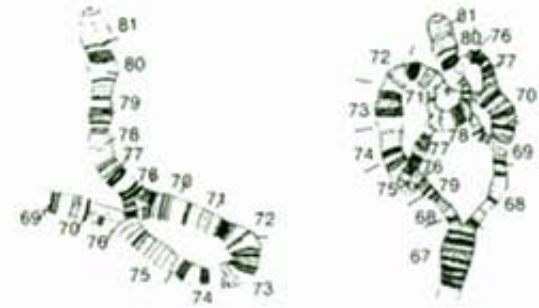


4.23. ábra. Paracentrikus és pericentrikus inverziók kialakulásának mechanizmusa kettős kromozómatörés esetén



4.24. ábra. (a) Paracentrikus inverzióra és (b) pericentrikus inverzióra heterozigóták homológ kromoszómáinak párosodásakor kialakuló hurkok

amelyek a két homológ egymáshoz való affinitása miatt alakulnak ki. A homológ kromoszómák párba állásának egyetlen módja, ha egyikük visszafordul saját magán, és hurkot képez, a másik pedig átfordulás nélkül alkot hurkot. A 4.24. ábra mutatja be a hurkok kialakulásának lehetőségeit. Az inverziós hurkok legjobban a politén kromoszómákon tanulmányozhatók, például a *Drosophila pseudoobscura*-ban. A 4.25. ábrán mind az egyszeres (ún. Arrowhead-standard), mind pedig a többszörös inverzióra (ún. Chiricahua-standard) látható példa. Ezekkel a szekvenciákkal foglalkozunk még a 19. fejezetben is.



4.25. ábra. A *Drosophila pseudoobscura* inverziós heterokariotipusai. Az Arrowhead-standard heterokariotipus (balra) egyszeres, a Chiricahua-standard heterokariotipus (jobbra) pedig többszörös inverziót mutat

Elliot B. Spiess (1938): *Genetics*: 23–28; John Wiley and Sons, Inc.

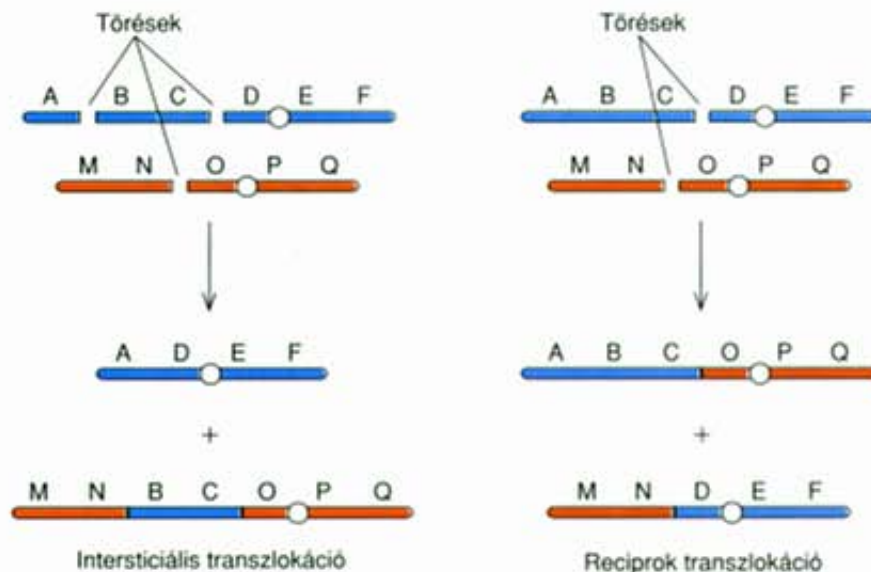
Inverziók akkor jönnek létre, amikor a gének sorrendje megfordul a kromoszómákon.

Transzlokációk

A **transzlokáció** egy kromoszómaszakasz átkerülése egyik kromoszómáról a másik, nem homológ kromoszómára, törés és újraegyesülés révén. A transzlokációnak két alapvető típusa van. Egy szakasz egyirányú áthelyeződése, az **intersticiális transzlokáció**, aránylag ritkán fordul elő. Gyakoribb a **reciprok transzlokáció**, ami a kromoszómadarabok kölcsönös cseréjét

jelent (4.26. ábra). Ha a reciprok transzlokációban szereplő szegmentumok közül kettő nagy, a másik kettő pedig kicsi, akkor a kisebb, transzlokáción átesett kromoszómák gyakran elvesznek. Ilyen esetben a kromoszómális kicserélődés csökkenti a kromoszómaszámot. A transzlokáció mind a kromoszómák méretét, mind pedig a centromeron helyzetét megváltoztathatja.

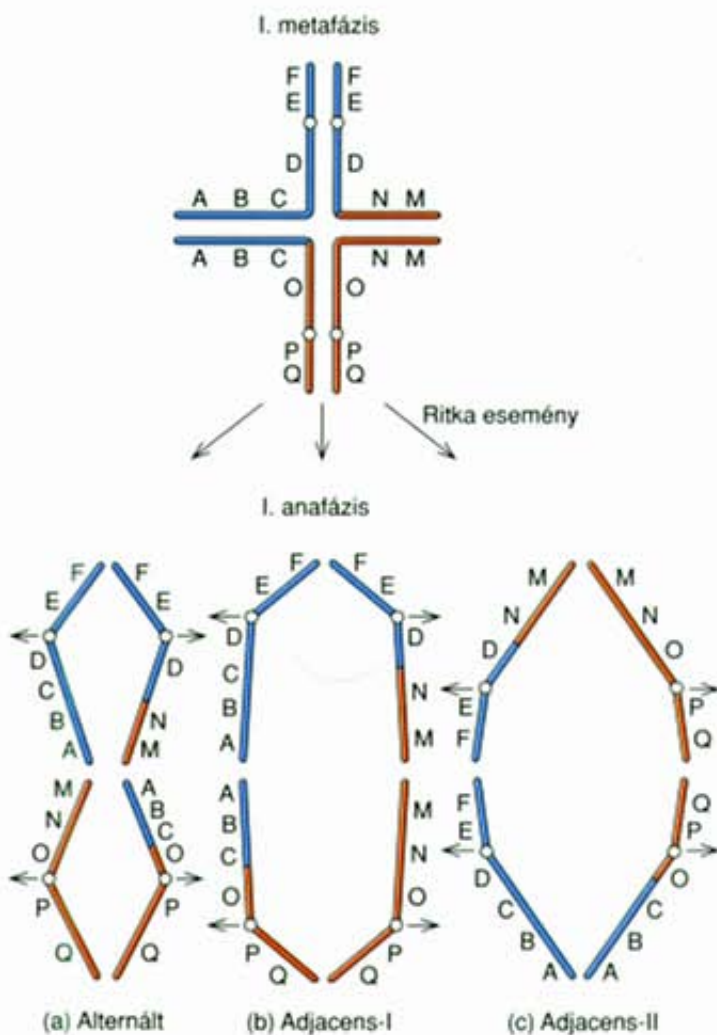
Annak ellenére, hogy a reciprok transzlokáció során a kromoszómaszakaszok kicserélődnek, a homológ régiók affinitása a meiózis I. fázisában párosodáshoz vezet. Ha közel egyforma



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

méretű szakaszok cserélődnek, vagy nem cserélődnek ki, a párosodott kromoszómák a transzlokációs heterozigótában kereszt alakú formában jelennek meg az I. metafázisban (4.27. ábra). Az I. anafázis során a szegregáció két fő típusa lehet: az egyik során az alternált helyzetű centromeronek ugyanarra a pólusra vándorolnak, a másik esetben a szomszédos centromeronek kerülnek ugyanarra a pólusra. A harmadik szegregációs forma, amely a 4.27. ábrán látható, igen ritka, mivel előfeltétele, hogy a homológ centromeronek ugyanarra a pólusra kerüljenek.

Amikor az alternált centromeronek vándorolnak azonos pólusra, akkor a kromoszómák gyakran nyolcas alakzatot vesznek fel az I. anafázis elején. (A kiazma terminalizációja során a homológ kromoszómák végei együtt maradnak.) Az ilyen ún. **alternált szegregáció** eredményeként kiegyensúlyozott gaméták jönnek létre teljes kromoszómakészlettel: vagy két nem transzlokációs vagy két kiegyensúlyozott transzlokációs gaméta. **Adjacens szegregáció** esetén a szomszédos centromeronek együtt hasadnak, a kromoszómák az I. metafázisban gyűrű formában jelennek meg. Ilyenkor a gamétákban található duplikációk és deléciók miatt a termékek kiegyensúlyozatlanok.

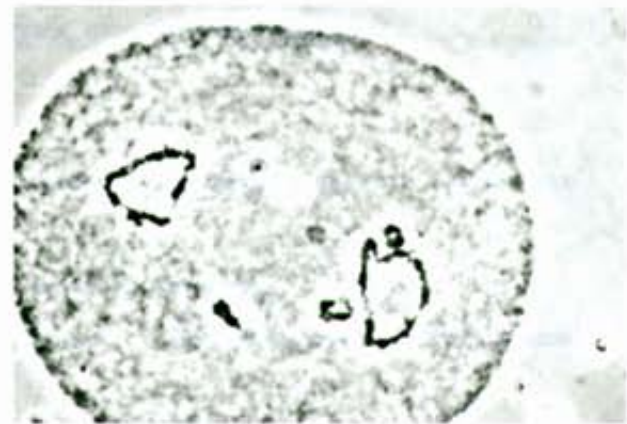


4.27. ábra. Reciprok transzlokációra heterozigóta meiózisének eredményei. (a) Az alternált szegregáció termékei kiegyensúlyozott kromoszómák. (b) és (c) Az I és a II típusú adjacens szétválás duplikációt és deléciókat eredményez

Néhány növény és állat a reciprok transzlokációk sorozatát hordozza, így a kromoszómális heterozigóták majdnem mindegyik kromoszómája egyetlen nagy gyűrűvé (vagy gyűrűkké) kapcsolódik össze a meiózisban (4.28. ábra). Anafázisban ezek a kromoszómák szabályos alternált hasadással válnak el, és így kiegyensúlyozott kromoszómakészletű zigóták keletkeznek.

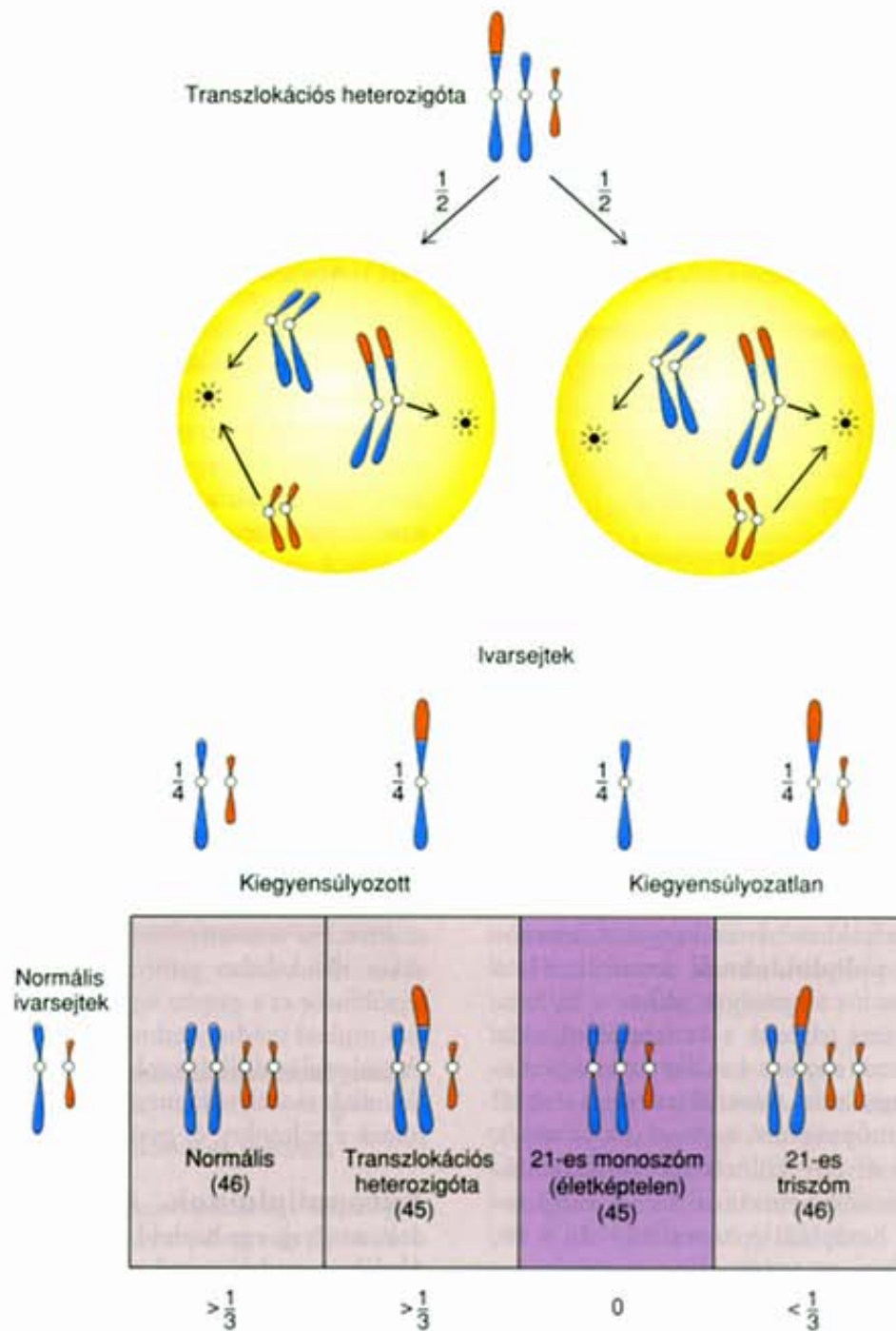
Bár a transzlokációk eredményezhetnek normális kromoszómákat, több emberi betegség hátterében transzlokáció áll. A **Down-kóros** betegeknek mintegy 5%-ánál az egyik szülő transzlokációs heterozigóta (4.29. ábra). Ebben az esetben a 14. kromoszóma helyeződött át a 21-es kromoszómára. A heterozigóta fele részben vagy normális, vagy kiegyensúlyozott transzlokációs kromoszómakészletet hoz létre, és így az utódok normálisak, illetve transzlokációs heterokariotípusúak. Ugyancsak fele részben nem kiegyensúlyozott kromoszómák keletkezhetnek: vagy egy 14-es kromoszóma a 21-es kromoszómához nélkül vagy egy transzlokációs 14-es kromoszóma a 21-es résszel, valamint egy normális 21-es kromoszóma. Az első esetben az utódokba csak egyetlen 21-es kromoszóma kerülne, ami letális. A második esetben az utódnak három 21-es kromoszómája lesz, ez a Down-kór genetikai háttere. A transzlokációs heterozigóták életképes utódainak átlagosan $\frac{1}{3}$ -a Down-kóros. Ténylegesen ez a számarány kisebb, mert egy részük méhen belül elhal.

A vázoltak miatt a Down-kór problémákat vet fel a genetikai tanácsadások során. Először, mert a Down-kór ismét megjelenhet a transzlokációs heterokariotípus gyermekei között, noha rendszeren nem jelenik meg a testvérekben (l. a triszómia tárgyalását a fejezet későbbi részében). Másodsor, a Down-kóros egyének fenotípusosan normális testvéreinek fele transzlokációs heterokariotípusú, és így nekik is születhetnek Down-kóros gyermekeik.



4.28. ábra. Kerti díznövény (*Clarkia sp.*) osztódó sejtje. A hat transzlokációs gyűrűből kettő jól látható. A felvételen három kisebb bivalens is megfigyelhető

William L. Bloom, University of Kansas engedélyével



4.29. ábra. Down-kóros (21-es triszóm) kariotípus kialakulása transzlokációs heterozigótából. A 14-es kromoszóma kék, a 21-es kromoszóma pedig piros színű

A transzlokáció kromoszómaszakasz(ok) áthelyeződését jelenti nem homológ kromoszómára. A transzlokációs heterokariotípusokban alternált szegregáció esetén normális meiotikus termékek keletkeznek, más esetekben duplikációk és deléciók lépnek fel.

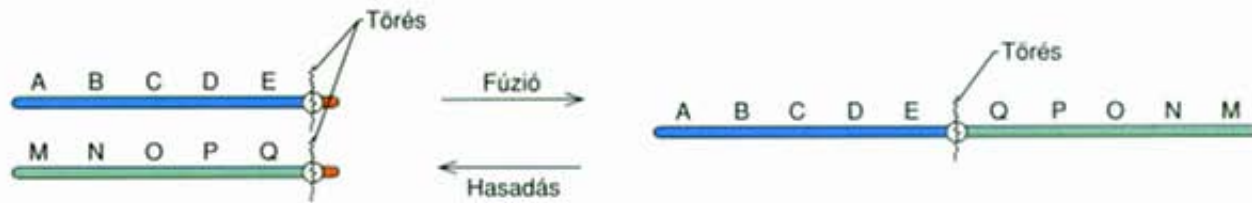
KROMOSZÓMASZÁM-VÁLTOZÁSOK

A kromoszómaszám-változások két alapvető típusba sorolhatók. **Euploidia** esetén a változás az egész kromoszómaszerelvényre kiterjed, míg az **aneuploidia** csak bizonyos kromoszómák számának

eltérését jelenti a diploid értéktől. Mint várható, a kromoszómaszám megváltozása nagyobb hatással van az életképességre, mint a kromoszómaszerkezet módosulásai. Embernél a terhesség első három hónapjában bekövetkező spontán abortuszok több mint felénél aneuploidia, poliploidia vagy más, jelentős kromoszómaaberráció mutatható ki a magzatban.

Mielőtt részleteznénk a genetikai anyag mennyiségének növekedését, illetve csökkenését okozó kromoszómaszám-változásokat, tekintsük át azokat a mechanizmusokat, amelyek során a kromoszómaszám módosulhat.

Már említettük, hogy a reciprok transzlokáció két akrocentrikus kromoszóma között úgy is létrejöhet, hogy a nagyobb



4.30. ábra. Centrikus fúzió akkor fordul elő, amikor két nem homológ, akrocentrikus kromoszóma egy metacentrikussá kapcsolódik össze. Centrikus hasadás esetén egy metacentrikus kromoszóma törik el, és két telocentrikus keletkezik

szegmentumok összekapcsolódnak, és egy nagy metacentrikus kromoszóma, valamint egy kis kromoszóma keletkezik, amely a további sejtsztódások során elvész. Azaz két akrocentrikus kromoszóma kombinálódhat egy metacentrikussá. Ez a mechanizmus az ún. **kromoszomális** (centrikus) **fúzió**, amelyben két nem homológ kromoszóma kapcsolódik össze a centromeroknál, és egy metacentrikus kromoszómát hoz létre (4.30. ábra). Másrészt, egy kromoszóma hossz tengelyére merőlegesen ketté is hasadhat a centromeronnál és így **kromoszomális** (centrikus) **hasadás** révén két kisebb kromoszóma keletkezik. Általános vélemény, hogy a kromoszomális fúziók sokkal gyakoribbak a hasadásnál. A fejezet későbbi részében bemutatjuk a fúzió egy példáját, amely az ember 46 kromoszómájának kialakulását eredményezhette.

Poliploidia – euploidia

Azokat a szervezeteket, amelyekben három vagy több kromoszómaszerelvény található, **poliploidoknak** nevezzük. Ha a haploid kromoszómaszámot x -szel jelöljük, akkor a $3x$ kromoszómaszerelvényű szervezet triploid, a $4x$ tetraploid, a $6x$ pedig hexaploid stb. A fejezet elején a haploid kromoszómaszám jelölésére az n -et használtuk. Azoknál a szervezeteknél azonban, amelyek rendszerint poliploidok (mint sok növény), x jelenti a kromoszómaszerelvény különböző tagjainak számát, n pedig a gaméták kromoszómaszámát. Ennek megfelelően egy 60 kromoszómás hexaploid esetében $6x = 2n = 60$, amiből az $x = 10$ és $n = 30$.

A poliploidia viszonylag gyakori a növényeknél, de ritka az állatvilágban: csak néhány bogárfajnál, gilisztafajoknál, a szalamandránál, egyes halaknál és néhány más szervezetnél fordul elő. A virágos növényeknek viszont közel a fele poliploid, és közöttük sok fontos termesztett növény is van. A burgonya például tetraploid ($4x = 48$), a kenyérbúza hexaploid ($6x = 42$), a földieper oktoploid ($8x = 56$).

A poliploidia több ok miatt is ritkább az állatoknál, mint a növényeknél. Először is, az ivari meghatározottság sokszor érzékenyebb a poliploidiaira az állatoknál, mint a növényeknél. Másodszor, a növényeknél az öntermékenyítés gyakori, így egyes poliploid növények páros számú kromoszómagarnitúrával (tetraploidok, hexaploidok) még képesek szaporodni. Végül, a növények könnyebben hibridizálódnak más, közeli rokon fajokkal. Ez utóbbi fontos jellegzetesség, mert a poliploidok különböző kromoszómakészletei gyakran más fajokból származnak.

A poliploidoknak két alaptípusát különítjük el. Az **autopoliploidok** mindegyik kromoszómakészlete azonos fajtól, míg az **allopoliploidok** kromoszómagarnitúrája különböző fajtól származik. Például, ha egy diploid növény diploid, redukálatlan pollenje ugyanannak a fajnak egy diploid, redukálatlan petesejtjét termékenyíti meg, az utód **autotetraploid**, vagyis $AAAA$ lesz, ahol az A az A típusú egyszeres kromoszómakészletet, a **genomot** jelöli. Amikor egy faj diploid pollenje egy másik, rokon faj diploid petesejtjét termékenyíti meg, az utód **allotetraploid**, vagyis $AABB$ lesz, ahol a B egy másik faj genomját jelenti. Az autopoliploidok teljes kromoszómaszerelvénye homológ, hasonlóan a diploidokéhoz. Az allopoliploidokban azonban a különböző kromoszómagarnitúrák valamelyest eltérők, ezért **homológok** vagy részlegesen homológok.

Természetes körülmények között is előfordulnak poliploidok, de igen kis gyakorisággal. Ha például mitóziskor, minden kromoszóma ugyanarra a pólusra vándorol, akkor a sejt kromoszómaszáma autotetraploid lesz. Ha abnormális meiózis zajlik le, akkor redukálatlan gaméta keletkezhet $2n$ kromoszómával. A legtöbbször ez a gaméta egy szabályos haploid gamétával egyesül, ami triploid utódot eredményez. Mesterséges poliploidokat kolchicinkezeléssel állíthatunk elő. A kolchicin az osztódási orsó kialakulását akadályozza meg, hatására a kromoszómák nem vándorolnak a pólusokra, és gyakran autotetraploidok keletkeznek.

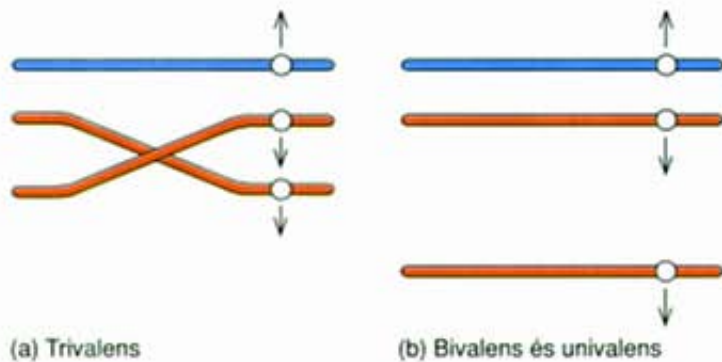
Autopoliploidok. A triploidok rendszerint autopoliploidok, amelyek egy haploid és egy diploid gamétából származnak. Általában sterilek, mivel a kiegyensúlyozott ivarsejt kialakulásának valószínűsége igen csekély. Meiózisban a három homológ párosodhat, és trivalenst alkothat, esetleg kettő közülük bivalenst képez, a harmadik pedig univalens marad. A gaméták egy adott kromoszómából egyforma valószínűséggel tartalmazhatnak egy vagy két példányt (4.31. ábra). Ugyanakkor, mivel a nem homológ kromoszómák viselkedése független, annak valószínűsége, hogy egy gaméta pontosan n kromoszómát tartalmazzon $(\frac{1}{2})^n$, és annak valószínűsége, hogy $2n$ kromoszómát tartalmazzon szintén $(\frac{1}{2})^n$. Az összes többi gaméta kiegyensúlyozatlan és általában működésképtelen, ugyanígy a belőlük képződő zigóták is. A legtöbb banán például triploid, így kiegyensúlyozatlan gamétákat termelnek és nincs magjuk (dugványozással szaporítják őket). A páratlan számú kromoszómakészlettel rendelkező egyéb poliploidok (pl. pentaploidok) ugyancsak sterilek.

A poliploidok gyakran nagyobb termetűek (nagyobb gyümölcsöket is teremnek) diploid rokonaiknál, ezért sok élelmiszer-növényünk autotetraploid vagy más típusú poliploid. Az

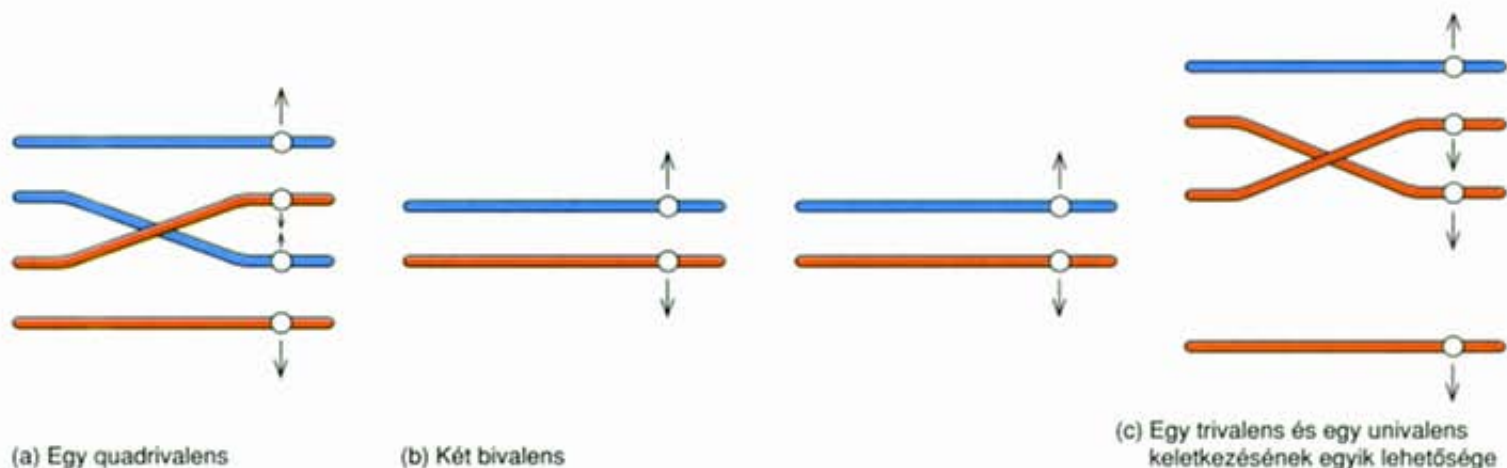
autotetraploidok meiózisa normális lehet, ha csak bivalensek vagy quadrivalensek alakulnak ki. Ha azonban a négy homológ trivalenst és univalenst képez, a gamétákba túl sok, vagy túl kevés kromoszóma kerül (4.32. ábra).

Allopoliploidok. A legtöbb természetben fellelhető poliploid allopoliploid, és új fajt képvisel. Így például a kenyérbúza (*Triticum aestivum*) allohexaploid és 42 kromoszómája van. A rokon vad fajok vizsgálatából kitűnik, hogy a kenyérbúza három különböző diploid ősteszta leszármazottja. Az ősök mindegyikének két genomja vesz részt a kenyérbúza *ABBDD* genomjának kialakításában. Szinapszist képezni csak a homológ kromoszómák képesek, ezért a meiózis szabályos, és kiegyensúlyozott gamétákat eredményez ($n = 21$).

Különösen érdekes allotetraploidot állított elő az orosz G. Karpecsenko 1928-ban, amikor a 18 diploid kromoszómaszámú káposztát és a retek keresztezte. Olyan hibridet akart előállítani, amelynek föld feletti része a káposztáéval, gyökere pedig a retekével mutat hasonlóságot. A mesterséges hibridből kapott magokat elültette, és meghatározta az utódok kromoszómaszámát, ami 36 volt. Reményeivel ellentétben, a hibridnek a levele volt a retekéhez és gyökere káposztáéhoz hasonló.



4.31. ábra. Meiotikus kromoszómapárosodás és a homológok mozgásának iránya triploidokban, amikor (a) trivalens vagy (b) bivalens és univalens keletkezik



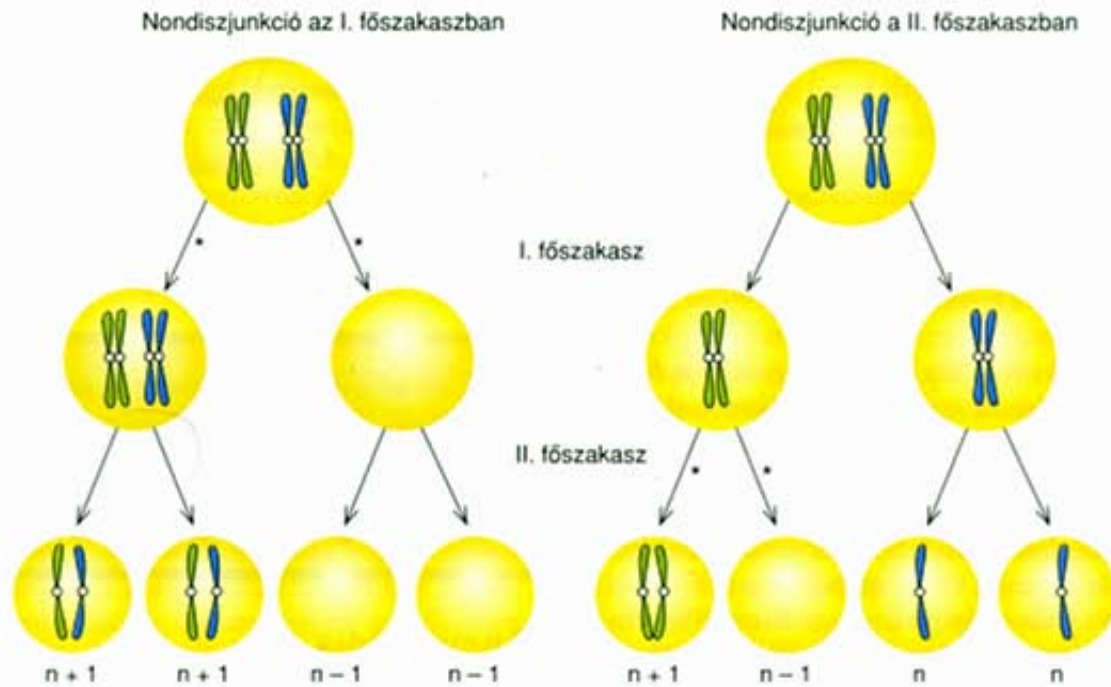
4.32. ábra. Meiotikus párosodás és a homológok mozgása tetraploidokban (a) egy quadrivalens és (b) két bivalens esetén. (c) Egy trivalens és egy univalens keletkezésének egyik lehetősége

Amikor egy *A* genomot tartalmazó pollen megtermékenyíti egy *B* genomot hordozó virág petesejtjét, az eredmény a steril *AB* genom összetételű hibrid lesz. Ha annak meiózisában osztódási rendellenesség miatt egy sejtvonalban nem válnak el a kromoszómák, *AABB* sejtek keletkezhetnek. Amennyiben az ezekből származó növények öntermékenyítők, akkor allopoliploid keletkezett. A növénynevelítők kolchicint használnak a steril hibrideknél allopoliploidok előállítására.

A két kromoszómagarnitúránál többet tartalmazó poliploidok gyakoriak a növényvilágban. Az autopoliploidok kromoszómakészletei ugyanattól a fajtól származnak. Az allopoliploidok különböző fajokból származó kromoszómagarnitúrákat tartalmaznak.

Aneuploidia

Ismertettük már Bridges megfigyeléseit arra vonatkozóan, hogy a *Drosophilának* alkalmasszerűen olyan egyedei jelennek meg, amelyeknek vagy egy (pl. egy *X*), vagy három ivari kromoszómájuk van (pl. *XXY*). Ennek az aneuploidának az oka a nondiszjunkció, vagyis az, hogy a meiózis során a két homológ kromoszóma együtt marad, nem vált el. A nondiszjunkció egyik oka valószínűleg a nem megfelelő kromoszómapárosodás a meiózis korai fázisában, melynek következtében a centromerok nem az egyenlítői sík két oldalára kerülnek. A másik ok lehet rendellenes kiazma képződése. Ennek eredményeként mindkét homológ ugyanarra a pólusra kerül, az egyik leánysejtben egy számfeletti, a másikba pedig eggyel kevesebb kromoszóma jut. Ha ezek az ivarsejtek normális gamétával egyesülnek, akkor a zigóta **trisómiás**, azaz eggyel több kromoszómát tartalmaz ($2n + 1$), vagy **monosómiás**, azaz eggyel kevesebb kromoszómát tartalmaz ($2n - 1$). A nondiszjunkció leggyakrabban a meiózis I. fázisában következik be, de a II. fázisban is sor kerülhet rá (4.33. ábra). Ha mitózisban jelentkezik rendellenes szétválás, akkor az érintett szövetben normális és



4.33. ábra. Nondiszió a meiózis I. és II. fázisában (*-gal jelölve az adott kromoszómat) és az így képződött gaméták

aneuploid sejtek mozaikja alakulhat ki. A számfeletti kromoszómáknak más kombinációi is léteznek, közülük a legfontosabb a tetraszómia $2n + 2$, illetve a nulliszómia $2n - 2$ kromoszómával (ez utóbbinál hiányzik az egyik homológ pár).

Triszómiás változat sok faj esetében ismert. Növényeknél ezek nagy része életképes, állatoknál csak ritkán. Az egyik leg részletesebben tanulmányozott aneuploid faj a csattanó maszlag (*Datura stramonium*). Alfred Blakeslee 1920 körül különös tulajdonságokkal rendelkező *Datura*-mutánsok sorozatát vizsgálta, amelyek triszómiásak voltak különböző kromoszómákra. Mind a tizenkét kromoszómára talált triszómiás változatokat, amelyek mindegyikének speciális fenotípusa volt. A toktermés megjelenése egészen eltérő volt, ami azt sejteti, hogy az egyes kromoszómák génjei más-más hatást gyakorolnak erre a bélyegre (4.34. ábra).

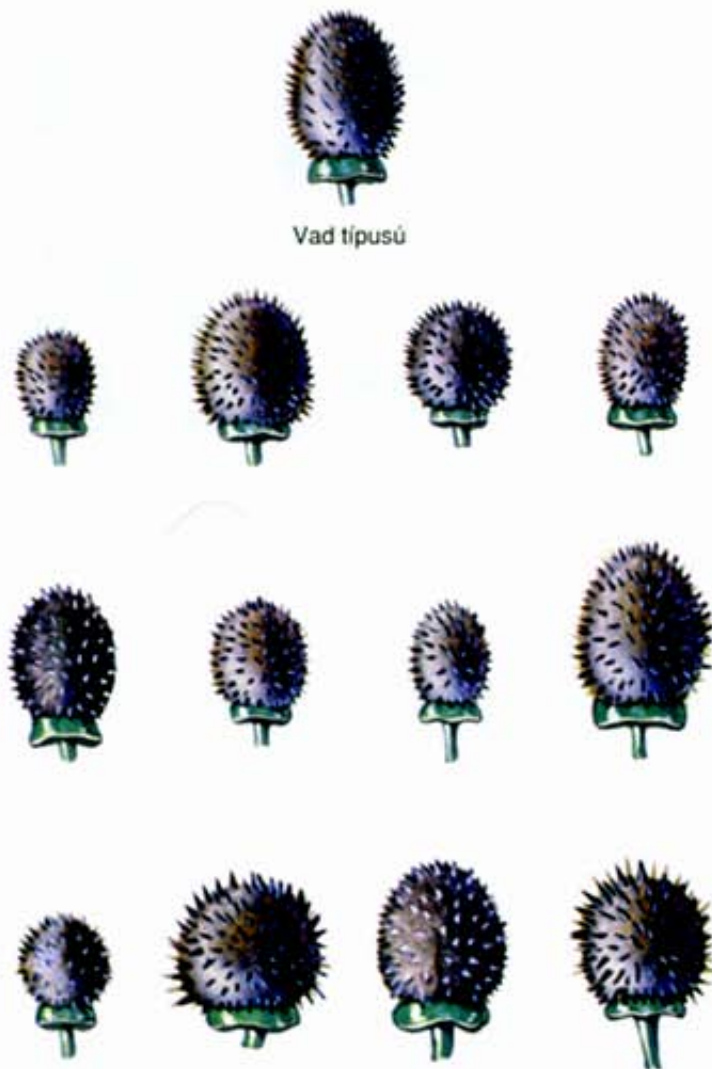
Kukorica, rizs és búza triszómiás változatait vizsgálták, hogy azonosítsák a különböző géneket hordozó kromoszómákat. A triszómiás növényekkel végzett keresztezések szokatlan hasadási arányokat adtak. Így például homozigóta domináns triszómiást (AAA) a recesszív diploiddal (aa) keresztezve, az utódok fele triszómiás AAa , fele pedig diploid Aa volt. Amikor a triszómiás utódokat visszakeresztették az aa egyeddel, a kapott utódoknak mintegy $\frac{1}{3}$ -a volt aa recesszív (4.35. ábra). Ha az érintett gén olyan kromoszómán lett volna, amelyik nem triszóm, akkor az F_1 Aa genotípusú lett volna, a visszakeresztésből kapott utódoknak pedig a fele, és nem az $\frac{1}{3}$ -a tartozott volna a homozigóta recesszív (aa) genotípusba.

Az állatok körében a triszómia és más aneuploid kromoszómakombináció még szokatlanabb. Embernél a spontán vetélések kromoszómális hátterét vizsgálva kitűnik, hogy majdnem mindegyik monoszómiás vagy triszómiás embrió letális. Ugyan-

akkor vannak olyan triszómiások, akik élve születnek, és meglehetősen nagy hányadát képviselik a veleszületett rendelleneségeknél. A leggyakoribb ilyen jellegű eltérések egyike a Down-kór, a 21-es kromoszóma triszómiája. Átlagosan minden hétszázadik élve születésre esik egy (4.4. táblázat). A Down-kört körülbelül 150 évvel ezelőtt írták le először. Jellemzője a szellemi visszamaradottság, a tenyér rendellenes bőrlécmintázata és a jellegzetes arc. A halandóság is nagyobb az átlagosnál, a várható élettartam a környezettől függően tizenéves kortól a negyvenes évekig, ritkán tovább is tart. A Down-kóros emberek általában pozitív személyiségek, és vannak közöttük, akik korlátozott mértékben független életre is képesek (4.36. ábra).

A Down-szindróma kromoszómális alapját 1959-ben fedezték fel, nem sokkal azután, hogy az ember pontos diploid kromoszómaszámát meghatározták. Kromoszómaszávozásos módszerrel kimutatták, hogy a Down-kört ténylegesen a legkisebb, a 22-es kromoszóma triszómiája okozza. De mivel igen elterjedt az a korábbi adat, hogy a 21-es triszómia következménye, ezt a kapcsolatot nem változtatták meg, ezért a legkisebb kromoszómat nevezik 21-esnek. A jelenleg elterjedt némenklátúra szerint egy 21-es triszómia jelölése: 47, +21. A 47 jelenti a teljes kromoszómaszámot, a +21 pedig azt, hogy a 21-es kromoszómából három található a genomban. Az előzőekben már tárgyaltuk, hogyan alakulhat ki ez a rendellenesség a reciprok transzlokációs heterokariotípusból, de leggyakrabban (az esetek 95%-ában) a homológ párok együtt maradásának, a nondiszióknak a következménye. Más autoszómás triszómiák sokkal ritkábbak, mert a magzatok életképtelenek.

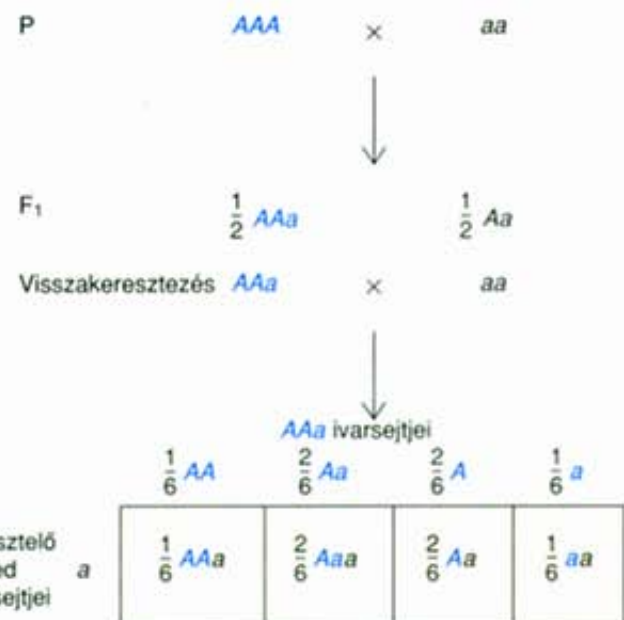
Az ivari kromoszómák szabálytalan szétválása többféle emberi kromoszómaaberráció forrása. A 4.5. táblázat a normál



4.34. ábra. A vad típusú *Datura* termés és a tizenkét triszómiás típus

meióziszból és a homológ párok együtt maradásából származó gamétákat és zigótákat mutatja be. Megjegyzendő, hogy négy aránylag gyakori, életképes, de rendellenes kromoszómakombináció, az X0, XXX, XXY és XYY is nondiszjunkció következménye. A 0 az egyik ivari kromoszóma hiányát jelenti a gamétában vagy a zigótában.

A **Klinefelter-kór** XXY-kombináció (47, XXY) viszonylag ritka, és általában enyhe rendellenességgel jár. Az érintett férfiak meddők, néhány nőies vonással. A **Turner-kórban** szenvedők X0 (45, X) genotípusú, alacsony termé, steril nők, jellegzetesen rövid nyakkal. Az XYY (47, XYY) gyakorisága ezer férfi között körülbelül egy, de ezeknek a személyeknek veleszületett rendellenességük nincs. Felmerült korábban, hogy az XYY személyek között a bűnő-



4.35. ábra. Egy F₁ triszómiás és egy diploid homozigóta recesszív keresztezése. Az utódok 1/6-a recesszív fenotípusú

4.4. táblázat. A leggyakoribb aneuploid típusok gyakorisága és hatása embernél

Kór	Nem	Kromoszómák	Gyakoriság		Várható életképesség és termékenység
			Vetélés	Születés	
Down	F vagy N	21. Triszómia (47, +21)	1/40	1/700	15 év, ritkán fertilis
Patau	F vagy N	13. Triszómia (47, +13)	1/33	1/15 000	<6 hónap
Edward	F vagy N	18. Triszómia (47, +18)	1/200	1/5000	<1 év
Turner	N	X0 (45, X)	1/18	1/5000	Meddő
Metanő	N	XXX (47, XXX)	0	1/700	Majdnem mindig meddő
Klinefelter	F	XXY (47, XXY)	0	1/2000	Meddő
XYY	F	XYY (47, XYY)	?	1/2000	Normális



4.36. ábra. Down-kóros kislány

© M. Coleman/Visuals Unlimited

zõ hajlam gyakoribb, de a részletesebb elemzések szerint, ha egyáltalán van korreláció, akkor az minimális. A bebörtönzöttek között az XYY genotípusúak gyakorisága szignifikánsan magasabb, mint a normális populációkban, ugyanakkor az összes XYY személynek kevesebb, mint 5%-a ténylegesen büntetett.

A fejlődő magzat rendellenes kromoszómaszámát magzatvízvizsgálattal (**amniocentesis**) lehet diagnosztizálni (4.37. ábra). Az eljárás során a magzatvízből mintát vesznek, a kinyert magzati eredetű sejteket két-három hétig sejtenyészetben szaporítják, majd az osztódó sejteket megfestik, és kariotípust készítenek.

Az X-kromoszóma lényegesen különbözik a többi kromoszómától abban, hogy sejtenként csak egy aktív példány található belőle. A szabályos kariotípusú férfiaknak egy X-kromoszó-



4.37. ábra. Amniocentesis

© Eric Kroll

májuk van, és az mindegyik sejtben működik. A normális kariotípusú nők egy sejtjében csak az egyik X-kromoszóma aktív. A másik heterokromatinizálódik vagy többnyire inaktív, és az ún. **Barr-testet** alkotja a sejtmagban (4.38. ábra). A szabályos kariotípusú férfiak és az X0 genotípusú nők sejtjeiben nem látható Barr-test, míg a normális kariotípusú nők és az XXY genotípusú férfiak sejtjeiben egy-egy, az XXX típusú személyek sejtjeiben pedig kettő-kettő figyelhető meg. Más szóval, a Barr-testek számának meghatározásával azonosíthatók az X-kromoszómát érintő rendellenességek.

A Down-kór és más aneuploid eltérések gyakorisága az anya életkorával nő (4.39. ábra). A 45 év feletti anyák gyermekei között a Down-kór közel ötször gyakoribb, mint húsz év alatti anyák esetében. Bár a növekedés pontos magyarázata ismeretlen, valószínűleg kapcsolatban áll a férfiak és a nők gametogenezisének különbségeivel. A nőkben az oociták a születés előtt képződnek, és a meiózis I. profázisában maradnak az ovulációig. Idősebb anyákban az érésnek induló oocita több mint negyven évet ebben a stádiumban tölthet, mialatt igen sok környezeti hatás érheti.

4.5. táblázat. Szabályos meiózis, illetve nondiszjunkció során keletkező ivarsejtek és zigóta

Petesejt

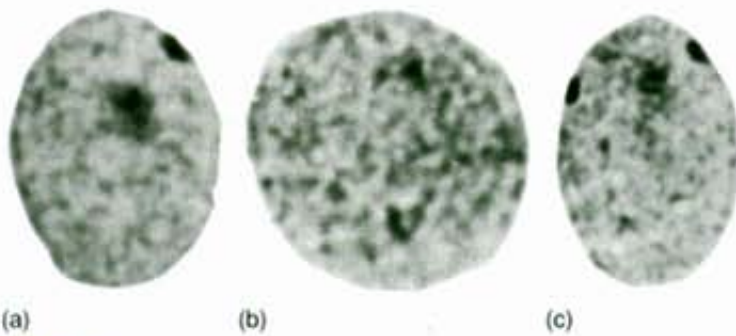
	Spermium	Nondiszjunkció (Meiózis I vagy II. fázisakasz)		
		Szabályos meiózis	XX	0
Szabályos meiózis	X	X	XX	0
	Y	XY	XXY	X0
Nondiszjunkció az I. fázisakaszban	XY	XXY		Y0*
	0	X0		
Nondiszjunkció a II. fázisakaszban	XX	XXX	Rendkívül ritka	
	YY	XYY		
	0	X0		

* Nem létező zigóták

Az aneuploidia kromoszómatöbblet vagy kromoszómahiány a normális értékhez képest. A triszómia, amely egy számfeletti kromoszómat jelent a kariotípusban, növényekben és emberben is előfordul. Emberben többféle rendellenességet okoz.

KÜLÖNBÖZŐ FAJOK KROMOSZÓMÁI

Mint az előzőekben már láttuk a kromoszómák száma és szerkezete egy fajon belül is változhat. Amikor rokon fajok kromoszómáit hasonlítjuk össze, gyakran tapasztalunk közöttük hasonló-



4.38. ábra. (a) Normális kariotípusú nő (XX) sejtmagja egy Barr-testtel, (b) normális kariotípusú férfi (XY) sejtmagja Barr-test nélkül, (c) XXX genotípusú nő sejtmagja két Barr-testtel

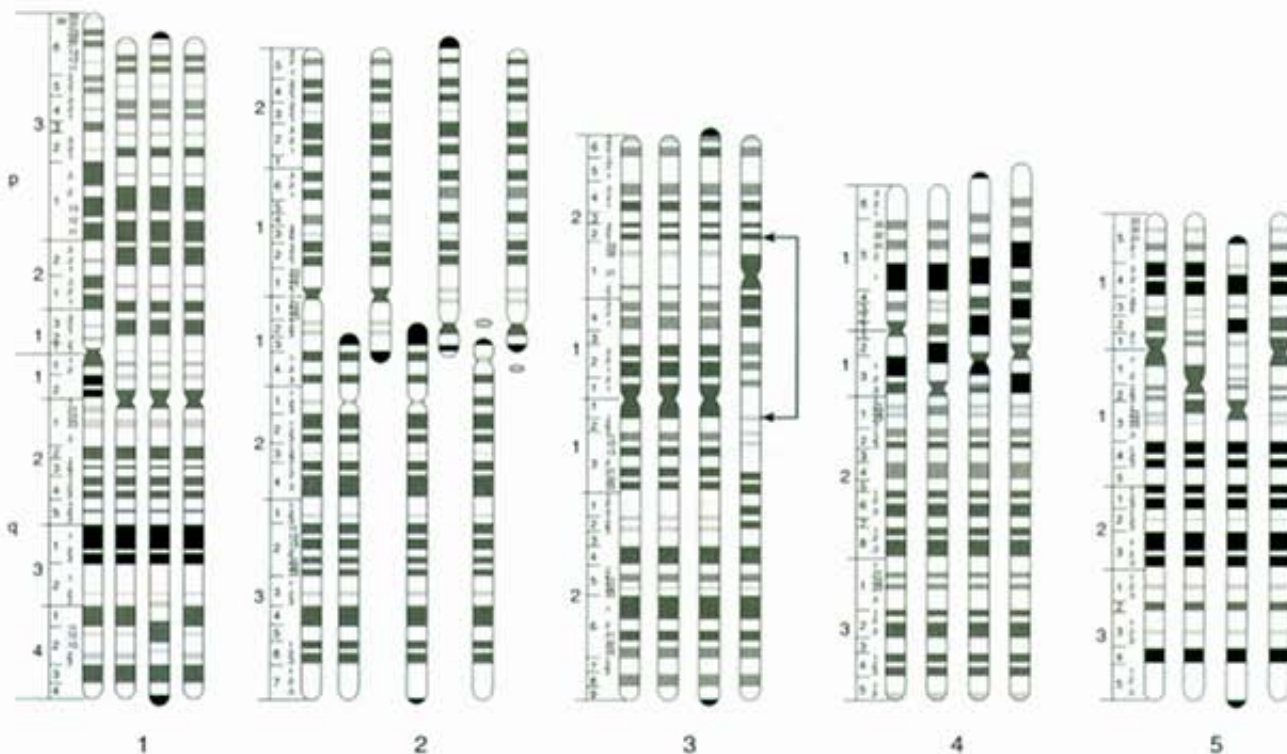
Dr. Dorothy Warburton/Peter Arnold, Inc.

ságot. Régebbi vizsgálatok szerint egyes *Drosophila*-fajok kromoszómainak sávozási mintázata nagyfokú homológiát mutat. *Drosophila melanogaster* és *Drosophila simulans* – amelyek a hímek ivarszerveinek anatómiáját kivéve szinte mindenben megegyeznek – esetében majdnem azonos a sávozási mintázat, csak néhány inverzióban különböznek.

Az új, nagy felbontású kromoszómasávozási eljárások sok faj kromoszómainak összehasonlítását teszik lehetővé. Számos összehasonlító vizsgálatot végeztek az ember és a rokon emberszabású majmok kromoszómaival. Az ember diploid kromoszómaszáma 46, míg a csimpánzoké, a gorilláké és az orangutánoké 48. Ez a számbeli eltérés az emberszabású majmok két nem homolog kromoszómájának centrikus fúziójára vezethető vissza, feltételezhetően ezekből alakult ki az ember 2-es kromoszómája (4.40. ábra). Figyeljük meg, hogy a három em-



4.39. ábra. Down-kóros gyermekek gyakorisága az anyák életkorának függvényében



4.40. ábra. Az öt legnagyobb kromoszóma (1–5) sávozási mintázata a profázis késői szakaszában embernél, csimpánznál, gorillánál és az orangutánnál (balról jobbra)

berszabású majom két akrocentrikus kromoszómája – amely homológ az ember 2-es metacentrikus kromoszómájával – a fúziós régió és a terminális heterokromatin kivételével azonos sávozási mintázatot mutat.

Számos más szerkezeti eltérés is van a négy faj kromoszómái között. Például az ember 3-as kromoszómájának sávozási mintázata megegyezik a csimpánzéval, a gorilláéval, de az orangutánétól két inverzióban eltérő. A 4.40. ábrán az inverziók közül a legnagyobb töréspontjait nyilak jelzik. Látható, hogy az inverzió pericentrikus és a metacentrikus kromoszóma akrocentrikussá alakult. A fajok között csak egy transzlokációs különbség van, mégpedig a gorilla 5-ös és 17-es kromoszómája között, a többi fajban ilyen nem fordul elő. Összegezve, az ember kromoszómáinak sávmintázata a csimpánzéval 13, a gorilláéval 9, az orangutánéval pedig 8 kromoszóma esetében közel azonos. Ezeknél a fajoknál majdnem minden egymásnak megfelelő sáv jelen van, ami azt jelzi, hogy a fajok között az elsődleges kromoszomális különbség a gének sorrendjében és nem a gének meglétében vagy hiányában mutatkozik.

A KROMOSZÓMÁK ÉS AZ IVARMEGHATÁROZÁS

Tudományos alapok nélkül elméletek százait írták le a múltban, amelyekkel a nemek kialakulásának módját próbálták magyarázni, ilyen volt többek között a holdjárás, a megtermékenyítés napszaka és egyéb más tényezők. A valóságban a nem kialakulásának nincsen egyetlen, általános érvényű módja, nagyszámú különböző mechanizmus létezik, közülük néhányat a környezeti tényezők is erősen befolyásolnak. A hüllők tojásaiból például magas hőmérsékleten egyes fajoknál inkább hímek, másoknál inkább nőstények kelnek ki. Néhány halfajban a szociális dominancia befolyásolja az ivart, bizonyos növények esetén pedig különböző nemű egyedek jelennek meg a nappal hosszúságától vagy más, a növekedési rátát befolyásoló tényezőtől függően.

A szervezetek többségében azonban a nemet kromoszomális különbségek szabják meg (4.6. táblázat). A kromoszomális alapú ivarmeghatározást először 1905-ben egy rovarfajon (*Protenor sp.*) írták le. Felfedezték, hogy a nőstényeknek két X-kromoszómájuk van, a hímeknek pedig csak egy. A hím gamétái egyforma gyakorisággal tartalmaztak egy X-kromoszómát vagy egyet sem, míg a petesejtek mindig egy X-et hordoztak,

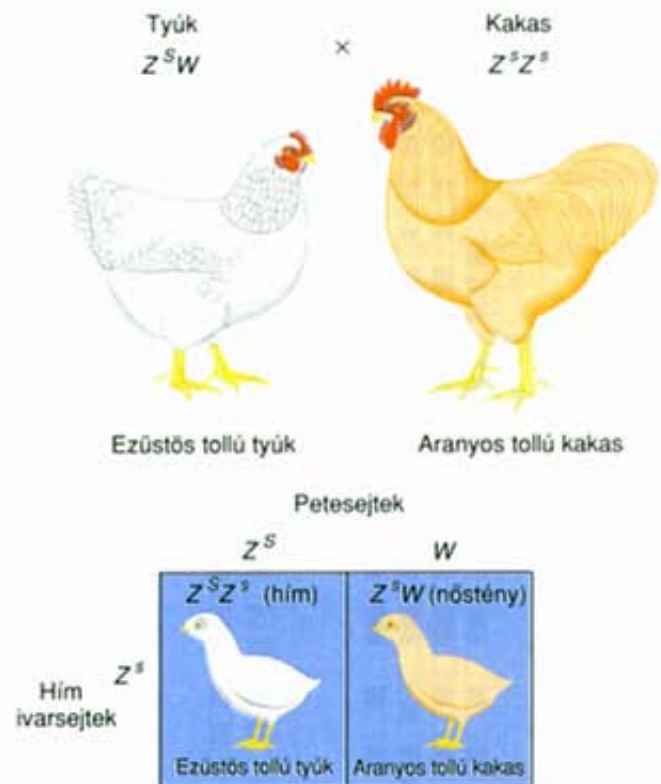
4.6. táblázat. A kromoszomális ivarmeghatározás típusai

Szervezet	Nőstény	Hím
A legtöbb emlős, néhány rovar és növény	XX	XY
<i>Protenor</i> és egyéb rovarok	XX	X
Madarak, a legtöbb hüllő, lepkék	ZW	ZZ
Hártyásszárnyúak (<i>Hymenoptera</i>)	Diploid	Haploid

tehát az utódok között az XX genotípusú (nőstény) és az X0 (hím) utódok egyenlő arányban voltak.

Nem sokkal ezután, több kutató más szervezetekben kimutatta egy második típusú ivari kromoszóma, az Y-kromoszóma létét. Ezekben a fajokban az X- és Y-kromoszóma együttes megléte a hím, az X két kópiája a női nemet eredményezi. A hímek gamétái kétfélek, az X-et, illetve az Y-t tartalmazó spermiumok egyenlő arányban fordulnak elő. A kétféle ivari kromoszómát tartalmazó nem az ún. heterogamétás nem, míg az XX-es a homogamétás. Más szervezetekben – madarak, néhány hüllő – a hímek a homogamétások és a nőstények a heterogamétások. A keveredés elkerülése érdekében ezeknek a kromoszómáit gyakran Z-vel és W-vel jelölik: a homogamétás hím így ZZ, a heterogamétás nőstény ZW genotípusú. Ilyen esetben tehát a nőstények termelik a kétféle gamétát, a hímek gamétái csak egy Z-kromoszómát tartalmaznak.

A baromfityényszerűségben igen fontos a naposcsibék nemének megállapítása rögtön a kelés után, mivel a tojástermelő állományban a kakasokat nem célszerű felnevelni. A fiatal madarak nemének meghatározása nehézkes és költséges, ezért erre az ivari kromoszómák különbségein alapuló módszereket alkalmazták. Így például a Z kromoszómán található egyik gén recesszív alléja határozza meg az aranyos tollazatszint (vagy a $Z^S Z^s$, vagy a $Z^S W$ genotípussal), domináns alléja pedig az ezüstöt (a $Z^s Z^s$, $Z^s Z^s$ vagy $Z^s W$ genotípusok). A 4.41. ábrán látható keresztezés esetén minden kakas ezüstös, minden jérce aranyos tollazatú lesz, és így az ivar azonosítása a naposcsibéknél is gyorsan és egyértelműen elvégezhető. Vajon a reciprok keresz-



4.41. ábra. Ezüstös tollazatú tyúk és aranyos tollazatú kakas keresztezése, amelyből ezüstös tollazatú kakasok és aranyos tollazatú tojók származnak

tezés ($Z^bZ^b \times ZW$) vezethet-e olyan eredményre, hogy a nemeket meg lehessen határozni a tollazat alapján?

Csaknem minden emlősnél az Y-kromoszóma jelenléte szükséges a hím ivar kialakításához. A Turner-szindrómás emberek (XO) fenotípusosan nők. A Klinefelter-szindrómás emberek (XXY) fenotípusosan férfiak, bár két X-kromoszómájuk van. Ebből az látszik, hogy az Y-kromoszómának van olyan génterméke, amely szükséges ahhoz, hogy a fejlődés a hím jelleg kialakulása irányába induljon el. Ez a kapcsoló gén, az úgynevezett SRY (sex reversal Y) az Y-kromoszómán található, az ivarnak megfelelő fenotípus kialakításában szereplő többi gének pedig nyilvánvalóan más kromoszómákon vannak.

A ritka, fordított nemet mutató egyedek, vagyis az XX genotípusú férfiak és az XY genotípusú nők vizsgálata alapján a kapcsoló gén helyét azonosították az Y-kromoszómán. Az XX férfiakban tulajdonképpen megtalálható az Y-kromoszómának az a darabkája, amely hordozza a férfi jelleget meghatározó gént, az XY nőkből viszont az Y hasonló darabja hiányzik. A *Drosophilának* létezik egy olyan autoszómális mutánsa, a *tra* (transformer), amely homozigóta formában az XX egyedeket – a várakozással ellentétben – hímé és nem nőtényekké alakítja. Ennek ellenkezője ismert az embernél, ahol az X-kromoszómájukon mutáns személyek ún. tesztikuláris feminizációt mutatnak. Az ilyen XY kariotípusú személy fenotípusosan nő, emlője és hüvelye van, de meddő. A mutáció egy hormonreceptorral állhat kapcsolatban, amely megakadályozza, hogy a sejtek a tesztoszteronra reagáljanak, tehát férfias másodlagos nemi jellegek nem alakulnak ki.

Több bizonyíték is utal arra, hogy a kapcsoló funkciót kivéve kevés aktív gén mutatható ki az emberi Y-kromoszómán. Először is, az Y-kromoszóma legnagyobb része heterokromatikus. Másodszor, hosszú karjának mérete igen változatos. (Érdekes módon ez a hosszú kar a japán férfiaknál lényegesen hosszabb, mint más populációk férfitagjainál, de úgy tűnik, hogy ez a változatosság nem befolyásolja sem a termékenységet, sem más fenotípusos bélyegeket.) Végül, nagy variációt mutat az Y hosszú karján a sávazási mintázat mérete és intenzitása is, szembevető fenotípusos következmény nélkül. Ezek a tények alátámasztják azt a hipotézist, hogy az Y nagy része inert (nem aktív), és így működő génterméket nem hoz létre.

Bár a *Drosophila* XX egyedei nőtények, az XY példányok pedig hímek, az Y jelenléte nem feltétlenül szükséges a hím fenotípushoz. Ilyenek voltak a Bridges által is megfigyelt különleges fenotípusok (4.17. ábra), a piros szemű XO hímek és fehér szemű XXY nőtények. Később Bridges triploid vonalakat is előállított, és amikor a különböző számú X-kromoszómával rendelkező egyedeket megvizsgálta, azt tapasztalta, hogy az ivar a *Drosophila* esetében az X-kromoszómák (X) és az autoszómakészletek (A) arányától függ. Például a normális nőtényeknek két X-kromoszómájuk és két autoszómakészletük van, azaz $X/A = 2/2 = 1$ (4.7. táblázat). Ha a normális hímeknek egy X és két autoszómakészletük van, akkor $X/A = 1/2 = 0,5$. Hasonló módon a különleges hímek és nőtények is a 0,5, illetve az 1,0 arányt mutatták.

Amikor Bridges három X-szel és két autoszómakészlettel bíró muslicákat vizsgált, vagyis $X/A = 3/2 = 1,5$ arányt tapasztalt, ak-

4.7. táblázat. A *Drosophila melanogaster* ivari fenotípusai¹

X-kromoszómák száma	Autoszóma-készlet száma	X/A arány	Ivari fenotípus
3	2	1,5	Metanőtény
2	2	1,0	Normális nőtény
2	3	0,67	Interszex
1	2	0,5	Normális hím
1	3	0,33	Metahím

¹ Az autoszómakészlet számának és az X-kromoszómák számának az aránya

kor az ilyen példányok meddő nőtényeknek bizonyultak (néha **metanőtény** az elnevezés). Ezzel szemben az egy X és három autoszóma $X/A = 3/2 = 0,67$ aránnyal a muslicák meddő hímek (metahímek) voltak. Végül, a két X és a három autoszómakészlettel bíró egyedek $X/A = 2/3 = 0,67$ aránnyal mindkét nem bélyegeit mutatták, vagyis **interszexek** voltak. Eredményei alapján Bridges feltételezte, hogy a nőtény jelleget az X-kromoszómák, a hím jelleget pedig az autoszómák határozzák meg. Más szóval, ha az X/A arány 1 vagy ennél nagyobb, akkor a muslicák nőtények, ha pedig ez az arány 0,5 vagy kisebb, akkor hímek. Meg kell azonban jegyezni, hogy *Drosophila* esetében a hím fenotípus kialakításához nem szükséges az Y-kromoszóma, a termékenységhoz azonban elengedhetetlen: az XO hímek és a metahímek sterilek.

A rokon fajok kromoszómái általában hasonlóak. A legtöbb szervezet esetében kromoszómális különbségek is részt vesznek az ivar meghatározásában. Majdnem minden emlősnél az Y-kromoszóma határozza meg a hím tulajdonságokat. *Drosophila* esetében az X-kromoszóma és az autoszómák relatív aránya szabja meg a nemet.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Egy adott génnek hány kópiája van egy autohexaploidban? Feltételezzük, hogy a génnek két alléja van, B és b. Adjuk meg a lehetséges genotípusokat!

MEGOLDÁS

Mindegyik gén megtalálható mindegyik kromoszómagarnitúrában, ezért minden génnek hat kópiáját tartalmazza az autohexaploid. A lehetséges genotípusok száma hét, közülük kettő homozigóta: *BBBBBB*, *bbbbbb*; öt pedig heterozigóta: *BBBBBb*, *BBBBbb*, *BBBbbb*, *BBbbbb*, *Bbbbbb*.

2. FELADAT

Az *ecetmuslica* X-kromoszómán lévő géneit használták fel annak kimutatására, hogy a gének a kromoszómákon találhatók. A 4.16. ábrán vázolt keresztezésben fehér szemű nőstényeket kereszteztek piros szemű hímekkel, majd az F_1 egyedek keresztezésével állították elő az F_2 -t, és az alábbi megoszlást kapták: 40 piros szemű nőstény, 37 fehér szemű nőstény, 42 piros szemű hím és 35 fehér szemű hím. A fenotípusos eloszlás és az X-kromoszóma viselkedésének ismeretében, miért következtetne arra, hogy a *white* gén az X-kromoszómán található? A 4.16. ábra fenotípusos elrendezését és a bemutatott öröklődést figyelembe véve megegyeznek-e a kapott és a várt eredmények? Használja a khi-négyzet próbát!

MEGOLDÁS

A keresztezés több adata is arra utal, hogy a gének helye a kromoszómákon van. Így például az F_1 hímek Y-kromoszómájukat az apjuktól örökölték, hiszen az anyjukból hiányzik. A hímek szeme fehér, tehát fehér szemszín meghatározó alléljuk van, amelyet biztosan anyuktól örökölték. Ez azt valószínűsíti, hogy a fehér szemszín alléja az anyuktól kapott X-kromoszómán van. Hasonlóképpen az F_2 összes ivar és fenotípus kombinációja azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy a *white* allél az X-kromoszómán van. A khi-négyzet kiszámításának a menete a következő: mindegyik kategória várható egyedszáma $155/4 = 38,75$ vagyis az összes utódok $1/4$ -e.

Fenotípus	Ivar	Megfigyelt gyakoriság	Várt gyakoriság	$(M - V)^2/V$
Piros szemű	Nőstény	40	38,75	0,04
Fehér szemű	Nőstény	37	38,75	0,08
Piros szemű	Hím	43	38,75	0,47
Fehér szemű	Hím	35	38,75	0,36
		155	155	$\chi^2 = 0,95$

A szabadságfok 3 (fenotípusos kategóriák száma - 1). A kapott érték nem szignifikáns, vagyis az eredmények megfelelnek annak a hipotézisnek, hogy a *white* allél az X-kromoszómán van.

ÖSSZEFOGLALÁS

A különböző fajok diploid kromoszómaszáma eltérő. Az egyes kromoszómákat méretük, centromeronjuk helyzete és sávozási mintázatuk alapján lehet azonosítani. A mitózis – amely két azonos leánysejtet létrehozó, számtartó osztódás – négy szakaszra osztható: profázis, metafázis, anafázis, telofázis. A meiózis egy DNS-megkettőződésből és két sejtosztódásból áll. Az I. fázis a redukciós osztódás, amelynek során a homológ kromoszómák elválnak, és így a kromoszómaszám a felére csökken. A II. fázis a mitózishoz hasonlít, mert a testvérkromatidák elválása során a kromoszómaszám nem csökken. Állatoknál az érett hím és női gaméták a spermatogenezis és az oogenezis folyamatában keletkeznek.

A gének és a kromoszómák párhuzamos viselkedése adja a hasadás és a független kombinálódás törvényeinek fizikai magyarázatát. Az első megfigyelés arra vonatkozóan, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el, ebből a párhuzamos

viselkedésből származott. A végső bizonyítékokat azok a kísérletek adták, amelyekben a *Drosophila* X-kromoszómájához kapcsolt jellegeinek öröklődését vizsgálták. Kimutatták, hogy a nem várt szemszínű egyedek rendellenes kromoszómaszámot eredményező meiotikus hiba miatt jöttek létre.

Duplikációról, illetve delécióról akkor beszélünk, amikor egy kromoszómarészlet több példányban van jelen a kariotípusban, illetve hiányzik. Mindkettő a fenotípus megváltozásához vagy letalitáshoz vezethet, és általában a deléciók hatása a nagyobb. A meiotikus kromoszómákon a deléciós és a duplikációs heterozigótákban gyakran hurok képződik. Inverzióról akkor beszélünk, ha a gének sorrendje a kromoszómán megfordul. Az inverziós heterokariotípusokban az átfordult régióban fellépő rekombináció duplikációkat és deléciókat eredményez a meiotikus termékekben. A transzlokáció kromoszómarészletek átkerülése homológ kromoszómákra. Ha a transzlokációs heterokariotípusban alternált hasadás van, akkor normális meiotikus termékek keletkeznek, más esetben duplikációk és deficienciák figyelhetők meg.

A poliploidok, amelyek kettőnél több kromoszómakészlettel rendelkező fajok, gyakoriak a növényvilágban. Lehetnek autopoliploidok, amelyekben mindegyik kromoszómaszerelvény ugyanabból a fajból származik, vagy allopoliploidok, amelyek kromoszómagarnitúrája különböző fajokból ered. Aneuploidia esetén számfeletti kromoszóma vagy kromoszómahiány figyelhető meg a szabályos kromoszómakészlethez viszonyítva. A triszómia egy számfeletti kromoszóma jelenléte a kariotípusban. A jelenség jól ismert a növények körében, embernél pedig számos rendellenességet okoz.

A rokon fajok kromoszómainak szerkezete nagymértékben hasonló. A legtöbb szervezetnél az ivar meghatározását a kromoszómális különbségek is befolyásolják. Majdnem mindegyik emlősfajban a hím nemi jelleg kialakulását az Y-kromoszóma határozza meg. *Drosophila* esetében az X-kromoszómák és az autoszómák aránya döntő fontosságú az ivar kialakulásában.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Milyen három fő morfológiai típusa van a kromoszómáknak, és hogyan lehet azokat megkülönböztetni egymástól?
- Sorolja fel a sejtciklus négy szakaszát az S szakasztól kezdve! Mi történik az S szakaszban?
- A piros szemű F_1 heterozigóta *Drosophila* nőstényt kereszteztünk piros szemű hímekkel. Az eredmény 94 piros szemű és 30 fehér szemű utód volt. Megfelel-e ez a várható értékeknek? Ellenőrizze khi-négyzet próbával! A piros szeműek között 56 nőstény volt. Ellenőrizze ezt az értéket is!
- A 4.17. ábrán vázolt keresztezésben az összesítés szerint 4240 muslica között 3 piros szemű hím és 2 fehér szemű nőstény volt. Ezen adatok alapján mennyi a nondiszjunkció becsült gyakorisága?
- Magyarázza meg, hogy a sejtenkénti kromoszómaszám (n) és DNS-mennyiség (C) miért nem egyezik meg a sejtosztódás minden fázisában?

6. Mi a két legfontosabb eltérés a spermatogenezis és az oogenezis között embernél és a legtöbb államnál?
7. Vázolja a kromoszómákat érintő változásokat a mitózis metafázisában, a meiózis I. és II. fázisában!
8. (a) Az albinizmusra heterozigóta (Aa) egyén, milyen genotípusú spermiumokat termel a meiózis során? (b) A 4.13. ábra mintájára ábrázolja a kromoszómák viselkedését a meiózisban! (c) Az analízist végezze el két génre is, az Aa mellett egy másik recesszíven öröklődő betegség Bb genotípusára. A 4.14. ábra alapján ismertesse, hogyan magyarázható a független öröklődés a kromoszómák viselkedésével?
9. Sorolja fel, és röviden ismertesse a kromoszómaszerkezet megváltozásának négy típusát!
10. A 4.19. ábra tandem duplikáció kialakulását szemlélteti. (a) Ugyanezt a logikát követve mutassa be, hogyan keletkezhet egy reverz duplikáció. (b) Ábrázolja, miként jöhet létre elmozdult duplikáció!
11. Delécióban szereplő géneket szeretnénk azonosítani. Két, az e génre és az f génre homozigóta törzset kereszteztünk, és mutáns fenotípusú utódokat kaptunk. A g , illetve h mutációkra homozigóta törzsek keresztezésével pedig vad fenotípusú utódok keletkeztek. Mely gének hiányoznak a deléciós szakaszon?
12. Mi a lényege a pericentrikus és a paracentrikus inverzióknak? Mi a különbség a meiózisban és a meiotikus termékekben a paracentrikus, illetve pericentrikus inverziós heterokariotípusok között?
13. Tételezzük fel, hogy a 4.27. ábrán, a reciprok transzlokációt szemléltető kromoszómán az E és F, valamint a P és Q között történt kromoszómatorés. (a) Milyenek lesznek a kromoszómák a reciprok transzlokáció után? (b) Ábrázolja az I. metafázist és az alternált szegregációt az ilyen reciprok transzlokációt hordozó heterokariotípusnál!
14. Nevezzen meg négy gyakori aneuploid rendellenességet az ember esetében, és jellemezze azok kromoszómális viszonyait!
15. A Down-kórosok egy részénél a 21-es és a 14-es kromoszómák közötti transzlokáció áll a betegség hátterében. Egy transzlokációs heterozigóta utódainak körülbelül $\frac{1}{2}$ -a várhatóan Down-kóros. Magyarázza meg, miért! Az utódoknak ténylegesen csak mintegy $\frac{1}{4}$ -a Down-kóros. Miért?
16. (a) Milyen különbség tapasztalható a meiózis I. fázisában, illetve II. fázisában bekövetkező nondiszjunkció meiotikus termékei között? (b) Milyen genotípusú utódokat várhatunk, ha egy férfiban az I. fázisban az ivari kromoszómák nem válnak el egymástól? (c) Milyenek lesznek az utódok, ha a II. fázisban következik be a nondiszjunkció, illetve mi várható, ha a rendellenes szétválás egy nőnél lép fel?
17. Meg akarjuk határozni, melyik kromoszómán helyezkedik el egy gén. Ezért egy homozigóta recesszív mutánsát két különböző kromoszómára (5-ös, illetve 6-os) triszómiás törzsekkel kereszteztünk. A triszómiás F_1 egyedeket visszakeresztettük a recesszív homozigótával, és az 5-ös kromoszómára vonatkozóan 42 vad, valamint 38 mutáns fenotípusú utódot kapunk. Emellett a 6-os kromoszómára vonatkozóan 56 vad és 12 mutáns fenotípusú utód jön létre. Melyik kromoszómán lehet a kérdéses gén?
18. Hány kópiája van egy génnek egy autotetraploidban? Ha a génnek két alléja létezik, A és a , melyek a lehetséges genotípusok? Ha az A domináns, hányféle fenotípus alakulhat ki?
19. Adott egy $3x = 12$ kromoszómájú autotriploid. Mi a valószínűsége annak, hogy egy gamétában mindegyik homológból legyen egy kópia? Minden homológnak pontosan két kópiája van?
20. A 4.40. ábra 3-as kromoszómáján keresse meg azt a kisebbik inverziót, amelyben az orangután és a többi emberszabású majom különbözik. Keresse meg azt a pericentrikus inverziót, amely megkülönbözteti az ember és a csimpánz 4-es kromoszómáját!
21. Tyúkfélnél a kakasok homogamétásak (ZZ), a tyúkok pedig heterogamétásak (ZW). A $Z^A W$ és $Z^A Z^a$ keresztezéséből milyen utódnemzedéket vár? (A domináns és a recesszív allélokot a felső index jelöli.) Adja meg a genotípust és a nemet is!
22. A Bridges által felfedezett ivarmeghatározási szabály alapján, milyen lehet annak az ecetmuslicának a neme, amely három X-kromoszómát és három autoszómakészletet hordoz? Milyen neműek a két X-kromoszómával és négy autoszómagarnitúrával rendelkező egyedek és miért?
23. Diagramon magyarázza meg a mitózis és a meiózis I. profázisa közötti különbségeket!
24. Miért lehet az allotetraploidok növekedési rátája nagyobb, mint bármelyik diploid szülőé? Ha a különböző fajokból származó kromoszómakészletek egy allotetraploidban nem párosodnak, akkor keletkezhetnek-e kiegyensúlyozott gaméták?
25. Két rokon egérfaj kromoszómaszáma eltérő. Az 1-es fajnak 20 pár metacentrikus kromoszómája van, a 2-es faj 23 pár kromoszómája közül 17 metacentrikus, 6 pedig akrocentrikus. Hány kromoszómális hasadásra volt szükség ahhoz, hogy a 2-es faj kariotípusa az 1-es fajból kialakuljon?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

5.

F E J E Z E T

A genetikai kapcsoltság

Tanulási program

- 1 Az azonos kromoszómán lévő gének nem követik a mendeli független hasadás törvényét.
- 2 Az azonos kromoszómán lévő gének közötti rekombinációs gyakoriság becslése lehetővé teszi a kromoszóma genetikai térképének megszerkesztését.
- 3 Három kapcsolt gént vizsgálva keresztezéssel meghatározható a gének sorrendje a kromoszómán.
- 4 A rekombinációs gyakoriság rendszerint csökken az olyan régiókban, ahol már előzőleg is történt rekombináció.
- 5 A kapcsoltságot ember esetében családfaelemzésekkel és szomatikus sejthibridizációs eljárásokkal vizsgálták. A közelmúltban a DNS-markerek alkalmazásával sokkal hatékonyabbá vált az emberi gének térképezése.
- 6 A crossing over a meiózis I. fázisában, a kromoszómák négyfonalas stádiumában megy végbe.
- 7 A genetikai térképtávolság és a fizikai DNS-távolság, néhány lényeges kivételtől eltekintve, rendszerint jól közelítik egymást.

Az eredmények egyszerű mechanikus következményei a „faktorok” kromoszómákon való elhelyezkedésének és a homológ kromoszómák kapcsolódási módjának. A kialakuló arányok nem annyira egy számszerű rendszer megnyilvánulásai, inkább a faktorok egymáshoz viszonyított helyzetéből adódnak.

Thomas Hunt Morgan
amerikai genetikus



5.1. ábra. Thomas Hunt Morgan, a XX. század elejének vezető genetikusa, *Drosophila*-laboratóriumában

Lowe Memorial Library, Columbia University

A hasadás és a független kombinálódás elmélete összhangban van a gének kromoszómákon való elhelyezkedésével és a kromoszómák viselkedésével a meióziban. Feltételeztük, hogy az eddig tanulmányozott gének különböző kromoszómákon helyezkednek el. A mendeli törvények újrafelfedezése után nem sokkal Thomas Hunt Morgan (5.1. ábra) felismerte, hogy a *Drosophila*-nak több génje van, mint ahány kromoszómája. Ma már tudjuk, hogy a *Drosophila* három nagy kromoszómájának mindegyikén gének ezrei sorakoznak. Ennek következtében a független öröklődés elve nem érvényes az azonos kromoszómán található ún. kapcsolt génekre. Ebben a fejezetben két vagy több kapcsolt gén öröklődésének törvényszerűségeit elemezzük. Megtárgyaljuk, hogyan lehet genetikai térképet szerkeszteni, amely megmutatja a gének helyét a különböző kromoszómákon.

Az elmúlt évek nagy nemzetközi programjának, az ún. humán genom programnak köszönhetően az érdeklődés a géntérképezési eljárások felé fordult (l. 15. fejezet). Az alapelvek nagy része azokon a klasszikus kísérleteken alapul, amelyeket ebben a fejezetben tekintünk át.

KAPCSOLTSÁG

A század első évtizedében William Bateson és R. C. Punnett az szagosbüköny (*Lathyrus odoratus*) különböző bélyegeinek öröklődését vizsgálták. Egyik tanulmányukban a virágszín domináns lila (P) és recesszív piros (p), valamint a pollen domináns hosszúkás (L) és recesszív kerek (l) típusainak együttes öröklődését tanulmányozták. Mendelhez hasonlóan dihibrid kereszte-

5.1. táblázat. A szagosbüköny dihibrid keresztezésének F_2 generációja

Egyedszámok			
Fenotípus	Megfigyelt	Várt	$(M - V)^2 / V$
Lila, hosszúkás	296	240,2	13,1
Lila, gömbölyű	19	80,1	46,5
Piros, hosszúkás	27	80,1	35,1
Piros, gömbölyű	85	26,7	127,3
	427	427,1	$\chi^2 = 222,0$

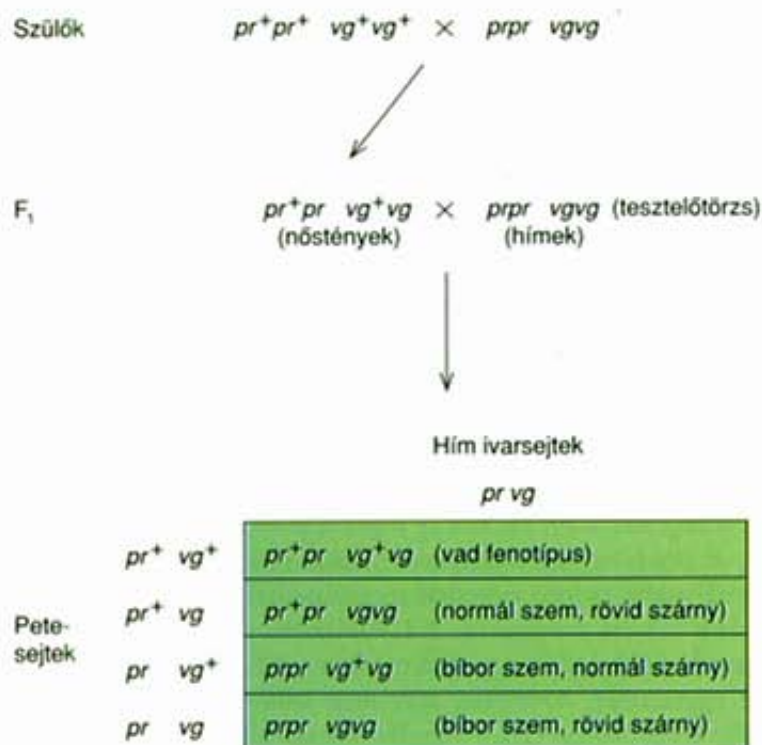
zést végeztek a $PP LL$ és a $pp ll$ genotípusú egyedek között. Az F_1 -et ($Pp Ll$) öntermékenyítették, és az F_2 különböző fenotípus osztályokba tartozó egyedekét megszámlálták. A várt 9:3:3:1-es arány helyett azonban az 5.1. táblázatban látható eredményt kapták. Sokkal több egyed tartozott a szülői kategóriákba, mint az egyszerűen domináns, azaz nem szülői típusokba. A khi-négyzet próbában erre a vizsgálatra a szabadsági fok 3, a kapott khi-négyzet érték pedig 222,0. Ez azt jelenti, hogy az adatok nagyon megbízhatóan eltérnek a független öröklődés hipotézise alapján várhatótól.

Bateson és Punnett már tudta, hogy az F_2 adatai az episztatikus kölcsönhatások miatt esetenként módosulhatnak a 9:3:3:1-es arányhoz képest, de az általuk tapasztalt F_2 arányok nem illeszkedtek egyik módosított mendeli arányhoz sem (bár vizsgálták az illeszkedést a 7:1:1:7 arányhoz is). Ráadásul a két gén nagyon eltérő tulajdonságokra vonatkozott, nem úgy, mint az episztatikus keresztezésekben. Mi lehetett ezeknek a furcsa F_2 arányoknak az oka?

Bateson és Punnett a két szülői fenotípus F_2 -ben tapasztalt nagy számaránya miatt feltételezték, hogy valamiféle fizikai kapcsolat lehet a szülői allélok között. Azt az esetet, amikor az egyik szülőben a domináns allélok, a másik szülőben a recesszív allélok között alakul ki kapcsolat, **couplingnak** (párban álló) nevezték. A jelenség ellentmondott a független öröklődés elvének. Másrészt pedig, az egyik génre domináns, a másikra pedig recesszív fenotípusú F_2 egyedek kis számát a domináns és a recesszív allélok valamiféle veleszületett negatív affinitásának tekintették. A jelenséget **repulzióknak** (szétválasztott) nevezték el.

EGY FIZIKAI MAGYARÁZAT

Bateson és Punnett megfigyeléseire a magyarázatot Morgan későbbi kutatásai adták meg, aki a *Drosophila* két génjét vizsgálta. Az egyik gén a szemszín határozta meg (a recesszív *purple*, pr és a domináns piros pr^+ allélok), a másik gén pedig a szárny fejlődését (a recesszív *vestigial*, vg allél a rövid szárnyét, a domináns vg^+ allél pedig a normál szárnyét). Nem a dihibrid keresztezés F_2 nemzedékét vizsgálta, hanem, amint az 5.2. ábrán látható, a két génre együttesen végezte a tesztelő keresztezést. Figyeljük meg, hogy mindkét vad típusú allél eredetileg az egyik F_1 szülőben, a



5.2. ábra. Dihibrid tesztelő keresztezés genotípus és fenotípus arányai rövid szárnyú (vg) és bíbor szemszínű (pr) mutánsok felhasználásával

5.2. táblázat. Morgan első tesztelő keresztezésének eredményei

Egyedszámok				
Fenotípus	Gaméta	Megfigyelt	Várt	$(M - V)^2 / V$
Vad	$pr^+ vg^+$	1339	709,75	558
Normális, rövid	$pr^+ vg$	151	709,75	440
Bíbor, normális	$pr vg^+$	154	709,75	435
Bíbor, rövid	$pr vgv$	1195	709,75	332
		2839	2839,00	$\chi^2 = 1765$

recesszívek pedig a másikban voltak. Az ilyen keresztezés nagy előnye, hogy csak az egyik szülő, jelen esetben az F₁ nőstény kettős heterozigóta, így szegregáció és független öröklődés csak a petesejt termelése során következhet be.

Ha Morgan tesztelő keresztezésében a két gén függetlenül öröklődött volna, akkor a nőstény négyféle gamétája, és így a négy különböző fenotípus is azonos gyakorisággal fordult volna elő az utódok között. Az 5.2. táblázatban azonban látható, hogy a szülői fenotípusok száma sokszorosa volt a nem szülői típusokénak. A khi-négyzet értéke ezekre az adatokra 11,34 (szabadsági fok 3), amely lényeges eltérést jelez, így a független öröklődés hipotézise nem tartható. Annak ellenére, hogy a négyféle petesejt gyakorisága eltért a független hasadás alapján várttól, a két szülői forma, a $pr^+ vg^+$ és $pr vgv$ közel azonos számban szere-

5.3. táblázat. Morgan második tesztelő keresztezésének eredményei

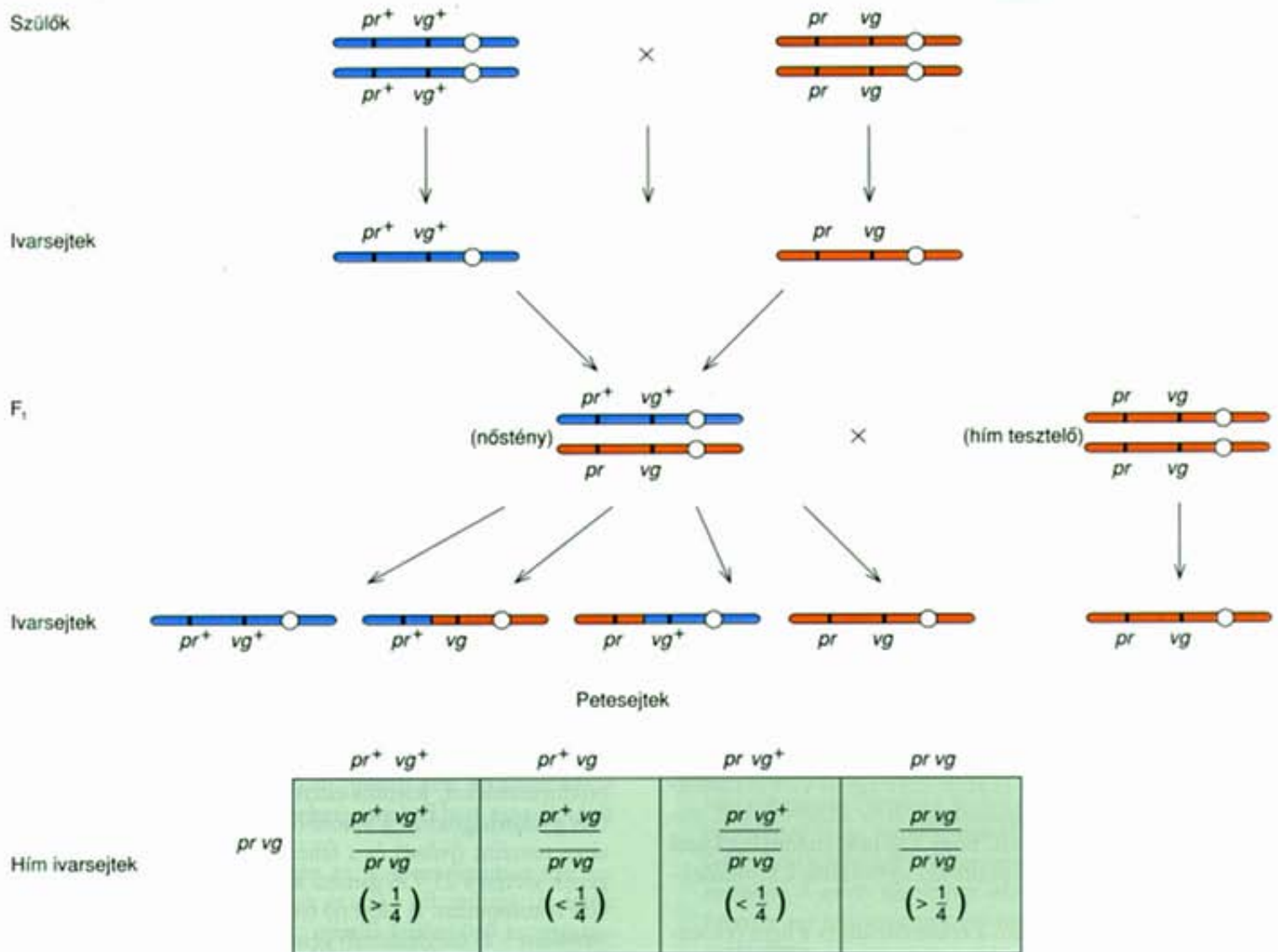
Egyedszámok				
Fenotípus	Gaméta	Megfigyelt	Várt	$(M - V)^2 / V$
Vad	$pr^+ vg^+$	157	583,75	312
Normális, rövid	$pr^+ vg$	965	583,75	249
Bíbor, normális	$pr vg^+$	1067	583,75	400
Bíbor, rövid	$pr vgv$	146	583,75	328
		2335	2335,00	$\chi^2 = 1289$

peltek, míg a két nem szülői kombináció, a $pr^+ vg$ és $pr vg^+$ is egyenlő arányban jelentek meg, csak sokkal kisebb mennyiségben, mint a szülői típusok. A mai terminológia szerint a két vad, illetve a két mutáns allélt tartalmazó gamétákat *coupling* fázisú, az egy mutáns és egy vad allélt hordozókat pedig *repulziós gamétáknak* nevezzük. Más szóval, az 5.2. táblázatban a szülői gaméták párban (*coupling*), a nem szülői gaméták pedig szétválasztottan (*repulziós*) voltak.

Egy másik kísérletében Morgan két olyan különböző genotípust keresztezett, amelyek az egyik gén vad típusú, illetve a másik gén recesszív alléljára voltak homozigóták ($pr^+pr^+ vgv \times prpr vg^+vg^+$). A kettős heterozigóta F₁ muslicákat ezután a $prpr vgv$ tesztelő törzssel keresztezte. Az eredmény egészen más volt, mint az előző esetben (5.3. táblázat). Az utódokban az egyszeres dominánsok száma a vártnál sokkal nagyobb, a kettős dominánsok és a kettős recesszívek száma pedig sokkal kevesebb volt. Más szóval, több *repulziós* típus volt, mint *coupling*. Figyeljük meg, hogy ebben a keresztezésben a szülői gaméták voltak a *repulziósok*, a nem szülőiek pedig a *coupling* típusúak.

Megfigyeléseit Morgan azzal magyarázta, hogy az érintett tulajdonságokat meghatározó gének azonos kromoszómán lehetnek. Ennek következtében a vizsgált gének alléljai hajlamosak arra, hogy együtt maradjanak az egyes generációk között is, hiszen fizikai kapcsolat van közöttük. A jelenség magyarázatát az 5.3. ábrán vázoltuk fel, a vad allélok a kék, a recesszívek pedig a piros színnel jelölt kromoszómákon vannak. Az F₁ muslicákban mindegyik típusú kromoszómából van egy. Azonban ezek a kromoszómák a gamétatermelés során nem mindig maradnak változatlanok, néhány esetben rekombinációra kerülhet sor közöttük. Ennek következtében a képződött ivarsejtek között vannak pr^+ és vg , illetve pr és vg^+ allélokat hordozó, nem szülői típusok is. Hasonló magyarázat igaz az 5.3. táblázatban tárgyalt keresztezésre is, azzal a különbséggel, hogy a szülői kromoszómákon egy domináns és egy recesszív allél van, a két domináns vagy a két recesszív helyett.

A változatlanul maradt kromoszómákat általában **szülői**, az új kombinációkat pedig **nem szülői kromoszómatípusnak** nevezik. Ahogyan azt a 4. fejezetben már említettük, a fizikai kicserélődés, amellyel az új kromoszómatípusok kialakulnak a



5.3. ábra. Coupling típusú szülőkkel végzett tesztelő keresztezés gametái és az utódok

crossing over vagy **rekombináció**, és a diagramokon sokszor \times -szel jelölik az összekapcsolódó homológ kromoszómákat. A másik gyakori elnevezés a szülői és nem szülői kromoszómatípusokra a **nem rekombináns**, illetve **rekombináns**, ami utal a keletkezés módjára. A rekombináció biokémiai mechanizmusát egy későbbi fejezetben tárgyaljuk. Most csak annyit jegyzünk meg, hogy a homológ kromoszómák esetenként eltörhetnek, és újra egyesülhetnek, de úgy, hogy a homológ pár másik tagjával kapcsolódnak. Minél távolabb van két gén a kromoszómán, annál nagyobb a valószínűsége, hogy ilyen törés-újraegyesülés lejtársódjon közöttük.

Ha a homológ kromoszómák között törés-újraegyesülés megy végbe, akkor joggal várható, hogy az esemény citológiai-
lag is kimutatható legyen. A meiózis során valóban megfigyelték, hogy néha nem-testvérekromatidák kapcsolódnak egymáshoz, kereszt alakú elrendeződésben. A 4. fejezetben már említettük, hogy ez a szerkezet, a **kiazma**, a rekombináció citológiai megjelenése.

Az azonos kromoszómán elhelyezkedő gének **kapcsoltak**, más szóval egy kapcsolódási csoportba tartoznak. Azt az általános jelenséget, amikor a gének azonos kromoszómán vannak, **kapcsoltság**nak nevezzük. (E fejezet egy későbbi szakaszában látni fogjuk, hogy ha a gének eléggé távol helyezkednek el a kromoszómán, akkor egymástól függetlenül is kombinálódhatnak.) Vonatkozik mindez a kétszeresen domináns $pr^+ vg^+$ és a kétszeresen recesszív $pr vg$ (coupling), illetve a $pr^+ vg$ és $pr vg^+$ (repulzió) formájában kapcsolt allélokra is. A két különböző coupling kromoszómát hordozó genotípust kétszeres coupling heterozigótának nevezik, jelölése $pr^+ vg^+ / pr vg$. A két repulziós kromoszómával rendelkező genotípus pedig a kétszeres repulziós heterozigóta, jelölése $pr^+ vg / pr vg^+$. Meg kell jegyezni, hogy a coupling és a repulzió meghatározást eredetileg a teljes dominanciát mutató tulajdonságok esetében használták, amikor a domináns allélok ugyanazon a kromoszómán vannak. A meghatározás csak az első ilyen keresztezésekre vonatkozott, és mesterséges elkülönítés, ami nyilvánvalóvá válik akkor, amikor részlegesen domináns, illetve kodomináns allélokat vizsgálunk.

Röviddel Mendel törvényeinek újrafelfedezése után olyan kivételeket fedeztek fel, amelyekre a független öröklődés szabálya nem volt érvényes. Az a jelenség, hogy a szülői kromoszómákon lévő gének hajlamosak az együtt öröklődésre, az egyes kromoszómákon lévő gének kapcsoltságával magyarázható.

REKOMBINÁCIÓS GYAKORISÁG

Ha két gén különböző kromoszómákon helyezkedik el, mind a négy gamétatípus (vagy fenotípus) egyforma arányban jelenik meg a tesztlő keresztezés utódnemzedékében. Más szóval, a független öröklődés eredménye egyenlő számú szülői és nem szülői gaméta, illetve utód. Ha azonban a két gén kapcsolts, a rekombináns gaméták aránya 50%-nál kisebb, és a tényleges gyakoriság a két gén fizikai távolságától függ. Szélsőséges esetben, amikor a vizsgált gének nagyon közel vannak egymáshoz, akkor a rekombináns gaméták, illetve utódok száma a 0-hoz közeli érték.

A **rekombináció gyakoriságát** (r) mérhetjük a tesztlő keresztezésben vagy más keresztezésekben megjelenő rekombináns fenotípusú utódok arányával. Például, az 5.2. táblázat szerint a 2839 utódból 305 (151 + 154) egyed volt rekombináns, így a rekombináció gyakorisága $305/2839 = 0,107$, vagyis 10,7%. Ez az érték sejteti, hogy a gének viszonylag közel vannak egymáshoz, de nem pontosan ugyanazon a kromoszómaszakaszon.

Az 5.4. táblázatban látható a rekombináns és a nem rekombináns gaméták arányának általános kifejezése kétszeresen heterozigóta szülő esetén, mind coupling (2. oszlop), mind repulziós (3. oszlop) helyzetben. Egy coupling genotípusú szülő esetében a gaméták egy része (r) $A-b$ és $a-B$ rekombinánsok. Mivel ez a két rekombináns kategória egyenlő arányban várható, ezért mindegyik osztály valószínűsége $\frac{1}{2}r$. Hasonló módon, a nem rekombináns gaméták aránya $1-r$, amely egyformán oszlik meg az $A-B$ és $a-b$ típusok között. Ugyanezen elv alapján

5.4. táblázat. Az ivarsejtek arányai¹

Gaméta	Szülői genotípus	
	Coupling $A B/a b$	Repulzió $A b/a B$
$A B$	$\frac{1}{2}(1-r)$	$\frac{1}{2}r$
$A b$	$\frac{1}{2}r$	$\frac{1}{2}(1-r)$
$a B$	$\frac{1}{2}r$	$\frac{1}{2}(1-r)$
$a b$	$\frac{1}{2}(1-r)$	$\frac{1}{2}r$
	1	1

¹ r a rekombinációs gyakoriság

határozható meg a repulziós genotípus gamétáinak várható aránya is, de ilyenkor a rekombináns és nem rekombináns kategóriák az előző fordítottjai.

A GENETIKAI TÉRKÉP

Morgan egyik hallgatója, Alfred Sturtevant volt az, aki feladatául kapta, hogy megerősítse a crossing overre vonatkozó korábbi információkat *D. melanogaster*-ben. Feltételezte, hogy a rekombinációs adatok felhasználhatók a gén fizikai kapcsolatának, lineáris sorrendjének leírására a kromoszómán, amit **kapcsoltsági** vagy **genetikai térképnek** nevezett el. A genetikai térkép a tesztlő vagy más keresztezésben képződő rekombináns ivarsejtek (vagy utódok) gyakoriságát használja fel két gén távolságának mérésére. Például az 5.2. táblázatban a pr és a vg géneknek 10,7%-a volt rekombináns, így a **térképtávolság** közöttük 10,7 **térképegység**. Morgan és Sturtevant javasolta, hogy a kromoszóma mentén a távolságokat a rekombinációs százalék által meghatározott egységben mérik. A későbbi kutatások kimutatták, hogy az ilyen statisztikai megközelítéssel mért genetikai távolságok a kromoszómán általában hasonlóak a citológiai vagy biokémiai módszerrel meghatározott távolságokhoz.

Morgan és tanítványai sok olyan gént fedeztek fel a *Drosophilában*, amelyek X-hez kötött öröklődést mutattak. Ha két ilyen génben eltérő törzset kereszteztek, és megvizsgálták az utódnemzedéket, jelentős eltéréseket tapasztaltak a rekombinációs gyakoriságokban a különböző gnpárokról (5.5. táblázat). A sárga testszint (*yellow*) és a fehér szemszint (*white*) meghatározó gének esetén a 21 736 gaméta közül csupán 214, vagyis 1%-nyi volt rekombináns. A *sárga* (y) testszint és az élénkpiros szemszint (*vermillion* - v) meghatározó génekre pedig 32,2%.

5.5. táblázat. Öt X-kromoszómához kapcsolt gnpár rekombinációs gyakorisága

Gének	Rekombinációs gyakoriság
<i>sárga</i> (y)- <i>fehér</i> (w)	$\frac{214}{21\,736} = 0,010$
<i>sárga</i> (y)- <i>élénkpiros szem</i> (v)	$\frac{1464}{4551} = 0,322$
<i>fehér</i> (w)- <i>élénkpiros szem</i> (v)	$\frac{471}{1584} = 0,297$
<i>élénkpiros szem</i> (v)- <i>miniatűr szárny</i> (m)	$\frac{17}{573} = 0,030$
<i>fehér</i> (w)- <i>miniatűr szárny</i> (m)	$\frac{2062}{6116} = 0,337$
<i>fehér</i> (w)- <i>cökevényes szárny</i> (r)	$\frac{406}{898} = 0,452$
<i>élénkpiros</i> (v)- <i>cökevényes szárny</i> (r)	$\frac{109}{405} = 0,269$

A táblázatban látható adatok felhasználásával Sturtevant meghatározta az öt gén fizikai kapcsolatát, és úgy vélte, hogy lineáris elrendeződésűek. Először is, az y -nak és a w -nek kevés rekombináns gamétája volt, amely azt jelzi, hogy nagyon közeli gének. Másodszor, a következő legalacsonyabb rekombinációs érték a w és a v közötti 0,297 vagyis 29,7% volt. De mivel az y és a v között a rekombinációs gyakoriság nagyobb, mint a w és a v között, a három gén sorrendje $y-w-v$, w a köztes helyzetű. A v -hez legközelebb az m található, 3 térképegységnyire. A v -től jobbra kell lennie, mert a $w-m$ távolság megközelítőleg a $v-m$ és $w-v$ összege. Végül, az r laza kapcsoltságot mutat v -vel, de nem mutat kapcsoltságot w -vel. Tehát az r a v -től jobbra található, és így az öt gén lineáris sorrendje: $y-w-v-m-r$.

Sturtevant a szomszédos gének közötti rekombinációs gyakoriságokat felhasználva megszerkesztette a térképet, amely y -nal indul a 0,0 pozícióban a bal oldalon (5.4. ábra). A w -t az 1,0, a v -t a 30,7 (1,0 + 29,7), az m -t a 33,7 (30,7 + 3,0) és az r -t az 57,6 (30,7 + 26,9) értékekhez tette. Látható, hogy az ábrán feltüntetett távolságok mai adatai w , v , m és r esetében kissé eltérnek a Sturtevant-féle értékektől, mivel azóta több köztes helyzetű gént is használtak a pontosabb térképezéshez.

Ahogy az előzőekben bemutattuk, a genetikai térképet meg lehet szerkeszteni az összes génpár közötti rekombinációs gyakoriság becsülésével. De létezik egy jóval hatékonyabb módszer is, amely három gént használ fel egyidejűleg (ezt később ismertetjük). Több marker (jelző) gén alkalmazásával olyan eseteket is azonosítani lehet, amelyekben egynél több crossing over van.

Bár mind a w , mind a r gén az X-kromoszómán van, az 5.5. táblázat adatai szerint nagyon magas a rekombinációs érték közöttük, majdnem olyan nagy, mintha különböző kromoszómákon lennének. Ez azt sejteti, hogy az azonos kromoszómán egymástól nagyon távol lévő gének nem bizonyítják a kapcsoltságot a genetikai keresztezésekben. Az azonos kromoszómán elhelyezkedő gének, akár mutatják a kapcsoltságot, akár nem, **szinténikusak** („azonos fonálon vannak”).

Sokan csodálkoznak azon, miért nem figyelte meg Mendel a kapcsoltságot dihibrid keresztezéseiben. A veteményborsónak hét kromoszómája van, és Mendel is hét bélyeget vizsgált, de kiderült, hogy kettőt közülük az 1-es, hármat pedig a 4-es kromoszómán lévő gének határoznak meg (5.6. táblázat). Ezért a lehetséges 21-féle génpár közül (a kombinációk száma hét gén esetében, ha egyszerre kettőt választhatunk ki) négy génpár szinténikus. De három esetben a génpárok olyan messze vannak egymástól a kromoszómán, hogy keresztezések százaiban sem találunk kapcsoltságot közöttük. A fennmaradó egy génpárnak –

5.6. táblázat. A Mendel által vizsgált hét tulajdonság kromoszomális lokalizációja

Tulajdonság	Kromoszóma
Maghøj színe (sárga-zöld)	1
Virágszín (lila-fehér)	1
Hüvelyfelszín (sima-ráncos)	4
Virágok helyzete (oldalsó-végálló)	4
Szár (magas-alacsony)	4
Hüvely színe (sárga-zöld)	5
Mag alakja (kerek-szőgletes)	7

amely a hüvely alakját, illetve a szár hosszát határozza meg – kapcsoltságot kellett volna mutatnia a keresztezések során, de ezeket Mendel nem vizsgálta. Vagyis, mivel a vizsgált 21 tulajdonságpárból csak egy mutatott volna kapcsoltságot, és Mendel csak néhányat tanulmányozott, ezért nem meglepő (hanem inkább szerencse), hogy nem figyelte meg a független öröklődéstől eltérő eseteket.

A rekombinációs gyakoriság kifejezi a gének kapcsoltságának mértékét. Értéke 0 körüli a nagyon szorosan kapcsolt és $1/2$ -hez közeli a nagyon lazán kapcsolt lokuszok (vagy azok különböző kromoszómákon vannak) esetében. A gének egymáshoz viszonyított helyzete egy kromoszómán genetikai térképen ábrázolható.

HÁROMPONTOS KERESZTEZÉSEK

Bár a gének lineáris elhelyezkedésére az X-kromoszómához kapcsolt génpárok adataiból következtetni lehetett, a modell teljes bizonyítékát azok a keresztezések szolgáltatták, amelyeket három génjükben eltérő egyedekkel végeztek. Az egyik ilyen kísérletben három X-kromoszómához kapcsolt gént – y , w és m – használtak *Drosophilánál*. A tesztelő keresztezésben mindhárom génre coupling elrendezésű heterozigóta nőtény szerepelt (5.5. ábra). Az utódokban a gaméták vagy X-kromoszómát kaptak y , w és m génekkel vagy pedig Y-t a tesztelő hím vonalból. A hármas heterozigóta F_1 nőtény nyolcféle gamé-



5.4. ábra. A Sturtevant által tanulmányozott öt X-hez kötött gén korábbi és mai térképhelyzete

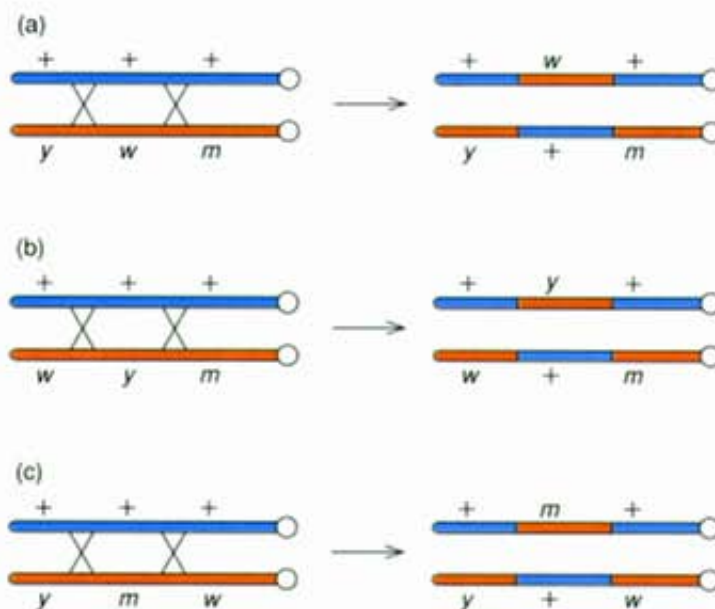
Szülők	+ + + / + + + × y w m / Y																		
	↓																		
	+ + + / y w m (F ₁ nőstények) × y w m / Y (tesztelőtörzs hímjei)																		
	↓																		
	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Ivarsejtek</th> <th style="text-align: center; padding-right: 10px;">Utódszám</th> <th style="text-align: center;">Gyakoriság</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding-right: 10px;">Szülői</td> <td style="text-align: center;">+ + + y w m</td> <td style="text-align: center;">3501 3471 } 0,664</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 10px;"><i>m</i> rekombinációja <i>y</i>-nal és <i>w</i>-vel</td> <td style="text-align: center;">+ + <i>m</i> y w +</td> <td style="text-align: center;">1754 1700 } 0,329</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 10px;"><i>y</i> rekombinációja <i>w</i>-vel és <i>m</i>-mel</td> <td style="text-align: center;">y + + + w m</td> <td style="text-align: center;">28 32 } 0,0057</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 10px;"><i>y</i> rekombinációja <i>y</i>-nal és <i>m</i>-mel</td> <td style="text-align: center;">+ w + y + m</td> <td style="text-align: center;">6 3 } 0,00086</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center; border-top: 1px solid black;">10 495</td> <td style="text-align: center; border-top: 1px solid black;">1,0</td> </tr> </tbody> </table>	Ivarsejtek	Utódszám	Gyakoriság	Szülői	+ + + y w m	3501 3471 } 0,664	<i>m</i> rekombinációja <i>y</i> -nal és <i>w</i> -vel	+ + <i>m</i> y w +	1754 1700 } 0,329	<i>y</i> rekombinációja <i>w</i> -vel és <i>m</i> -mel	y + + + w m	28 32 } 0,0057	<i>y</i> rekombinációja <i>y</i> -nal és <i>m</i> -mel	+ w + y + m	6 3 } 0,00086		10 495	1,0
Ivarsejtek	Utódszám	Gyakoriság																	
Szülői	+ + + y w m	3501 3471 } 0,664																	
<i>m</i> rekombinációja <i>y</i> -nal és <i>w</i> -vel	+ + <i>m</i> y w +	1754 1700 } 0,329																	
<i>y</i> rekombinációja <i>w</i> -vel és <i>m</i> -mel	y + + + w m	28 32 } 0,0057																	
<i>y</i> rekombinációja <i>y</i> -nal és <i>m</i> -mel	+ w + y + m	6 3 } 0,00086																	
	10 495	1,0																	

5.5. ábra. Három, X-hez kapcsolt génre heterozigóta nőstény tesztelő keresztezése, a különböző típusú utódok számának és gyakoriságának feltüntetésével

tát termelhet, amelyek közül hat rekombináns, kettő pedig szülői típusú.

Feltételezve, hogy a három tanulmányozott gén lineárisan helyezkedik el a kromoszómán, háromféle sorrend lehetséges: *y-w-m*, *w-y-m* és *y-m-w*, melyek mindegyikében más-más gén van a középső pozícióban. A rekombináns kategóriák közül kettő egyetlen rekombinációs eseménnyel keletkezhet, a harmadik pedig biztosan ugyanazon kromatidák között létrejött két crossing over eredménye. Mivel az ilyen kettős crossing over előfordulásának valószínűsége kicsi (a két különböző crossing over valószínűségének szorzata), a legkisebb rekombinációs kategória várhatóan a kétszeres rekombinánsokat képviseli. Az 5.5. ábrán a megfigyelt legkisebb rekombináns osztályt a + w + és az y + m gaméták adják. Tekintettel a három lehetséges génsorrendre, ezek a kategóriák akkor jöhetnek létre kettős crossing overrel, ha a gének sorrendje *y-w-m* (5.6. ábra). A másik két génsorrend esetén a kétszeres crossing over nem adhatja legritkább osztályként a fenti gamétákat (+ w + és y + m), hanem létrehozza a másik leggyakoribb rekombináns osztályokat.

Három kapcsolt gén esetén három különböző rekombinációs gyakoriság lehetséges a lokuszpárok között: a *w* és *m*, az *y* és *w*, valamint az *y* és *m* között. Az 5.5. ábra alapján a *w* és *m* közötti teljes rekombinációs gyakoriság az ebben a régióban rekombinálódó két osztály összege, vagyis $0,329 + 0,00086 = 0,330$. (Ebben a régióban természetesen a *w* és *m* közötti kétszeres rekombináns kategóriának is szerepelnie kell.) A *y-w* szakaszra a rekombinációs gyakoriság: $0,0057 + 0,00086 = 0,0066$; az *y-m* távolságra pedig $0,329 + 0,0057 = 0,335$. (A génsorrend megál-



5.6. ábra. Az *y*, *w* és *m* gének három lehetséges sorrendje a kétszeres rekombinációval keletkező gamétákkal. Az (a) alatt szereplő elrendezés, ahol *w* gén középen van, azonos az 5.5. ábra adataival. A crossing over helyét X jelzi

lapításának másik módja az, ha figyelembe vesszük, hogy a legnagyobb rekombinációs értékeknek a szélső helyzetű gének között kell lenniük, vagyis ebben az esetben az *y* és az *m* között.)

Adott $y-w-m$ sorrend mellett kétszeres rekombináció esetében, mind az $y-w$, mind pedig a $w-m$ között létre kell jönnie kicserélődésnek. Az előbb számított rekombinációs gyakoriságokat felhasználva, a várható kétszeres rekombinációs gyakoriság (a szorzat szabály alkalmazásával) $0,0066 \times 0,330 = 0,00218$. A tapasztalt kettős rekombináns gyakoriság, $0,00086$, ami valamivel alacsonyabb a vártnál (részletesebb tárgyalása a fejezet következő részében). Az y és az m térképtávolságát ezután az $y-w$ és a $w-m$ közötti rekombináció összegeként számíthatjuk ki, azaz $0,006 + 0,330 = 0,336$. Figyeljük meg, hogy egyetlen hárompontos keresztezésből ugyanannyi információt nyerhetünk, mint három, különböző génpárral végzett keresztezésből. Emellett, a hárompontos keresztezésekkel a kettős rekombinációval keletkező gamétákat is azonosítani tudjuk.

Ilyen keresztezések és más hasonló módszerek alkalmazásával a kutatók összeállították a *Drosophila melanogaster* genetikai térképét, amely napjainkban az egyik legjobban ismert térkép az eukarióták körében. Az 5.7. ábra néhány jól ismert gén helyét mutatja a négy különböző kromoszómán. A 70 térképegységnyi X-kromoszómán kívül a *Drosophilának* három autoszómája is van. A két nagy autoszóma 108, illetve 106, a kicsi 4-es kromoszóma pedig csak 3 térképegység. A kromoszómák teljes hosszát, ahogy azt a fentiekben említettük, a keresztezésekkel térképezett szakaszok összegzésével kapták meg. A *Drosophila* genom 287 térképegység hosszú. A genetikai kutatásokban gyakran használt más szervezetek, mint például a *Neurospora*, a kukorica és az egér genetikai térképei ugyancsak jól ismertek.

A hárompontos keresztezéseket a gének kromoszomális sorrendjének meghatározására használják.

INTERFERENCIA

A rekombinációs gyakoriságot két kapcsolt gén közötti kicserélődések gyakorisága (vagy valószínűsége) határozza meg. Már említettük, hogy egy kromoszómán egynél több kicserélődés is létrejöhet. Ezért azt is tudnunk kell, hogy vajon ezek a rekombinációk egymástól függetlenek-e, vagy pedig valamilyen módon befolyásolják egymást. Ha az egyes rekombinációs események függetlenek, akkor két esemény egyidejű bekövetkezésének a valószínűsége ugyanabban a gamétában az egyes valószínűségek szorzata. A fentiekben elemzett y , w és m génekre a megfigyelt kétszeres crossing over gyakoriság $0,00086$ volt, valamivel alacsonyabb a várt $0,00218$ értéknél. A vártnál alacsonyabb kétszeres crossing over érték más szervezeteknél is általános.

A megfigyelt és a várt kétszeres crossing over gyakorisága közötti különbségeket standard módszerrel H. J. Muller írta le először. Eszerint az **interferencia (I)** mértéke, vagyis

az, hogy miként befolyásolja az egyik crossing over kialakulása a másikat:

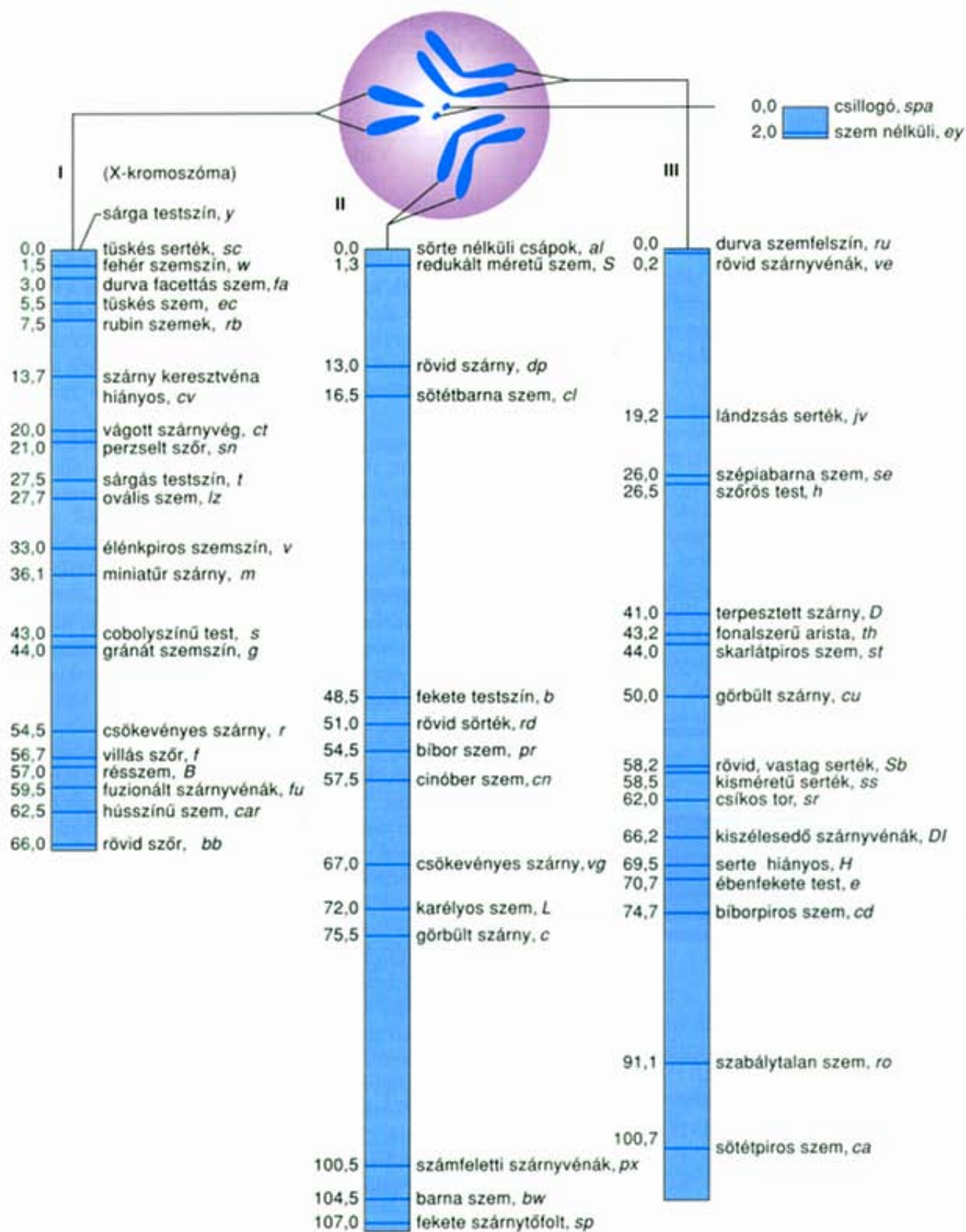
$$I = 1 - \frac{\text{Megfigyelt kétszeres rekombináns gyakoriság}}{\text{Várt kétszeres rekombináns gyakoriság}}$$

Így például a y , w és m adataira $I = 1 - 0,00086/0,00218 = 1 - 0,394 = 0,606$. Az ilyen pozitív értékek a rekombinációs események közötti interferenciát jelzik, míg a 0-hoz közeli értékek azt jelentik, hogy nincs interferencia, vagyis a különböző rekombinációs folyamatok függetlenek egymástól. Nagyon szorosan kapcsolt gének esetében az interferencia megközelítheti az 1-et, míg a távolabbi génekre az I gyakran 0.

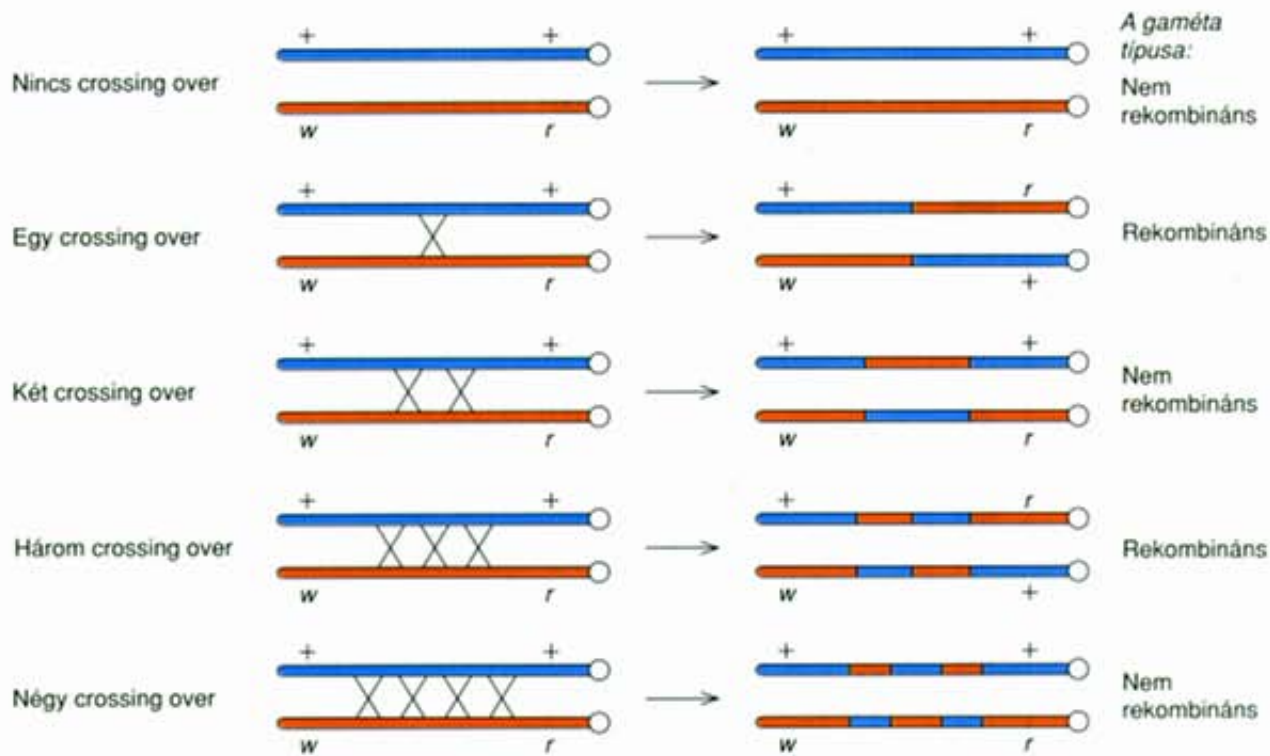
A kétszeres crossing overek viszonylagos ritkaságát magyarázó egyik elmélet szerint a közeli génekre tapasztalható nagy interferencia alapja a kromatidák fizikai merevsége, ami meggátolhatja az olyan meghajlásokat, amelyek egy rövid szakaszon két crossing over előfordulását lehetővé tennék. Interferencia ugyanakkor felléphet a harminc térképegységnyire lévő géneknél is, ami azt jelzi, hogy más tényezők is fontosak. Érdekes módon, a *Drosophila* (és talán más szervezetek) metacentrikus kromoszómáinak centromeronja akadályozza az interferenciát. Vagyis a metacentrikus kromoszóma egyik karján bekövetkező crossing over nem gátolja a rekombinációt a másik karon.

Meg kell jegyezni, hogy a távoli gének között megfigyelt rekombinációs gyakoriság kisebb lehet a térképtávolság alapján vártnál. Tudjuk például, hogy a w és r gének 53 térképegységre vannak az X-kromoszómán. Először is, nem kapcsolt gének esetében a rekombináns genotípusú gaméták maximális aránya a független öröklődés elve alapján 0,5, így nem várhatunk 0,53 gyakorisággal rekombináns ivarsejteket. Másodszer, a többszörös páros számú rekombinációk csökkentik a megfigyelhető rekombinációs gyakoriságot. Az 5.8. ábra azt illusztrálja, hogy köztes helyzetű marker gén hiányában mind a kétszeres, mind a négyszeres crossing overek látszólag nem rekombináns gamétákat eredményeznek. Ennek következményeként az 50 térképegységre lévő gének között megfigyelhető rekombinációs gyakoriság általában kevesebb 0,5-nél. Emlékezzünk vissza, hogy a w és r közötti rekombináció arányát Sturtevant 0,452-nek találta. A megfigyelhető rekombinációs gyakoriság csak akkor éri el a 0,5-öt, ha a gének 70-80 térképegységnyire vannak egymástól.

A kétszeres rekombináció gyakorisága szorosan kapcsolt gének között gyakran alacsonyabb a vártnál. Ez a jelenség az interferencia.



5.7. ábra. A *Drosophila melanogaster* genetikai térképe, néhány fontos gén helyének feltüntetésével a három nagy kromoszómán (A fenotípusok mellett feltüntetett betűk az eredeti angol elnevezés kezdőbetűi, melyeket a keresztezések leírásában allélszimbólumként használnak.)



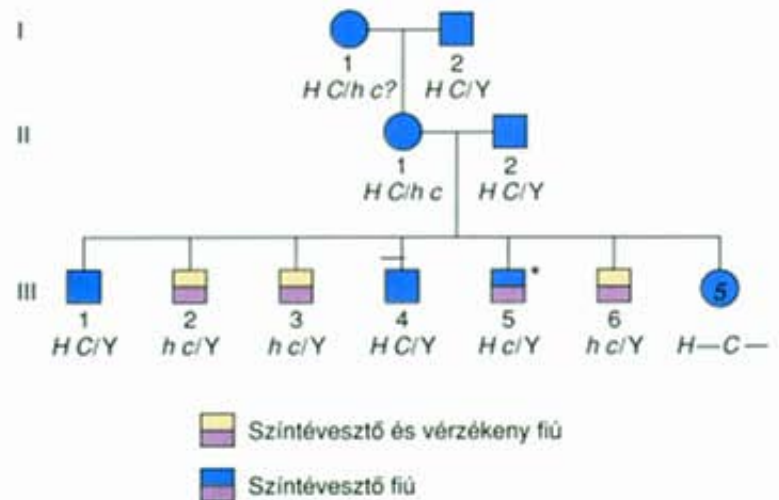
5.8. ábra. Két gén között fellépő, különböző számú crossing over után keletkező gamétatípusok

KAPCSOLTSÁG EMBERBEN

Az embernél természetesen előre tervezett keresztezések nem lehetségesek, és a legtöbb házasságban a gyermekek száma is kevés. Emiatt egészen napjainkig, a modern molekuláris módszerek bevezetéséig a kapcsoltsági viszonyokat csak néhány, főleg az X-kromoszómán lévő génre határozták meg. Az érintett két génre hasadást mutató családfák alapján szoros kapcsoltságot csak az AB0-vércsoportrendszer és az ún. köröm-térdkalács kór (abnormális körömfejlődés az ujjakon és rendellenesen kicsi vagy hiányzó térdkalács), valamint a β - és a δ -globin gének között, illetve még néhány egyéb génpár esetén sikerült meghatározni.

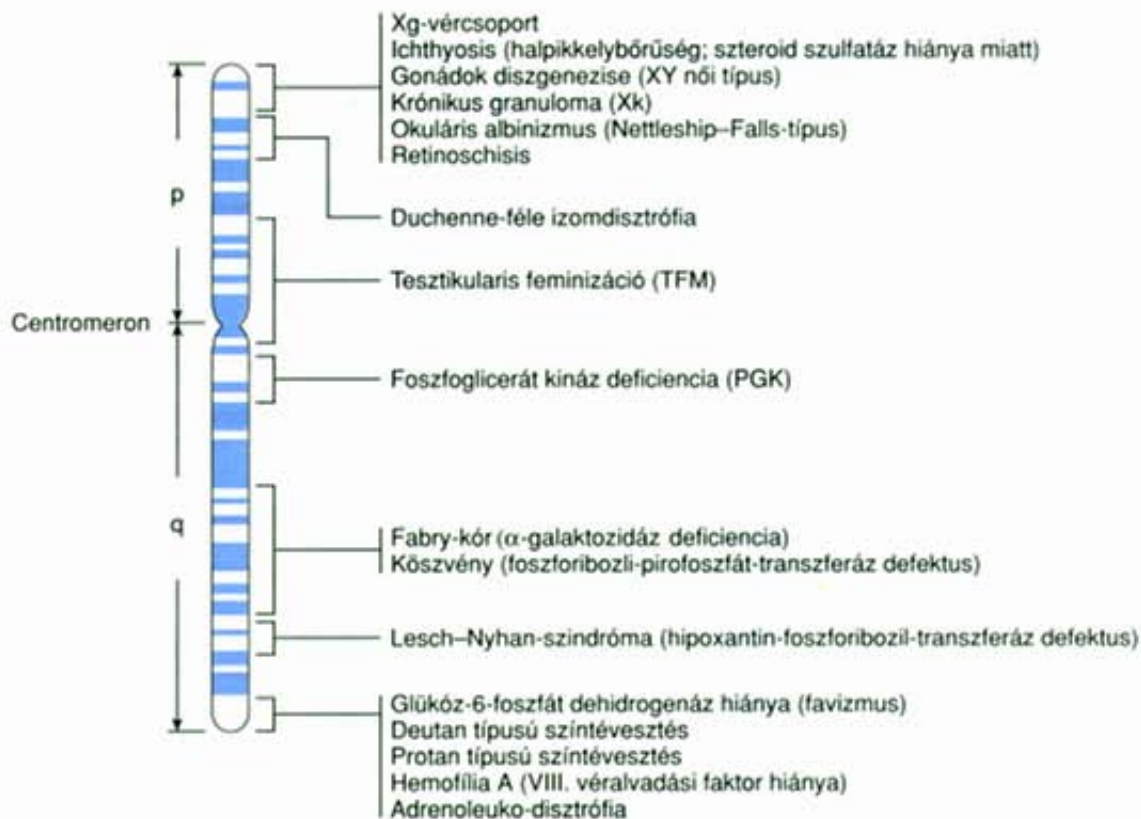
Az X-kromoszóma térképezése könnyebb, hiszen az X-kromoszómás rekombinációra csak a nők esetében van lehetőség (a férfiaknak egy X- és egy Y-kromoszómájuk van), és a rekombináns ivarsejtek a fiú utódokban nyilvánulnak meg. Vagyis, ha az anya kettős heterozigóta ismert gamétatípusokkal, és elegendő számú fiúgyermek születik, a rekombinációs gyakoriságot meg lehet becsülni.

Az 5.9. ábrán az X-kromoszómához kapcsolt szintévesztés és a hemofília (vérzékenység) példája látható. A II-1 asszony egészséges volt, egyik recesszív jelleget sem mutatta, de született három vérzékeny és szintévesztő fia, egy színvak fia és két egészséges fia. Mivel az asszony édesapja (I-2) mindkét tulajdonságra nézve egészséges volt, az asszony apai ágon csak normál allélos X-kromoszómát örökölhettek, így anyjától származhatott a két recesszív allélt tartalmazó X-kromoszómája. Tehát a nő coupling fázisú kettős heterozigóta volt ($H C/h c$). Így az öt fiú, akik vagy egészségesek voltak ($H C/Y$) vagy mindkét betegségben szenvedtek ($h c/Y$), nem rekombináns gamétát örököltek tőle. A ha-



5.9. ábra. Az ábrázolt családfán a két X-kromoszómához kapcsolt génre heterozigóta genotípusú anyának (II-1) öt nem rekombináns (1, 2, 3, 4, 6) és egy rekombináns fia (5, *-gal is jelölve). Emellett öt lánya egészséges

todik fiú azonban (III-5) egy rekombináns ($H c$) gamétát örökölt. Ebben a családban a rekombináció gyakorisága $\frac{1}{6} = 0,167$. Ahhoz, hogy a két gén közötti térképtávolságot pontosan tudjuk megbecsülni, sok ilyen családot kell megvizsgálni, majd az egyes családokra kapott adatokat különböző statisztikai módszerekkel összegezni kell. Erre a két tulajdonságra hasadó családoknál általában nincs rekombináns, mert a gének szorosan kapcsoltak az X-kromoszóma hosszú karjának végén. Ezeket a géneket és más X-kromoszómához kötött géneket egymáshoz viszonyított térképhelyzetük alapján ábrázolja az 5.10. ábra.



5.10. ábra. Gének egymáshoz viszonyított helyzete az ember X-kromoszómáján, ahol p és q a kromoszóma rövid, illetve hosszú karját jelöli

Stickerberger, Monroe W.: Genetics. 3. kiadás. © 1985. A Prentice-Hall, Inc. (Upper Saddle River, NJ.) engedélyével.

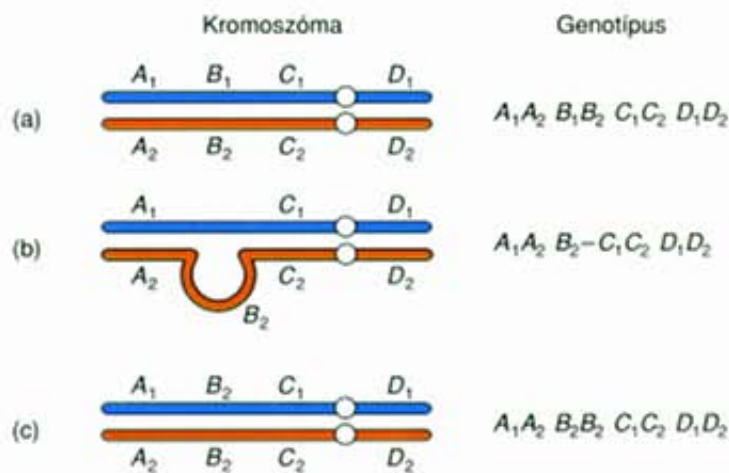
Érdekes módon az autoszómás gének rekombinációs aránya a férfiakban és a nőkben gyakran különbözik. J. B. S. Haldane, angol evolúcióbiológus felvetette, hogy azokban a szervezetekben, amelyekben az ivar meghatározása kromoszómális alapon történik, a rekombináció általában fokozottabb a homogamétás nemben. Emlősöknél rendszerint a nőstény a homogamétás. Mind az embernél, mind pedig az egérnél a rekombinációs gyakoriság nagyobb a nőnemű egyedekben. A vizsgált emberi gnpárokból mintegy 50-100%-kal nagyobb. A *Drosophila* esetében, ahol szintén a nőstény a homogamétás, a hímekben nincs rekombináció. A selyemhernyónál, ahol a nőstények a heterogamétásak, a nőstényekben nincs rekombináció.

Az emberi genomot nem ismerjük olyan részletességgel, mint a *Drosophiláét*, de a teljes térképhosszúság a meiózis I. fázisában előforduló átlagos kiazmaszám alapján becsülhető. Férfiakban a becsült átlagos kiazmaszám kb. 50/sejt, azaz bivalensenként valamivel több kettőnél. Feltételezve, hogy minden 50 térképegységre 1 kiazma jut, a teljes térképtávolság a 23 emberi kromoszómára elosztva kb. 2000-2500 térképegység lehet, ez a *Drosophila* genom térképhosszához közel tízszerese.

Sok emberi génnek nem ismerjük kromoszómális helyét, és még kevésbé tudjuk azt, hogy az egyes kromoszómákon belül milyenek a kapcsoltsági viszonyok. Néhány esetben a kromoszóma-rendellenességek adhatnak kulcsot a gének lokalizációjához. Így például sok termesztett növénynél a triszómiákat használják a gének helyének meghatározására (l. 4.36. ábra). Elvben

a 21-es triszóm (Down-kóros) egyénekben az érintett kromoszómán lévő gének által termelt enzimek szintjének is különböznie kell lenniük. Mivel azonban a Down-kórosok sok más rendellenességet is mutatnak, nem világos, hogy a biokémiai eltérések egy gén három dózisének, vagy pedig az ilyen egyének rendellenes élettani állapotának a következményei. Hasonlóképpen csökkent a deléciós genotípusú egyénekben a deléciós régióban lévő gének által termelt fehérjék szintje.

Mind a *Drosophilában*, mind a prokariótákban (l. 13. fejezet) a **deléciós térképezés** olyan módszer, amellyel a gének bizonyos kromoszómaszakaszhoz lehet rendelni (l. 4.22. ábra). Tételizzük fel például, hogy egy egyed adott kromoszómaszakaszra, amelyen sok kódomináns gén van (vércsoportok, enzimek gnpjei vagy DNS-változatok) deléciós heterozigóta. Ha mindegyik génre különböző alléljai vannak, akkor mindegyik genotípus heterozigótaként ismerhető fel (5.11.(a) ábra). Ha azonban egy gén a deléciós szakaszon van, akkor a heterozigótának mindig homozigótaként kell megjelenni (5.11.(b) ábra). A deléciós heterozigóták és a valódi homozigóták elkülönítéséhez a családfára vonatkozó információk is szükségesek. Például egy B_2 - deléciós heterozigóta egy B_1B_2 -vel házasodik, akkor lehet olyan B_1 - utód, amely B_1B_1 homozigótának tűnik. De ha a szülő valójában B_2B_2 homozigóta volt, és B_1B_2 heterozigótával házasodott, akkor az utódok fele B_1B_2 , fele pedig B_2B_2 genotípusú, és nincs közöttük olyan B_1 -, amelyik fenotípusosan B_1B_1 lenne.



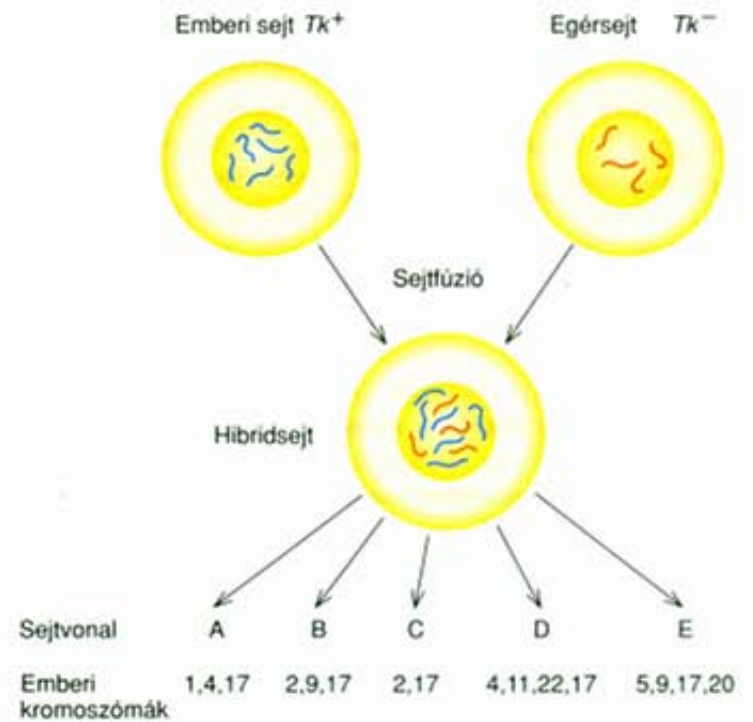
5.11. ábra. (a) Kodomináns allélokra normális heterozigóta; (b) a B régióra deléciós heterozigóta; (c) a B_2 -re homozigóta egyed

SZOMATIKUS SEJTHIBRIDIZÁCIÓ

Egészen napjainkig az emberi gének kromoszomális lokalizációjának meghatározása nagyon nehéz feladat volt. Az egyik rendkívül elmés módszer, amit a kutatók alkalmaztak, a **szomatikus sejthibridizáció** volt. Az eljárás alapja, hogy két eltérő faj sejtjeit laboratóriumi körülmények között fuzionáltatják (egyesítik) olyan sejtfüziót kiváltó anyaggal, mint például a Sendai-vírus. A Sendai-vírusnak több olyan pontja van, ahol kapcsolódni tud gazdasejtjéhez, így lehetővé teszi két, teljesen eltérő eredetű sejt egyesülését. A fuzionált sejtekben a két faj kromoszómái és a vizsgált genetikai tulajdonság (vagy tulajdonságok) egyaránt nyomon követhetők. Az emberi sejteket általában egér vagy hörcsög sejtjeivel hibridizálják. Az emberi kromoszómák többekévé véletlenszerűen elvesznek, ezért a különböző hibrid sejtvonalakból más-más emberi kromoszómák hiányoznak. A vizsgált gént tartalmazó kromoszómát úgy határozzák meg, hogy megjelölik azokat a sejtvonalatokat, amelyek mutatják a kérdéses tulajdonságot, majd keresnek egy olyan emberi kromoszómát, amely hasonló tulajdonságot mutat.

Ezzel a módszerrel elsőként a timidin kináz, a DNS-replikáció egyik fontos enzimjének génjét lokalizálták. Erre az enzimet hiányos egérsejteteket (Tk^-) hibridizáltak az enzimet termelő emberi sejtekkel (Tk^+). A hibrid sejteket olyan táptalajon nevelték, amelyen a sejteknek életben maradásukhoz termelniük kellett az enzimet. Az 5.12. ábra azokat a kromoszómákat mutatja be, amelyeket a timidin kináz termelni képes öt sejtvonaltan azonosítottak. Figyeljük meg, hogy csak 17-es számú humán kromoszóma található meg mindegyik sejtvonaltan. Az adatok alapján tehát a timidin kináz génje az emberi genomban a 17-es kromoszómán van.

Ez a kísérleti technika több irányban kiterjeszhető. Egyes sejtvonaltan például deléciósak lehetnek bizonyos kromoszómaszegmentumokra. Az emberi 17-es kromoszóma hosszú karjára deléciós hibridsejtek Tk^- -ok, ami azt jelzi, hogy a Tk gén a 17-es kromoszóma hosszú karján van. Ha egyidejűleg több tulajdonságot vizsgál-

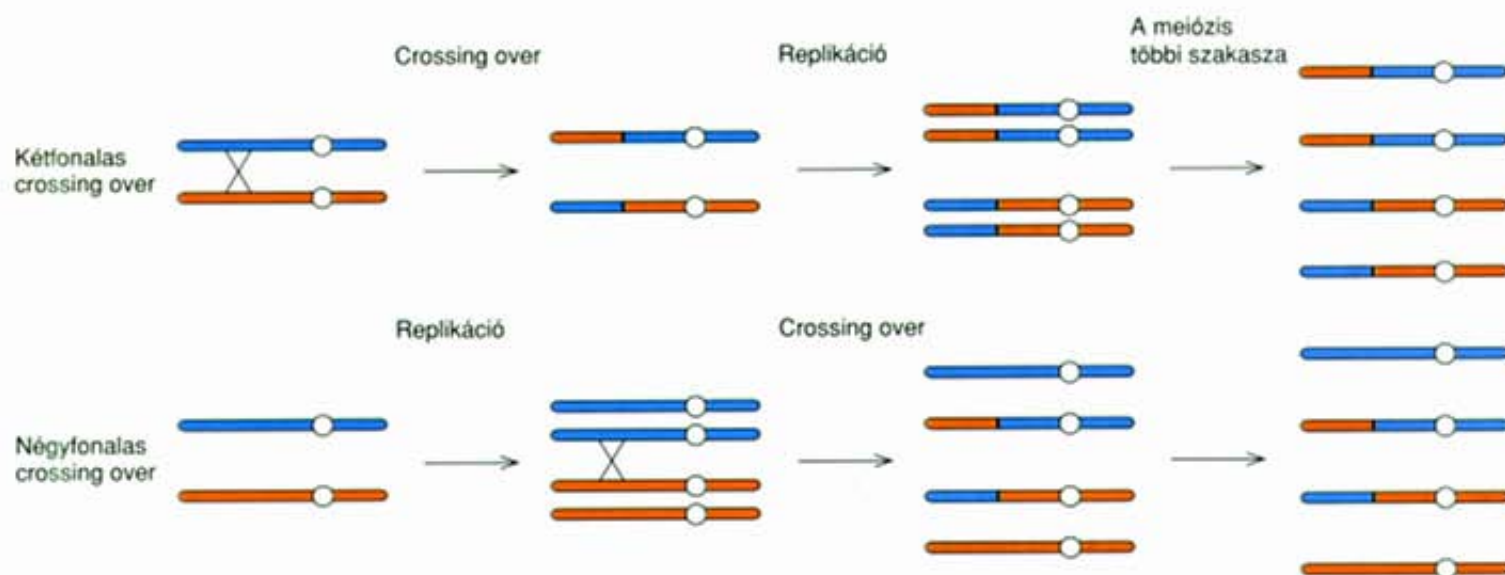


5.12. ábra. Ember és egér sejtjeinek fúziója a timidin kináz génlokalisációjának megállapításához. Az öt, timidin kináz termelő sejtvonaltan csak az ember 17-es kromoszómája a közös, ami azt jelenti, hogy a Tk gén ezen a kromoszómán van

lunk, akkor enzimtermékeik együttes előfordulása vagy hiánya alapján a gének kapcsolódási viszonyait is meghatározhatjuk.

A különböző szervezetek géntérképezésére irányuló kutatások eredményei azt mutatják, hogy a rokon fajok génei sokszor ugyanolyan elrendezésben kapcsolnak. Így például, a rokon emlősök X-kromoszómáin azonos gének találhatóak. Más gének, mint például a Tk , minden emberszabású majomnál azonos kromoszómán vannak, ami alátámasztja az említett fajok kromoszómaszávozásos módszerrel jelzett nagyfokú genetikai homológiáját (l. 4.40. ábra). Másként megfogalmazva, ha egy fajra vonatkozóan két gén kapcsolódási viszonyát állapítjuk meg, vagy meghatározzuk egy gén helyét egy adott kromoszómán, a rokon fajoknál is hasonló viszonyokat tapasztalhatunk. Az ilyen információk ismerete lerövidítheti azt a célkitűzést, hogy minden faj kapcsoltságát mintázatát tisztázzuk. Az ember albinó génjének helyét például nem ismerjük, de az egér és a macska homológ albinó génje olyan régióban található, amelynek sávozási mintázata hasonló az ember 11p kromoszómáján lévőhöz.

Régebben az emberi gének kapcsoltságát a megfelelő családfák adatainak összegzésével határozták meg. Az egér sejtjeivel történő szomatikus sejthibridizálási eljárás alkalmazása azonban sokkal több emberi gén helyének azonosítását tette lehetővé.



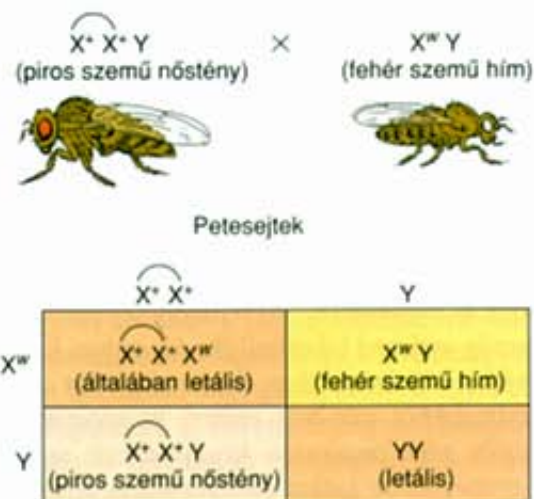
5.13. ábra. A két- és a négyfonalas crossing over eltérő következményei. Négyfonalas crossing overrel rekombináns és szülői gaméták is képződnek, míg a kétfonalas crossing over csak rekombináns ivarsejteket hoz létre

NÉGYFONALAS CROSSING OVER

Morgan elképzeléseit a gének kapcsoltságáról és a crossing over-ről sok adat támasztotta alá. Kezdetben azonban nem tisztázták, hogy a rekombináció a kromoszómák replikációja előtt (kétfonalas állapotban), vagy azután (négyfonalas állapotban) játszódik le. Ha az átrendeződés a replikáció előtt történik, akkor mind a négy kromatida rekombináns, ha azonban a replikáció után lép fel, akkor a négy kromatida közül csak kettő lesz rekombináns (5.13. ábra).

A két lehetőség elkülönítéséhez olyan genetikai rendszerre volt szükség, amelyben a meiózis minden egyes genetikai termékét azonosítani lehet. Az első ilyen kísérleti rendszert *Drosophila*-ra fejlesztették ki, a **kapcsolt X-kromoszóma**, egy olyan komplex kromoszóma alkalmazásával, amely két, centromeronjuknál összekapcsolódott X-kromoszómából áll. Az összekapcsolódás következtében a kapcsolt X-szel és egy független Y-kromoszómával rendelkező nőstények \overline{XXY} gamétái vagy két X-kromoszómát tartalmaznak vagy egy Y-t. Az 5.14. ábra egy olyan keresztezést vázol, amelyben mindkét X-kromoszómán, a *white* lokuszon a vad típusú allél helyezkedik el. A mindkét X-kromoszómán vad típusú allélt hordozó \overline{XXY} nőstényt normális fehér szemű hímekkel keresztezték. Az életképes utódok ugyanolyanok, mint a szülők, mivel az YY egyedek mindig, az \overline{XXX} genotípusúak pedig általában elpusztulnak.

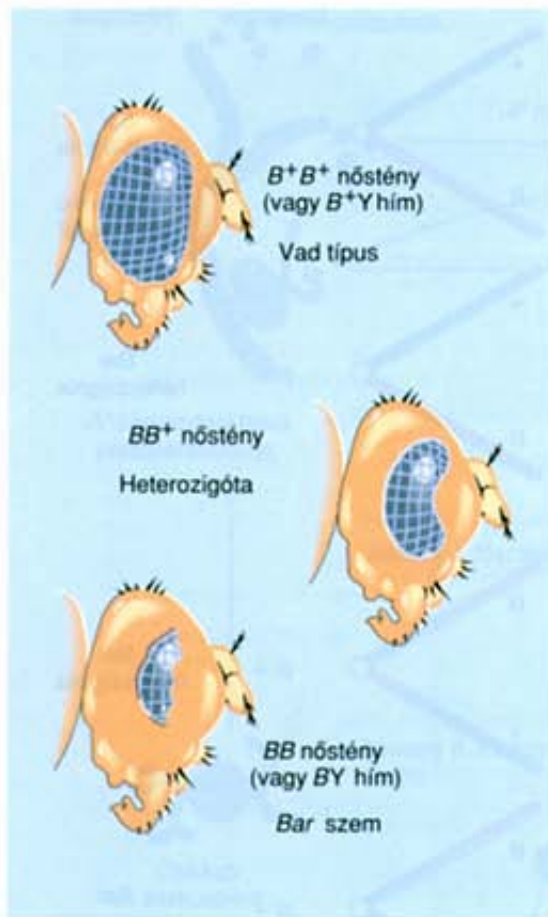
Ha a kapcsolt X-kromoszómákon különböző allélok vannak, akkor a kétfonalas és a négyfonalas crossing over megkülönböztethető. Ehhez a kísérlethez célszerű olyan mutánst használni, amely heterozigóta állapotban is azonosítható. Ilyen a *Bar*-mutáció, amely heterozigóta állapotban a szemben található ommatidiumok számát a normális 780-ról 360-ra, a homozigóta (*BB*) esetében pedig 70-re csökkenti (5.15. ábra).



5.14. ábra. Kapcsolt X-kromoszómás, vad típusú nőstény és fehér szemű hím keresztezése. Az életben maradó utódnemzedék ugyanolyan, mint a szülők

Az 5.16. ábra felső sora jelzi a crossing over nélkül keletkező kromoszómákat. Ebben az esetben minden X-et hordozó gamétának van heterozigóta kapcsolt X-kromoszómája és így a heterozigóta *Bar* fenotípus is megjelenik. Ha a kétfonalas állapotban crossing over következne be (replikáció előtt), akkor abban mindkét fonál részt vesz, ezért a keletkező gaméták ismét heterozigóták. Vagyis crossing over nélkül és kétfonalas crossing over után is ugyanaz az eredmény.

Eltérő eredményt ad az utódok között a négyfonalas állapotban bekövetkező crossing over. Ebben az esetben a négy közül csak két kromatida vesz részt a crossing overben, és így új típusok keletkeznek. Négyfonalas állapotban bekövetkező



5.15. ábra. Vad típusú, heterozigóta Bar szemű és homozigóta Bar szemű egyedek fenotípusa

rekombináció eredményeként mind vad típusú, mind pedig *BB* homozigóta egyedeknek meg kell jelenniük. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a rekombináció a replikáció után, négyfonalas állapotban következik be.

TETRÁDANALÍZIS

A négyfonalas állapotban zajló crossing over létét a *Neurospora crassa*val folytatott kísérletek is megerősítették. Ez a tömlősgomba genetikai kísérletekre nagyon alkalmas, azon sajátja miatt, hogy meiotikus termékei lineáris elrendezésben jelennek meg. Életciklusát az 5.17. ábra mutatja be a párosodással, a diploid sejt kialakulásával, majd az ezt követő meiózissal. A meiózis termékei, az askospórák a tömlőben (ascus) oly módon helyezkednek el, hogy az egyik oldalon lévő négy spóra a meiózis I. fázisának egyik utódsejtjéből származik, míg a másik négy spóra a másik utódsejt terméke. A meiózis befejeződése után ugyanis lejátszódik egy mitotikus osztódás is, és így a meiózis II. fázisának utódsejtjeiből egy-egy spórapár képződik. A négy meiotikus terméket, amelyek lineárisan négy askospóra párba rendeződnek, **tetrádnak** nevezik.

Amennyiben nincs crossing over egy heterozigótában, akkor az askusz egyik felén lévő spórák az egyik, a másik felén lévő spórák pedig a másik allélt tartalmazzák (5.18. ábra). Az askusz egyik felében lévő askospórák az egyik centromeronnal, az askusz másik felében lévők pedig a másik centromeronnal kapcsolódó kromoszómákat kapják. Ha a vizsgált gén és a centromeron között történt crossing over, akkor a spórapárok alternált helyzetben tartalmazzák az egyes allélokat. Ez az elrendezés csak akkor jöhet létre, ha a rekombináció négyfonalas állapotban zajlik. A kétfonalas crossing overert nem lehetne elkülöníteni a crossing over nélküli állapottól, feltéve, ha nem voltak más marker gének.

Mivel egy askuszban az askospórák felső fele az egyik centromerontól, alsó fele pedig a másik centromerontól származik, ezért a centromeron és egy adott gén közötti rekombináció gyakorisága a rekombináns askuszok száma alapján meghatározható. Például, ha a vizsgált askuszok egy csoportjának 84%-a olyan, mint az 5.18. ábra felső felén (az askuszok egyik felében minden askospóra *A*, a másik felében pedig mindegyik *a* genotípusú), a fennmaradó 16% pedig olyan, mint az 5.18. ábra alsó felén (vagyis az askusz mindkét részén van *A* és *a* genotípusú askospóra is), akkor a rekombináció gyakorisága 0,16.

A *Neurospora*n végzett egyéb kísérletek bővítették ismereteinket a meiotikus rekombináció alapvető tulajdonságairól. Így például az a három alapvető mód, ahogyan nem-testvérkromatidák között kialakulhat kétszeres crossing over, a *Neurospora*nál elkülöníthető (5.19. ábra). Ha három gén van egy kromoszómán, és mindkét átkereszteződés ugyanazokat a kromatidákat érinti (mint az 5.19.(a) ábra középső részén), akkor négyféle askospóra típus keletkezik, és a szülői típusok lesznek az askusz végein. Ez a kétszeres rekombináció típusa, amelyet egy korábbi fejtegetésünkben már feltételeztünk.

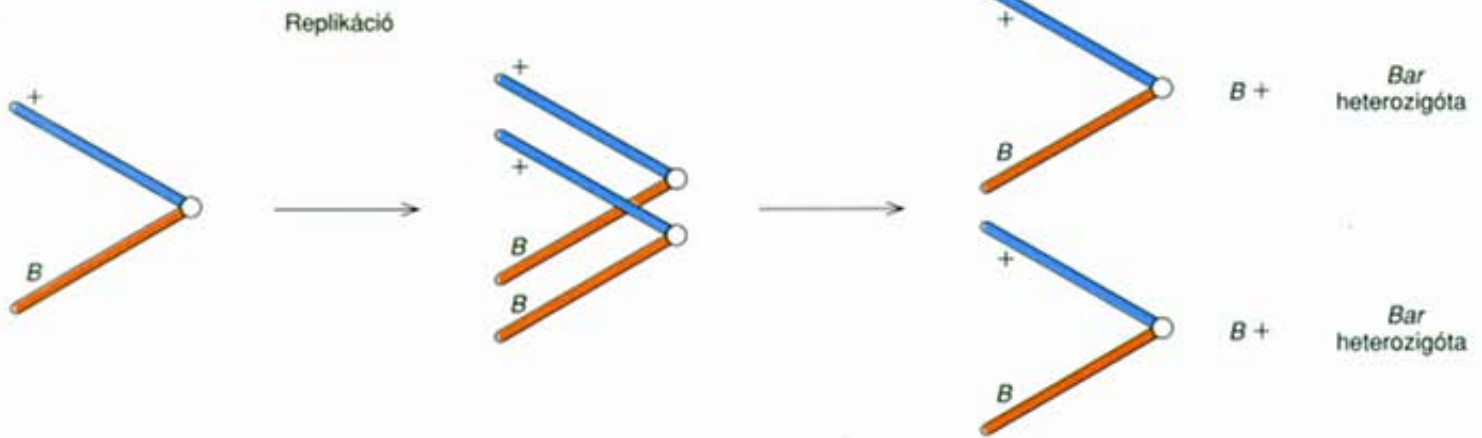
Különböző nem-testvérkromatidák is szerepelhetnek a két rekombinációban (5.19.(b) ábra). Az is előfordulhat, hogy az egyik kromoszómának csak az egyik, míg a másiknak mindkét kromatidája részt vesz a két crossing overben (5.19.(c) ábra). Az utóbbi esetben az egyik szülői típusú gaméta (*ABC*) az askusz belsejébe kerül.

Azt a tényt, hogy a crossing over a meiózis I. fázisának négyfonalas állapotában zajlik, a *Drosophila* kapcsolt X-kromoszómáinak segítségével mutatták ki legelőször. Az elmélet helyességét a *Neurospora*n végzett kísérletek eredményei megerősítették.

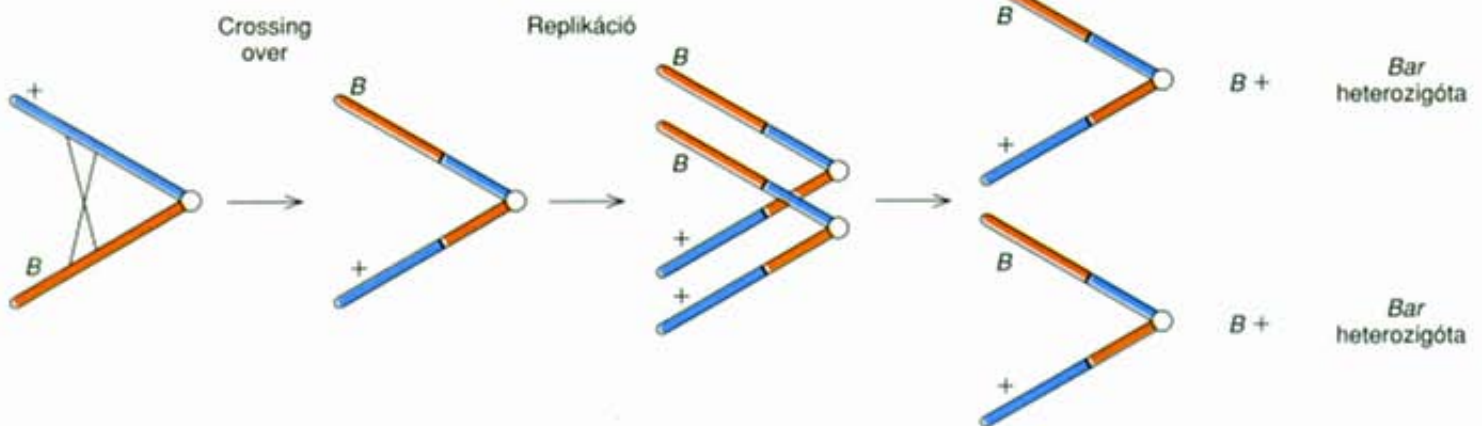
INVERZIÓK ÉS A REKOMBINÁCIÓ

Ha az egyedek heterozigóták a kromoszómális változatokra, akkor a meiózis termékei életképtelenek lehetnek (l. előző fejezet). Amikor az egyed egy inverzióra vagy egy transzlokációra heterozigóta, akkor duplikációs vagy deléciós gamétái is képződhetnek. Az inverzióval kapcsolatos problémát megérthetjük a négyfonalas rekombinációra vonatkozó ismer-

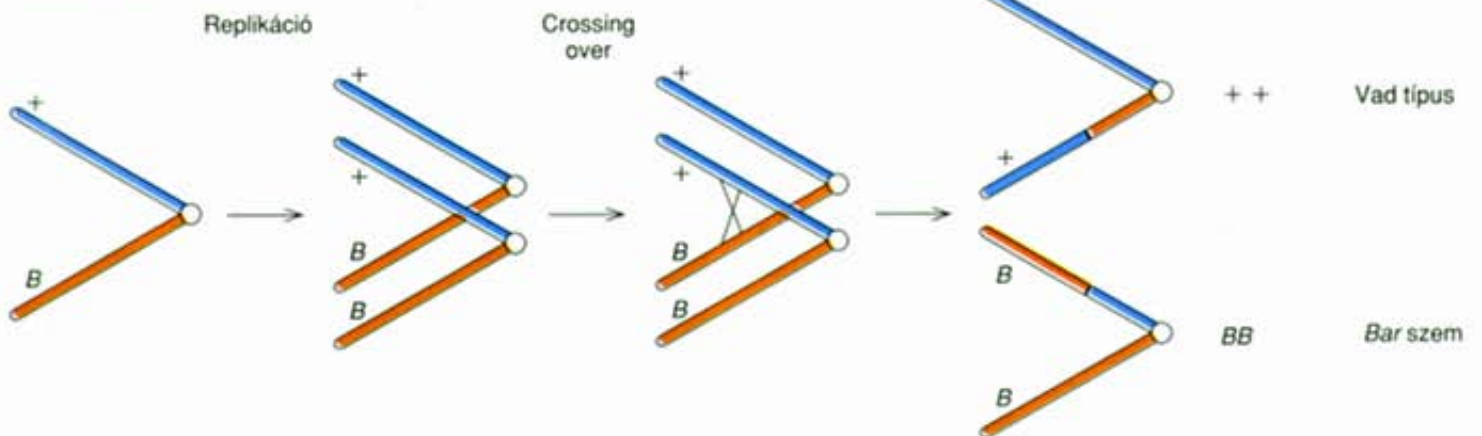
Nincs crossing over



Kétfonalas crossing over



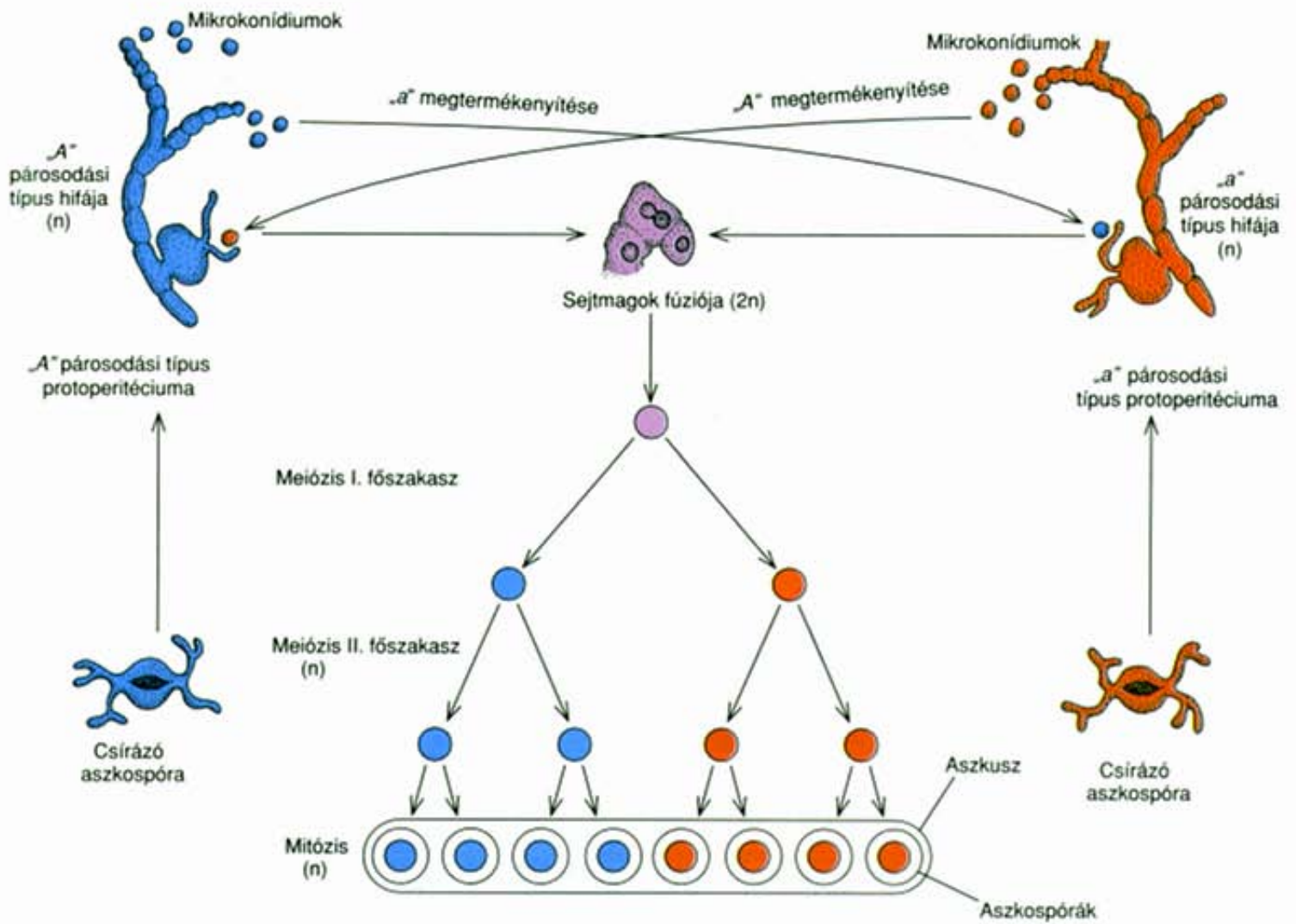
Négyfonalas crossing over



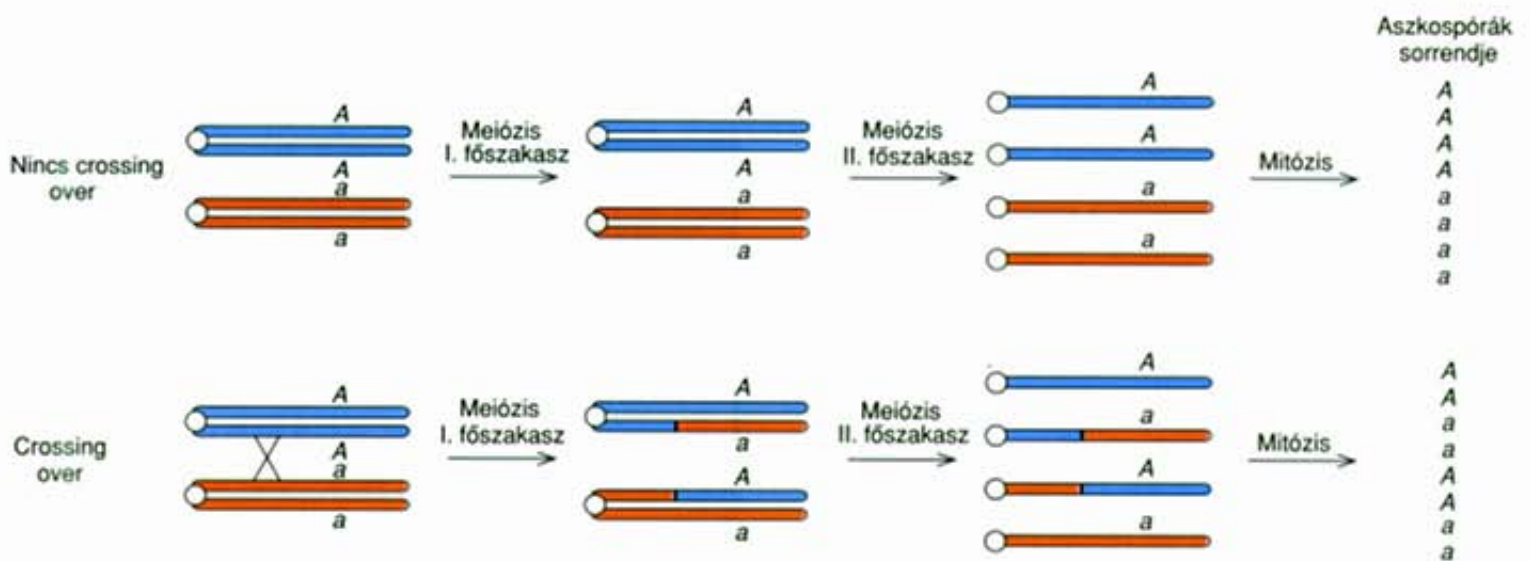
5.16. ábra. A *Bar* génre heterozigóta kapcsolt X-kromoszómás egyed gamétái crossing over nélkül (fent), illetve a két- és négyfonalas crossing overrel képződő gaméták lehetséges típusai. A kísérletekben a vad és a *Bar* fenotípusú utódok megjelenése azt mutatja, hogy a crossing over négyfonalas állapotban következik be

retek felhasználásával. Az előző fejezetben ismertettük, hogy az inverziók vagy tartalmazzák a centromeront (pericentrikus) vagy nem (paracentrikus). Ha egy egyed inverziós heterozigóta valamelyik inverzió típusra és rekombináció csak az inverziós hurkon kívül jön létre, akkor a meiózis termékei-

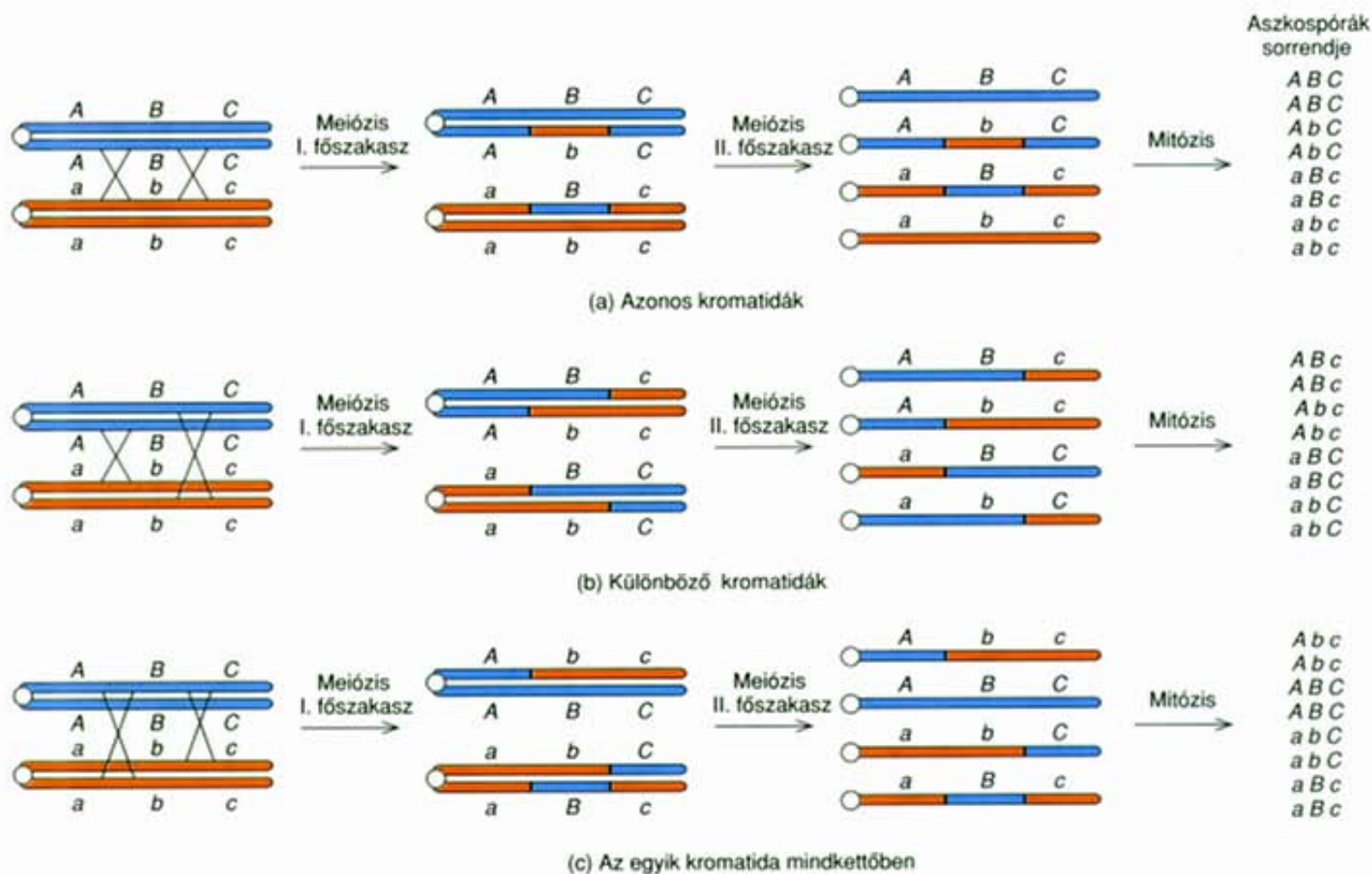
nek a szülői kromoszómákkal azonos génjei és génsorrendjei vannak. Ha azonban a crossing over az inverziós hurkon belül alakul ki, akkor a keletkező kromoszómák rendellenesek lehetnek. Az 5.20.(a) ábra egy paracentrikus inverziós hurkon belüli, *B* és *C* gének közötti, rekombináció termékeit mutat-



5.17. ábra. A *Neurospora crassa* aszkospóráinak képződése a meiózis során. Az aszkospórák lineárisan rendeződnek el, úgy, hogy a két aszkuszfél a meiózis I. fázisának 1-1 szegregánsából származik. Mindegyik negyed egy centromeronnal kapcsolódó kromatidából származik



5.18. ábra. Az aszkospórák sorrendje crossing over nélkül, illetve egy crossing over után



5.19. ábra. Három különböző típusú kettős crossing overből származó aszkospóra-sorrend. (a) Ugyanazok a kromatidák vesznek részt; (b) különböző kromatidák vesznek részt; (c) az egyik kromatida mindkét eseményben részt vesz

ja be. Az I. anafázisban a homológ kromoszómák eltávolodásakor a rekombinációban részt vevő egyik kromatida **acentrikus** lesz (centromeron nélküli), a másik pedig **dicentrikus** (két centromeronnal). Az acentrikus fragmentum rendszerint nem vándorol a pólusokhoz és elvész, a dicentrikus fragmentum pedig többé-kevésbé véletlenszerűen valahol a két centromeron között eltörik. Amikor a meiózis II. fázisában a centromeron kettéválik, az eredmény két kiegyensúlyozott kromoszóma lesz – egy normális és egy megfordult génsorrendű – valamint két kromoszóma, amely vagy deléciós, vagy deléciós és duplikációs. Ebben a példában az egyik rendellenes kromoszómáról (*EFG*) hiányzik a kromoszómának több mint a fele, a másiktól pedig csak az *A* régió, de a *D* régióban van egy duplikáció. E rendellenes kromoszómákat tartalmazó gamétákból képződő zigóták minden valószínűség szerint letálisak.

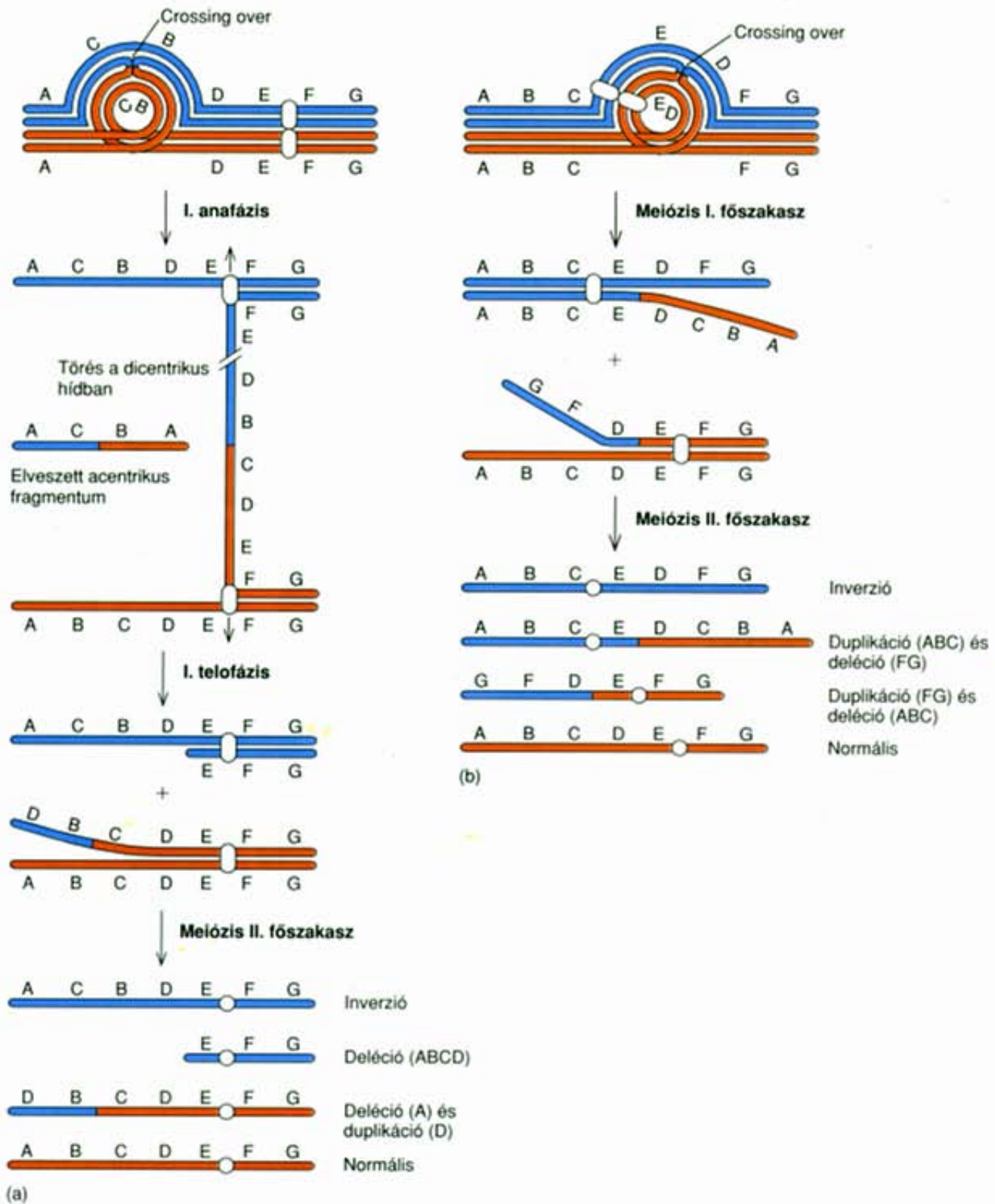
A pericentrikus inverziós hurkon belüli rekombináció szintén rendellenes kromoszómákhoz vezethet. Tétélezzük fel, hogy a *D* és az *E* gének között rekombinációra kerül sor (5.20.(b) ábra). Ismét keletkezik két kiegyensúlyozott kromoszóma, de ebben az esetben a másik párnak duplikációja és deficienciája is lesz. Az ilyen nem kiegyensúlyozott kromoszómákat tartalmazó zigóták valószínűleg ugyancsak letálisak.

A fentiekből látható, hogy az inverzióban bekövetkező rekombináció után képződő kromoszómákon deléción, vagy deléción és duplikáción alakul ki, ezért ezek gyakran letálisak. Ennek eredménye, hogy az invertált régiókban a rekombináció gátoltnak tűnik, mivel nem lehet rekombinációs termékeket megfigyelni. Ráadásul, az inverziós heterokariotípusokban a kromoszómapárok kialakulásának nehézségei miatt az invertált régióban és annak közelében gyakran csökken a rekombináció.

Amikor rekombináció következik be egy inverziós heterokariotípus inverziós régiójában, a meiotikus termékekben duplikációk és deficienciák figyelhetők meg.

EGYENLŐTLEN CROSSING OVER

A genetikai anyag viszonylag kis mennyiségének deléción vagy duplikáción rekombinációs hiba miatt is keletkezhet. A homológ kromoszómapárok kromatidái az I. profázisban erősen kapcsolódnak, gén-gén melletti párosodás alakul ki, ahogyan azt az



5.20. ábra. Egy paracentrikus inverziós hurkon (a) és egy pericentrikus inverziós hurkon (b) belül létrejövő egyszerűes crossing over meiotikus termékei

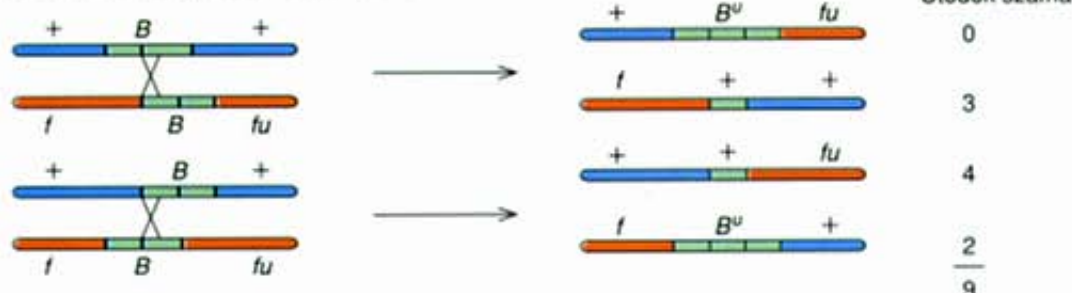
előzőekben már tárgyaltuk. Ez a párosítás ritkán pontatlanul játszódik le, különösen akkor, ha a régiókban már duplikációk vagy ismétlődő szekvenciák is vannak. Ha a hibásan párosított szakaszon rekombináció következik be, akkor duplikációk vagy deléciók alakulhatnak ki.

A jelenség klasszikus példája a *Drosophila Bar* mutánsa. A *Bar*-génre homozigóta törzsekben hozzávetőlegesen 1600 új kromoszómánként lesz egy vad típusú vagy egy nagyon keskeny szemű variáns, a 25 fécettés szemű *Ultrabar* (B^U). Sturtevant és Morgan kimutatta, hogy ezek nem új mutánsok, hanem rekombinációs termékek.

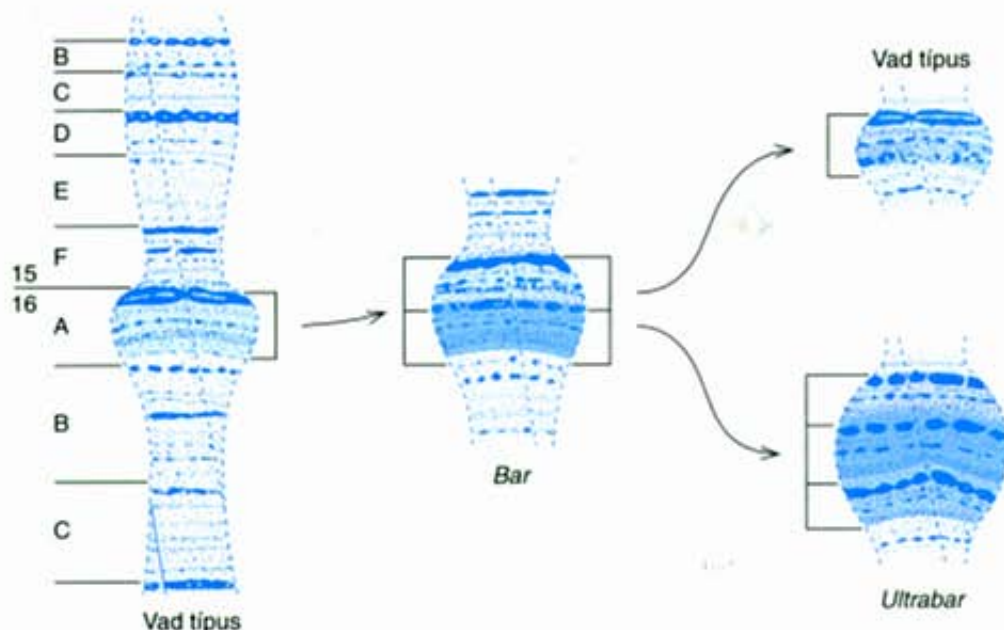
Szabályos kromozómapárosodás és crossing over



Hibás párosodás és egyenlőtlen crossing over



5.21. ábra. Szabályos crossing over eredménye (fent). Hibás kromozómapárosodás és egyenlőtlen crossing over következtében kialakuló vad típusú és *Ultrabar* típusú kromozómák (lent). A feltüntetett utódszámok a 20 000 egyedre jutó rendellenes típusok számát jelentik



5.22. ábra. Homozigóta *Bar*-mutánsok politén kromozómáinak sávmintázata. A 16A sávnak a vad típusnál egy, a *Bar* típusnál kettő, az *Ultrabar* típusnál három kópiája figyelhető meg

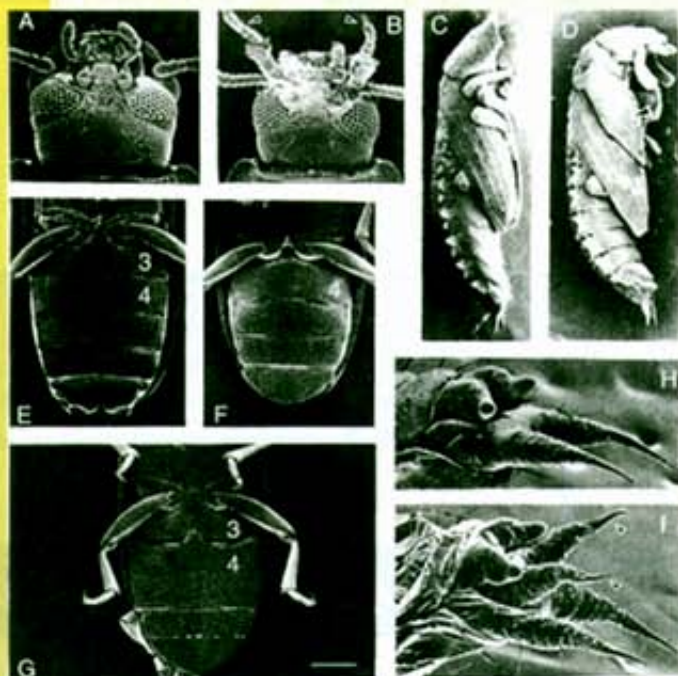
Az *Ultrabar* eredetének kiderítésére Sturtevant és Morgan olyan jelölt kromozómákat szerkesztett, amelyek a *Bar*-mutáción kívül más mutációkat is tartalmaztak a *Bar* régió valamelyik oldalán. A kromozómák a *Bar*-gén egyik oldalán az elágazó sertét *forked* (*f*) okozó recesszív mutációt, másik oldalán pedig a két szárnyvéna fúzióját okozó recesszív mutációt (*fu*) hordozzák (5.21. ábra). A gének térképhelyzete: $f = 56,7$, $B = 57,0$ és $fu = 59,5$. Tehát az X-kromozómának viszonylag kicsi, 3 térképegységnyi szakaszát lehet velük vizsgálni. A *Bar*-génre homozigóta, de a másik két génre heterozigóta (coupling) nőstényeket hármass mutáns kromozómájú hímekkel keresztezték, hogy bármelyik rekombináns kromozómát azonosítani tudják. A közel

20 000, elemzett utód legtöbb kromozómája nem volt rekombináns, azaz $+ B +$, vagy $f B fu$, mert a marker gének szorosan kapcsolódtak *B*-vel. A rekombinánsok közül majdnem mindegyik *Bar* szemű volt, de hét vad típusú kettő *Ultrabar* fenotípusú is megjelent. Ténylegesen a *Bar*-allélt nem tartalmazó kromozómák mindegyike rekombináns volt, három $f++$, négy $++ fu$ és a kettő $f B^u +$.

Az X-kromozóma sávjainak részletes analízise megerősítette, hogy egy szakaszának megkettőződése felelős a *Bar* fenotípusért. A *Bar* típusú kromozómáknak van egy duplikációjuk a 16A régióban (5.22. ábra). Ezekből egyenlőtlen rekombinációval egy kópiát tartalmazó, vad típusú és háromkópiás, *Ultrabar* típusú kromozómák képződhetnek.

5.1. Multigéncsaládok

Sok génről már tudjuk, hogy ún. multigéncsaládok formájában léteznek. Valószínű, hogy a legtöbb ilyen géncsalád egyenlőtlen crossing overrel, és azt követő tandem duplikációval jött létre. A multigéncsaládokban az egyes géneknek általában azonos vagy hasonló funkciójuk van. Ha azonban a duplikáció az evolúció során régen keletkezett, akkor a géncsalád egyes tagjainak kissé eltérő feladataik is lehetnek.

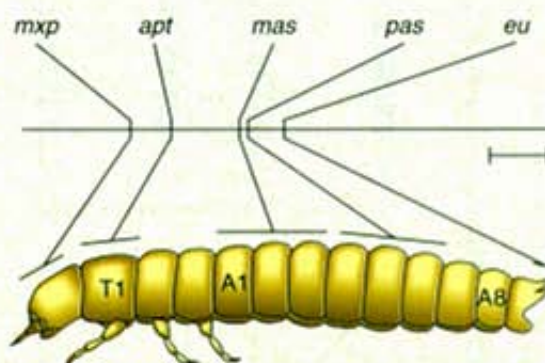


M5.1. ábra. A lisztbogár öt, szorosan kapcsolt homeotikus génjének normális fenotípusai az (A), (C), (E), és (H) részekben. Mutáns fenotípusok a (B), (D), (F), (G), és (I) ábrarészleteken. A mutáns fenotípust eredményező öt gén az M5.2. ábrán látható
Richard W. Beeman, USDA

Vannak olyan esetek, amikor a rokon funkciót ellátó gének szorosan kapcsolatosak: ilyenek például a különböző globin gének, vagy a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) génjei az emlősöknél. A fejezet következő részében ismertetjük az ember MHC-génjeinek kapcsoltságát, az ún. HLA-régió szerkezetét. Úgy gondolják, hogy a hasonló szerkezetű és funkciójú kapcsolt gének eredetileg egy egyenlőtlen crossing overből származó duplikáció révén alakulhattak ki. A rokon gének ilyen csoportját **multigéncsaládnak** nevezik (l. 5.1. melléklet).

Néha egyenlőtlen crossing over jön létre, ami duplikáció révén növelheti a DNS-mennyiséget.

Különösen érdekes a lisztbogarak (*Tribolium*) kapcsolt gének csoportjából álló, **homeotikus** géneket tartalmazó multigén-családjá. A rovarok egyes testszelvényeiben különböző homeotikus gének irányítják a sejtek megfelelő anatómiai struktúrává történő differenciációját (M5.1. ábra). Közülük öt egy 2,6 térképegységnyi kromoszómarészleten található. Ráadásul a gének sorrendje azonos az általuk szabályozott testszelvények sorrendjével (M5.2. ábra).



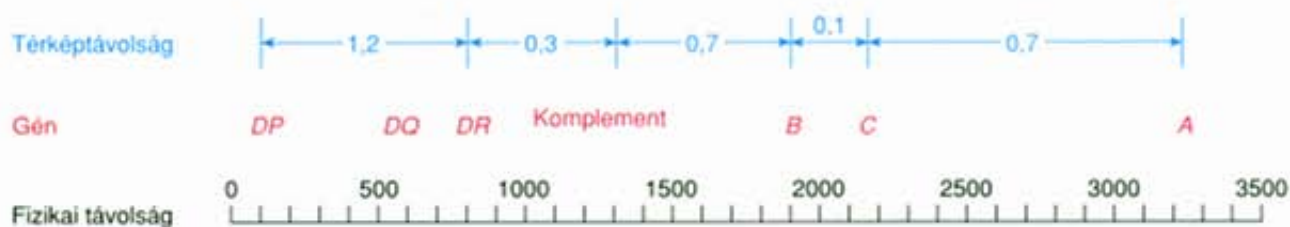
M5.2. ábra. A lisztbogár (*Tribolium*) öt homeotikus génje és az érintett testszelvények (←→ = 1 térképegység hossza)

Richard W. Beeman, USDA engedélyével

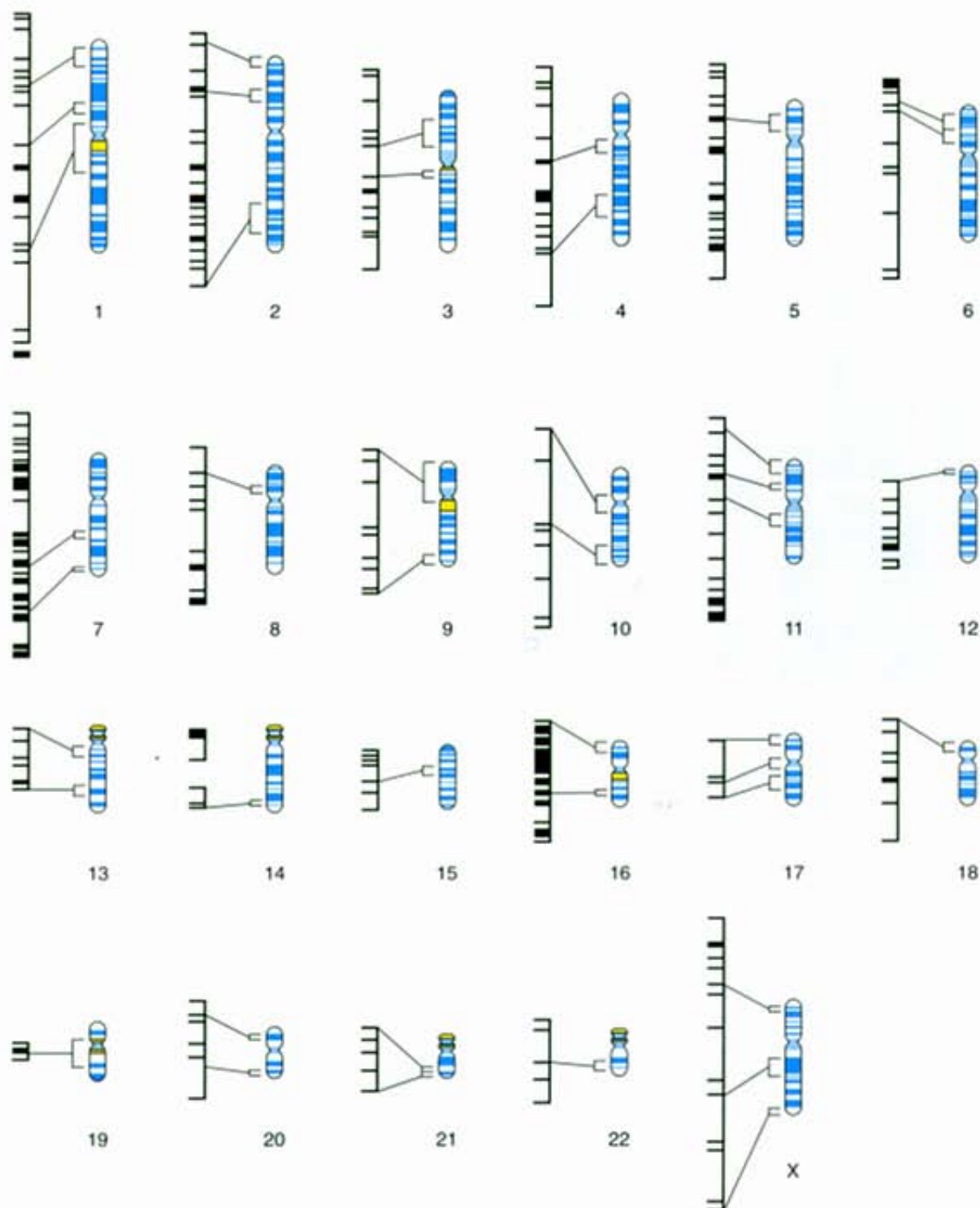
TÉRKEPTÁVOLSÁG ÉS FIZIKAI TÁVOLSÁG

Már említettük, hogy a két gén között genetikai keresztezésekkel becsült térképtávolság általában jó megegyezést mutat fizikai távolságukkal, vagyis a géneket elválasztó DNS-szakasz tényleges hosszával. Az egyik legfontosabb kivétel ez alól a centromeron régiója, ahol nincs rekombináció, de jelentős hosszúságú DNS-szakaszt tartalmazhat. Úgy tűnik továbbá, hogy a rekombináció gyakran speciális régiókban megy végbe, és a folyamat nem teljesen véletlenszerű az egész kromoszóma hosszában.

A genetikai és a fizikai térkép összehasonlításához vizsgáljuk meg az ember fő HLA-génjeinek becsült térképtávolságát, illetve a kilobázisok számát a DNS-ben, azaz a fizikai távolságot



5.23. ábra. A genetikai térképtávolság (térképegységekben) és a fizikai térképtávolság (kilobázisokban) összehasonlítása a HLA-régióban



5.24. ábra. Az emberi genom egyik korai térképe (ma már jóval részletesebb térképek is vannak), amelyen az egyes kromoszómák bal oldalán lévő diagramok a különböző RFLP-k közötti relatív térképtávolságot mutatják. A jobb oldali kromoszómákon pedig néhány RFLP hely fő sávozási mintázata látható

(5.23. ábra). A *B*- és *C*-génnek például fizikailag közel vannak egymáshoz és térképtávolságuk is csak 0,1. Ugyanakkor a *DP*- és a *DR*-génnek fizikailag közelebb vannak egymáshoz, mint a *C* és az *A*, de térképtávolságuk nagyobb. Ez azt sejteti, hogy *DP* és *DR* között a vártnál több rekombináció következik be.

Jelenleg több laboratórium dolgozik az emberi géntérkép elkészítésén (5.24. ábra és a 15. fejezet legújabb adatai). A térképen az első viszonyítási pontok többsége olyan DNS-variáns, amit **restrikciós fragmentumhossz polimorfizmusnak** (RFLP) neveznek. Az RFLP-t a 15. fejezetben tárgyaljuk részletesen. Figyeljük meg, hogy egyes kromoszómákon, mint például az 1-es és a 7-es, igen sok ilyen marker található, míg másokon – 14-es és 19-es –, csak kevés. Ezek és más molekuláris markerek felhasználásával a markerek ezreit találták meg az emberi genom különböző részein. Mindegyik kromoszóma genetikai térképe jól közelít a kromoszómasávozási vizsgálatok alapján elkészített fizikai térképhez. Ez az újfajta térkép hatékonyan segíthet abban, hogy bizonyos betegségek génjeinek a helyét megtaláljuk, majd a DNS-t elemezve kiderítsük, hogy mi is okozza a rendellenességet.

A genetikai térképtávolság és a fizikai DNS-távolság általában összhangban van egymással. Napjainkban DNS-variánsokat használnak az emberi genom térképezéséhez.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Vad típusú *Drosophila* törzset egy olyan másik törzssel kereszteztünk, amely homozigóta volt az X-kromoszómához kapcsolt három recesszív, *m*, *r* és *v* mutációra. Az F_1 nőtényeit visszakeresztettük a recesszív törzs hímjével, és a következő utódszámokat kaptuk:

+	+	+	331
<i>m</i>	+	+	2
+	<i>r</i>	+	73
+	+	<i>v</i>	14
<i>m</i>	<i>r</i>	+	10
<i>m</i>	+	<i>v</i>	81
+	<i>r</i>	<i>v</i>	0
<i>m</i>	<i>r</i>	<i>v</i>	<u>309</u>
			820

Mi lehet a gének sorrendje és mekkora a térképtávolság közöttük?

MEGOLDÁS

Három lehetséges génsorrend írható fel: *m-r-v*, *m-v-r* és *r-m-v*. A két legkisebb arányban képződő osztály, az *m++* és a *+m* kétszeres crossing over eredménye. Az egyetlen lehetőség, hogy a *+m+r+v* nőtényekből kettős rekombinációval ilyen utódok keletkezzenek,

az, ha az *m* gén van középen, vagyis a génsorrend: *v-m-r* (l. az 5.6. ábrát, a *y*, *w* és *m* génekre).

A térképtávolságok meghatározásához az utódok genotípusát úgy írjuk fel, hogy az *m* legyen középen. Számoljuk össze régióként a rekombináns utódokat, és osszuk el az összes utódszámmal:

Genotípus			Egyedszám	A rekombináció régiója
+	+	+	331	nincs
+	<i>m</i>	+	2	<i>v-m</i> , <i>m-r</i>
+	+	<i>r</i>	73	<i>m-r</i>
<i>v</i>	+	+	14	<i>v-m</i>
+	<i>m</i>	<i>r</i>	10	<i>v-m</i>
<i>v</i>	<i>m</i>	+	81	<i>m-r</i>
<i>v</i>	+	<i>r</i>	0	<i>v-m</i> , <i>m-r</i>
<i>v</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<u>309</u>	nincs
			820	

A *v-m* régióra a rekombináció gyakorisága:

$$v - m = (2 + 14 + 10 + 0) / 820 = 0,032$$

Az *m-r* régióra a rekombináció gyakorisága:

$$m - r = (2 + 73 + 81 + 0) / 820 = 0,190$$

Vagyis a *v* és *m* között a térképtávolság 3,2; az *m* és az *r* közötti távolság 19,0; a *v* és *r* között pedig 22,2 térképegység. A térképtávolságokat *v* és *m*, valamint *m* és *r* között úgy számítottuk ki, hogy a rekombinációs gyakoriságokat 100-zal megszoroztuk.

2. FELADAT

Neurospora aszkuszokat vizsgáltunk két lokusz figyelembevételével, amelyek alléljai a meiózis előtt heterozigóták voltak.

Ennek a keresztezésnek az eredményeit először csak az *A* génre vonatkozóan nézzük meg:

Aszkusztípus	Száma
<i>AAAA aaaa</i>	56
<i>AAaa AAaa</i>	8
<i>AaAa aaAA</i>	11
<i>aaAA aaAA</i>	12
<i>aaAA AAaa</i>	7
<i>aaaa AAAA</i>	62

Mekkora a rekombináció gyakorisága a centromeron és az *A*-gén között?

Ha mindkét génre (*A* és *B*) elvégezzük a vizsgálatokat, akkor az alábbi típusú aszkuszokat kapjuk. Ebben az esetben a két gaméta genotípusa, amelyek a meiózis előtt összeolvadtak, *AB* és *aB* volt. Mekkora a rekombináció gyakorisága a két lokusz között?

	Aszkusztípus			
Felső	<i>AB ab</i>	0,5 <i>AB</i> , 0,5 <i>ab</i>	0,5 <i>Ab</i> , 0,5 <i>aB</i>	
Alsó	<i>ab AB</i>	0,5 <i>ab</i> , 0,5 <i>AB</i>	0,5 <i>aB</i> , 0,5 <i>Ab</i>	
Darab	54	51	23	28

MEGOLDÁS

A centromeron és az *A*-gén közötti rekombinációs gyakoriságot úgy kapjuk meg, ha a rekombináns aszkuszok számát osztjuk az összes vizsgált aszkuszok számával. Ebben az adatsorban a középső négy típus volt rekombináns, vagyis nem minden *A* vagy *a* van az aszkusz

egyik oldalán. Ennek megfelelően a rekombinációs gyakoriság: $(8 + 11 + 12 + 7)/156 = 0,244$.

Hasonló módon számítjuk ki az *A* és *B* lokuszok közötti rekombinációs gyakoriságot is. Ebben az esetben az első két oszlop nem rekombináns aszkusz volt, ezért a rekombinációs gyakoriságot úgy kapjuk meg, hogy az utolsó két oszlopban lévő számot elosztjuk az összes vizsgált aszkuszok számával: $(23 + 28)/156 = 0,327$.

3. FELADAT

Egy kutató a patkány két génjének (*C* és *D*) térképtávolságát szeretne volna megtudni. Beltenyésztett törzseket keresztezett egymással, amelyek genotípusa *CC DD*, illetve *cc dd* volt (1. keresztezés). Majd az ebből származó utódokat visszakeresztelte a beltenyésztett *cc dd* törzssel és meghatározta a rekombináns és a nem rekombináns utódok számát. Egy másik keresztezésben a *CC dd* és *cc DD* genotípusú beltenyésztett törzsek állatait keresztezte, majd az F_1 utódokat a *cc dd* vonallal keresztezte vissza. A keresztezések megadott eredményei alapján mennyire becsülne a két lokusz között a rekombinációs gyakoriságot?

Utódok száma

Az utódok típusa	1. keresztezés	2. keresztezés
<i>Cc Dd</i>	43	12
<i>Cc dd</i>	8	59
<i>cc Dd</i>	11	62
<i>cc dd</i>	51	15

MEGOLDÁS

Mivel az 1. keresztezésben *C d* és *c D* rekombináns gaméták keletkeztek (*C D* és *c d* voltak a szülői típusok), ezért ebből a keresztezésből a rekombináns gaméták száma $8 + 11 = 19$, vagyis a *Cc dd* vagy a *cc Dd* utódok számának az összege. Ehhez hasonlóan a második keresztezésben a rekombináns gaméták száma $12 + 15 = 27$, vagyis a *Cc dd* vagy a *cc Dd* utódok száma (ebben a keresztezésben a szülői gaméták a *Cd* és a *cD* voltak). A rekombináns ivarsejtek száma összesítve: $19 + 27 = 46$. Az utódok száma összesen $113 + 148 = 261$. Az összesített rekombinációs gyakoriság: $46/261 = 0,176$.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az 1900-as évek elején felfedezték, hogy Mendel független öröklődésről szóló törvénye nem minden esetben teljesül, mivel az azonos szülői kromoszómán található ún. kapcsolt gének a közöttük levő távolság mértékétől függően gyakran együtt öröklődnek. A gének kapcsoltságát a rekombinációs gyakoriság alapján becsüljük meg, amely 0 (szorosan kapcsolt lokuszok) és $\frac{1}{2}$ (lazán kapcsolt lokuszok) között változik. A genetikai térkép a kromoszómán található gének egymáshoz viszonyított helyzetét ábrázolja. A gének sorrendjének megállapítására a hárompontos keresztezések alkalmasak. Az interferenciának nevezett jelenség miatt a szorosan kapcsolt gének között a kettős crossing overek gyakorisága a vártnál kevesebb lesz.

Az emberi genom kapcsoltági viszonyainak felderítése nehéz feladat. Kezdetben a vizsgált jelleget mutató családok családja elemzése alapján végeztek becsléseket. A szomatikus sejt-hibridizációs technikával azonban már sok gén helyzetét sikerült meghatározni az egyes kromoszómákon. Azt a tényt, hogy a rekombináció a meiózis I. fázisának négyfonal állapotában megy végbe, először a *Drosophila* kapcsolt X-kromoszómáinak segítségével mutatták ki, amit később a *Neurospora*-val végzett kísérletek is megerősítettek.

Egyes esetekben egyenlőtlen crossing over történik, ami duplikációt és a DNS-tartalom növekedését okozza. A genetikai térképtávolság és a gének fizikai távolsága között általában szoros összefüggés tapasztalható. Napjainkban az emberi genom térképezéséhez DNS-variánsokat használnak.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Mendel melyik törvényével nincs összhangban a kapcsoltság? Fogalmazza meg egy mondatban, miért okozhat a kapcsoltság a kérdéses törvénytől eltérő eredményt!
- Két *Pp Ll* genotípusú szagosbükköny keresztezése után az utódok között 142 lila virágú és hosszúkás pollenű, 8 lila virágú és kerek pollenű, 11 piros virágú és hosszúkás pollenű, 47 piros virágú, kerek pollenű volt (az 5.1. táblázathoz hasonló utódnemzedék). Kihagyott próbával állapítsa meg, illeszkedik-e ez az eloszlás a várt 9:3:3:1-es arányhoz?
- Az F_1 nemzedék tesztelő keresztezés eredménye alapján a lila virágszín és a hosszúkás pollen kialakító gén között a rekombinációs gyakoriság 0,114 volt. Bateson és Punnett keresztezésének megfelelően milyen arányban várná a négyféle gamétát az F_1 szülőktől?
- A 3. feladatban megadott rekombinációs gyakoriság esetén várhatóan milyen arányban jelenik meg a négyféle fenotípus az F_2 nemzedékben? Kihagyott próbával döntse el, hogy az 5.1. táblázatban közölt adatok megfelelnek-e ennek!
- Miért nem fedezte fel Mendel a kapcsoltság tényét?
- Számítsa ki a rekombinációs arányt a *pr* és a *vg* gének között Morgan második tesztelő keresztezésének adataiból (5.3. táblázat)! Hasonlítsa össze eredményeit az első tesztelő keresztezésben kapott értékekkel, amelyben a szülők coupling fázisban voltak!
- Ábrázolja diagramon (5.3. ábra kromoszómáihoz hasonlóan), hogyan keletkeznek az F_2 kialakításában részt vevő gaméták, ha az eredeti szülők genotípusa *pppr vg⁺vg⁺* és *pr⁺pr⁺ vgv⁺* volt!
- Egy tesztelő keresztezés sorozat alapján a rekombinációs gyakoriság az *a-* és a *c*-gén között 0,1; az *a* és a *b* között 0,27; a *b* és a *c* között pedig 0,2. Határozza meg a három gén sorrendjét! Magyarázza meg, miért nem egyenlő a két legközelebbi génpár rekombinációs gyakoriságának összege a két legtávolabbiéval!
- Egy másik gén, *d*, az előző példa *b*-génjével 0,15, az *a*-val pedig 0,14 rekombinációs gyakoriságot mutat.

Hová helyezné ezt a gént a 8. kérdés alapján szerkesztett térképen? Milyen keresztezést végezne a térkép igazolására?

10. Miért bizonyultak a hárompontos keresztezések nagyon hasznosnak a gének kapcsoltságának vizsgálatára?
11. Egy hárompontos keresztezésben az F_1 heterozigótát ($kk^+ll^+mm^+$) egy $kkllmm$ tesztelő törzzsel keresztezték, és az alábbi genotípusú utódokat kapták:

$kk^+ll^+mm^+$	621
kk^+ll^+mm	3
kk^+llmm^+	64
$kkll^+mm^+$	103
kk^+llmm	109
$kkll^+mm$	57
$kkllmm^+$	7
$kkllmm$	608

Szerkessze meg a három lokusz genetikai térképét sorrendjük és távolságuk figyelembevételével!

12. A 11-es feladat adataiból számítsa ki a kettős rekombinánsok várható arányát! Mekkora az adatokból számított interferencia (I) értéke? Magyarázza meg a kapott érték jelentését!
13. Ábrázolja diagramon a $y^{+}/++w$ genotípusú nőstény esetében várható gamétatípusokat, ha a két lokusz között nincs crossing over, egy, kettő, három, illetve négy crossing over van!
14. Miért nehezebb a kapcsoltsági viszonyok meghatározása az emberi genomban, mint például a *Drosophila* vagy a kukorica esetében?
15. Egy népes családban az anya repulziós heterozigóta a szintévesztésre és a vérzékenységre is, tehát $H/h C$ genotípusú. Két fia hemofiliás, másik kettő szintévesztő, míg az ötödik fiú mindkét jellegre nézve normális fenotípusú. Az 5.9. ábra alapján adja meg a fiúk genotípusát! Mekkora a becslhető a két gén közötti rekombinációs gyakoriság ebben a családban?
16. Sok olyan családból gyűjtöttek össze adatokat, ahol az anya a vérzékenységre és a szintévesztésre is heterozigóta volt. Ezekben a családokban a fiúk és a rekombinánsok száma az alábbi volt: öt fiúból 1, nyolcból 2, négyből 1, ötből 1, hatból 1. Az összes adat felhasználása alapján mekkora a becslött rekombinációs arány? A tényleges érték ennél sokkal kisebb. Meg tudná magyarázni, miért?
17. Egy deléciós heterozigótát (A_1-) egy A_2A_2 genotípusú egyeddel keresztezték. Milyen genotípusú utódok várhatók, és milyen arányban? Eltérő eredményre vezetne, ha az első szülő A_1A_1 lenne?
18. Szomatikus sejtibridizációval olyan sejtvonalakat állítottunk elő, amelyeknek egy speciális emberi enzimjük van. A sejtvonalak közül ötnek az alábbi emberi kromoszómái vannak: (A) 4, 9, 11; (B) 2, 7, 11, 21; (C) 4, 9, 10, 11, 21; (D) 1, 2, 11, 18; (E) 4, 11, 15. Melyik humán kromoszómán lehet az enzimet kódoló gén?
19. Elemezze a kétfonális és a négyfonális crossing over közötti különbséget! Kétfonális crossing over esetében milyen arányban keletkeznek szülői és rekombináns (nem szülői típusú) gaméták?
20. Milyen genotípusú és fenotípusú utódnemzedéket kaphat az X^wX^Y genotípusú nőstény és az X^Y genotípusú hím keresztezéséből (a nőstény kapcsolt X-kromoszómás). Mely utódkategóriák életképesek? Miért nem használható ez a keresztezés a két-, illetve négyfonális crossing over megkülönböztetésére?
21. Milyen askospóra-sorrend várható egy D és egy d genotípusú *Neurospora* törzs keresztezése után, ha nincsen crossing over a gén és a centromeron között? Hogyan alakul a spórák sorrendje az askuszkokban egy crossing over esetén?
22. A *Neurospora* egyik kromoszómájának két kapcsolt génjét E -t és F -et vizsgáljuk. Ha az EF törzset az ef törzzsel keresztezzük, és elemezzük a keletkezett askuszkokat, akkor a következő askospóra-sorrendeket kapjuk: $EF, EF, EF, EF, ef, ef, ef, ef$. De találunk néhány $EF, EF, eF, eF, Ef, Ef, ef, ef$ vagy $eF, eF, EF, EF, ef, ef, Ef, Ef$ elrendeződést is. Mi lehet ezeknek a géneknek és a centromeronnak a sorrendje a kromoszómán?
23. Sturtevant és Morgan az f (56,7) és a fu (59,5) géneket használta markerként egy keresztezésben az *Ultrabar* elemzésekor. Milyen arányban várhatók rekombinánsok a markerek között? Sturtevant és Morgan a 20 000 utód között 9 olyat találtak, amelyek rekombinánsok voltak a markerekre nézve, és vad vagy *Ultrabar* fenotípusúak voltak. Feltételezve, hogy a *Bar* homozigótákban tíz esetből egyszer következik be hibás párosodás, mekkora a becslött mérete azoknak a régióknak, amelyek duplikációkat vagy deléciókat hozhatnak létre?
24. Ebben a fejezetben a gének közötti genetikai vagy térképtávolsággal foglalkoztunk. A térképtávolság a kromoszómán általában a fizikai távolsághoz hasonló, néhány esetben azonban eltérés tapasztalható. Sorolja fel azokat az okokat, amelyek eltérést eredményezhetnek a kétféle adat között!
25. Tételezzük fel, hogy a Mendel két olyan bélyegét választotta ki a borsónak, amelyek szorosan kapcsolatosak. Hogyan befolyásolta volna ez a független öröklődés elvét?

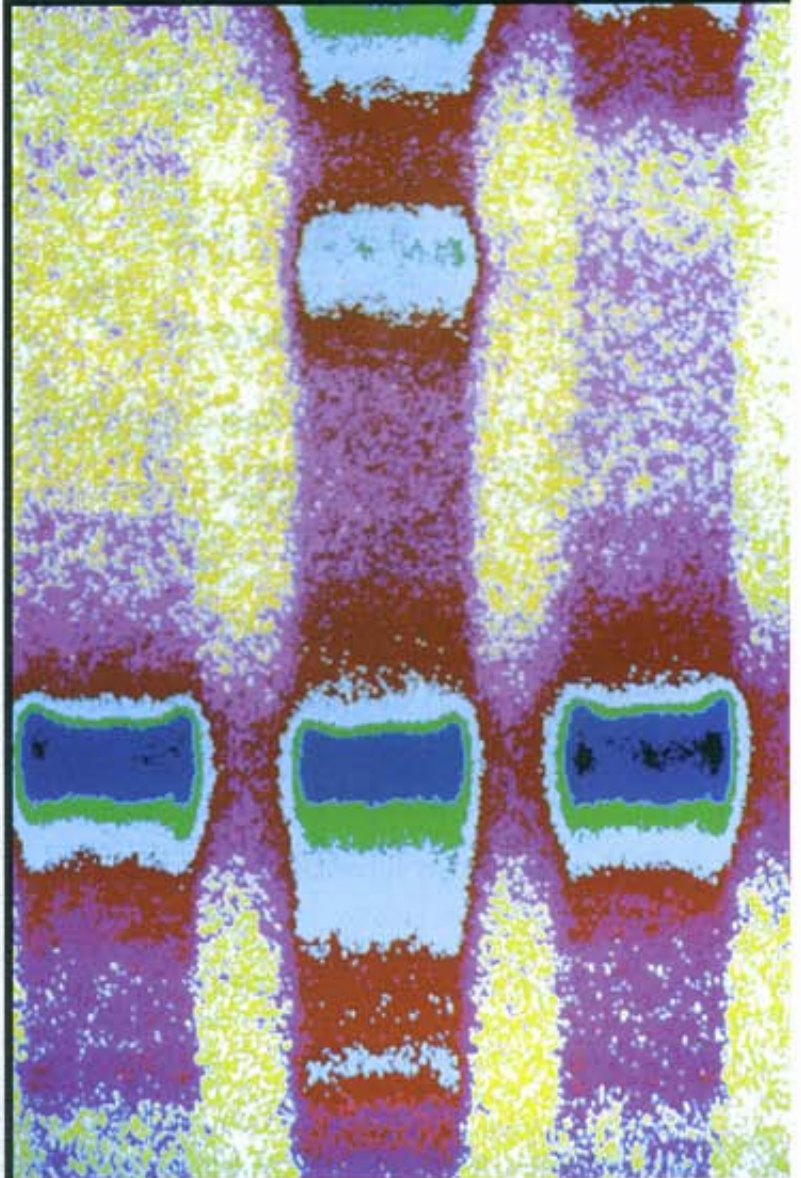
A megoldások a könyv végén találhatók.

2.

R É S Z

Molekuláris genetika

- 6** A gének biokémiája 130
- 7** A gének replikációja és rekombinációja 154
- 8** A transzkripció és szabályozása prokariótákban 185
- 9** Az eukarióta genom szerveződése és működése 219
- 10** A transzláció 255
- 11** Génmutáció 295
- 12** Mozgó genetikai elemek 322
- 13** A baktériumok és a fágok genetikája 340
- 14** Fejlődésgenetika 369
- 15** A génklónozás és a génmanipuláció 415
- 16** A génklónozás gyakorlati alkalmazása és a genetikai térképezés távlatai 448
- 17** A gének és a rák 482
- 18** Extranukleáris öröklődés 504



RNS-blotról készült festett felvétel. A Xoma Corporation munkatársai a különböző méretű RNS-molekulák szétválasztására három mintában gélelektroforézist végeztek. Az RNS-eket a gélről membránra vitték át, és radioaktív DNS-sel kezelték, amely specifikusan kötődött az RNS molekulához. A színek a radioaktivitás intenzitását, így az RNS mennyiségét jelzik.

© Jay Fries/The Image Bank

6.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A gének döntő többsége egy polimer molekulából, a DNS-ből épül fel, de egyes szervezetekben a gének anyaga RNS.
- 2 A DNS és az RNS kémiai felépítése.
- 3 A génekben a DNS két polinukleotid-láncból áll, amelyek egymás körül feltekeredve kettős hélixszerkezetet alkotnak.
- 4 A kettős hélix két szála esetenként elválik egymástól, majd újraegyesül.
- 5 A DNS mérete és konformációja változatos.

A gének biokémiája

A genetikusoknak egyben bakteriológusokká, biokémikusokká és fizikusokká is kell lenniük, amellet, hogy zoológusok és botanikusok? Reméljük, így lesz.

H. J. Muller
amerikai genetikus

Az élet alapja kémiai természetű, hiszen minden élő szervezet, így az emberi test is, molekulákból épül fel. Az élet leírható a szervezetben szüntelenül zajló biokémiai átalakulásokkal, azzal a több ezer reakcióval, amelyek nélkül az élet minden formája lehetetlen. Ezért az élet lényegének megértéséhez ismernünk kell kémiját is.

Mindezt kiterjeszthetjük a genetikára is, hiszen a genetika alapja szintén kémiai természetű. Az egyedi szinten végzett genetikai kísérletek: a keresztezések, az utódnemzedékek fenotípusának elemzése, mind arra irányulnak, hogy megismerjük az adott szervezet géneinek működését és felépítését. Mint láttuk, a genetika története telis-tele van ilyen kísérletekkel. Ez a fajta megközelítés nagyon eredményes volt, lényegében ma is az, de nem teszi lehetővé a teljes megismerést. Ennek magyarázata, hogy a gének rendkívül nagy méretű, információhordozó molekulák, amelyek meghatározzák más biomolekulák szerkezetét is. Ahhoz, hogy a genetika törvényszerűségeit alapjaiban is megértsük, meg kell ismernünk a géneknek mint molekuláknak a szerkezetét és működését. Ebben a fejezetben a gének molekuláris felépítését ismertetjük.

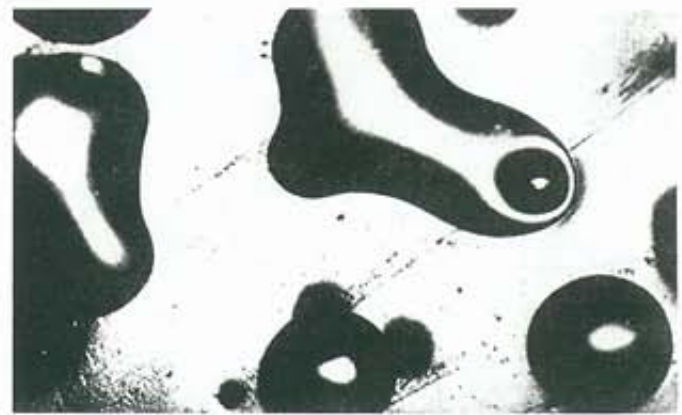
AZ ÖRÖKÍTŐ ANYAG TERMÉSZETE

Azok a kutatások, amelyek elvezettek a gének kémijának megértéséhez, 1869-ben kezdődtek a németországi Tübingenben. Friedrich Miescher sejtmagokat izolált a használt sebészeti kötözőanyagokon levő genny fehérvérsejtjeiből. Egy addig nem ismert, foszfortartalmú anyagot fedezett fel bennük, amit *nukleinek* nevezett el. A nuklein anyaga legnagyobbbrészt **kromatin**, a **dezoxiribonukleinsav (DNS)** és a kromoszomális fehérjék komplexe.

A XIX. század végére mind a DNS-t, mind a **ribonukleinsavat (RNS)** sikerült elkülöníteni a hozzájuk kapcsolódó fehérjétől. Ezzel lehetővé vált a **nukleinsavak** sokkal részletesebb kémiai analízise. (A *nukleinsav* és származékainak, a *DNS-nek* és *RNS-nek* a neve a Miescher által adott *nuklein* szóból származik.) Az 1930-as évek elejére P. Levene, W. Jacobs és mások kimutatták, hogy az RNS felépítésben egy cukor (ribóz) és négyféle nitrogéntartalmú bázis, míg a DNS-ben egy másik cukor (dezoxiribóz) és négyféle bázis található. Felfedezték azt is, hogy a bázis egy cukor-foszfat egységhez kapcsolódva nukleotidot alkot. Ezenfelül azt találták, hogy a négyféle bázis mind a DNS-ben, mind az RNS-ben körülbelül azonos mennyiségben fordul elő. A fejezet későbbi részeiben még visszatérünk a DNS és az RNS kémiai szerkezetéhez, először azonban vizsgáljuk meg, milyen bizonyítékai vannak, hogy a gének DNS-ből állnak (vagy ritkán RNS-ből).

BAKTÉRIUMTRANSZFORMÁCIÓ

Frederick Griffith 1928-ban végzett kísérletei jelentették az alapját azoknak a vizsgálatoknak, amelyekkel később sikerült azonosítani a DNS-t, mint örökítő anyagot. Griffith a **transzformáció** jelenségét vizsgálta *Diplococcus pneumoniae*, mai nevén *Streptococcus pneumoniae* baktériumokon. A vad típusú baktériumsejt gömb ala-



(a)



(b)

6.1. ábra. A *Streptococcus pneumoniae* változatai. (a) A nagy, fényes, sima felületű telepeket a virulens baktériumok (S) hozzák létre; (b) a kicsi, ráncos felszínű kolóniákat (R) az avirulens baktériumok fejlesztik

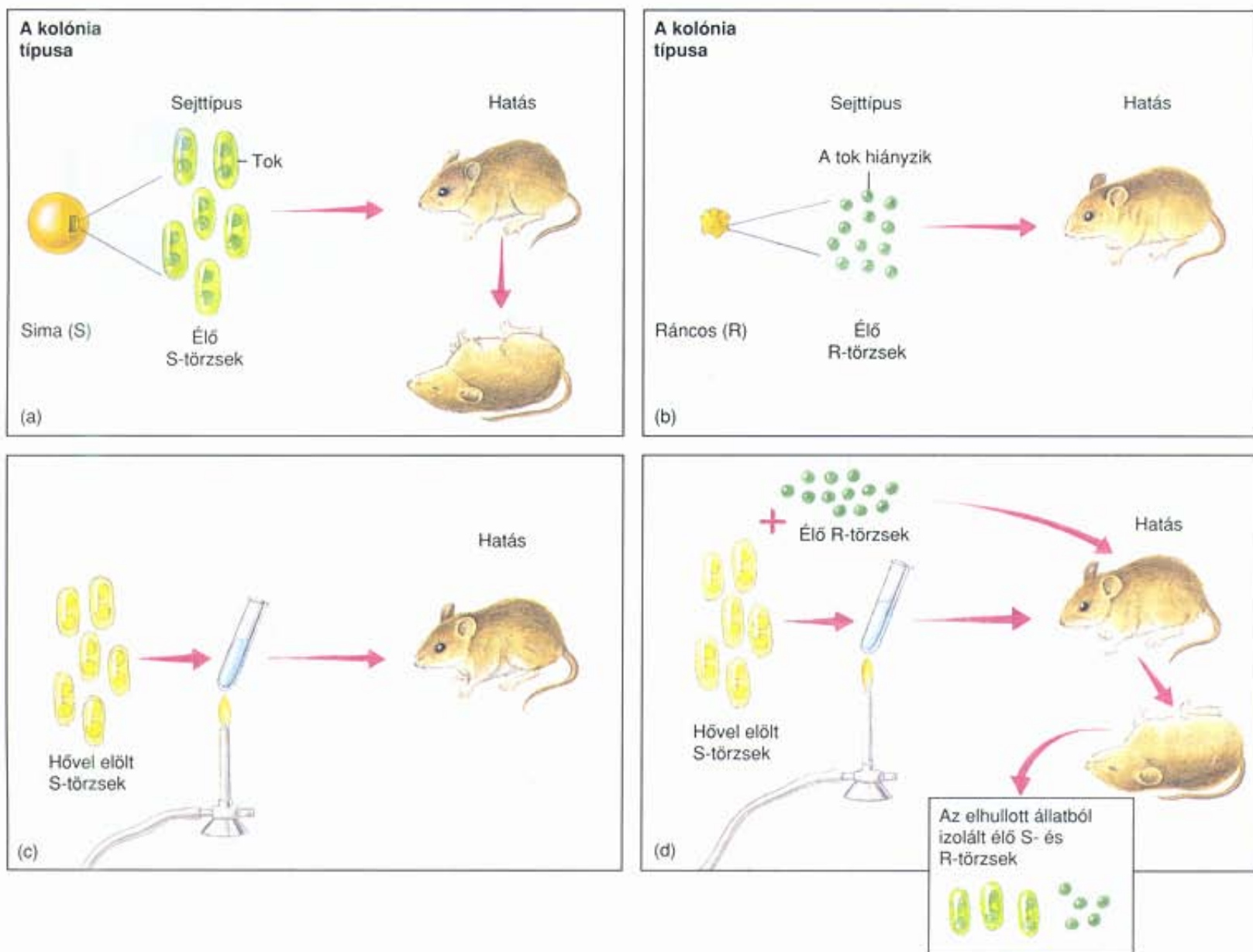
Fotó: Harriett Ephrussi-Taylor

kú, és nyálkás tok veszi körül. A nagy, csillogó, sima felszínű telepeket alkotó sejtek (6.1.(a) ábra) **virulensek**, egérbe oltva halálos kimenetelű fertőzést okoznak (S törzs). A *S. pneumoniae* egyik mutáns törzsében nem képződik tok a sejtek körül, és a kolóniák a táptalajon (6.1.(b) ábra) kisebbek, ráncos felszínűek (R törzs). Ennél sokkal fontosabb, hogy ez a törzs védőburok hiányában **avirulens**, mivel a gazdaszervezet fehérvérsejtjei bekebelezik, mielőtt elszaporodhatna, és károsíthatná a szervezetet.

Griffith kulcsfontosságú felfedezése volt, amikor kimutatta, hogy a hővel elölt virulens baktériumok átalakítják, **transzformálják** az avirulens sejteket, virulenssé. Sem a hővel elölt S törzs, sem az élő R törzs önmagában nem okoz halálos kimenetelű fertőzést, együttesen azonban igen. A virulencia tulajdonsága az elhalt sejtekből valamilyen úton átjutott az élő, avirulens sejtekbe, az ily módon kezelt állatokból az S törzsbe tartozó sejteket sikerült kitenyészteni (6.2. ábra). A transzformáció nem volt időleges, a tokképzés és a virulencia, mint öröklődő jellegek az utódsejtekbe is átkerültek. Más szóval, a virulencia génje, ami hiányzott az avirulens sejtekből, valahogyan helyreállt a transzformáció során. Mindezek alapján valószínű, hogy a hővel elölt baktériumokból származó transzformáló anyag nem más, mint a virulencia génje. Az összerakó játék hiányzó darabja a transzformáló anyag kémiai azonosítása volt. Aki felfedezi, az megfejtja a gének természetét is.

A transzformációért felelős anyag, a DNS

Oswald Avery, Colin MacLeod és Maclyn McCarty 1944-ben megtalálták a hiányzó darabot. Az előzőekben ismertetett transzfor-



6.2. ábra. Griffith transzformációs kísérletei. (a) A *S. pneumoniae* virulens S törzse elpusztítja a megfertőzött állatot; (b) az avirulens R törzssel történő fertőzés hatástalan, az egerek életben maradnak; (c) a hővel elölt S törzs szuszpenziója nem fertőzőképes; (d) a hővel elölt S törzs és az R törzs keveréke elpusztítja az állatokat. A hővel elölt S törzs transzformálta az R törzs avirulens sejtjeit. Az elhullott állatokból kitenyészthető a virulens S törzs

mációs kísérletet ismételték meg, de nem élő állatokat használtak az azonosításra, valamint a hővel elölt baktériumkivonatot előzetesen kémiaiilag tisztították. Céljuk az volt, hogy azonosítsák a transzformációért felelős anyagot. Az első sorozatban szerves oldószerekkel denaturálták a fehérjéket a hővel elölt baktériumok kivonatában, és azt találták, hogy a kivonat transzformálóképessége megmaradt. Ezután egy sor fehérjebontó enzimmel: tripszinnel, kimotripszinnel próbálkoztak, de ezek is hatástalannak bizonyultak. Ugyanígy nem vezetett eredményre a ribonukleázal, az RNS-molekulákat hidrolizáló enzimmel végzett kezelés sem. Ezekkel a kísérletekkel a szóba jöhető anyagok közül kizárták a fehérjéket és az RNS-t. Avery és munkatársai csak abban az esetben tapasztalták a transzformációs képesség eltűnését, amikor a virulens sejtek kivonatát dezoxiribonukleázal, a DNS-t hidrolizáló enzimmel kezelték.

Végül közvetlen fizikai-kémiai analízissel kimutatták, hogy a tisztított transzformáló anyag a DNS. Avery és munkatársai az alábbi analitikai módszereket alkalmazták:

1. **Ultracentrifugálás.** A transzformáló anyag molekula-méretének becslésére ultracentrifugálást alkalmaztak. A transzformáló aktivitással rendelkező anyag gyorsan szedimentálódott (ülepedett a centrifugacső aljára), ami nagy moláris tömegre utal. Ez a sajátság jellemző a DNS-re.
2. **Elektroforézis.** A transzformáló anyag elektromos térben való elmozdulását vizsgálva, gyors mobilitást találtak, ami ugyancsak jellemző a DNS-re.

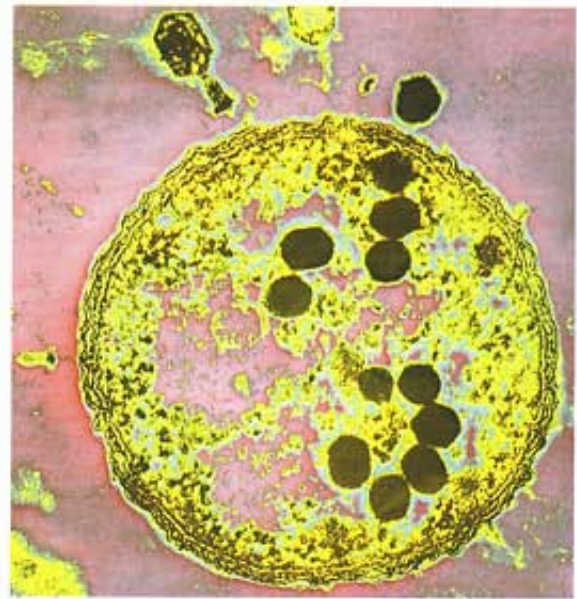
3. *Ultraibolya abszorpciós spektrofotometria.* Spektrofotométerben meghatározták, melyik tartományban a legnagyobb a transzformáló anyag oldatának ultraibolya fényabszorpciója. Az abszorpciós spektrum megegyezett a DNS-ével. Az abszorpciós maximumot 260 nm hullámhosszúságon mérték, ellentétben a fehérjék 280 nm-es értékével.
4. *Minőségi kémiai analízis.* A transzformáló anyagban átlagosan 1,67 volt a N/P arány, ami megfelelt a DNS-re várható értéknek, mivel a DNS-ben mindkét elem nagy mennyiségben fordul elő. A kapott arány sokkal kisebb a fehérjékre várható értéknél, hiszen a fehérjék sok nitrogént, de igen kevés foszfort tartalmaznak. Még akkor is igaz ez, ha a mintában található fehérjeszennyeződés emelte a N/P arányt.

További bizonyítékok

A következőkben ismertetett eredmények szintén hozzájárultak a gén kémiai természetének tisztázásához, de közvetlen hatásuk kisebb volt. A korábbi kémiai vizsgálatok egyik téves következtetéséből, nevezetesen abból, hogy a DNS-molekulában a 4 bázis monoton, például ACTG sorrendben ismétlődik, sok kutató azt vonta le, hogy a DNS nem lehet az örökítő anyag. További viták folytak arról is, hogy vajon nem a transzformáló anyagban levő fehérjeszennyeződés felelős-e a hatásért, más sajtóságok transzformációja is elképzelhető-e az R és S törzseken kívül, és végül arról, hasonló-e a bakteriális gének a magasabb rendűek génjeihez.

1953-ra, amikor James Watson és Francis Crick publikálta a DNS szerkezetére vonatkozó kettőshélix-modellt, a kutatók többsége már elfogadta, hogy a gének anyaga a DNS. Mi okozta a változást? Először is, Erwin Chargaff 1950-ben kimutatta, hogy a különböző bázisok aránya nem azonos a DNS-ben, mint azt korábban hitték, valamint azt is, hogy a bázisösszetétel fajonként változó. Ez összhangban volt az elvárásokkal, hiszen a gének is különböznek az egyes fajokban. Rollin Hotchkissnek sikerült finomítania és kiterjesztenie Avery eredményeit. Nagy tisztaságú, mindössze 0,02%-nyi fehérjét tartalmazó transzformáló anyagot állított elő, és kimutatta, hogy az változatlanul alkalmas a baktériumsejtek genetikai jellemzőinek megváltoztatására. De ennél is tovább ment, és igazolta, hogy az ilyen nagy tisztaságú DNS nemcsak az R és S, hanem más tulajdonságok átvitelére is alkalmas.

Végül 1952-ben A. D. Hershey és Martha Chase elvégezték egy másik kísérletet, amely újabb meggyőző bizonyítéka volt annak, hogy az örökítő anyag a DNS. Kísérletüket a közönséges bélbaktériumban (*Escherichia coli*) élősködő vírussal, a T2 bakteriofággal végezték (6.3. ábra). (A bakteriofágokat röviden fágoknak is nevezik.) A fertőzés során a fág génjei bejutnak a gazdasejtbe, és ott új fágreszecskek szintézisét irányítják. A fágok csak fehérjékből és DNS-ből állnak. A kérdés az, a két anyag közül melyik tartalmazza a géneket, a fehérje vagy a DNS? Hershey és Chase kísérlete választ adott a kérdésre, mivel sikerült kimutatniuk, hogy a fertőzés során a DNS legna-

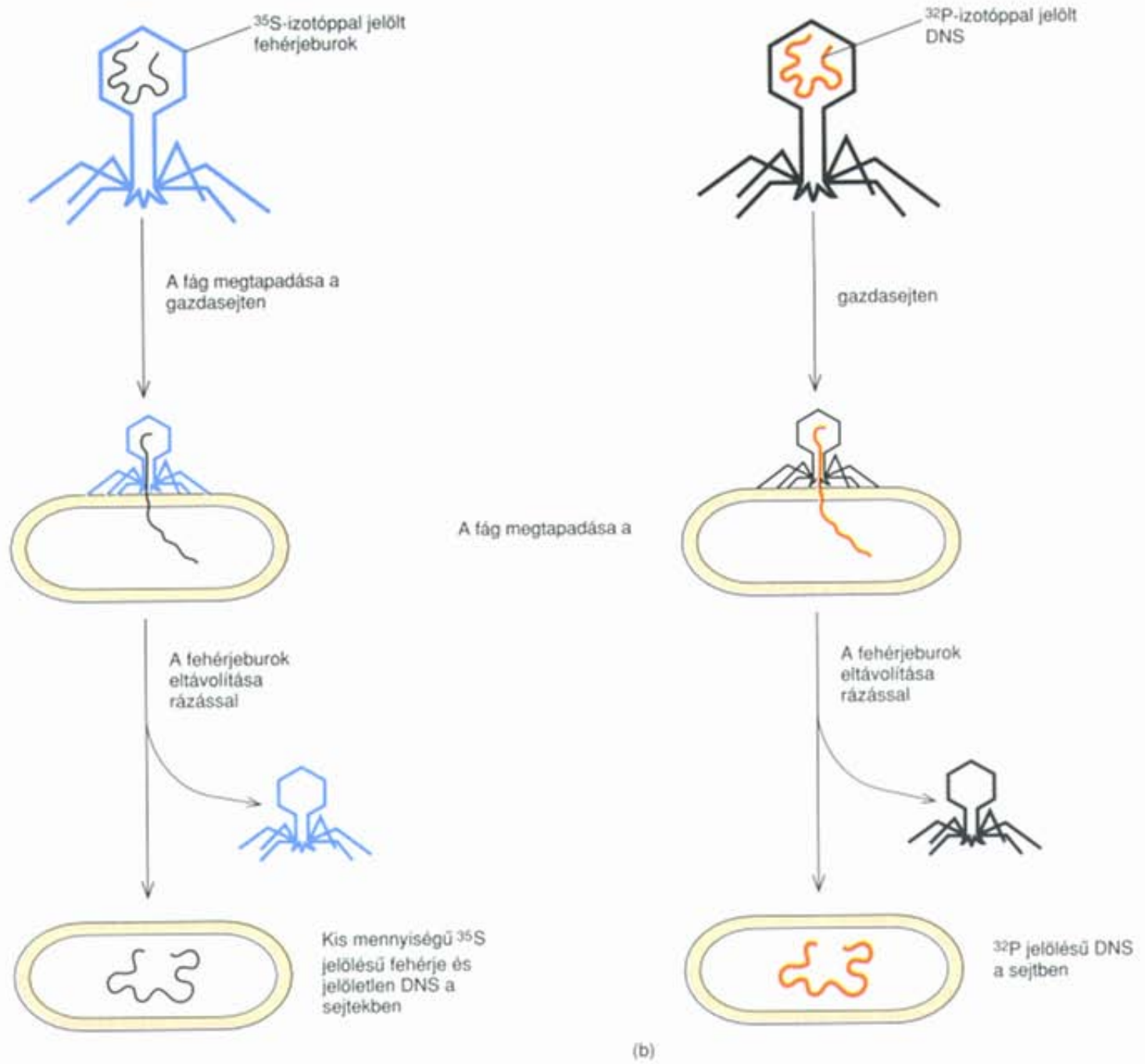


6.3. ábra. Mesterségesen színezett transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel *E. coli*-sejtet fertőző T2 bakteriofágokról. A kép felső részén látható fág éppen befecskendezi DNS-ét a gazdasejtbe. Ugyanakkor egy másik fág már megfertőzte a sejtet, és a képződő fágreszecskek összekapcsolódása megkezdődött. Az új fágok feji részei jól kivehető, sötét, sokszögletű képletek a gazdasejt belsejében
Lee D. Simon, Rutgers Egyetem, *Cell*, 4(6): címlap, 1985

gyobb hányada bejut a baktériumba egy kis mennyiségű fehérje kíséretében, és a fehérjék túlnyomó többsége kívül marad a sejten (6.4. ábra). Mivel a DNS jut be nagy mennyiségben a sejtbe, valószínűleg az hordozza a géneket. Természetesen ez a következtetés nem teljesen egyértelmű; a DNS-sel együtt a sejtbe kerülő csekély mennyiségű fehérje is hordozhatja a géneket. De az előző munkák eredményeivel összevetve, ez a kísérlet is segített meggyőzni a genetikusokat abban, hogy a gének anyaga a DNS.

A Hershey–Chase-kísérlet lényege az volt, hogy a DNS-t és a fehérjét különböző radioaktív izotópokkal jelölték. A radioaktív izotópok alkalmazását a II. világháború alatt és azt megelőzően intenzívvé vált nukleáris kutatások tették lehetővé. A DNS jelölésére a foszfor 32-es tömegszámú izotópját (^{32}P), míg a fehérjék jelölésére a kén 35-ös izotópját (^{35}S) használták. A jelölés alapja, hogy a DNS foszforban gazdag, míg a fágfehérje ezt az elemet nem tartalmazza, ugyanakkor kén csak a fehérjében van, a DNS-ből hiányzik.

Hershey és Chase megvárták, amíg a jelölt fágok farki részükkel megtapadnak a gazdasejtek felszínén, és befecskendezik genetikai anyagukat a baktériumsejtbe. Ezután a fágok üres burkait erőteljes rázással eltávolították a sejtekről (Waring blender-módszer). Az izotópok meghatározásával kimutatták, hogy a fertőzés után a ^{32}P -izotóp túlnyomó része a baktériumsejtben található, míg a ^{35}S -izotóp a sejten kívül marad. Tehát ez a kísérlet is azt igazolta, hogy a DNS az örökítő anyag. Valóban, a gének szinte kivétel nélkül DNS-ből



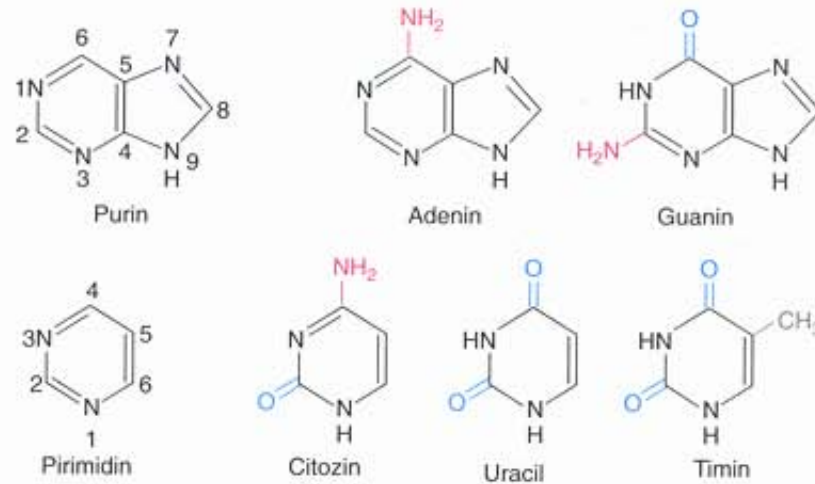
6.4. ábra. Hershey és Chase kísérlete. A T2 fág olyan géneket tartalmaz, amelyek képessé teszik az *E. coli*-ban való sokszorozódásra. Mivel a fág csak DNS-t és fehérjét tartalmaz, géneinek ezek egyikéből kell állniuk. Hershey és Chase két szakaszból álló kísérletet végeztek a gén azonosítására. Az első szakaszban (a) a fágok fehérjeit ^{35}S -izotóppal (kék) jelölték, a DNS-t jelöletlenül hagyták (fekete). A második szakaszban (b) a fág DNS-t ^{32}P -izotóppal jelölték (piros) és a fehérjét hagyták jelöletlenül (fekete). Mivel a fág géneinek be kell jutniuk a fertőzött sejtbe, a gazdasejtben kimutatható jelölés segítségével a gének anyaga azonosítható. A jelölt fehérjék túlnyomó többsége a gazdasejten kívül maradt, és erőteljes rázással el lehetett távolítani a sejtekről (a), a jelölt DNS zöme viszont behatolt a fertőzött sejtekbe (b). A következtetés az volt, hogy a T2 fág genetikai anyaga DNS-ből áll

állnak, de a fejezet későbbi részében látni fogjuk, hogy egyes vírusok genetikai állománya RNS-ből épül fel.

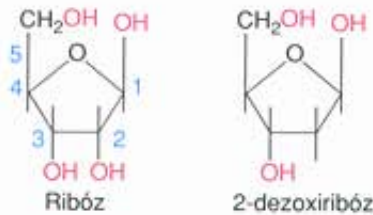
A gének nukleinsavakból állnak, az esetek túlnyomó részében DNS-ből, csak néhány egyszerű genetikai rendszerben, például vírusokban vannak RNS-gének.

A POLINUKLEOTIDOK KÉMIAI SZERKEZETE

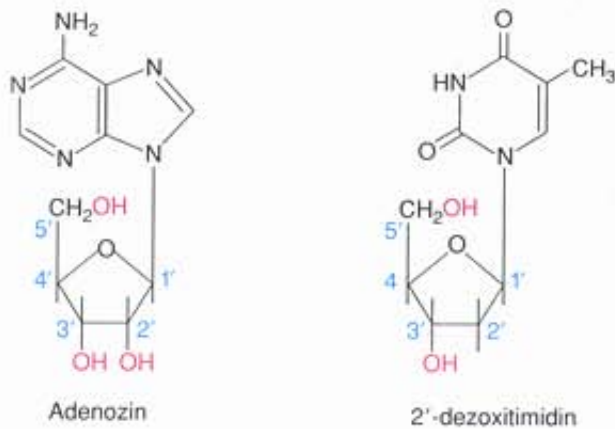
Az 1940-es évek közepére a DNS és az RNS alapvető kémiai szerkezetét a biokémikusok ismerték. Amikor a DNS-t alkotó-részeire hidrolizálták, a termékek között nitrogéntartalmú **bázisok**, **foszforsav** és cukor, **dezoxiribóz** voltak. Az RNS ugyancsak bázisokból, foszforsavból és egy másik cukorból, **ribózból** épül fel. A DNS-ben található négy bázis az **adenin**



6.5. ábra. A DNS és az RNS bázisai. Az alapvázat alkotó purin és pirimidin a bal oldalon láthatók. A DNS-ben és az RNS-ben található bázisok ezek származékai



6.6. ábra. A nukleinsavak cukorkomponensei. A ribóz 2' C-atomjához OH-csoport kapcsolódik, ami a dezoxiribózból hiányzik



6.7. ábra. A nukleozidok szerkezete

(A), citozin (C), guanin (G) és timin (T). Az RNS egy eltéréssel ugyanezeket a bázisokat tartalmazza, a timin helyett uracil (U) van benne. A bázisok szerkezetét a 6.5. ábra szemlélteti. Az adenin és a guanin **purin-**, míg a többi **pirimidinbázis**. Ezek a bázisok alkotják a genetika ábécéjét.

A nukleinsavakban található cukrok szerkezete a 6.6. ábrán látható. A két molekula csak egyetlen helyen különbözik egymástól, a ribóz a 2-es szénatomon hidroxilcsoportot (–OH) tartalmaz, míg a dezoxiribózból ezen a szénatomon csak egy hidrogén (H) található, amit a képletben függőleges vonal jelez. Erre utal a mo-

lekula elnevezése is: *dezoxiribóz*. A bázisok és a cukrok az RNS-ben és a DNS-ben **nukleozidokat** alkotnak (6.7. ábra). A nukleozidok elnevezése a megfelelő bázis alapján történik:

Bázis	Nukleozid (RNS)	Dezoxinukleozid (DNS)
Adenin	Adenozin	Dezoxiadenozin
Guanin	Guanozin	Dezoxiguanozin
Citozin	Citidin	Dezoxicitidin
Uracil	Uridin	Általában nincs
Timin	Általában nincs	(dezo)timidin

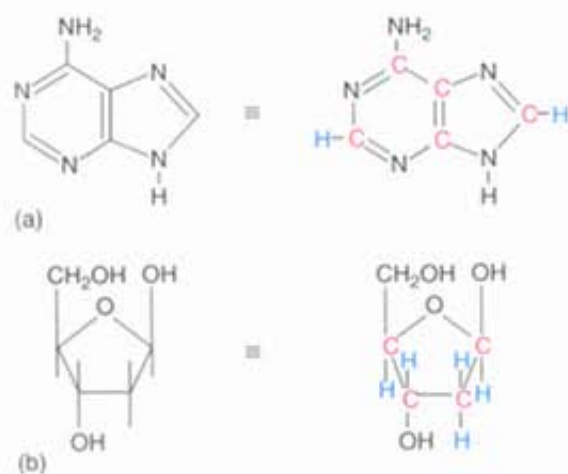
Mivel az RNS rendszerint nem tartalmaz timint, a „dezo-xi” jelző használata nem feltétlenül szükséges, az egyszerűbb timidin nevet használják. A bázisok és a cukrok gyűrűjét alkotó atomokat arab számok, ezen belül a cukrok C-atomjait ' jelöli. Így például a bázis a cukor 1' C-atomjához kapcsolódik, és a 2' pozícióról hiányzik az O a dezoxinukleozidokban.

A 6.5. ábra szerkezeti képletei egyszerűsített szerves kémiai jelöléssel készültek, egyes atomok és atomcsoportok nem szerepelnek rajtuk. A 6.6. és a 6.7. ábra ettől kissé eltér, a szabad véget tartalmazó egyes szakaszok C–H kötést jelentenek. A 6.8. ábra az adenin és a dezoxiribóz felépítését mutatja, egyszerűsített, illetve részletes, minden atomot feltüntető szerkezeti képlettel.

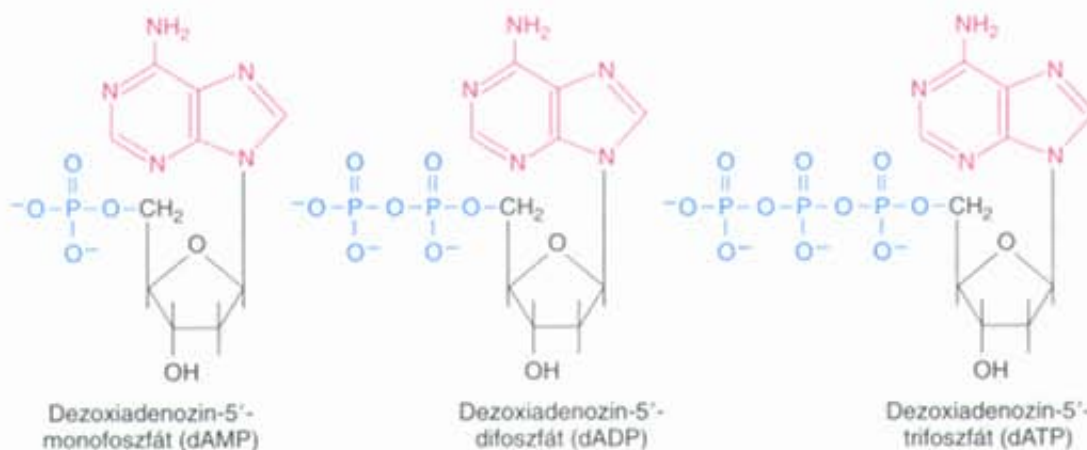
A DNS és az RNS alapegységei a **nukleotidok**, amelyek egy nukleozidból és egy foszfátcsoportból állnak, ez utóbbi észterkötéssel kapcsolódik a molekulához (6.9. ábra). Az észterek olyan szerves vegyületek, amelyek egy alkoholtól és egy savból képződnek. A nukleozidokban az észterkötést létrehozó alkoholos –OH a cukor 5' szénatomján található, és vízkilépés közben reagál a foszforsavval *foszfát-észterkötés* kialakulása közben. A 6.9. ábrán a DNS-szintézis négy prekursora közül a dezoxiadenozin-5'-trifoszfát (dATP) szerkezete látható. Amikor a dATP beépül a DNS-be, két foszfátcsoport lehasad róla, és dezoxiadenozin-5'-monofoszfát keletkezik (dAMP). A DNS másik három nukleotidjának (dCMP, dGMP, dTMP) szerkezete és elnevezése hasonló elveket követ.

A 7. fejezetben részletesen ismertettük a DNS szintézisét. Itt csak arra térünk ki, hogy a nukleotidegységeket a DNS-ben és az RNS-ben is **foszfodiészter-kötések** kapcsolják össze. A foszfodiészter elnevezés arra utal, hogy a foszforsav két cukoregységet kapcsol össze, az egyiknek az 5'-OH csoportját a másik 3'-OH csoportjával (6.10. ábra). Az előzőekhez képest itt a bázisokat más pozícióban ábrázoltuk, ugyanis ez a térbeli helyzet a legvalószínűbb a DNS-ben és az RNS-ben. Lényeges az is, hogy a trinukleotid, és általában a polinukleotid-láncok polaritással rendelkeznek: a molekula egyik végén szabad 5'-foszfátcsoport van, ez az ún. **5'-vég**. A molekula másik végén szabad 3'-hidroxilcsoport, a **3'-vég** található.

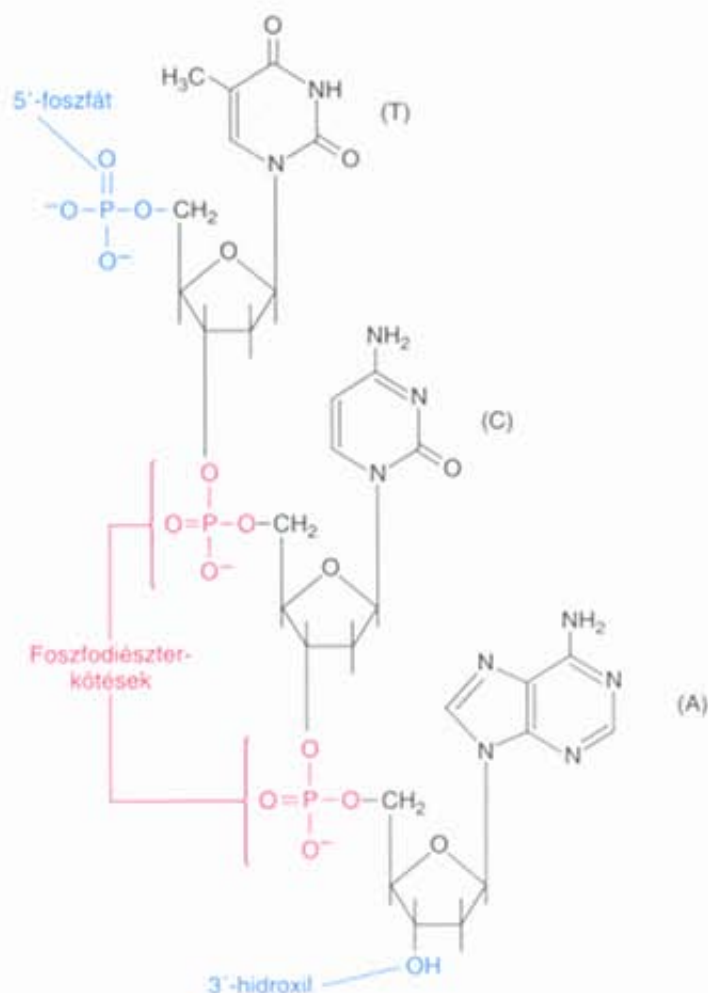
A 6.11. ábra egy nukleotid és egy DNS-szál egyszerűsített ábrázolását mutatja. Ebben a felírási módban a dezoxiribóz egy függőleges vonal, melynek felső részéhez az 1' pozícióban bázis kötődik, míg a szomszédos nukleotidok foszfodiészter-kötésen át kapcsolódnak a 3' (középen) és az 5' (alul) helyeken.



6.8. ábra. Az adenin (a) és a dezoxiribóz (b) szerkezete, a szerves kémiában használatos kétféle módon felírva. A bal oldali felírás nem jelöli külön a C-atomok többségét és egyes H-atomokat sem. A jobb oldali képleteken ezek is szerepelnek piros, illetve kék színnel kiemelve



6.9. ábra. Három nukleotid szerkezete. A dezoxiadenozin 5'-nukleotidjai az 5'-hidroxilcsoport foszforilálásával keletkeznek. Egy foszfátcsoport belépésével dezoxiadenozin-5'-monofoszfát (dAMP) keletkezik. Egy újabb foszfátcsoport kapcsolódásával dezoxiadenozin-5'-difoszfát (dADP), végül egy harmadik beépülésével dezoxiadenozin-5'-trifoszfát (dATP) jön létre

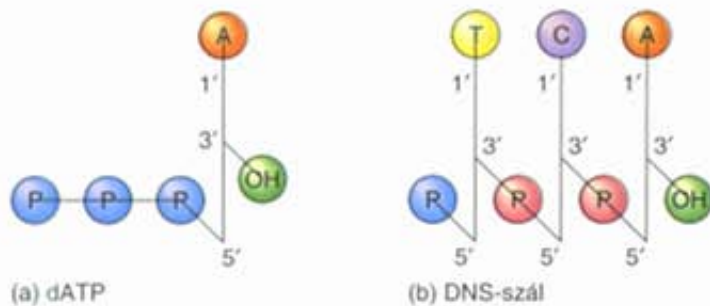


6.10. ábra. Egy trinukleotid szerkezete. Ez a DNS-részlet mindössze három nukleotidegységből áll, amelyeket foszfodiészter-kötések (piros) kapcsolnak össze a cukor 5'- és 3'-hidroxilcsoportjai között. Az 5'-vég az ábra tetején található, ahol a szabad 5'-foszfátcsoport (kék) van. A 3'-vég alul látható, szabad 3'-hidroxilcsoporttal (kék). A nukleotid szekvenciája a következő: 5'pTpTpCpdA3', egyszerűsítve TCA

A DNS és az RNS polimer molekulák, felépítő egységeik a nukleotidok. A nukleotidokban egy cukor (ribóz az RNS-ben, dezoxiribóz a DNS-ben) 1' C-atomjához nitrogéntartalmú bázis, 5' C-atomjához foszfátcsoport kötődik. A nukleotidokat a DNS-ben és az RNS-ben is foszfdiészter-kötések kapcsolják össze polinukleotid-lánccá az 5'- és a 3'-OH-csoportokon keresztül.

A DNS SZERKEZETE

Az 1940-es évek végére már mindazt tudták a DNS-ről és az RNS-ről, amit eddig ismertünk. Tisztázódott az is, hogy a DNS az örökítő anyag, ezért a DNS háromdimenziós szerkezetének felderítése állt a kutatások középpontjában.



6.11. ábra. A DNS szerkezetének egyszerűsített jelölése. (a) dATP nukleotid. Az ábrázolás a nukleotid négy tulajdonságát emeli ki: (1) a dezoxiribózt a függőleges fekete vonal jelenti. (2) Felül a cukor 1' C-atomjához csatlakozik az adenin (narancssárga). (3) Középen, a cukor 3' C-atomján hidroxilcsoport (OH, zöld) található. (4) Alul, a cukor 5' C-atomján trifoszfát-csoport (kék) van. (b) Egy rövid DNS-szakasz egyszerűsített szerkezete. Ugyanezt a trinukleotidot (TCA) mutatja a 6.10. ábra. A rajzon feltüntetik az 5'-foszfát- (kék), a foszfdiészter- (piros) és a 3'-hidroxilcsoportot (zöld). A szekvencia felírása megegyezés szerint 5' → 3' irányban, balról jobbra történik

A KÍSÉRLETI HÁTTÉR

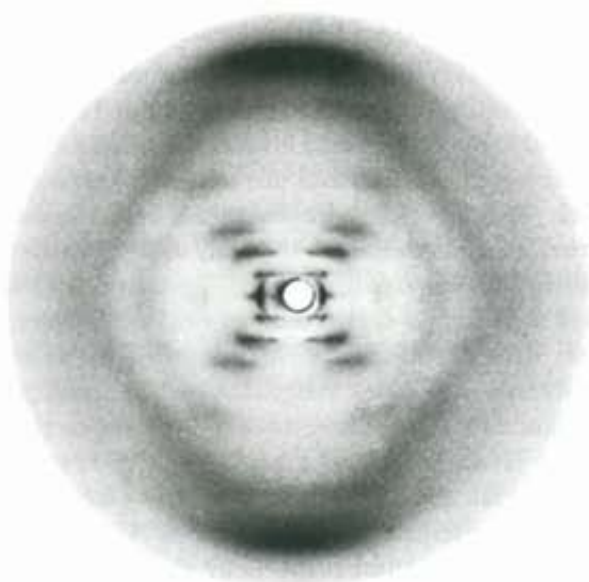
Az egyik tudós, aki élénk érdeklődést tanúsított a DNS szerkezetéről, Linus Pauling, a California Institute of Technology elméleti kémikusa volt. A kémiai kötések vizsgálatával, a fehérjék α -hélix szerkezetének leírásával már meglehetősen nagy hírnevet szerzett magának. A hidrogénkötések révén kialakuló α -hélix struktúra adta az elméleti alapot Watson és Crick számára a kettőshélix-moddal kidolgozásához. Ugyancsak a DNS szerkezetének vizsgálatával foglalkozott egy másik kutatócsoport is a londoni King's College-ban. Maurice Wilkins és Rosalind Franklin röntgendiffrakciós vizsgálatokkal igyekeztek feltárni a DNS háromdimenziós szerkezetét. Végül ugyanezzel a témával foglalkozott James Watson és Francis Crick is. Watson húszas éveinek még csak az elején járt, de már PhD-fokozatot szerzett az indianai egyetemen, majd az angliai Cambridge-be, a Cavendish Laboratóriumba ment, hogy részt vegyen az ott folyó DNS-kutatásokban. Itt ismerkedett meg a 35 éves Crickkel, aki eredetileg fizikus volt, és csak később kezdett el molekuláris biológiával foglalkozni. Watson és Crick nem végeztek kísérleteket, hanem más kutatók adatait gyűjtötték össze, és az adatokat értelmezve alkották meg a DNS háromdimenziós modelljét.

Erwin Chargaffnak ugyancsak oroszánrésze volt a DNS szerkezetének feltárásában. Már ismertettük, hogyan járult hozzá egy 1950-es cikke a DNS örökítő szerepének igazolásához, de ebben a cikkben volt egy másik, talán még fontosabb információ is. Chargaff elemezte a különböző szervezetekből vett DNS-minták bázisösszetételét, és azt találta, hogy a pirimidinbázisok anyagmennyisége mindig megegyezik a purinbázisokéval, ezen belül pedig az adenin a timinével és a guanin a citozinével. Ezeknek a megállapításoknak, amelyeket ma Chargaff-szabályként említünk, ugyancsak fontos szerepük volt a Watson-Crick-féle modell megszületésében. Chargaff eredményeit a 6.1. táblázat összegzi. Látható, hogy az adatokban mutatkozó kisebb eltérések ellenére, az alapelvek világosan kirajzolódnak.

Az „összerakós játék” talán egyik legfontosabb darabja az a röntgendiffrakciós felvétel volt, amelyet Franklin 1952-ben készített a DNS-ről. A felvételt Wilkins mutatta meg Watsonnak

6.1. táblázat. A DNS összetétele (mól bázis/mól foszfát)

	Ember		Rákos sejt (máj)	Madár tuberkulózis baktériumok		Szarvasmarha						
	Spermium			Élesztő	Csecsemőmirigy		Lép					
	#1	#2			#1	#2	#3	#1	#2			
A:	0,29	0,27	0,28	0,27	0,24	0,30	0,12	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26
T:	0,31	0,30	0,28	0,27	0,25	0,29	0,11	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24
G:	0,18	0,17	0,19	0,18	0,14	0,18	0,28	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21
C:	0,18	0,18	0,16	0,15	0,13	0,15	0,26	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17
Összesen:	0,96	0,92	0,91	0,87	0,76	0,92	0,77	0,88	0,94	0,94	0,84	0,88



6.12. ábra. Rosalind Franklin röntgendiffrakciós felvétele a DNS-ről. A mintázat szabályossága arra utal, hogy a DNS helikális szerkezetű. A felső és alsó erős sávok távolságából a hélix ismétlődő elemeinek (bázispárok) távolsága 3,4 Å-nek adódik. A mintázat szomszédos vonalainak távolságából a hélix csavarmenetének átlagos távolsága határozható meg (34 Å)

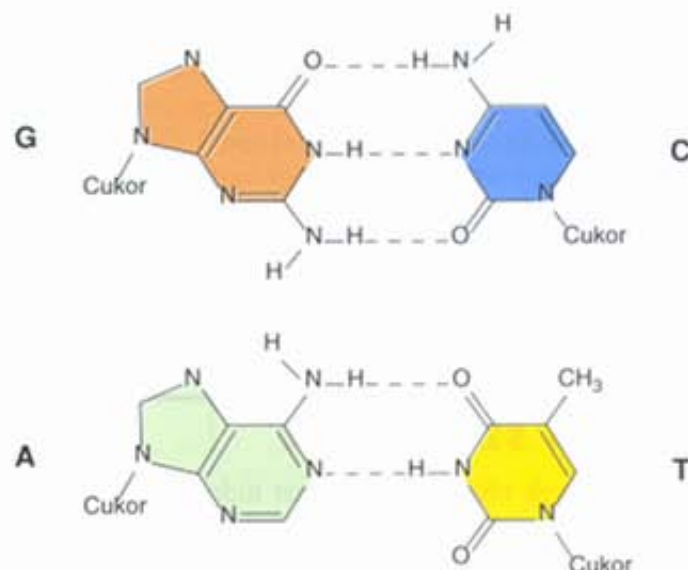
M. H. F. Wilkins, Biophysics Department, King's College, London

egy vacsorán 1953. január 30-án. A röntgendiffrakciós módszer lényege a következő: a kísérlet során nagyon tömény, viszkózus oldatot készítenek a DNS-ből. Ezután egy tüvel vékony szálát húznak ki az oldatból. A szál nagyszámú molekula alkotja, amelyek a húzóerő hatására egymással párhuzamosan, kötegekbe rendeződnek.

Megfelelő relatív páratartalom mellett a szálak többé-kevésbé szabályos kristályos szerkezetet vesznek fel, ezért röntgensugár diffrakciójuk vizsgálható. A Franklin által készített felvételen a röntgensugár-diffrakció mintázata meglehetősen egyszerű volt – **x** alakban rendeződött foltok sorozata (6.12. ábra) –, ami arra utalt, hogy a DNS szerkezete nagyon egyszerű. Ezzel ellentétben ugyanis, egy bonyolult, látszólag szabálytalan szerkezetű molekula, mint például egy globuláris fehérje, nagyszámú foltból álló, összetett, röntgendiffrakciós képet ad, amely leginkább egy golyószóró lyuggatta felszínhez hasonlítható. Mivel a DNS nagyon nagy molekula, csak akkor lehet egyszerű, ha szabályos, ismétlődő a szerkezete. A legegyszerűbb repetitív struktúra egy hosszú, vékony molekula, amely csavarmenetet vagy csigalépcsőszerű hélixet alkot.

A KETTŐS HÉLIX

Franklin röntgendiffrakciós eredményei erősen azt sejtették, hogy a DNS hélixkonformációjű, emellett értékes adatokat szolgáltatott a hélix méretéről és alakjáról is. A felvételen látható **x** karján a szomszédos foltok közötti távolság fordítottan arányos a hélix egy csavarmenetének átlagos távolságával ($34 \text{ \AA} = 3,4 \text{ nm}$),

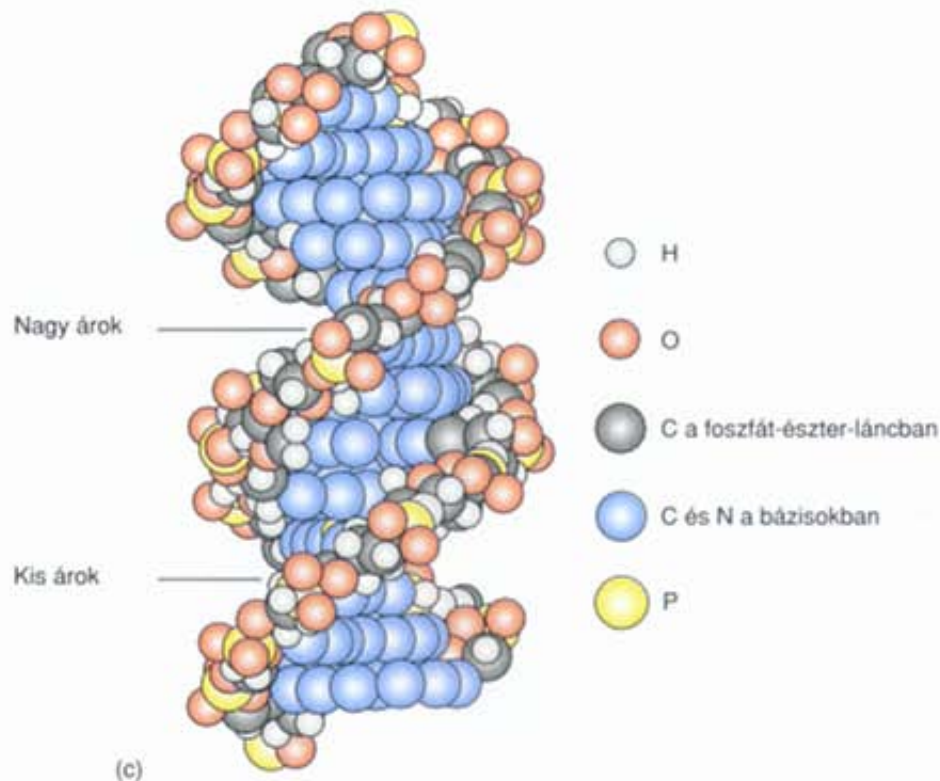
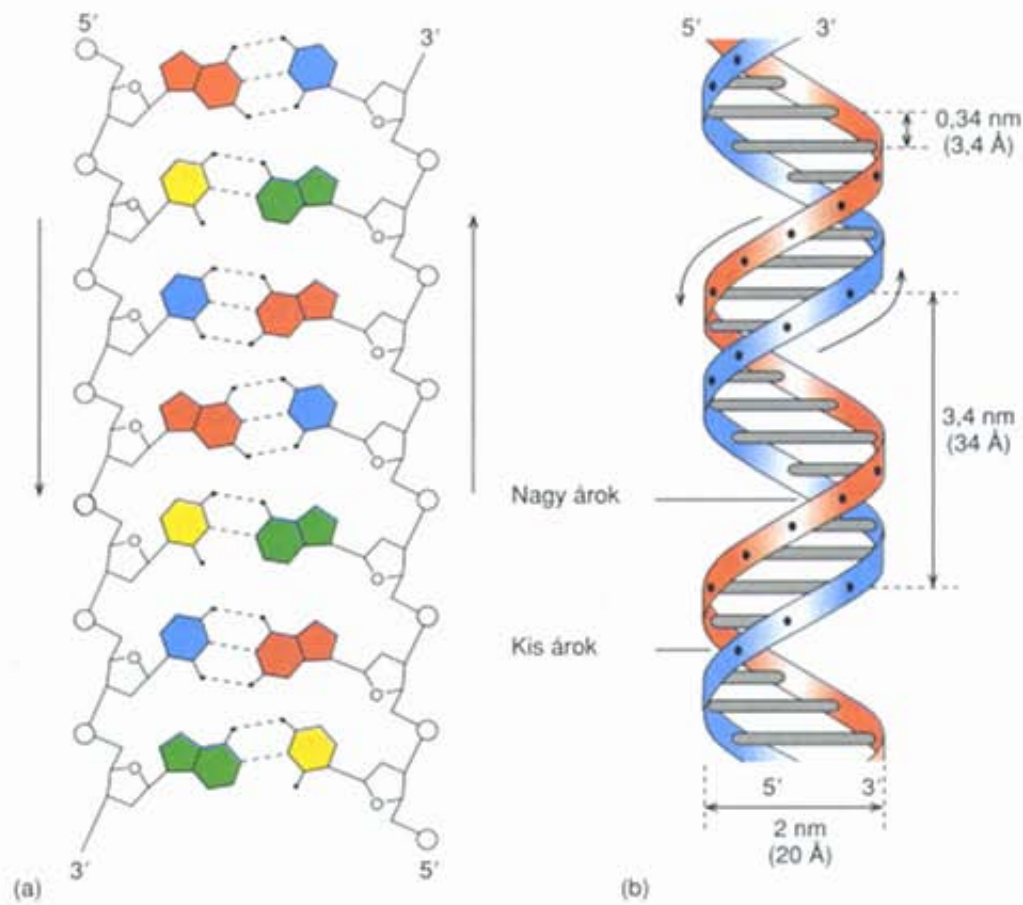


6.13. ábra. A DNS bázispárjai. A guanin-citozin bázispárt (G-C) három hidrogénkötés kapcsolja össze (szaggatott vonalak), alakja csaknem pontosan azonos a két hidrogénkötéssel kapcsolódó adenin-timin bázispáréhoz (A-T)

míg az **x** felső és alsó része közötti távolság fordítottan arányos a hélix hosszában ismétlődő elemek (**két bázispár**) távolságával ($3,4 \text{ \AA} = 0,34 \text{ nm}$). Bár Franklin felvétele sok mindent elárult a DNS szerkezetére vonatkozóan, egy ellentmondást rejtett magában, nevezetesen azt, hogy a DNS egy szabályosan ismétlődő részekből álló hélix, de genetikai szerepe miatt, bázissorrendjének *szabálytalan*nak kell lennie.

Watson és Crick feloldották ezt az ellentmondást, ráadásul úgy, hogy a Chargaff-szabályra is magyarázatot találtak: a DNS **kettőshélix-konformációjű**, a hélix külső felszínén fut a cukor-foszfát gerinc, a bázisok pedig a hélix belseje felé fordulnak, ezen túlmenően a bázisok párokat alkotnak, egy purinbázis mindig egy pirimidinbázissal kapcsolódik. Ily módon a hélix szabályos, nincsenek rajta kidudorodások, amelyekben két nagyobb purinbázis kapcsolódna, és nincsenek rajta befűződések sem, ahol két kisebb pirimidinbázis alkotna párt. Watson tréfálkozott is azon, mi volt az oka, hogy a kettős hélix mellett döntöttek: „Én elhatároztam, hogy kétféle modell készítek. Francisnek fenntartásai voltak, de fizikus mivolta ellenére tudta, hogy a fontos biológiai objektumok párosával járnak.”

De a Chargaff-szabályok ennél messzebbre vezettek. Kimondták, hogy az adenin és timin, valamint a guanin és citozin mennyisége egyenlő a DNS-ben. Ez nagyon pontosan illik Watson és Crick feltételezéséhez, mely szerint a H-kötésekkel kapcsolódó adenin-timin bázispár csaknem ugyanolyan alakú, mint a guanin-citozin bázispár (6.13. ábra). Watson és Crick posztulátuma szerint ezért az adenin mindig timinnel, a guanin mindig citozinnal alkot párt. Így a kétfonális DNS egyforma, nagyon hasonló alakú bázispárokból áll, tekintet nélkül a szálak bármelyikének bázissorrendjére. Ez a meglátás döntő fontosságú volt a DNS szerkezetének megértéséhez.



6.14. ábra. A DNS szerkezetének három modellje. (a) A hélixet kiegyenesítve ábrázolja, így jól láthatók a közepén elhelyezkedő bázispárok. Mindegyik bázist másik szín jelöl, a cukor-foszfát gerinc fekete. A G–C bázispárok között három, az A–T bázispárok között két hidrogénkötés van. A függőleges nyilak a szálak $5' \rightarrow 3'$ irányát jelzik, és azt, hogy a két szál antiparalel lefutású. A bal oldali szál felülről lefelé fut $5' \rightarrow 3'$ polaritással, a jobb oldali pedig alulról felfelé, ugyancsak $5' \rightarrow 3'$ polaritással. A dezoxiribóz gyűrűk (fehér ötszögek, ahol O az oxigén) szintén jelzik a szálak ellentétes irányát: a két szálon ellenkező irányban állnak. (b) A DNS kettős hélixet, mint egy megcsavarodott létrát szemlélteti, a létra két oldalát a cukor-foszfát gerinc, fokait a bázispárok alkotják. A görbe nyilak az $5' \rightarrow 3'$ irányt, az antiparalel lefutást jelzik. (c) Térkitöltési modell. A cukor-foszfát gerinc atomjait szürke, piros, fehér és sárga gömbök képviselik, míg a bázispárokat a vízszintes síkban sorakozó kék gömbök. Figyeljük meg a (b) és a (c) ábrán a hélixen látható nagy és kis árkot!

(a) Átvéve Arthur Kornberg *The Structure of DNS* c. cikkéből, Scientific American Inc., 1968

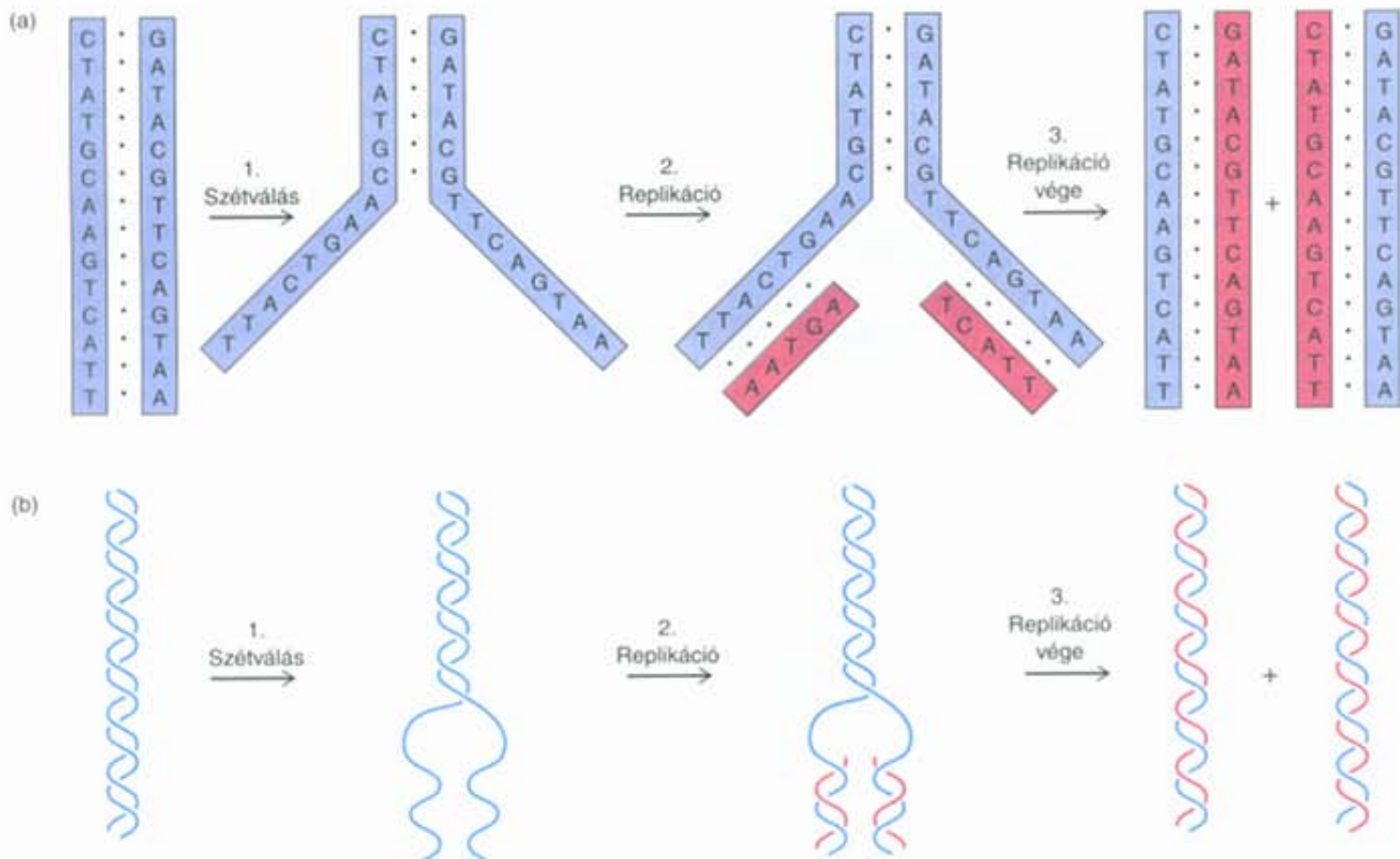
A kettős hélixet sokszor egy megcsavart létrához hasonlítják, és sokféleképpen ábrázolják (6.14. ábra). A létra két oldala jelenti a két DNS-szál cukor-foszfát gerincét, fókai pedig a bázispárokat. Az egyes bázispárok között 3,4 Å a távolság, míg a csavarmentet ismétlődő részeinek távolsága 34 Å, ami azt jelenti, hogy a hélix egy fordulatra tíz bázispár esik. (Egy angström 10^{-10} méter, azaz egytized nanométer.) A nyilak jelzik, hogy a két szál **antiparalel** lefutású. Ha az egyik szál felülről lefelé $5' \rightarrow 3'$ polaritású, a másik $3' \rightarrow 5'$ irányú. Oldatban a DNS szerkezete nagyon hasonló az eddig leírtakhoz, de a hélix mintegy 10,5 bázispárt tartalmaz csavarulatonként.

Watson és Crick a *Nature* c. tudományos folyóiratban publikálták modelljük lényegét, a lap hátoldalán pedig Wilkins, Franklin és munkatársaik közölték a röntgendiffrakciós vizsgálatok eredményeit. A Watson–Crick-publikáció az egyszerűség és a tömörség mintapéldája – mindössze kilencszáz szó, terjedelme alig több egy oldalnál. Nagyon gyorsan megjelent, a benyújtást követően egy hónap múlva már közölték. Crick szerette volna, ha kitérnek a modell biológiai vonatkozásaira is, de Watson óvakodott ettől. Végül megállapodtak abban, hogy egyetlen mondat erejéig kitérnek a kérdésre: „Nem került el figyelmünket,

hogy az általunk javasolt speciális bázispárosodás közvetlenül felveti az örökítő anyag egy lehetséges másolási mechanizmusát is.” Ez a mondat a tudományos irodalom egyik legnagyobb jelentőségű állítása!

Ahogy ez a kihívó mondat is jelzi, a Watson–Crick-modell valóban magában rejtje a DNS másolási mechanizmusát. Mivel az egyik fonal **komplementere** (kiegészítője) a másiknak, a két fonal szétválhat, és mindkettő mintaként (templát) szolgálhat egy-egy új szál felépítéséhez. A 6.15. ábra vázlatosan szemlélteti a DNS megkettőződésének, a replikációnak a folyamatát. Figyeljük meg, miként biztosítja ez a mechanizmus, hogy a két utódmolekula pontosan olyan legyen, mint az eredeti, ami sejtosztódáskor lehetővé teszi a gének integritásának megőrzését.

A DNS kettős hélix szerkezetű molekula, amelynek külső felszínét cukor-foszfát gerinc alkotja, a bázispárok a hélix belseje felé néznek. A bázispárokból az A mindig T-nel, a G mindig C-nal alkot párt.



6.15. ábra. A DNS replikációja. (a) Az egyszerűség kedvéért a két szülői fonalat (kék) párhuzamos vonalakkal jelöltük. 1. lépés: A megkettőződés során a szülői fonalak elválnak egymástól, széttekerednek. 2. lépés: Az új szálak (piros) az elvált szülői fonallal komplementer bázisokból épülnek fel. 3. lépés: A replikáció befejeződik, a szülői fonalak egészen elválnak egymástól, az új szálak pedig teljesen felépülnek. A végeredmény két, az eredetivel azonos bázissorrendű, kettőshélix-szerkezetű DNS-molekula. Mindkét utódmolekula egy régi (kék) és egy új szálból (piros) épül fel. Mivel az utódmolekulának csak az egyik szála régi, ezt a megkettőződési mechanizmust szemikonzervatív replikációnak nevezik. (b) Ugyanez a folyamat a valóságot jobban tükröző ábrázolással. A fonalakat párhuzamos vonalak helyett kettős hélix jelöli. Figyeljük meg, hogy a régi szálak mellett itt is egy-egy új szál szintetizálódik.

AZ RNS-GÉNEK

A Hershey és Chase által alkalmazott genetikai rendszer egy fág, azaz egy bakteriális vírus volt. A vírusrészecske lényegében véve egy génekből álló csomag, önmagában nem mutat életjelenségeket, nem folytat anyagcserét. Amikor azonban megfertőz egy sejtet, úgy tűnik, életre kel. A gazdasejt hirtelen a vírusfehérjéket kezdi gyártani, a vírusgének is replikálódnak benne, majd az újonnan keletkezett gének a burokképletekkel kapcsolódva vírusrészecskékké állnak össze. Mivel a vírusok a sejten kívül inert részecskékként viselkednek, de a gazdasejtben élőhöz hasonló aktivitást mutatnak, rendszertani besorolásuk problémákat vet fel. Egyes tudósok élőlényeknek, sőt élő szervezeteknek nevezik őket.

Mi inkább egy másik megjelölést, a „genetikai rendszert” részesítjük előnyben, annak ellenére, hogy kissé nehézkes, de talán jobban tükrözi a vírusok valódi, az élőnél alacsonyabb rendű státusát. Ezt a meghatározást bármilyen entitásra lehet alkalmazni – legyen az egy valódi élő szervezet, egy vírus, vagy akár egy fehérjéket sem tartalmazó, gyűrű alakú RNS-ből álló **viroid** –, amely replikálódásra alkalmas géneket tartalmaz.

A legtöbb eddig ismert genetikai rendszer DNS-ből álló géneket tartalmaz. Néhány vírus azonban, közöttük több bakteriofág, növényi és állati vírus (például a HIV, az AIDS vírusa) és a viroidok, RNS-ből álló génekkal rendelkeznek. Ezek rendszerint egyfonalas RNS-ek, de vannak kétfonalas szerkezetűek is.

Már láttuk a vírusok egyik sikeres alkalmazását a genetikai kutatásokban. A következő fejezetekben sok ilyen példával találkozunk még. Tény, hogy a vírusok nélkül a genetikai mérhetetlenül szegényebb lenne.

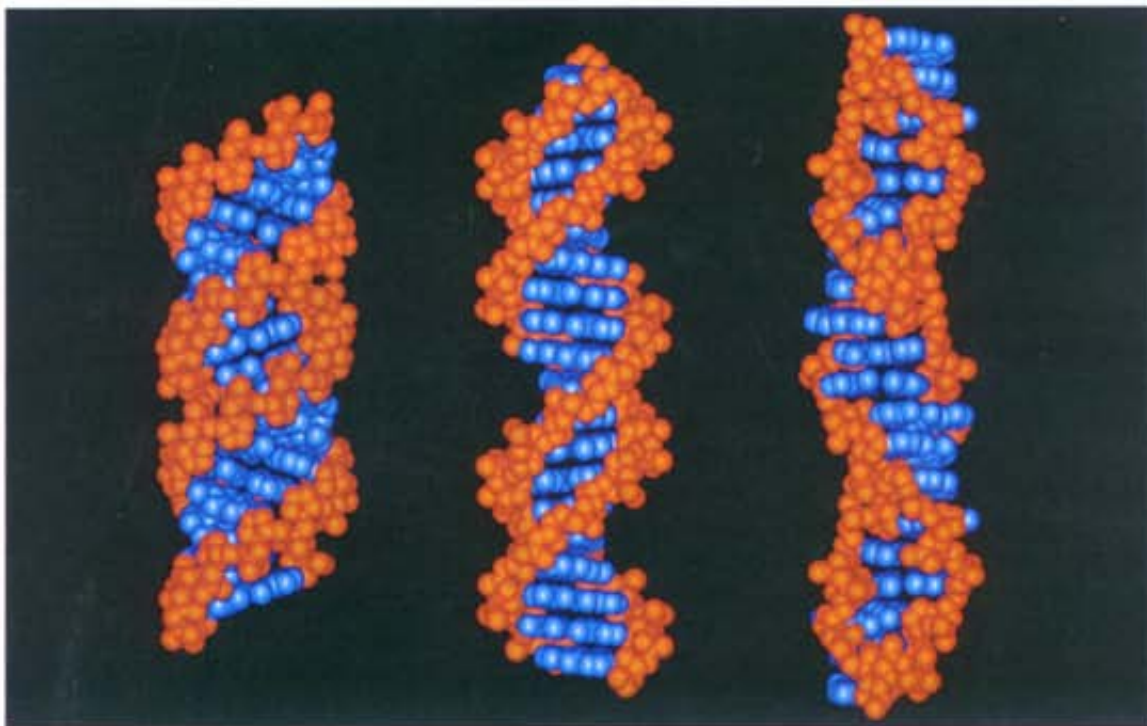
Bizonyos vírusok és a viroidok örökítő anyaga DNS helyett RNS-ből épül fel.

A NUKLEINSAV FIZIKAI KÉMIÁJA

A DNS- és az RNS-molekulák többféle szerkezetet felvehetnek. Vizsgáljuk meg ezeket, és a DNS viselkedését olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a két szál elválását, azután újraegyesülését!

A DNS SZERKEZETI VÁLTOZATAI

A Watson és Crick által javasolt DNS-szerkezet (6.14. ábra) a DNS Na-sójjára érvényes, egy magas relatív páratartalom (92%) mellett kihúzott szálban. Ez a DNS úgynevezett B-formája. A **B-forma** valószínűleg jól közelíti a legtöbb sejt DNS-ének konformációját, de nem ez az egyetlen lehetséges térbeli elrendezés,



6.16. ábra. Az A-, B- és Z-DNS számítógépes térkitöltéses modellje. (balra) A-DNS. Figyeljük meg a bázispárokat (kék), amelyek elbillenése a vízszintestől nagyon jól látható a nagy árokban alul és felül! Az, hogy a hélix jobbmenetes, a cukor-foszfát gerincen (piros) látható. (középen) B-DNS. A jól ismert jobbmenetes hélix a vízszintes bázispárokkal. (jobbra) Z-DNS. Balmenetes hélix. Mindegyik DNS-forma ugyanannyi bázispárral szerepel az ábrán, ami kihangsúlyozza az egy bázispárra jutó csavarulat emelkedésében mutatkozó eltéréseket. Mivel az A-forma emelkedése a legkisebb, adott térfogatban az A-DNS-ben több bázispár található, mint a B- vagy a Z-DNS-ben

Dr. Fusao Takusagawa engedélyével

6.2. táblázat. A DNS különböző formái

Forma	Bázispárok távolsága (Å)	Bázispárok száma csavarulatonként	Bázispárok elmozdulása a vízszintestől
A	2,8	11	20°
B	3,4	10	0°
Z	4,5	12	7°
RNS-DNS hibrid	2,8	11	20°

Davidson: *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 8. átdolgozott kiadás, Adams és mások
© Chapman & Hall, London

amit a kétszálú DNS felvehet. Ha a kihúzott szál körül 75%-ra csökkentik a relatív páratartalmat, a DNS Na-sója úgynevezett **A-formát** vesz fel (6.16.(a) ábra), ami több vonatkozásban is eltér a B-formától (6.16.(b) ábra). A legszembetűnőbb, hogy a bázispárok síkja nem merőleges a hélix tengelyére, hanem 20%-kal eltér a vízszintestől. Emellett az A-hélixben 11 bázispár esik egy fordulatra, a B-forma 10 bázispárjával szemben, a csavarmentek távolsága pedig 34 Å helyett 28 Å. Ez azt is jelenti, hogy a bázispárok távolsága csak 2,8 Å, nem pedig 3,4 Å, mint a B-DNS-ben. Egy hibrid polinukleotid, amelynek egyik szála RNS, a másik DNS, oldatban A-formát vesz fel, hasonlóan a kétszálú RNS-hez. A 6.2. táblázat áttekintést ad az A- és B-forma, valamint az RNS-DNS hibrid helikális paramétereiről.

Mind az A-, mind a B-DNS jobbmenetes, azaz a hélix az óramutató járásával egyező irányban fut, akár felülről, akár alulról vizsgáljuk. Alexander Rich és munkatársai felfedezték 1979-ben, hogy a DNS-nek nemcsak jobbmenetes változatai lehetnek. Kimutatták, hogy a kétfonális DNS, amelyet váltakozó purin-pirimidin szakaszok (pl. a poli[dG-dC] · poli[dG-dC]):



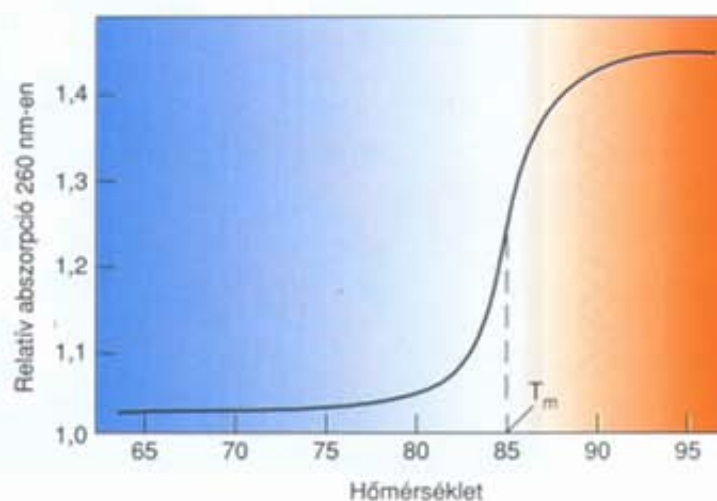
építenek fel, kiterjedt balmenetes formát vehetnek fel. Mivel ennek a DNS-nek a lefutása oldalnézetben cikcakkos, gyakran **Z-DNS** néven emlegetik (az angol zigzag – zezguzos szóból). A 6.16.(c) ábrán látható a Z-DNS modellje, a B-forma mellett, helikális adatait a 6.1. táblázat tartalmazza. Bár Rich a Z-DNS-konformációt szintetikus modellen, a már említett poli[dG-dC] · poli[dG-dC] láncon fedezte fel, ez a forma nem csupán laboratóriumi érdekesség. Bizonyítékok vannak arra, hogy kisebb arányban az élő sejtek is tartalmazzanak Z-DNS-t, bár annak pontos szerepe egyelőre nem ismert.

Az élő sejtekben a DNS előfordulhat a gyakori B-formában, amelyben a bázispárok vízszintes pozícióban állnak. A DNS kis hányada kiterjedt balmenetes konformációt vesz fel, ez a Z-DNS (legalábbis eukariótáknál). Az RNS-DNS hibrid egy harmadik helikális szerkezettel, az A-formával jellemezhető, amelyben a bázispárok a vízszintes síktól kissé elfordulnak.

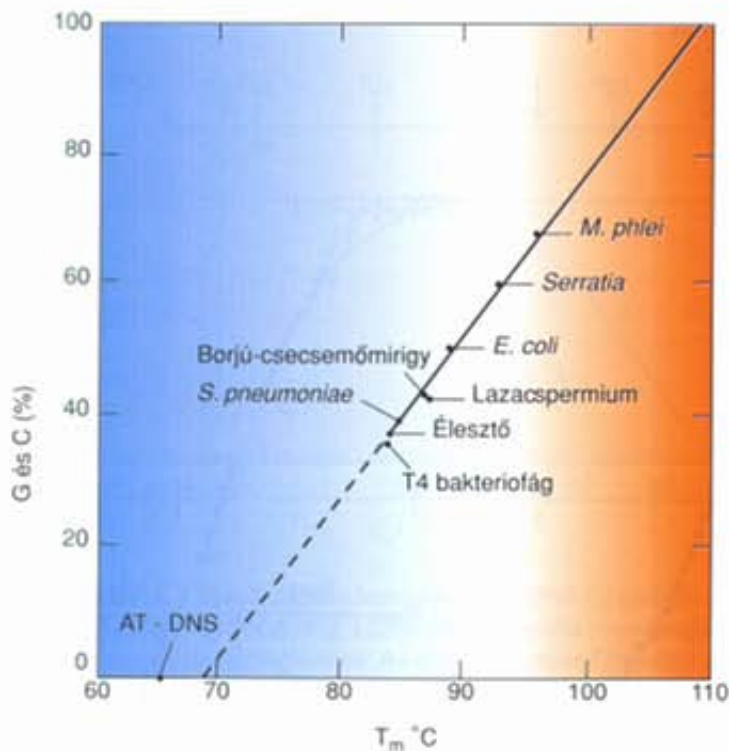
6.3. táblázat. Különböző forrásból származó DNS-ek relatív G + C tartalma

Faj	G + C %
<i>Dictyostelium</i> (nyálkagomba)	22
<i>Streptococcus pyogenes</i>	34
Vaccinia vírus	36
<i>Bacillus cereus</i>	37
<i>B. megaterium</i>	38
<i>Haemophilus influenzae</i>	39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Bojju-csecsemőmirigy	40
Patkánymáj	40
Bikaspermium	41
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
Búzacsíra	43
Csirkemáj	43
Egérlep	44
Lazacspermium	44
<i>B. subtilis</i>	44
T1 bakteriofág	46
<i>Escherichia coli</i>	51
T7 bakteriofág	51
T3 bakteriofág	53
<i>Neurospora crassa</i>	54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
<i>Sarinea lutea</i>	72
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72
Herpes simplex vírus	72
<i>Mycobacterium phlei</i>	73

Davidson: *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 8. átdolgozott kiadás, Adams és mások
Copyright © Chapman & Hall, London



6.17 ábra. A *Streptococcus pneumoniae* DNS-ének olvadási görbéje. A DNS-t melegítették, miközben 260 nm hullámhosszon mérték fényelnyelésének növekedését. Az a pont, amelyen a denaturáció a fonalak felére terjed ki, az ún. olvadási hőmérséklet (T_m). Ennek a mintának az olvadáspontja adott körülmények között 85 °C



6.18. ábra. A DNS olvadási hőmérsékletének és GC-tartalmának összefüggése. Az AT-DNS kizárólag A- és T-tartalmú, szintetikus DNS

A DNS-kettős hélix két szálának elválasztása

Az előzőekben láttuk, hogy míg a DNS G:C és A:T aránya állandó, addig a GC-tartalom (a G + C %-os aránya) meglehetősen változó az egyes DNS-molekulák között. A 6.3. táblázat különböző szervezetek DNS-ének GC-tartalmát szemlélteti. Az értékek 22%-tól egészen 73%-ig változnak, és ezek az eltérések tükröződnek a DNS fizikokémiai tulajdonságaiban is.

Ha egy DNS-oldat hőmérséklete elég magasra emelkedik, azok a másodlagos kötőerők, amelyek összetartják a két fonalat, fokozatosan gyengülnek, majd felszakadnak. Amikor ez bekövetkezik, és a két szál elválik egymástól, a DNS **denaturálódik**, más szóval **megolvad**. Az a hőmérséklet, amelyen a DNS fele denaturálódott állapotba kerül, az ún. olvadási hőmérséklet, jele: T_m . A 6.17. ábrán a *Streptococcus pneumoniae* DNS-ének olvadási görbéje látható. A fonalak elválásának mértékét – másként az olvadást – a DNS-oldat 260 nm-es hullámhosszon mért abszorpciójával lehet nyomon követni. A nukleinsavak a bázisok elektronszerkezetének köszönhetően abszorbeálják ezen a hullámhosszon a fényt, de a kétszálú DNS-ben, a bázisok közelsége miatt abszorpciók készségük csökken. Amikor a két szál eltávolodik egymástól, a fényelnyelés mértéke 30-40%-kal nő. Ez a jelenség az ún. **hiperkróm hatás**. A görbe lassú kezdeti emelkedése jelzi, hogy a fonalak elég szorosan kapcsolódnak, amíg a hőmérséklet el nem éri az olvadáspontot (T_m), azután az elválás gyors, amit a görbe meredek emelkedése mutat.

A DNS GC-tartalmának számottevő hatása van a T_m értékére (6.18. ábra). Minél magasabb a GC-tartalom, annál magasabb a T_m . Mi ennek az oka? A két DNS-szálat összetartó erők egyike a bázisok között kialakuló hidrogénkötés. A G-C bázispárok között három hidrogénkötés jön létre, míg az A-T párok között csak kettő. Ebből következik, hogy a GC-ben gazdag DNS-szálak erősebben kötődnek egymáshoz, mint az AT-ben gazdagabb fonalak.

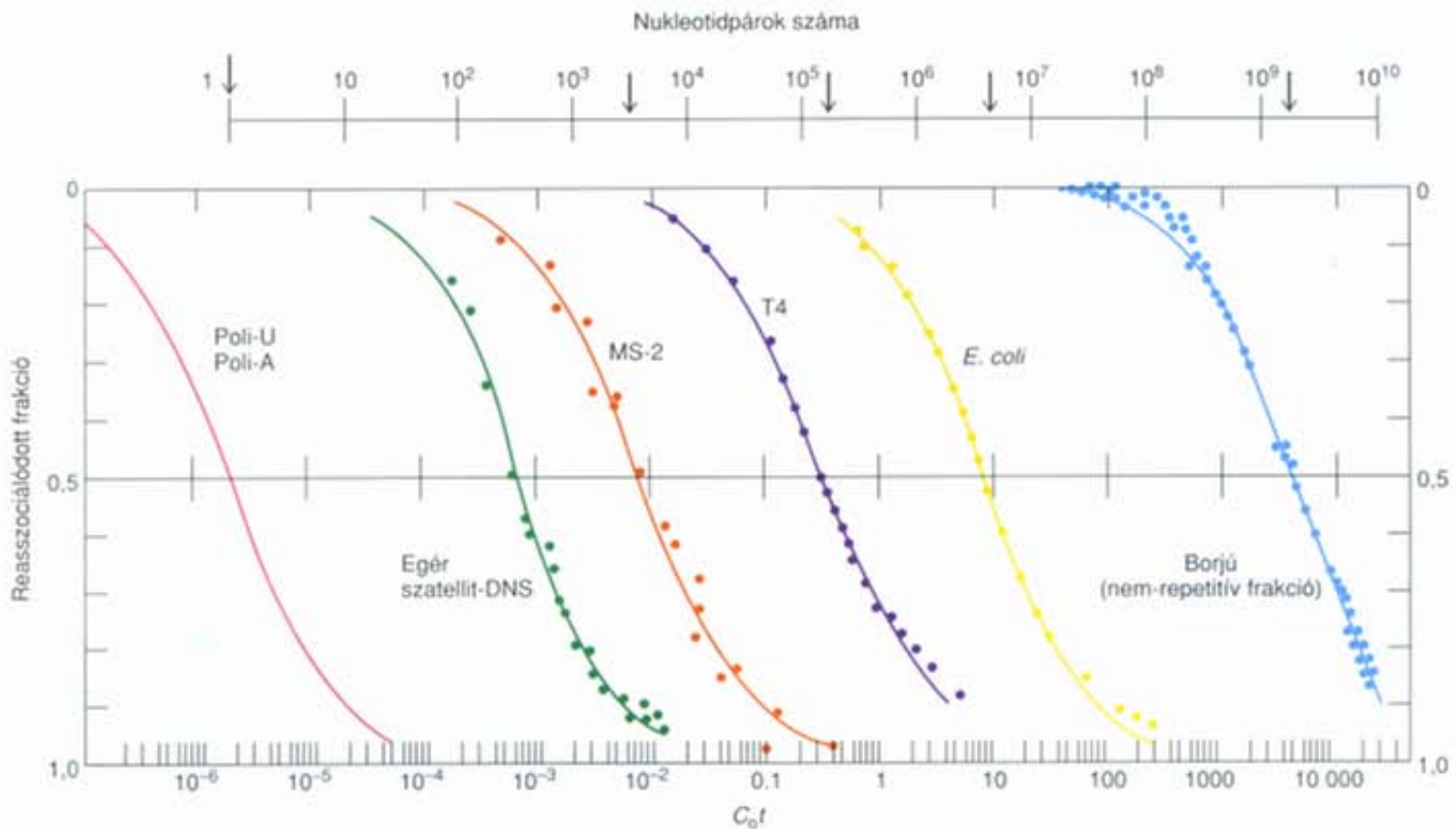
A melegítés nem az egyetlen módja a DNS denaturálásának. A szerves oldószerek, mint például a dimetil-szulfoxid, a formamid, felbontják a hidrogénkötéseket, ezzel elősegítik a denaturálódást. A DNS-oldat sókoncentrációjának csökkentése szintén kedvez a denaturációnak, mivel eltávolítja az ionokat, amelyek leárménykolják a két fonal negatív töltéseit. Alacsony ionerőn ezeknek a negatív töltéseknek a kölcsönös taszító ereje elég nagy ahhoz, hogy már viszonylag alacsony hőmérsékleten is denaturálódjon a DNS.

A DNS GC-tartalma kevesebb, mint 25%-tól megközelítőleg 75%-ig terjedhet. A GC-tartalom erősen befolyásolja a DNS fizikai tulajdonságait, különösen az olvadáspontját, amely a GC-tartalommal egyenes arányban változik. A DNS olvadáspontja (T_m) az a hőmérséklet, amelyen a két szál félig elválik egymástól, más szóval denaturálódik. Az alacsony ionkoncentráció és a szerves oldószerek elősegítik a denaturációt.

A szétválasztott fonalak újraegyesülése

A szétvált DNS-szálak megfelelő körülmények között újra összekapcsolódhatnak. Ez a folyamat a **renaturáció**. A renaturáció hatékonyságához több tényező is hozzájárul. Ezek közül a három legfontosabb:

1. **Hőmérséklet.** A DNS renaturációjához legalkalmasabb a T_m értékénél 25 °C-kal alacsonyabb hőmérséklet. Ez már elég alacsony ahhoz, hogy ne kedvezzen a denaturációnak, de elég magas ahhoz, hogy a diffúzió még megfelelő sebességű legyen, valamint ahhoz, hogy a nem pontosan komplementer szekvenciák között kialakuló kötések és az azonos fonálon belüli bázispárok még gyengék legyenek. Ebből következik, hogy a denaturáció utáni gyors hűtés akadályozza a renaturációt. A denaturált DNS fenntartására gyakran alkalmazott eljárás, hogy a forró DNS-oldatot jég közé rakják (*quenching*).
2. **A DNS koncentrációja.** Az oldat DNS-koncentrációja is fontos tényező. Elfogadható határokon belül, minél magasabb a koncentráció, annál valószínűbb, hogy két komplementer fonal adott időn belül találkozzon. Vagyis, minél magasabb a koncentráció, annál gyorsabb a renaturáció.



6.19. ábra. Különböző polinukleotidok C_0t görbék. A reasszociálódott frakció mennyisége a C_0t függvényében. A leszálló görbe jelzi a renaturáció előrehaladtát. A polinukleotidok összetettségének mértékét a nukleotidpárok száma mutatja a felső x tengelyen

3. Renaturációs idő. Nyilvánvalóan, minél hosszabb ideig tart a renaturáció, annál több molekula képez kettős fonalat.

A renaturáció kinetikájának jellemzésére R. J. Britten és D. E. Kohne bevezettek egy olyan kifejezést, amely magában foglalja a DNS-koncentrációt és az időt. A C_0t paraméter a kezdeti DNS-koncentráció (C_0 mol nukleotid/dm³) és az idő (másodperc) szorzata: C_0t . (Röviden: cot , amely a koncentráció – concentration és az idő – time kiemelt kezdőbetűiből származik.) Minden egyéb tényezőt azonos értéken tartva a komplementer fonalak renaturációja az oldatban a C_0t paramétertől függ, ahogyan azt a 6.19. ábrán a C_0t görbék illusztrálják. Figyeljük meg, hogy a reasszociálódott hányad *növekszik* az y tengely mentén *lefelé* haladva, a görbe menete reprezentálja a renaturációt.

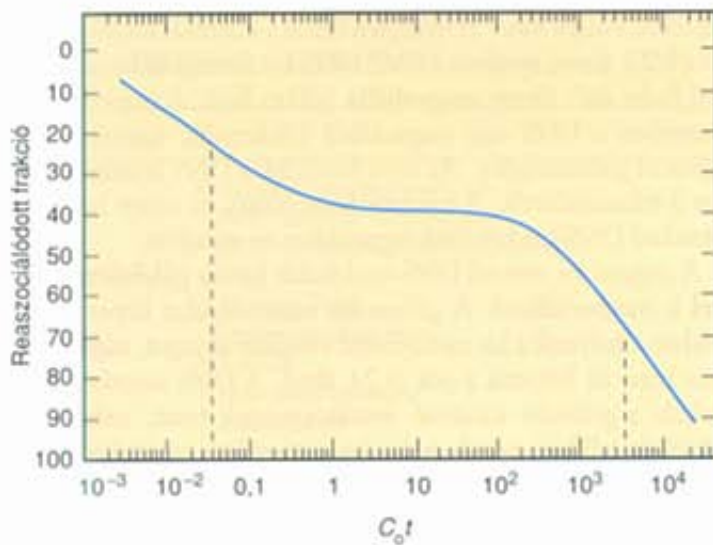
A C_0t görbék sorozata még egy tényezőre felhívja a figyelmet a renaturáció során: a DNS összetettségére. Nézzük meg a bal szélső görbét! Két mesterségesen szintetizált RNS-szál, egy poli(U) és egy poli(A) renaturációját szemléltetik. Mivel ezek a fonalak komplementerek, akármilyen pozícióban találkoznak, tökéletesen illeszkednek egymáshoz a bázispárok, akár pontos a fonalak végének találkozása, akár elcsúsznak egymás mentén. Az effektív komplexitásuk vagy hosszuk mindössze egy bázis. Tehát nagyon könnyen, már kis C_0t értéknél renaturálódnak. Az a C_0t érték, amelynél a poli(U) és poli(A) félig kétfonalas, azaz a $C_0t_{1/2}$, csak 2×10^6 .

Az ábra középtáján látható a T4 fág DNS-ének C_0t görbéje. Ez a DNS már sokkal összetettebb, mint a poli(U) · poli(A) RNS; körülbelül 2×10^5 bázispár (l. a felső x tengelyen), és nem

tartalmaz ismétlődő szekvenciákat. Így két fonalának tökéletes illeszkedéssel kell találkoznia a renaturációhoz. Ezért a $C_0t_{1/2}$ mintegy 2×10^5 -szöröse a poli(U) · poli(A) értékének, azaz 0,4.

Nézzük végül a borjú DNS-ének nem-repetitív frakcióját. Ez a DNS képviseli a borjú teljes genomjának mintegy 70%-át, és nagyon komplex szerkezetű. Körülbelül 2×10^9 bázispáryi ilyen egyedi DNS-szekvencia van a borjú minden haploid kromoszómakészletében – mintegy 10 000-szerese a T4 fág DNS-ének. Tehát a borjú DNS-ének két komplementer szála, sokkal több nem megfelelő szakasszal találkozik, mielőtt komplementer szakasszal kapcsolódhatna. Valóban, 10 000-szer több idő szükséges a folyamathoz ugyanazon a koncentráción, mint a T4 DNS esetében. Másképp kifejezve, ha ugyanannyi idő alatt akarjuk elérni a renaturációt, mint a T4 DNS-ét, a koncentrációnak 10 000-szeresnek kellene lennie. Ez egy másik megközelítése annak, hogy a borjú DNS $C_0t_{1/2}$ értéke 10 000-szerese a T4 DNS-ének. Számszerűen 4000, a 0,4-hez képest.

Figyeljük meg a DNS komplexitása és $C_0t_{1/2}$ értéke között fennálló lineáris összefüggést: minél bonyolultabb egy DNS-molekula, annál magasabb a $C_0t_{1/2}$. Természetesen nem minden eukarióta DNS nem-repetitív. Az egér DNS-készletének 40%-a repetitív, és száztól egy millió kópiaszámig van jelen a haploid kromoszómakészletben. A tartomány felső határán az ún. **nagymértékben ismétlődő szekvenciájú** DNS helyezkedik el, a teljes készletnek kb. 10%-a. Rövid, sokszor ismétlődő szakaszból áll, kismértékű változásokkal, egymilliószoros ismétlésben az egér genomban. Ennek a DNS-nek a C_0t görbéje a 6.19. ábrán balról a második. Figyelemre méltó az eltérés a $C_0t_{1/2}$ értéke és az emlősök egyetlen kópiában



6.20. ábra. Borjú csecsemőmirigyéből vett DNS C_0t görbéje. A görbén két fázis figyelhető meg, a DNS két legnagyobb mennyiségben szereplő kategóriájának megfelelően. Az első $C_0t_{1/2}$ értéke 0,04 körül van (bal oldali szaggatott vonal), ami a közepes mértékben ismétlődő DNS-nek felel meg. Ez a teljes mennyiségnek mintegy 30%-át teszi ki, ahogyan az y tengelyről leolvasható (10%-ról 40%-ra változik a reasszociálódott mennyiség). A másik kategória az egyedi szekvenciáké, vagyis az egyetlen kópiában szereplő DNS-frakció. $C_0t_{1/2}$ értéke 4000 körüli (jobb oldali szaggatott vonal), és a DNS-nek mintegy 60%-át teszi ki. A harmadik kategória, azaz a nagymértékben ismétlődő DNS, már igen alacsony C_0t értékeken reasszociálódott, amelyek a grafikonon nincsenek feltüntetve. Ez a frakció a teljes DNS-nek körülbelül 10%-át jelenti, ami leolvasható abból, hogy a legkisebb C_0t értékeknél a DNS-nek 10%-a már renaturált állapotban van.

előforduló, **egyedi szekvenciájú** (nem-repetitív) DNS-ének $C_0t_{1/2}$ értéke között, ami az ábra jobb szélén látható.

A repetitív DNS fennmaradó része a moderátnan, másképp **közepes mértékben ismétlődő szekvenciák** közé tartozik, ami az egér genomjának megközelítőleg 30%-át teszi ki. Az emlős genom repetitív és egyetlen kópiában meglévő DNS-ének kombinációjával a 6.20. ábra komplex C_0t görbéjéhez jutunk. Az igen alacsony C_0t értéknél a nagymértékben ismétlődő DNS reasszociálódik, ezt követik a közepes mértékben ismétlődő szakaszok, végül az egyedi szekvenciák. A fehérjék információit kódoló eukarióta gének (9. fejezet) általában az egyetlen kópiában meglévő, egyedi szekvenciákhoz tartoznak, a riboszomális RNS-ek génjei közepes mértékben repetitívek (10. fejezet), míg a kromoszómák centromeronjának DNS-e nagymértékben ismétlődő szekvencia (6.21. ábra). A repetitív DNS legnagyobb hányadának szerepe egyelőre ismeretlen.

Az egymástól elválasztott DNS-fonalak renaturálódhatnak. A renaturációt több tényező is befolyásolja: (1) hőmérséklet, (2) a DNS koncentrációja, (3) az idő, (4) a DNS komplexitása. A DNS kezdeti koncentrációjának és az időnek a szorzata a C_0t , amely az egyéb tényezők azonossága esetén megszabja a renaturáció mértékét. A bonyolult szerkezetű DNS magasabb C_0t értéknél renaturálódik, mint az egyszerűbb felépítésű molekulák.



6.21. ábra. A satellit-DNS a centromeronokban található. Az egér satellit-DNS-ének próbáját biotinhoz kapcsolták, majd hibridizálták az egér metafázisos kromoszómáival (balra fent), illetve interfázisos sejteivel (jobbra alul). Ezután a preparátumhoz egy biotint kötő fehérjét, avidint adtak, amelyhez előzőleg sárgászöld fluoreszcens festéket kötöttek. Ahová a satelit-próba hibridizálódott, oda a fluoreszcens avidin is bekötődik, így fluoreszcens mikroszkóppal kimutatható. A mikroszkópos felvételen látható, hogy a jelölés, és ebből következően a satellit-DNS is, a metafázisos kromoszómák centromeronjánál van. A kromoszómák zömét kitevő DNS-t piros fluoreszcens festékekkel kontrasztosították. Az interfázisos sejtekben is láthatók a sárgán fluoreszkáló centromeronok, annak ellenére, hogy maguk a kromoszómák ilyenkor nem mutathatók ki.

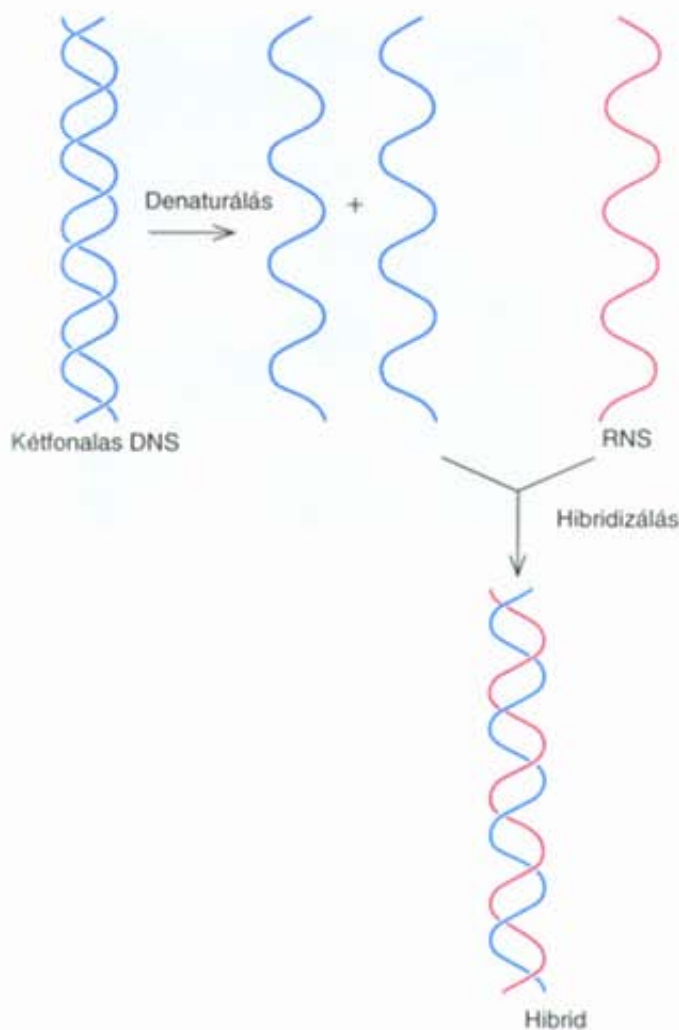
Heinz-Ulrich Weier, *Biotechniques*, 10(4) címlap, 1991. április; a cikk szerzője Dr. Simone Eperon, 498, Eaton Publishers

Két különböző polinukleotid-lánc hibridizációja

Eddig csak arról volt szó, hogyan kapcsolódhat ismét össze két elválasztott DNS-fonál, de vannak más lehetőségek is. Vegyünk például egy egyszálú DNS-t, amely egy komplementer szekvenciájú egyszálú RNS-sel alkot kettős hélixet. Ez történne, ha egy gén két szálát elválasztanánk, az egyik szálát izolálnánk, és összehoznánk egy komplementer RNS-szállal (6.22. ábra). Ez a folyamat nem renaturáció, hanem **hibridizáció**, hiszen két különböző polinukleotid kapcsolódik össze egy **hibrid** molekulává. A két polinukleotidnak nem is kell annyira különböznie egymástól, mint a DNS-nek és az RNS-nek. Ha két különböző eredetű komplementer vagy közel komplementer szekvenciákat tartalmazó DNS-szálat összekeverünk, akkor azok összekapcsolódását is hibridizációnak nevezzük. Az eltérés a két komplementer szál között finomságokra is kiterjedhet, az egyik például tartalmazhat radioaktív jelölést, a másik pedig nem. A későbbi fejezetekben látni fogjuk, hogy a hibridizáció rendkívül értékes módszere a genetikai kutatásoknak, fontosságát nehéz lenne túlbecsülni.

KÜLÖNBÖZŐ MÉRETŰ ÉS ALAKÚ DNS-MOLEKULÁK

A 6.4. táblázat különféle szervezetek és vírusok haploid genomjának méretét mutatja be. A méreteket háromféle módon adhatjuk meg: molekulatömeggel, a bázispárok számával, illetve a hosszúság-



6.22. ábra. DNS és RNS hibridizálása. Először a DNS-t denaturálják, hogy két szálát (kék) elválasszák egymástól (balra fent). Ezután a DNS-szálakat RNS-szálakkal (piros) keverik össze. Ha az RNS komplementere valamelyik DNS-szálnak, és a hibridizációt megfelelő körülmények között végzik (viszonylag magas hőmérsékleten, ami a DNS-RNS hibrid kialakulásának kedvez, szemben a DNS-DNS hibriddel), kialakul a DNS-RNS hibrid molekula, amelynek egyik szála DNS (kék), másik szála RNS (piros)

gal. Természetesen ezek az értékek összefüggnek egymással. Már tudjuk, hogyan lehet átszámolni a bázispárok számát hosszúságra, hiszen a kétfonalas DNS-nél tíz bázispár esik egy teljes fordulatra, vagyis 34 Å távolságra. A bázispárok alapján a molekulatömeg is becsülhető, ha egy nukleotidpár átlagos molekulatömegével (660) számolunk.

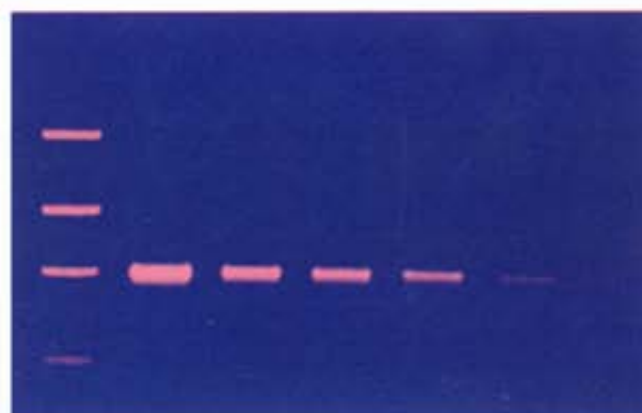
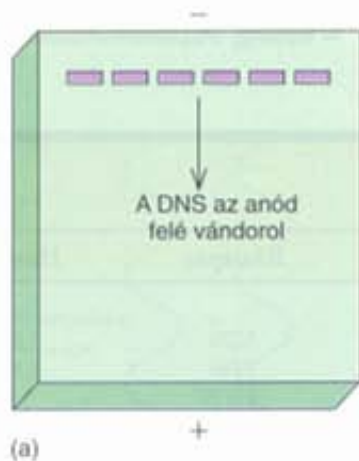
Hogyan mérhetők ezek az értékek? A kisebb DNS-molekulák esetében viszonylag egyszerűen. Tekintsük például a PM2 fág DNS-ét, amely kétszálú, gyűrű alakú (cirkuláris) DNS. Hogyan állapíthatjuk meg, hogy cirkuláris? Kézenfekvő megoldás, ha megnézzük. Erre alkalmas az elektronmikroszkóp, de a vizsgálat előtt a minta elektronmegkötő képességét, más szóval elektrondenzitását növelni kell. Erre a leggyakoribb eljárás a nehézfémekkel, például platínával történő ámyékolás. A mintát felviszik egy elektronmikroszkópos rostélyra, majd hegyes szögben platínát gőzölnek rá. A fém ilyenkor úgy halmozódik fel a DNS mentén, mint a hó a kerítésnél. A rostélyt, úgy forgatják, hogy a DNS körös-körül *ámyékolva* legyen. Így már a DNS elektrondenzitása lesz, és az elektronmikroszkópban úgy fog feltűnni, mint egy sötét hát-

terén fekvő világos fonál. Fényképfelvételen a kontraszt fordított, úgy, mint a 6.23. ábrán, amelyen a PM2 DNS két formája látható: nyitott gyűrű (balra alul), illetve **szuperhélix** (jobbra fent). A szuperhelikális szerkezetben a DNS saját maga körül feltekeredik, hasonlóan egy megcsavart gumiszalaghoz. Az ilyen felvételek a DNS hosszának mérésére is felhasználhatók. A módszer finomítható, ha ismert hosszúságú standard DNS-t is kezelünk ugyanabban az anyagban.

A nagyon kis méretű DNS-molekulák hossza **gélelektroforézissel** is megbecsülhető. A gélben kis mintavályukat képeznek ki, amelyben elhelyezik a kis mennyiségű vizsgálati anyagot, majd elektromos áram alá helyezik a gélt (6.24. ábra). A DNS negatív töltésű molekula a gerincén sorakozó foszfátcsoportok miatt, ezért a gél egyik végén található pozitív pólus (*anód*) irányában mozdul el. A különböző méretű DNS-molekulák eltérő sebességgel vándorolnak a gél pórusaiban. A kisebbek könnyen áthatolnak az apró pórusokon, ezért gyorsan mozognak az elektromos erőterben, a nagyméretűek mobilitása ezzel ellentétben kicsi. Megfelelő ideig végzett futtatás után a DNS-molekulák méretük szerint rendeződnek a gélben, a legnagyobbak a pozitív pólus (*katód*), a legkisebbek az anód közelében. Ezt követően fluoreszcens festékkel megfestve a gélt, a DNS-fragmentumok által alkotott sávok ultraibolya fényben tanulmányozhatók. A 6.25. ábrán látható egy ilyen analízis végeredménye, amit fág DNS ismert méretű fragmentumaival végeztek. A fragmentumok mobilitását molekulatömegű (vagy a bázispárok számának) logaritmus szerint grafikonon ábrázolják. Ezután ismeretlen DNS-fragmentumok analízise is elvégezhető, ha a mintát párhuzamosan futtatjuk a standardfragmentumokkal. Méretüket is meghatározhatjuk, feltéve ha belesik a standard mérettartományába. Például, a 6.25. ábrán a 20 mm mobilitású DNS-szakasz körülbelül 910 bázispárt (bp), más szóval 0,91 **kilobázispárt (kbp, röviden kb)** tartalmaz.

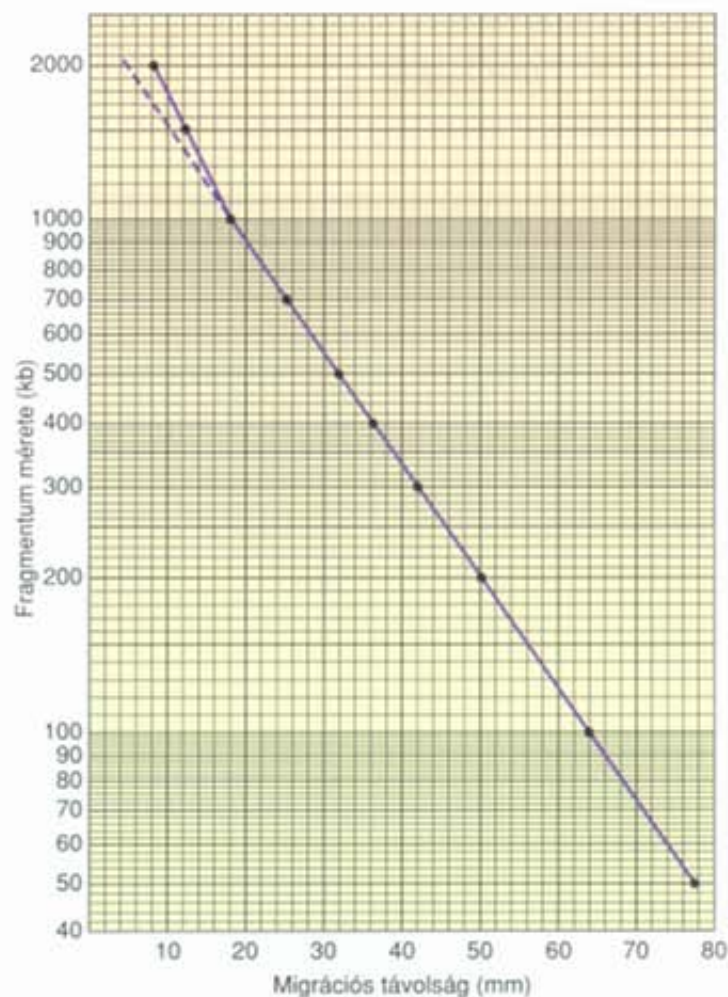
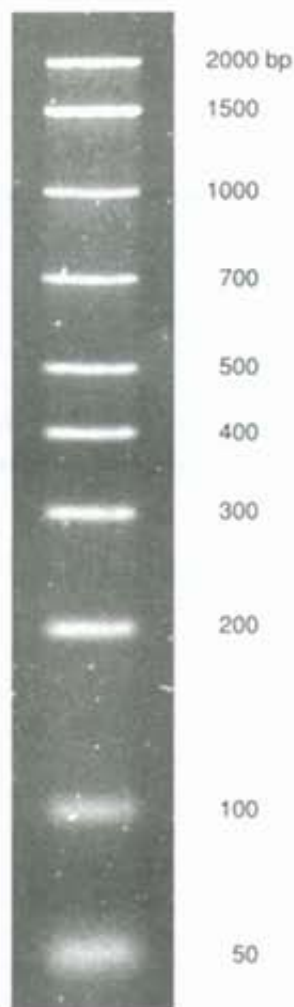
Egy nagyobb DNS-fragmentum méretét nem ilyen könnyű meghatározni. Ennek egyik oka, hogy a DNS mérete és elektroforetikus mobilitása között nagyobb molekulák esetén nem lineáris az összefüggés. Ilyen eltérés látható a 6.25b ábra bal felső részén. A másik ok, hogy a kétfonalas DNS viszonylag merev, ugyanakkor hosszú és vékony, ráadásul minél hosszabb, annál törékenyebb. A nagy DNS-molekulák nagyon könnyen eltörnek, még látszólag kíméletes kezelés, mint például egy főzőpohárban való kevergetés vagy pipettázás is elegendő ahhoz, hogy eltörjenek. Hogy könnyebben belátható legyen, képzeljük el a DNS-t, mint egy szál kifőzetlen spagettit. Ha rövid, egy-két centiméteres a darab, viszonylag kíméletesen is bánhatunk vele anélkül, hogy megsérülne; de ha hosszú, a törés csaknem elkerülhetetlen.

A nehézségek ellenére a kutatók olyan elektroforetikus módszert is kifejlesztettek, amellyel több millió bázispárnyi (**megabázis, Mb**) hosszúságú DNS-molekulák is elválaszthatók egymástól. Ahelyett, hogy állandó áramot vezetnének a gélen keresztül, lökéseket (pulzusokat) alkalmaznak. A viszonylag hosszú ideig tartó pulzusokat az elektroforézis irányában és rövid ideig tartókat az ellenkező irányban vagy még oldalirányban is. Ez az ún. **áramlökéses elektroforézis** értékes módszer még az olyan nagy DNS-molekulák méretének meghatározására is, mint amilyenek az élesztő egyes kromoszómaiban találhatóak! A 6.26. ábra egy ilyen elektroforézis eredményét demonstrálja. A kimutatott tizenhat sáv 0,2-2,2 Mb méretű kromoszómákat jelez.



6.24. ábra. DNS gélelektroforézise. (a) A módszer lényege: agarózból (tengeri algák kivonata, fő komponense az agar-agar) vízszintes helyzetű gélt készítenek. Melegítés hatására az agaróz megolvad, majd lehűtve gellé dermed. A még olvadt anyagba „fésűt” helyeznek, amit csak a gél megdermedése után távolítanak el. Az agarózban így kis vályúk képződnek, ezekbe viszik be a DNS-mintát, majd egyenáramot vezetnek át a gélen. Az áram hatására DNS vándorolni kezd a gél pórusaiban. A DNS sav, ezért az elektroforézis közel semleges pH-ján negatív töltésű, így molekulái a vályúkból a pozitív pólus, az anód felé vándorolnak. (b) Egy gélről készült felvétel az elektroforézis után. A DNS-fragmentumok világos sávként tűnnek elő. A DNS-hez egy speciális festéket kötöttek, amely UV fényben narancsszínű, de ezen a felvételen rózsaszínűnek látszik.

Fotó (b) Life Technologies, Inc.

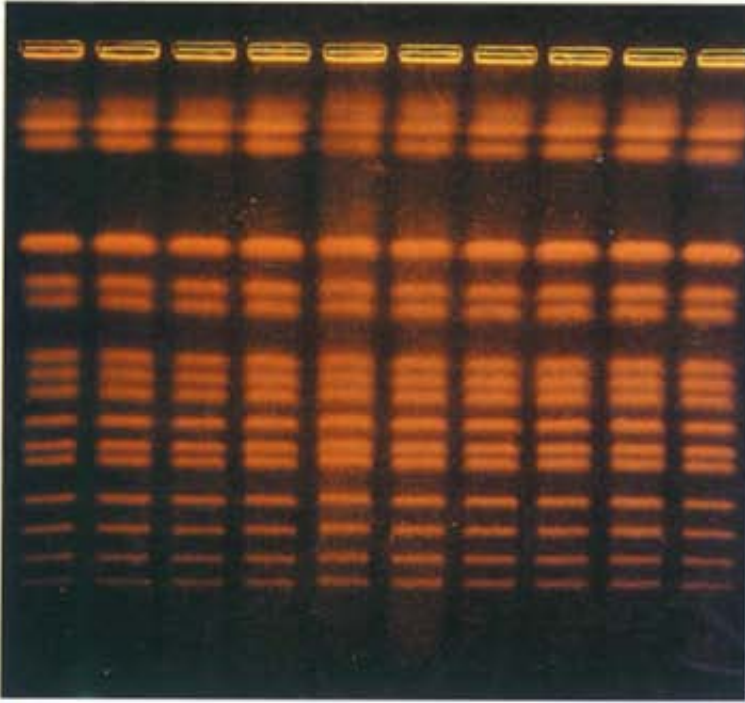


(a)

(b)

6.25. ábra. DNS-fragmentumok méretének meghatározása gélelektroforézissel. (a) Kereskedelemben beszerezhető, festett, standardfragmentumok elektroforézisének fotója. A sávok színes felvételen narancsszínűek lennének, de itt fekete-fehérnek látszanak. A fragmentumok méretét a jobb oldalon tüntették fel. (b) A fragmentumok által megtett út és a méret (bp) közötti összefüggés grafikus ábrázolása. A függőleges tengely logaritmikus, nem lineáris beosztású, mivel a fragmentumok elektroforetikus mobilitása (migrációs ráta) a méret logaritmusával arányos. Figyeljük meg a várttól való eltérést a nagyméretű fragmentumok esetében. A folyamatos vonal jelenti a mért eredményeket, a szaggatott vonal pedig a várt elméleti értékeket. Az ábra jól demonstrálja, hogy a hagyományos elektroforézis csak korlátozott mértékben alkalmas nagyméretű DNS-molekulák méretének meghatározására.

Forrás: (a) Bio-Rad Laboratories



6.26. ábra. Élesztő kromoszómáinak szétválasztása áramlökéses gélelektroforézissel. Az egyes mintákat tíz párhuzamos sávban futtatták, és etidium-bromiddal festették. A sávok alapján a kromoszómák mérete 0,2 megabázis (alul) és 2,2 megabázis (felül) közötti mérettartományba esik. Az eredeti gél 13 cm széles és 12,5 cm hosszú

Bio-Rad Laboratories, CHEF-DR © II elektroforetikus rendszer

négy fehérje kódolására elegendő, de a vírusgének átfedik egymást, így valamivel nagyobb a kapacitásuk. A 15. fejezetben még részletesebben megvizsgáljuk ezt a jelenséget.

A DNS-tartalom és a C-érték paradoxon

Nagy valószínűséggel megjósolható, hogy a fejlettebb szervezeteknek, mint például a gerinceseknek, több génre van szükségük, mint az alacsonyabb rendűeknek, köztük az élesztőnek. Így **C-értékük**, azaz a haploid sejtjeik DNS-tartalma, magasabb kell hogy legyen.

Általánosságban ez a becslés meg is felel a valóságnak, az egér és az ember haploid sejtjei több mint százszor annyi DNS-t tartalmaznak, mint az élesztő haploid sejtjei. Továbbá, az élesztősejt C-értéke mintegy ötszöröse az *E. coli* sejtjének. De egy szervezet fejlettsége, és sejtjeinek DNS-tartalma között, nem ilyen egyszerű az összefüggés. Vegyük például a békákat. Semmi okunk nincs annak feltételezésére, hogy egy kétlétű C-értéke magasabb az emberénél, de a valóságban a békák haploid sejtjei hétszer több DNS-t tartalmaznak. Még megdöbbentőbb, hogy a lilium DNS-tartalma százszorosa az emberének.

Ez a rejtélyes jelenség a **C-érték paradoxon**. A magyarázat még nehezebb, ha azonos rokonsági körbe tartozó szervezetekről van szó. Így például vannak olyan kétlétűfajok, amelyek C-értéke százszorosa másokénak, a virágos növények C-értéke pedig még szélesebb határok között változik. Azt jelenti ez, hogy az egyik magasabb rendű növény százszor annyi génnel rendelkezik, mint egy másik? Ez

egyszerűen hihetetlen. Kézenfekvő az a kérdés, mi célt szolgál ez a géntöbblet, ha nincsenek lényeges különbségek a két szervezet felépítésében és működésében? A C-érték paradoxon legelfogadhatóbb magyarázata az, hogy a rendkívüli magas DNS-tartalmú szervezetekben nagy mennyiségű extra, nem-kódoló DNS van. A nem-kódoló DNS funkciója – ha van egyáltalán – ma még ismeretlen.

Tulajdonképpen még az emlősöknek is jóval több DNS-ük van, mint az génjeikhez szükséges. Azt az egyszerű szabályt alkalmazva, hogy a bázispárok számát 1200-zal osztva megkapjuk a gének számát, az emberi genom génjeinek száma közel kétmilliónak adódik, és ez az érték túlságosan magas. Ha valóban ennyi géntünk lenne, nem élnénk túl azt a nagyszámú mutációt, amely felléphetne.

Ha viszont nem használható a C-érték egy magasabb rendű szervezet génszámának elfogadható becsléséhez, mit tehetünk? Az egyik megközelítés, ha meghatározzuk egy emlőssejtben a különböző mRNS-ek számát, ami 10 000 körüli érték. Természetesen az emlősöknek száznál is több különböző sejtje van, de mindegyik termel sok közös mRNS-t. Tehát nem szorozhatjuk egyszerűen a 10 000-et a 100-zal. Valójában az átfedés a különböző emlőssejt genjei között olyan nagyfokú, hogy a 10 000-et egy tíznél kisebb számmal kell csak megszorozni. Ily módon az emlősök génszámának felső határa 100 000 körül van. Ebből következik, hogy egy emberi sejt közel hússzor annyi DNS-t tartalmaz, mint amennyi szükséges lenne a 100 000 fehérje kódolásához. Az extra DNS legnagyobb része az eukarióta gének beágyazódó szekvenciáiban található (9. fejezet), a maradék pedig a géneken kívül, főként a közepes mértékben ismétlődő szekvenciákban, illetve a nagymértékben ismétlődő szakaszokban, amelyeket a C_{11} vizsgálatokkal kimutattak.

A sejtekben, illetve egy vírusban található gének száma és a DNS-tartalom között csak hozzávetőleges összefüggés tapasztalható. Sok azonos rokonsági körbe tartozó szervezet C-értéke, azaz haploid sejtjeinek DNS-tartalma, tág határok között változik. Ezt a C-érték paradoxont valószínűleg nem géntöbblet, hanem a nem-kódoló extra DNS indokolja.

A GÉNEK MŰKÖDÉSE

Egy gén működése három formában nyilvánulhat meg:

(1) A gén replikálódhat. Ez a megkettőződés nagyon pontos, így a genetikai információ változatlanul kerülhet át egyik nemzedékről a másikra. A replikáció folyamatát a 7. fejezetben tekintjük át.

(2) A gén a genetikai információ hordozója. A gének az élet egyik kulcsfontosságú molekulájának, az RNS-nek a szintéziséhez szükséges információt tartalmazzák. Bázissorrendjük közvetlenül meghatározza az RNS bázissorrendjét. A legtöbb RNS pedig mintául szolgál az ugyancsak alapvető fontosságú fehérjék szintéziséhez. A DNS tehát a **génexpresszió** (génkifejeződés) során fehérjék termelődését irányítja. A folyamatot a 8–10. fejezetben részletezzük.

(3) A génben esetenként változások, mutációk következhetnek be, ami lehetővé teszi az élőlények változását, az evolúciót. A folyamat a 11. fejezet témája.

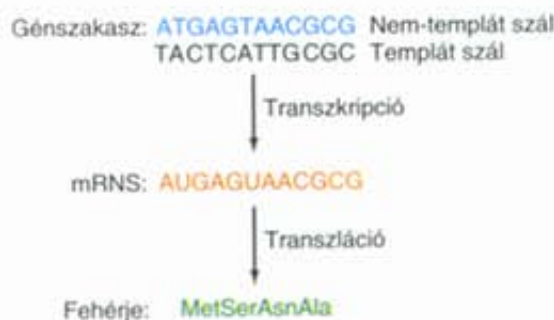
A következő öt fejezetben részletesen ismertetjük, hogy a DNS Watson–Crick-féle modellje alapján, miként értelmezhető a gén működése. Ez az, amiért a kettőshélix-modell kidolgozása, az egyik legfontosabb mérföldköve a biológia történetének.

A GÉNEXRESSZIÓ VÁZLATOS ÁTTEKINTÉSE

Két részből áll az a folyamat, amelynek során egy DNS-gén információja alapján fehérje képződik. Az első lépés egy RNS szintézise, méghozzá olyané, amelynek bázissorrendje a gén egyik szálának komplementere. Ez a folyamat az **átírás** vagy **transzkripció**. A második lépés a **transzláció**, amikor az RNS információjának felhasználásával elkészül a fehérje. Minthogy a folyamatban az RNS is információt hordoz, mégpedig úgy, hogy közvetíti az információt a géntől a sejt fehérjeszintetizáló rendszeréhez – mint egy küldönc az üzenetet –, ezért a **hírvívő** vagy **messenger RNS**, röviden **mRNS** nevet kapta.

A DNS-hez és az RNS-hez hasonlóan a fehérjék is polimerek, hosszú, láncszerű molekulák. Építőköveik, monomereik az aminosavak. A DNS és a fehérje között a következő megfeleltetés érvényes: a gén három nukleotidja jelent egy aminosavat a fehérjében.

A 6.27. ábra összegzi a génexpresszió folyamatának lényegét, és ismerteti a DNS-szálakra használt elnevezéseket. Figyeljük meg, hogy az mRNS-nek ugyanolyan a bázissorrendje, mint a DNS felső szálának (kék), eltekintve attól, hogy a T helyén U áll. Minthogy az mRNS közvetlenül adja a fehérje szintéziséhez az információt, azt is mondjuk, hogy kódolja a fehérjét. A bemutatott esetben az mRNS az alábbi peptidet kódolja: metionin-szerin-aszparagin-alanin, rövidítve Met-Ser-Asn-Ala. Láthatjuk, hogy az mRNS-ben a metionin kódszava, másként



6.27. ábra. A génexpresszió vázlata. Az első lépésben, a transzkripció során, a templát szál (fekete) íródik át mRNS-re. Figyeljük meg, hogy a DNS nem-templát szálának (kék) ugyanolyan a szekvenciája, mint az mRNS-é (piros), de a timin helyén uracilt tartalmaz. A második lépés az mRNS lefordítása, transzlációja fehérjére (zöld). Ez a génszakasz csak tizenkét bázispárnyi hosszúságú, és négy aminosavból álló tetrapeptidet kódol

kodonja az AUG bázishármas, a szeriné az AGU, az aszparaginé az AAC és az alaniné a GCG. Mivel az alsó DNS-szál komplementere az mRNS-nek, mintaként (templát) szolgál annak szintéziséhez. Ezért ezt a DNS-szálat hívjuk **templát szálnak**, illetve **értelmes szálnak**. Ugyanilyen érveléssel a felső szál az át nem íródó **nem-templát szál**, ún. **néma szál**. (Minthogy az ábrán a felső szál ugyanolyan kódsorozatú, mint az mRNS, sokan kódoló szálnak nevezik, míg a másikat antikódonnak. Mivel a felső szál biológiai értelme megegyezik az mRNS-ével, „sense” – értelmes szálként, az alsót pedig „antisense” – értelmetlen szálként is említik. De – így a hazai szakirodalomban is – sokszor pontosan fordított értelemben használják mind a két-féle elnevezést!) A továbbiakban a vastagon szedett kifejezéseket használjuk a két szál elkülönítésére.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

A P1 fág DNS-e kétfonális, 91 500 bázispárral (91,5 kb).

- (a) Hozzávetőlegesen hány teljes csavarulatot tartalmaz a kettős hélix?
 (b) Milyen hosszú ez a DNS mikronokban megadva? ($1\mu\text{m} = 10^3 \text{ \AA}$ vagy 10^{-6} m)
 (c) Mennyi a becsült relatív molekulatömege?
 (d) Hozzávetőleg hány foszforatomot tartalmaz?

MEGOLDÁS

(a) Egy teljes csavarulatra a B-formában 10,5 bázispár esik, amit az egyszerűség kedvéért vegyünk 10-nek. Tehát ezzel kell osztanunk a bázispárok számát:

$$91\,500 \text{ bp} \times 1 \text{ csavarulat}/10 \text{ bp} = 9150 \text{ csavarulat.}$$

(b) Két bázispár közötti távolság a B-formában mintegy $3,4 \text{ \AA}$, másképp $3,4 \times 10^{-4} \mu\text{m}$, tehát ezzel az értékkel kell szorozni a bázispárok számát:

$$91\,500 \text{ bp} \times 3,4 \times 10^{-4} \mu\text{m}/\text{bp} = 31,11 \mu\text{m}$$

(c) Egy nukleotidpár átlagos relatív móltömege 660, ezért:

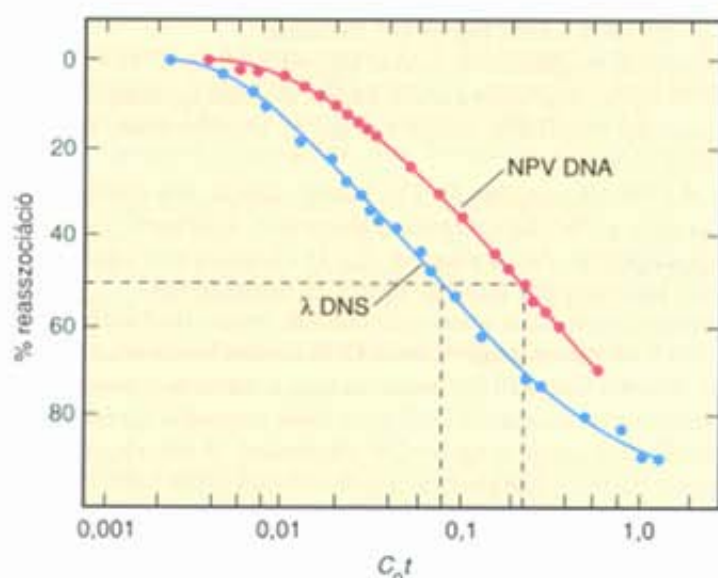
$$91\,500 \text{ bp} \times 660/\text{bp} = 6,04 \times 10^7$$

(d) Minden nukleotidegységben egy foszforatom van, így bázispáronként 2. Ebből

$$91\,500 \text{ bp} \times 2 \text{ foszforatom}/\text{bp} = 183\,000$$

2. FELADAT

A 6.28 ábrán két különböző eredetű DNS C_{λ} görbéje látható. A kék görbe (bal oldali) a λ fág DNS-ének renaturációját ábrázolja, a piros pedig (jobbra) a hemyókat fertőző egyik baculovirus (polihedrózis vírus) DNS-ét. (a) Mennyi a két DNS C_{λ} értéke? (b) Legyen a λ fág DNS-e 50 kb méretű, és tétélezzük fel, hogy egyik DNS sem tartalmaz repetitív szekvenciákat, emellett GC-tartalmuk is egyforma. Mekkora lehet a baculovirus DNS-ének mérete?



6.28. ábra. A nukleáris polihedrózis vírus (NPV) DNS-ének (piros) és a λ fág DNS-ének (kék) C_{ot} görbéi. A két DNS renaturálódását a 260 nm-en mért abszorpció csökkenésével mérjük

MEGOLDÁS

(a) A $C_{ot/2}$ az az érték, ahol a DNS fele mennyisége renaturálódott. A görbén úgy találjuk meg ezt a pontot, ha az y tengely 50%-os értékétől kiindulva húzunk egy párhuzamost az x tengellyel (6.28. ábra). Az egyenes és a görbe metszéspontjából merőlegest húzunk az x tengelyre, és leolvassuk a megfelelő $C_{ot/2}$ értéket. A két adott DNS-re: 0,08 (λ fág), 0,22 (baculovírus). Megjegyzés: az x tengely logaritmikus skála, a 0,01 és 0,1 értékek közötti beosztások 0,02; 0,04; 0,06 és 0,08-nak felelnek meg. Mivel a baculovírus DNS-ének $C_{ot/2}$ értéke nem esik pontosan egyik beosztásra sem, interpolálással becsüljük meg.

(b) Amennyiben a két DNS nem tartalmaz repetitív szekvenciákat, és nincs eltérés GC-tartalmukban sem, akkor méretük egyszerűen $C_{ot/2}$ értékükkel arányos. Mivel ismerjük az egyik DNS (λ) méretét, a másikat egyszerűen kiszámíthatjuk, ha a megadott értéket megszorozzuk a $C_{ot/2}$ értékek hányadosával:

A baculovírus DNS-ének mérete:

$$= \frac{0,22}{0,08} \times 50 \text{ kb} \\ = 137,5 \text{ kb}$$

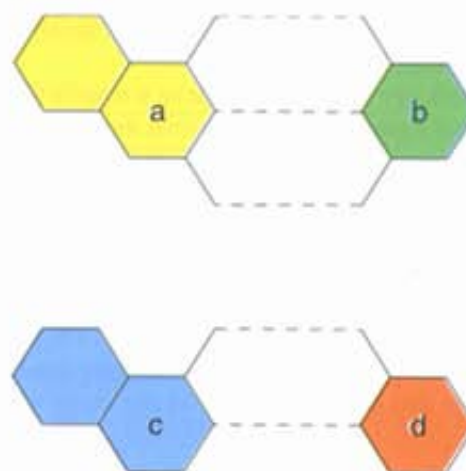
A baculovírus DNS-ének mérete ténylegesen 130 kb, így a számított érték jó becslésnek számít. Az eltérés legnagyobb részét a két DNS GC-tartalma közötti különbségre vezethető vissza.

3. FELADAT

Az ábrán két DNS-bázispár vázlata szerepel, a bázisokat a, b, c és d jelöli. A valóságban mely bázisok ezek?

MEGOLDÁS

Az a bázis purinvázis (egy hat- és egy öttagú gyűrűvel), így adenin (A) vagy guanin (G) lehet. Mivel három H-kötéssel kapcsolódik



a komplementer bázishoz, és tudjuk, hogy a G-C párban három, az A-T párban csak kettő H-kötés van, ez a bázis csak guanin lehet. A párja, b citozin (C). A c bázis purinvázis és két H-kötéssel kapcsolódik párjához. Így a c az adenin (A), a d pedig a timin (T).

4. FELADAT

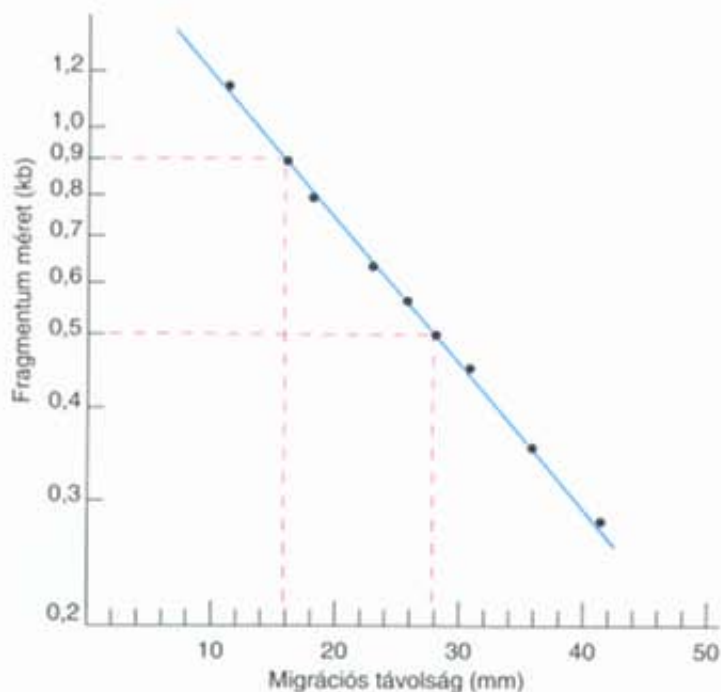
Az alábbi grafikon kétfonalas DNS (0,2 kb és 1,2 kb méretű) elektroforézisének eredményét mutatja. Magyarázza meg a következőket a grafikon alapján:

(a) Mekkora az a fragmentum, amelyik 16 mm-re vándorolt az elektroforézis során?

(b) Milyen messze vándorolna a kísérlet során egy 0,5 kb méretű fragmentum?

MEGOLDÁS

(a) Húzzunk az x tengely 16 mm-es pontjától egy függőleges vonalat a görbéig, majd a metszéspontból húzzunk egy vízszintes vonalat az y tengelyhez. Ez az egyenes 0,9 kb (900 bp) értéknél metszi az y



tengelyt. Ez azt jelenti, hogy az a fragmentum, amelyik 16 mm távolságot tesz meg, 0,9 kb méretű.

(b) Húzzunk egy vízszintes vonalat az y tengely 0,5 kb pontjától a görbéig. Abból a pontból, ahol ez a vonal metszi a görbét, bocsássunk merőlegest az x tengelyre. Az egyenes 28 mm-nél metszi az x tengelyt, vagyis a 0,5 kb méretű fragmentum ilyen távolságot tesz meg az elektroforézis során.

5. FELADAT

A 6.4. táblázatból leolvashatjuk, hogy a T2 és a T4 fágok genomjának mérete 2×10^5 bázispár. Hány átlagos méretű gént tartalmazhatnak? (Egy átlagos gén által kódolt fehérje molekulatömege 40 000.)

MEGOLDÁS

Egy aminosav átlagos molekulatömege 100, így a 40 000-es molekulatömegű fehérjében körülbelül 400 aminosav lehet. Egy aminosavat három bázispár kódol, tehát a fehérjét mintegy 1200. Ennek alapján a 2×10^5 bázispár $2 \times 10^5 / 1,2 \times 10^3 = 1,67 \times 10^2 = 167$ gént hordozhat.

6. FELADAT

Egy DNS templát szála a következő:



(a) Írja fel a DNS kétfonális szerkezetét!

(b) Feltételezzük, hogy a transzkripció az első nukleotidnál kezdődik, és az utolsónál végződik. Írjuk fel a transzkriptum bázissorrendjét hagyományos módon, $5' \rightarrow 3'$ irányban, balról jobbra haladva.

MEGOLDÁS

(a) A Watson-Crick bázispárosodás szabálya alapján, és tekintettel arra, hogy a szálak antiparalelek, a kétszálás forma, felülre írva a templát szálát:



(b) Mivel az RNS bázissorrendjét $5' \rightarrow 3'$ irányban szokás felírni, és a nem-templát DNS-szál, amely az RNS-transzkriptumra hasonlít, itt az ellenkező irányban van felírva, segít, ha a DNS megfordításával kezdjük:



Ahol a nem-templát szál van alul. Tudjuk, hogy egy gén transzkriptumának szekvenciája és orientációja megegyezik a nem-templát szálával, de a timint uracil helyettesíti, ezért:



fü, a bázispárok a hélix belseje felé fordulnak.

A bázispárok meghatározott módon kapcsolódnak: A-T, G-C. A DNS replikációja során a szülői fonalak elválnak egymástól, és mindkét szál templátként szolgál egy-egy új, komplementer fonal kialakulásához.

A DNS GC-tartalma 22–73% között változik, ami erőteljesen befolyásolja a DNS fizikokémiai tulajdonságait, különösen az olvadáspontját. Az olvadáspont (T_m) az a hőmérséklet, amelyen a DNS két fonala fele arányban disszociál, denaturálódik. A denaturálódott szálak reasszociálódhatnak, renaturálódhatnak. A többi feltétel azonossága esetén a DNS kezdeti koncentrációjának és az időnek a szorzata (C_0t) határozza meg a renaturáció mértékét. A bonyolultabb összetételű DNS-molekulák magasabb C_0t értéknél renaturálódnak, mint az egyszerűbb felépítésűek. A különböző forrásból származó komplementer polinukleotid-szálak (akár DNS, akár RNS) a hibridizáció során kettős hélixet képezhetnek. A természetes DNS-molekulák hossza igen változatos. A DNS mérete többféle módszerrel megbecsülhető, beleértve az elektronmikroszkópos és a gélelektroforetikus eljárásokat is.

A génműködésnek alapvetően három módja van: (1) replikáció, (2) információátvitel, (3) mutációs változások felhalmozása. A DNS-ben tárolt információ a legtöbb DNS-gén esetén két lépésben nyilvánul meg: (1) transzkripció, az mRNS szintézise, (2) transláció vagy fehérjeszintézis az mRNS információjának felhasználásával.

Egy sejt vagy egy vírus géneinek száma és DNS-tartalma között nincs pontos összefüggés. Azonos rokonsági körbe tartozó szervezetek haploid sejtjének DNS-tartalma (C-érték) is lehet nagyon eltérő. Ennek az ún. C-érték paradoxonnak magyarázata lehet az egyes fajokban előforduló, nagy mennyiségű, nem-kódoló DNS. Ebbe tartozik a C_0t analízissel kimutatott repetitív DNS legnagyobb része.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Griffith kísérleteiben mi utalt arra, hogy a transzformáló anyag valójában egy gén vagy gének?
- Melyik kísérleti megközelítés mutatja ki egyértelműbben, hogy a DNS az örökítő anyag. Avery és kollégáinak kísérlete vagy a Hershey-Chase-kísérlet? Miért?
- A ^{14}C és a 3H alkalmas radioaktív jelölés lett volna a Hershey-Chase-kísérletben? Indokolja választát!
- Ha egy kétfonális DNS egyik szálának szekvenciája $5'-AGCATTTCG-3'$, mi a komplementer szála, $5' \rightarrow 3'$, illetve $3' \rightarrow 5'$ irányban?
- Egy kétfonális DNS egyik szála: ATGTCCAGTCG. Írja fel a kétfonális molekula szekvenciáját!
- A szarvasmarha DNS-ének adenintartalma 30%, a guanintartalma 20%. Mekkora a másik két bázis aránya?
- Egy állati vírusnak cirkuláris kétfonális DNS-e van (végig B-forma), 120 000 bázispárral. (a) Hozzávetőleg hány teljes csavarulata van ennek a DNS-nek? (b) Milyen hosszú ez a DNS μm -ben ($1 \mu m = 10^4 \text{ \AA}$)? (c) Mekkora az átlagos relatív molekulatömeg? Hány foszforatomot tartalmaz?

ÖSSZEFOGLALÁS

Az élő szervezetek génjeit DNS építi fel, de egyes vírusok és viroidok génjei RNS-ből állnak. A DNS és RNS polimer molekulák nukleotidegységekből épülnek fel. A DNS a legtöbb genetikai rendszerben kettős hélix, melynek külső oldalán cukor-foszfát gerinc

8. A 6.19. ábrán látható, hogy az *E. coli* DNS-ének $C_{0,t_{1/2}}$ értéke 8 körüli érték. A 6.4. tábla alapján 4,2 millió bázispárt tartalmaz. Egy képzeletbeli bakteriofág DNS-ének $C_{0,t_{1/2}}$ értéke 0,04. Feltételezzük, hogy egyik DNS sem tartalmaz ismétlődő szekvenciákat és GC-tartalmuk is megegyezik, hány bázispár van a fág DNS-ben?
9. Van egy képzeletbeli baktérium és annak egy fágja. A baktérium DNS-e 10^7 bázispár, a fágé 5×10^5 bp hosszú. A bakteriális DNS $C_{0,t_{1/2}}$ értéke 40. Mekkora lehet a fágé, ha feltételezzük, hogy a GC-tartalom ugyanannyi, és nincs ismétlődő szekvencia?
10. A 6.25. ábrán bemutatott kísérleti rendszerben egy DNS-fragmentum elektroforetikus mobilitása 30 mm. Mekkora a mérete bázispárookban?
11. Griffith transzformációs eredményeinek egyik lehetséges magyarázata volt, hogy az avirulens (R) baktériumok valahogy „életre keltették” az elhalt, virulens (S) sejteket. Hogyan zárták ki Avery és munkatársainak kísérletei ezt a valószínűtlen lehetőséget?
12. A T3 fág DNS-ének GC-tartalma 53%. Mekkora lesz a GC-tartalma a fág mRNS-ének? Miért?
13. Ismeri a T3 fág DNS-ének purintartalmát, de nem tudja, melyik szála íródik át, meg tudja mondani az mRNS purintartalmát? Indokolja a választ!
14. Alább látható egy éppen átíródó kétfonális DNS sematikus ábrája:
1. _____
 2. _____
 3. ----->
- Az 1. szál a nem-templát szál, a 3. szál az egyfonális mRNS.
 (a) Jelölje be az mRNS 5' és 3' végét! (b) Jelölje be a nem-templát szál 5' és 3' végét! (c) Jelölje be a templát szál 5' és 3' végét!
15. Az alábbi egy DNS templát szála:
- 5'-GTCAATCGTAGCGGCCATAT-3'
- (a) Írja fel a kétfonális formát! (b) Feltételezzük, hogy az átírás az első nukleotidnál kezdődik, és az utolsónál végződik. Adja meg a transzkriptum szekvenciáját a hagyományos 5' → 3' felirással!
16. Egy állati vírus kétfonális gyűrű alakú, cirkuláris DNS-e 120 000 bázispár. Hány átlagos méretű (400 aminosavból álló) fehérjét kódolhat a vírus?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

7.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A DNS megkettződésének, replikációjának mechanizmusa.
- 2 A DNS replikációjában szereplő enzimek.
- 3 A gének pontos replikációját biztosító mechanizmusok.
- 4 Az RNS-genomok replikációjának különböző módjai.
- 5 A DNS-molekulák rekombinációja crossing overrel.
- 6 A crossing over egy DNS-szekvencia másik szekvenciává történő konverziójához vezethet.

A gének replikációja és rekombinációja

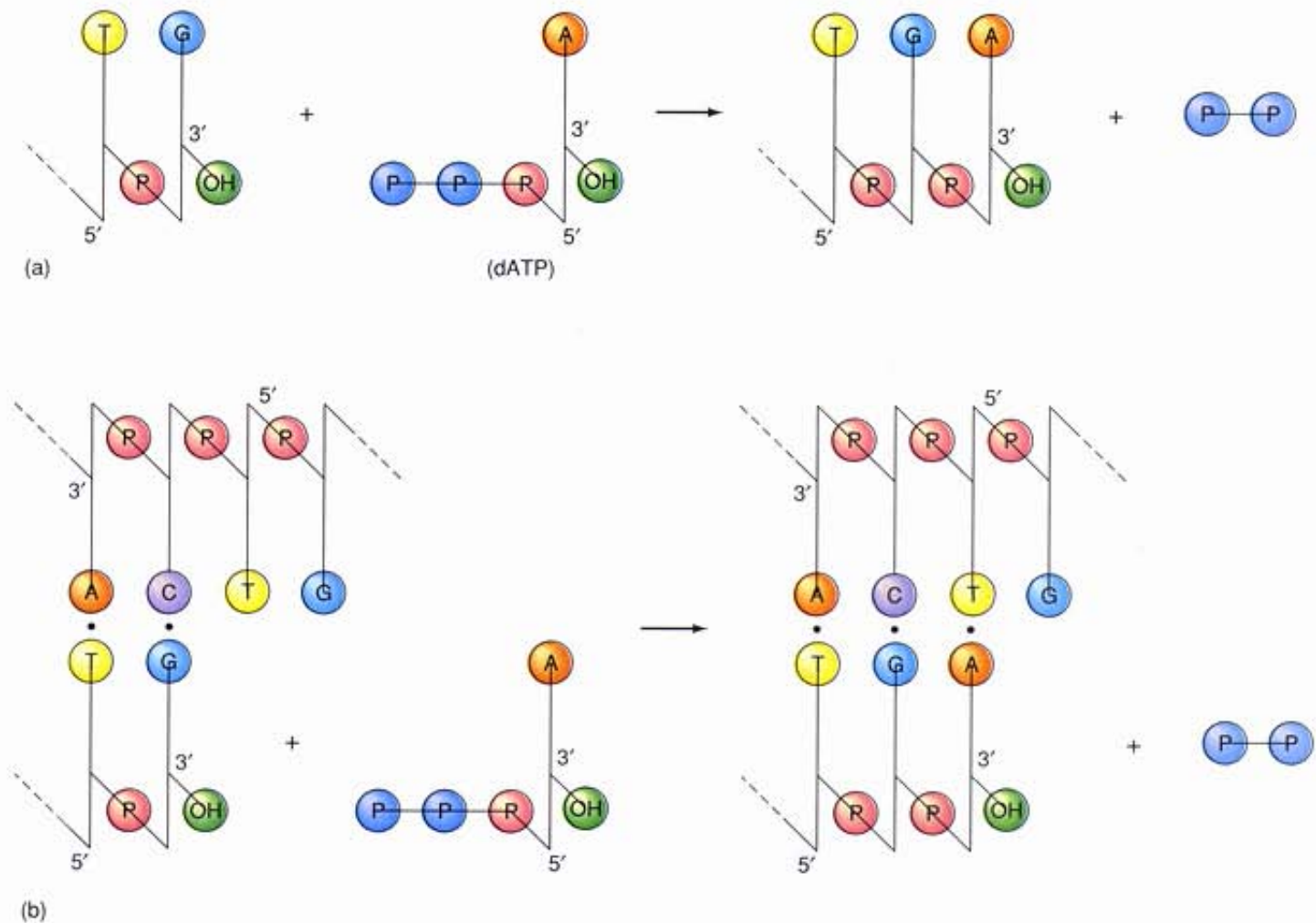
A bonyolult dolgokhoz hosszú időre van szükség, a lehetetlenekhez valamivel többre.

Chaim Weizmann
izraeli vegyész

Az előző fejezetben megismertük, hogy a DNS-kettős hélixben a két polinukleotid-lánc komplementer egymással, azaz adeninnel szemben timin, guaninnal szemben citozin áll. Ez a komplementaritás teszi lehetővé a DNS replikációját, más szóval megkettőződését. A szülői szál adeninjével szemben timin, guaninjával szemben pedig citozin épül be az újonnan szintetizálódó szálba. Ez a folyamat az élet alapja, ez biztosítja, hogy az örökítő anyag lényegében változatlanul jusson át egyik generációból a másikba. Ebben a fejezetben bemutatjuk a replikáció molekuláris mechanizmusát, valamint körvonalazzuk a rekombinációt eredményező crossing over folyamatát, ami gyakran összefügg a replikációval.

A DNS-SZINTÉZIS ALAPVETŐ MECHANIZMUSA

Mielőtt belekezdenénk a DNS-replikáció részletes tárgyalásába, tekintsük át, miként kapcsolódnak a nukleotidok DNS-molekulává (7.1. ábra). Az ábrán a 6. fejezetben ismertett egyszerűsített jelölést használjuk. A DNS-szál növekedő végétől indulunk ki, és az építőkövek egyikét, a dATP-t (7.1.(a) ábra) kapcsoljuk a lánc szabad végéhez foszfodiészter-kötéssel. A 7.1(b) ábrán ugyanez a folyamat látható, de feltüntetjük a templát DNS-szálat is, így látjuk a bázispárképzést az újonnan beépült adenin és a szülői szálon található timin között.



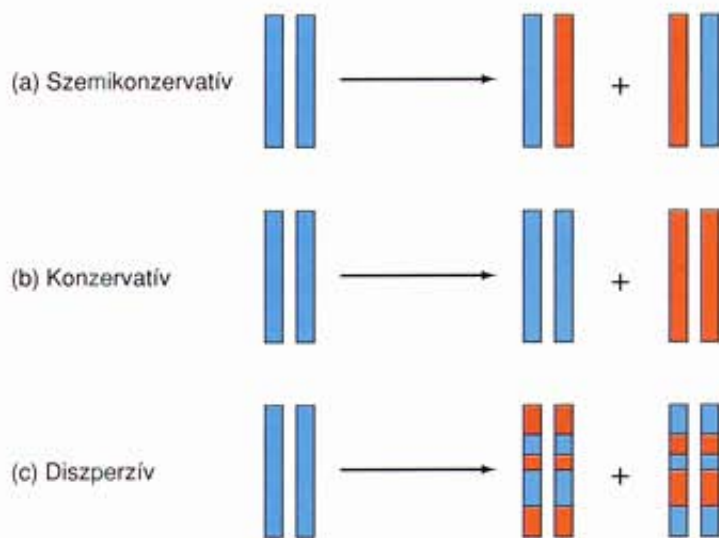
7.1. ábra. DNS-szál szintézise. (a) A foszfodiészter-kötés kialakulása. Bal oldalon látható a növekvő DNS-szál, amely TG-bázisokkal és 3'-hidroxilcsoporttal (zöld) végződik. Középen helyezkedik el a következő beépítésre kerülő nukleotid, a dATP. Jobb oldalon, a nyíl túlsó oldalán szerepelnek a reakció termékei: a növekvő szál, amelyhez foszfodiészter-kötéssel (piros) kapcsolódott az adenintartalmú nukleotid, valamint a reakció mellékterméke a P-P-vel jelzett pirofoszfát (kék). (b) Ugyanez a reakció, de a szintézishez mintaként szolgáló szál feltüntetésével. Itt is látszik a kiépülő foszfodiészter-kötés, valamint a templát timinjével bázispárt kialakító adenin

SZEMIKONZERVATÍV REPLIKÁCIÓ

A DNS-replikáció Watson–Crick-modellje (6. fejezet) feltételezte, hogy az új DNS-szálak a bázispárosodás szabályait követik, azaz A-T, G-C bázispárok alakulnak ki. Ez lényeges, hiszen a replikációs rendszernek képesnek kell lennie a legjobb illeszkedést biztosító Watson–Crick-bázispárok, valamint a hibás bázispárok megkülönböztetésére. A modell azt is feltételezte, hogy a két szülői szál elválik egymástól, és mindkettő mintaként szolgál egy-egy új szál szintéziséhez. Ez a megkettőződés az ún. **szemikonzervatív** replikáció, mert az utódmolekulák egyik szála régi, a másik pedig új (7.2.(a) ábra). Vagyis mindegyik utódmolekulában megőrződik egy-egy szülői szál. De a megkettőződésnek nemcsak ez az egyetlen elképzelhető módja. A **konzervatív** replikáció (7.2.(b) ábra) során a két szülői szál együtt maradna, és az utódmolekula kettős hélice két teljesen új szálból épülne fel. A következő lehetőség az ún. **diszperzív** replikáció, amelyben a DNS-szálak fragmentálódnak, és a replikáció után az utódmolekulák mindkét szálában új és régi szakaszok váltakoznak (7.2.(c) ábra). A legésszerűbbnek a szemikonzervatív változat tűnik, mert kihasználja a DNS két szálának komplementaritását, az elvált szülői szálak mintaként szolgálnak az új szálak felépítéséhez. Mint azt rövidesen látjuk, a kísérleti eredmények is ezt a mechanizmust támasztották alá.

SZEMIDISZKONTINUUS REPLIKÁCIÓ

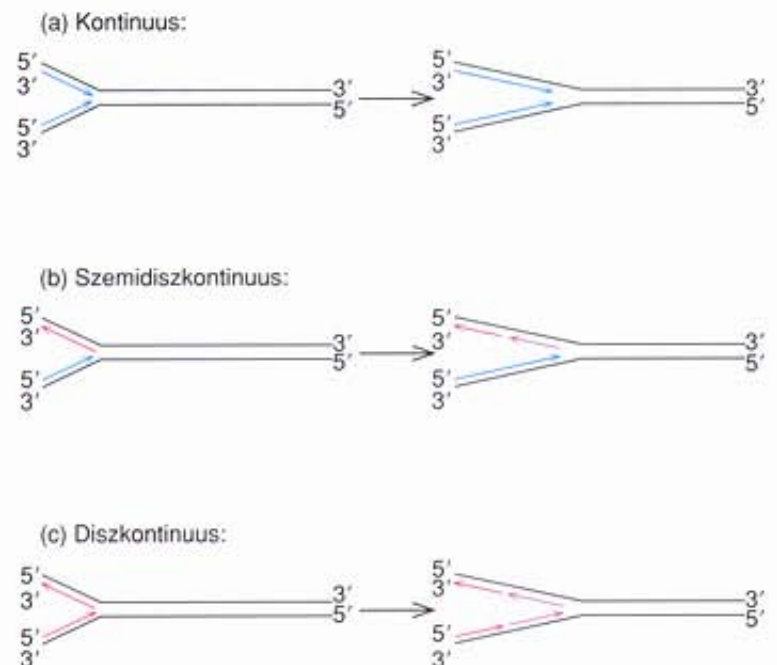
Ha az lenne a feladatunk, hogy tervezzünk egy szerkezetet a DNS-replikációhoz, olyan megoldást ajánlanánk, mint amilyen a 7.3.(a) ábrán látható. A DNS megkettőződése mindkét fonál mellett folyamatosan, ugyanabba az irányba történne, egy szétnyíló villához hasonlóan. Ezzel az elképzeléssel szemben van egy



7.2. ábra. Három hipotézis a DNS-replikáció mechanizmusára. (a) Szemikonzervatív replikáció esetén (lásd a 6.15. ábrát is) mindkét utódmolekula egy régi (kék) és egy új (piros) fonálból áll. (b) Konzervatív replikáció, amikor a két utódmolekula közül az egyik két régi (kék), a másik két új (piros) szál tartalmaz. (c) Diszperzív replikáció eredményeként az utódmolekulák mindkét szála régi és új fonalak keverékéből áll

komoly ellenvetés, ugyanis azt feltételezi, hogy a replikációs mechanizmus mind $5' \rightarrow 3'$, mind $5' \rightarrow 3'$ irányban képes DNS-t szintetizálni. Ez a DNS-szálak antiparalel (l. 6. fejezet) lefutása miatt szükséges. De minden, a természetben előforduló replikációs rendszer DNS-szintézist irányító enzime, a **DNS-polimeráz**, csak $5' \rightarrow 3'$ irányba tud haladni. Vagyis elsőként az $5'$ -végen lévő nukleotidot építi be, majd $3'$ irányban folytatja a láncot.

Ezt a gondolatmenetet követve jutott Reiji Okazaki arra a következtetésre, hogy egyszerre mindkét szál nem replikálódhat folyamatosan. Elméletileg a DNS-polimeráz az egyik szálát, a **vezető szálát** (leading strand) folyamatosan szintetizálhatja $5' \rightarrow 3'$ irányban, de a másik, a **követő** vagy **késlekedő szálát** (lagging strand), csak szakaszosan, **diszkontinuusan** tudja építeni, hogy az $5' \rightarrow 3'$ irány kialakuljon, ahogyan az a 7.3.(b) és 7.3.(c) ábrákon látható. A követő szál szintézisének szakaszossága abból következik, hogy a szintézis iránya ott ellentétes a replikációs villa mozgásának irányával. Ezért, amint a villa szétnyílik, és egy új DNS-szakasz kerülhet replikációra, a követő szál csak az ellenkező irányból, a villától távolodva szintetizálódhat. A követő szál szintézise éppen ezért a villánál, a már meglévő szakasz mögött egy új pontból indul. A DNS-szintézis újratekzdése a követő szálon szakasról szakaszra ismétlődik. A keletkező rövid DNS-darabok természetesen össze-



7.3. ábra. A DNS-replikáció kontinuus, szemidiszkontinuus és diszkontinuus modelljei. (a) Kontinuus modell. A replikációs villa szétnyílásával mindkét fonál folyamatosan megkettőződik ugyanabban az irányban (kék nyilak). A felső szál $5' \rightarrow 3'$ irányban, az alsó szál $5' \rightarrow 3'$ irányban növekszik. (b) Szemidiszkontinuus modell. Az egyik új fonál (az ún. vezető fonál) szintézise folyamatos (alsó, kék nyíl); a másik fonálé (az ún. késlekedő szál, a felső piros) szakaszos, a DNS rövid darabokban készül. Mindkét szál szintézise $5' \rightarrow 3'$ irányú. (c) Diszkontinuus modell. Mind a vezető, mind a késlekedő szál rövid szakaszokban szintetizálódik (piros nyilak), $5' \rightarrow 3'$ irányban. A valódi replikáció a szemidiszkontinuus változat (b) szerint történik

kapcsolódnak, a replikáció végeredménye folyamatos szál. Összefoglalva az eddigieket: Okazaki helyesen feltételezte, hogy a DNS-szintézis **szemidiszkontinuus**, azaz a vezető szál folyamatosan, a követő szál pedig szakaszosan, diszkontinuusan szintetizálódik.

A DNS-SZINTÉZIS KEZDŐ LÉPÉSE

Az RNS szintézisét, azaz a transzkripciót irányító enzim az RNS-polimeráz, amely az átírást egyszerűen egy új RNS-szál kialakításával indítja el: beépíti az első nukleotidot, majd hozzákapcsolja a következőt. Ezért meglepő volt, amikor kiderült, hogy a DNS-polimeráz nem képes hasonló műveletre a DNS-szintézis iniciációjánál. Ha a DNS-polimeráznak rendelkezésére áll az összes nukleotid és más kisebb, a replikációhoz szükséges molekula, emellett van a rendszerben egy- vagy kétfonalas DNS-templát is, az enzim nem szintetizál DNS-t. Mi hiányozhat a rendszerből?

Ma már tudjuk, hogy a hiányzó komponens egy rövid RNS-szakasz, az ún. **primer**, amelynek 3'-végéhez a DNS-polimeráz hozzákapcsolja a további nukleotidokat. A folyamat egyszerűsített vázlatát a 7.4. ábra szemlélteti. Először felnyílik a replikációs villa, elkészül a rövid RNS-primer, ezután a DNS-polimeráz a primerhez kapcsolja a DNS-nukleotidokat (a nyílak a szintézis irányát jelzik).

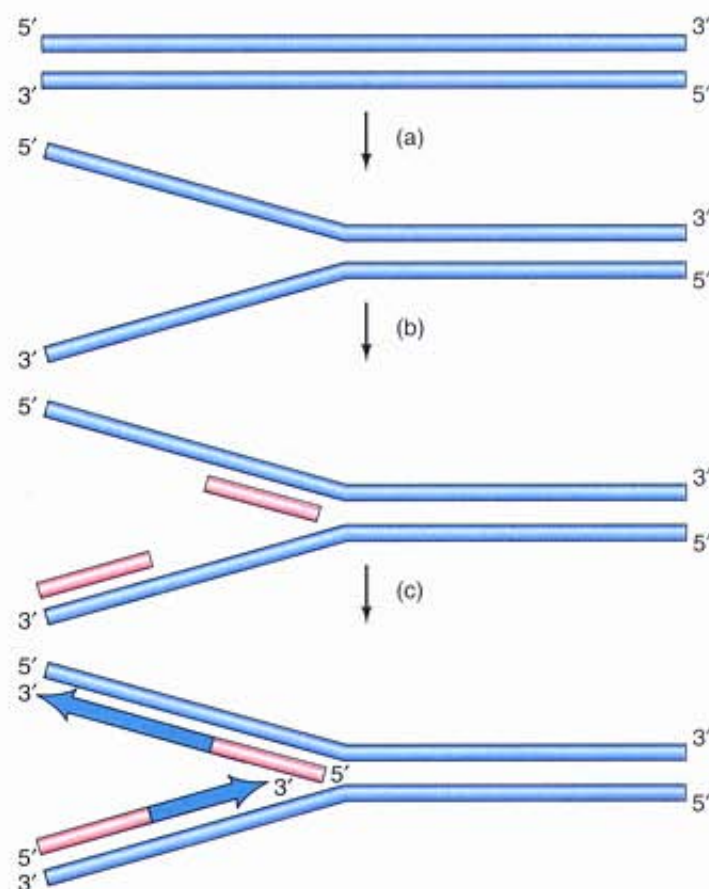
A REPLIKÁCIÓ KÉTIRÁNYÚ

Ahogy már láttuk, a szemikonzervatív replikáció feltétele a két szülői fonál elválása, hogy templátként szolgálhassanak az új fonalak szintéziséhez. A DNS-replikáció sosem kezdődik a fonal alakú molekulák végeinél, ezért a két szál eltávolodása replikációs buborékot alakít ki a molekula középső részén (7.5.(a) ábra). Ezt követően épülhetnek fel az új fonalak, amelyek komplementerei a szétvált szülői fonalaknak. A 7.5.(a) ábrán látható, hogyan helyezkednek el a replikációs buborék belsejében az elkülönült szülői fonalak mellett a rövid új szálak. Figyeljük meg, hogy a replikációs buborékok mindkét vége egy-egy replikációs villa, ahol a replikáció történhet. Történik-e megkettőződés a replikációs buborék mindkét végénél, vagy csak az egyiknél? A 7.5.(b) és 7.5.(c) ábra szemlélteti a két lehetőséget. Ha a DNS-replikáció **egyirányú** (7.5b ábra), csak az egyik villa aktív, és a replikáció távolodik a másik, álló villától. Amennyiben a replikáció **kétirányú** (7.5.(c) ábra), akkor mindkét villa működik, a replikáció távolodik az eredeti kezdőponttól mindkét irányban. A fejezet későbbi részében mind az egyirányú, mind a kétirányú replikációra látunk majd példákat, de a kétirányú replikáció jóval gyakoribb.

A KÜLÖNÁLLÓ DNS-FRAGMENTUMOK ÖSSZEKAPCSOLÁSA

Az ismertett replikációs mechanizmus eredményeként különálló DNS-fragmentumok képződnek a késlekedő szál mentén, amelyeknek össze kell kapcsolódnuk. Az egybefűzés a DNS-ligáz feladata, de az enzim működését még két lépés előzi meg. Először az RNS-primereket el kell távolítani, hogy a véglegesen kialakuló DNS-t ne szakítsák meg kis RNS-szakaszok. Másodszor a primereket helyettesíteni kell DNS-sel.

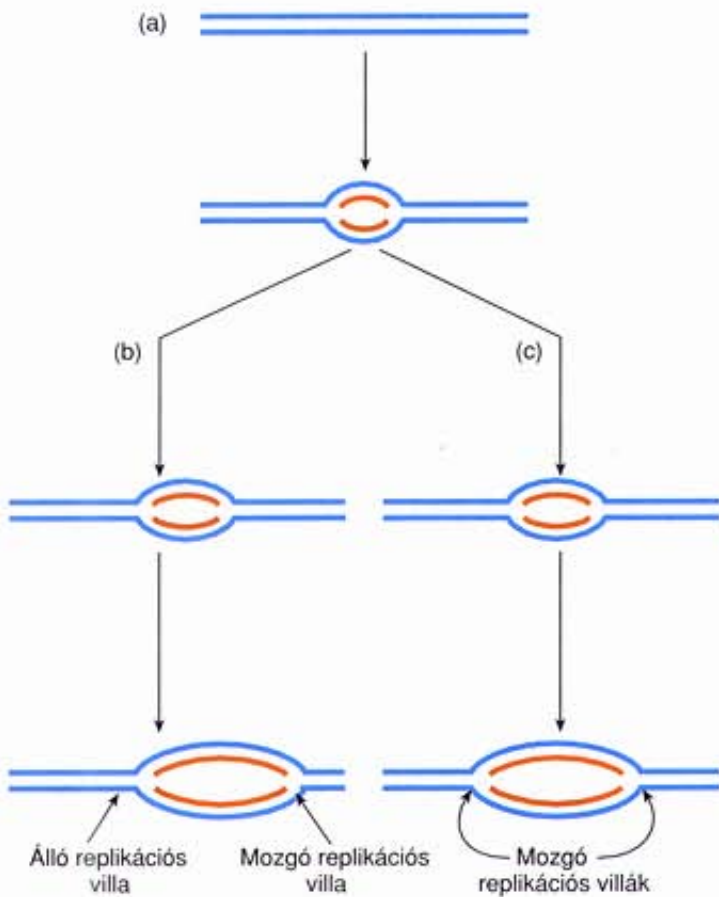
A 7.6. ábra mutatja be, hogyan végzi el mindkét lépést egyetlen enzim az *E. coli* esetében. Ez a multifunkciós enzim a



7.4. ábra. A DNS-szintézis kezdete. (a) A két szülői fonál (kék) elválik egymástól. (b) Rövid kezdő RNS-szakaszok, primerek (piros) szintetizálódnak. (c) A DNS-polimeráz ezeket a primereket használja kezdőpontként az utódfonalak (zöld) szintéziséhez

DNS-polimeráz I, az elsőként felfedezett DNS-t szintetizáló enzim (Arthur Kornberg). A DNS-polimeráz I az $5' \rightarrow 3'$ polimerizációs aktivitás mellett kétféle nukleáz aktivitással is rendelkezik. Egyrészt $5' \rightarrow 3'$, illetve $3' \rightarrow 5'$ irányban lebontja a nukleotidokat. Másrészt $5' \rightarrow 3'$ irányú aktivitásával elbontja az RNS-primert, majd DNS-polimeráz aktivitásával pótolja a hiányzó szakaszt. A kétféle aktivitás összhangban működik, a primer lebontása és a rés bezárása egyidejűleg történik. Ebben a vonatkozásban a DNS-polimeráz egy útjavító gépre hasonlít, amely a régi burkolatot előrehaladtában felszedi, majd lerakja maga mögött az újat. A $3' \rightarrow 5'$ exonukleáz aktivitásnak kulcsfontosságú szerepe van a DNS-replikáció pontosságának biztosításában, amire a későbbiekben még visszatérünk.

Miután a DNS-polimeráz elvégezte feladatát, a 7.6.(c) ábrán látható állapotba jutunk. Minden nukleotid a helyére került, de az újonnan szintetizálódó szálon egy rés, ún. **nick** maradt. Figyeljük meg, hogy a rés tulajdonképpen elmozdult az eredeti, 7.6.(a) ábrán látható pozícióból, a 7.6.(c) ábrán látható helyre. A folyamat, a **nick transláció** a rés elmozdulásáról, áthelyeződéséről kapta nevét. A nick transláció kétfonalas, rést tartalmazó DNS-en RNS-primer hiányában is előfordul. A DNS-polimeráz sokoldalúsága ellenére sem tudja a rést eltüntetni. Ezt a műveletet a **DNS-ligáz** nevű enzim végzi el, amely kialakítja a foszfodiészter-

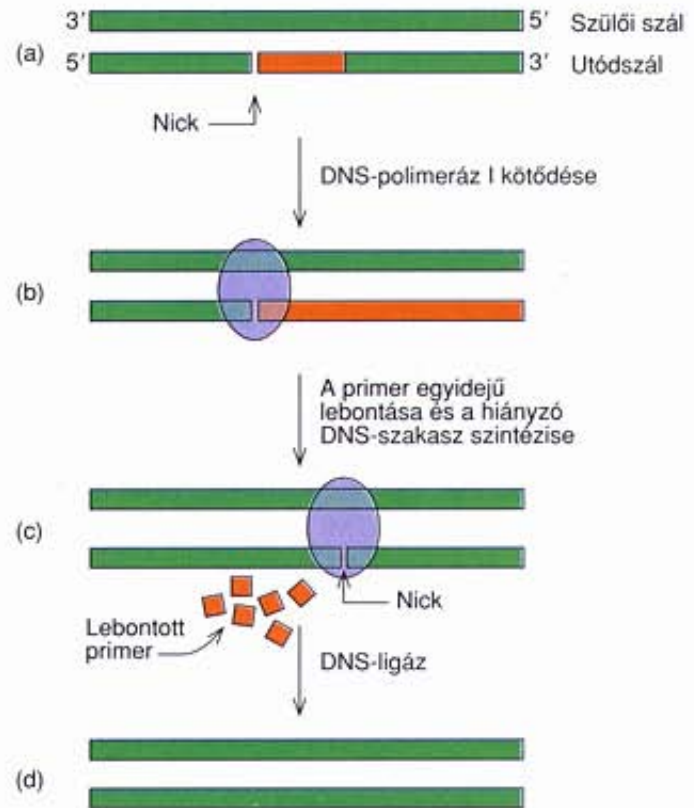


7.5. ábra. Az egyirányú és a kétirányú replikáció összehasonlítása. (a) A két szülői fonál (kék) felnyílik, kialakul a replikációs buborék, ahol lehetővé válik az utódszálak (piros) szintézise. (b) Egyirányú replikáció esetén az egyik replikációs villa (az ábrán a bal oldali) helyben marad, míg a másikonál DNS-szintézis folyik. (c) Kétirányú replikáció esetén mindkét replikációs villa aktív, egy közös kezdőpontból kiindulva mindkét irányban történik DNS-szintézis

kötést, helyreállítja a folyamatos DNS-szálat. A folyamat annyiszor ismétlődik, ahányszor csak szükséges, és eredményeként az összes fragmentum egyetlen, kovalensen zárt kettős hélixet alkot.

ÖSSZEGZÉS

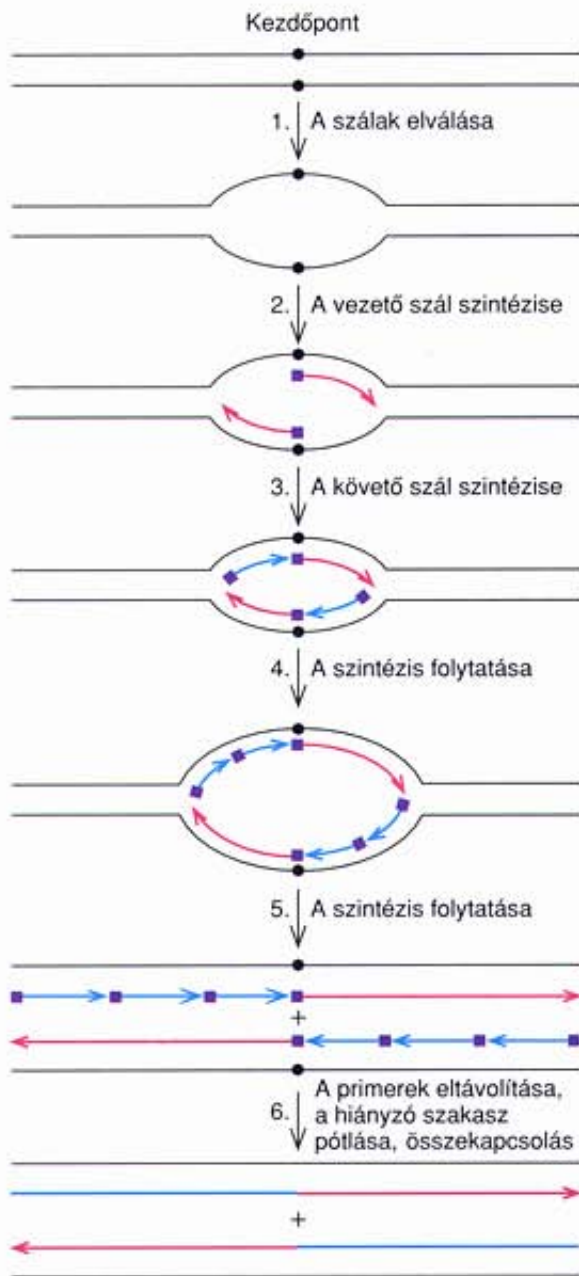
A 7.7. ábra összegzi a DNS-replikáció eddig ismertett részfolyamatait egy rövid DNS-szakaszon. Először a szülői fonalak elválnak egymástól a replikációs kezdőpontnál. Ezután megkezdődik a vezető szál szintézise egy RNS-primer segítségével, ezt követi a késlekedő szál kialakítása szintén RNS-primer közreműködésével. A folyamatban természetesen mindkét szülői fonál templátként szerepel. A valóságban ezek az események többé-kevésbé párhuzamosan és folyamatosan zajlanak, csak a könnyebb érthetőség kedvéért ábrázoltuk lépésekre bontva. A szintézis során a replikációs buborék mindkét irányban terjeszkedik, és a replikáció folytatódik a vezető és a késlekedő szálon. A folyamat mindaddig ismétlődik, amíg a szülői fonalak teljesen elválnak egymástól. Végül megtörténik az RNS-primerek kivágása, a hiányzó DNS-sza-



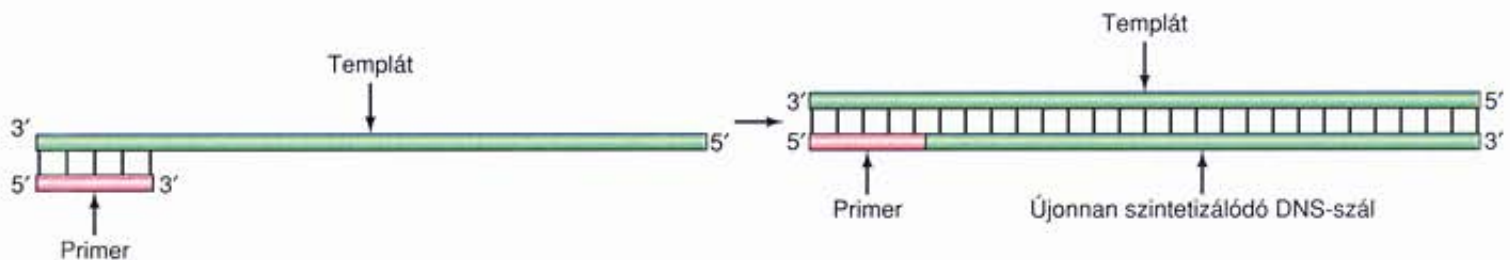
7.6. ábra. A primerek eltávolítása és a DNS-fragmentumok összekapcsolása. (a) A két szomszédos, újonnan képződött DNS-fragmentum közül a jobb oldali 5'-végén található egy primer (piros). A két fragmentumot rés, ún. nick választja el egymástól. (b) A DNS-polimeráz I a résnél kötődik a kétszálú DNS-hez. (c) A DNS-polimeráz I egyidejűleg eltávolítja a primert, és felépíti a hiányzó szakaszt a bal oldali fragmentum szintézisének folytatásával. (d) A DNS-ligáz megszünteti a megmaradt rést, azaz foszfodiészter-kötést képez az újonnan szintetizálódott szál bal és jobb oldali fragmentumai között

kaszok felépítése, majd a fragmentumok összekapcsolása a DNS-ligáz közreműködésével. Ügyeljünk a „primer” és a „templát” fogalma közötti különbségre (7.8. ábra)! A primerek RNS-ből állnak, és kovalensen kapcsolódnak az újonnan szintetizált DNS-szakasz 5'-végéhez. A „templát” olyan DNS-szakasz, amely mintaként szolgál az új DNS-szál felépítéséhez. Bázispárok révén kapcsolódik az új szárhoz, de nem kovalensen kötődik.

A DNS replikációja szemediszkontinuus, azaz egyik szála, a vezető szál folyamatosan, egyetlen hosszú darabban szintetizálódik, míg a másik, a követő szál rövid szakaszokban. A DNS-szál szintézisének elkezdéséhez szükséges egy indító RNS-primer. A replikáció legtöbbször kétirányú, a két replikációs villa folyamatosan távolodik a közös kezdőponttól. A rövid RNS-primerral induló fragmentumokból a replikációs gépezet eltávolítja a primereket, kitölti a hiányzó szakaszokat, végül összekapcsolja a fragmentumokat.



7.7. ábra. A DNS-replikáció mechanizmusának összefoglalása. A szülői fonalak fekete színűek, a replikáció kezdőpontját fekete kör jelzi. A lila négyzetek az RNS-primerek, a piros nyíl a vezető szál, a kék nyíl pedig a követő szál



7.8. ábra. A templát és a primer közti különbségek. A bal oldali templát DNS-szálhoz (zöld) bázispárok révén egy primer (piros) kapcsolódik. A jobb oldalon egy új DNS-fonál szintetizálódik. Figyeljük meg, hogy a primerhez kovalens kötéssel kapcsolódik, míg a templát szálhoz bázispárokkal

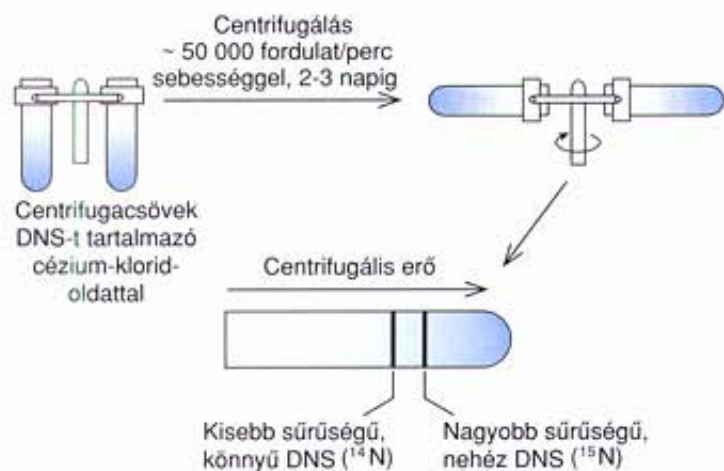
A DNS-REPLIKÁCIÓ MECHANIZMUSÁNAK KÍSÉRLETI BIZONYÍTÉKAI

A DNS-replikáció eddig tárgyalt jellemzőit mind prokarióta, mind eukarióta sejtekben sikerült igazolni. A fejezet következő részében a legfontosabb kísérletek eredményeit ismertetjük.

A REPLIKÁCIÓ SZEMIKONZERVATÍV

1958-ban Matthew Meselson és Franklin Stahl szellemes eljárást dolgoztak ki a szemikonzervatív replikáció elkülönítésére a konzervatív és a diszperzív replikációs mechanizmusoktól. Vizsgálataikhoz a nitrogén nem radioaktív, nehéz izotópját alkalmazták. A legnagyobb mennyiségben előforduló N-izotóp a 14-es tömegszámú (^{14}N), míg viszonylag ritka a 15-ös tömegszámú (^{15}N). Meselson és Stahl kimutatták, hogy a ^{15}N -ben dús táptalajon növesztett baktériumok beépítik a nehéz izotópot DNS-ükbe, amely emiatt nehezebb a normális értéknél. Az ily módon megjelölt DNS egyértelműen elkülöníthető a közönséges DNS-től cézium-kloridos közegben végzett sűrűséggradiens ultracentrifugálással. A CsCl-ből igen nagy sűrűségű sóoldat állítható elő, ezért az ultracentrifugálás során a kisebb sűrűségű DNS-frakció nem ülepedik le benne, hanem valahol középtájon rétegződik a centrifugacsőben. A kísérleti eljárást a 7.9. ábra vázolja. A 7.10. ábrát Meselson és Stahl eredeti, 1958-as cikkéből vettük át, amely egyértelműen igazolja a közönséges, ^{14}N -nel és a nehéz ^{15}N -nel jelzett DNS elkülönülését.

A kísérlet következő fázisában a ^{15}N -nel jelölt baktériumokat egy, illetve több generáción át ^{14}N -es táptalajon nevelték, majd megvizsgálták az utódsejtek DNS-ének sűrűségét. Gondoljuk végig, milyen lehetőségek várhatók egy replikációs ciklus után a három különböző mechanizmus esetén! Amennyiben a replikáció konzervatív, a megkettőződés után a nehéz szülői szálak együtt maradnak, és megjelenik egy újonnan szintetizálódott DNS. Mivel a szintézis a könnyű izotóp jelenlétében történik, az utódmolekula mindkét szála könnyű lesz. A nehéz/nehez szülői duplex és a könnyű/könnyű utódmolekulák CsCl-gradiensben könnyen azonosíthatók (7.11. ábra). Ha a replikáció szemikonzervatív, a két nehéz szülői szál elválik egymástól, majd mindkettő kiegészül egy-egy új, könnyű szállal. Ezeknek a nehéz/könnyű hibrid ket-tős hélixeknek a sűrűsége várhatóan a nehéz/nehez szülői és a

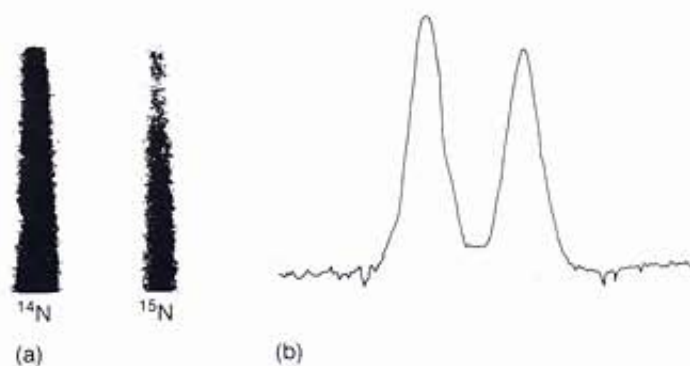


7.9. ábra. A cézium-kloridos sűrűséggradiens centrifugálás elve. A cézium-klorid-oldatot tartalmazó centrifugacső nagy sebességgel forog a centrifugálás során, a nagy sűrűségű cézium-klorid folyamatosan ülepedik a cső aljára, mindaddig, amíg be nem áll az egyensúly a centrifugális erő és a diffúzió között. Egyensúlyi állapotban koncentrációgradiens, ezzel együtt sűrűséggradiens alakul ki, a centrifugacső alján nagyobb, tetején kisebb az oldat sűrűsége. Ha az oldat DNS-t is tartalmaz, akkor a centrifugális erő hatására az is egyensúlyi helyzetbe kerül saját sűrűségének megfelelően. Egyensúlyban a centrifugacsőnek azon a részén helyezkedik el, ahol sűrűsége meg egyezik a cézium-klorid-oldatával. Ennek megfelelően két különböző sűrűségű DNS-frakció elkülönült réteget alkot a centrifugacsőben

könnyű/könnyű közönséges kettős hélixek sűrűsége közé esik. A kísérlet során pontosan ez igazolódott, az első megkettőződés után egyetlen sávot sikerült kimutatni, méghozzá a nehéz/nehéz és a könnyű/könnyű DNS között. Ez az eredmény kizárta a konzervatív replikáció lehetőségét, ugyanakkor megfelelt a szemikonzervatív és a diszperzív replikáció mechanizmusának is.

Az újabb megkettőződési ciklusok vizsgálata azonban kizárta a diszperzív replikáció hipotézisét is. ^{14}N -tartalmú táptalajon, véletlenszerű diszperzív replikáció esetén két replikációs ciklus után olyan DNS-molekulák keletkeznének, amelyek $\frac{1}{2}$ rész ^{15}N -t és $\frac{1}{2}$ rész ^{14}N -t tartalmaznak. A szemikonzervatív modell szerint pedig a termékek fele nehéz/könnyű, másik fele könnyű/könnyű DNS (7.11. ábra). Vagyis, az első replikáció során kialakult nehéz/könnyű hibrid szála elválnak egymástól, és mindkettő mellett egy-egy új, könnyű szál szintetizálódik, ami 1:1 arányban nehéz/könnyű és könnyű/könnyű DNS-t eredményez. A kísérlet ez utóbbit igazolta, az adatok a szemikonzervatív mechanizmust támasztják alá.

A 7.2. ábra a diszperzív replikációnak azt a speciális esetét szemlélteti, amelyikben a régi és az újonnan szintetizált DNS véletlenszerűen oszlik el a leánymolekulákban. Elképzelhető azonban egy olyan nem-véletlenszerű diszperzív eloszlás is, amely két generáció után ugyanolyan gradiens centrifugálási eredményt adna, mint a szemikonzervatív megkettőződés, azaz $\frac{1}{2}$ rész könnyű/könnyű és $\frac{1}{2}$ rész nehéz/könnyű jelölésű szál. Ennek a lehetőségnek a kizárására, Meselson és Stahl az első replikáció után kivont DNS szálaikat melegítéssel elválasztották egymástól, majd ezekkel végezték el a sűrűséggradiens centrifugálást. A szemikonzervatív replikáció alapján a szálaik fele várha-



7.10. ábra. DNS-molekulák szétválasztása cézium-kloridos sűrűséggradiens centrifugálással. A nitrogén normál izotópját (^{14}N) tartalmazó DNS-t összekeverték nehéz izotóppal (^{15}N) jelölt DNS-sel, majd az elegyet cézium-kloridos sűrűséggradiens centrifugálásnak vetették alá. A két különböző sűrűségű réteg tisztán elkülönül egymástól. (a) A centrifugacsőről ultraibolya megvilágítással felvétel készítették. A két sötét sáv az UV sugarakat abszorbeáló két különböző DNS-frakciónak felel meg. (b) A két sáv denzitásából következtetni lehet a kétféle DNS mennyiségi viszonyaira is

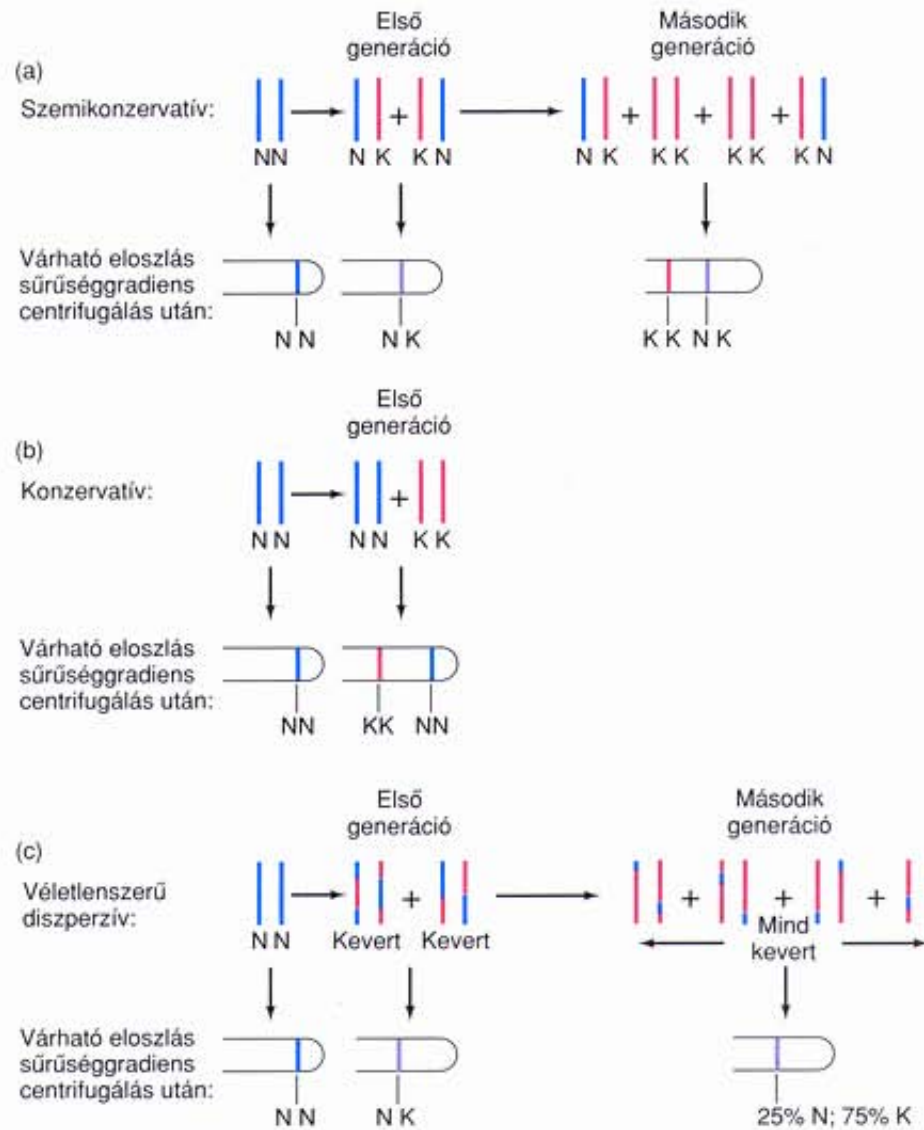
Forrás: Meselson, M. és Stahl F. W.: The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 44:671–82, 1958

tóan nehéz, fele pedig könnyű, így a centrifugálás után a szálaik elkülönült sávokban jelennek meg, hasonlóan a kizárólag nehéz, illetve kizárólag könnyű DNS-szálaiból készült standardokhoz. A diszperzív modell szerint mindkét szál kevert típusú, ezért a standardtól eltérő sávban kell megjeleníteniük. Meselson és Stahl kísérleteiben a két szál egyértelműen elkülönült, és úgy viselkedett, mint a standard nehéz, illetve könnyű szála, azaz a szemikonzervatív replikációs modellnek megfelelően. Mindezek alapján tehát kizárhatjuk a diszperzív replikáció lehetőségét is.

A DNS replikációja szemikonzervatív. A folyamat során a szülői fonalak elválnak egymástól, és mindkettő templátként szolgál az új, komplementer szál szintéziséhez.

A REPLIKÁCIÓ SZEMIDISZKONTINUUS

Az Okazaki által javasolt szemidiszkontinuus replikáció igazolására a kutatóknak két feltételezést kellett kísérletileg ellenőrizniük: (1) Az újonnan keletkező DNS-nek legalább a fele rövid szakaszokban szintetizálódik, ezért radioaktív DNS-prekuzorral meg kell jelölni, és röviddel a jelölés után azonosítani kell ezeket a szakaszokat, mielőtt még összekapcsolódnának. Az ilyen rövid ideig tartó, impulzusszerű radioaktív jelölés, a **pulzusjelölés** alkalmas a makromolekulák sejten belüli átalakulásának nyomon követésére. (2) Ha kizárjuk a rendszerből a DNS-ligázt, azt az enzimet, amely összekapcsolja a DNS-szakaszokat, akkor még hosszú ideig tartó jelölés mellett is azonosíthatók a fragmentumok. Okazaki a T4 bakteriofág DNS-ét vizsgálta, amely meglehetősen egyszerű, és emellett több DNS-ligáz mutánsa ismert.

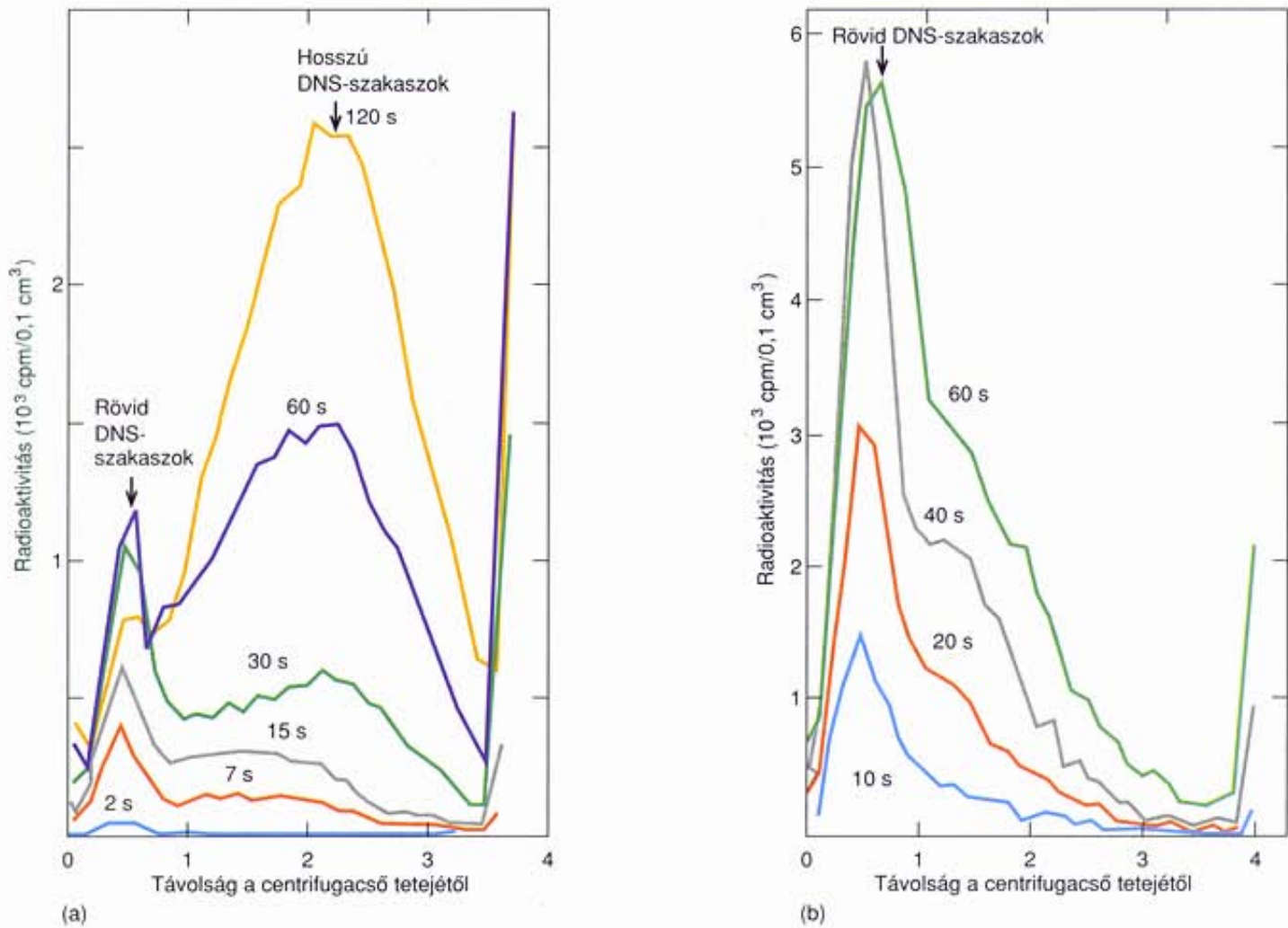


7.11. ábra. Három hipotézis a replikációra. A konzervatív modell (b) alapján egy generáció után a kétféle DNS (nehéz/nehéz, könnyű/könnyű) várhatóan azonos mennyiségben jelenik meg. A szemikonzervatív (a) és a véletlenszerű diszperzív (c) modell alapján egy generáció után egyetlen DNS-frakció várható, amelynek a sűrűsége a könnyű/könnyű és a nehéz/nehéz minták közé esik. Meselson és Stahl eredményei az utóbbi feltételezést erősítették meg, kizárták a konzervatív replikációs mechanizmust. A véletlenszerű diszperzív modell alapján két generáció után ugyancsak egyféle denzitású DNS-frakció várható, amelyben a molekulák 25%-ban nehéz, 75%-ban pedig könnyű szakaszokból állnak. Ezért egyetlen sáv megjelenése valószínűsíthető, a könnyű/könnyű és a könnyű/nehéz frakció között. A szemikonzervatív modell a második generációban kétféle DNS-frakciót – könnyű/könnyű és könnyű/nehéz – feltételez azonos mennyiségben. A kísérleti eredmények ez utóbbi feltételezést igazolták.

Az első feltevés vizsgálatához Okazaki egyre rövidebb impulzusokban tríciummal jelzett timidint adott azokhoz az *E. coli*-sejtekhez, amelyekben a T4 fág DNS-e replikálódott. Mindössze két másodperces jelölési idővel dolgozott, hogy biztosan azonosíthassa a DNS-szakaszokat még összekapcsolódásuk előtt. Végül meghatározta az újonnan szintetizálódott DNS-darabok hozzávetőleges méretét ultracentrifugálással. A nagyobb méretű DNS-fragmentumok gyorsabban ülepednek ki a centrifugacső aljára, mint a kisebb darabok.

A kísérletek eredményei a 7.12.(a) ábrán láthatók. Már két másodperces pulzusidő esetén is látható valamennyi jelölt DNS a gradiensen; úgy tűnik, hogy a kimutathatóság határain belül a tríciumos jelölés teljes mennyisége igen rövid, mindössze 1000-

2000 bázis hosszúságú DNS-szakaszokban jelentkeznek, amelyek a centrifugacső felső részében rétegződnek. Növekvő pulzusidőt alkalmazva a tríciummal jelölt DNS-nek egy másik csúcsa is megjelenik, sokkal közelebb a centrifugacső aljához. Ez annak a folyamatnak az eredménye, amelynek során a jelölt DNS rövid, újonnan szintetizálódott szakaszai összekapcsolódnak sokkal nagyobb, még a jelölés megkezdése előtt keletkezett darabokkal. Ezek a nagy darabok a kísérlet megkezdése előtt nem tartalmaztak radioaktív jelölést, ezért egészen addig az időpontig nem lehetett kimutatni őket, amíg a DNS-ligáz hozzájuk nem kapcsolta a rövid, jelölt szakaszokat. Ehhez mindössze néhány másodpercre volt szükség. Azokat a rövid DNS-szakaszokat, amelyek a replikáció



7.12. ábra. A szemidiszkontinuus DNS-replikáció kísérleti igazolása. (a) Okazaki és munkatársai replikálódó T4 fág DNS-ét nagyon rövid idejű impulzusokban radioaktív DNS-prekuzorral jelölték, majd a keletkező DNS-molekulákat ultracentrifugálással méret szerint elválasztották. A legrövidebb ideig tartó impulzus után a jelölés főként a kisebb DNS-szakaszokban jelent meg (a centrifugacső tetejéhez közel), ahogyan azt a diszkontinuus modell alapján várták. (b) Amikor mutáns fágot alkalmaztak, amelynek hibás volt a DNS-ligáz génje, még hosszú jelölési idő után is (az ábrán egy perc) rövid DNS-szakaszok halmozódtak fel

kezdeti termékei, **Okazaki-fragmentumoknak** nevezzük. Méltó emlékezés ez Okazakira, aki túlélte a hirosimai atomtámadást, és kutatói pályájának csúcán leukémiában halt meg.

Az Okazaki-fragmentumok felfedezése megbízható bizonyítékot szolgáltatott a T4 fág DNS-ének szemidiszkontinuus replikációjára. Minden kétséget kizárt annak igazolása, hogy ezek a rövid DNS-fragmentumok nagyon jelentős mennyiségben halmozódnak fel, ha a kapcsoló enzim, a DNS-ligáz nem működik. Okazaki kutatócsoportja ezt a vizsgálatot egy olyan T4 mutánsal végezte, amelyben a DNS-ligázt kódoló gén hibás volt. A 7.12.(b) ábrán látható, hogy az Okazaki-fragmentumokat jelentő csúcs kiugróan magas ebben a mutánsban. Még teljes egy percen át tartó jelölés után is ez a meghatározó része a jelölt DNS-nek.

Az utóbbi kísérlet alapján az Okazaki-fragmentumok a DNS-szintézis kezdeti termékei, és nem az igen rövid pulzusjelölés műtermékei. Mindemellett, az a tény, hogy a jelölés túlnyomórészt rövid DNS-darabokban jelent meg a működőképes DNS-ligáz hiányában, azt sejtette, hogy a replikáció *mindkét szálon* szakaszosan történik

(7.3.(c) ábra). A későbbiek során végzett kísérletek azonban kimutatták, hogy az első kísérletekben kapott Okazaki-fragmentumok fele tulajdonképpen műtermék volt, a folyamatosan replikálódó szál fel-darabolódása miatt. Tehát a replikáció valójában **szemidiszkontinuus**: az egyik fonál folyamatosan, a másik szakaszosan replikálódik.

A DNS-replikáció szemidiszkontinuus. Okazaki kimutatta, hogy a szintézis során rövid DNS-fragmentumok keletkeznek, különösen akkor, ha a DNS-ligáz nem működőképes.

AZ RNS-PRIMER

Az RNS-primer létezésére utaló első jel az volt, amikor kimutatták, hogy az M13 fág DNS-ének replikációját, amelyet *E. coli* sejt-kivonatában vizsgáltak, a rifampicin nevű antibiotikum gátolja. Ez

meglepő volt, hiszen a rifampicin az RNS-polimeráz inhibitora, nem pedig a DNS-polimerázé. A magyarázat abban rejlik, hogy az M13 fág az *E. coli* RNS-polimerázát használja fel a DNS-szintézist indító RNS-primer előállítására. Ez azonban nem általános jelenség. Még az *E. coli*-ban sem RNS-polimeráz szintetizálja a primert, hanem kizárólag erre a célra specializálódott enzimszisztéma.

Az RNS-primer egyértelmű bizonyítéka volt, amikor kimutatták, hogy a DNS-t hidrolizáló enzim, a DNáz, nem bontja le teljesen az Okazaki-fragmentumokat, hanem kicsi, 10–12 bázis hosszúságú RNS-darabokat hagy. Más kísérletekben kimutatták, hogy ezek az RNS-ből álló **oligonukleotidok** kovalensen, nem pedig hidrogénkötéssel kapcsolódnak az Okazaki-fragmentumok 5'-végéhez.

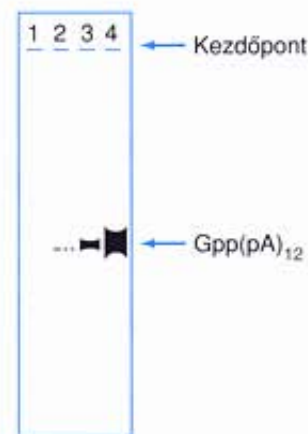
Ennek a kutatómunkának nagy részét Tuneko Okazaki – Reiji Okazaki felesége és szellemi társa – végezte. Ő és kollégái először mindössze 1–3 bázisnyira becsülték a primer méretét. Ehhez a tévedéshez két probléma vezetett: (1) Az RNS-t bontó enzimek (nukleázok) már részlegesen hidrolizálták a primereket, mire tiszta állapotban sikerült kinyerni őket, és (2) Okazaki nem tudta elkülöníteni a degradált primereket az épektől. Egy második kísérletsorozatban, amelyet 1985-ben fejeztek be, Okazaki csoportjának sikerült mindkét problémát megoldani, és megállapítani, hogy a primerek valójában 10–12 bázis hosszúságúak.

A nukleáz aktivitásának csökkentésére olyan mutánsokat alkalmaztak, amelyekből hiányzott a ribonukleáz H (a hibrid nukleinsavak RNS-részét kihalászó enzim), vagy a DNS-polimeráz I nukleáz aktivitása, illetve mindkettő. Ez jelentősen javította az ép primer kinyerését. Annak érdekében, hogy csak az ép primereket jelöljék meg, cap-képző enzimet (l. 9. fejezet) használtak, amely GMP-t köt az RNS-ek 5'-végére, de csak azokéra, amelyek nem veszítették el terminális nukleotidjaikat. A 9. fejezetben majd részletesen ismertetjük e specifikusság hátterét, a lényeg most annyi, hogy az enzim csak az ép primerekhez képes hozzákapcsolni a radioaktív GMP jelölést. Miután a primerek radioaktív jelölést kaptak, az Okazaki-fragmentumok DNS-részét DNázzal eltávolították, és a megmaradó jelölt primert gélelektroforézissel vizsgálták (l. 6. fejezet). A kísérlet eredménye a 7.13. ábrán látható. A mutáns baktériumok mindegyikéből tisztán elkülönült egy sáv, amelyet mintegy 12 bázisból álló primerek alkotnak. A vad típusú baktériumok nem adnak kivehető sávot, nukleázuk minden jel szerint lebontják az ép primereket nagy részét, illetve teljes egészét. További kísérletekkel kimutatták, hogy a 4-es minta széles sávja valójában három sávból áll, amelyet a 10, 11, illetve 12 bázis hosszúságú primerek alkotnak.

A primereket lebontó enzimek aktivitásának gátlásával Tuneko Okazaki izolálta a primereket, és kimutatta, hogy azok 10–12 bázis hosszúságú RNS-szakaszok.

A REPLIKÁCIÓ KÉTIRÁNYÚ

A DNS-replikáció vizsgálatának egyik közvetlen módja, hogy izoláljuk az éppen replikálódó DNS-molekulákat, és felvételeket készítünk róluk. Ezt sikerült megvalósítani, és a fejezet későbbi részében példát is látunk majd ilyen kísérleti eljárásra. Az első

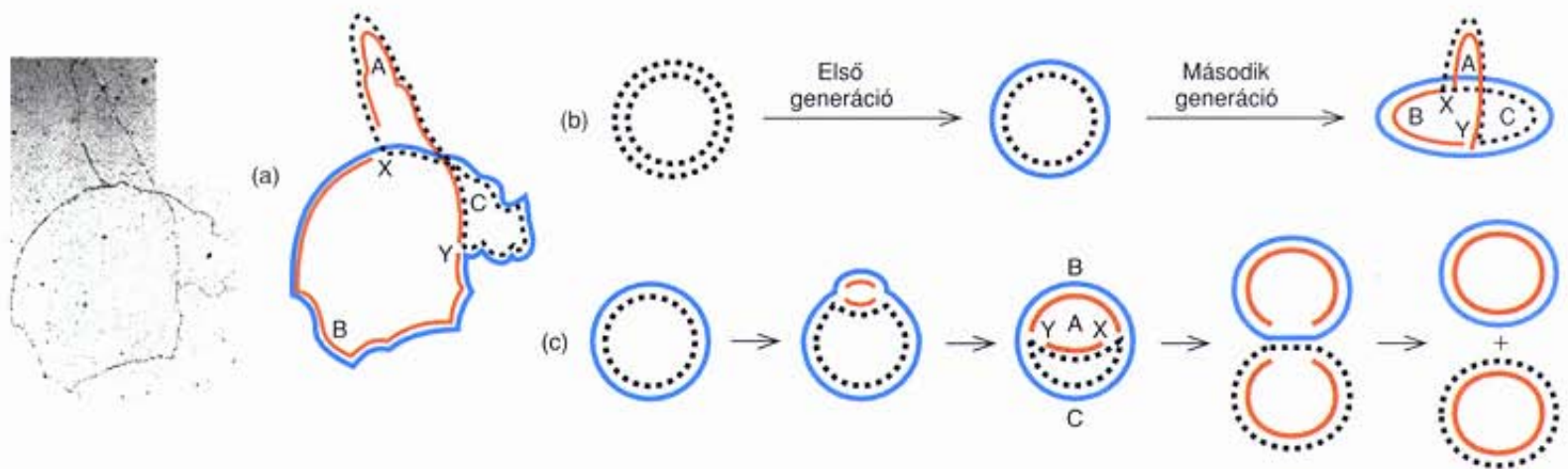


7.13. ábra. Az RNS-primer kimutatása és méretük meghatározása. Okazaki-fragmentumokat izoláltak vad típusú sejtekből és olyan mutánsokból, amelyekből az egyik, vagy mindkét RNS-primer bontó enzim hiányzott. Az Okazaki-fragmentumok érintetlen primerjeit ezután radioaktív GTP felhasználásával cap-képző enzim segítségével megjelölték, majd a fragmentumok DNS-ét DNázzal lebontották. A visszamaradt jelölt primereket gélelektroforézissel elválasztották, autoradiográfiával meghatározták helyzetüket a gélen. Az ábrán látható primerek az alábbi sejtekből származtak: 1. vonal vad típusú sejt; 2. vonal DNS-polimeráz I hiányos sejt; 3. vonal RNáz H hiányos sejt; 4. vonal mind DNS-polimeráz I-re, mind RNáz H-ra hiányos sejt. Mindegyik mutáns sejtben egyforma, mintegy 12 bázis hosszúságú primereket mutattak ki

vizsgálatok során hasonló technikát, **autoradiográfiát** alkalmaztak. Az autoradiográfia során radioaktív jelölést építenek be a vizsgálandó anyagba, majd a radioaktív anyagot fénképezési célra használt emulzióval hozzák érintkezésbe. Mivel a radioaktív sugárzás exponálja az emulziót, a radioaktív anyag „leképezi saját magát”. Ez a magyarázata, miért **autoradiográfia** a folyamat neve.

John Cairns is ezzel a módszerrel vizsgálta az 1960-as évek elején az *E. coli* kromoszómájának replikációját. A 7.14.(a) ábrán látható egy megkettződő *E. coli*-kromoszóma autoradiográfias képe, mellette Cairns értelmezésével. A 7.14.(a) és 7.14.(b) ábra megpróbálja megmagyarázni a három hurok (A, B és C) jelölésében levő különbségeket is: A DNS túljutott egy replikációs cikluson, sőt, egy része már a második replikációt is megkezdte. Ez azt jelenti, hogy a DNS-fonalak legalább egy jelölt szállal rendelkeznek. A második replikáció során a jelöletlen szülői szál templátként szolgál az új, jelölt szál felépítéséhez, a kettős hélix egyik szála jelölődik. A jelölést tartalmazó szülői szál is jelölt komplementert kap, így ez a duplex kettős jelölésű lesz. Ez a kettős jelölésű B hurok erősebben exponálja a filmet, így sötétebbnek látszik, mint a DNS többi, egyszerűen jelölt A és C hurka.

A 7.14.(a) ábrán bemutatott szerkezet az ún. **théta-szerkezet**, mivel alakja emlékeztet a görög théta betűre θ . Ha a hasonlóság a 7.14.(a) alapján nem lenne egyértelmű, a 7.14.(c) vázlatos rajza nyomán megérthető, hogyan keletkezhetett a második replikáció során a kapott autoradiogram. A rajzon látható, hogy a megkettződés egy replikációs buborék kialakulásával indul, ott, ahol a szü-



7.14. ábra. Az *Escherichia coli* DNS-ének théta-replikációja. (a) Autoradiográfias felvétel az *E. coli* replikálódó DNS-éről, mellette magyarázó diagrammal. A DNS radioaktív nukleotidok jelenlétében egy teljes replikációs cikluson ment keresztül, és megkezdődött a második replikáció is. A DNS-nek az a része, amelyik csak egyszer replikálódott egy jelölt (kék) és egy jelöletlen (szaggatott fekete) fonalból áll. A kétszer replikálódott DNS-nek kétszeresen jelölődött (kék és piros B hurok), illetve egyszeresen jelölődött (piros és fekete A hurok) részei vannak. Cairns szaggatott vonalat használt a jelöletlen DNS-szárla, folyamatosat a jelöltre. Figyeljük meg, hogy a B hurok két folyamatos vonalból áll, jelezve, hogy ez a rész kétszeresen jelölt. Ez az értelmezés megfelel annak a ténynek, hogy a felvételen a B hurok sötétebb, mint az A és a C. (b) Cairns autoradiogramjának pontosabb magyarázata ugyanazokkal a jelölésekkel, mint az (a) ábrarészben. (c) A théta-replikáció részletesebb levezetése. A jelölések megegyeznek az (a) és a (b) ábrarészével

Forrás: (a) Cairns, John: *Symposia on Quantitative Biology*, 28:44, 1963. Cold Spring Harbor

lői szálak elválnak egymástól, és az utódmolekula szintetizálódni kezd. A replikációs buborék növekedésével kirajzolódik a θ formájú szerkezet. Így már felismerhető az autoradiográfias felvételen a 7.14c középső rajzának szerkezete, ahol is a θ harántvonala már olyan hosszúságot ért el, hogy a kör alakú részen kissé túlnyúlik.

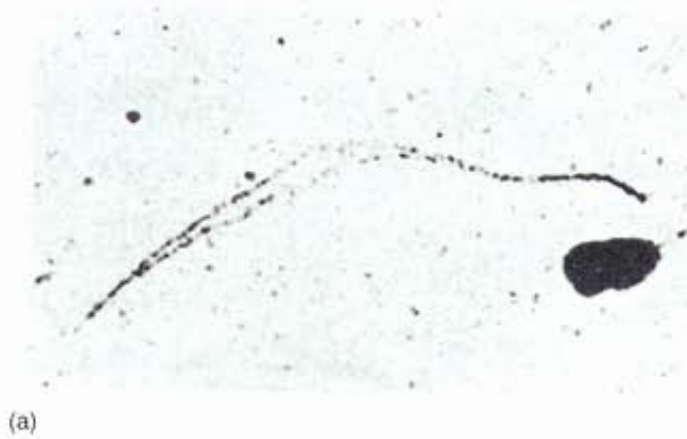
A θ -szerkezetben két **replikációs villa** van (a 7.14. ábrán X-szel és Y-nal jelölve), ami felvett egy lényeges kérdést: mindkettő vagy csak az egyik aktív replikációs hely? Másként fogalmazva: egyirányú-e a replikáció, és az egyik villa távolodik-e a másik, a **replikációs kezdőpontnál** rögzített villától? Vagy éppen ellenkezőleg, kétirányú a folyamat, és a két villa ellenkező irányban mozog a szál mentén, távolodva a kezdőponttól? Cairns nem úgy tervezte autoradiográfias vizsgálatát, hogy a felvétel alapján ezt a kérdést megválaszolhatta volna, de egy későbbi kísérlettel Elizabeth Gyurasits és R. B. Wake kétséget kizáróan igazolták, hogy a *Bacillus subtilis* esetében kétirányú a replikáció.

Kísérleti stratégiájuk az volt, hogy rövid ideig hagyták növekedni a *Bacillus subtilis*-sejteket gyenge radioaktivitású DNS-prekursorok jelenlétében, majd rövid időre sokkal erősebb prekursorokat adtak a sejteknek. Jelölt prekursoroként mindkét esetben tríciummal jelzett timidint (^3H -timidin) alkalmaztak. A trícium (^3H) a hidrogén radioaktív izotópja, sugárzásának hatására a fotoemulzió, a DNS közelében ezüstszemcsék válnak ki. Ezért az autoradiográfias képen az ezüstkiválás jól megfelel a jelzett DNS alakjának. Fontos kihangsúlyozni, hogy az autoradiográfias felvételen csak az izotóppal jelzett anyagok képezhetők le, a jelöletlen DNS nem követhető. A fenti kísérletben alkalmazott pulzusidő elég rövid volt ahhoz, hogy csak a replikációs buborékok jelenjenek meg a felvételen (7.15.(a) ábra). A képen látható DNS-t ne tévesszük össze a 7.14. ábrán látható teljes baktériumkromozómával.

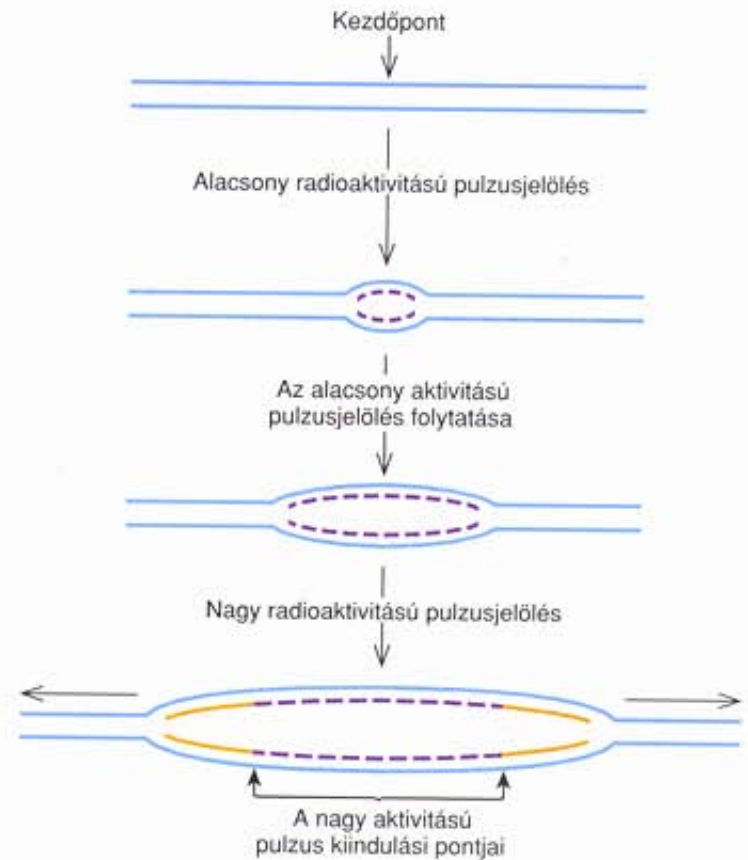
Ha gondosan tanulmányozzuk a 7.15.(a) ábrát, észrevehetjük, hogy az ezüstszemcsék kiválása nem egyenletes, a replikációs buborék mindkét, villához közel eső szélénél nagyobb mennyiségben halmozódnak fel! Ez a plusz radioaktivitás azonosítja azokat a DNS-részeket, ahol az ún. forró jelölés, vagyis a nagy radioaktivitású anyaggal történt pulzus idején a replikáció folyt. Mindkét villánál beépült az erősebben jelölt anyag, ami elárulja, hogy mindkettőnél folyt replikáció a pulzus idején. Ebből következik, hogy a *B. subtilis* DNS-ének replikációja kétirányú. A megkettőződés egy rögzített kezdőpontból indul, és két replikációs villában zajlik ellentétes irányban a kör alakú molekula mentén, egészen addig, amíg össze nem találkoznak a másik oldalon. Később ugyanilyen, illetve más módszerekkel sikerült igazolni, hogy az *E. coli* kromozómájának replikációja is kétirányú.

J. Huberman és A. Tsai hasonló autoradiográfias kísérleteket végzett eukariótákban, pontosabban *Drosophila melanogaster*-ben. A vizsgálat során a kutatók először az erős radioaktivitású (nagy specifikus aktivitású) pulzust alkalmazták, és másodszor a gyengébb radioaktivitású (kis specifikus aktivitású) prekuzort. Ezután megfordították a sorrendet, és először alacsony aktivitású, majd nagy specifikus aktivitású prekuzort adtak a sejtekhez. Ezután következett a jelölt DNS autoradiográfias vizsgálata. Az eljárás során a DNS szétterítése nem tette lehetővé hogy a replikációs buborékok nyitott formában megmaradjanak, azok összelapultak, és az autoradiográfias felvételen ezüstszemcsékből álló egyszerű csíkok jelentek meg.

A csík egyik vége a pulzus kezdetét, a másik a pulzus végét jelöli. De a kísérlet lényeges eleme, hogy a csíkok mindig párosával jelentek meg (7.16.(a) ábra). A párok a két replikációs villát jelentik, amelyek fokozatosan távolodnak a közös kezdőponttól. De miért nem kezdődik a jelölés a középpontnál, a replikációs kez-



(a)



(b)

7.15. ábra. A kétirányú DNS-replikáció kísérletes bizonyítása. (a) Autoradiográfias felvétel a *Bacillus subtilis* replikálódó DNS-éről. Nyugvó stádiumú spórákat csíráztattak alacsony radioaktivitású DNS-prekursor jelenlétében, így az újonnan kialakuló replikációs buborékok rögtön gyengén jelölődtek. A replikációs buborékok bizonyos időtartamú növekedése után erősebb aktivitású DNS-prekuzort adtak a rendszerhez egy rövid időre. (b) Az autoradiogram értelmezése. Lila szín jelöli azokat a DNS-szalakat, amelyek az alacsony radioaktivitású prekuzorral való jelölés során keletkeztek. A narancssárga szín a később szintetizálódott, a nagyobb aktivitású prekuzor beépítése révén erősebben jelölődött szakaszokat szemlélteti. Mivel mindkét replikációs villa felvette az erősebb jelölést, mindkettő aktív volt az adott időpontban, tehát a *B. subtilis* DNS-ének replikációja kétirányú

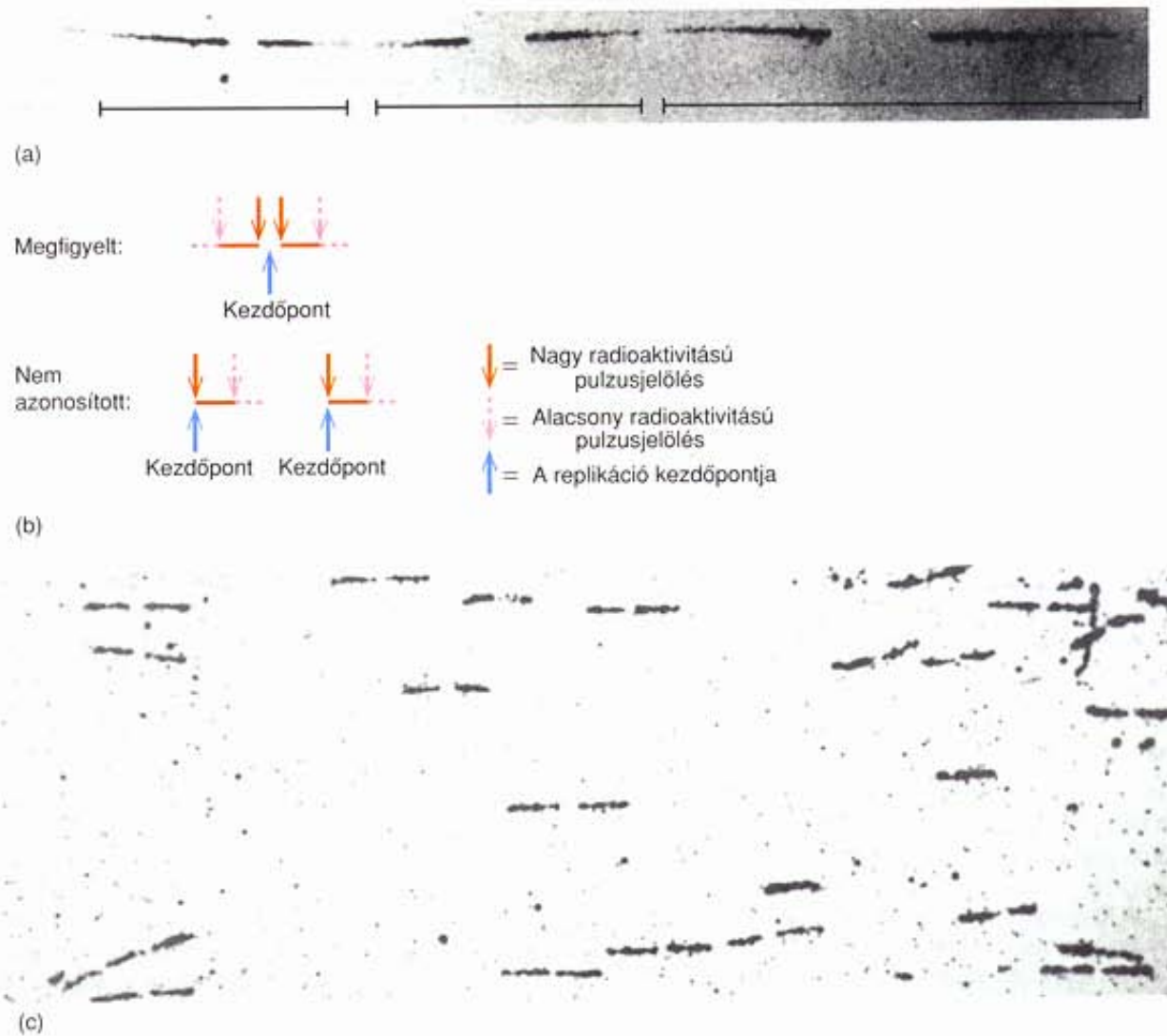
Fotó: Gyurasits, E. B. és Lake R. G., *Journal of Molecular Biology*, 73:58, 1973, Academic Press

dőpontban, ahogyan azt a *B. subtilis* esetén láttuk? A baktériumokkal folytatott kísérletben a kutatók a tenyészetet szinkronizálni tudták azzal, hogy spórából hajtatták ki a sejteket, így mindegyik sejt növekedése ugyanabban az időben indult. Ilyen módon radioaktív jelölést juttattak a sejtekbe már a DNS replikációjának kezdete előtt. A szinkronizáció sokkal bonyolultabb a *Drosophila* esetében, ezért nem is próbálkoztak vele ezekben a kísérletekben. Így a replikáció rendszerint már megindult, amikor a jelölést hozzáadták a sejtekhez, ezért látható egy „üres” szakasz a replikációs helyek közepén, hiszen oda nem épülhetett be jelölés.

Vegyünk szemügyre a 7.16(a) ábrán a csíkok alakját. Kifelé haladva, pödrott bajuszhoz hasonlóan fokozatosan elvékonyodnak. Ez azt jelenti, hogy először a nagy aktivitású jelölés épült be a DNS-be, majd ezután a gyengébb jelölés. Így a jelölődés mértéke a replikációs kezdőponttól távolodva mindkét irányban csökken. Az ellentétes kísérletben, ahol a „hidegebb” jelölés történt először, és utána a „forró”, a „bajuszok” jelölődése is megfordult, befelé lett gyengébb. Természetesen az is lehetséges, hogy ilyen jelölődést adnak igen közeli, egymástól független replikációs kezdőpontok is;

nem várható azonban, hogy ezekből a kezdőpontokból szabályosan, mindig ellenkező irányban haladjon a megkettőződés. Biztosan előfordulna azonos irányban folyó replikáció is, ami aszimmetrikus autoradiográfias felvételt eredményezne, ahogyan az a hipotézist magyarázó 7.16.(b) ábrán látható. Ilyeneket azonban nem találunk. Ezért az autoradiográfias kísérletek azt valószínűsítik, hogy a párosával kialakuló csíkok valóban egy replikációs kezdőpontból indulnak, és nem két egymáshoz közeliből. Tehát úgy tűnik, hogy a DNS replikációja a *Drosophila* esetében is kétirányú.

A fenti kísérletekben kifejelett állatokból nyert, és mesterséges sejttenyészetben fenntartott sejtekkel dolgoztak. H. G. Callan és munkatársai ugyanilyen típusú vizsgálatokat végeztek nagy radioaktivitású pulzusjelöléssel és kétélűtek embrionális sejteivel. A pettyes gőte (*Tritonus vulgaris*) embrionális sejteivel folytatott kísérlet meglepő eredményt hozott, amely a 7.16.(c) ábrán látható. A kifejelett rovarok sejteiben észlelt mintázattal ellentétben, a párosával álló csíkok mind egyformák voltak. Megközelítőleg azonos volt a hosszuk, sőt még a középső, nem jelölődött szakasz mérete is. Ez azt jelenti, hogy minden kezdőpontnál azonos idő-



7.16. ábra. Kétirányú DNS-replikáció eukariótákban. (a) Autoradiográfias felvétel a *Drosophila melanogaster* replikálódó DNS-éről. A pulzusjelölés során először nagy radioaktivitású, majd alacsony radioaktivitású DNS-prekurzort alkalmaztak. Figyeljük meg a párosával álló csikokat, amelyek a középponttól távolodva vékonyodnak. Ez a mintázat a replikonok jelölődését tükrözi, a replikációs kezdőponttól kiindulva, két replikációs villával. (b) Egyszerűsített vázlat a magas, majd kis aktivitású jelölés után megfigyelt mintázat értelmezésére, illetve arra a feltételezett esetre, amikor a két csik két egymástól független, egy irányban replikálódó egységet képvisel, amelyek replikációs villája azonos irányban mozog. Az utóbbi mintázatot nem figyelték meg a kísérlet során. (c) Autoradiográfias felvétel *Triturus vulgaris*-embrió replikálódó DNS-éről. Figyeljük meg a párosával álló csikok állandó méretét és alakját, ami arra utal, hogy a kapcsolatban álló replikonok megkettőződése egyidejűleg folyik

Fotó (a) Huberman J. A. és Tsai A.: *Journal of Molecular Biology*, 75:8, 1973, Academic Press; (c) Callan H. G.: *Symposia on Quantitative Biology*, 38: 196, 1973, Cold Spring Harbor

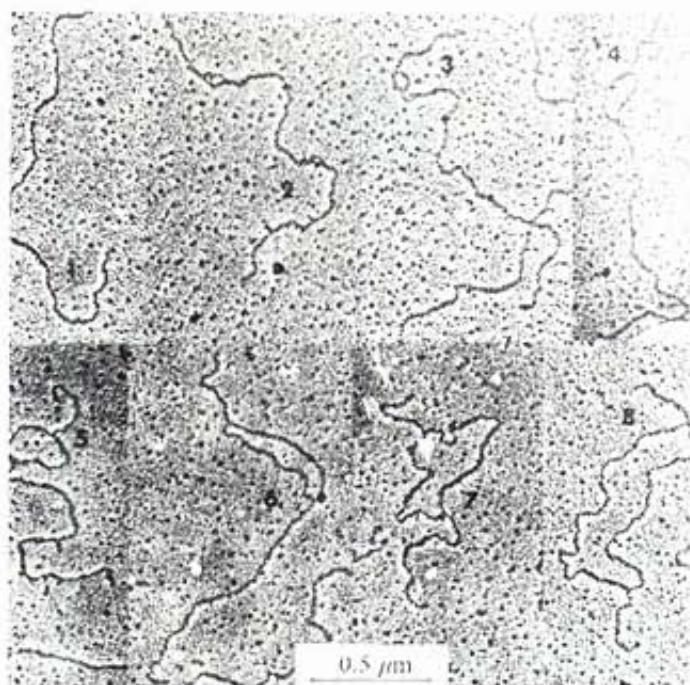
pontban kezdődött a replikáció. Ennek így kellett lennie, hiszen a jelölést ugyanabban a pontban – ugyanolyan távolságra a replikációs kezdőponttól – vette fel a replikációs villa. A jelenség valószínűleg segít annak megértésében, hogyan játszódhat le olyan gyorsan a gőte embrionális sejtjeinek DNS-megkettőződése (mindössze egy óra alatt zajlik le a folyamat, míg a felnőtt állatok sejtjeiben negyven óra szükséges hozzá). A replikáció minden kezdőpontnál egyszerre indul, és nem eltoltd időpontokban.

A replikáció kezdőpontjának tárgyalása elvezet egy új fogalom, a **replikon** bevezetéséhez. A replikon az a DNS-szakasz, amely egy replikációs origó ellenőrzése alatt áll, még akkor is, ha két replikációs villája van. Az *E. coli* kromoszómája egyetlen replikon, mivel egyetlen kezdőponttól kettőződik meg. Az eukarióták

kromoszómái sok replikonból állnak, másképp túlságosan hosszú időt igényelne a teljes kromoszóma megkettőződése. Ez még akkor is igaz lenne, ha a prokariótákra jellemző szédületes sebességgel folyna a replikáció – mintegy ezer nukleotid épülne be másodpercenként! Az eukarióták DNS-ének replikációja azonban sokkal lassúbb, ami még inkább egyértelművé teszi a nagyszámú replikon szükségességét.

EGYIRÁNYÚ REPLIKÁCIÓ

Mindegyik genetikai rendszer replikációja kétirányú? Valószínűleg nem. Vizsgáljuk meg például egy **plazmid**, a **colE1** replikációját! A plazmid olyan kör alakú DNS, amely a sejt kromo-



7.17. ábra. A colicin E1 plazmid (colE1) egyirányú replikációja. Az 1. molekula még nem kezdett replikálódni, ezért nem látható rajta replikációs buborék. A 2–8 molekulák replikációs buborékjai fokozatosan növekednek. Lényeges, hogy mindegyik felvételen azonos méretű a buborék fölött látható replikálatlan DNS-szakasz, miközben a buborék alatt lévő egyre rövidül a buborék növekedésével. Vagyis egyértelmű, hogy csak az alsó villánál folyik replikáció, a másiknál nem

Forrás: Lovett, M., Katz, L. és Helinski D.: *Nature*. 251: 338, 1974, 1991 Macmillan Magazines Limited

számjától függetlenül replikálódik. A colE1 plazmidot az *E. coli* néhány törzse hordozza. Michael Lovett elektronmikroszkóppal vizsgálta a colE1 molekuláinak replikációját, és azt tapasztalta, hogy csak egy replikációs villa mozog rajta.

Természetesen, ha a kísérletező egyszerűen csak nézi a megkettőződő kör alakú molekulát, akkor megfigyelheti a két-villás replikációs buborékot, de nem tudja eldönteni, hogy mindkét villánál folyik-e a replikáció. Ennek eldöntéséhez valamilyen markerre van szükség a DNS-en, amit felhasználhatunk a két villa helyzetének meghatározására a replikáció különböző időpontjaiban. Ha mindkét villa elmozdul a markerhez képest, akkor mindkettő aktív, tehát a replikáció kétirányú. Amennyiben csak az egyik villa mozdul el, a replikáció egyirányú.

Lovett és munkatársai markerként azt a helyet választották, ahol a colE1 DNS-ét az *EcoRI* **restriktív endonukleáz** elhasítja (l. 15. fejezet). Az *EcoRI* az 5'-GAATTC-3' szekvenciát ismeri fel. A colE1 molekulán egyetlen ilyen szekvenciájú hely van, ezért az enzim hatás után lineáris DNS-molekula keletkezik, amelynek a végei az *EcoRI* hasítási helyét jelentik. A kísérlet eredménye a 7.17. ábrán látható. Tisztán kivehető, hogy csak az egyik villa mozdul el a lineáris molekula végeihez viszonyítva. Tehát a colE1 replikációja egyirányú.

Autoradiográfias kísérletekkel kimutatták, hogy a legtöbb eukarióta és prokarióta DNS replikációja kétirányú. A colE1 plazmid az egyirányú replikáció egyik példája.

A DNS-REPLIKÁCIÓ ENZIMEI

A DNS megkettőzésében mind a prokariótáknál, mind az eukariótáknál egy sor DNS-polimeráz vesz részt. Az *E. coli* DNS-ének replikációjakor már láttuk a DNS-polimeráz I szerepét a primerek eltávolításában és a keletkező hézagok kitöltésében. A fejezet következő részében több polimerázt is bemutatunk, más, a prokarióta és az eukarióta DNS replikációjában fontos fehérjékkel együtt.

A FONALAK SZÉTVÁLASZTÁSA

A DNS replikációjának általános jellemzésénél feltételeztük, hogy a DNS két fonala a replikációs villánál valamilyen módon széttekeredik. Ez azonban nem automatikusan játszódik le a DNS-polimeráz működése közben, hiszen a két szülői fonál szorosan kapcsolódik egymáshoz, szétválasztásuk energiát és enzimek közreműködését igényli.

Helikázok

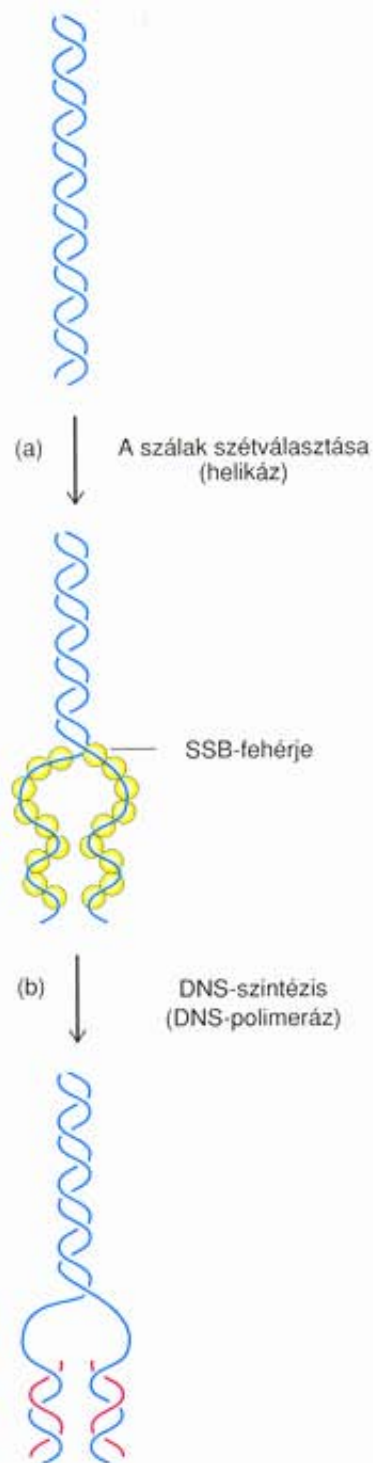
Az az enzim, amely ATP-ből származó energia segítségével a replikációs villánál a szülői DNS-szálat elválasztja, a **helikáz**. Az ATP a sejt kémiai energia igényének elsődleges forrása. Amikor az ATP valamilyen enzim hatására ADP-re és foszfátra hidrolizál, tekintélyes energiamennyiség szabadul fel. Az ATP hidrolízisére sok enzim képes. A helikázoknak is van **ATPáz** aktivitásuk, minden bázispár elválasztásához két molekula ATP-t bontanak el.

Egyfonalas DNS-hez kötődő fehérjék

Ha a szülői DNS fonalait helyenként a helikázok már elválasztották egymástól, egy másik fehérje kötődik az újonnan kialakult egyfonalas régiókhoz, és megakadályozza reasszociációjukat. Ez a fehérje az ún. **egyfonalas szakaszokat kötő fehérje** (single-strand-binding protein), röviden **SSB**. Valójában az *E. coli* SSB-fehérjeje kötődik a kétfonalas DNS-hez is, de a kötődés módja eltérő. Ha kétfonalas DNS-hez kapcsolódik, akkor csak egyenként kötődnek molekulái. Amikor azonban egyfonalas DNS-hez kapcsolódik, több molekula kooperatívan kötődik, azaz egy molekula kapcsolódása a lánchoz elősegíti újabb molekulák kötődését. Ennek eredményeként az egyfonalas DNS-hez sokkal erősebb a kötődés, mint a kétfonalashoz. A 7.18. ábra vázolja a helikázok, az SSB-fehérjék és a nukleotidokat polinukleotiddal összekapcsoló DNS-polimeráz enzim aktivitását.

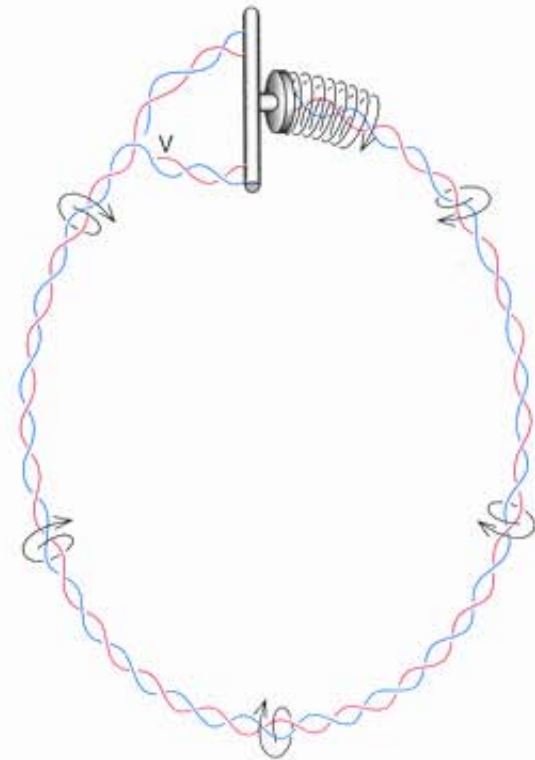
Topoizomerázok

Sokszor úgy beszélünk a DNS fonalainak elválasztásáról, mint egy cipzár szétnyitásáról. Nem szabad azonban megfedkezni arról, hogy DNS nem hasonlít az egyenes, párhuzamos szélű cipzárta, hiszen kettőshélix-szerkezetű. Ezért, amikor a DNS két fonala szétvá-



7.18. ábra. A fonalak szétválása és a DNS-szintézis.
 (a) A DNS-helikáz elválasztja a két szülői szálát, amelyeket azután az egyfonalas DNS-t kötő fehérjék (SSB, sárga gömbök) stabilizálnak.
 (b) A DNS-polimeráz a szülői fonalak komplementereiként építi fel az utódfonalakat. A folyamatban még számos faktor vesz részt

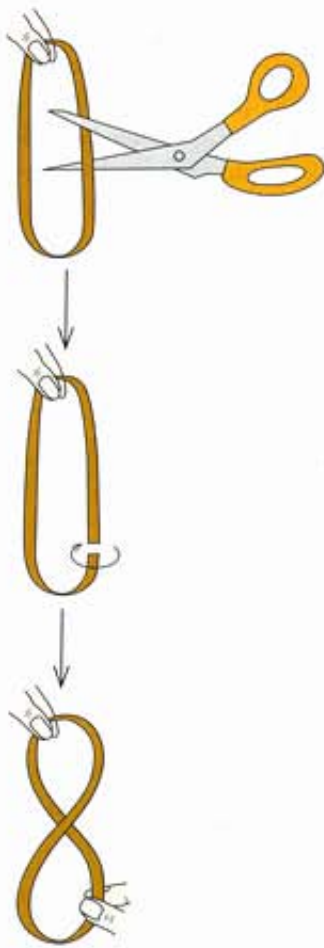
lik, akkor el is kell fordulniuk egymás körül! A helicázok minden bizonnyal elvégeznék ezt a feladatot önállóan is, ha a DNS lineáris és igen rövid lenne, de a gyűrű alakú, önmagukba visszatérő molekulák, mint amilyen az *E. coli* kromoszómája is, speciális problémát vetnek fel. Amikor ugyanis a DNS széttekeredik a replikációs villában, a gyűrű más részein szorosabbá válik a csavarodás. A hélix fél-



7.19. ábra. Cairns „csavaró szerkezet” elmélete. A zárt, körkörös DNS-molekula replikációjakor a két fonálnak szét kell válnia a replikációs villánál (V). A széttekeredés miatt kialakuló feszültséget lazítja a feltételezett mechanizmus. Cairns elképzelése szerint ez a „csavar” egy aktívan forgó szerkezet lehet, amely folytonos forgásával segítené a villánál a fonalak szétválását

tekeredése feszültséget kelt a molekulában, aminek valamilyen módon meg kell szűnnie. Már Cairns is felismerte ezt a problémát 1963-ban, amikor először figyelte meg az *E. coli* gyűrű alakú molekuláját, és felvetette egy „széttekerő szerkezet” jelenlétét a DNS-duplexen, amely lehetővé tenné a DNS-szálak elfordulását a feszültség megszüntetésére (7.19. ábra). Ma már tudjuk, hogy a tekereselés egy enzim, a **DNS-giráz** feladata. A DNS-giráz a **topoizomerázok** csoportjába tartozik. Ezek olyan enzimek, amelyek átmenetileg egy- vagy kétfonalas töréseket hoznak létre a DNS-duplexen, és ezzel lehetővé teszik alakjának vagy topológiájának változását.

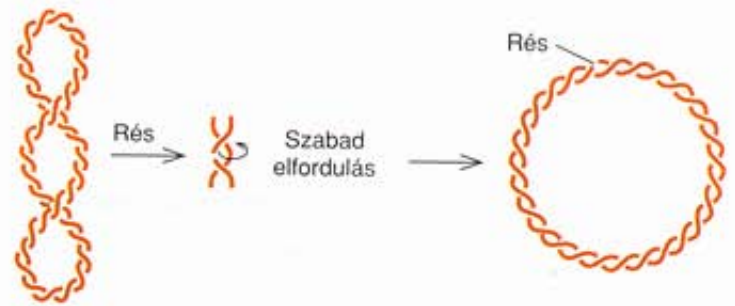
A topoizomerázok működésének megértéséhez vizsgáljuk meg közelebbről a 6. fejezetben már említett szupertekercselt vagy szuperhelikális DNS-t. Minden, a természetben előforduló, zárt, gyűrű alakú, kétfonalas DNS, amelyet eddig vizsgáltak, szuperhelikális szerkezetű volt. Zárt, gyűrű alakú az a molekula, amelyen nincs az egyik fonalat érintő törés, azaz nick. Amikor a sejtben ilyen DNS képződik, a kettős hélix szabályos csavarulatai kissé lazák, a DNS „alultekercselt”. Amíg a molekula mindkét szála ép, nincs lehetőség szabad elfordulásra a kötések körül egyik szál gerince mentén sem, így nincs más mód az „alultekercselt” állapotból adódó feszültség (torzulás) oldására, mint a szuperhélix képződése. Az így kialakult szupertekercset nevezik konvencionálisan negatív szupertekercsnek, ami a vad típusú szervezetekre jellemző. A pozitív szupertekercs csak egyes mutánsokban, illetve *in vitro* létezik.



7.20. ábra. A szupertekercs kialakulásának modellezése gumiszalagon. Ha elvágunk egy gumiszalagot, és egyik végét egy teljes fordulattal eltekerjük, a másikat pedig meggátoljuk a forgásban, akkor a szalagvégek összeillesztésénél fellépő feszülést szupertekercs kialakulása kompenzálja

A szupertekercs kialakulásának folyamatát egy bűvészmutatványhoz hasonló kísérlettel szemléltethetjük (7.20. ábra). Vegyünk egy közepes méretű gumigyűrűt, és egyik kezünkben tartva vágjuk át egy helyen, körülbelül középtájon. Ezután anélkül, hogy elengednénk, a szalag egyik szabad végét csavarjuk el egy teljes fordulattal, és így fogjuk össze a másik szabad véggel. Jól érezhető, ahogyan a gumiszalag ellenáll a forgatásnak, mert feszültség keletkezik benne, ami azzal szűnik meg, hogy egy szupertekercs alakul ki rajta. Minél többször elfordítjuk a szalagot, annál több szupertekercs jön létre, minden egyes teljes fordulatra egy. Ha az elfordítást az ellenkező irányba végezzük, a szupertekercs is az ellenkező irányba fordul. A DNS is hasonló módon viselkedik, de természetesen a gumiszalag nem tökéletes modell. Először is, össze kell fogni a szétvágott, majd összeillesztett végeket, míg a cirkuláris DNS-ben kémiai kötések rögzítik a végeket. Másodszor, a gumiszalag nem kettős hélix.

Ha a mutatvány során elengedjük az összefogott végeket, a szupertekercs kitékeredik. A DNS kettős hélixében csak az egyik szál kell elhasítani ahhoz, hogy a szupertekercselt állapot megszűnjön, mert a másik szál így már szabadon elfordulhat, ahogyan azt a 7.21. ábra szemlélteti.



7.21. ábra. Az egyik szálon ejtett bemetszés hatására a szupertekercselt DNS-molekula relaxált állapotba kerül. Az egyik fonál hasítása (balra) lehetővé teszi a szemközti fonálon lévő foszfodiészter-kötés körüli szabad elfordulást (középen). Ezzel megszűnik az a feszülés, amely miatt kialakult a szupertekercs, és a DNS nyitott, cirkuláris formát vesz fel

A replikációs villánál széttekeredett DNS inkább pozitív, mint negatív szupertekercs alakul ki, ha nincs mód a feszültség megszüntetésére. Ennek oka, hogy a replikáció során folyamatosan széttekeredik a DNS egy szakasza, de rés nem keletkezik rajta. Ez azt eredményezné, hogy a fennmaradó rész túlzottan feltekeredik, tehát ennek ellensúlyozására pozitív szupertekercs alakul ki. Ezt szemlélteti a 7.19. ábrán a replikációs villa előtt látható körbe futó nyíl. Figyeljük meg, miként csavarodik meg a DNS a nyíl irányába a nyíl mögötti rész széttekeredése és a nyíl előtti terület túltekeredése miatt. Képzeld el, hogy ujjunkat a DNS-szálak közé dugjuk, éppen a replikációs villa mögött, majd a villa haladásának megfelelő irányban mozgatjuk, így erőt fejtünk ki a DNS-re, elősegítjük a szálak szétválását. Láthatjuk, hogy ez az erő, miként forgatná el a DNS-t az ábrán látható nyíl irányába, és hogyan vezetne a kettős hélix túlfeszüléséhez. Ez a túlzott feltekeredésből származó feszültség egyre nagyobb erőt fejtene ki az ujjunkra, ahogy haladnánk előre a gyűrű mentén. Tehát a DNS széttekeredése a replikációs villánál pozitív szupertekercs feszülést eredményez, amelynek állandón oldódnia kell, hogy ne akadályozza a replikációt. A jelenséget abból is megérthetjük, hogyan növekszik a gumiszalag ellenállása a tekeréssel szemben, amint egyre szorosabban csavarjuk. Elvben minden olyan enzim részt vehet a szupertekercs oldásában, amelyik oldani tudja a fellépő feszülést. Úgy tűnik, hogy a valóságban az *E. coli* összes topoizomérája közül csak a DNS-giráz alkalmas erre a feladatra.

A topoizomérák osztályozása aszerint történik, hogy egy- vagy kétfonális töréseket idéznek-e elő a DNS-en. Az első osztályba tartozók (*E. coli* topoizoméráz I) egyfonális időleges töréseket hoznak létre. A második osztályba tartozók (topoizoméráz II, *E. coli* DNS-giráz) mindkét DNS-szálat elnyírják, majd újra összekapcsolják. Miért nem alkalmas a topoizoméráz I a replikációhoz szükséges szupertekercs oldására? Azért, mert csak negatív szupertekercs oldására képes, pozitívra nem, pedig a DNS-replikáció során ez képződik a replikációs villa előtt. Nyilvánvaló, hogy az enzim által létrehozott rések nem teszik lehetővé a szabad rotációt egyik irányban sem. A DNS-giráz azonban negatív szupertekercs oldására képes, a zárt, gyűrű alakú DNS-be, ezzel ellensúlyozza a pozitív szupertekercs kialakulására való hajlamot.

Közvetlen bizonyíték is van a DNS-giráz központi szerepére a replikációban. Mindenekelőtt, a két polipeptidből álló

DNS-gírázt kódoló génekben bekövetkező mutáció letális, mivel gátolják a replikációt. Másodsor, egyes antibiotikumok, mint például a novobiocin, a cuomermicin és a nalidixinsav, a DNS-gíráz inhibitorai, ezáltal akadályozzák a replikációt.

A helikázok ATP-energiájának felhasználásával elválasztják egymástól a két szülői DNS-szálat a replikációs villánál. Amikor a helikázok széttekerik a zárt, gyűrű alakú DNS fonalait, pozitív szupercoarulatot létrehozó feszülés alakul ki a DNS-ben. Ennek a feszítőerőnek oldódnia kell, mert gátolja a replikációs villa előrehaladását. A széttekerő mechanizmus minden bizonnyal egy bakteriális topoizomeráz, a DNS-gíráz működésével kapcsolatos. Az egymástól szétválasztott DNS-szálakat az egyfonalas szakaszokhoz kötődő fehérje (SSB) stabilizálja.

A REPLIKÁCIÓ INICIÁCIÓJA

Már láttuk, hogy a replikáció indításának, iniciációjának egyik döntő mozzanata egy rövid RNS-primer szintézise. (Van néhány kivétel is ez alól, nevezetesen az adenovírus, amely egy speciális fehérjével kezdi a DNS-szintézist.) Az RNS-primer kialakítására egy sor mechanizmus szolgál, és ezek közül minden genetikai rendszer egyet használ. *E. coli*-ban mintegy húsz polipeptidből álló komplex vesz részt a primerek képzésében. Ez az ún. **primoszóma** annyira összetett, hogy alkotóinak azonosítása sokkal hosszabb időt vett volna igénybe, ha nem lennének olyan egyfonalas DNS-t tartalmazó fágok, amelyek a primoszómának csak egyes részeit használják fel. Ezeket alkalmazták modellként, amikor az *E. coli* primer képzésének mechanizmusát tisztázták.

A primer szintézise

A replikációs mechanizmus tagjainak, köztük a **primázok**, másként primer szintetizáló azonosítására két különböző kísérleti megközelítést alkalmaztak a fágrendszerekben. Az első egy genetikai-biokémiai módszer, amely során olyan mutánsokat izolálnak, amelyek defektesek a fág DNS replikálásában. Ezután mutáns sejtek kivonatait kiegészítik a vad típusú sejtek fehérjéivel. A mutánsokból készült kivonat nem alkalmas a fág DNS *in vitro* replikálására, kivéve, ha hoz-

záadják a megfelelő vad típusú fehérjét. A rendszert elemzési mintaként használva a kérdéses fehérje nagy tisztaságban előállítható, majd jellemezhető. A második módszer klasszikus biokémiai megközelítés, amelynek során az összes szükséges komponenst tisztítják, majd *in vitro* rekonstruálják a replikációs rendszert (l. 7.1. melléklet).

Az elsőként vizsgált fág replikációs rendszer a lehető legegyszerűbb volt, mégpedig a fonalas M13 fágé. Korábban már említettük, hogy a kísérlet egyik meglepő eredménye az volt, hogy a fág replikációját gátolta a rifampicin, egy olyan antibiotikum, amely az *E. coli* RNS-polimerázának inhibitora. Ez pedig azt jelentette, hogy a fág a gazdasejt RNS-polimerázát használja primázként. Egy másik egyfonalas DNS fág, a G4, ugyancsak gazdaeredetű fehérjét használ a primer szintéziséhez, nevezetesen a *dnaG* gén termékét. Ez ugyanaz a primáz, ami az *E. coli*-ban is működik. Egy másik jól ismert fág, a ϕ X174 is használja az *E. coli* fehérjéinek egy csoportját, köztük a *dnaG* fehérjét (primáz) a primer szintéziséhez. Úgy tűnik, hogy ennek a három példának valamelyike jellemző az *E. coli* összes egyfonalas fágjára. Közülük az utolsó szolgáltatja a legtöbb információt a gazdasejt primoszómájának megismeréséhez, mivel ez a leghasonlóbb hozzá.

Biókémiai és genetikai módszereket is alkalmaztak, hogy azonosítsák a primert szintetizáló rendszer komponenseit az *E. coli* három különböző csoportba tartozó, egyfonalas DNS fágjaiban. Az első csoportba tartozik az M13 fág, amely a gazdasejt RNS-polimerázát használja primerszintézisre. A második csoport képviselője, a G4 fág a gazda primázát (*dnaG* fehérjéjét) működteti. Végül a harmadik csoportba tartozik a ϕ X174, amely egy komplex primoszómát igényel, ami a *dnaG* primázból, és mintegy húsz más, a gazdasejt által termelt polipeptidből áll. Úgy tűnik, ez megegyezik azzal a primoszómával, amely a gazdasejtben is működik.

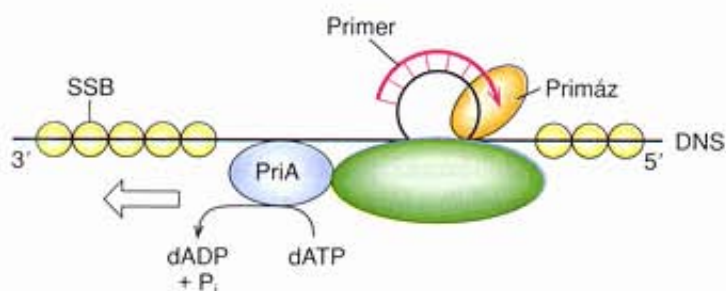
A primerek szintézise *E. coli*-ban

Az *E. coli* replikációs gépezetének ismert elemei rendkívül bonyolult rendszert alkotnak. Most azokkal a fehérjékkel ismerkedünk meg, amelyek a primerek szintézisében közreműködnek.

7.1. A biokémikusok szeretik ízekre szedni a dolgokat

A biokémikusok módszere, nevezetesen az, hogy vizsgálatuk tárgyát alkotó elemekre bontják, majd ismét felépítik, néha tréfálkozásra ad okot. Három kutatót megkérdeztek, hogyan derítenék ki egy karóra működési elvét. A fiziológus elektródokat vezetett az órába, a genetikus mutagén sugárzással bombázta, a biokémikus pedig berakta egy homogenizátorba, és megőrölte. De az elemekre való lebontás, majd az azt követő rekonstrukció általában nagyon eredményes stratégia, természetesen nem

a karórával, hanem a sejtekkel. Arthur Kornberg az alábbi aforizmával támasztotta alá véleményét: „Hiszek abban, hogy amire egy sejt képes, azt egy biokémikus is végre tudja hajtani. Sőt, még jobbat is csinálhat. ...Másként szólva, az ember sokkal könnyebben lehet kreatív egy rekonstruált rendszerrel.” Az *E. coli* replikációjának vizsgálatakor e megközelítési mód ötvözve a genetika módszereivel nagyon gyümölcsözőnek bizonyult.



7.22. ábra. A ϕ X174 DNS-en primert kialakító primoszóma felépítése. A primoszóma komplex $5' \rightarrow 3'$ irányba mozog a templát szálon (üres nyíl), mialatt ellenkező irányban a primert szintetizálja (piros nyíl). A primer tényleges szintézisét a primáz irányítja (narancssárga). A folyamathoz szükséges energiát a PriA fehérje (kék) biztosítja ATP, illetve dATP (ahogy itt is látható) hidrolizálásával. A primoszóma egyéb részeit zöld szín jelöli

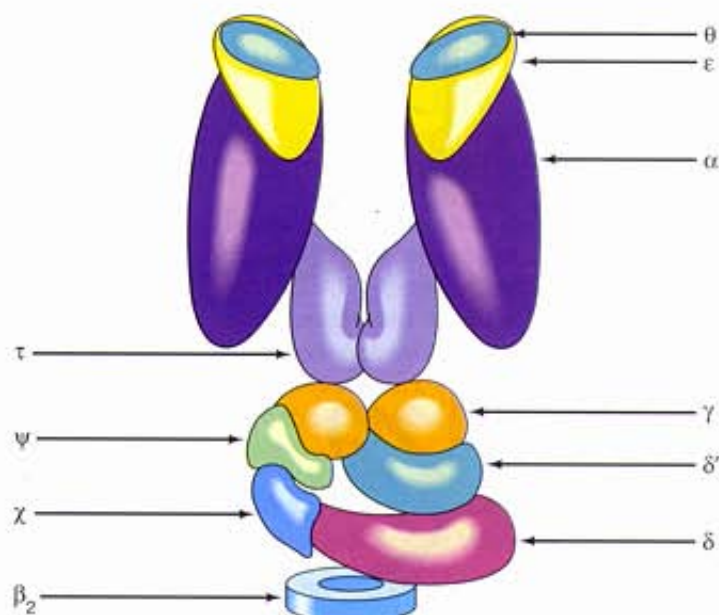
Már foglalkoztunk a primázzal, a primert szintetizáló enzimmel, de még semmit sem mondtunk működéséről. A mindössze 12 nukleotidból álló primerek szintézise, és a hosszú gének transzkripciója között nagyon lényeges különbség van. Ez arra utal, hogy a primáz alapvetően másként működik, mint a transzkripciót irányító RNS-polimeráz.

Ez a feltételezés a primáz aktivitás más sajátágaiból is következik. A kétfonalas DNS replikációja során a primoszóma a követő szál templátja mentén mozog, folyamatosan, a replikációs villa haladásának irányában. A folyamatoság itt azt jelenti, hogy nem disszociál le a DNS-ről. Előnyösebb, ha a primoszóma a követő szál templátjához kötődik, mivel azon a szálon a DNS-szintézis szakaszokban történik, azaz új primerek szükségesek minden egyes Okazaki-fragmentumhoz. Ez azonban felvet egy problémát a primáz működésével kapcsolatban, hiszen a replikációs villa mozgásának iránya a követő szál templátján $5' \rightarrow 3'$, amiből az következne, hogy a primer $3' \rightarrow 5'$ irányban szintetizálódik. Ugyanakkor tény, hogy az RNS-ek, így a primerek is, $5' \rightarrow 3'$ irányban szintetizálódnak! A primer szintézise is $5' \rightarrow 3'$ irányú, annak ellenére, hogy a primoszóma haladási iránya ezzel ellentétes (7.22. ábra). A folyamat pontos mechanizmusa még nem ismert.

A primoszóma az *E. coli* összetett, számos polipeptidből álló struktúrája, amely a DNS-replikációhoz szükséges primereket építi fel. Egyik alkotóeleme a primerek szintézisét végző primáz. Az *E. coli* DNS-ének replikációja során a primoszóma a követő szál templátja mentén mozog, és ezzel ellentétes irányban szintetizálja a primert.

AZ ELONGÁCIÓ

Amikor a primoszóma elkészítette a primert, megkezdődhet a folyamatos szintézis, az elongáció. A folyamat kulcsenzime a **DNS-polimeráz III holoenzim**, amely tíz különböző polipeptid komplexe (7.23. ábra). A „holoenzim” jelentése „teljes enzim”, tehát magába foglalja az aktív centrumot (ez esetben a DNS-szintézisét), valamint



7.23. ábra. Az *E. coli* DNS-polimeráz III holoenzim modellje. Felül található a két polimeráz aktivitással rendelkező centrum (α , ϵ és θ alegységek). Ezeket két τ alegység kapcsolja a γ komplexhez (γ , δ , δ' , χ és ψ alegységek). Az alsó részen helyezkedik el a β kapocs, amely két β alegységből áll (a rajzon nincsenek megkülönböztetve)

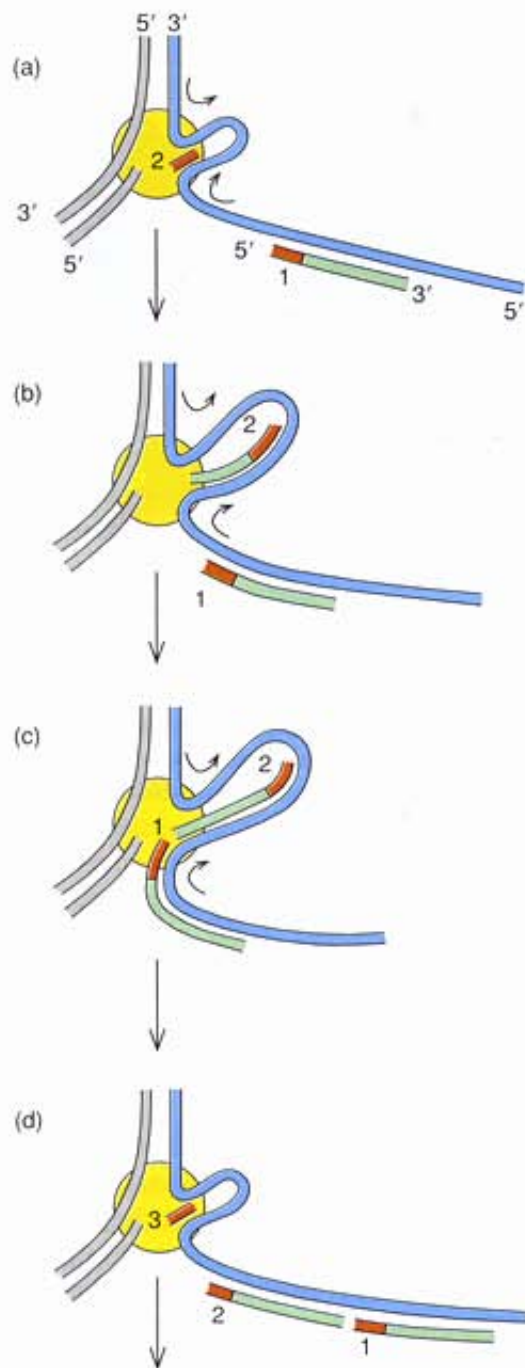
azokat a járulékos faktorokat, amelyek részt vesznek a reakcióban. Nem tudjuk biztosan, csak feltételezzük, hogy a DNS-polimeráz III holoenzim kapcsolódik a primoszómához, és ún. **repliszómát** hoz létre, amely a DNS-lánc folyamatos szintéziséért felelős.

Az *E. coli* repliszómája

Az elongáció folyamatának elemzésekor azonnal felmerül egy fontos kérdés: Hogyan koordinálja a repliszóma a vezető és a követő szál szintézisét? Elsőre úgy tűnik, hogy mindegyik replikációs villa két repliszómát igényel, mindegyik szál mentén egyet-egyét, vagy pedig a repliszóma annyira flexibilis, hogy egyszerre képes a két szálon irányítani a szintézist, mégpedig ellentétes irányban.

Ugyanakkor az egyfonalas DNS sokkal rugalmasabb a fehérjékénél, így nem elképzelhetetlen, hogy a követő szál templátja áthurkolódik a repliszómán, ahogyan az a 7.24. ábrán látható. Ha ez megtörténik, amint azt Kornberg is feltételezte, akkor a repliszóma egyszerre leolvashatja mindkét szálát, mert mindkettő növekedhet ugyanazon a repliszóma komplexen. A vezető szál templátja a repliszóma tetejénél, a követő szál pedig az aljánál léphet be, ami hurokképződéssel jár. Ez egyben azt is jelenti, hogy a repliszóma egy aszimmetrikus dimer. Egyik monomerje szintetizálja a vezető szálát, míg a másik a követő szálát. Ez megfelel annak a megfigyelésnek, hogy a DNS-polimeráz III holoenzim két DNS-polimeráz aktív centrumot tartalmaz. A repliszómában tehát a valóságban két leolvasó fej van.

A modell nagy előnye, hogy ily módon egyetlen repliszóma képes a két szál folyamatos megkettőzésére anélkül, hogy leválna a replikációs villáról. Ez pedig fontos, mert ha egyszer ledisszociál a DNS-ről, akkor újrakötődése sok időt vesz igénybe. Ennek megítéléséhez gondoljunk bele, hogy az elongáció sebessége *E. coli*-ban mintegy 1000



7.24. ábra. A két DNS-szál egyidejű szintézisének modellje. (a) A késlekedő szál templátja (kék) hurkot képez a replizómán (sárga), és a primáz kialakítja a 2-es számmal jelzett új primert (piros). A korábban szintetizált Okazaki-fragmentum zöld színű, rajta az 1 számú piros primerrel. A vezető szál templátját és az utódszálát (szürke) balra tüntettük fel, de a szál növekedését nem részleteztük. (b) A követő szál templátja még nagyobb hurkot képez, áthatolva a replizómán, felülről és alulról, ahogyan azt a nyilak jelzik. A hurok alsó részének mozgása (alsó nyíl) lehetővé teszi a második Okazaki-fragmentum elongációját. (c) A második Okazaki-fragmentum vége az elongáció eredményeként az első Okazaki-fragmentum primerjével szomszédos helyzetbe kerül. (d) A replizóma kiengedi a hurkot, benne az 1 és 2 Okazaki-fragmentumokkal, és egy új hurkot képez, amin a primáz újabb primert (3-as számú) szintetizálhat. A folyamat ismét kezdődhet előlről.

nukleotid másodpercenként, az iniciációs komplex kialakulásához szükséges idő pedig 1-2 perc. Ez azt jelenti, hogy az alatt az idő alatt, amíg a replizóma működése a visszakötődés miatt szünetel, legalább 60 000 nukleotid épülne be a láncba az elongáció során. Valamennyi időt a fentiekben vázolt hurokképzés és kioldás is igényel, de ez a molekulán belüli áthelyeződés a másodperc tört része alatt lejátsszódik.

Az *E. coli* sejtjei a DNS-polimeráz I és a DNS-polimeráz III mellett egy harmadik enzimet is tartalmaznak, a DNS-polimeráz II-t. Ennek az enzimnek a szerepe még nem egészen világos, szemben a másik két enzimmel. A polimeráz II génjére mutáns sejtek életképessége meglepően jó.

Az *E. coli* DNS-szintézise során az elongációhoz replizóma szükséges, ami primoszómából és DNS-polimeráz III holoenzimből áll. Ez utóbbi legalább tíz különböző polipeptid komplexe. Kornberg modellje szerint a két szálon egyidejűleg folyik a replikáció, aminek feltétele, hogy a replizómának két DNS-polimeráz aktivitású centruma legyen. Az egyik folyamatosan szintetizálja a vezető szálát, míg a másik szakaszosan a követő szálát anélkül, hogy közben leválna a replikációs villáról.

Az eukarióták DNS-polimerázai

Sokkal kevesebb ismeretünk van az eukarióták DNS-ének megkötődésében közreműködő fehérjékről, de azt már tudjuk, hogy több DNS-polimeráz is részt vesz benne, amelyek szerepéről aránylag pontos képünk van. Az emlősök ismert DNS-polimerázainak felsorolását és azok feltételezett szerepét a 7.1. táblázat foglalja össze.

Milyen alapon feltételezzük, hogy a polimeráz α felelős a késlekedő szál, míg a polimeráz δ (és talán a polimeráz ϵ) a vezető szál szintéziséért? Legalább két bizonyíték utal erre a lehetőségre. Először is, a polimeráz δ az egyetlen az öt enzim közül, amelyiknek primáz aktivitása van. Ez alapvető követelmény a követő szál szintetizáló enzimmel szemben, hiszen a szakaszosan felépülő fonál mindegyik Okazaki-fragmentuma RNS-primerrel kezdődik. Másrészt – legalábbis az elmélet szerint – a folyamatosan felépülő vezető szál szintéziséhez csak egy primer szükséges, ezért a folyamatot irányító enzim primáz aktivitása kevésbé lényeges.

7.1. táblázat. Az emlősök DNS-polimerázai és azok szerepe

Enzim	Feltételezett funkció
DNS-polimeráz α	DNS replikáció: a késlekedő szál szintézise
DNS-polimeráz δ	DNS replikáció: a vezető szál szintézise
DNS-polimeráz ϵ	Ismeretlen, szerkezete hasonló a polimeráz δ -hez
DNS-polimeráz β	DNS hibajavitása
DNS-polimeráz γ	A mitokondriális DNS replikációja

Ráadásul, nagyon nagy a különbség a polimeráz α és β processzivitásában. A **processzivitás** azt fejezi ki, milyen mértékben hajlamos az enzim a replikáció folytatására, ha már egyszer elkezdte. Az *E. coli* polimeráz III holoenzim nagy processzivitású, vagyis miután elindult egy DNS-szálon, kötődik a templáthoz, és hosszú időn át folytatja a szintézist. Mivel ritkán válik le a templátról, az *E. coli* DNS-ének replikációja nagyon gyors, hiszen kevés az új polimeráz bekötődése és működésének megkezdése miatt fellépő idővesztés. A polimeráz δ processzivitása lényegesen jobb, mint a polimeráz α -é. Ezért valószínű, hogy a polimeráz α a követő szálat szintetizálja, hiszen ennek az enzimnek le kell válnia, és újra kell indulnia minden egyes Okazaki-fragmentum kezdetekor. A nagy processzivitású polimeráz δ a vezető szál szintézisében vehet részt, hiszen ez a szál folyamatosan, disszociáció nélkül képződhet. Jelen esetben a processzivitás nem a polimeráz δ sajátossága, hanem egy hozzá kapcsolódó fehérjéé, az ún. **proliferáló sejtmagi antigéné (PCNA)**. Ez a fehérje nagy mennyiségben található az erőteljesen növekvő, más szóval proliferáló, élénk DNS-szintézist folytató sejtekben, és mintegy 40-szeresére növeli a polimeráz δ processzivitását. Azaz hatására a polimeráz δ 40-szer akkora távolságot tesz meg az elongáció során, mielőtt leválna a templátról.

Ezzel éles ellentétben, a polimeráz β egyáltalán nem mutat processzivitást. Mindössze egyetlen nukleotidot ad a növekvő DNS-lánchoz, majd le is válik róla. A következő nukleotid beépítéséhez új polimeráznak kell kötődnie. Ez megfelel a polimeráz feltételezett szerepének, hiszen a javító enzimnek csak rövid DNS-darabokat kell beépítenie a primer kihatása után keletkező hézagba, vagy ki kell cserélnie a hibásan beépült bázisokat (l. 11. fejezet). Ráadásul a polimeráz β mennyiségét a sejtben nem befolyásolja a sejtosztódási ráta, vagyis az enzim nem kapcsolódik szorosan a replikációhoz. Ha kapcsolódna, akkor a gyorsan osztódó sejtekben várhatóan nagyobb arányban kellene jelen lennie, ugyanúgy, mint a polimeráz δ és α esetében.

A polimeráz γ -t a mitokondriumokban találták meg, nem a sejtmagban. Ebből arra következtethetünk, hogy a mitokondriális DNS replikációjában vehet részt.

Az emlősök sejtei ötféle DNS-polimerázt tartalmaznak. A polimeráz δ és α a DNS replikációjában szerepel, a vezető, illetve a követő szál szintézisében. A polimeráz β valószínűleg a DNS-szintézis javító mechanizmusában vesz részt, míg a polimeráz γ a mitokondriális DNS megkettőződésében. A polimeráz ϵ szerepe még ismeretlen.

A replikáció gördülő gyűrű modellje

Egyes gyűrű alakú DNS-molekulák nem a már elemzett théta-szerkezettel replikálódnak, hanem az ún. **gördülő gyűrű mechanizmussal** (rolling circle). A lambda (λ) fāgra valójában mindkét mechanizmus jellemző. Replikációjának korai szakaszában a théta-modellt követi, amelynek során több példány cirkuláris DNS-molekula készül. Ezek azonban nem csomagolódnak



7.25. ábra. A lambda fāg replikációjának gördülő gyűrű modellje. Amint a gyűrű alakú DNS jobbra gördül, a vezető szál (piros) folyamatosan replikálódik. A késlekedő szál (kék) szakaszosan szintetizálódik, a legördülő vezető szálat használva templátként. Az így keletkező kétfonalas utód molekulák többgenomnyi hosszúságot is elérnek (ún. konkatemer), mielőtt megfelelő méretű darabokra hasadnának és becsomagolódnának a fāg feji részébe

fāgrészecskébe, hanem templátként szolgálnak a lineáris λ DNS-molekulák szintéziséhez, amelyek azután már becsomagolódnak.

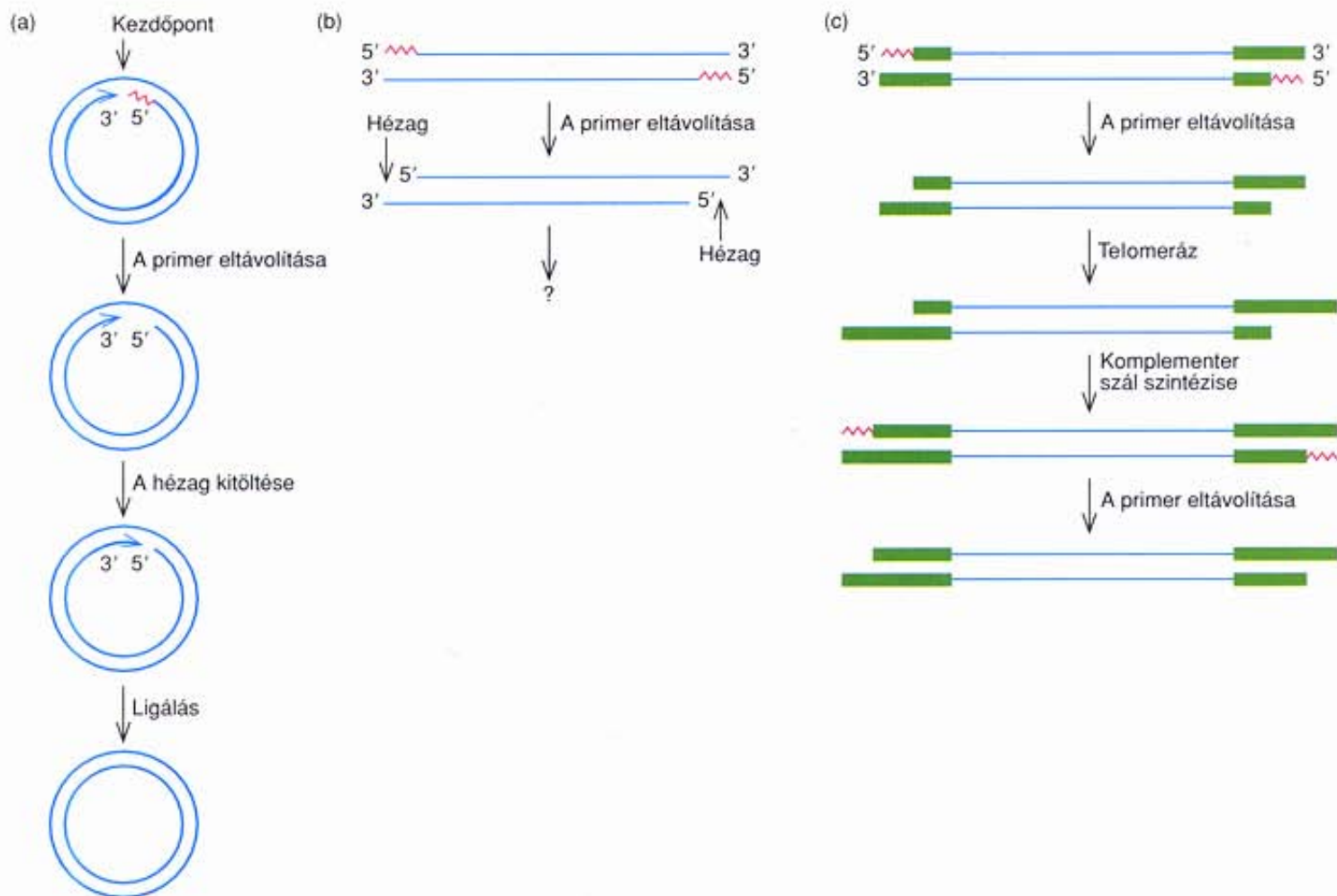
A gördülő gyűrű modellt a 7.25. ábra szemlélteti. A replikációs villa működése hasonló az *E. coli*éhoz, vagyis a vezető szálon folyamatos a szintézis (a kör mentén futó szál), míg szakaszos a késlekedő szálon. Nem nehéz rájönni, mire utal a gördülő gyűrű elnevezés. A replikálódó DNS úgy képzelhető el, mint egy tekercs papír, amint letekeredik a földre. A letekeredett rész jelenti a növekvő kétfonalas utód DNS-t. A lambda fāgban az utód molekulák hossza a becsomagolás előtt a genom méretének többszöröse is lehet. Az ilyen többszörös hosszúságú DNS-molekulák a **konkatemek**. A becsomagolás során a lineáris DNS-nek csak egy genom hosszúságú szakasza kerül a fāg feji részébe, tehát a konkatemer feldarabolódik. A gördülő gyűrű mechanizmust **szigma típusú replikációnak** is nevezik, mert a köztes forma hasonló a görög szigma betűre (σ).

A cirkuláris egyfonalas DNS fāgok, mint például a $\phi\chi 174$, szintén a gördülő gyűrű mechanizmussal replikálják DNS-üket (l. 15. fejezet). Először egy kétfonalas, ún. replikatív formát szintetizálnak, amelynek egyik szála templátként szolgál a másik szál nagyszámú kópiájának szintéziséhez. A replikáció meglehetősen hasonlít a 7.25. ábrán vázoltéhoz, csak nem készül farki rész az újonnan képződött vezető szálról.

A cirkuláris DNS megkettőződhet gördülő gyűrű, más néven szigma mechanizmussal is. A kétfonalas DNS egyik szálán hasítás történik, és a szintézis a 3'-végtől indul, templátja az ép, törést nem tartalmazó szál. A szintézis leszorítja az 5'-véget a kétfonalas részről. A lambda fāgban a leszorított szál ezután templátként szolgál a szakaszosan szintetizálódó követő szálnak.

A TERMINÁCIÓ

A replikáció befejezésekor a sejtnek ki kell töltenie a primerek eltávolítása után maradt hézagokat. A gyűrű alakú DNS-molekulák esetében, mint amilyen a baktériumoké is, ez nem jelent problémát, mivel mindig található felette szabadon egy 3'-vég, amely primerként szolgál (7.26.(a) ábra). De mi a helyzet az eukarióták lineáris kromoszómáival? Ha mindegyik szálról eltávolítjuk az első primert (7.26.(b) ábra), akkor nincs mód a vissza-



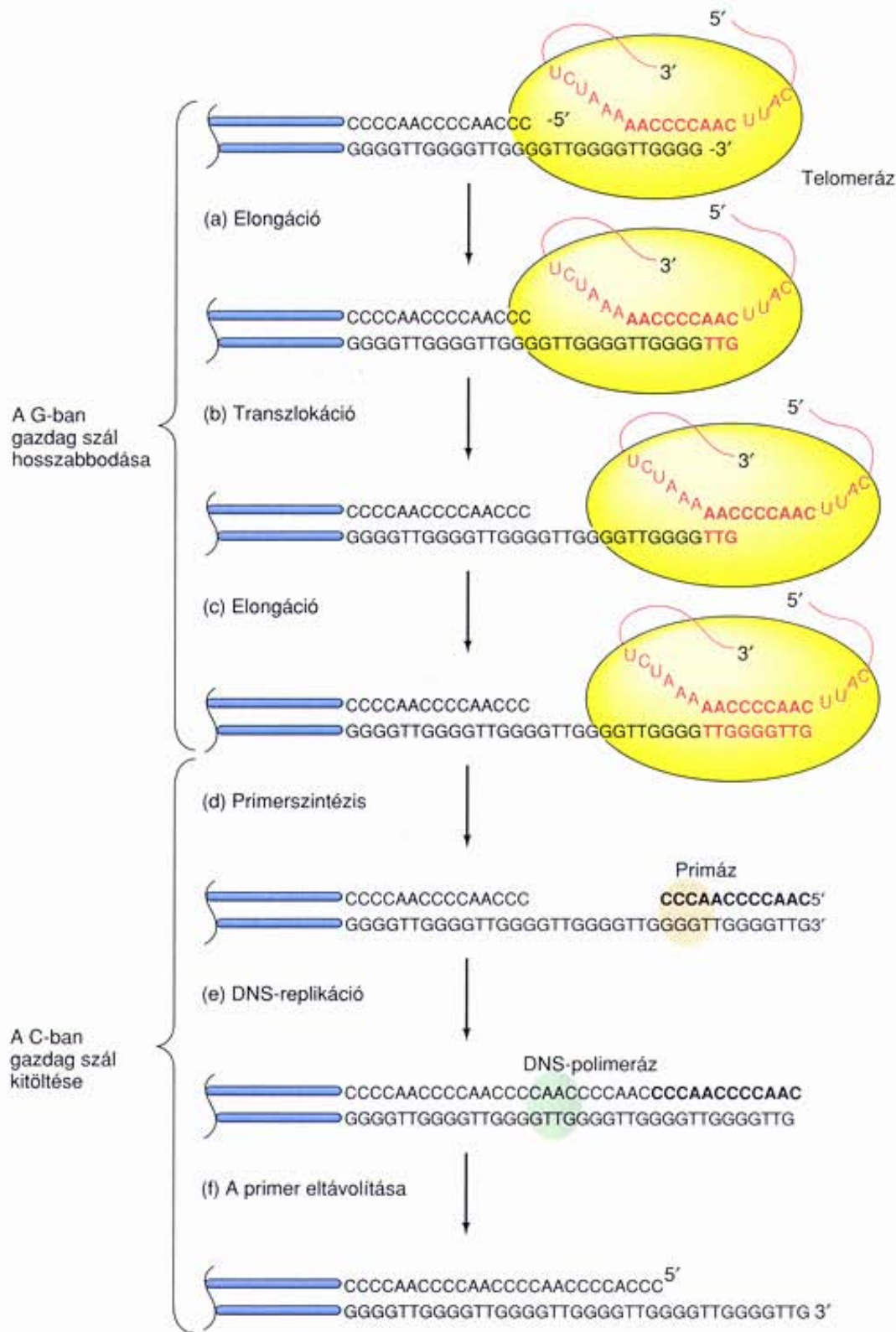
7.26. ábra. A primer eltávolításával keletkező hiány (hézag) pótlása. (a) Prokariótáknál a gyűrű alakú DNS-molekula egyik fonalán a 3'-végtől megindulhat a DNS-szintézis, amely befoltozza az első primer (piros) eltávolításakor keletkező hézagot. Az egyszerűség kedvéért csak az egyik replikálódó szálát ábrázoltuk. (b) Hipotetikus modell annak bemutatására, mi történik, ha a primerek egyszerűen lehasadnak a lineáris DNS-molekula 5'-végéről, és a telomeráz nem pótolja azokat. Belátható, hogy ez esetben a kromoszómavégeken kialakuló hézagok minden egyes replikáció után hosszabbodnának. (c) A telomeráz működése. Az első lépésben a primerek (piros) lehasadnak az 5'-végekről, hézagokat hagyva. A második lépésben a telomeráz telomera DNS-t (zöld szakaszok) kapcsol a másik szál 3'-végéhez. A harmadik lépésben DNS-szintézis történik, amelyhez az új telomera DNS szolgál templátként. A negyedik lépésben lehasadnak az előzőleg kialakult RNS-primerek. Ezek az utoljára kialakuló hézagok megmaradnak, de a telomeráznak köszönhetően nettó DNS-vesztéség nincs. Az ábrán a telomerek nem méretarányosak a primerekkel, a valóságban az ember telomerái több ezer nukleotid hosszúságúak

maradó hézag kitöltésére, hiszen nincsen szabad 3'-vég, mint a gyűrű alakú molekulán, és a DNS-t nem lehet 5' → 3' irányban pótolni. Ha nem lenne más mechanizmus ennek a problémának a megoldására, a DNS-szálak minden replikációval egyre rövidebbé válnának, ami gének elvesztéséhez vezetne. Mi lehet a megoldása ennek a problémának?

A kérdésre Elizabeth Blackburn és kollégái adták meg a választ, amelynek összegzése a 7.26.(c) ábrán található. Az eukarióta kromoszómák telomerái, azaz végei, nem tartalmaznak géneket, hanem rövid, GC-ben gazdag ismétlődő, fajspecifikus szekvenciákból állnak. A *Tetrahymena* csillós egysejtűben például TTGGGG/AACCCC; a gerincesekben, beleértve az embert is, TTAGGG/AATCCC. Ezek a 3'-vég legszűkebb részéhez nem szemikonzervatív replikációval kapcsolódnak, hanem a **telomeráz** enzim révén. Ha a telomeráz nem követi a szemikonzervatív replikációs mechanizmust, akkor nem használhatja az egyik

DNS-szál templátként a szintézishez. Miként alakul ki mégis a telomerák specifikus szekvenciája? Blackburn kimutatta, hogy a specifikusság magának a telomeráznak köszönhető, mivel az enzimben egy rövid RNS-szakasz található. A *Tetrahymena* telomerázában például egy 159 nukleotidos RNS-szakasz van, amely a CAACCCCAA szekvenciát tartalmazza. Ez az RNS-szakasz szolgál templátként a *Tetrahymena* ismétlődő TTGGGG szekvenciák kialakításához (7.27. ábra). Ezzel a termináció kérdése úgy tűnik megoldódott, a telomeráz a rá jellemző ismétlődő szekvencia sok kópiáját hozzákapcsolja a kromoszóma 3'-végéhez, így az ellenkező szál szintézise megindulhat a telomerában. Nem okoz problémát, ha a primer az 5'-végnél leválik, és nem pótlódik, mert csak telomeraszekvenciák vesznek el, amelyeket a következő replikációs körben a telomeráz helyettesít.

A közelmúltban felfedezték, hogy az emlősök szabályos, szomatikus sejtjeiben nincs telomeráz, míg az ivarsejtjeiben van.



7.27. ábra. A *Tetrahymena* telomeráinak kialakulása. (a) A telomeráz (sárga) templát RNS-e (piros) és a telomera 3'-végének G-ban gazdag szakasza között hibridizáció történik. A telomeráz RNS-ének három bázisa (AAC) templátként szolgál három bázis (TTG, vastagon szedve) kapcsolódásához a telomera 3'-végéhez. (b) A telomeráz áthelyeződik a telomera 3'-végéhez, miközben templát RNS-ének bal oldali AAC nukleotidjai bázispárt alakítanak ki a telomera újonnan beépült TTG szakaszával. (c) A telomeráz további hat nukleotidot (GGGGTTG) kapcsol a telomera 3'-végéhez a templát RNS alapján. A fent vázolt lépések (a-c) többször ismétlődnek, ezért a telomera G-ban gazdag vége meghosszabbodik. (d) Amikor a G-ban gazdag szakasz megfelelő hosszúságot ér el (valószínűleg jóval hosszabb, mint az ábrán), a primáz (narancssárga) RNS-primert (vastagon szedve) alakít ki, ami komplementer a telomera G-ban gazdag 3'-végével. (e) A DNS-polimeráz (zöld) az új primer segítségével megkezdi a DNS-szintézist, kitölti a hézagot a telomera C-ban gazdag szálán. (f) A primer eltávolítása után 12-16 bázis hosszúságú párosítatlan szakasz marad a G-ban gazdag szálon

7.2. A telomerák, a Hayfick-határ és a rák

Mindenki tudja, hogy az élőlények, köztük az ember is, halandók. A biológusok azonban feltételezték, hogy a kultúrában tenyésztett emberi sejtek halhatatlanok. Természetesen végül az egyes sejtek elhalnak, de a sejtvonala meghatározatlan ideig tovább osztódhat. Az 1960-as években Leonard Hayflick felfedezte, hogy a szabályos emberi sejtek nem halhatatlanok. Véges ideig, mintegy 50 generáción át tarthatók fenn tenyészetben. Ezután belépnek az öregedési periódusba, majd elpusztulnak. A normál sejtek életidejének ez a felső határa az ún. Hayflick-határ. A rákos sejtek azonban nem engedelmessé válnak, megkezdik a megújulást. Meghatározatlan ideig osztódnak, generációkon keresztül.

A kutatók lényeges különbséget találtak a normál és a rákos sejtek között, ami megmagyarázhatja, miért halhatatlanok a rákos sejtek, és a normál sejtek miért nem. A rákos emberi sejtek telomerázt tartalmaznak, míg a normál sejtekből ez az enzim hiányzik. (Az ivarsejtekben természetesen kell lennie telomeráznak, hogy

a következő generációnak átadandó kromoszómák végeit megőrizzék.) A rákos sejtek tehát minden replikáció után kijavíthatják telomeráikat, míg a legtöbb normál sejt nem. Így a rákos sejtek folytathatják osztódásukat anélkül, hogy kromoszómáik rövidülne, de a szabályos sejtek kromoszómái minden sejtosztódással rövidebbek lesznek. A genetikai állományban fellépő veszteség előbb vagy utóbb gátolja a sejtek replikációját, tehát elpusztulnak. A rákos sejtek a telomeráz segítségével megmenekülnek ettől.

Az egyik alapvető változás, ami bekövetkezik egy sejt rákos átalakulásakor, a telomeráz gén reaktiválódása. Ez a halhatatlanság feltétele, ami a rákos sejtek ismertetőjegye. Ez a fejtegetés felveti a rák kezelésének egy lehetséges módját is: ki kell kapcsolni a transzformált sejtek telomeráz génjét, vagy találni kell egy olyan gyógyszert, ami gátolja a telomerázt. Ez a gyógyszer nem zavarná a normál sejtek legnagyobb részét, hiszen azoknak nincs telomerázuk. A rákkutatók egyik fő stratégiája ma éppen ez.

Ezenfelül a rákos sejtekben is működik a telomeráz. Ez a tény alapvető lehet a rákos sejtek tulajdonságait és szabályozásukat tekintve (l. 7.2. melléklet).

Az eukarióták kromoszómavégeit a telomeráz enzim alakítja ki, azaz saját RNS-templátja alapján a DNS 3'-végéhez ismétlődő szekvenciákat kapcsol. A kromoszómavégek így történő megújulása ellensúlyozza a telomera DNS-elvesztését a sejtosztódások alkalmával.

A REPLIKÁCIÓ PONTOSSÁGA

Az eddigieket végiggondolva, felmerülhet a kérdés: „Miért ilyen bonyolult a DNS megkettőződése? Mi az előnye a szemidiszkontinuus megkettőződésnek és az RNS-primereknek?” A válasz az, hogy ezek a bonyolult mechanizmusok egy nagyon fontos dologgal járulnak hozzá az élethez: pontos, hűséges DNS-másolat készítésével. Gondoljuk végig ennek az ellenkezőjét! Mi lenne a következménye, ha kromoszómáink megkettőződésekor, a DNS-szintézis során a replikációs mechanizmus sok hibát vétene? Ezek a hibák mutációk, amelyek minden egyes sejtosztódással halmozódnának. Már láttuk, hogy a mutációk gyakran végzetesek, ezért az élet nem viselne el túl sokat belőlük. Más szóval, kevésbé hűséges replikáció esetén csak sokkal kisebb méretű genomunk lehetne, ez ugyanis csökkentené a generációnként bekövetkező mutációk számát. Így az élet összetett, sok génen alapuló formái nem alakulhatnának ki.

Mennyire megbízhatók a DNS-polimerázok a helyes bázis-párok kialakításában? Az *E. coli* DNS-polimeráz III holoenzime *in vitro* átlagosan minden százezredik bázispárra ejt egy párosítási hibát, ami nem éppen jó eredmény, figyelembe véve, hogy az

E. coli genomja mintegy hárommillió bázispárból áll. Ilyen arány esetén a replikáció a gének szignifikáns százalékában hozna létre hibákat minden egyes generációban. Szerencsére a DNS-polimeráz III holoenzimnek van saját, 3' → 5' exonukleáz saját-ságon alapuló „korrektor” aktivitása, aminek eredményeként csak tízmillió nukleotid beépítésére esik egy-egy hiba.

A korrekciós mechanizmus működését a 7.28. ábra szemlélteti. A repliszómában a DNS-polimeráz III holoenzim csak akkor adja a növekvő polinukleotid-lánchoz a következő nukleotidot, ha az előző helyesen illeszkedik. Ez kritikus követelmény, hiszen azt jelenti, hogy a polimeráz nem épít be hibás nukleotidot. Emellett, ha a repliszóma nem a megfelelő nukleotidot illeszti be, a folyamat leáll, amíg a hiba javítása meg nem történt. Az enzim 3' → 5' exonukleáz aktivitása révén kivágja a hibásan párosított nukleotidot, valószínűleg néhány szomszédos nukleotiddal együtt. Szabályos bázispárosodású primerrel helyreállítja a hiányt, így a replikáció folytatódhat.

Vizsgáljuk meg az ellenőrző mechanizmus következményeit. Azonnal érthetővé válik, miért szükséges a primer. Ha a DNS-polimeráz csak bázispárosodásban álló nukleotidhoz tudja hozzáfűzni a következőt, világos, hogy primer nélkül nem tud új DNS-láncot elkezdni. De miért RNS-ből állnak a primerek? Úgy tűnik, az ok a következő: A primerek korrekciós mechanizmus nélkül szintetizálódnak, ezért szintézisük során több hibát halmoznak fel. Az RNS-ből álló primerek biztosan felismerésre kerülnek, kihasadnak, és a szomszédos Okazaki-fragmentum folytatásaként DNS-sel pótlódnak. Az utóbbi folyamat természetesen többé-kevésbé hibamentes. Az ilyen elméleti megfontolások mellett ott áll az az egyszerű tény is, hogy az RNS-szintetizáló enzimek primer nélkül is képesek elindulni, míg a DNS-polimeráz nem.

A korrekciós mechanizmus segít a replikáció szemidiszkontinuus jellegének megértésében is. Ha a polimeráz képes lenne



7.28. ábra. Javítás a DNS-replikáció során. (a) Egy adenin nukleotid (piros) hibásan épült be a guaninnal szemben. Emiatt nem lehetséges tökéletes bázispárosodás a primer 3'-végénél, ezért a replikációs mechanizmus leáll. (b) A polimeráz III holoenzim 3' → 5' exonukleáz aktivitása eltávolítja a hibásan beépült nukleotidot. (c) A megfelelő bázispárok helyreállítása után a polimeráz III holoenzim folytatja a replikációt

3' → 5' irányú szintézisre, ami lehetővé tenné mindkét szál kontinuos megkettőződését, akkor szükség lenne egy 5' → 3' irányú javító mechanizmusra is, azoknak az 5'-trifoszfátoknak a helyreállításához, amelyek az ilyen típusú korrekció során megsérülnek. A szemidiszkontinuos replikáció, bármily bonyolultnak is tűnik, valószínűleg egyszerűbb.

A pontos DNS-replikáció létfontosságú. A hűsége megkettőződést segíti a replikációs gépezet saját korrekciós rendszere, ami primereket igényel. A replikációs enzim primere csak bázispárban álló nukleotid lehet. Ezenkívül, ha véletlenül hibás beépülés történik, a replikáció leáll, amíg a nukleáz ki nem vágja a hibás nukleotidot néhány utoljára beépített nukleotiddal együtt. Az a tény, hogy a primerek RNS-ből állnak, már jelölést is jelent degradációjukhoz.

AZ RNS-GENOMOK REPLIKÁCIÓJA

A DNS replikációs rendszerének nagyfokú pontossága éles ellentétet mutat az RNS-ből álló genomok megkettőződésével. Már láttuk, hogy az RNS-szintetizáló enzimeknek nincs szükségük primerre, és így nincs lehetőség korrekcióra sem. Ezen felül az RNS sokkal kevésbé stabil molekula, mint a DNS, mivel a ribóz 2'-hidroxilcsoportja lehetővé teszi a foszfodiészterkötés elbomlását (7.29. ábra). A javítási mechanizmus hiánya és az instabil szerkezet összességében súlyos korlátokat jelent az RNS-genomok esetében. Nem lehetnek túlságosan nagyok, ellenkező esetben a magas hibaarány (1000-10 000 nukleotidonként egy) tönkreteszi őket. Ezért nem meglepő, hogy a legnagyobb ismert RNS-genom (egy coronavírusban) egyfonalas molekulája mindössze 25 000 bázisból áll. Ugyancsak nem váratlan, hogy az evolúció a DNS-t részesítette előnyben, mint a genetikai információt hordozó anyagot.

A kis méret ellenére az RNS-vírusok genomja gyorsan változik a replikáció során fellépő hibák miatt. Ez egyben veszélyessé is teszi az RNS-vírusokat, mivel gyorsan változnak, így kijátszhatják gazdaszervezetük immunrendszerét. Így például a HIV genomja is nagyon változékony, ezért komoly nehézséget jelent az összes HIV-változattal szemben hatékony oltóanyag, illetve gyógyszer kifejlesztése.

Az RNS-ből felépülő genomok hibajavító rendszer nélkül replikálódnak. A tökéletlen replikáció következtében fellépő hibák miatt méretük erősen korlátozott. Az RNS-vírusok nagyon változékonyak, ezért képesek gazdaszervezetük védekező rendszerének kijátszására.

A REKOMBINÁCIÓ MECHANIZMUSA

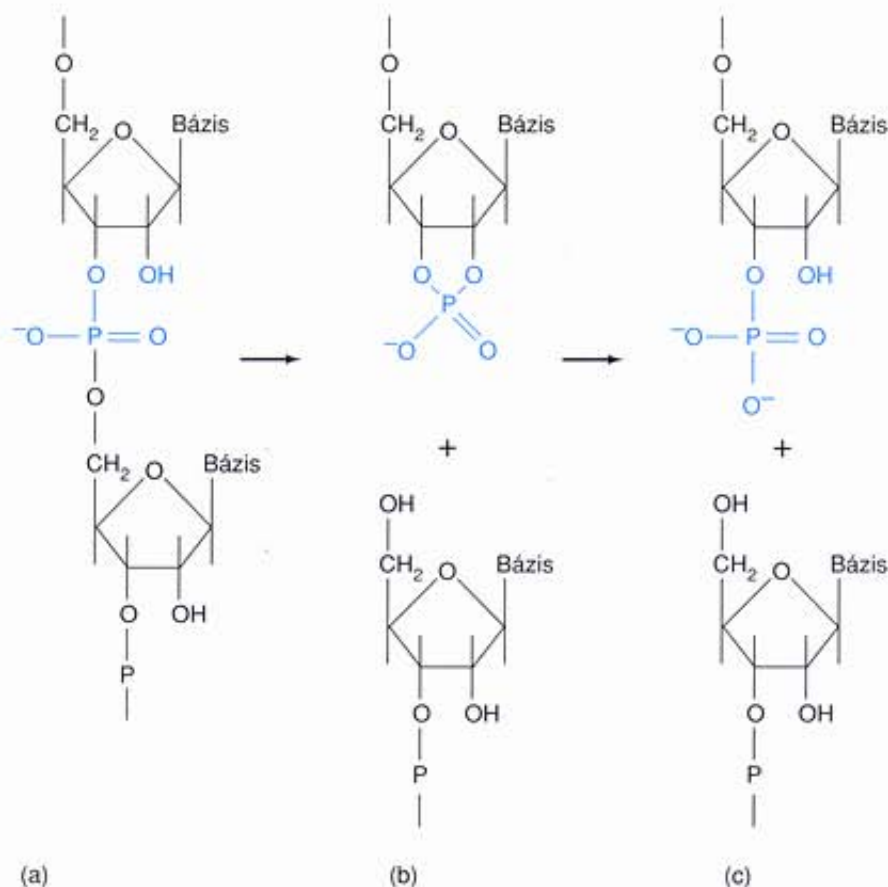
Számos példát láttunk már arra, hogy az utódok a szüleikétől eltérő génkombinációkat hordozhatnak. Ez a tény kétféle mechanizmussal is magyarázható. Először is, a 2. fejezetben tárgyaltuk, hogy a különböző kromoszómákon lévő gének egymástól függetlenül öröklődnek. Másodsor, a 4. fejezetben bemutattuk, hogy a homológ kromoszómák között **crossing over** történhet. A meiotikus sejtekben a DNS replikációját rendszerint crossing over is követi. Ez a folyamat az anyai és apai eredetű kromoszómák alléljainak rekombinációját eredményezi, így az utódokban a szülőitől eltérő kombinációk is előfordulnak. Ez a változatosság nagyon értékes, mert az új kombinációk az utódokban a szülőkénel nagyobb esélyt biztosíthatnak a túlélésre. Emellett a rekombináció a DNS-t ért károsodások kijavításában is nagyon fontos (l. 11. fejezet).

Mindkét folyamat, a független kombinálódás és a crossing over is, központi kérdése a genetikának. Mindkettőt rekombinációnak nevezik, mivel új génkombinációkat alakítanak ki az utódokban. A legtöbb genetikus azonban csak a crossing over nyomán fellépő átrendeződést tekinti rekombinációnak. Könyvünk további részeiben mi is ezt az értelmezést követjük.

Miután alaposan megismertük a DNS-t, választ kaphatunk arra a kérdésre is: Hogyan történik a rekombináció?

A REKOMBINÁCIÓ TÍPUSAI

A rekombináció típusait szemléltető 7.30. ábrán látható, hogy a folyamat minden esetben korábban különálló DNS-szegmentumok kapcsolódásával és a **fonalak kicserélődésével** – crossing over – jár. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az érintett szakaszok mindig különböző DNS-molekulákon helyezkednek el. A rekombináció lehet intramolekuláris, ebben az esetben az ugyanazon kromoszóma két pontja között kialakuló crossing over a köztes DNS-szakaszt eltávolítja, vagy megfordítja. A bimolekuláris re-



7.29. ábra. Az RNS hidrolízisének mechanizmusa. (a) A két ribonukleoid közötti foszfodiészter-kötés (kék) felhasad és (b) egy új, ciklikus foszfodiészter-kötés képződik a cukor 2'- és 3'-hidroxilcsoportjai között. A (c) ciklikus szerkezet felnyílik, a foszfát a 3'-pozícióban kapcsolódik. Mivel a DNS-en nincs hidroxilcsoport, nem vehet részt ilyen reakcióban, ezért sokkal stabilabb molekula

kombináció két független DNS-molekula között lejátszódó crossing over. A rekombináció rendszerint **reciprok**, azaz a partnerek kölcsönösen kicserélik DNS-szakaszaikat. A DNS-molekulák részt vehetnek egy, két vagy akár több crossing overben is, és a kicserélődések száma erősen befolyásolja a folyamat végeredményét.

A 7.30. ábrán bemutatott típusokon kívül a rekombinációnak még három alapvető formája létezik. (1) A **helyspecifikus rekombináció** a két rekombinálandó DNS meghatározott, hasonló szekvenciáján alapul, és mindig azonos DNS-szakaszok között zajlik, ami magyarázatot ad elnevezésére. Az ilyen típusú rekombináció ismert példája a λ fág DNS-ének beépülése a gazdasejt genomjába (l. 8. fejezet). (2) Az **illegitim rekombinációnak** is feltétele a rekombinálandó DNS-molekulák szekvenciájának kismértékű hasonlósága, de nem helyspecifikus. A mozgó genetikai elemek általában ezt a rekombinációs utat követik (l. 12. fejezet). (3) A **homológ** vagy **generalizált rekombináció** a rekombináció leggyakoribb, meiózisra is jellemző formája, és a folyamatban szereplő DNS-molekulák kiterjedt hasonlóságán alapul.

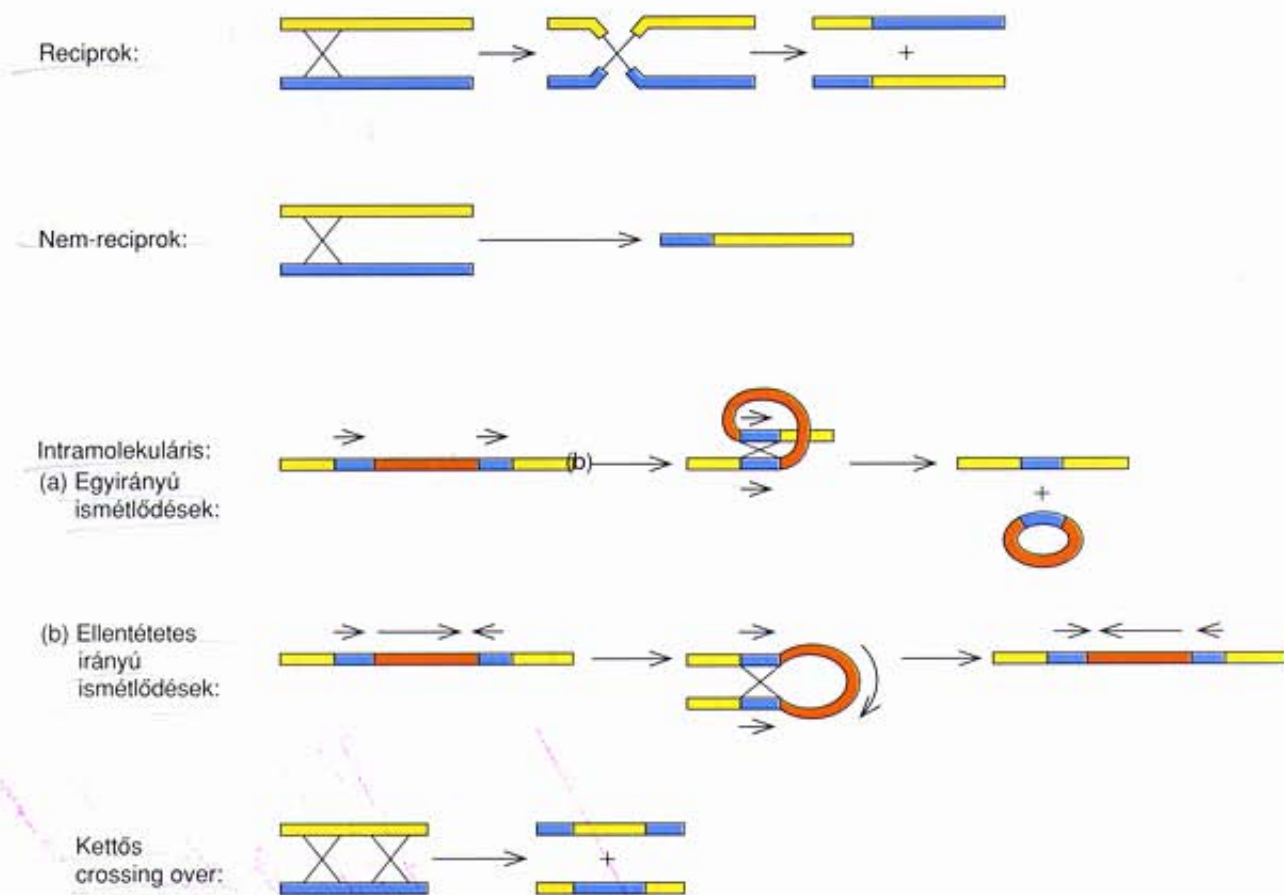
A HOMOLÓG REKOMBINÁCIÓ MODELLJE

A homológ rekombináció mechanizmusát magyarázó mai modellek a következő alapvető lépéseket tartalmazzák (bár nem szükségszerűen ebben a sorrendben): (1) az azonos, vagy nagyon

hasonló szekvenciájú, ún. **homológ DNS-duplexek** párt alkotnak; (2) a homológ DNS-szalakon két törés keletkezik; (3) az újraképződő foszfodiészter-kötések összekapcsolják a két homológ szálat (intramolekuláris rekombináció esetén ugyanannak a fonálnak a szakaszait); (4) a másik két szál is eltörik, majd összekapcsolódik. Az alapmodell, amelyet eredetileg Robin Holliday javasolt, a 7.31. ábrán látható.

A Holliday-féle modell szerint a két homológ DNS-duplex párosodik, és az érintkezési pontokban bemetszések (nick) alakulnak ki rajtuk. Amikor mindkét homológ szál eltört, a szabad végek átkereszteződhetnek, és intermolekuláris kötésekkel kapcsolódhatnak a másik duplex végéhez. A régi intramolekuláris kötések visszaalakulása nem jellemző.

Amikor a két fonál átkereszteződött, és a DNS-ligáz kialakította az új, intermolekuláris foszfodiészter-kötéseket, kereszt alakú képződmény, ún. **fél kiazma** vagy **khi-szerkezet** jön létre, amely többféle ábrázolásban is szerepel a 7.31. ábrán. A fél kiazmában az elágazódás bármilyen irányban elmozdulhat az eredeti bázispárok felnyílásával és újak kialakulásával. Ez a folyamat az ún. **kiazmavándorlás**. A kiazmában a két szál először átkereszteződik, de akár felső, akár alsó felének 180°-os elfordulása kitekeri a két szálat, és négyszög alakú intermedier jön létre. Amennyiben a kapcsolódási pontnál néhány bázispár eltávolodik egymástól, az egyfonalas DNS-ből álló négyszög alakú



7.30. ábra. A rekombináció típusai. X-szel jelöltük a crossing overek helyét két kromoszóma között vagy ugyanannak a kromoszómának a szakaszai között. Vizsgáljuk meg a reciprok rekombináció köztes formáját a felső sorban. Képzeld el, hogy a DNS eltörik, és új, szálak közötti kötések alakulnak ki, ahogyan azt az X karjai jelzik. A bemutatott példák mindegyikére ugyanez az elv érvényes. Nem-reciprok rekombináció esetén a rekombináns DNS-ek egyike elvész

struktúra mérete növekedhet. A rekombinálandó plazmid DNS-ről készült elektronmikroszkópos felvétel egyértelműen igazolja, hogy az említett struktúrák valóban kialakulnak (7.32. ábra).

A kiazmat alkotó két hélix természetesen nem maradhat összekapcsolódva a végtelenségig. Megszűnéséhez, és a két független DNS-molekula kialakulásához a másik két szálnak is el kell törnie, majd újrakapcsolódnia. A folyamat kétféleképpen játszódhat le.

Ha ismét ugyanaz a két fonál törik el, és kapcsolódik újra, amelyek az első törésben is szerepeltek, akkor nem történik valódi rekombináció. Ehelyett két olyan kettős hélixet kapunk, amelyek **heteroduplex** szakaszokat tartalmaznak. Ezekben a szakaszokban a khiszerkezetet kialakító DNS-ek mindegyikéből található egy részlet. Ha azonban azok a fonalak törnek el, amelyeket *nem* érintett az első törés, akkor a kiazmából két rekombináns DNS-molekula alakul ki.

A rekombináció RecBCD mechanizmusa

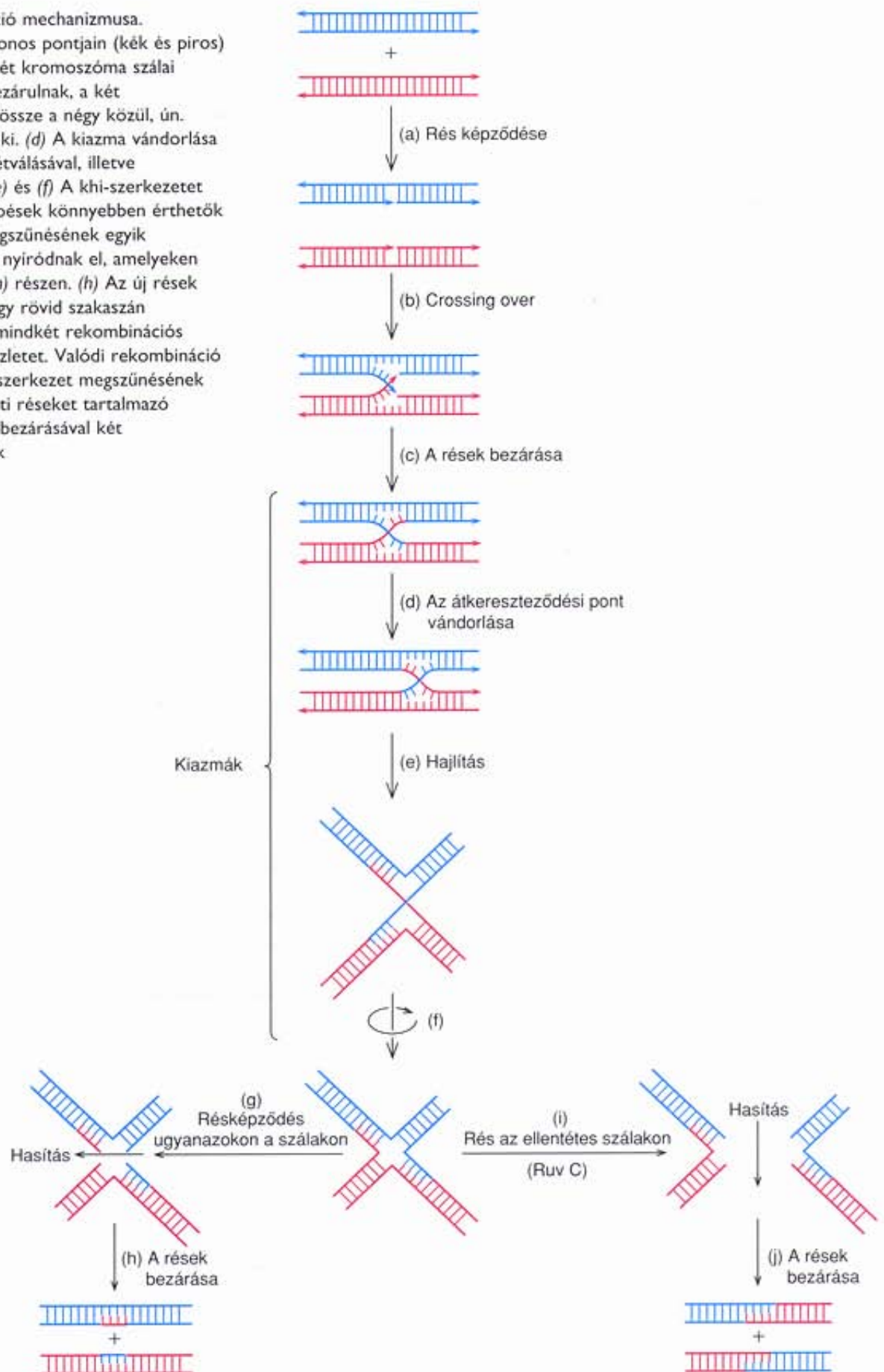
Mai tudásunk szerint nincs olyan természetes rekombináció, amelyik pontosan a 7.31. ábrán vázolt módon menne végbe. Így például nem ismerünk olyan mechanizmust, ami a két nick spontán megjelenését eredményezné a párosodott homológ DNS-szálak azonos pontjain. A valóságban a két rés (nick) kialakulásának módja különbözteti meg egymástól a főbb rekombinációs utakat. Ezek közül a legjobban tanulmányozott rekombinációs mechanizmus az *E. coli* ún. RecBCD útja (7.33. ábra).

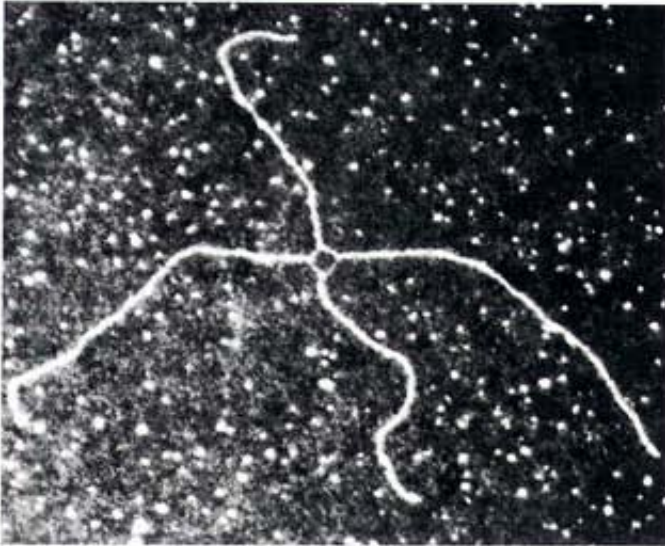
A rekombinációs folyamat azzal kezdődik, hogy a RecBCD nevű fehérje, ami három gén, a *recB*, *-C* és *-D* terméke, rést ejt az 5'-GCTGGTGG-3' szekvenciájú khi-hely 3'-végénél. Az *E. coli* genomjában átlagosan minden 5000-edik bázispárra esik ilyen khi-hely. Amikor a DNS a rés közelében „lélegzik”, átmeneti egyfonalas fark alakul ki rajta, amelyhez kötődik a RecA-fehérje (a *recA*-gén terméke) és az SSB. Az SSB megakadályozza, hogy a farki vég visszaalakuljon DNS-duplexszé, a RecA-fehérje pedig lehetővé teszi, hogy az egyfonalas szál „megtámadjon” egy kétfonalas DNS-szakaszt, kialakítson egy ún. D-hurkot, majd elkezdje a megtámadott DNS-duplex homológiájának vizsgálatát. Amikor a farki rész homológ régióra bukkan, nick jön létre a D-hurok DNS-szálán, valószínűleg a RecBCD-fehérje segítségével. A nick lehetővé teszi, hogy a RecA és az SSB új egyfonalas szálát hozzon létre, ami párosodhat a másik DNS megfelelő szakaszával. A DNS-ligáz ezután mindkét rést összekapcsolja, és kialakít egy Holliday-szerkezetet.

A kiazma vándorlása nem spontán folyamat. A DNS-replikációhoz hasonlóan, feltételezi a DNS szétesavarodását, ami helikázaktivitást és ATP-ből származó energiát igényel. A folyamatban két fehérje, a **RuvA** és a **RuvB** működik együtt. Mindkettőnek van DNS-helikáz aktivitása, a RuvB emellett ATP-áz is, tehát az ATP kötésének hidrolízisével energiát szolgáltat a kiazma elmozdulásához. Végül a két

7.31. ábra. A rekombináció mechanizmusa.

(a) A homológ kromoszómák azonos pontjain (kék és piros) rések (nick) keletkeznek. (b) A két kromoszóma szála átkereszteződnek. (c) A rések bezárulnak, a két kromoszómát két szál kapcsolja össze a négy közül, ún. kiazma vagy khi-szerkezet alakul ki. (d) A kiazma vándorlása (tetszőleges) néhány bázispár szétválásával, illetve újrakapcsolódásával történhet. (e) és (f) A khi-szerkezetet elforgattuk, hogy a következő lépések könnyebben érthetőek legyenek. (g) A khi-szerkezet megszűnésének egyik lehetősége. Ugyanazok a fonalak nyíródnak el, amelyeken először keletkeztek a rések az (a) részen. (h) Az új rések bezárásakor a DNS-molekulák egy rövid szakaszán heteroduplex keletkezik, amely mindkét rekombinációs partnerből tartalmaz egy-egy részletet. Valódi rekombináció azonban nem történik. (i) A khi-szerkezet megszűnésének másik lehetősége. Nem az eredeti réseket tartalmazó fonalak nyíródnak el. (j) A rések bezárásával két rekombináns molekula keletkezik.

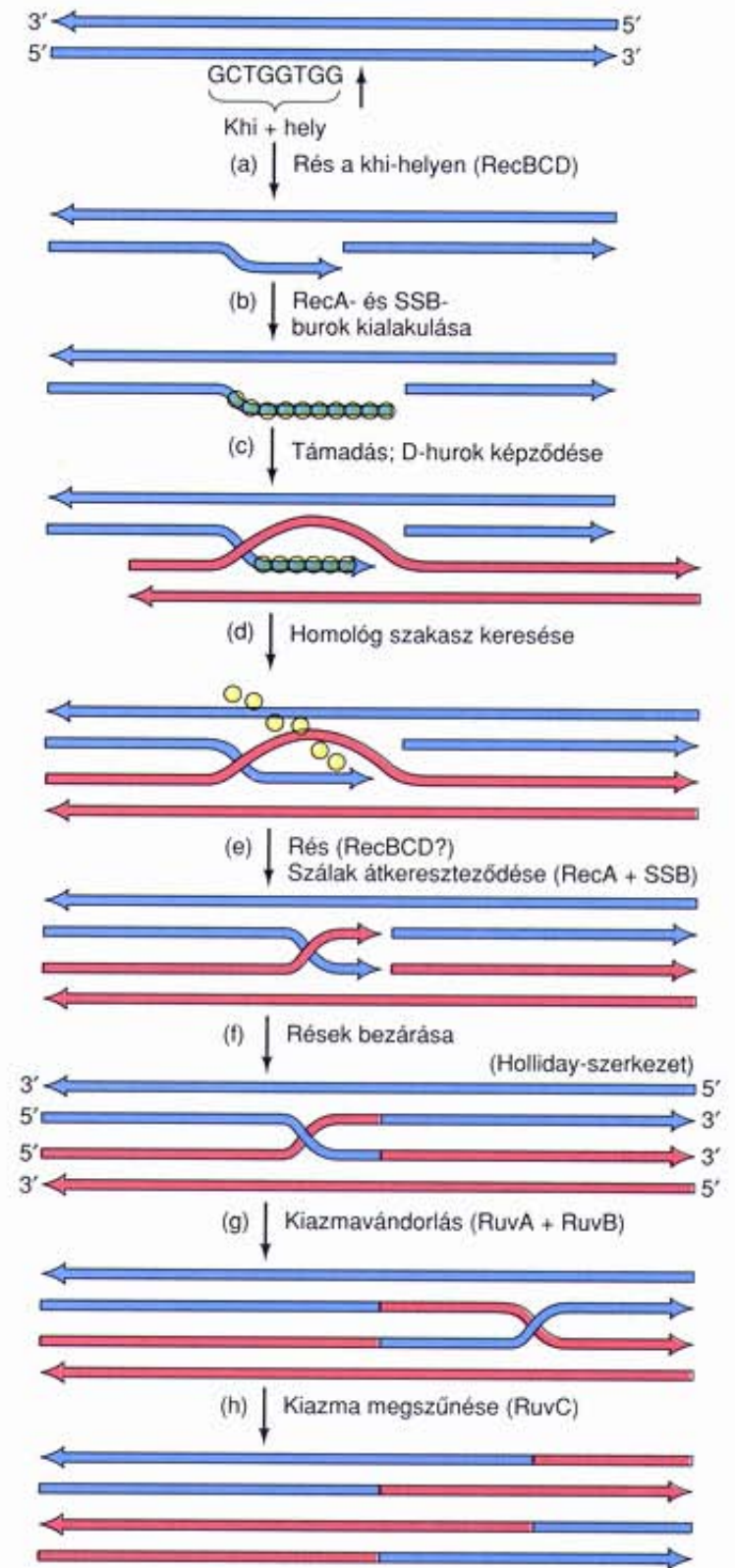




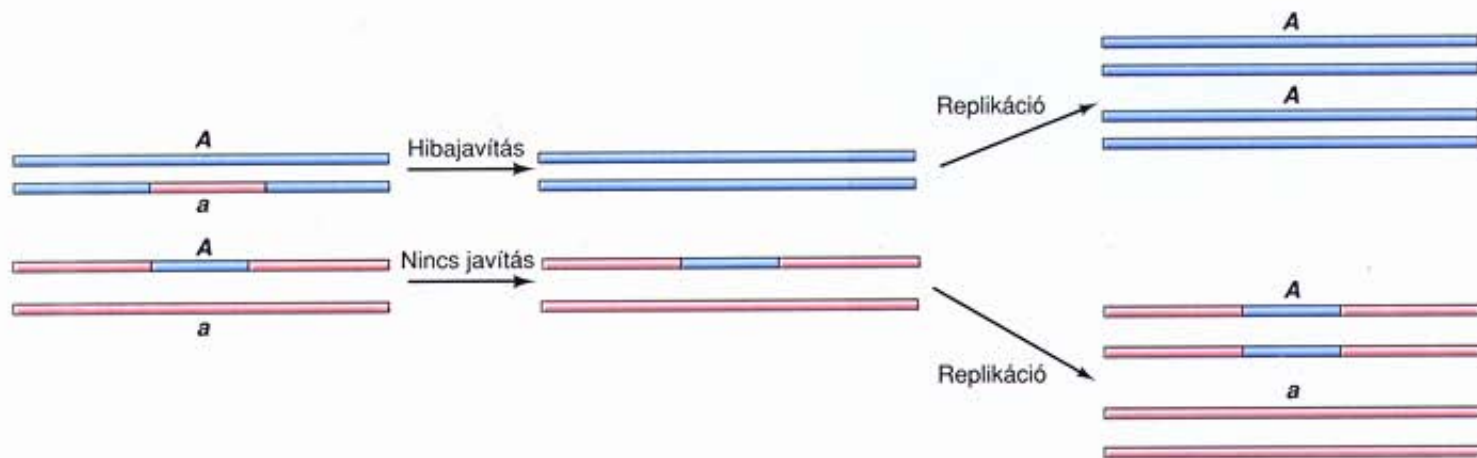
7.32. ábra. A rekombináció során kialakuló kiazma. A felvételen látható alakzat megfelel a 7.31.(f) ábrarészlet átmeneti formájának. A középső, négyszög alakú részben néhány bázispár elvált egymástól, így rövid, egyfonalas DNS-szakaszok alakultak ki. Dr. Huntington Potter és Dr. David Dressler engedélyével

szál elhasításával a Holliday-szerkezet megszűnik, heteroduplex vagy rekombináns termék jön létre. Ezt a feladatot a **RuvC**-fehérje látja el.

A homológ rekombináció azzal kezdődik, hogy a két különálló DNS-molekula homológ szálain rések képződnek. Így szabad végekkel rendelkező egyfonalas szakaszok alakulnak ki, amelyek átkeresztezhetőek a másik DNS-molekulával, és új intermolekuláris kötések alakulhatnak ki közöttük. A kiazmában (Holliday-szerkezetben) az átkereszteződési pont vándorolhat az átkereszteződött szálak 3'-vége felé. Végül a kiazma a két szál elhasításával szűnik meg. Eredményként heteroduplex szakaszt hordozó DNS-molekulák, vagy valódi rekombináns DNS-molekulák alakulhatnak ki. A RecBCD típusú rekombináció során a RecBCD-fehérje vágja az első rést, és valószínűleg a másodikat is. A RecA és az SSB elősegíti az egyfonalas szál invázióját, amely kialakítja a crossing overt (kiazma, Holliday-szerkezet). Az átkereszteződési pont elmozdulása a RuvA és -B szerepe. A kiazmát a RuvC hasítása szünteti meg, eredményként heteroduplexek vagy valódi rekombinánsok keletkeznek.



7.33. ábra. A homológ rekombináció RecBCD útja. (a) A RecBCD-fehérje a khi-hely 3'-végénél elhasítja az egyik szálát. Így a DNS-en kialakulhat egy egyfonalas szakasz. (b) A RecA- és az SSB-fehérje (mindkettőt sárga körök jelzik) beburkolják ezt a farki véget, és megakadályozzák reasszociációját a komplementer szakasszal. (c) A RecA elősegíti egy másik kétfonalas DNS invázióját, kialakítja a D-hurkot. (d) A RecA közreműködik a megtámadott DNS-duplex homológ szakaszának azonosításában. A támadó szál bázispárokkal kötődik a homológ régióhoz, leválik róla a RecA és az SSB. (e) Amikor a szál megtalálta a homológ régiót, a kihurkolódó DNS-szakaszon nick képződik, valószínűleg a RecBCD-fehérje hatására. A kialakuló új egyfonalas szál és a másik molekula egyfonalas része között bázispárok jönnek létre, feltehetőleg a RecA és az SSB segítségével. (f) A réseket a DNS-ligáz bezárja, és létrejön egy négyfonalas komplex, az ún. Holliday-szerkezet. (g) Az átkereszteződési pont a RuvA- és RuvB-fehérjék közreműködésével vándorolhat. (h) A RuvC a szálak elhasításával feloldja a Holliday-szerkezetet, és példánkban két valódi rekombináns hoz létre



7.34. ábra. Génkonverzió a *Neurospora* spóráképzésekor. A szálak átkereszteződésének és a kereszteződési pont vándorlásának eredményeként két DNS-molekula keletkezett heteroduplexet tartalmazó szakaszokkal, pontosan azon a részen, ahol az A (kék) és az a (piros) allél közötti egyetlen bázispárnyi eltérés található. A másik két testvérkromoszóma szabályos homoduplex, az egyik A, a másik a allélt hordoz (nincs ábrázolva). A felső heteroduplexet kijavítja a hibajavító rendszer, az a fonál szekvenciáját az A-nak megfelelőre változtatja. Az alsó heteroduplexen nem történik javítás. A következő replikációban a javított DNS-ből két A kromatida lesz, a nem javított pedig egy A és egy a kromatidát ad. A végeredmény három A és egy a allél. A két nem ábrázolt DNS replikációja két A és két a allélt ad. Összességében tehát öt A és három a allélt hordozó spóra keletkezik a szabályos 4:4 eloszlás helyett

A GÉNKONVERZIÓ

A tömlősgombák (pl. *Neurospora crassa*) spóráképzése során két haploid sejtmag összeolvad, majd az így kialakuló diploid sejtmag meiózissal négy haploid sejtmagot hoz létre. Ezekből a sejtmagokból mitózissal nyolc haploid mag alakul ki, amelyekből nyolc askospóra képződik. Amennyiben az egyik kiindulási sejtmagban egy adott génnek A, a másik sejtmagban pedig a alléja volt, akkor a spórákban a két allélnak azonos számban kell megjelenniük. Négy spórának A, négynek a allélt kell tartalmaznia. Más megoszlást nehéz elképzelni – például öt A és három a –, mivel ehhez egy a allélnak át kell alakulnia A-vá. A valóság azonban az, hogy fajtól függően mintegy 0,1-1%-os gyakorisággal megfigyelhetők ilyen rendellenes arányok. A jelenség neve **génkonverzió**.

A 7.31. ábrán bemutatott rekombinációs modell, azon belül is a kiazmavándorlás, magyarázatot adhat a meiotikus génkonverzió mechanizmusára. A hipotézist a 7.34. ábra ismerteti. Kiindulunk egy olyan sejtmagból, amelyben a DNS már megkettőződött, így minden kromoszómának négy kromatidája van. Elvben két kromoszómán A, kettőn pedig a allél található. Ebben az esetben viszont crossing over történt, amit az átkereszteződési pont vándorlása követett. A kiazma megszűnésekor heteroduplexeket tartalmazó kromoszómák alakultak ki (7.31.(g)). A heteroduplexes részek éppen azon a helyen vannak, ahol az A és az a allél egy bázispárban különbözik egymástól, így mindegyik kromoszóma egyik szála

az egyik, másik szála a másik allélt tartalmazza. Ha közvetlenül ekkor replikáció történne, akkor helyzet egyszerűen megoldódna, két A és két a duplex keletkezne. De a replikáció előtt az egyik vagy mindkét heteroduplexet azonosítják a hibásan beépült bázispárokat javító enzimek (l. 11. fejezet). Az itt bemutatott példában csak a felső heteroduplex javítása történt meg, az a allél A-vá alakult. Így három szálon A, egy szálon a allél található. A javítást követő replikáció három A és egy a duplexet eredményez. Ha ezekhez hozzáadjuk azt a két A és két a duplexet, amelyeknél nem történt heteroduplex képződés, akkor a végeredmény öt A és három a allél lesz.

Génkonverzió nemcsak a meiózis során történhet. Ez a mechanizmus változtatja a sütőélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) párosodási típusát. Ilyenkor két hasonló, de nem allélikus viszonyban álló gén alkot párt, majd a génkonverzió következtében az egyik szekvenciája a másikéra változik.

Amikor két hasonló, de nem pontosan azonos DNS-szekvencia kerül egymás mellé, lehetőség nyílik a génkonverzióra, vagyis az egyik DNS-szekvencia átalakulására a másik mintájára. A génkonverzióban részt vevő szakaszok lehetnek allélok, mint például a meiózisban, illetve nem-allélikusak, mint az élesztő párosodási típusát meghatározó gének esetében.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

(a) Készítsünk vázlatos rajzot a *Drosophila* DNS-ének replikációs buborékjáról. Jelöljük be a szülői és az utódszálakat az Okazaki-fragmentumok mindegyikének összekapcsolódása után!

(b) Feltételezve, hogy a replikáció már a jelölt timidin hozzáadása előtt elkezdődött, ábrázoljuk a vázlaton, hol található a jelölt, és hol a jelöletlen DNS-szál?

(c) Milyen autoradiográfias képet mutat a (b) feladatban szereplő replikációs buborék?

(d) Hogyan nézne ki ez az autoradiogram, ha a két utódmolekula egymás köré tekeredne (azaz a buborék összelapulna)?

MEGOLDÁS

(a) A szülői DNS-t sötétebb, az utódfonalakat világosabb színnel jelölve a replikációs buborék képe a következő:



Az utódfonalakban nincsenek rések, mert minden Okazaki-fragmentum összekapcsolódott.

(b) A jelölt DNS-t cikcakkos vonallal ábrázolva a következő elrendeződés várható:



Az utódszál középső szakasza jelöletlen, mert még a jelölt timidin hozzáadása előtt szintetizálódott.



Megjegyzés: Az autoradiográfias képen csak a jelölt szálak láthatók (az előző ábra cikcakkos része). A jelöletlen szál nem exponálja a filmet, így helyzete nem azonosítható.



Ha a buborék összeesik, a felső és alsó jelölt szakaszok egymás mellé kerülnek, és egyetlen csíkot adnak a filmen. Tehát négy helyett két sáv látható az autoradiográfias felvételen.

2. FELADAT

Mennyi időt vesz igénybe az *E. coli* 100 000 bázispárjának replikációja?

MEGOLDÁS

(a) Az *E. coli* DNS-ének elongációja replikációs villánként kb. 1000 nukleotid/másodperc sebességgel folyik. Mivel a replikáció kétirányú, és két villa vesz részt benne, a tényleges sebesség

2000 nukleotid/másodperc. Ha nincs szünet, a 100 000 bázispár $100\,000/2000 = 50$ másodperc alatt készül el.

3. FELADAT

Milyen hosszú csíkot látunk az autoradiográfias felvételen, ha a *colE1* DNS-e egy replikációs villában, szünet nélkül, 50 másodpercen át replikálódik?

MEGOLDÁS

Egy villa 1000 nukleotid/másodperc sebességgel mozog, így 50 másodperc alatt 50 000 nukleotidnyi távolságot tesz meg. Minden nukleotid (vagy bázispár) 0,34 nm hosszú, ezért 50 000 bázispár $50\,000 \times 0,34\text{ nm} = 17\,000\text{ nm}$, azaz 17 μm hosszú.

ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS replikációja szemikonzervatív: a szülői fonalak elválnak egymástól, és mindegyik templátként szolgál egy-egy új komplementer szál szintéziséhez. Azt a DNS-szakaszt, amely egy replikációs kezdőpont irányítása alatt kettőződik meg, replikonnak nevezzük. Az egyszerű genetikai rendszerek, mint például a plazmidok, a vírusok és egyes baktériumok kromoszómái egyetlen replikonból állnak. A DNS-replikáció a legtöbb genetikai rendszerben kétirányú. A replikációs gépezet egy meghatározott pontból, a replikációs kezdőpontból indul, és a két replikációs villa egymással ellentétes irányban halad. A replikáció a prokariótákban és az eukariótákban szemidiszkontinuus. A vezető szál folyamatosan, a replikációs villa mozgásával megegyezően, $5' \rightarrow 3'$ irányban szintetizálódik. A másik, a követő szál rövid szakaszokban (Okazaki-fragmentumok) ugyancsak $5' \rightarrow 3'$, de a replikációs villa mozgásával ellentétes irányban képződik. A DNS-polimeráz önmagában nem képes a DNS-szintézis iniciációjára. Működéséhez olyan primert igényel, amelynek szabad $3'$ -végéhez építheti a naszcensz DNS-szálat. A primerek nagyon rövid RNS-darabok. Az Okazaki-fragmentumokról a primerek lehasításra kerülnek, a helyükön keletkező hézag pótlódik, és a nick záródik.

Amikor a helikáz a replikációs villánál széttekeri a két szülői fonalat, szuperhelikális feszültséget visz a gyűrű alakú, zárt DNS-be. A feszültséget a DNS-giráz oldja fel, ezzel lehetővé teszi a replikáció folytatását.

Az eukarióta kromoszómák végét a telomeráz enzim építi fel. Sajat RNS-templátja felhasználásával nukleotidokat kapcsol a DNS $3'$ -végéhez.

A cirkuláris DNS a gördülő gyűrű mechanizmussal replikálódhat. A kétfonalas DNS egyik szálán nick képződik, és a $3'$ -vég meghosszabbodik, az ép fonalat használva templátként. A szintézis az $5'$ -véget leszorítja. A λ fágban a leszorított szál szolgál templátként a követő szál szakaszos szintéziséhez.

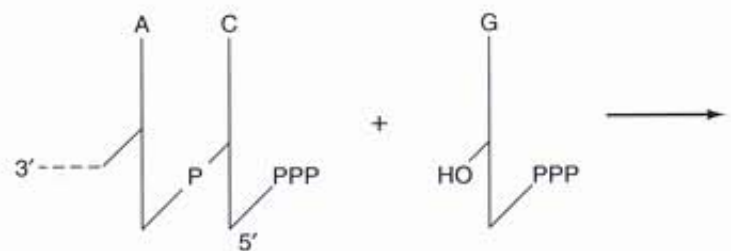
A DNS-polimeráz, mint minden enzim, nem működik tökéletesen, átlagosan százezer nukleotid beépítésére egy-egy hibát vét. Az élő szervezetek számára ez elviselhetetlenül magas arány, ezért a replikációs gépezetnek saját leolvasás-ellenőrző rendszere van. Mivel a replikáló enzimmek csak bázispárban álló nukleotid szolgálhat primerként, hibás bázispárosodás esetén a replikáció leáll, amíg a nukleáz ki nem javítja a hibát az utolsóként beépített DNS-szakasz eltávolításával. Az RNS-genomok leolvasás-ellenőrző rendszer nélkül

replikálódnak. A pontatlan replikációból eredő hibák erősen korlátozzák az RNS-genomok méretét.

A meiotikusan osztódó sejtekben a DNS-replikációt rendszerint rekombináció követi, a homológ rekombináció mechanizmusa szerint. A kromoszómák két homológ régiója egymás mellé simul, majd mindkettőben egyfonalas törés keletkezik. Az eltört fonalak szabad végei átkeresztesződnek, új intermolekuláris kötéseket alakítanak ki, aminek eredményeként khi-szerkezet, más szóval kiazma jön létre. Ez a kereszt alakú struktúra két rekombináns DNS-molekulát adva rendeződik át, ha a másik két fonálon is bekövetkezik a törés, majd a kapcsolódás. Az átkeresztesződés helye gyakran elmozdul a rekombináció során, ami heteroduplex szakaszokat alakít ki a két DNS-en. A heteroduplexek aktiválhatják a javító mechanizmust, ami az allélmegoszlás várhatótól való eltérését okozhatja a meiózisban. Ez az egyik lehetőség a génkonverzióra.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Készítse el a DNS-molekulák vázlatos rajzát a Meselson–Stahl-kísélet három generációjában, feltéve, ha a sejteket ^{14}N -t tartalmazó táptalajon nevelték, és a replikáció (a) diszperzív, (b) konzervatív, (c) szemikonzervatív. Jelölje a ^{15}N -tartalmú DNS-t folyamatos, a ^{14}N -t tartalmazót pedig szaggatott vonallal!
- Rajzolja le, hogyan alakulnak a DNS-sávok az 1. kérdésben szereplő vizsgálatban, CsCl-os sűrűséggradiens-centrifugálást alkalmazva. Adja meg a ^{15}N -nel teljes mértékben jelölt, illetve a teljes mértékben ^{14}N -nel jelzett DNS pozícióját is!
- Rajzolja le azokat a DNS-sávokat, amelyeket olyan egyfonalas (hődenaturált) DNS-molekulák adnának CsCl-os sűrűséggradiens-centrifugálás során, amelyek (a) diszperzív, (b) konzervatív, (c) szemikonzervatív replikációból származnak. Jelölje a nehéz és a könnyű szálak helyét.
- Tételezzük fel a következő eseménysort: egy eukarióta DNS replikációja megkezdődik; a DNS-t kis specifikus aktivitású timidinnel pulzusszerűen jelöljük; ezután nagy aktivitású pulzusjelölést alkalmazunk. Milyen lesz az autoradiográfias felvétel, ha a két utódmolekula feltekeredik egymás körül (azaz a replikációs buborék összeesik, mint a 7.16. ábrán)?
- Embriionális sejteket tríciumos timidinnel pulzusszerűen jelölünk, majd a DNS-ről autoradiográfias felvételt készítünk. Milyen következtetés vonható le abból a felvételtől, amelyen a párosával álló ezüstcsíkok mindegyike az alábbi két mintázatba tartozik: _____ vagy _____? A csíkok mindkét esetben párosával állnak, és nem két független sávban.
- Egy autoradiográfias kísérletben a *colE1* DNS-ét alacsony aktivitású timidinnel egyenletesen jelölték. Majd egy replikációs ciklus kezdete után, nagy specifikus aktivitású timidint alkalmaztak a replikációs ciklus egynegyed részében. Rajzolja le a várható autoradiográfias képet! (Ne feledje, a *colE1* replikációja egyirányú!)
- Egy Földön kívüli lény baktériumtenyészetet hozott ajándékba bolygójáról, és azt állította, hogy náluk minden élőlény DNS-e folyamatosan replikálódik. (a) Tervezzon egy pulzusjelöléses kísérletet, amellyel megbizonyosodhat erről! (b) Milyen nem földi jellegzetességei lehetnek a baktérium DNS-polimerázának?
- Mi a helikáz szerepe a DNS replikációjában? Miért kell ATP-áz aktivitással is rendelkeznie?
- Hasonlítsa össze egy helikáz és egy topoizomeráz működését!
- Miért kötődik sokkal jobban az *E. coli* SSB-fehérjéje az egyfonalas, mint a kétfonalas DNS-hez?
- Ha nem lenne széttekerő mechanizmus, milyen szupercsavarulatok jelennének meg egy zárt, gyűrű alakú, replikáló DNS-ben?
- Az *E. coli* primoszómája melyik szál templátjához kötődik? Miért célszerű ehhez a szálhoz kötődnie?
- Milyen előnyei vannak a két DNS-polimeráz aktív centrummal rendelkező repliszómának?
- Miért jár több hibával a primer szintézise, mint a DNS elongációja?
- Miért nem lehet nagyméretű az RNS-vírusok genomja?
- Mi lehet a sorsa annak a DNS-szakasznak, amely két egy irányban ismétlődő szekvencia között helyezkedik el ugyanazon a kromoszómán, ha homológ rekombináció játszódik le az ismétlődő szekvenciák között? (Egyirányú ismétlődés esetén a DNS-szakasz kópiáinak orientációja megegyezik.)
- Mi lehet a sorsa annak a DNS-szakasznak, amely két ellentétes irányban ismétlődő szekvencia között helyezkedik el ugyanazon a kromoszómán, ha homológ rekombináció játszódik le az ismétlődő szekvenciák között? (Ellentétes irányú ismétlődés esetén a DNS-szakaszok kópiái ellentétes lefutásúak.)
- (a) Milyen lesz az allélok eloszlási mintázata a 7.34. ábrán bemutatott génkonverzióban, ha mindkét heteroduplex *A/A*-vá alakul át a hibajavítás révén? (b) Mi történik, ha az egyik heteroduplex *A/A*-ra, a másik *a/a*-ra konvertálódik?
- Mennyi idő alatt replikálódik az *E. coli* teljes genomja ($4,2 \times 10^6$ bázispár)?
- Milyen hosszú csíkot kapunk az autoradiográfias felvételen az *E. coli* DNS-ének kétirányú replikációjakor, ha közös origóból indulunk ki, és a folyamat időtartama egy perc?
- A Zorb bolygón élő szervezetek DNS-ük mindkét szálát folyamatosan replikálják, vagyis az egyik szálnak $3' \rightarrow 5'$ irányban kell replikálnia. Az alábbi rajzon egy ilyen DNS-szál végének rajza látható.



- (a) Hogyan néz ki ez a szál egynél több nukleotid hozzáadása után (a GTP-t ábrázoltuk)? (b) Mi lesz a helyzet, ha a a GTP-n kívül egy másik nukleotid is beépül, majd kivágja azt a leolvasás helyességét ellenőrző rendszer (a helyes nukleotid beépülése előtt)? (c) Miért jelentene ez problémát egy földi élőlénynek?

A megoldások a könyv végén találhatók.

8.

F E J E Z E T

A transzkripció és szabályozása prokariótákban

Tanulási program

- 1 A gének átírását szabályozó fehérjék kötődése a specifikus DNS-szekvenciákhoz.
- 2 A gén információjának átírása RNS-re az RNS-polimeráz közreműködésével.
- 3 A funkcionális kapcsolatban lévő bakteriális gének vezérlési egységei az operonok, amelyek mindegyike egy-egy RNS-polimeráz-kötőhely, ún. promoter szabályozása alatt áll.
- 4 A bakteriális génműködés elsődleges szabályozása aszerint történik, hogy melyik promotert ismeri fel az RNS-polimeráz.
- 5 A génműködés különböző programjai az RNS-polimeráz változtatásával aktiválhatók.

A kíváncsiság szüntelen, hogy világosabban lássuk, miként lehetséges, hogy ugyanaz az anyag, amely a fizikában és a kémiában szabályos, reprodukálható és viszonylag egyszerű tulajdonságokkal rendelkezik, mihelyt az élő szervezetekbe kerül, sokkal kevésbé érthető formát ölt. Minél közelebbről szemléli valaki az anyagnak ezt az átalakulását az élő szervezetekben, annál mélyebb benyomást tesz rá. A legegyszerűbb élő sejt is olyan, mint egy varázsdoboz, telis-tele bonyolult és állandóan átalakuló molekulákkal. Túltesz minden kémiai laboratóriumon, ... könnyedén elvégzi a szerves szintéziseket, megfelelő gyorsasággal és egyensúlyra törekedve.

Max Delbrück

A 6. fejezetben ismertettük, hogy a legtöbb gén expressziója két szakaszban – transzkripció (RNS-szintézis) és transzláció (fehérjésztézis) – történik. Ebben a fejezetben részletesen elemezzük a transzkripció folyamatát prokariótákban, elsősorban *E. coli*-ban, a világ legalaposabban tanulmányozott baktériumában.

A TRANZKRIPCIÓ ALAPJAI

Mielőtt belemerülnénk a transzkripció részleteibe, tekintsük át a folyamat alaplépéseit, kezdve az mRNS felfedezésével.

A HÍRVIVŐ RNS FELFEDEZÉSE

Az az elképzelés, hogy a hírvivő (messenger) RNS közvetíti az információt a génektől a riboszómáig, fokozatosan alakult ki Watson és Crick a DNS szerkezetéről szóló cikkének megjelenését követő években. 1958-ban maga Crick vetette fel, hogy az RNS lehet a genetikai információ közvetítője. Hipotézisét részben arra a tényre alapozta, hogy az eukariótákban a DNS a sejtmagban található, míg a fehérjésztézis a citoplazmában zajlik. Ez azt jelenti, hogy az információt valaminek szállítania kell egyik helyről a másikra. Crick felfigyelt arra, hogy a riboszómák RNS-t tartalmaznak, és feltételezte, hogy ez a riboszómális RNS (rRNS) hordozza az információt. Az rRNS azonban a riboszóma szerves alkotórésze, nem válhat ki abból. Ráadásul Crick hipotézise azt is magában foglalta, hogy mindegyik riboszóma a rá jellemző rRNS-sel folyamatosan ugyanazt a fehérjét szintetizálja. Mint kiderült, ez nem felel meg a valóságnak.

François Jacob és munkatársai egy másik hipotézist dolgoztak ki, mely szerint a nem specifikus riboszómák lefordítják a „messenger” RNS-ek információját. Szerintük a hírvivők független RNS-molekulák, amelyek az információt szállítják a génektől a riboszómákhoz. 1961-ben Jacob Sydney Brennerrel és Meselsonnal közösen publikálta a messenger-hipotézis bizonyítékát. Ugyanazt a bakteriofágot, a T2-t alkalmazták, amellyel Hershey és Chase is dolgozott csaknem egy évtizeddel korábban, amikor sikerült igazolniuk, hogy a gének anyaga DNS. A kísérlet a következő feltételezésen alapult: amikor a T2 fág megfertőzi az *E. coli*-t, átprogramozza a gazdasejtet, és az nem a baktérium, hanem a fág fehérjéit termeli. Ha Crick hipotézise helyes, akkor ez az átállás a fágfehérjék termelésére új, fág-specifikus RNS-t tartalmazó riboszómák kialakulásával jár.

Az új és a régi riboszómák megkülönböztetésére a nem fertőzött sejteket nehéz nitrogénizotóppal (^{15}N) és szénizotóppal (^{13}C) jelölték. A jelölés beépült a „rég” riboszómákba. Ezután a jelölt sejteket T2 faggal fertőzték (vagy a hasonló T4-gyel), és ezzel egy időben átoltották könnyűizotópot (^{14}N , ^{12}C) tartalmazó táptalajra. Ily módon a fágfertőzés után keletkező „új”, könnyű riboszómák sűrűséggradiens-centrifugálással elkülöníthetők a „rég”, nehéz riboszómáktól. Brenner és munkatársai a fertőzött sejteket ^{32}P -vel is jelölték, hogy nyomon kövessék a

fág-RNS-ek képződését. A következő kérdésre keresték a választ: A radioaktív jelölést tartalmazó fág-RNS a régi vagy az új riboszómákkal kapcsolódik-e? A 8.1. ábrán látható, hogy a fág-RNS a régi riboszómákon jelent meg, amelyek rRNS-e még a fertőzés előtt szintetizálódott. Ebből világosan következik, hogy ez a régi RNS nem hordozhatja a fág genetikai információját, továbbá az sem valószínű, hogy a gazdasejt genetikai információját tartalmazza. Azaz a riboszómák a fertőzés után nem változtak. A közreműködésükkel előállított fehérje természete attól az mRNS-től függ, amely hozzájuk kapcsolódik. Ez a kapcsolat a magnetofon és a magnetofonszalag viszonyával szemléltethető. A zenét (fehérje) a szalag (mRNS) határozza meg, és nem a magnetofon (riboszóma).

Más kutatók ekkorra már azonosítottak egy esélyesebb jelöltet mint hírvivőt: találtak egy kevésbé stabil RNS-típust, amely átmenetileg kapcsolódik a riboszómákkal. Érdekes módon, ennek az RNS-nek a bázisösszetétele (GC-tartalma) a T2 faggal fertőzött sejtekben nagyon hasonlított a fág-DNS-éhez, ugyanakkor erősen eltért a bakteriális DNS és RNS összetételétől. Pontosan ezt vártuk a fág-mRNS-től, és ezt igazolták a tények is. Másrészt a gazda mRNS-ének bázisösszetétele hasonló a gazda DNS-éhez. Ez a megfigyelés ugyancsak alátámasztja azt a hipotézist, hogy az mRNS, és nem az rRNS a fehérjésztézis vezérlő molekulája.

A legtöbb gén expressziója két lépésben történik: a transzkripció, vagyis az mRNS szintézisekor másolat készül a génről, majd ezt követi a transzláció, az üzenet lefordítása fehérjére.

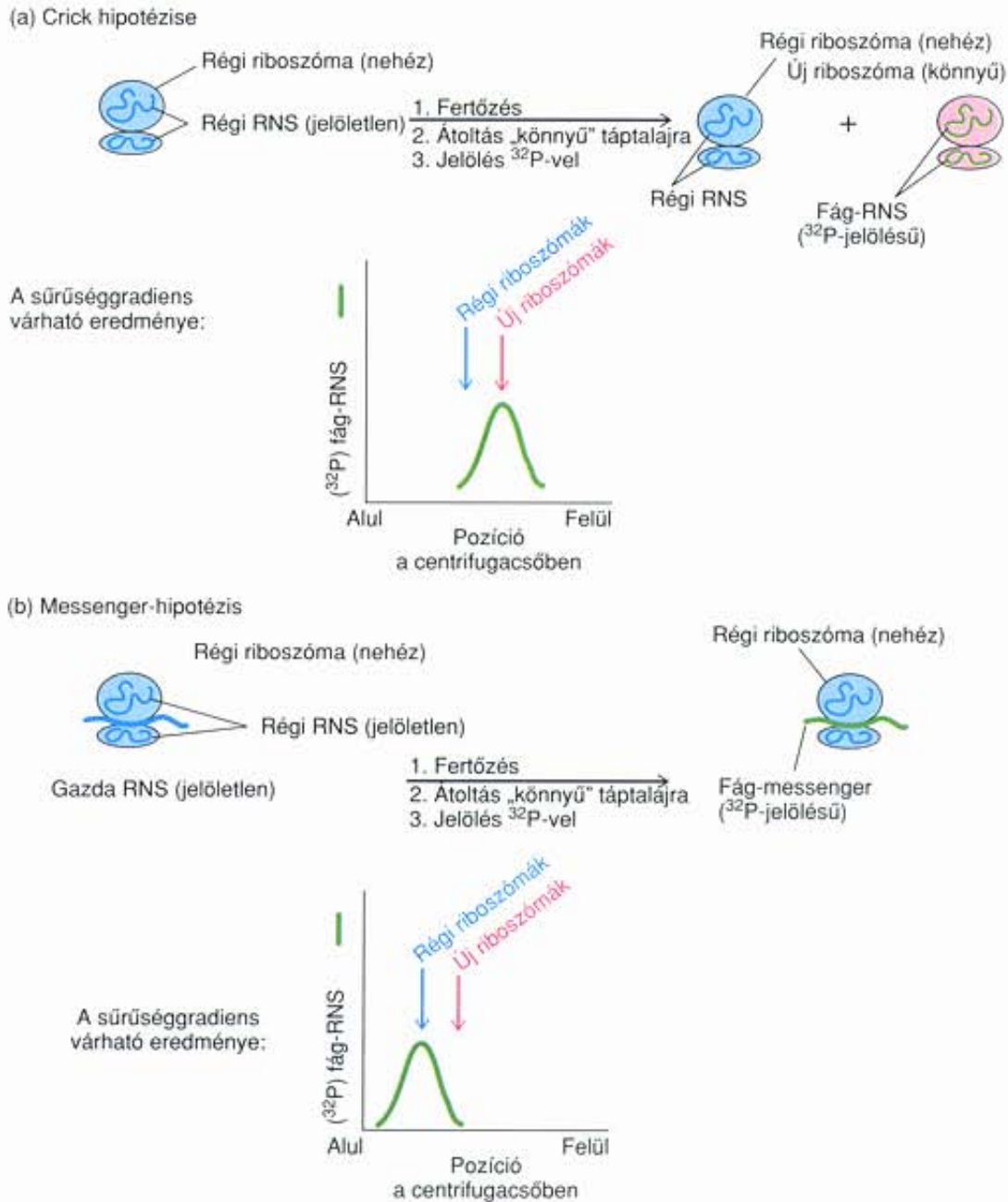
A TRANZKRIPCIÓ ALAPFOLYAMATAI

Mint ahogyan várható, a transzkripció ugyanazokat a bázispárosodási szabályokat követi, mint a DNS replikációja. A DNS-ben levő T, G, C és A az RNS-ben rendre A-, C-, G- és U-tartalmú nukleotidokra íródik át. (Az RNS-ben uracil található a DNS timinje helyett.) Ez a bázispárképzési szabály biztosítja, hogy az átírás terméke hűséges mása legyen a génnek (8.2. ábra).

Természetesen az olyan erősen szabályozott kémiai reakciók, mint amilyen transzkripció is, nem maguktól zajlanak le, hanem enzimek katalizálják. A transzkripciót irányító enzim az **RNS-polimeráz**. A 8.3. ábrán az *E. coli* működő RNS-polimerázának vázlatos rajza látható. A transzkripciónak három fázisa különíthető el, az iniciáció, az elongáció és a termináció.

Iniciáció

Először az enzim felismeri a DNS egyik speciális szakaszát, a **promotert**, amely rendszerint éppen a gén „előtt” helyezkedik el. A polimeráz szorosan kötődik a promoterhez, és megkezdődik a promoteren belül a DNS-fonalak szétválasztását. Hozzávetőleg 12 bázispárt választ el egymástól. A következő lépésben a polimeráz megkezdődik az RNS-lánc felépítését. A szintézis szubsztrát-

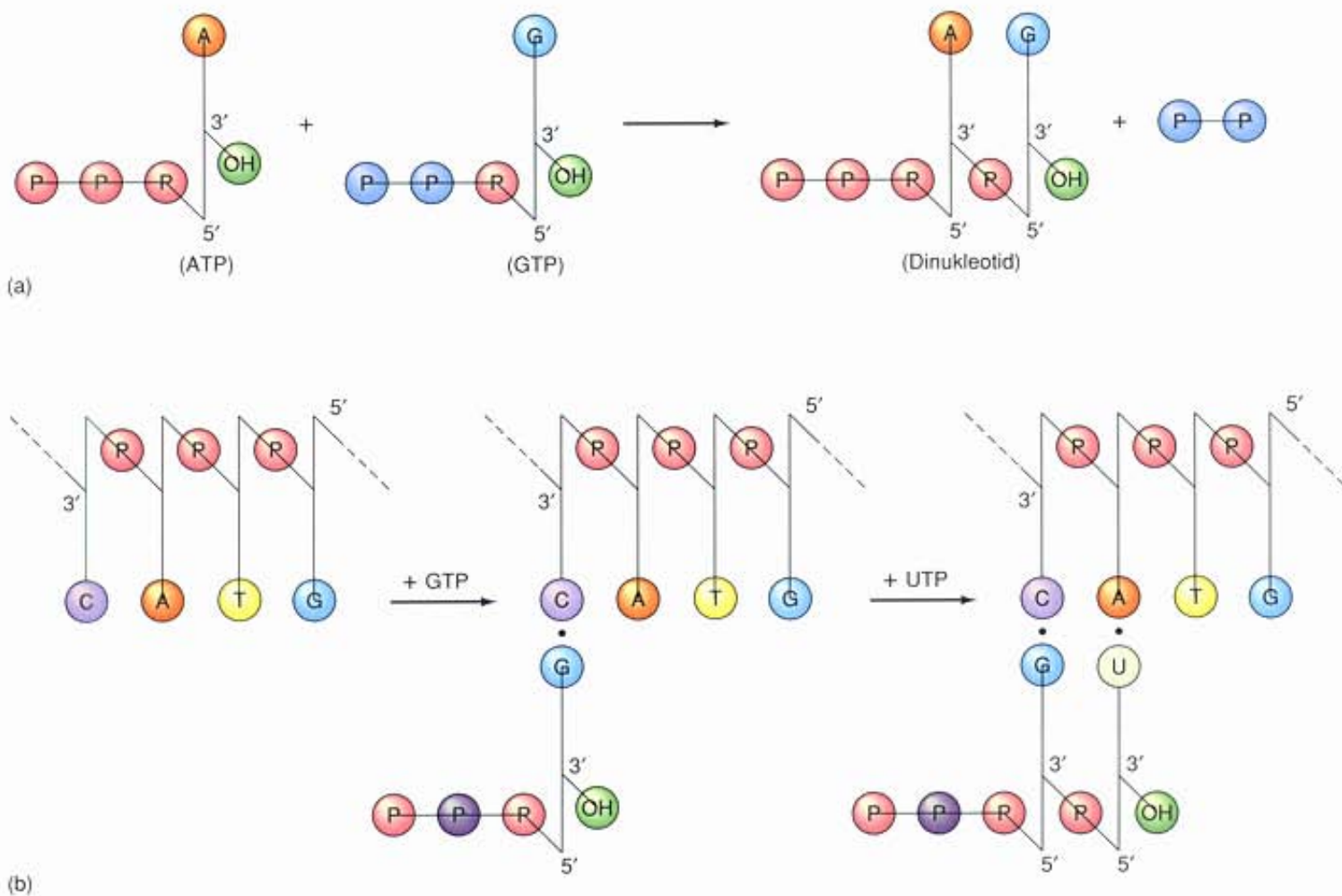


8.1. ábra. A messenger-hipotézis kísérletes vizsgálata. Az *E. coli* riboszómaikat nehézizotópokkal jelölték meg úgy, hogy a baktériumsejteket a C és a N nehézizotópjait tartalmazó táptalajon növesztették. Ezután a baktériumokat T2 vagy T4 fággal fertőzték, és ezzel egy időben könnyű C- és N-izotópokat tartalmazó táptalajra oltották. A táptalaj ^{32}P -izotópot is tartalmazott a fág RNS-jelölésére. (a) Crick elképzelése szerint a riboszómális RNS hordozhatja a fehérjeszintézishez szükséges információt. Ha ez igaz, akkor az új riboszómák a fág-specifikus riboszómális RNS-sel a fágfertőzés után képződnek. Így az újonnan szintetizált, ^{32}P -jelölésű RNS (zöld) együtt mozogna az új, könnyűizotópos jelölésű riboszómákkal (piros). (b) Jacob és munkatársainak javaslata szerint a messenger RNS szállítja az információt a riboszómákhoz. E szerint a fágfertőzés új, fág-specifikus mRNS-ek megjelenését eredményezi, amelyek ^{32}P -izotóppal jelölődnek (zöld). Ezek az mRNS-ek a régi, nehézizotópos jelölésű riboszómákhoz kapcsolódnak (kékek). Vagyis a radioaktív jelölés együtt mozogna a régi, nehéz riboszómákkal a sűrűséggradiensben. A kísérlet az utóbbi hipotézist igazolta.

jai, azaz építőkövei **ribonukleozid-trifoszfátok**, pontosabban: ATP, GTP, CTP és UTP. A legelső vagy kezdő szubsztrát rendszerint egy purinnukleotid. Ha az első nukleotid a helyére került, a polimeráz megkötö a másodikat, majd hozzákapcsolja az elsőhöz, kialakítva az első foszfodiészter-kötést az RNS-láncban. Ezzel a lépéssel az iniciáció befejeződik.

Elongáció

A transzkripció elongációs fázisában az RNS-polimeráz irányítja a ribonukleotidok egymás utáni bekötését a növekvő RNS-láncba, $5' \rightarrow 3'$ irányban (vagyis az RNS-szál $5'$ -végétől a $3'$ -vég felé haladva). Működése közben a DNS-templát szála mentén mozog, és vele együtt halad az a „buborék” is, amely a DNS szétvált bá-



8.2. ábra. RNS-szintézis. (a) Foszfodiészter-kötés kialakulása az RNS-szintézis során. ATP és GTP kapcsolódik össze dinukleotiddá. Figyeljük meg, hogy a guanozinhoz legközelebb álló foszforatom (piros) szerepel majd a foszfodiészter-kötésben. A másik két foszfát (kék) nem lép be a kötésbe, hanem pirofoszfátként mint melléktermék lehasad. (b) RNS szintézise DNS-templát mellett. A templát szekvenciája 3'-dC-dA-dT-dG-5', amely mindkét irányban folytatódik (szaggatott vonal). Az RNS-szintézis kezdetén a GTP a templát dC nukleotidjával képez bázispárt. A következő lépésben UTP szolgáltatja az uridinnukleotidot, amely a templát dA nukleotidjával áll párba, és a GTP-vel foszfodiészter-kötést alkot. Az eredmény GU dinukleotid kialakulása. Hasonló módon mindig egy újabb nukleotid kapcsolódik a növekvő RNS-lánchoz, amíg a transzkripció teljes nem lesz. A kilépő pirofoszfátokat nem jeleztük

zispárjait tartalmazza. Ebben a szétvált régióban a DNS-templát bázisait sorban egymás után olyan pozícióba hozza, hogy azok bázispárokat alakíthassanak ki az odaérkező ribonukleotidokkal. Amint a transzkripció gépezet továbblép, a két DNS-fonál ismét feltekeredik, és helyreáll a kettős hélixszerkezet.

Termináció

Ahogy a promoterek a transzkripció kezdetét jelzik, a gének másik végénél található régiók, az ún. **terminátorok** az átírás végét jelentik. Az RNS-polimerázzal és esetenként más fehérjével kapcsolódva lazítják a képződött RNS- és a DNS-templát közötti kapcsolatot. Ennek eredményeként az RNS disszociál az RNS-polimerárról és a DNS-ről, ami a transzkripció végét jelenti.

Az RNS szekvenciáját rendszerint 5' → 3' irányban, balról jobbra haladva írják fel. Ez a molekuláris genetikával foglalkozók

részére természetes, mivel az RNS 5' → 3' irányban szintetizálódik, és a transláció is 5' → 3' irányban történik. Mivel a riboszómák 5' → 3' irányban olvassák le az üzenetet, annak felírása is így célszerű, hogy egy mondathoz hasonlóan olvasható legyen.

A géneket általában ugyanígy írják fel, a transzkripció irányának megfelelően, balról jobbra haladva. A transzkripció startpontjától, vagyis az RNS-lánchoz beépülő első nukleotidtól felfelé (*upstream*) – konvencionális felírás esetén bal oldali irányban – helyezkedik el a promóter. A promóterhez képest pedig lefelé (*downstream*) – jobb oldalra – a szabályozott gén(ek).

A transzkripció rövid áttekintése után két alapvető különbség fedezhető fel a transzkripció és a replikáció között: (a) Az RNS-polimeráz egyszálú RNS-t készít a transzkripció során, ami azt jelenti, hogy csak az egyik DNS-fonalat másolja. Ezért a transzkripció **aszimmetrikus**, ellentétben a szemikonzervatív replikációval, amikor mindkét DNS-szálról készül másolat. (b) A transzkripció során a DNS két szála csak rövid időre és kis szakaszon távolodik el

(1) Iniciáció:

(a) Az RNS-polimeráz kötődése a promoterhez:



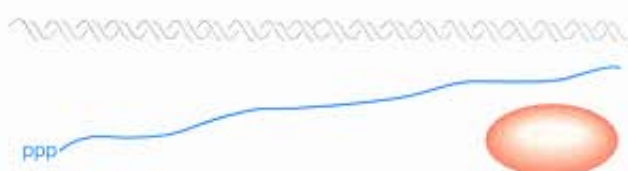
(b) Az első foszfodiészterkötés kialakulása:



(2) Elongáció:



(3) Termináció:



8.3. ábra. A transzkripció. (a) Az RNS-polimeráz (piros) szorosan kötődik a promoterhez, és egy rövid szakaszon elválasztja a DNS két szálát. (b) Az iniciációs lépésben a polimeráz foszfodiészter-kötéssel összekapcsolja a naszcensz RNS (kék) első két nukleotidját. Az első nukleotidon megmarad a trifoszfát-csoport. (2) Az elongáció során a DNS-szálak szétválását jelző transzkripciós buborék együtt mozog a polimerázzal, ami lehetővé teszi, hogy az enzim leolvassa a templátot, és azzal komplementer RNS-t szintetizáljon. (3) A terminációra akkor kerül sor, amikor a polimeráz eléri a terminációs jelet a gén végén, aminek hatására az RNS-polimeráz és az RNS leválik a DNS-templátról

egymástól. A szálak elválása mindössze arra a részre korlátozódik, amely lehetővé teszi, hogy a polimeráz leolvassa a templátot. A replikáció során azonban a két szülői fonál végleg elválik egymástól.

A transzkripció három fázisra tagolható: az iniciációra, az elongációra és a terminációra. Az iniciáció során az RNS-polimeráz kötődik a promoterhez, a DNS két szála lokálisan elválik egymástól, és kialakul az első foszfodiészterkötés. Az elongáció folyamán a ribonukleotidok az RNS-polimeráz hatására 5' → 3' irányban összekapcsolódnak. A termináció során a polimeráz és az elkészült RNS leválik a DNS-templátról.

A TRANZKRIPCIÓ RÉSZLETES ISMERTETÉSE

A transzkripció két legfontosabb szereplője az RNS-termék szintéziséhez templátként szolgáló DNS és a szintézist végző RNS-polimeráz. A transzkripció feltétele a két komponens találkozása egymással. Az RNS-polimeráz azonban nem indulhat el a baktérium-DNS bármelyik pontjáról. A gének starthelye előtt található speciális régióhoz, a **promoterhez** kötődik. Kezdjük tehát a folyamat részletes ismertetését ezzel a két elemmel, az RNS-polimerázzal és a promoterral.

8.1. táblázat. A holoenzim és a core-enzim transzkripciós képessége

	Transzkripciós aktivitás		
	DNS	Core-enzim	Holoenzim
T4 (ép)		0,5	33,0
Borjú-csecsemőmirigy		14,2	32,8

Az RNS-polimerázt már 1960-61-ben felfedezték az állati, a növényi és a baktériumsejtekben egyaránt. Közülük leg részletesebben a bakteriális enzimet tanulmányozták. Richard Burgess, Andrew Travers és munkatársaik 1969-ben kimutatták, hogy az *E. coli* RNS-polimeráz holoenzimét fizikailag két komponensre lehet szétválasztani: egy polipeptidre, az ún. **szigma-faktorra** (σ) és a visszamaradó, négy polipeptid komplexéből álló „**core**”-enzimre. A core-enzim és a σ -faktor szétválasztása mélyreható változást okoz az enzimaktivitásban (8.1. táblázat). Míg a holoenzim meglehetősen jó aktivitással írja át *in vitro* az ép T4 fág DNS-ét, addig a core-enzim csak kevésbé képes erre. Másrészt a core-enzim megőrzi alapvető RNS-polimerizáló képességét, mivel a sok rést tartalmazó templátokról igen jó hatásfokkal készít átíratot. (A későbbiekben látjuk majd, hogy a nagyszámú rést tartalmazó DNS átírásának nincs biológiai jelentősége.)

A σ -faktort visszaadva a core-enzimhez, az enzim képessé válik a rést (nick) nem tartalmazó, ép T4 DNS átírására. (Egy kontroll kísérletben kimutatták, hogy a σ nem hasította a T4 DNS-t.) Ennél is fontosabb, hogy a holoenzim a T4 génjeinek csak bizonyos osztályát írja át – az ún. közvetlenül átíródnak korai géneket – míg a core-enzim nem mutat ilyen specificitást, *in vitro* kis intenzitással a teljes T4-genomot átírja. Továbbá, a T4 DNS átírása a holoenzim közreműködésével *in vitro* és *in vivo* is aszimmetrikusan történt, míg a core-enzim lassú átírása szimmetrikusan. Tehát a core-enzim nem csak leolvasta a teljes genomot, hanem mindkét fonalat leolvasta. Ebből az következik, ha megfósztjuk a holoenzimet a σ -faktortól, akkor megmarad a core-enzim RNS-szintetizáló aktivitása, de specificitását elveszti. A core-enzim hozzáadása pedig helyreállítja a specificitást. (A σ -faktor elnevezése is erre utal, a görög σ , azaz *s*, a „specificitás” szó rövidítése.)

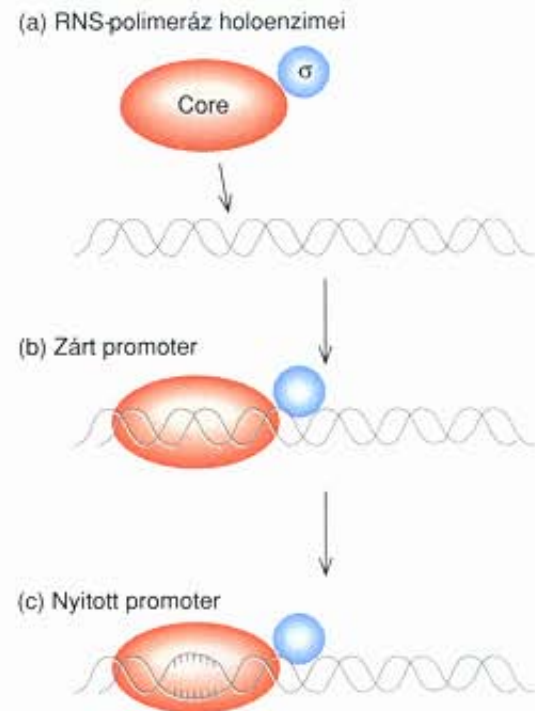
A transzkripció folyamatának kulcsszereplője az RNS-polimeráz. Az *E. coli* holoenzime egy core-enzimből áll, amely a transzkripció gépezet alapeleme. Emellett tartalmaz egy σ -faktort, amely irányítja a core-enzimet, hogy az specifikus géneket írjon át.

AZ RNS-POLIMERÁZ KÖTÖDÉSE A PROMOTEREKHEZ

Miért képes az RNS-polimeráz core-enzime a rést (nick) tartalmazó DNS átírására, az ép DNS-ére pedig nem? A DNS-en levő rések és hézagok iniciációs helyet jelölnek az RNS-polimeráz és a core-enzim részére, de az iniciációnak ez a fajtája természetesen nem specifikus. Az ép T4 DNS-en is található néhány rés vagy hézag, ezért a core-enzim csak néhány ilyen mesterséges kezdőhelyet talált. Ha azonban a σ -faktor is jelen volt, az RNS-polimeráz felismerte a valódi kötőhelyeket – a promotereket – az ép T4 DNS-en, és ott kezdte el az átírást. Ez az iniciáció specifikus és hasonló az *in vivo* iniciációhoz. Tehát a σ -faktor irányítja a polimerázt a specifikus promoterekre történő iniciációra.

Hogyan változtatja meg a σ -faktor a polimeráz viszonyát a promoterekhez? Michael Chamberlin és kollégái kötődési kísérletekkel próbálták választ adni erre a kérdésre. Mérték a fág-DNS és az RNS-polimeráz core-enzime, illetve a holoenzim közötti kötődést, és úgy találták, hogy a kötőhelyek két osztályba sorolhatók. Csak néhány olyan kötőhely volt, amelyek rendkívül erősen kötötték a holoenzimet. Ezekben az esetekben az enzim kapcsolódása után mintegy 30–60 órára volt szükség ahhoz, hogy a holoenzimek 50%-a disszociáljon a kötőhelyekről, amelyek természetesen promoterek voltak. Emellett sok olyan kötőhely volt, amely lazán kötötte a polimerázt, és mind a holoenzim, mind a core-enzim kapcsolódhatott hozzá.

Ezeknek és más kísérleti eredményeknek az a magyarázata, hogy az RNS-polimeráz kétféle állapotban lehet: egyik formája szorosan kapcsolódik a promoterekkel (iniciációs fázis), míg a másik forma csak lazán kötődik (elongációs fázis). Az első állapot



8.4. ábra. Az RNS-polimeráz kötődése a promóterhez. (a) A polimeráz holoenzime megkeresi a DNS-en a kötőhelyet. (b) A holoenzim megtalálja a promótert, és lazán hozzákapcsolódik ún. zárt promóter komplexet alkotva. (c) A holoenzim kötődése szorossá válik, a DNS kis szakasza lokálisan megolvad, és kialakul az ún. nyitott promóter komplex

csak a σ -faktor jelenlétében alakulhat ki, majd ha az iniciáció már megtörtént, a σ leválik, és a core-enzim végzi az elongációt. Továbbá a holoenzim kötődése a promóterhez a DNS helyi olvadásával jár, vagyis az ún. **nyitott promóter komplex** kialakulásával. A **zárt promóter komplexben** lazán kötődő polimeráz σ -faktor jelenlétében alakul át nyitott formává, és ez teszi lehetővé a transzkripció elindulását (8.4. ábra). Most már tudjuk, mi a szerepe a σ -faktornak a transzkripció specificitásában: kiválasztja azt a promótert, amelyhez a polimeráz szorosan kötődhet, ezután a promóter irányítása alá tartozó gének átíródnak.

A σ -faktor azzal teszi lehetővé a transzkripció iniciációját, hogy az RNS-polimeráz holoenzimét szorosan a promóterhez kapcsolja. Ez a kötődés a DNS helyi olvadásától, a nyitott promóter komplex kialakulásától függ, ami csak a σ -faktor jelenlétében játszódik le. Ezáltal a σ -faktor kiválasztja, mely gének íródnak át. Miután a σ -faktor részt vett az iniciációban, disszociál a core-enzimről, ami végrehajtja az elongációt.

AZ *E. COLI* PROMOTEREINEK KÖZÖS BÁZISSZEKVENCIÁI

Mi a prokarióta promoterek speciális jellemzője, amelynek alapján az RNS-polimeráz megtalálja őket? David Pribnow számos *E. coli*- és fágpromótert hasonlított össze, és talált bennük egy



8.5. ábra. Egy prokarióta promotor felépítése. Az ábra a -10 és -35 boxok, valamint a letekeredett régió helyzetét mutatja a transzkripció kezdőpontjához viszonyítva egy jellemző *E. coli*-promoterben. A nagybetűk azoknak a bázisoknak a jelzései, amelyek a vizsgált promoterek több mint 50%-ában előfordulnak az adott pozícióban. A kisbetűk az 50%-nál kisebb arányban megtalálható bázisok jelei

közös, mintegy hat-hét bázisból álló szekvenciát, amelynek középpontja megközelítőleg tíz bázissal felfelé (upstream) található a transzkripció kezdőpontjától. A szakasz eredeti elnevezése **Pribnow box** volt, de ma már inkább a **-10 box** jelölés terjedt el. Később találtak egy másik rövid szekvenciát is az *E. coli*- és a fágpromoterekben, mintegy 35 bázissal a transzkripció start-helytől felfelé (upstream), ez lett a **-35 box**. Már több mint száz promotert összehasonlítottak, és az említett jellegzetes szekvenciájú szakaszok mindegyikben jelen voltak (8.5. ábra).

Ezek az ún. **konszenzus szekvenciák** tulajdonképpen valószínűségi értékeket jelölnek. A 8.5. ábra nagybetűi olyan bázisokat jelentenek, amelyek igen nagy gyakorisággal találhatók az adott pozícióban. A kisbetűk azoknak a bázisoknak felelnek meg, amelyek általában az adott ponton találhatók, de kisebb gyakorisággal az előzőeknél. Az egyes valószínűségi értékek olyanok, hogy igen ritkán lehet teljesen azonos -10 és -35 box szekvenciákat találni. Ha azonban az egyezés tökéletes, akkor az nagyon erős promoterekben található, amelyek szokatlanul nagy aktivitással kezdik a transzkripciót. Az erős promoterek várhatóan olyan szabályozó gének, amelyek termékei nagy mennyiségben szükségesek.

Azok a mutációk, amelyek rontják a konszenzus szekvenciák egyezőségét általában ún. **gyengítő hatású mutációk**, vagyis a promotert gyengítik, így kisebb intenzitású transzkripciót eredményeznek. Például a -10 box mutációja a TATAAT szekvenciáról TGTAAT szekvenciára általában gyengítő hatású. Ezzel ellentétben, azok a mutációk, amelyek növelik a promoterek szekvenciáinak hasonlóságát, többnyire erősítik a promotert, vagyis ún. **fokozó hatású mutációk**. Ilyen például a -10 box mutációja a TATCTT szekvenciáról TATATT szekvenciára. A 9. fejezetben látjuk majd, hogy az eukarióta promotereknek is vannak konszenzus szekvenciáik, és egyikük nagyon hasonlít a -10 boxra.

A prokarióta promoterek két régiót tartalmaznak a transzkripció kezdőponttól -10 és -35 bázissal felfelé. *E. coli*-ban ezek kisebb-nagyobb hasonlóságot mutatnak a TATAAT és TTGACA konszenzus szekvenciákkal. Általában, minél nagyobb a megegyezés egy promotor megfelelő régiójában ezekkel a konszenzus szekvenciákkal, annál erősebb a promotor.

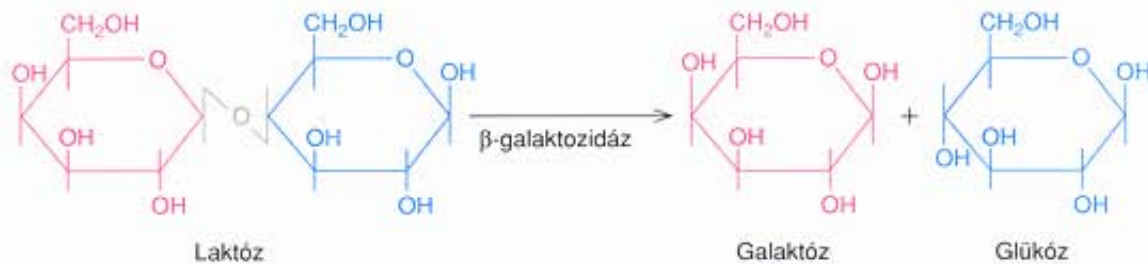
A GÉN MŰKÖDÉS EGYSÉGEI: AZ OPERONOK

Az 1. fejezetben említett tettünk azokról a biokémiai reakcióutakról, amelyeket enzimsoportok katalizálnak. Nyilvánvaló, hogy egy reakcióút enzimeinek egyszerre kell rendelkezésre állniuk, hiszen bármelyikük hiánya gátolná az egész folyamatsort. Ezért például egy négy enzim által katalizált reakciósorozatban nem lenne gazdaságos három gén átírása és a negyedik kikapcsolása, vagyis a hatékony működés érdekében az egy reakcióutat katalizáló fehérjék génjeit célszerű közösen szabályozni. Ennek egyik lehetséges mechanizmusa, hogy a funkcionálisan kapcsolatban álló gének egymás mellett helyezkednek el a genomban, és közös szabályozás alatt állnak. Ilyen összefüggő, összehangoltan szabályozott géncsoport az **operon**.

A LAC OPERON

Az elsőként felfedezett operon, az operonelmélet iskolapéldája. Három **struktúrgént**, vagyis enzimfehérjét kódoló gént tartalmaz. A struktúrgének azoknak az enzimeknek az információját hordozzák, amelyek közreműködésével az *E. coli* hasznosítani tudja a tejcukrot, más néven **laktózt**, erre utal a **lac operon** elnevezés is. Vegyünk egy *E. coli*-tenyészetet, amelyet **glükózt** tartalmazó táptalajon növesztünk, és oltuk át a sejteket laktóztartalmú táptalajra. Képesek-e a sejtek az új tápanyagforráshoz alkalmazkodni? Rövid ideig nem, hiszen leáll a növekedésük, de egy bizonyos várakozási idő, ún. lag-periódus után, ismét osztódni kezdenek. A lag-periódus alatt a sejtek „bekapcsolják” a **lac operont**, és ennek eredményeként felszaporodnak bennük a laktóz hasznosításához szükséges enzimek.

Melyek ezek az enzimek? Először is, szükséges egy olyan enzim, amely lehetővé teszi a laktóz felvételét a sejtbe. Ez a **galaktozid permeáz**. Másodszor, szükséges egy enzim, amely a laktózt monomerjeire, galaktózra és glükózra bontja. A reakciót a 8.6. ábra szemlélteti. A laktóz két egyszerű cukorból álló **diszacharid**. Molekulájában a glükóz és a galaktóz között β -galaktozidos kötés van, tehát a laktóz egy β -galaktozid, és a hidrolízisére képes enzim a β -galaktozidáz. A két enzim, a galaktozid permeáz és a β -galaktozidáz génjei egymás mellett helyezkednek el a **lac operonban**, a harmadik struktúrgénnel, a **galaktozid transzacetiláz** génjével együtt. Az utóbbi enzim szerepe a laktóz anyagcseréjében még nem teljesen tisztázott.



8.6. ábra. A β -galaktoszidáz által katalizált reakció. Az enzim hasítja a β -galaktosidos kötést (szürke) a laktózt alkotó két cukor, a galaktózt (piros) és a glükózt (kék) között

A felsorolt nevek bepillantást nyújtanak az enzimek nevezékta-nába is. Az *-áz* utótag általánosan előfordul a hidrolízist katalizáló enzimek nevében, míg a név többi része az enzim által katalizált reakcióra utal.

A laktózanyagcsere enzimeit kódoló gének a következő sorrendben követik egymást: β -galaktoszidáz (*lacZ*), galaktosid permeáz (*lacY*), galaktosid transzacetiláz (*lacA*). A három gén együtt íródik át, egy promotertől kiindulva, egyetlen, ún. **poli-cisztronos mRNS**-re. Így transzkripciójuk egyetlen promoter szabályozásával megvalósulhat. A *poli-cisztronos* kifejezés a *cisztron* szóból, a gén egyik szinonim elnevezéséből származik. A poli-cisztronos mRNS egynél több gén átíratát tartalmazza.

A laktóz feldolgozását *E. coli*-ban két enzim végzi, és valószínűleg még egy harmadik is közreműködik benne. A három enzim génje egymás mellett helyezkedik el, és egy promoter vezérlete alatt, együtt íródik át egy poli-cisztronos mRNS-re. A három gén funkciója és expressziója is összefügg egymással, ki- és bekapcsolásuk együtt történik.

A *lac* operon negatív szabályozása

A *lac* operon egyik lehetséges szabályozási mechanizmusát, a **negatív szabályozást** vázolja a 8.7. ábra. Az elnevezés arra utal, hogy az operon „bekapcsolt” állapotban van addig, amíg valamilyen tényező le nem állítja működését. Az operont a ***lac* represszor** inaktíválja. A represszor annak a ***lacI* génnek** a terméke, amely a 8.7. ábrán a promotertől balra található. Négy azonos alegységből álló tetramer polipeptid, és a promotertől közvetlenül jobbra található **operátorhoz** kötődik. A kötődés után az operon **represszált állapotba** kerül. Ennek oka, hogy az operátor és a promoter közvetlenül egymás mellett helyezkednek el, és az operátorhoz kötődő represszor megakadályozza az RNS-polimeráz mozgását az operon struktúrgénjei felé. Ezért a struktúrgének nem íródnak át, az operon kikapcsolt, azaz represszált állapotban van.

A *lac* operon mindaddig represszált állapotban marad, amíg a glükóz jelen van a táptalajban, a laktóz pedig hiányzik. A rendszer így gazdaságos, hiszen főleg olyan enzimeket termelnie a sejtnek, amelyek egy jelen nem lévő tápanyag lebontását szolgálják, ráadásul egy másik cukor, a glükóz is hozzáférhető. Ha

egy *E. coli*-sejtben minden gén állandóan működne, az olyan sok energiát emésztene fel, hogy az *E. coli* alulmaradna a hatékonyabb anyagcseréjű baktériumokkal folytatott versengésben. A génműködés szabályozása tehát létfontosságú.

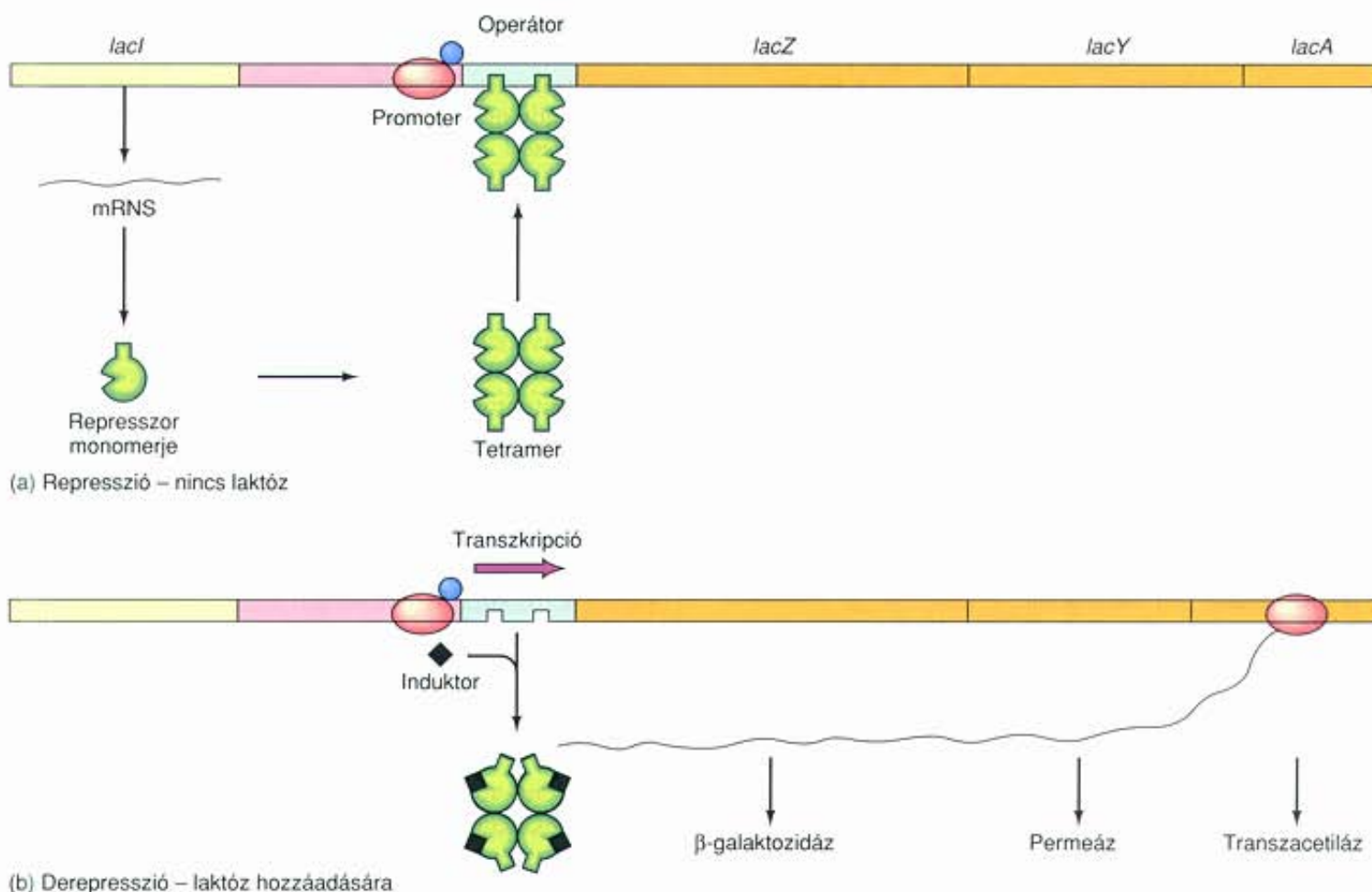
Másrészt, ha a táptalajból elfogy a glükóz, de a laktóz jelen van, kell lennie olyan mechanizmusnak, amely eltávolítja a represszort, bekapcsolja az operont, így a sejt felhasználhatja az új tápanyagot. Hogyan történik mindez? A represszor ún. **alloszterikus fehérje**, vagyis konformációváltozásra, ezzel együtt funkcióváltásra is képes. Ez akkor következik be, amikor egy speciális molekulával, a *lac* operon **induktorával** kapcsolódik. Az induktor kötődésének hatására a represszor konformációja megváltozik, és a represszor disszociál az operátorról, ezzel az operon működése indukálódik (8.7.(b) ábra).

Milyen jellegzetességei vannak az induktornak? A laktóz egyik alternatív formája, az **alolaktóz** (a görög *allo* = más), ami kis mennyiségben képződik akkor, amikor a β -galaktoszidáz elhasítja a laktózt glükózzra és galaktózzra. A laktóz és az alolaktóz abban tér el egymástól, hogy a laktózban a két monoszacharid között β -1,4, míg az alolaktózban β -1,6 kötés szerepel (8.8. ábra).

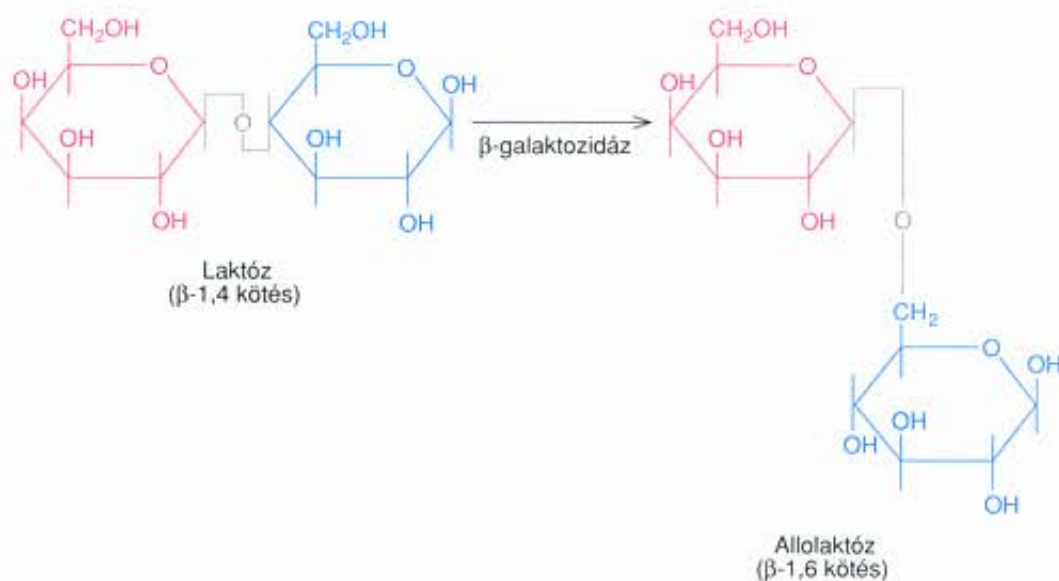
Az eddigiek alapján azonnal adódik a kérdés: miként alakulhat a laktóz alolaktózzá, amikor nincs jelen a sejtben, hiszen a *lac* operon represszált, így nincs permeáz, amely bejuttatná a sejtbe, és nincs β -galaktoszidáz sem, amely átalakíthatná! A válasz az, hogy a represszió nem tökéletes, és a *lac* operon termékei igen kis mennyiségben, de mindig megtalálhatók a sejtben. Mennyiségük éppen elég ahhoz, hogy a laktóz néhány molekulája bejusson, és induktor képződjön belőlük. A működtetéshez nem szükséges sok induktor, hiszen mindössze tíz tetramer represszor van sejtenként. Továbbá, az operon derepressziója lavinaszerűen egyre több és több terméket produkál, amelyek egyre több és több induktort alakítanak ki.

Az operon felfedezése

Az operonelmélet kidolgozása François Jacob, Jacques Monod és munkatársaik nevéhez fűződik, akik sikerüket részben annak is köszönhetnék, hogy munkájuk során együttesen alkalmazták a genetikai és biokémiai analízist. A történet az 1940-es években kezdődött, amikor Monod az *E. coli* laktózanyagcseréjének indukálhatóságát kezdte tanulmányozni. Monod tudta, hogy a laktózanyagcsere egyik fontos eleme a β -galaktoszidáz, amely laktózzal és más galaktosidokkal is indukálható. Melvin Cohn-



8.7. ábra. A *lac* operon negatív szabályozása. (a) Represszió – nincs laktóz. A *lacI* gén által kódolt represszor (zöld) az operátorhoz kötődik, ezzel megakadályozza, hogy az RNS-polimeráz átírja a *lac* struktúrgéneket. Az RNS-polimeráz nagyon rövid, 6 nukleotidnál nem hosszabb RNS-darabokat szintetizál. (b) Derepresszió – van laktóz. Az induktor (fekete) a represszorhoz kapcsolódik, és úgy változtatja meg annak konformációját (*lent*), hogy már nem kötődik erősen az operátorhoz. A represszor levál az operátorról, az RNS-polimeráz pedig megkezd a struktúrgének átírását. A transzkriptum egy policisztronos mRNS, amelynek transzlációja β -galaktozidázt, permeázt és transzacetilázt eredményez.



8.8. ábra. A laktóz allolaktózzá alakulása. A β -galaktozidáz egyik mellékreakciója során a laktóz hatásos induktorrá, allolaktózzá alakul. A galaktozidos kötés típusa β -1,4-ről β -1,6-ra módosul.

8.2. táblázat. Kriptikus mutáns (*lacY*⁻) hatása a galaktozid felhalmozódására

Genotípus	Induktor	Galaktozid-felhalmozódás
Z ⁺ Y ⁺	-	-
Z ⁺ Y ⁺	+	+
Z ⁺ Y ⁻ (kriptikus)	-	-
Z ⁺ Y ⁻ (kriptikus)	+	-

nal közösen egy specifikus ellenanyagot, az antigalaktozidázt használták fel a β -galaktozidáz mennyiségének meghatározására, és kimutatták az enzim mennyiségének növekedését az indukció során. Mivel a laktózra adott válasz során egyre több géntermék jelent meg, arra a következtetésre jutottak, hogy maga a β -galaktozidáz gén indukálódik.

A helyzetet bonyolította, hogy találtak olyan mutánsokat (kriptikus mutánsok), amelyek termeltek ugyan β -galaktozidázt, mégsem növekedtek laktózon. Mi hiányzott ezekből a mutánsokból? Monod és munkatársai radioaktív galaktozidot adtak vad és kriptikus mutáns baktériumokhoz. Azt találták, hogy az indukálatlan vad sejtek nem vették fel a galaktozidot, hasonlóan a kriptikus mutánsokhoz, annak ellenére, hogy az utóbbiak indukáltak voltak. Az indukált vad sejtek természetesen felhalmozták a galaktozidot. Mindez két dologra világított rá. Először is, a vad típusú sejtekben egy olyan anyag (galaktozid permeáz) indukálódik a β -galaktozidázzal együtt, amely a galaktozidok sejtbe való juttatásáért felelős. Másodsor, a kriptikus mutánsokban ennek az anyagnak a génje (Y) valószínűleg hibás (8.2. táblázat).

Monod elnevezte a kérdéses anyagot galaktozid permeáznak, annak ellenére, hogy kollégái erősen bírálták, mert nevet adott egy fehérjének, mielőtt izolálta volna. Monod erre megjegyezte: „Ez a hozzáállás erősen emlékeztet két vérbeli angol úriember viselkedésére, akik hírből ugyan nagyon jól ismerik egymást, de nem elegendnek szóba, mert még nem mutatták be őket egymásnak.” Miközben Monod kollégáival tiszta formában igyekezett izolálni a galaktozid permeázt, azonosítottak egy másik fehérjét is, a β -galaktozidázzal és galaktozid permeázzal együtt indukálódó galaktozid transzacetilázt.

Az 1950-es évek végére Monod már tudta, hogy a galaktozidok három enzimet indukálnak egyszerre, és ennek megfelelően legalább három gént. Talált néhány ún. **konstitutív mutáns** is, amelyeknek nem volt szükségük indukcióra, mégis állandóan termeltek a három enzimet. Monod felismerte, hogy az előrelépéshez nélkülözhetetlen a genetikai analízis, ezért felvette a kapcsolatot a Pasteur Intézetben dolgozó François Jacobbal.

Arthur Pardee közreműködésével Jacob és Monod olyan merodiploidokat (részleges diploid baktériumokat), hoztak létre, amelyekben mind a vad típusú (indukálható), mind pedig a konstitutív allélok jelen voltak (l. 13. fejezet). A vizsgálatokban az indukálható allél bizonyult dominánssal, alátámasztva, hogy a vad típusú sejtek olyan anyagot termelnek, amely a *lac* operont

kikapcsolja. Mivel ez az anyag mind a vad, mind pedig a konstitutív szülőből származó géneket kikapcsolta, a merodiploid indukálható volt. Ez az anyag természetesen a *lac* represszor. A konstitutív mutánsokban a represszort kódoló *I* gén defektes, ezért jelölése *I*⁻.

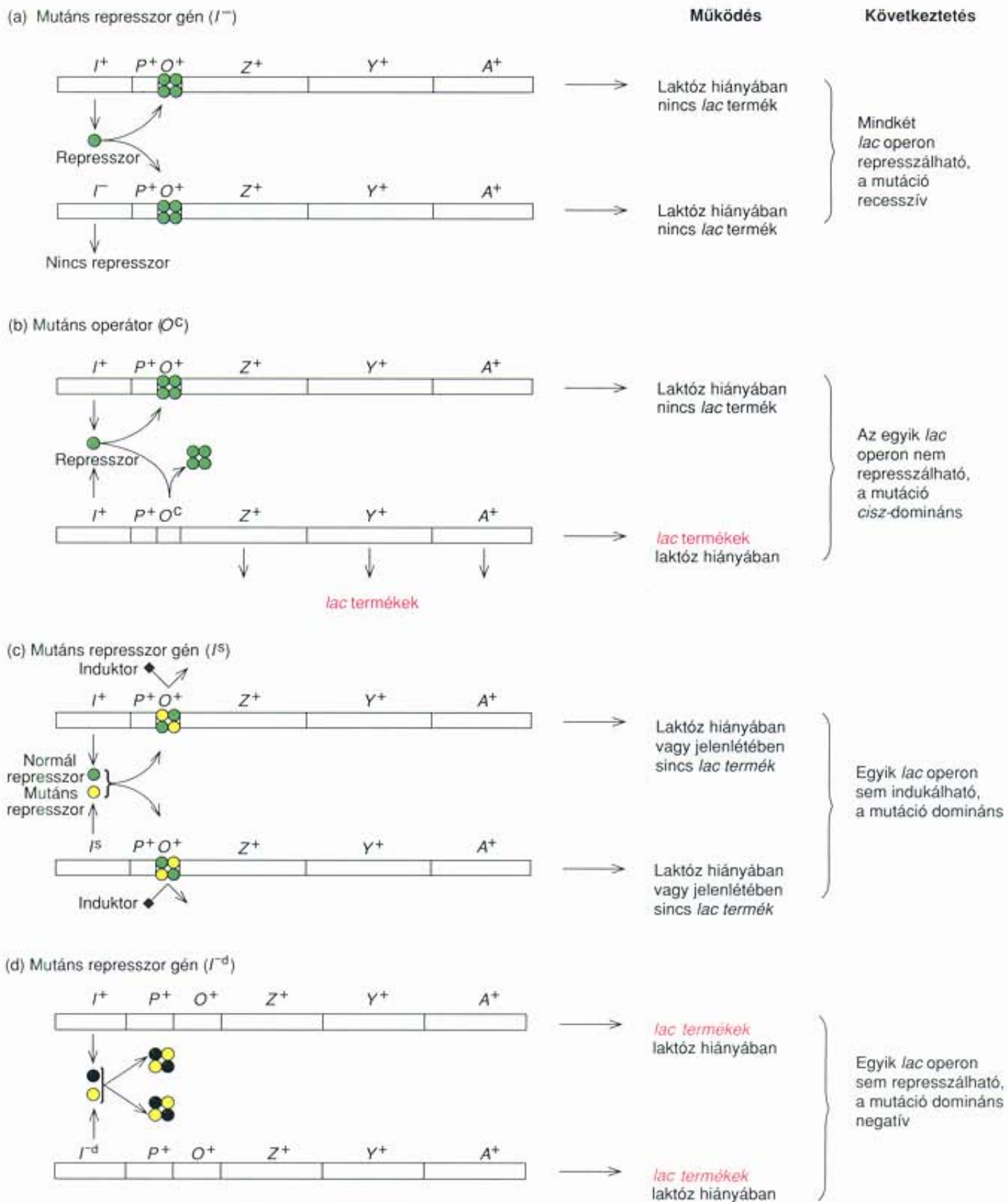
A represszor létezése feltételez egy olyan specifikus DNS-szekvenciát, amelyhez a represszor kötődni tud. Jacob és Monod ezt a régiót nevezték el operátornak. A kölcsönhatás specifikus-sága alapján azt is sejteni lehetett, hogy az operátor mutációi megakadályozzák a represszorral való kapcsolatot. Ezeknek a mutációknak szintén konstitutívoknak kell lenniük, de akkor hogyan lehet elkülöníteni az ilyen mutánsokat a represszor génjének konstitutív mutánsaitól?

Jacob és Monod felismerték, azt kell meghatározniuk, hogy a kérdéses mutáció domináns vagy recesszív sajátság-e. Jacob a merodiploid baktérium két operátorát két rádióvevőhöz hasonlította, amelyek egy ház két ajtaját ellenőrzik. A represszor génnek kis rádióadó, amelyek azonos, az ajtókat zárva tartó jeleket küldenek. Az egyik represszor gén mutációja működésképtelenné teszi az egyik transzmittert, de a másik transzmitter működik, ezért mindkét ajtó zárva marad. Másként megfogalmazva, a merodiploid mindkét *lac* operonja represszállható marad, ezért az ilyen mutáció fenotípusosan recesszív, ahogyan azt már láttuk is (8.9.(a) ábra).

Másrészt, az operátorok egyikének mutációját hasonlíthatjuk az egyik rádióvevő meghibásodásához. Mivel nem veszi többé a jeleket, az általa vezérelt ajtó kinyílik, míg a másik, hibátlan vevő által vezérelt ajtó zárva marad. Lefordítva a hasonlatot, a merodiploid mutáns *lac* operonja állandóan derepresszállt állapotban lehet, a vad típusú vizont represszállható marad. Ezért a kérdéses mutáció domináns, de csak a mutáns operátor szabályozása alatt álló *lac* operonra nézve (8.9.(b) ábra). Az ilyen mutáció neve ***cisz*-domináns**, mert hatását csak az azonos DNS-szálon elhelyezkedő génekre fejti ki (latin *cis* = itt). Jacob és Monod valóban találtak ilyen *cisz*-domináns mutánsokat, és bebizonyították az operátor létezését. A mutációkat *O*⁻-vel jelölték, amelynek jelentése: **konstitutív operátor**.

Mit tudunk a represszor génben bekövetkező mutációkról, amelyek miatt a represszor nem képes az induktorra reagálni? Az ilyen mutációk indukálhatatlanná teszik a *lac* operont, és mind *cisz*, mind ***transz*** helyzetben dominánsak, azaz a másik DNS-szál felett is kifejtik hatásukat (latin *trans* = át, keresztül). Ennek oka, hogy a megváltozott szerkezetű represszor még az induktor jelenlétében is kötve marad az operátorhoz, sőt a vad típusú represszor molekulák jelenlétében is (8.9.(c) ábra). Mindezt olyan rádiójelhez hasonlíthatjuk, amelyet nem lehet kikapcsolni. Monod és munkatársai két ilyen mutánsot találtak, majd később Suzanne Bourgeois még jó néhányat. Jelölésük *I*⁺, hogy elkülöníthetőek legyenek a konstitutív represszor mutánsoktól (*I*⁻), amelyekben a represszor nem ismeri fel az operátort.

A konstitutív mutánsok mindkét típusában (*I*⁻, *O*⁻) ugyanolyan hatás figyelhető meg a *lac* operon mindhárom génjére (Z, Y és A). A géneket ekkorra már térképezték, és kiderült, hogy egymás mellett találhatók a kromoszómán. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az operátor a struktúrgének közelében van.



8.9. ábra. Regulációs mutációk hatása merodiploidok *lac* operonjában. (a) Ebben a merodiploidban egy vad típusú operon (felül) és egy represszor génjében mutáns (I^-) operon (alul) van. A vad típusú represszor gén (I^+) elegendő szabályos szerkezetű represszort (zöld) termeltet mindkét operon kikapcsolásához, ezért az I^- mutáció recesszív. (b) A merodiploidban egy vad típusú operon (felül) és egy mutáns operátorú (O^C) operon (alul) van, amely nem képes a represszor (zöld) megkötésére. A vad típusú operon represszálható marad, a mutáns azonban nem, ezért a *lac* operon termékei laktóz hiányában is képződnek. Mivel csak a mutáns operátorhoz tartozó operont érinti a hatás, a mutáció cisz-domináns. (c) A merodiploid ebben az esetben egy vad típusú (felül) és egy represszor génjében mutáns (I^S) operonnal (alul) rendelkezik. A mutáns gén terméke (sárga) nem képes az induktor megkötésére. A mutáns represszor ezért irreverzibilisen kötődik mindkét operátorhoz, ezzel mindkettőt indukálhatatlanná teszi. Ez a mutáció tehát domináns. Figyeljük meg, hogy a vad típusú és a mutáns alegységeket tartalmazó represszor tetramerek mutánsként viselkednek, vagyis induktor jelenlétében is kötődnek az operátorhoz. (d) Ebben a merodiploidban egy vad típusú operon (felül) és egy represszor génjében mutáns (I^-d) operon (alul) van. Az utóbbi terméke (sárga) nem képes a *lac* operátorhoz kötődni, sőt nem kapcsolódnak a heterotetramer (vad és mutáns monomerekből álló) represszor molekulák sem. A mutáció domináns, hiszen az operon laktóz hiányában is bekapcsolva marad. Mivel a mutáns fehérje tönkreteszi a vad típusú aktivitását is, a pontos elnevezés: domináns negatív mutáció

Azóta más, konstitutív és domináns (I^d) mutációit is azonosították a represszor génnek (8.9.(d) ábra). A defektes génnek ez a típusa hibás fehérjét kódol, amely azonban tetramerré kapcsolódhat a vad típusú represszor monomerekkel. A hibás monomerek megszüntetik a tetramer aktivitását, így az nem tud az operátorhoz kapcsolódni. Ezért a mutáció domináns. Ugyanakkor nem *ász*-domináns, mivel az inaktív represszor egyik operátorhoz sem képes kötődni. Az ilyen típusú, ún. **domináns negatív** mutációk meglehetősen gyakoriak a természetben.

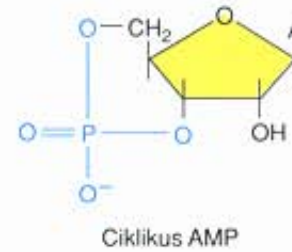
Jacob és Monod tehát okosan tervezett genetikai analízissel dolgozták ki az operonelméletet. Előre megjósolták két kulcsfontosságú szabályozó elem létét: a represszor génét és az operátort. Deléciós mutációkkal igazolták egy harmadik, mindhárom struktúrgén működéséhez szükséges elem, a promoter létezését. Ahhoz a következtetéshez is eljutottak, hogy mindhárom struktúrgén (*lacZ*, *Y* és *A*) egy szabályozási egységben, a *lac* operonban lokalizálódik. Az ezt követő biokémiai kísérletek minden kétséget kizáróan megerősítették Jacob és Monod csodálatos hipotézisét.

A *lac* operon negatív szabályozása az alábbiakból következik: Az operon mindaddig kikapcsolt állapotban marad, amíg a represszor az operátorhoz kötődik. A represszor ugyanis megakadályozza, hogy az RNS-polimeráz az operátortól indulva átírja a három struktúrgént. Amikor a glükózkészlet kimerül, és a laktóz rendelkezésre áll, a *lac* operon által kódolt enzimek néhány molekulája a laktózt allolaktózzá alakítja. Az allolaktóz mint induktor kötődik a represszorhoz, és olyan konformációváltozást idéz elő, ami miatt a represszor disszociál az operátorról. A represszor eltávolításával az RNS-polimeráz átírhatja a három struktúrgént. Biokémiai és genetikai kísérletek kombinációjával sikerült kimutatni a *lac* operon negatív szabályozó rendszerének két elemét: az operátort és a represszor gént.

A *lac* operon pozitív szabályozása

Az elnevezésből megjósolható, hogy a pozitív szabályozás ellentétes a negatívval, vagyis az operon kikapcsolt állapotban van (valójában alacsony szinten működik), hacsak valamilyen hatás be nem kapcsolja. Ha a negatív kontrollt egy autó fékjéhez hasonlítjuk, a pozitív kontroll a gázpedál. A *lac* operon esetében mindez azt jelenti, hogy a represszor eltávolítása az operátorról (a fék kioldása) önmagában nem elég az operon beindításához, szükség van egy járulékos, pozitív faktor egyidejű jelenlétére is (rá kell lépni a gázpedálra).

Mi a szelektív előnye ennek a pozitív szabályozó rendszernek? Nem elegendő a negatív kontroll? A negatív kontroll önmagában csak a laktóz jelenlétére való reakciót teszi lehetővé. Pozitív kontroll hiányában pusztán a laktóz megjelenése aktiválná az operont. Ez azonban nem szükséges akkor, ha glükóz



8.10. ábra. A ciklikus AMP. Figyeljük meg a ciklikus 5' → 3' foszfodiészter-kötést (kék)

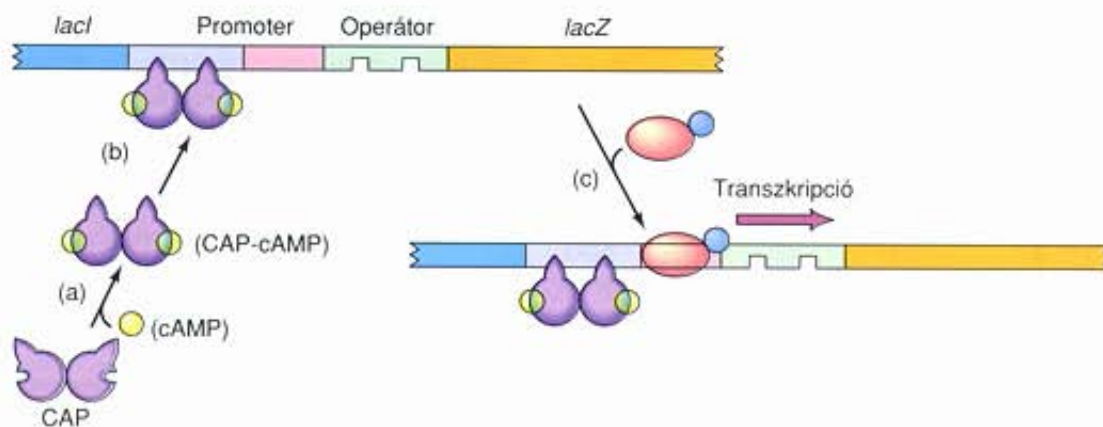
van a rendszerben, mivel az *E. coli* sokkal könnyebben metabolizálja a glükózt, mint a laktózt. Ilyen esetben tehát felesleges a *lac* operon működtetése. A valóságban az *E. coli lac* operonja mindaddig inaktív, amíg a glükóz rendelkezésre áll. Hosszú ideig azt gondolták, hogy a glükóz metabolizmusának előtérbe helyezése valamelyik lebontási köztes termék, ún. *katabolit* hatására következik be. Erre utal a jelenség neve: **katabolit-represszió**.

A *lac* operon ideális pozitív szabályozója egy olyan anyag lenne, amelyik érzékeli a glükóz hiányát, aktiválja a *lac* promotert, hogy az RNS-polimeráz kötődhessen hozzá, és átírassa a struktúrgéneket (feltéve természetesen, hogy a laktóz rendelkezésre áll, és a represszor levált az operátorról). A glükóz koncentrációjának változására reagáló anyagok egyike egy nukleotid, a **ciklikus-AMP**, röviden **cAMP** (8.10. ábra). A glükóz mennyiségének csökkenésével a cAMP koncentrációja növekszik a sejtben.

A cAMP a pozitív szabályozás végrehajtója? Nem egészen. A *lac* operon pozitív regulátora egy két részből álló komplex: a cAMP és az azt megkötő **katabolitaktivátor-fehérje**, a **CAP**, ahogyan felfedezői, Geoffrey Zubay és munkatársai elnevezték. (A fehérjét Ira Pastan és csoportja is tanulmányozta, és a CRP, azaz cAMP receptor fehérje nevet adták neki.) A fehérje megkötöti a cAMP-t, és az így kialakult komplex kapcsolódik a *lac* szabályozó régiójához, ami elősegíti az RNS-polimeráz kötődését is (8.11. ábra). A *lac* promoter két részre osztható, a bal oldali CAP-kötőhelyre és a jobb oldali RNS-polimeráz-kötőhelyre.

Hogyan segíti elő a CAP-cAMP komplex kötődése a promoterhez az RNS-polimeráz kapcsolódását? A CAP-cAMP-promoter komplex röntgendiffrakciós vizsgálata kiderítette, hogy a CAP-cAMP kötődése a promoter régió erőteljes meghajlását idézi elő. Ennek a hajlatnak köszönhetően az RNS-polimeráz könnyebben elválasztja egymástól a DNS két szálát, és ezzel kialakul a nyitott promoter komplex. A CAP-cAMP ugyanakkor fokozza a transzkripciót is, mivel közvetlen kapcsolatba lép az RNS-polimerázzal.

A CAP-cAMP más indukálható operonok transzkripcióját is elősegíti, köztük a sokat tanulmányozott *ara* és *gal* operonokét is. Ahogyan a *lac* operon a laktóz anyagcseréjét teszi lehetővé, a felsorolt operonok más szénhidrátok, az arabinóz, illetve a galaktóz lebontásához szükséges enzimeket kódolják.



8.11. ábra. A *lac* operon pozitív szabályozása. (a) cAMP (sárga) hiányában a CAP (lila) nem képes kötődni a *lac* szabályozó régiójában levő célhelyre. A cAMP megkötése után a CAP már alkalmas a célhelyhez való kapcsolódásra. (b) A CAP-cAMP komplex kötődik a DNS-en levő célhelyre. (c) A CAP-cAMP kapcsolódása a DNS-hez megkönnyíti az RNS-polimeráz kötődését a promoterhez. A transzkripció elkezdődhet, feltéve, ha van laktóz és az operátorról levált a represszor. A cAMP-CAP komplex kötődése mintegy 90°-kal meghajlítja a DNS-t, de ezt az ábrán nem tüntették fel

A gazdaságos, hatékony működés érdekében, mindhárom operon kikapcsolt állapotban van, amíg a glükóz a sejt rendelkezésére áll. Minthogy a cAMP a glükóz koncentrációjának változására reagál, nem meglepő, hogy a három fent említett operonnak közös, a cAMP-vel kapcsolatban álló szabályozó mechanizmusa van. A CAP-cAMP kötődik az operonokra vagy azok közelébe, és elősegíti az RNS-polimeráz kapcsolódását.

A *lac*, az *ara*, illetve a *gal* operonok pozitív kontrolljának, más néven katabolit-repressziójának lényege a következő: A cAMP és a katabolit-aktivátor-fehérje (CAP) komplexe kötődik a promoter felső részéhez (upstream), ami elősegíti az RNS-polimeráz kapcsolódását az alsó régióhoz (downstream). A mechanizmus erőteljesen fokozza az operon transzkripcióját. A pozitív szabályozás fiziológiai jelentősége abban áll, hogy csak megfelelően magas cAMP-szint mellett működik, vagyis akkor, amikor a glükóz koncentrációja alacsony, és más energiaforrás felhasználása kerül előtérbe.

A *trp* OPERON

A *trp* operon (ejtsd: tript) azoknak az enzimeknek a génjeit tartalmazza, amelyek *E. coli*-ban a triptofán nevű aminosav szintéziséhez szükségesek. A *lac* operonhoz hasonlóan működése represszor útján megvalósuló negatív szabályozás alatt áll, de a két mechanizmus között alapvető eltérés van. A *lac* operon lebontó folyamatokban szereplő, azaz **katabolikus** enzimeket kódol, és a megfelelő kiindulási anyag jelenlétében aktiválódik. A *trp* operon felépítő folyamatot katalizáló, azaz **anabolikus** enzimek információját tárolja. Az ilyen

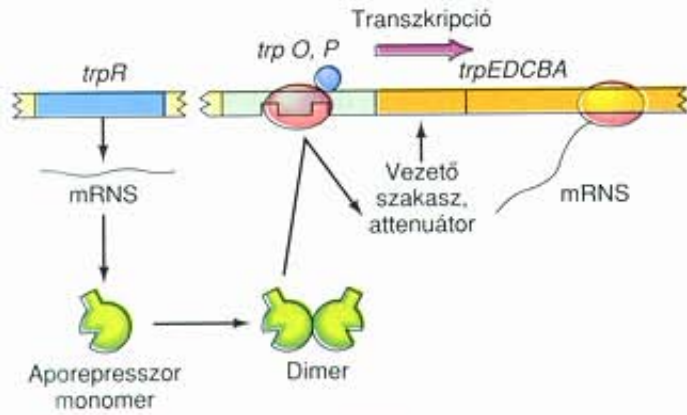
operonok a szintézis végtermékének jelenlétében általában represszálódnak. Amikor a triptofán koncentrációja magas, az operon termékeire nincs szükség, így a *trp* operon struktúrgénjei nem íródnak át. A *trp* operonnak van egy másik szabályozója is, amellyel a *lac* operon esetében nem találkoztunk. Ez az attenuáció.

A triptofán szerepe a *trp* operon negatív szabályozásában

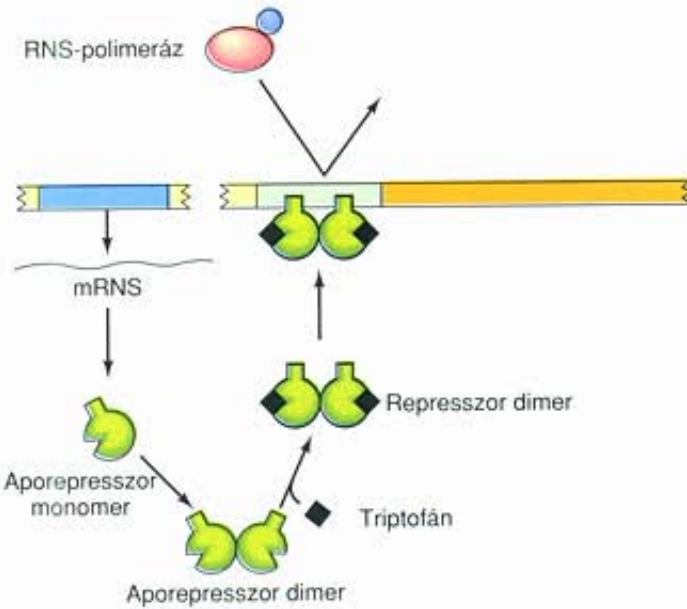
A *trp* operonnak öt struktúrgénje van, amelyek három enzim polipeptidláncát kódolják (8.12. ábra). Az enzimek a triptofán prekursorát, a korizminsavat alakítják át. Az első két gén, a *trpE* és a *trpD* termékei a reakciót első lépését katalizáló enzim polipeptidjei. A harmadik gén, a *trpC* terméke a második lépést katalizálja. Az utolsó két gén, a *trpB* és a *trpA*, annak az enzimnek a két polipeptidjét kódolja, amelyik a harmadik és egyben utolsó reakciólépést irányítja. A *lac* operonhoz hasonlóan a promoter és az operátor itt is megelőzi a struktúrgéneket, de a *trp* operátor teljes egészében a promoter belsejében helyezkedik el, míg a *lac* operonban a két lokusz csupán szomszédos volt.

A *lac* operon negatív szabályozásakor a sejt érzékeli a laktóz jelenlétét, mivel kis mennyiségben megjelenik egy köztes termék, az allolaktóz. Az allolaktóz induktor, mert derepresszálja az operont. A *trp* operon esetében a triptofán magas koncentrációja azt jelzi, hogy a sejtnak nem szükséges energiát fordítania az aminosav szintézisére, az operon kikapcsol.

Hogyan érzékeli a sejt a triptofán jelenlétét? Lényegében a triptofán segíti elő a represszor bekötődését az operátorra. Triptofán hiányában a *trp* represszor inaktív, ún. **aporepresszor** formában van jelen. Amikor kapcsolódik hozzá a triptofán, megváltozik a konformációja, így sokkal nagyobb affinitással kötődhet az operátorhoz (8.12.(b) ábra). A folyamat alloszterikus átrendeződés, amihez hasonlóval már találkoztunk



(a) Alacsony triptofánszint: nincs represszió



(b) Magas triptofánszint: represszió

8.12. ábra. A *trp* operon negatív szabályozása. (a) Derepresszió. Az RNS-polimeráz (piros és kék) a *trp* promoterhez kötődik, és megkezd a struktúrgének (*trpE*, *D*, *C*, *B* és *A*) átírását. Triptofán hiányában, az aporepresszor (zöld), nem képes az operátorhoz kapcsolódni. (b) Represszió. A triptofán, a korepresszor (fekete) kötődik az inaktív aporepresszorhoz, és azt olyan konformációjú represszorrá alakítja, amelyik kapcsolódhat a *trp* operátorához. Ez meggátolja az RNS-polimeráz kötődését a promoterhez, ezért nem történik transzkripció

a *lac* represszor esetében. Az aktív *trp* represszort az aporepresszor és a triptofán komplexe alkotja, ezért a triptofán itt **korepresszorként** szerepel. Amikor magas a sejtben a korepresszor, a triptofán koncentrációja, kialakul az aktív *trp* represszor, ezért az operon inaktív. A triptofán szintjének csökkenésével az aminosav disszociál a represszorról, az aporepresszor visszanyeri konformációját, és leválik az operátorról. Ezzel az operon derepresszálódik. A későbbiekben még elemezzük az aporepresszor konformációjának változását triptofán hatására, és meglátjuk, miért olyan fontos ez az operátorhoz való kötődésben.

A *trp* operon negatív szabályozása bizonyos értelemben tükörképe a *lac* operonénak. A *lac* operonhoz kötődő represszort az induktor kapcsolódása távolítja el az operátorról. A *trp* operon represszora pedig korepresszorként magában foglalja a triptofánt, ami azt jelzi, hogy az aminosavból elegendő van a sejtben. A korepresszor az aporepresszor konformációváltozását okozza. Az aktív represszor erősen kapcsolódik a *trp* operátorához, és lezárja az operont.

A *trp* operon szabályozása attenuációval

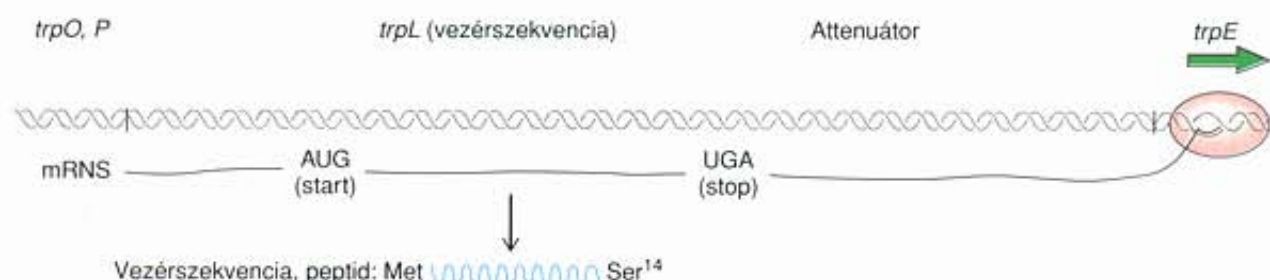
A *trp* operonnak a szokásos negatív szabályozás mellett egy másik, **attenuációnak** nevezett kontrollja is van. Mi ennek a biológiai értelme? A megoldás valószínűleg az, hogy a *trp* operon repressziója gyenge, sokkal gyengébb, mint a *lac* operoné. Ezért még a represszor jelenlétében is jelentős mértékű a *trp* operon átírása. Az attenuátor mutánsokban, amelyekben csak a represszió működik, a transzkripció teljesen represszált szintje csak 70-szer alacsonyabb, mint a teljes mértékben derepresszálnál. Az attenuáció további 10-szeres kontrollt tesz lehetővé az operon működésében, ami azt jelenti, hogy a represszió és az attenuáció kombinációja az operon 700-szoros pontosságú szabályozását valósíthatja meg. Ez pedig nagyon fontos, mivel a triptofán szintézise jelentős mennyiségű energiát igényel.

Nézzük, milyen az attenuáció mechanizmusa! A 8.12. ábrán látható, hogy az operátor és az első struktúrgén, a *trpE* között két lokusz, a ***trp* vezérszekvencia** és a ***trp* attenuátor** (csökkentő, gyengítő) található. A 8.13. ábra közelebbi betekintést ad a vezér-attenuátor rendszer működésébe, amelynek az a rendeltetése, hogy tovább gyengítse az operon transzkripcióját, ha a triptofán viszonylag nagy mennyiségben áll rendelkezésre. Az attenuátor működése a transzkripció idő előtti megszakítása. Más szóval, a magas triptofán koncentráció ellenére megindult transzkripció 90%-os eséllyel befejeződik az attenuátor régióban.

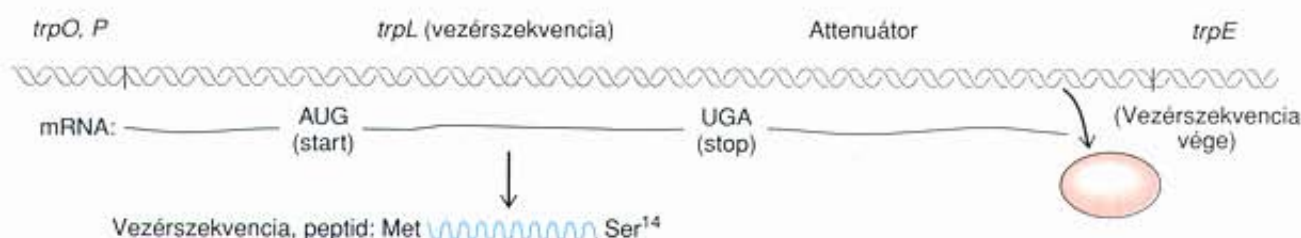
A korai termináció oka, hogy az attenuátor tartalmaz egy stopjelet, egy inverz repetitív szekvenciát, amelyet egymás után nyolc A-T bázispár követ. Az inverz repetitív szakasz miatt a transzkriptum bázispárok kialakítása révén hajtúszerkezetet vehet fel (8.14. ábra). Amikor a hajtú kialakul, a polimeráz leáll, a transzkripció megszakad. A későbbiekben látjuk majd, hogy ez a folyamat hasonló a transzkripció termináció szabályos mechanizmusához, ami *E. coli*-ban az mRNS-ek végén következik be.

Az attenuáció javítja a represszor-operátor rendszerrel működő operonok szabályozási szintjét. Idő előtt megszakítja az operon átírását, amennyiben az operon terméke bőségesen megtalálható a sejtben.

Alacsony triptofánszint: a *trp* struktúrgének átíródnak



(b) Magas triptofánszint: attenuáció, a transzkripció idő előtti leállítása



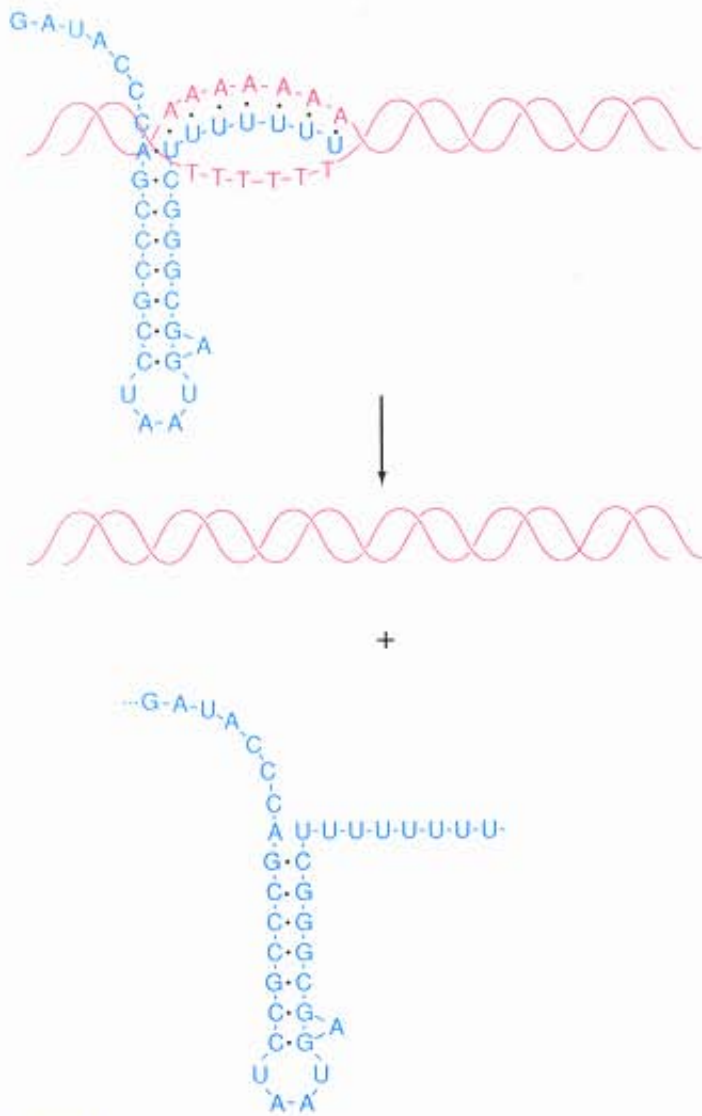
8.13. ábra. Attenuáció a *trp* operonban. (a) Alacsony triptofánkoncentráció mellett az RNS-polimeráz (piros) áthalad az attenuátor szekvencián, és elkezd a struktúrgének átírását. (b) Magas triptofánkoncentráció esetén az attenuátor idő előtt leállítja a transzkripciót, ezért a struktúrgének nem íródnak át

Az attenuáció kiküszöbölése

Amikor a triptofán kis mennyiségben található a sejtben, a *trp* operonnak aktiválódnia kell. Ennek megfelelően biztosan van egy olyan mechanizmus, amely felülkerekedik az attenuáción. Charles Yanofsky és munkatársai a következő hipotézist állították fel: létezik egy olyan hatás, ami gátolja a hajtű kialakulását, ezzel megszünteti a terminációs jelet, felfüggeszti az attenuációt, ezért a transzkripció folytatódhat. A 8.15.(a) ábra rávilágít arra, hogy nemcsak egy potenciális hajtű alakulhat ki a vezérszekvencia transzkriptumának végén, hanem kettő. Ráadásul a két hajtűs szerkezet nem az egyetlen lehetséges elrendezés, hanem létezik egy olyan is, amely csak egy hajtűt tartalmaz (8.15.(c) ábra). Figyeljük meg, hogy ez a változat az első szerkezet mindkét hajtűjéből tartalmaz részeket. A 8.15.(b) ábra jelzései megkönnyítik a koncepció megértését, az eredeti hajtűk oldalainak számozásával (1, 2, 3, 4). Amennyiben az eredeti hajtűk közül az első zárát az 1-es és 2-es szakaszok alkotják, akkor a másikat a 3-as és 4-es szakaszok. Ezzel szemben az alternatív formában csak a 2-es és 3-as szakaszok vesznek részt a hajtű szárrészének kialakításában (8.15.(c) ábra), ami egyben ki is zárja a két hajtű kialakulásának lehetőségét (8.15.(a) ábra).

A két hajtűs szerkezetben több bázispár van, mint az egy hajtűsben, ezért jóval stabilabb is. De hogyan alakul ki egyáltalán a kevésbé stabil forma? A megoldás kulcsa a vezérszek-

vencia bázissorrendjében rejlik (8.16. ábra). Ennek a szekvenciának van egy nagyon különleges sajátossága, nevezetesen az, hogy két szomszédos triptofán kodont (UGG) is tartalmaz, mégpedig az első hajtű 1-es szakaszában. Ez első pillantásra nem tűnik szokatlannak, de tény, hogy a triptofán ritka építőköve a legtöbb fehérjének, száz aminosav közül átlagosan csak egyszer fordul elő. Ezért igen kicsi annak az esélye, hogy *bárh* két kodonja legyen közvetlenül egymás mellett, ráadásul mindez éppen a *trp* operonban! Baktériumokban a transzkripció és a transláció egyidejűleg folyik. Vagyis, amikor a *trp* vezérszekvencia átíródik, a riboszómákon elkezdődik a még szintetizálódó mRNA translációja. Gondoljuk végig, mi történik azon a riboszómán, amelyik triptofán hiányában megpróbálja lefordítani a *trp* vezérszekvenciát (8.17.(a)) ábra. A sejtben kevés a triptofán, így kevés a triptofán-tRNS is, mégis egymás mellé kell beépíteni a láncba két triptofánt! Minden valószínűség szerint ez nem történik meg azonnal, ezért a riboszóma megáll az egyik triptofán kodonnál, mégpedig éppen az első hajtű kialakításában szereplő 1-es szakasznál. Az RNS-szálon ülő, nagyméretű riboszóma megakadályozza a bázispárosodást a 2-es szakasszal, és ezzel lehetővé teszi a bázispárképzést a 2-es és 3-as szakaszok között, ami egy hajtűs szerkezet kialakulásához vezet. A második hajtű kialakulásának hiánya miatt a transzkripció nem fejeződik be, és ezzel az attenuáció is kivédhető. Mindez a sejt alacsony triptofántartalma szükséges is, hiszen a *trp* operonnak át kell íródnia.



8.14. ábra. Az attenuáció mechanizmusa. A vezérszekvencia-attenuátor régió transzkriptuma (kék) egy inverz repetitív szekvenciát tartalmaz, ezért hajtűre emlékeztető szerkezetet vesz fel. Amikor ez bekövetkezik, az RNS-polimeráz megáll, majd leválik róla a transzkriptum, ami egyben a gépezet leállását is jelenti, mielőtt elérte volna a struktúrgéneket

Figyeljük meg a folyamatban a transzkripció és a transláció kapcsolatát, és azt, hogy az utóbbi hatással van az előbbire. Eukariótákban ez a rendszer nem működhetne, hiszen a transzkripció és a transláció a sejt elkülönült tereiben zajlik. A rendszer működésének feltétele az is, hogy a transzkripció és a transláció körülbelül azonos sebességgel folyjon. Ha az RNS-polimeráz gyorsabb lenne a riboszómánál, akkor átjuthatna az attenuátoron, mielőtt a riboszóma megállna a triptofán kodonoknál.

Eltöprenghetünk azon is, hogyan fordítható le a *trp* operon policisztronos mRNS-e, ha a riboszóma már a legelején, a vezérszekvenciánál megakad. Tudni kell azonban, hogy a mRNS-en mindegyik génnek megvan a saját translációs starthelye (AUG), ezért például a *trpE* gén translációja akkor is folyhat, amikor a *trp* vezérszekvenciáé áll.

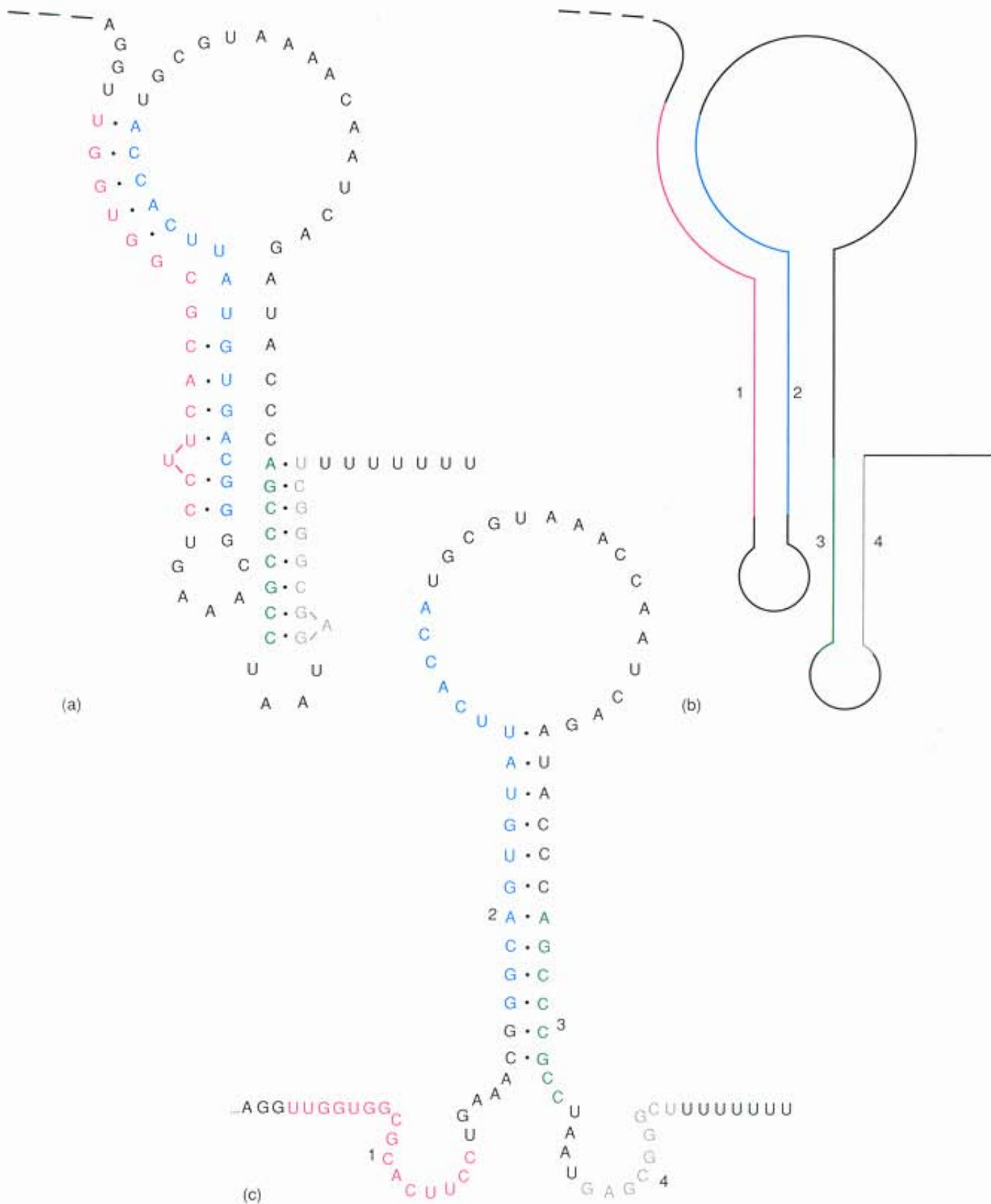
Vizsgáljuk meg azt is, mi történik, ha a vezérszekvencia translációja magas triptofán mellett zajlik (8.17. (b) ábra). Ebben az esetben a kettős triptofán kodon nem gátolja a translációt, a riboszóma folytathatja a leolvasást az 1-es szakaszon át, amíg el nem jut az 1-es és 2-es szakasz között található stopjelig (UGA), és le nem válik. Riboszóma hiányában tehát kialakulhat a két hajtű, ezzel az a terminációs jel, ami véget vet a transzkripciónak, mielőtt a transzkripció gépezet elérte volna a *trp* struktúrgéneket. Tehát az attenuációs mechanizmus reagál a megfelelő triptofán szintre, megakadályozza a felesleges enzimek szintézisét, és ezzel még több triptofán előállítását.

Az attenuáció más operonok esetében is megfigyelhető. Közülük a legtöbb halmozottan előforduló kodonismétlődés a hisztidin operonban (*his*) található, amelynek a vezérszekvenciájában hét hisztidin kodont azonosítottak egymás közvetlen közelében.

Az attenuáció addig érvényesül a *trp* operonban, amíg magas a triptofán szintje. Amikor az aminosav koncentrációja lecsökken, a translációt végző riboszóma megakad a *trp* vezérszekvencia kettős triptofán kodonjánál. Mivel a *trp* vezérszekvencia a translációval egyidejűleg szintetizálódik, a megakadt riboszóma befolyásolja a képződő RNS hajtógatódását, nevezetesen megakadályozza egy olyan hajtű kialakulását, amely része az attenuációért felelős transzkripció terminációs jelnek. Ezért, ha kevés a triptofán, az attenuáció nem következik be, az operon átíródik. Vagyis az attenuációs kontroll ugyanúgy a triptofán szintjére reagál, mint a represszorral történő szabályozás.

A TRANZKRIPCIÓ TERMINÁCIÓJA

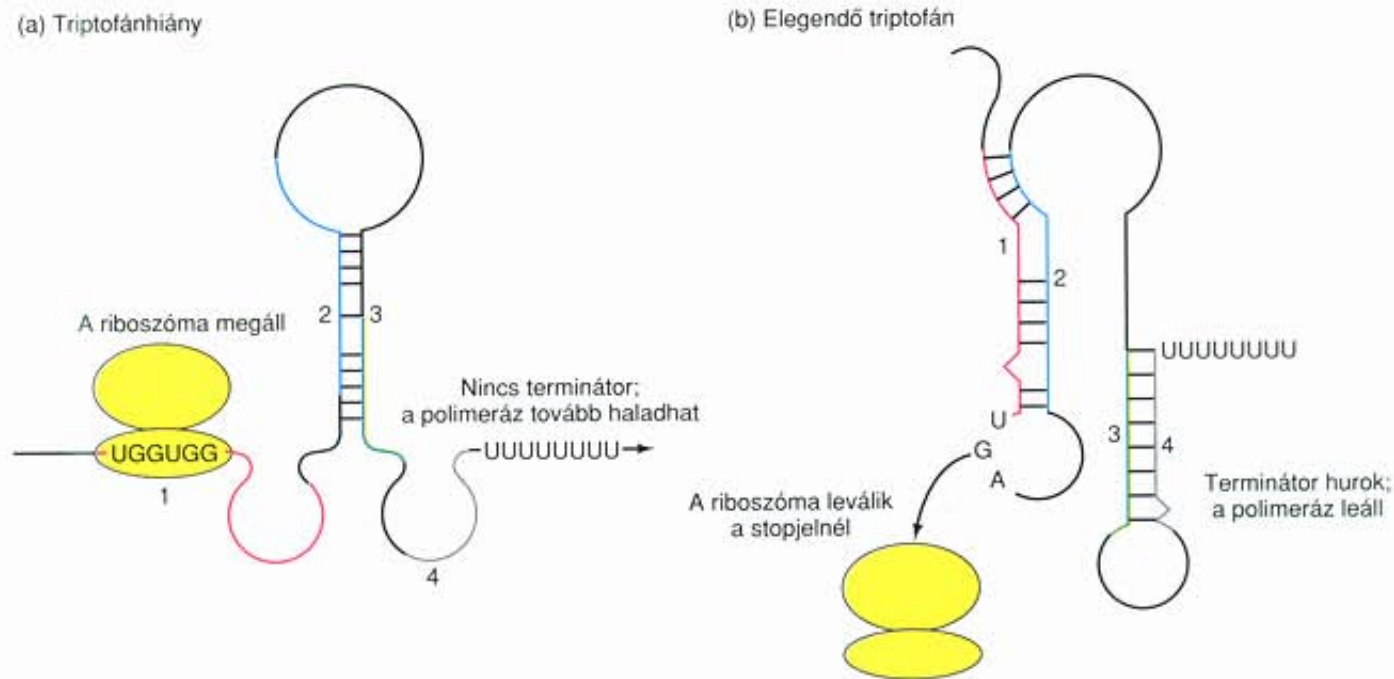
Az előbbieken tárgyalt attenuáció nagyon jó bevezető a transzkripció terminációjának vizsgálatához, mert a prokarióták génjeinek végén bekövetkező valódi termináció hasonló az attenuáció idő előtti terminációjához. Az attenuációt, mint kísérleti próbát felhasználták a termináció mechanizmusának felderítésére is. Terry Platt és munkatársai a *trp* attenuátor régiót manipulálták különböző mutációk beépítésével, és elemezték azoknak az attenuációra gyakorolt hatásait. Ha az attenuátor egy bizonyos szekvenciája fontos a terminációban, akkor az abban bekövetkező mutációk gátolják az attenuációt. Az attenuátor két jellemzője bizonyult fontosnak, ami az attenuáció mechanizmusának ismeretében egyáltalán nem meglepő. (1) A transzkriptum hurokképző képessége az inverz ismétlődő szekvenciáknak köszönhető; (2) a kódoló szálaban egy timidinnukleotidokból álló fűzér található.



8.15. ábra. A vezérszekvencia-attenuátor régió transzkriptumának két lehetséges szerkezete. (a) A stabilabb szerkezet két hajtút tartalmaz. (b) A bázispárosodásban részt vevő, hajtút képző szekvenciákat számok és színek jelzik, így az egyes szakaszok a (c) ábrarészen is könnyen azonosíthatók. (c) Kevésbé stabil szerkezetű, csak egy hajtút tartalmazó struktúra. Az alsó részen látható RNS-gömbölet a valóságban nem ilyenek, egyszerűen csak a helyszüke miatt ábráztuk így

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Thr Ser Stop
 pppA---AUGAAAGCAAUUUUUCGUACUGAAAGGUUGGUGGCGCACUCCUGA

8.16. ábra. A *trp* operon transzkriptumának vezérszekvenciája. A szekvenciának csak egy része szerepel, felette a kódolt peptiddel. Figyeljük meg a két szomszédos Trp kodont (kék)



8.17. ábra. Az attenuáció felfüggesztése. (a) Triptofán hiányában a riboszóma (sárga) leáll a Trp kodonoknál, ami meggátolja, hogy az 1-es szakasz (piros) bázispárokat alkosson a 2-es szakasszal (kék). Ez elősegíti az egy hajtús szerkezet kialakulását, amelyben nincs terminátor, ezért az attenuáció nem következik be. (b) Elegendő triptofán jelenlétében a riboszóma leolvassa a triptofán kodonokat, és leválik a translációs stopjelnél (UGA). Ezzel nem akadályozza meg, hogy a vezérszekvencia transzkriptuma stabil, két hajtús szerkezetet vegyen fel, amelyben megtalálható a terminátor, ezért bekövetkezik az attenuáció

AZ INVERZ ISMÉTLŐDŐ SZEKVENCIÁK ÉS A HAJTÚK

5'-TACGAAGTTCGTA-3'
 3'-ATGCTTCAAGCAT-5'

A szekvencia szimmetrikus a középső, aláhúzott bázispárra, olvasata a papír síkjában 180°-kal elforgatva 5' → 3' irányban, balról jobbra haladva ugyanaz. Vizsgáljuk meg a szekvencia transzkriptumát:

UACGAAGUUCGUA

Szimmetriájának köszönhetően középső bázisából (vastagon szedett G) kiindulva önmagában komplementer szakaszokat tartalmaz. A komplementer bázisok az alábbi módon hajtút képezhetnek:

U • A
 A • U
 C • G
 G • C
 A • U
 A • U
 G

A hajtú csúcán lévő A és U a hajlat fizikai korlátjai miatt nem alkothat bázispárt.

A *trp* attenuátor inverz ismétlődő szekvenciája nem tökéletes, de még nyolc bázispár alakulhat ki a 3-as és 4-es szakaszok között, és közülük hét erős, három hidrogénkötéssel kapcsolódó G-C bázispár. A hajtú szerkezete a következő:

A • U
 G • C
 C • G
 C • G
 C • G
 G • C
 C • G
 C • G
 U • U
 A • A

A hajtú végén egy kis szabad hurok képződik, mivel az U-U és A-A szekvenciák nem képezhetnek bázispárt. Ráadásul egy A is kilóg a hurokból, hogy nyolc bázispár alakulhasson ki hét helyett. Mindezek ellenére a hajtú viszonylag stabil szerkezetet jelent.

A TERMINÁCIÓ EGY MODELLJE

A 8.18. ábrán vázolt terminációs hipotézist alátámasztja az a fel-fedezés, hogy az inverz ismétlődő szekvenciák és a T-sorozat kulcsfontosságú tényezői a transzkripció terminációs jelének. Az RNS-polimeráz átírja az inverz ismétlődő szekvenciát, és ezzel olyan transzkriptumot hoz létre, amely hajtűképzésre hajlamos (8.18.(a) ábra). Amikor a hajtű kialakul (8.18.(b) ábra), az RNS-polimeráz valamilyen, pontosan még nem tisztázott ok miatt le-áll. Ennek következtében a transzkriptumot és a DNS-templátot csak a DNS adeninjei (dA) és az RNS uraciljai (rU) között levő H-kötések tartják össze. Az ilyen dA-rU kötések azonban meglehetősen gyengék, olvadáspontjuk 20° -kal alacsonyabb, mint rU-rA vagy rA-dT bázispárok esetén. Ez a tény vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy az RNS könnyen leválhat a templátról, ami a transzkripció végét jelenti (8.18.(c) ábra).

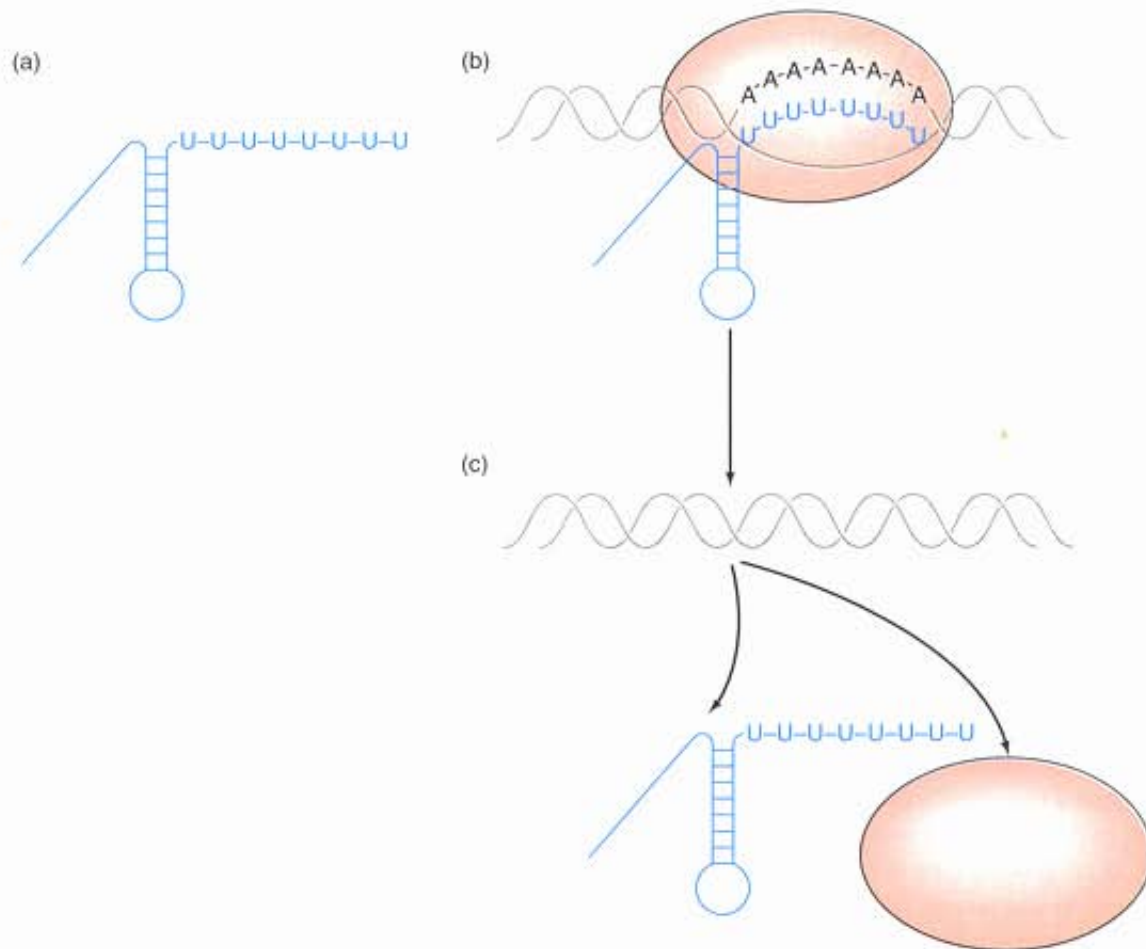
A ρ TERMINÁCIÓS FAKTOR

A fenti terminációs modell valójában csak az *E. coli* RNS-polimerázának terminációjára érvényes. Az *E. coli*-ban ugyanakkor sok olyan terminációs esemény van, amelyben nem csak a polimeráz, hanem egy másik faktor, a **rhó-faktor** (ρ) is közremű-

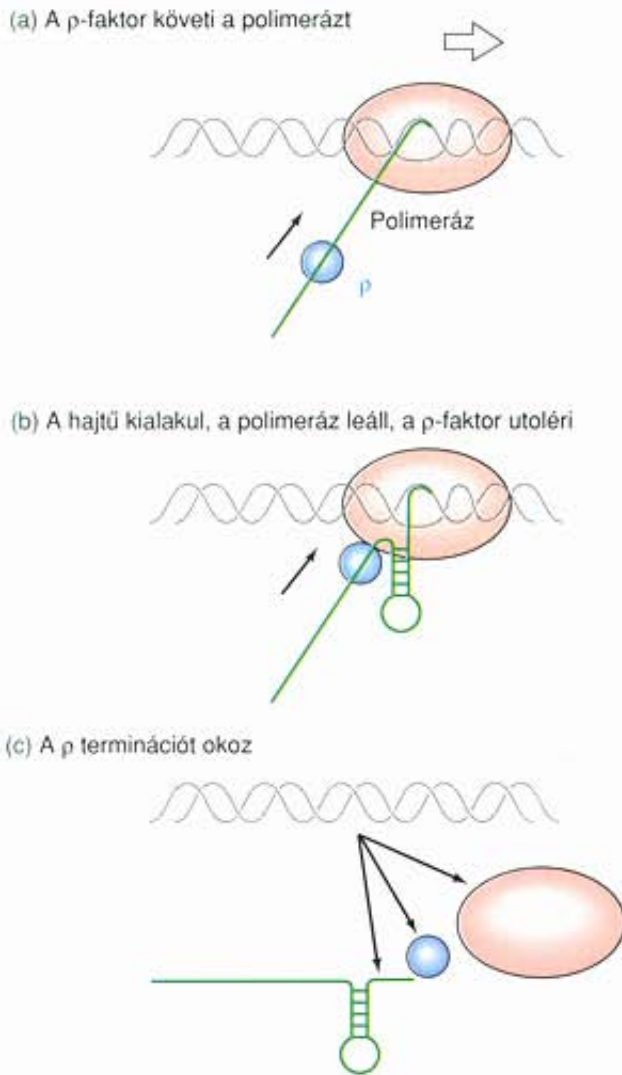
ködik. Ha a szigma-faktor (σ) az iniciációs, más néven specifi-tási faktor, akkor a ρ a terminációs, más szóval leválási faktor.

A ρ -dependens termináció szabályai kissé eltérnek a ρ -faktortól független terminációtól. A legszembevetőbb különbség az, hogy a ρ -dependens terminátorokban csak az egyik szerkezet-i elem, az inverz ismétlődő szekvencia található meg, és hiányzik belőlük a T-fűzér vagy valamilyen más mintázatú szekvencia. Emiatt a polimeráz minden bizonnyal megáll a hajtűnél, de a transzkriptum nem képes magától leválni. Ezt a feladatot ρ -faktor végzi el.

Hogyan működik a ρ -faktor? A σ -faktornál láttuk, hogy hatását az RNS-polimerázra a core-enzimhez szorosan kötődve fejt ki. Hasonló szerepet tételhetnénk fel a ρ -faktor esetében is, ρ -nak azonban nincs affinitása az RNS-polimerázhoz. Míg a σ -faktor alapvető eleme a polimeráz holoenzimnek, addig a ρ nem. Sokkal valószínűbb az a hipotézis, hogy a ρ kötődik a transzkriptumhoz, és követi az RNS-polimerázt, amíg az meg nem áll a terminátor régióban, éppen a hajtű kialakulása után (8.19. ábra). Ekkor a ρ utoléri a polimerázt, és leválasztja a transzkriptumot. A hipotézis helyességét néhány bizonyíték is alátámasztja. Kimutatható, hogy a ρ -faktor, legalábbis bizonyos körülmények között, kötődik az RNS-hez.



8.18. ábra. A ρ -faktortól független termináció vázlata. (a) A transzkriptum 3'-végén megtalálható a ρ -faktortól független terminációhoz szükséges két szerkezet: egy bázispárokat tartalmazó hajtű és egy másik mintázatú szekvencia, jelen esetben uridinnukleotidok sorozata. (b) Amikor a hajtű kialakul, a polimeráz (piros) leáll, így a transzkriptumot és a templátot csak A-U kötések tartják össze. (c) Az A-U kötések felszakadnak, ezzel az RNS (kék) leválik a templátról, és a transzkripció befejeződik.



8.19. ábra. A ρ -faktortól függő termináció modellje. (a) A polimeráz (piros) szintetizálja az RNS-t, a ρ -faktor (kék) a transzkriptumhoz (zöld) kötődik, és követi a polimerázt. (b) Amikor a transzkriptumon kialakul a hajtú, a polimeráz leáll, így a ρ -faktor utolérheti. (c) A ρ -faktor fellazítja az RNS-DNS kötéseket, ezzel leválasztja az RNS-t a templátról

A termináció jelzéseit, más szóval a terminátorokat ismeri fel az RNS-polimeráz. Közéjük tartoznak az inverz ismétlődő szekvenciák és az ezeket követő bázisszekvenciák, gyakran egy T-fűzér. Az inverz ismétlődő szekvencia átírásával képződő transzkriptum hajtút képez, ami megállítja az RNS-polimerázt. A terminátor második része biztosítja az RNS leválását, ezzel a transzkripció befejezését. Más terminátorok az RNS-polimeráz mellett igényelnek egy leválási faktort is, az ún. ρ -faktort. Az ilyen terminátorokban csak az inverz ismétlődő szekvenciák találhatók meg. A ρ fellazíthatja a transzkriptum-templát kötést, amikor az RNS-polimeráz leáll a hajtúnél.

A TRANZKRIPCIÓ IDŐBELI KONTROLLJA

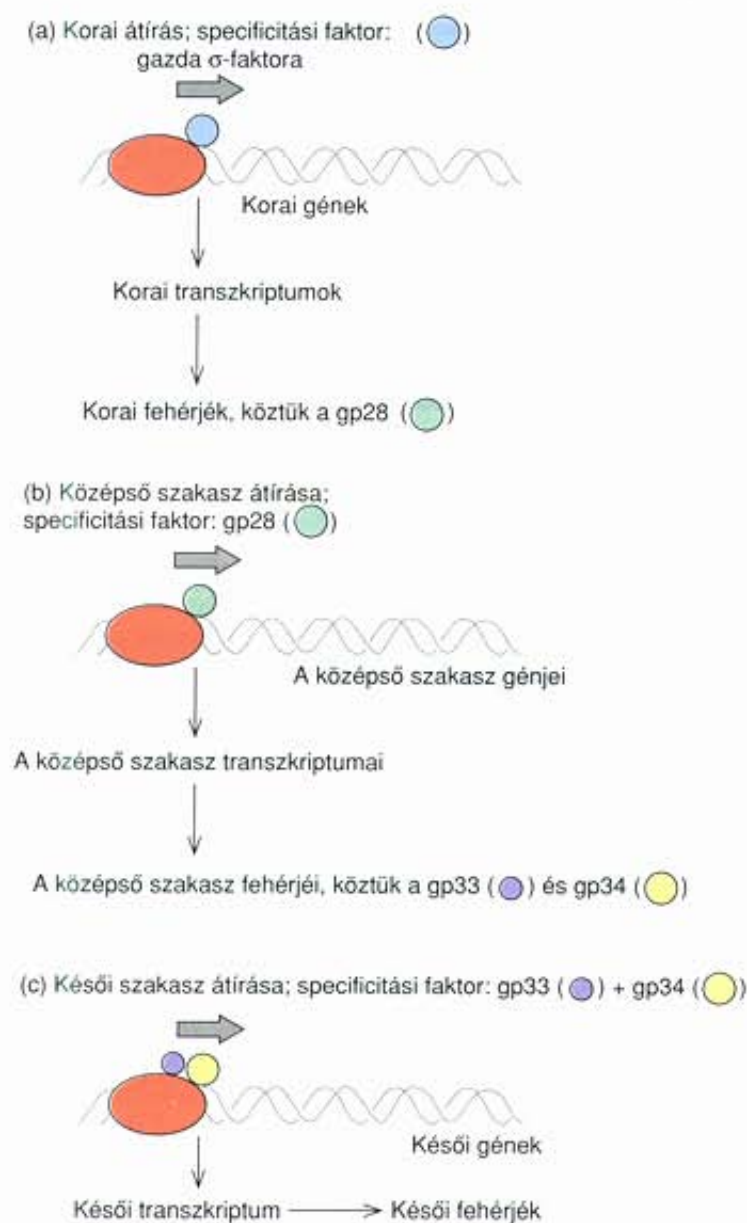
Mindeddig azokat a mechanizmusokat mutattuk be, amelyek csak erősen korlátozott számú gén transzkripciójának egyidejű szabályozását teszik lehetővé. A *lac* operon bekapcsolásakor például csak három struktúrgén aktiválódik. A baktériumok életciklusában azonban vannak olyan időszakok, amikor sokkal erőteljesebben módosul a génexpresszió. Amikor egy fág megfertőz egy baktériumot, általában saját céljainak megfelelően programozza át a gazdasejt transzkripció apparátusát. A folyamat a transzkripció időbeli szabályozásán alapul. A fág génei közül először az ún. korai gének, majd a késői gének íródnak át. Mire az *E. coli* a T4 fág fertőzésének késői szakaszába lép, lényegében megszűnik a gazdasejt géneinek transzkripciója, és csak a fág géneinek átírása folyik. A specificitás ilyen mértékű változását nehéz lenne az operonmechanizmussal magyarázni. A fertőzés alapvető változást okoz a transzkripció gépezetében – maga az RNS-polimeráz módosul. Más, de hasonlóan gyökeres változás történik a génexpresszióban egyes baktériumok, köztük a *Bacillus subtilis* sporogenezise során is. Ez esetben a növekedés vegetatív fázisában szükséges gének kapcsolódnak ki, és a sporogenezishez szükséges speciális gének kapcsolódnak be. A háttérben ismét az RNS-polimeráz módosulása áll. A fejezet hátralévő részében a génműködés szabályozásának ezeket a vonatkozásait mutatjuk be.

A GAZDA RNS-POLIMERÁZÁNAK MÓDOSÍTÁSA

Az RNS-polimeráz melyik részének módosulása okozhatja az enzim specificitásának megváltozását? Már láttuk, hogy *in vitro* a σ -faktor kulcsszerepet játszik a T4 DNS transzkripciójának specificitásában, ezért a fenti kérdésre adott legésszerűbb válasz, a σ -faktor, amelynek helyességét kísérletek is alátámasztják. Érdekes, hogy az első kísérleteket nem az *E. coli*-T4 rendszerrel végezték, hanem a *B. subtilis* nevű baktériummal és annak fágjaival, elsősorban az SPO1 faggal.

Az SPO1 a T4-hez hasonlóan nagyméretű genommal rendelkezik. Transzkripciójának időbeli lefutása a következő: A fertőzés első öt percében a korai gének működnek; majd a fertőzéstől számított öt-tíz perc elteltével a középső fázis génei kapcsolódnak be; a tizedik perctől a fertőzés végéig a késői gének aktiválódnak. Mivel a fagnak nagyszámú génje van, ezért egyáltalán nem meglepő, hogy a program időbeli lefolyását igen pontos szabályozó mechanizmus ellenőrzi. J. Pero és kollégái vezető szerepet játszottak a 8.20. ábrán szemléltetett modell kidolgozásában.

Az SPO1 fág korai géneinek átírását a gazdasejt RNS-polimeráz holoenzime végzi, hasonlóan a T4 rendszerhez. Erre azért van szükség, mert a fagnak nincs saját RNS-polimeráza. Tehát, amikor a fág megfertőzi a sejtet, az egyetlen



8.20. ábra Az átírás időbeli szabályozása az SPO1-gyel fertőzött *Bacillus subtilis*-ben. (a) A korai transzkripciót a gazdasejt RNS-polimeráz holoenzime végzi, beleértve a gazda σ -faktorát is (kék). Az egyik korai fágfehérje, a gp28 (zöld) egy új σ -faktor. (b) A középső szakasz génjeinek transzkripcióját a gp28 irányítja, a gazdasejt polimerázának core-enziméhez (piros) kapcsolódva. Két, a középső szakaszban termelődő fehérje, a gp33 és a gp34 (lila és sárga), amelyek együttesen egy újabb σ -faktort alakítanak ki. (c) A késői szakasz génjeinek átírása a gazda core-enzimének és a gp33-gp34 fehérjéknek a függvénye

rendelkezésére álló RNS-polimeráz a gazdasejt holoenzime. A *B. subtilis* holoenzime nagyon hasonlít az *E. coli*-éra. Core-enzime két nagy (β és β') és két kicsi (α) polipeptidből áll, σ -faktora 43 000 molekulatömegű, valamivel kisebb az *E. coli* 70 000-es σ -faktoránál. Az SPO1 fertőzés korai fázisában átírt gének egyike a 28-as gén. Terméke, a gp28 fehérje, amely kapcsolódik a gazda polimerázának core-enziméhez, helyettesíti a gazda σ -faktorát (σ^{43}). A fág által kódolt poli-

peptiddel megváltozik az RNS-polimeráz specificitása, és megkezdődik a fágfertőzés középső szakaszára jellemző gének átírása a gazda, illetve a fág korai génjei helyett. Más szóval, a gp28 felváltja a σ -faktort, és kettős hatással bír: megakadályozza, hogy a gazdasejt polimeráza a saját géneket írja át, emellett átvált a korai gének átírásáról a középső fázis génjeinek átírására.

Az átkapcsolás a középső szakaszból a későire, lényegében hasonlóan történik, de ekkor két polipeptid kötődik a core-enzimhez, amelyek együttműködve változtatják meg a polimeráz specificitását. A két polipeptid, a gp33 és gp34 a fág életciklusának középső szakaszára jellemző két gén, a 33-as és a 34-es termékei. A két fehérje a gp28 helyébe lép, a megváltozott polimeráz pedig a késői gének átírását irányítja, és nem a középső géneket. A gazdasejt core-enzimét felépítő polipeptidek a folyamat során változatlanok, az enzim specificitását, és ezzel a transzkripció program irányítását a σ -faktorok progresszív cserélődése eredményezi.

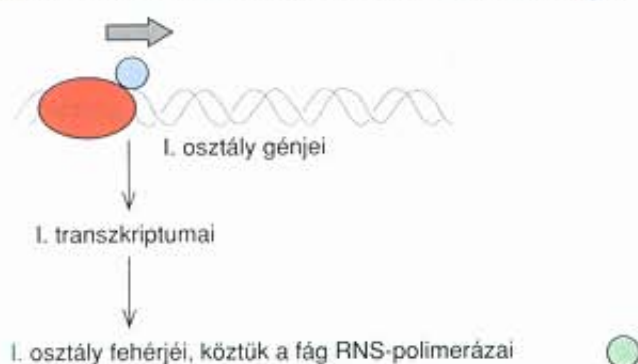
A σ -faktor cserélődésével járó modell érvényességét genetikai és biokémiai bizonyítékok is alátámasztják. Genetikai vizsgálatokban kimutatták, hogy a 28-as gén mutációi megakadályozzák a korairól a középső szakaszra történő váltást. Hasonló módon, a 33-as, illetve a 34-es gén mutációi meggyengítik a középsőről a késői szakaszra való átkapcsolást. A biokémiai kísérleteket olyan tisztított RNS-polimerázokkal végezték, amelyek a kérdéses σ -faktorok egyikét vagy másikat tartalmazták. A gazdasejt σ -faktorát hordozó polimeráz a fág-DNS-ről *in vitro* csak a korai géneket írja át. Amikor a polimerázhoz gp28 kötődik, előtérbe kerül a középső szakasz génjeinek átírása, míg a gp33, a gp34-gyel közösen a késői génekre specifikus.

Fertőzött *B. subtilis*-sejtekben az SPO1 fág génjeinek átírása időzített program alapján történik, melynek során először a korai, azt követően a középső, végül a késői gének íródnak át. A szakaszváltásokat a fág által kódolt σ -faktorok irányítják, amelyek a gazdasejt polimerázának core-enzimjéhez kapcsolódnak, és ezzel megváltoztatják a polimeráz specificitását. A gazda σ -faktora a fág korai génjeire, a fág gp28-a a középső szakasz génjeire, végül a fág gp33-a és gp34-e a fág késői génjeire specifikus.

A T7 FÁG ÁLTAL KÓDOLT RNS-POLIMERÁZ

A T7 fág az *E. coli* viszonylag egyszerű fágjainak egyik osztályába tartozik, amelybe a T3 és a ϕ II is. Genomjuk jóval kisebb, mint az SPO1-é, ezért génjeik száma is kevesebb. Ezekben a fágokban három transzkripció fázis különíthető el, az I., a II. és a III. osztály. (Alkalmazhatjuk az SPO1-nél már látott korai, középső és késői szakasz megjelölést is.) Az I. osztály öt génje kö-

(a) Korai transzkripció; specificitási faktor: gazda σ -faktor (●)



(b) Késői transzkripció; fág RNS-polimeráza (●)



8.21. ábra. A transzkripció időbeli szabályozása T7 faggal fertőzött *E. coli*-ban. (a) A korai (I. osztályú) gének transzkripciója a gazda RNS-polimeráz holoenzimétől függ, így σ -faktorától is (kék). Az egyik korai fágfehérje a T7 RNS-polimeráza (zöld). (b) A késői (II. és III. osztályú) gének átírása a T7 polimerázzal folyik

zül az egyik (1. gén) szükséges a II. és III. osztály génjeinek expressziójához. Ha mutáció történik benne, csak az I. osztály génjei íródnak át. Az SPO1 ciklusának ismeretében valószínűleg mindenki azt várja, hogy az 1. gén egy σ -faktort kódol, az irányítja a gazda RNS-polimerázát a későbbi génekhez. A T7 transzkripciójával foglalkozó első kutatók valóban erre a következtetésre jutottak, de tévedtek.

Az 1. gén terméke nem egy σ -faktor, hanem egy teljes mértékben fág-specifikus RNS-polimeráz, egyetlen polipeptiddel. Ez olvassa le a II. és III. osztály génjeit, figyelmen kívül hagyva az I. osztály génjeit. A polimeráz specificitása valóban szokatlan mértékű, mivel csak a T7 II. és III. osztályú génjeit írja át, más természetes templátot nem. A kapcsoló mechanizmus ebben a fágban meglehetősen egyszerű (8.21. ábra). Amikor a fág-DNS bejut a baktériumsejtbe, az *E. coli* holoenzime átírja az I. osztály öt génjét, köztük az 1. gént is. Ez utóbbi terméke a fág-specifikus RNS-polimeráz, amely ezután átírja a II. és III. osztály génjeit.

A T7 fág helyett, hogy új σ -faktort kódolna, amely módosítja a gazdasejt polimerázának specificitását, egy új RNS-polimerázot kódol, amely teljes mértékben specifikus a fág később átíródnak géneire. A polimerázot egyetlen polipeptid építi fel, amely a fág korai génjei közül az egyik legelső, az 1. gén terméke. A fágfertőzés időbeli lefolyása egyszerű: a gazda polimeráza átírja a korai (I. osztály) géneket. Egyikük terméke a fág-specifikus polimeráz, amely ezután átírja a II. és III. osztály génjeit.

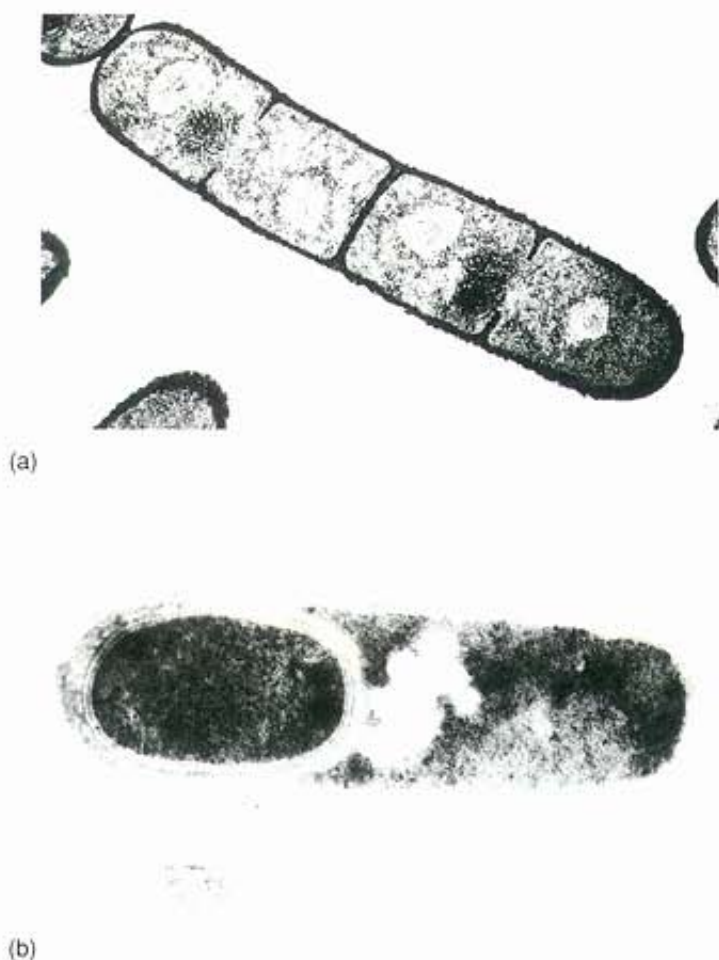
A TRANZKRIPCIÓ KONTROLLJA A SPOROGENEZIS SORÁN

Az előzőekben megismertük, hogyan változtatja meg a gazdasejt RNS-polimerázának specificitását az SPO1 fág azzal, hogy lecseréli σ -faktorát. Ebben a részben bemutatjuk, hogy ugyanilyen mechanizmus módosítja a gazdasejt génműködését is a sporogenezis során. Az *E. coli*, a mindaddig legjobban ismert baktérium, egész életét **vegetatív**, másként növekedési stádiumban éli le. Ha egy *E. coli*-tenyészetet éheztetünk, a sejtek növekedése leáll, és néhány hétig vagy hónapig stacionárius fázisban maradnak. Ezután a sejtek pusztulni kezdenek, ami azt jelenti, hogy a megváltozott körülmények ellen csak kevésbé képesek védekezni. Ugyanakkor vannak olyan baktériumok, amelyek a feltételek rosszabbodására **spóráképzéssel** válaszolnak. A *Bacillus subtilis* például **endospórákat** hoz létre, és ezek a kemény, nyugalmi állapotban lévő képződmények biztosítják a túlélést a kedvező körülmények visszatéréséig (8.22. ábra).

A spóráképzés alatt a génműködésnek módosulnia kell, hiszen a vegetatív és a spórasejtek nagyon különböző alakúak, ami eltérő géntermékekre utal. A spóráképző *B. subtilis*-sejtekben egy sor specifikus gén aktiválódik. A vegetatív és a spórás fázis közötti átkapcsolást egy komplex, a σ -faktorok cserélődésén alapuló rendszer irányítja, amely bizonyos vegetatív gének transzkripcióját leállítja, és bekapcsolja a sporogenezis specifikus gének átírását.

A sporogenezis alapvető változás, amely számos gént érint, nagyszámú gén kikapcsolásával és több új gén bekapcsolásával jár. De a transzkripció változás nem teljes mértékű, vannak olyan, a vegetatív stádiumban aktív gének, amelyek a sporogenezis során is azok maradnak. Hogyan képes a transzkripció átkapcsoló mechanizmus megbirkózni ezzel az összetett feladattal?

Amint az várható, a sporogenezisbe egynél több új σ -faktor szerepel. Valójában legalább három, a σ^{29} , σ^{30} , σ^{32} (újabbán σ^F , σ^{31} és σ^C), valamint a vegetatív σ^{24} (újabbán σ^A). A fehérjék neve molekulatömegükre utal, a σ^{24} molekulatömege például 43 000. Mindegyikük másféle promotor osztályt ismer fel. A vegetatív σ^{24} például azokat, amelyek szerkezete nagyon közel áll az *E. coli* σ -faktora által felismerthez, amelyekben a -10 box (Pribnow) konszenzus szekvenciája TATAAT, a -35 boxé pedig a TTGACA. Ezzel szemben a sporogenezisspecifikus σ^{32} és σ^{30} egészen más szekvenciákat ismer fel.



8.22. ábra. (a) *Bacillus subtilis* vegetatív sejtjei és (b) spóráképzősejt a fejlődő endospórával

Kenneth Bott felvétele

Amikor 1969-ben *E. coli*-ban az eredeti σ -faktort felfedezték, Burgess és Travers arra számítottak, hogy a későbbiekben sok különböző σ -faktort találnak, amelyek különböző génsztyálok átírását irányíthatják. Ezt az elvet először *B. subtilis*-ben igazolták – ahogyan azt az előzőekben láttuk –, de később igazolták *E. coli*-ban is. Az *E. coli* σ^{32} -je egy speciális géncsoport, az ún. *hőshokk gének* átírását irányítja, amelyek akkor kezdenek működni, amikor a baktériumot magas hőmérsékletnek vagy más káros környezeti hatásnak teszik ki. Nitrogénéheztesítés alatt egy másik σ -faktor, a σ^{54} irányítja a nitrogén-anyagcserében szereplő gének transzkripcióját.

A *Bacillus subtilis* spóra képzésekor egy sor specifikus gén aktiválódik, és számos, de nem minden vegetatív gén áll le. Ez az átkapcsolás nagyrészt a transzkripció szintjén történik. A háttérben több új σ -faktor áll, amelyek helyet cserélnek a vegetatív σ -faktornal az RNS-polimeráz core-enzimén, és a sporogenezis gének átírását vezérlik a vegetatív géneké helyett. Mindegyik σ -faktor más promoter-szekvenciát részesít előnyben.

AZ *E. COLI* FERTŐZÉSE LAMBDA-FÁGGAL

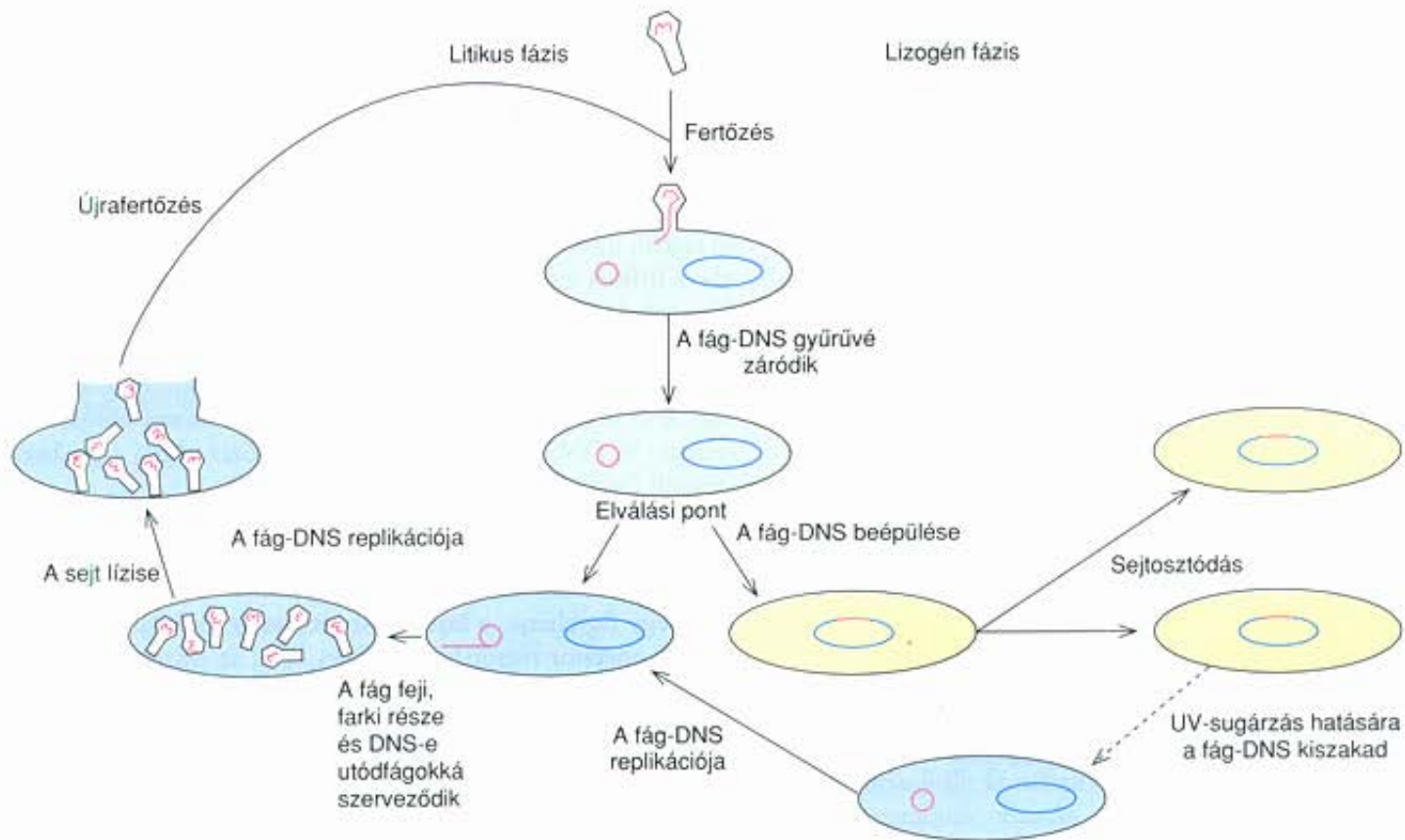
Az eddig ismertetett fágok közül sok, például a T2, T4, T7 és SPO1, **virulens** fágok, amikor replikálódnak, elpusztítják, **lizálják** a gazdasejtet. A **lambda**- (λ) fág azonban a **temperált** fágok közé tartozik, azaz nem feltétlenül pusztítja el a fertőzött *E. coli*-sejtet. Ebben a vonatkozásban a lambda sokoldalúbb a többi fágnál, mivel kétféle replikációs utat követhet (8.23. ábra). Az első a **litikus** mód, amikor a fertőzés a virulens fágokéhoz hasonlóan halad előre. A folyamat azzal kezdődik, hogy a fág-DNS bejut a gazdasejtbe, majd a gazda RNS-polimerázának segítségével átíródik. A képződő mRNS-ek fágfehérjékre fordítódnak le, a fág-DNS is replikálódik, majd az utódfágok összeszerelődnek a fehérje- és DNS-komponensekből. A fertőzés végén a gazdasejt szétesik (lizál), és az utódfágok kiszabadulnak.

A **lizogén** mechanizmus gyökeresen eltér az előzőtől. A fág-DNS bejut a sejtbe, korai génjei átíródnak, translációjuk is megtörténik, hasonlóan a litikus fertőzéshez. De ezután megjelenik egy fágfehérje, a **lambda-represszor**, és hozzákötődik a fág két operátor régiójához, leállítva ezzel az összes gén transzkripcióját, egyetlenegy kivétellel. Ez az egy gén a **cI**, ami nem más, mint a λ -represszor génje. Könnyen belátható, hogy ez esetben nem képződnek utódfágok. A lizogénia kialakulásával a fág-DNS integrálódik a gazdasejt genomjába. A beépült fág DNS-t tartalmazó baktérium, az ún. **lizogén** baktérium, az integrálódott fág-DNS pedig a **profág**. A lizogén állapot meghatározatlan ideig fennmaradhat, és nem tekinthető hátrányosnak a fāgra nézve, mivel az integrálódott fág-DNS a gazdasejt DNS-ével együtt replikálódik. Ezzel a fág genomja anélkül szaporodik, hogy új fāgrészecskék alakulnának ki. Bizonyos körülmények, mint például mutagének vagy besugárzás hatására a lizogénia megszűnhet, a fág litikus fázisba léphet.

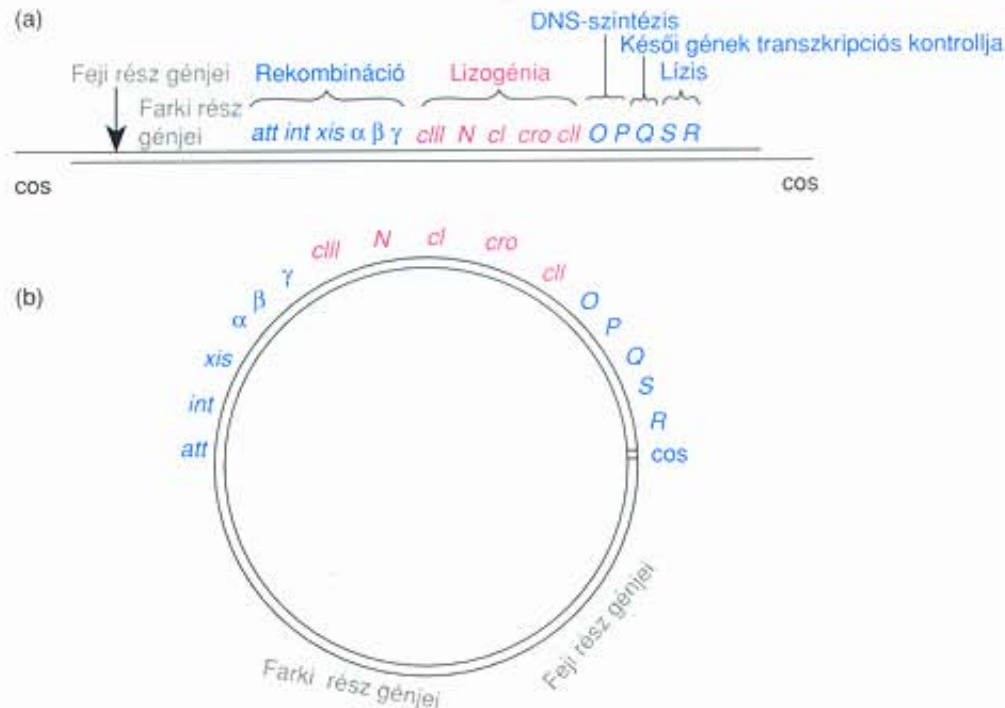
A lambda-fág kétféle módon replikálódhat: litikus, illetve lizogén úton. A litikus fertőzés esetén a fág csaknem mindegyik génje átíródik, és translációra kerül, a fág-DNS pedig replikálódik. Mindez utódfágok képződéséhez, végül a gazdasejt liziséhez vezet. A lizogén úton a lambda DNS-e beépül a gazdasejt genomjába, de csak egy génje működik, melynek terméke a lambda-represszor, ami leállítja a fág többi génjének transzkripcióját. A sejt genomjába beépült fág-DNS a profág, és mivel része a gazda DNS-ének, azzal együtt replikálódik.

A lambda-fág litikus reprodukciója

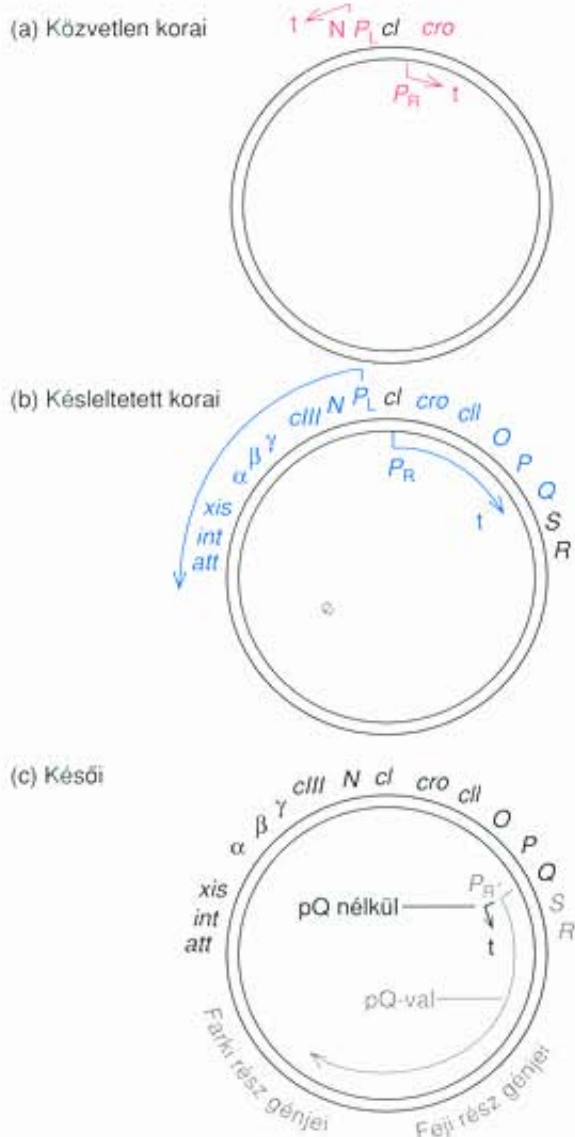
A lambda fág litikus reprodukciós ciklusa hasonlít a virulens fágokéra, amelyről már tudjuk, hogy három transzkripciósi fázisból áll, a **közvetlen korai**, a **késleltetett korai** (középső) és a **késői** fázisokból. Ezek génjei egymás után sorakoznak a fág-DNS-en, ami segítséget jelent szabályozásuk megértésében is. A 8.24. ábra két formában mutatja be a lambda-fág genetikai térképét: lineárisan, ahogyan az a fāgrészecskékben található, és cir-



8.23. ábra. A lambda-fág litikus, illetve lizogén fertőzése. A kék sejtek litikus fázisban vannak, a sárga sejtek pedig lizogén fázisban. A zölddel jelölt sejtek el nem kötelezettek



8.24. ábra. A lambda-fág genetikai térképe. (a) A térkép a lineáris formát ábrázolja, úgy ahogyan a DNS a fág részecskékben található. A ragadós (*cos*) végek a térkép végein találhatóak, és a gének elsősorban funkció szerint rendeződnek. (b) A cirkuláris forma térképe, ahogyan a DNS a litikus fertőzés során található a gazdasejtben, a *cos* végek záródása után



8.25. ábra. A transzkripció időbeli szabályozása a lambda fág litikus fertőzése során. (a) A közvetlen korai gének transzkripciója (piros) a jobb (P_R), illetve a bal oldali (P_L) promoterekről indul, amelyek a represszor gént (cI) határolják. Az átírás leáll a ρ -faktortól függő terminátoroknál (t) az N és a cro gének után. (b) A késleltetett korai gének transzkripciója (kék) ugyanazoknál a promotereknél kezdődik, de áthalad a terminátorokon az N gén termékének, a pN antiterminátor hatására. (c) A késői gének transzkripciója (szürke) egy új promoternél (P_R) kezdődik, de nagyon hamar leállna a terminátornál (t) a Q gén terméke, a pQ nélkül, amely szintén egy antiterminátor. Az O és a P fehérjét kódoló késleltetett korai gének, nem pedig az operátor, illetve a promotor jelei

kuláris formában, ami röviddel a fertőzés kezdete után jellemző. A gyűrűvé záródást a lineáris molekula mindkét végén megtalálható 12 bázis hosszúságú, egyszálú szakasz, más néven „ragadós” vagy kohezív vég, röviden **cos** teszi lehetővé. Meg kell jegyezni, hogy a gyűrűvé záródás után az összes késői gén egymás mellé kerül, amelyek a lineáris elrendezésben elkülönülten, a molekula két végén találhatók.

A génműködés programjának szabályozása ebben a fágban is a transzkripció átkapcsolásával történik, de a λ -fágban egy olyan mechanizmus működik, amellyel eddig nem találkoztunk, és ez

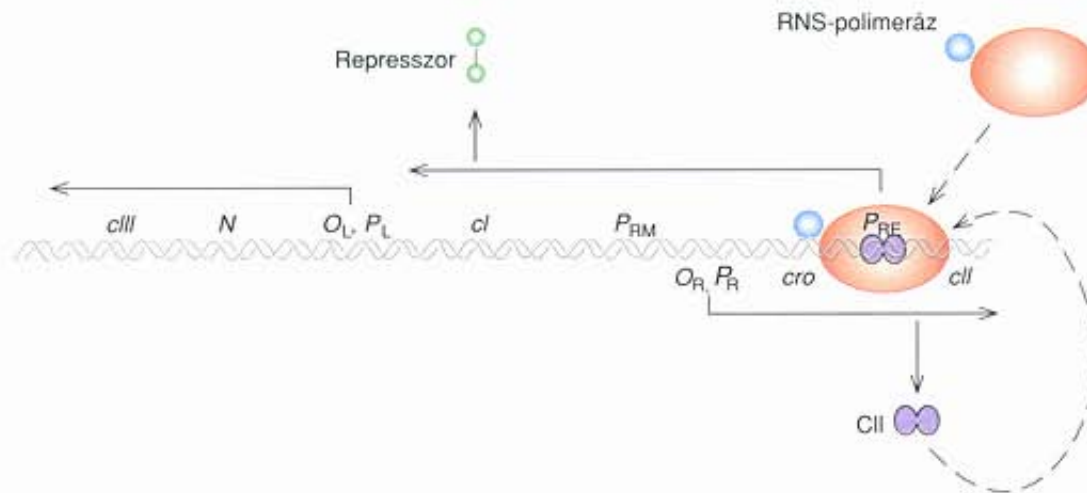
az **antitermináció**. A folyamatot a 8.25. ábra vázolja. A fág közvetlen korai géneinek átírását természetesen a gazdasejt RNS-polimeráz holoenzime végzi. A korai gének közül csak kettő, a cro és az N található közvetlenül lefelé (downstream) a jobbra levő P_R , illetve a balra irányuló P_L promoterektől. A litikus ciklusnak ebben a stádiumában nem kötődik represszor az operátorokhoz (O_R és O_L), amelyek a fenti promotereket irányítják, ezért a transzkripciónak nincs akadálya. Amint a polimeráz eléri a közvetlen korai gének végét, találkozik egy ρ -dependens terminátorral, és a középső szakasz géneitől kis távolságra leáll.

A közvetlen korai gének mindkét terméke kulcsfontosságú a lambda programjának további működéséhez. A cro gén terméke egy **antirepresszor**, amely leállítja a represszor cI génjének a transzkripcióját, ezzel meggátolja a represszorfehérje képződését. Ez természetesen elengedhetetlen a fág többi génjének expressziójához. Az N gén terméke, a pN egy **antiterminátor**, amely lehetővé teszi, hogy az RNS-polimeráz figyelmen kívül hagyja a közvetlen korai gének végén lévő terminátorokat, és folytassa az átírást a középső szakasz génein. Az átkapcsolás nem igényel új σ -faktort vagy másik RNS-polimerázt, ami felismerné az új promotereket, és elkezdene az új transzkripciót, mint ahogyan azt más fágoknál láttuk. Ehelyett kiterjeszti a transzkripciót ugyanazon promoterek ellenőrzése alatt.

A középső szakasz génei nemcsak a litikus ciklus folytatásában fontosak, hanem a lizogénia kialakításában is. Az O és a P gének a fág-DNS replikációjához szükséges fehérjéket kódolnak, ami kulcsfontosságú eleme a litikus ciklusnak. A Q gén terméke, a pQ egy másik antiterminátor, ami lehetővé teszi a késői gének átírását.

A késői gének mind jobbra íródnak át, de nem a P_R promotertől. A késői gének promotere, a P_R , a Q gén után (downstream) következik. Az ebből a promoterből kiinduló transzkripció csak 194 bázis után áll le, ha csak a pQ meg nem gátolja a terminációt. Az N gén terméke csak a cro és az N gének utáni antiterminációra specifikus. A késői gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyekből a fág feje és farokrésze épül fel, valamint olyanokat, amelyek lizálják a gazdasejtet az utódfágok kiszabadulásához.

A lambda-fág litikus ciklusában a közvetlen korai, a késleltetett korai és a késői fázisok közötti transzkripció átkapcsolást antiterminátorok szabályozzák. A két közvetlen korai gén egyike, a cro egy antirepresszort kódol, ami biztosítja a litikus ciklus folytatását. A másik, az N gén a pN antiterminátort kódolja, amely áthalad az N és a cro gének utáni terminációs jeleken, és ezzel folytatódhat a késleltetett korai gének transzkripciója. Ez utóbbiak egyike, a Q gén egy másik antiterminátort, a pQ -t kódolja, ami lehetővé teszi a késői gének idő előtti leállítás nélkül történő átírását saját promotereükből (P_R) kiindulva.



8.26. ábra. A lizogénia kialakulása. A késleltetett korai gének P_R promotertől kiinduló transzkripciójának terméke a *cII* mRNS, amelyről a CII fehérje (lila) készül. A CII teszi lehetővé, hogy az RNS-polimeráz (kék és piros) kapcsolódjon a P_{RE} promoterhez, és átírja a *cI* gént, amely a represszort (zöld) kódolja

A lizogénia kialakítása

Már említettük, hogy a késleltetett korai géneknek nem csak a litikus ciklusban, hanem a lizogéniában is szerepük van. A lizogénia kialakulását két úton segítik: (1) A késleltetett korai gének termékei közül néhány a fág-DNS integrálódásához szükséges a gazdasejt genomjába, ami pedig a lizogénia előfeltétele. (2) A *cII* és *cIII* gén terméke teszi lehetővé a *cI* gén átírását, és ezzel a lizogénia központi fontosságú komponensének, a lambda-represszornak a termelését.

A *cI* génnek két promotere van, a P_{RM} és a P_{RE} (8.26. ábra). A P_{RM} működik a lizogénia során, folyamatosan biztosítva a represszor ellátást a lizogén állapot fenntartásához. Különleges tulajdonsága, hogy aktivitásához saját termékét, a represszort igényli. Ebből azonnal levonhatunk egy fontos következtetést: a P_{RM} nem játszhat szerepet a lizogénia kialakításában, hiszen a fertőzés kezdetén nincs jelen a represszor, amely aktiválná. Ezt a feladatot egy másik promotor, a P_{RE} látja el. A P_{RE} mind a P_R -től, mind a *cro*-tól jobbra helyezkedik el. A transzkripciót balra a *cro*-n, majd a *cI*-n át irányítja. Ezzel lehetővé teszi a *cI* expresszióját, mielőtt még a represszor jelen lenne.

Természetesen a *cro* transzkripciójának szabályos iránya a P_R -től jobbra halad, így a P_{RE} -ből kiinduló, balra történő transzkripció RNS-terméke a *cro* értelmetlen szálának átírata, míg a *cI* átírata az értelmes szálról készül. Az RNS *cI*-ről átíródott része ezért translációra kerül, kialakul a represszor. Az RNS *cro*-ról készült transzkriptuma nem kerül translációra, hanem valószínűleg hibridizálódik az értelmes szálról készült RNS-sel, és megakadályozza annak translációját.

A P_{RE} -nek van néhány érdekes jellegzetessége. -10 és -35 boxa nem mutat egyértelmű hasonlóságot azokkal a szokásos konszenzus szekvenciákkal, amelyeket az *E. coli* RNS-polimeráza felismer. *In vitro* nem is írja át egyedül ez a polimeráz, amelyet a *cII* gén terméke, a CII segít abban, hogy kötődjön a szokatlan promotor szekvenciához. A *cIII* génről készülő CIII szintén szerepel a folyamatban, de hatása kevésbé közvetlen.

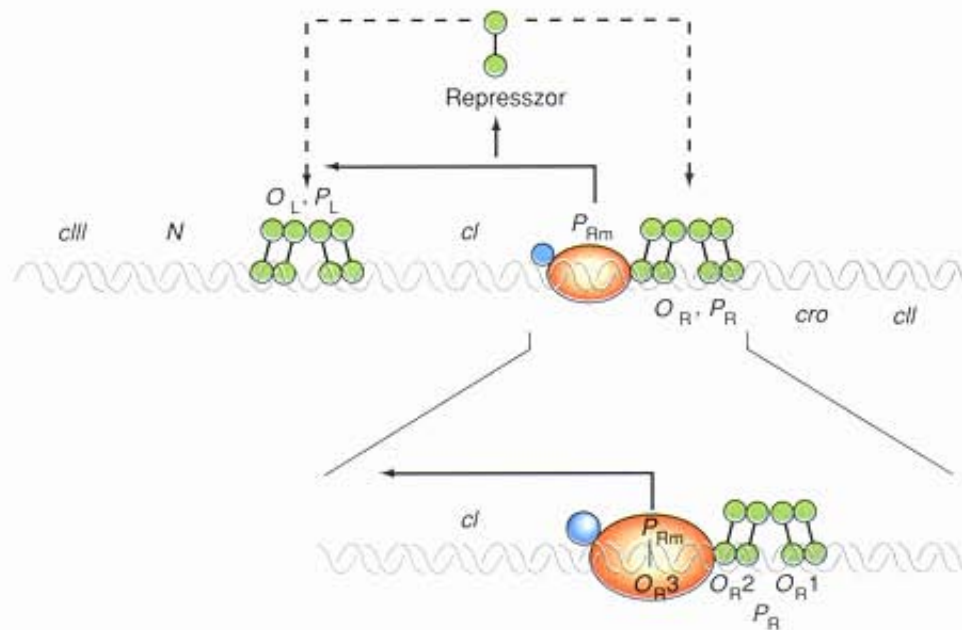
Megóvja a CII fehérjét a celluláris proteázoktól. Vagyis a késleltetett korai gének termékei, a CII és a CIII teszik lehetővé a lizogénia kialakulását a P_{RE} aktiválásával.

A lambda-fág lizogéniája elegendő mennyiségű represszor képződésével alakul ki. A represszor kötődik a korai gének operátorához, és megakadályozza a további korai RNS-ek szintézisét. A lizogénia kialakulásában a P_{RE} promoternek van szerepe, amely a P_R -től és a *cro*-tól jobbra helyezkedik el. A P_{RE} -től kiinduló transzkripció balra, a *cI* génen át történik. A késleltetett korai gének, a *cII* és a *cIII* termékei is részt vesznek a folyamatban: a CII közvetlenül elősegíti a polimeráz kötődését a P_{RE} -hez, míg a CIII lassítja a CII lebontását.

A *cI* gén autoregulációja a lizogénia során

Amikor a λ represszor megjelenik, kötődik a O_R és O_L operátoraihoz. A kötődésnek kettős hatása van, és mindkettő a lizogénia kialakulása felé tart. Először is, a represszor leállítja a további korai transzkripciót, tehát megszakítja a litikus ciklust. A *cro* gén inaktíválása különösen fontos a lizogéniához, mert terméke, a Cro fehérje a represszor ellenében működik. A represszor második hatása, hogy segíti saját szintézisét a P_{RM} aktiválásával.

A 8.27. ábra szemlélteti az önaktiválás folyamatát, amelyben kulcsfontosságú az a tény, hogy mind az O_R , mind az O_L három részre tagolódik, és ezek mindegyike képes megkötni a represszort. Az O_R régió sokkal érdekesebb, mert a *cI* balra haladó transzkripcióját kontrollálja, ugyanakkor a *cro* jobbra haladó transzkripcióját is. Az O_R régió három kötőhelye az O_{R1} , az O_{R2} és az O_{R3} . Affinitásuk a represszorhoz meglehetősen eltérő, legerősebben az O_{R1} , legkisebb mértékben az O_{R3} kötődik a represszorhoz. Ráadásul a represszor kötődése az O_{R1} -hez és



8.27. ábra. A lizogénia fenntartása (lent). A represszor (zöld), amely eredetileg a P_{RE} promotertől kiindulva szintetizálódik, dimereket képez, és kooperatívan kötődik az O_R1 -hez, valamint az O_R2 -höz. Az O_R2 -n a represszor és az RNS-polimeráz (piros és kék) közötti fehérje-fehérje kontaktus biztosítja, hogy az RNS-polimeráz kötődhessen a P_{RM} -hez, és onnan kezdve átírja a cI gént (fent). A P_{RM} -től induló transzkripció és a cI mRNS translációja folyamatos represszor szintet biztosít. A represszor kötődik az O_R -hez és az O_L -hez, és ezzel a cI kivételével megakadályozza mindegyik más gén átírását

az O_R2 -höz kooperatív, ami azt jelenti, hogy a represszor kapcsolódása a legerősebb kötőhelyhez, az O_R1 -hez, elősegíti egy következő represszor kötődését az O_R2 -re. Az O_R3 -hoz való kötődés nem kooperatív.

A represszor két azonos alegység dimerje, a 8.27. ábrán az alegységeket súlyzó alakú képletek jelölik. A forma arra utal, hogy mindegyik alegység két doménből épül fel, melyek a molekula végén helyezkednek el. A két domén szerepe eltérő: az egyik a molekula DNS-kötőhelye, a másik a represszor-represszor kölcsönhatás helye, amely a dimerizációt és a kooperatív kötődést teszi lehetővé. Amikor a represszorok már kötődnek az O_R1 -hez és az O_R2 -höz is, akkor az O_R2 -höz kapcsolódó represszor nagyon közel esik az RNS-polimeráz kötőhelyéhez a P_{RM} -nél. A valóságban annyira közel, hogy a két fehérje érintkezik is egymással. Mint az várható, ez a fehérje-fehérje kontaktus szükséges ennél a promoternél az RNS-polimeráz számára a transzkripció hatékony iniciációjához.

Amikor a represszorok bekötődnek az O_R1 -hez és az O_R2 -höz, a P_{RE} -ről nem folyhat transzkripció, hiszen a represszorok blokkolják a cII és $cIII$ átírását, és ezeknek a géneknek a termékei – amelyek szükségesek a P_{RE} -ről induló transzkripcióhoz –, nagyon gyorsan lebomlanak. Mindez rendszerint nem probléma, mivel a lizogénia már kialakult, és csak egy kis mennyiségű represszor kell a fenntartásához. Ez biztosított mindaddig, amíg az O_R3 nyitott, mert az RNS-polimeráz a P_{RM} -ről szabadon átírhatja a cI gént.

Belátható, hogy a represszor koncentrációja olyan nagy is lehet, hogy még leggyengébb kötőhelyéhez, az O_R3 -hoz is kapcsolódhat. Ebben az esetben a cI transzkripciója teljesen leáll, mert még a P_{RM} is blokkolódik. Ezért a represszor mennyisége lecsökken, és először az O_R3 -ról disszociál, ami ismét lehetővé

teszi a cI transzkripcióját. Ezzel a mechanizmussal a represszor nem engedi túl magasra emelkedni saját koncentrációját.

A lizogénia fenntartását a P_{RM} promoter vezérli.

Akkor jut szerephez, miután a P_{RE} -ről kiinduló transzkripció lehetővé teszi a lizogéniát kialakító represszor szintézisének fokozódását. A represszor kooperatív módon kapcsolódik az O_R1 -hez és az O_R2 -höz, de az O_R3 -at szabadon hagyja. Az RNS-polimeráz kapcsolódik a P_{RM} -hez, ami átfedi az O_R3 -at, oly módon, hogy érinti az O_R2 -höz kötődő represszort. Ez a protein-protein kölcsönhatás szükséges a promoter működéséhez.

A lambda-fággal történő fertőzés következménye: lízis vagy lizogénia

Mi határozza meg, hogy egy lambda-val fertőzött sejt litikus vagy lizogén útra lépjen? Érzékeny egyensúly van a két lehetőség között, és a tényleges kimenetelt rendszerint nem lehet megjósolni egy adott sejten. Ennek az állításnak az alapját a lambda-val fertőzött *E. coli*-sejtek csoportjának vizsgálata adja. Amikor néhány fágreszcikét egy Petri-csészében levő baktériumtenyésztetre szélesztnek, azok megfertőzik a sejteket. Litikus fertőzésnél az utód-fágok elárasztják a szomszédos sejteket, és megfertőzik azokat. Néhány óra múlva kicsi, kör alakú tarfoltok, **plakkok** jelennek meg a baktériumtenyésztetben, azokon a helyeken, ahol a litikusan fertőzött sejtek szétestek. Ha a fertőzés 100%-ban litikus volt, a plakk átlátszó, mivel az összes gazdasejt elpusztul. A λ plakkjai azonban rendszerint nem átlátszóak, hanem zavarosak, jelezve az élő, lizo-

gén sejtek jelenlétét. Ez azt jelenti, hogy néhány sejt még a plakk területén is lizogén fertőzést szenved, zömük viszont litikus lesz.

Tegyük egy kis kitérőt a következő kérdéssel: Miért nem fertőződnek meg a lizogén baktériumok litikusan a plakkban lévő rengeteg fág valamelyikétől? Ha egy újabb fág-DNS behatol egy lizogén sejtbe, ott temérdek represszort talál, amelyek hozzákötődnek a DNS-molekulához, és megakadályozzák annak működését. Ezért azt mondhatjuk, hogy a lizogén sejt **immunis** az olyan fágokkal történő **felülfertőzéssel** szemben, amelyek a profág kontroll régiójával azonos szabályozó rendszerrel, ún. **immunitás-régióval** rendelkeznek.

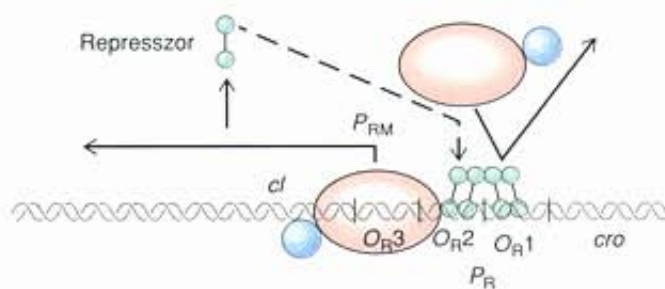
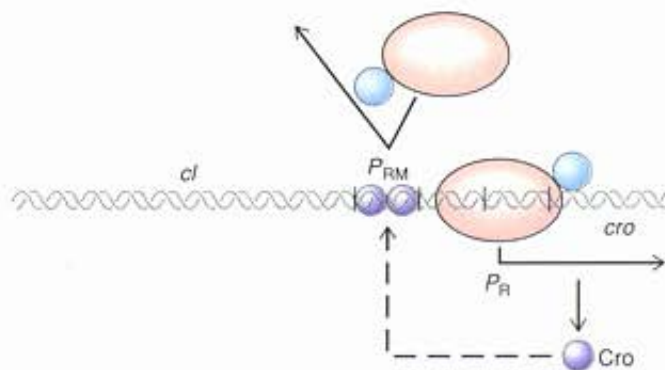
De térjünk vissza az alapproblémához. Láttuk, hogy egy plakkban lehetnek litikusan fertőzött és lizogén sejtek. A plakk sejtjei és a fágok is genetikailag azonosak, így a probléma nem genetikai jellegű, inkább két gén, a *cl* és a *cro* termékei közötti versengésre vezethető vissza. A versengés mindegyik fertőzött sejtben végbemegy, és a győztesen kikérülő gén terméke szabja meg a fertőzés kimenetelét az adott sejtben. Ha a *cl* a nyertes, lizogénia az eredmény, ha a *cro*, akkor litikus lesz a fertőzés. Figyelembe véve az eddigieket, a magyarázat a következő: Ha a *cl* gén elegendő represszort termel, akkor a fehérje kötődik az O_R -hez és az O_L -hez, ezzel megakadályozza a korai gének további átírását, ami egyben az utódfágokat kialakító és a lizist irányító késői gének működésének hiányát is jelenti. Másrészt, ha elegendő Cro fehérje szintetizálódik, akkor az kikapcsolja a *cl* transzkripcióját, ezért gátolja a lizogéniát (8.28. ábra).

A Cro-nak a *cl* transzkripcióját gátló képességében a lambda-operátorokhoz való affinitás játssza a kulcsszerepet. A Cro – a represszorhoz hasonlóan – az O_R -hez és az O_L -hez egyaránt kötődik, de bekötődési sorrendje a három részre tagolható operátorokon éppen fordítottja a represszorénak. Nem 1, 2, 3 sorrendben kapcsolódik, mint a represszor, hanem elsőként az O_R3 -hoz kötődik. Amikor ez megtörténik, megszűnik a *cl* transzkripciója a P_{RM} -ről, hiszen a P_{RM} átfedésben van az O_R3 -mal. Más szóval a Cro represszorként működik. Ezenfelül, amint lefedi a jobbra és balra irányuló operátorokat, meggátolja az összes korai gén transzkripcióját a P_R -ről és a P_L -ről, beleértve a *dII*-t és a *dIII*-at is. Ezeknek a géneknek a termékei nélkül a P_{RE} nem működőképes, tehát az egész represszor szintézis kikapcsolódik, ami lehetővé teszi a litikus fertőzést.

Az, hogy a Cro kikapcsolja a korai gének transzkripcióját, a litikus növekedéshez is szükséges. A késleltetett korai fehérjék termelésének folytatása valamilyen módon megszakítja a litikus ciklust.

De végül is mi szabja meg, hogy a *cl* vagy a *cro* nyeri-e a versenyt? Biztosan nem a véletlen. A legfontosabb faktornak a *dII* gén termékének, a CII fehérjének a koncentrációja tűnik. Minél magasabb a CII koncentrációja a sejtben, annál nagyobb a lizogénia valószínűsége. Ez összhangban van azzal, amit eddig megtudtunk a CII-ről – aktiválja a P_{RE} -t, ezért segíti a lizogénia elindítását. Azt is láttuk, hogy a P_{RE} aktiválása a CII által a litikus program ellen dolgozik, hiszen antikódoló *cro* RNS-t termel, ami meggátolhatja a kódoló *cro* RNS translációját.

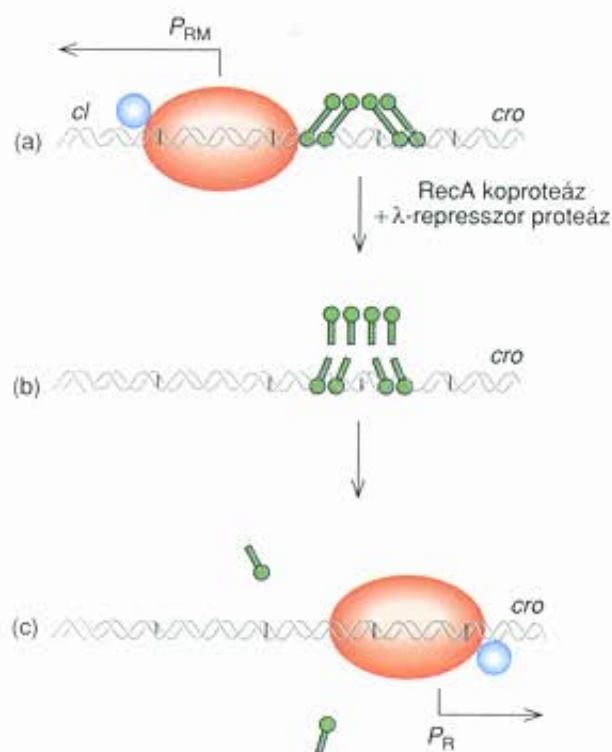
De mi szabályozza a CII koncentrációját? Már ismertettük, hogy a CIII megvédi a CII-t a sejt proteázaival szemben, de a magas proteázkoncentráció legyőzheti a CIII-at, lebonthatja a CII-t, ezzel kialakíthatja a litikus fertőzést. Ilyen magas proteázkoncentráció jó környezeti feltételek, például bőséges tápanyag-

(a) *cl* főlénye, lizogénia(b) *cro* főlénye, litikus ciklus

8.28. ábra. A *cl* és a *cro* gén vetélkedése. (a) A *cl* főlénye. A P_{RM} -től induló transzkripció során elegendő represszor (zöld) termelődik ahhoz, hogy megakadályozza a polimeráz bekötődését a P_R -hez, és ezzel meggátolja a *cro* transzkripcióját. Az eredmény lizogénia. (b) A *cro* főlénye. A P_R -től kiinduló transzkripció megfelelő mennyiségű Cro fehérjét (lila) termel, ami megakadályozza a polimeráz bekötődését a P_{RM} promoterhez, és ezzel akadályozza a *cl* átírását. Az eredmény litikus ciklus

ellátás mellett valósulhat meg. Ezzel ellentétben éhezéskor a proteázok mennyisége lecsökken. Vagyis az éhezés a lizogéniának, a megfelelő tápanyagellátás pedig a litikus fertőzésnek kedvez. Mindez a fág fennmaradását szolgálja, hiszen a litikus út tekintélyes energiát igényel a fág-RNS és a fágfehérjék szintézise miatt, és ez éhezéskor nem áll rendelkezésre. A lizogénia viszont energiatakarékos, hiszen csak kevés represszor szintézisét feltételezi.

Az, hogy egy sejtet litikus vagy lizogén módon fertőzi-e meg a lambda-fág, a *cl* és a *cro* gének termékeinek vetélkedésétől függ. A *cl* gén egy olyan represszort kódol, amely blokkolja az O_R1 , az O_R2 , az O_L1 és az O_L2 operátorokat, leállítja a korai transzkripciót, beleértve a *cro* génét is. A folyamat lizogéniához vezet. Másrészt a *cro* gén a Cro fehérjét kódolja, ami az O_R3 -at és az O_L3 -at blokkolja, ezzel kikapcsolja a *cl* transzkripcióját. A hatás eredménye a litikus ciklus. Az a géntermék nyeri a versengést, és határozza meg a sejt sorsát, amelyik elsőként eléri azt a koncentrációt, ami már gátolja a vetélytárs szintézisét.

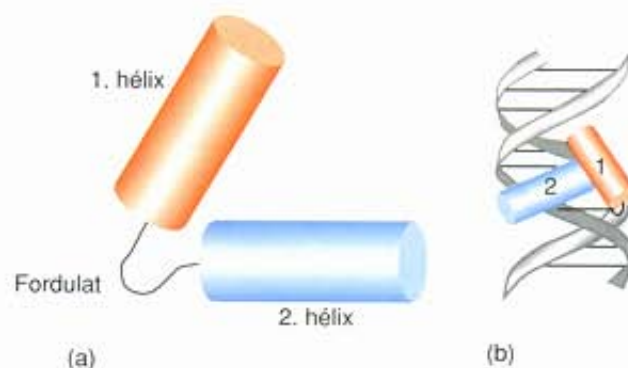


8.29. ábra. A lambda-profág indukciója. (a) Lizogénia. A represszor (zöld) kötődött az O_R -hez és az O_L -hez, a *cI* gén a P_{RM} promotertől kiindulva aktívan átíródik. (b) A RecA koproteáz (UV-sugárzásra vagy más mutagén hatásra aktiválódik) kiváltja a represszor saját proteázaktivitását, így az önmagát hasítja el. (c) A két részre hasadt represszor leválik az operátorról, így a polimeráz (piros és kék) kötődik a P_R promoterhez és átírhatja a *cro* gént. A lizogén állapot ezzel megszűnik.

Lizogén indukció

Már említettük, hogy a lizogének mutagén anyagokkal vagy besugárzással indukálhatók. Az indukció mechanizmusa a következő: Az *E. coli*-sejtek reagálnak a környezeti ártalmakra, mutagénekre, sugárzásokra egy sor olyan gén indukálásával, amelyek együttesen vesznek részt az ún. **SOS-reakcióban**. A gének közül az egyik legfontosabb a *recA* gén, amelynek terméke, a RecA részt vesz a DNS károsodásainak rekombinációs javításában, ami rávilágít a fehérje szerepére az SOS-válaszban. De a környezeti behatások egy új aktivitást is indukálnak a RecA fehérjében. A RecA koproteáz alakul, ami indukálja a lambda-represszor latens proteáz vagy fehérjebontó aktivitását. Ezért a represszor két részre hasítja önmagát, ezzel leválik az operátorokról (8.29. ábra). Amint ez megtörténik, a transzkripció megindul a P_R -ről és a P_L -ről. Az első átírt gének közé tartozik a *cro*, amelynek terméke leállítja a represszor génjének további transzkripcióját. Ezzel a lizogénia megszakad, és beindul a litikus program.

Biztosan nem alakult volna ki a lambda egy RecA-ra érzékeny represszorról, ha ez nem lenne kedvező a fāgra nézve. Az előny valószínűleg a következő: Az SOS-reakció jelzi, hogy a lizogén baktérium DNS-e valamilyen módon károsodott. Ilyen körülmények között a profāgnak előnyös, ha a litikus ciklus indukciójával kiválik a baktérium genomjából.



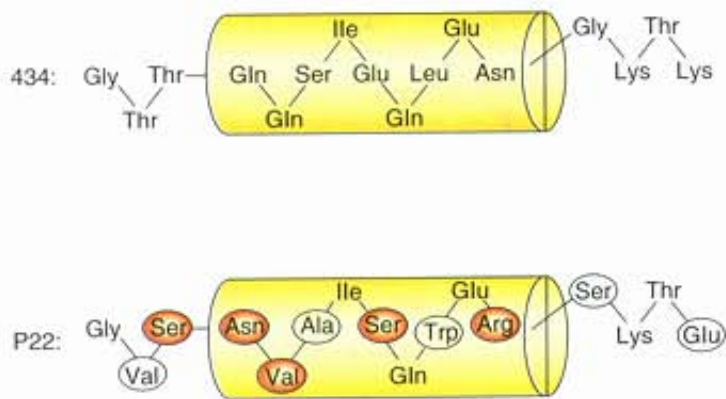
8.30. ábra. A hélix-fordulat-hélix szerkezet mint DNS-kötő elem. (a) A λ -represszor hélix-fordulat-hélix szerkezete. (b) Egy represszor monomer hélix-fordulat-hélix motívumának kapcsolódása a λ -operátorral. A 2. hélix (kék) a cél-DNS nagy árkában fekszik. A hélix hátsó felszínén (az ábrán nem látható) található aminosavak alakítják ki a kapcsolatot a DNS-sel.

A lizogén baktérium DNS-ének károsodása kiváltja az SOS-reakciót. Az első lépés a RecA fehérje koproteáz-aktivitásának kialakulása. Ennek következtében a lambda-represszor két részre hasad, leválik a lambda operátorairól, ezzel indukálja a litikus ciklust. Ily módon az utódfāgok megmenekülhetnek azoktól a potenciálisan letális károsodásoktól, amelyek a gazdasejtet érték.

SPECIFIKUS DNS-FEHÉRJE KÖLCSONHATÁSOK

Több példát láttunk már olyan fehérjékre, amelyek a DNS-molekula speciális régióhoz kötődnek. Közéjük tartoznak a *lac*, a *trp* és a lambda-represszorok, valamint a Cro, amelyek a megfelelő operátorokhoz kötődnek, és a CAP, amely a *lac* szabályozó régiójának CAP-kötőhelyéhez kapcsolódik. Az említett proteinek kötődése a megfelelő célszekvenciához nagyfokú specifitást mutat. A fehérjék nagy mennyiségű, hasonlóságot nem mutató DNS között is képesek megtalálni és hozzákötődni egy meghatározott, rövid szekvenciához.

Hogyan alakíthatnak ki a fehérjék ilyen speciális kapcsolatot? A felsorolt molekulák mindegyikében megtalálható egy közös szerkezeti elem: két α -hélix, amelyet egy rövid fordulat köt össze. Ez a **hélix-fordulat-hélix** motívum lehetővé teszi, hogy a második, az ún. **felismerő hélix** pontosan illeszkedjék a cél-DNS nagy árkába (8.30. ábra). A felismerő hélix aminosavain olyan csoportok vannak, amelyek kesztyűújszerűen illeszkednek a DNS megfelelő szekvenciájának nagy árkában lévő bázisokkal és a cukor-foszfát gerinc foszfátjaival. A kapcsolat rendszerint hidrogénkötésekkel valósul meg. Más hélix-fordulat-hélix szerkezettel rendelkező fehérjék nem kötődhetnek ugyanarra a helyre, mert felismerő hélixükben nem a megfelelő aminosavak vannak.



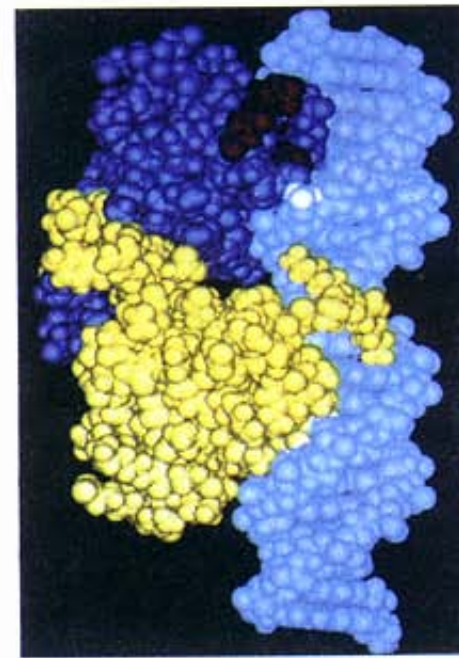
8.31. ábra. Két repressor felismerő hélixének kulcspozíciójú aminosavai. Az ábrán a 434 és a P22 represszorok felismerő hélixének aminosavsorrendje látható, mindkét oldalon néhány további aminosav feltüntetésével. Azokat az aminosavakat, amelyek a két fehérjében eltérést mutatnak, bekereteztük. Valószínűleg ezek felelősek a specificitásbeli különbségért. A felismerő hélix DNS felé eső részének aminosavai (piros) vehetnek részt a DNS-hez való kötődésben. Ezeknek, valamint a fordulat hélix előtti aminosavának (piros) változása módosíthatja a fehérje kötődési specificitását

HÉLIX-FORDULAT-HÉLIX MOTÍVUMOK A LAMBDAHOZ HASONLÓ FÁGOK REPRESSZORAIBAN

Mark Ptashne és munkatársai nagyszerű példákat találtak erre a kötődésre a lambda-hoz hasonló 434 és P22 fágok represszorai és operátorai között. A két fág molekuláris genetikája hasonló, de immunitási régióik eltérőek. Különböző represszorai és különböző operátoraik vannak. Mindkét repressor hasonlít a lambda-represszorhoz abban, hogy hélix-fordulat-hélix motívumot tartalmaznak. De mivel eltérő bázisszekvenciájú operátorokat ismernek fel, várhatóan felismerő hélixükben is különböző aminosavak vannak. Főként azokban a kulcspozíciójú aminosavakban lehetnek köztük eltérések, amelyek a DNS nagy árkának bázisaival kapcsolódnak.

Az operátor-repressor komplex röntgendiffrakciós analízisével Steve Harrison és Mark Ptashne azonosították a 434 repressor felismerő hélixének azt a részét, amellyel illeszkedik az operátor nagy árkának bázisaival. Ennek analógiájára hasonló helyzetet feltételezhetünk a P22 repressor esetében is. A 8.31. ábra vázlatosan szemlélteti mindkét repressorban azokat az aminosavakat, amelyek nagy valószínűséggel részt vesznek az operátorhoz való kötődésben.

Ha valóban ezek a kulcsfontosságú aminosavak, akkor kicserélésükkel várhatóan megváltoztatható a repressor specificitása. Pontosabban, végrehajthatunk olyan módosítást a 434 repressorban, aminek következtében sajátja helyett a P22 operátort ismeri fel. Ptashne a 434 repressor klónozott génjéből indult ki, és indukált mutagenézissel (l. 15. fejezet) rendre megváltoztatta a 434 repressor felismerő hélixének öt aminosavkodóját a P22 felismerő hélixének megfelelően.



8.32. ábra. A lambda-operátorhoz (O_R2) kötődő lambda-repressor dimerjének számítógépes modellje. Jobb oldalon a DNS kettős hélice (világoskék). A repressor két monomere sötétkék, illetve sárga. A felső monomer hélix-fordulat-hélix motívuma (piros és kék) illeszkedik a DNS nagy árkába. Az alsó monomer karja körüléri a DNS-t

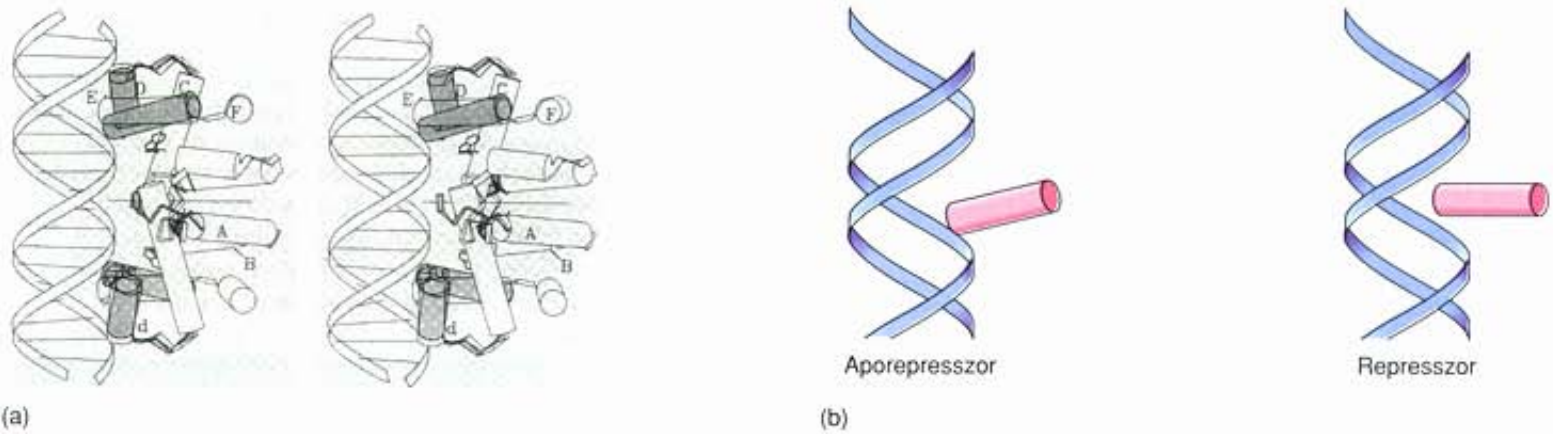
Forrás: Hochschild, A., Irwin, N. és Ptashne, M.: Cell, 32:322, 1983. Cell Press Photo

A következő lépésben a módosított gént baktériumsejtből működésre készítették, és megvizsgálta a géntermékek kötődését a 434 és a P22 operátorokhoz. Az öt aminosav szubsztitúciója tökéletesen megváltoztatta a repressor kötődési specificitását: a 434 operátora helyett a P22 operátórhoz kapcsolódott. Mindez igazolja, hogy a felismerő hélixben ez az öt aminosav, sőt talán csak ez az öt aminosav határozza meg a repressor specificitását.

A CRO ÉS A LAMBDA-REPRESSZOR HÉLIX-FORDULAT-HÉLIX ELEME

A Cro ugyancsak egy hélix-fordulat-hélix DNS-kötő elemet tartalmaz, és ugyanahhoz az operátorhoz kötődik, mint a lambda-repressor, csak pontosan ellentétes affinitást mutat a három különböző operátorhoz, ami azt jelenti, hogy először az O_R3 -hoz, utoljára pedig az O_R1 -hez kapcsolódik, és nem fordítva. Ezért az aminosavak megváltoztatásával várhatóan azonosítani lehet azokat az aminosavakat, amelyek a Cro és a repressor eltérő specificitásáért felelősek. Ptashne és munkatársai azt tapasztalták, hogy a felismerő hélixben különösen fontos az 5-ös és a 6-os aminosav. Emellett azt is kimutatták, hogy a lambda-repressor egyik végénél lévő kar, amely körbefonja az operátort, is jelentős a specificitásában.

A 8.32. ábra a lambda-repressor dimerjének és a lambda-operátor kölcsönhatásának számítógépes modelljét mutatja. A felül látható monomer hélix-fordulat-hélix eleme a DNS nagy árkába simul, az alsó részen levő másik monomer karja körbefonja a DNS-t.



8.33. ábra. A *trp* represszor és az aporepresszor illeszkedése a *trp* operátorhoz. (a) Térhatású ábra. Mindkét monomer hélix-fordulat-hélix eleme abban a pozícióban szerepel, amit felvesz a represszorban (átlátszó) és az aporepresszorban (szürke). A represszorban a triptofán helyzetét fekete sokszög mutatja. Figyeljük meg, hogy a felismerő hélix (E) az aporepresszorban nincs ideális pozícióban ahhoz, hogy szorosan illeszkedjék az operátor DNS-ének nagy árkába. A két csaknem azonos rajz sztereoteknikával készült, amely lehetővé teszi, hogy három dimenzióban lássuk a képet. A háromdimenziós hatás eléréséhez, használjon sztereonézőket, vagy pedig tartsa az ábrát 30-60 cm-re a szemei előtt, hagyja szemeit ellazulni, mintha maga elé meredne. Néhány másodperc múlva a két kép egybe úszik, és háromdimenziósnak tűnik. A térhatású kép segítségével jobban érzékelhetjük, miként illeszkedik a felismerő hélix a DNS nagy árkába. Ha nem sikerül elérni háromdimenziós hatást, külön-külön vegye szemügyre a két képet. (b) Egyszerűsített ábra az aporepresszor (balra) és a represszor (jobbra) felismerő hélixének (piros) a DNS nagy árkához viszonyított helyzetéről. Figyeljük meg, hogy a represszor felismerő hélice pontosan illik a barázdába, míg az aporepresszoré lefelé irányul

A TRP REPRESSZOR DNS-KÖTŐ ELEME

A *trp* represszor egy másik fehérje, amelynek hélix-fordulat-hélix DNS-kötő eleme van. Emlékezzünk vissza arra, hogy az aporepresszor – korepresszora a triptofán nélkül – nem aktív. Paul Siglernek és munkatársainak a *trp* represszor és az aporepresszor röntgenkristallográfiás vizsgálatával sikerült kimutatniuk azt a csekély, de igen lényeges eltérést, amit a triptofán okoz.

A vizsgálat eredménye a 8.33. ábrán látható. Az (a) részen a *trp* represszort és az aporepresszort egymás fölé rajzolták, a lehető legjobb illeszkedésben a *trp* operátorral. A represszor dimer, két monomere függőlegesen helyezkedik el az ábrán. Mindkettő felismerő hélixével kapcsolódik az operátor nagy árkához. A két dimer fennmaradó részei egymással kapcsolódnak. A represszor-dimer egy három doménből álló fehérje. A középső domén két, mindkét oldalra kiálló hélix-fordulat-hélix elemmel. A (b) ábrarészen a hélix-fordulat-hélix helyzete látható az aporepresszorban, illetve a represszorban. A felismerő hélix és a DNS által bezárt szögben igen csekélynek tűnik az eltérés, de nagyon fontos a fehérje és a DNS pontos illeszkedésében.

P. B. Sigler ezeket az elemeket „leolvasófejnek” nevezte, egy magnetofon fejéhez vagy egy személyi számítógép meghajtójához hasonlítva őket. A számítógép leolvasófeje két pozícióban lehet: foglalt és olvassa a lemezt, vagy szabad és messze van a lemeztől. A *trp* represszor hasonlóan működik! A triptofán beékelődik a kiemelkedő rész és a leolvasófejek közé, és a leolvasófejeket a legszorosabb illeszkedésű helyzetbe

kényszeríti az operátor DNS-ének nagy árkába. Amikor a triptofán disszociál az aporepresszorról, a kialakuló rések lehetővé teszik a leolvasófejek eltávolodását a középső gerincszerű rész felé, ezzel kikerülnek abból a pozícióból, amellyel az operátorhoz illeszkedtek.

Sok DNS-kötő fehérjében megtalálható egy hélix-fordulat-hélix szerkezeti elem. Minden ilyen elem második, ún. felismerő hélice a cél-DNS nagy árkába illeszkedik, és bizonyos kulcspozíciójú aminosavai közvetlen kapcsolatba kerülnek a DNS specifikus bázisaival és foszfátcsoportjaival. A fehérjék kötődésének specifitása megváltoztatható a kulcspozíciójú aminosavak cseréjével. A *trp* represszor triptofánt igényel, a represszor dimer felismerő hélice csak ekkor érintkezik megfelelő pozícióban az operátorral.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Az alábbi táblázat több részlegesen diploid *E. coli*-törzs genotípusát sorolja fel a *lac* operonra vonatkozóan. Adja meg fenotípusukat, alkalmazzon „+” jelölést a β -galaktozidázt termelő törzsekre, „-” jelölést a β -galaktozidázt nem termelőkre. A rendszerben egyik esetben sincs glükóz. Gondolatmenetét részletezze.

**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
(a) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(b) $I^+ O^+ Z^- / I^+ O^+ Z^+$		
(c) $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(d) $I^S O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(e) $I^+ O^C Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(f) $I^+ O^C Z^- / I^+ O^+ Z^+$		
(g) $I^S O^C Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		

MEGOLDÁS

**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
(a) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	+
(b) $I^+ O^+ Z^- / I^+ O^+ Z^+$	-	+
(c) $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	+
(d) $I^S O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	-
(e) $I^+ O^C Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	+	+
(f) $I^+ O^C Z^- / I^+ O^+ Z^+$	-	+
(g) $I^S O^C Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	+	+

Indoklás:

- (a) A részleges diploid mindkét genomrészelele vad típusú. Ezért a sejtek vad fenotípusúak a *lac* operonra: induktor hiányában represszáltak (-), induktor jelenlétében derepresszáltak (+), vagyis induktor hiányában nem termelnek β -galaktozidázt, induktor jelenlétében viszont igen.
- (b) A részleges diploidban egy mutáns és egy vad allél van a β -galaktozidáz (*Z*) lokuszon. Ebben az esetben a vad allél a domináns, mert a mutáns allél nem befolyásolja a vad allél működését. Ezért ez a törzs is vad fenotípusú, mint fent az (a) esetben.
- (c) A részleges diploidban van egy konstitutív (I^-) és egy vad allél az *I* lokuszon. Itt is a vad allél a domináns, a fenotípus az előzőekhez hasonlóan vad.
- (d) A részleges diploidnak egy vad típusú és egy I^S típusú alléja van az *I* lokuszon. Ebben az esetben a mutáns allél a domináns, mivel olyan represszort termel, amely nem képes megkötni az induktort. Ezért a represszor kötve marad az operátorhoz és megakadályozza a *lac* operon indukcióját, függetlenül attól, hogy a másik allél vad típusú represszort termel. Ezért az operon induktor jelenlétében represszált marad.
- (e) A részleges diploidban van egy vad típusú és egy konstitutív (O^C) allél az *O* lokuszon. A konstitutív allél a domináns, mert ez az operátor nem képes megkötni a represszort, szemben a vad típusú operátorral. Így ezek a sejtek induktor jelenlétében és hiányában is termelnek β -galaktozidázt.

- (f) A részleges diploid egyik genomrészelele kettős mutáns, konstitutív az operátorban és defektív a β -galaktozidáz *Z* lokuszára. A másik genomrészelet mindkét lokuszon vad típusú. Amikor ilyen *cis*-helyzetben van a két mutáció, akkor kioltják egymást. Az O^C mutáció domináns, de csak *cis*-domináns. Azaz csak annak az operonnak a vonatkozásában, amelyikhez kapcsolódik. Ebben az esetben a kapcsolódó operonban hibás *Z* gén van, így semmilyen körülmények között sem termel β -galaktozidázt. Mivel a másik genomrészeletben semmilyen eltérés sincs, a sejtek vad fenotípusúak.
- (g) A részleges diploid egyik genomrészelele kettős mutáns, I^S az *I* lokuszra és konstitutív az *O* lokuszra (O^C). Minthogy az O^C operátor egyáltalán nem képes megkötni a represszort, az I^S lokusz hibás represszort sem köti meg. Ezért ez az operon az induktor hiányában és jelenlétében is működik, akkor is, ha a vad típusú operon mindig kikapcsolt állapotú, mert a mutáns represszor *transz* helyzetű.

2. FELADAT

(a) Az alábbi táblázatban felsorolt genotípusokban az *A*, *B* és *C* betűk a *lacI*, *lacO* és *lacZ* lokuszokat jelölik, de nem feltétlenül ebben a sorrendben. A táblázat első három genotípusának mutáns fenotípusa alapján azonosítsa, hogy a *lac* operon melyik három lokuszának felel meg a betűk. A felső indexben szereplő negatív jel (pl. A^-) az alábbi rendellenes működésekre utalhat: Z^- , O^C vagy I^- .

(b) Határozza meg a genotípusát a táblázat 4. és 5. sorában található részleges diploid törzseknek a *lac* operon hagyományos genetikai jelöléseit alkalmazva!

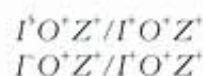
**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
1. $A^+ B^+ C^-$	+	+
2. $A^- B^+ C^+$	+	+
3. $A^+ B^+ C^- / A^+ B^+ C^+$	+	+
4. $A^- B^+ C^+ / A^+ B^+ C^+$	-	-
5. $A^- B^+ C^+ / A^+ B^+ C^+$	-	+

MEGOLDÁS

(a) Minthogy az #1. mutáns törzs konstitutív (nem szükséges induktor az aktivitáshoz), kell hordoznia egy mutációt az *I* vagy az *O* génben, vagyis I^- vagy O^C genotípusúnak kell lennie. Ezért a *C* (a mutáns allél az #1. törzsben) *I*-nek vagy *O*-nak felel meg. A #2. mutáns vonal szintén konstitutív, ezért genotípusa ugyancsak I^- vagy O^C . Ezért az *A* szintén *I*-vel vagy *O*-val azonos. Mivel tudjuk, hogy az *A* és a *C* *I* vagy *O*, ez egyben azt is jelenti, hogy *B* kizárásos alapon nem más, mint a *Z* gén. Most már csak azt kell eldönteni, vajon $A = I$ és $C = O$, vagy éppen fordítva. A választ a #3. mutáns törzs fenotípusa adja meg. Mivel ez is konstitutív, és a mutáns allél domináns a részleges heterozigótában, a *C* csak O^C lehet. I^- esetén ugyanis, a mutáció recesszív, és induktor hiányában nem tapasztalnánk β -galaktozidáz termelést. Tehát az $A = I$, $B = Z$, $C = O$.

(b) A 4. sor részleges diploidja még induktor jelenlétében sem termel β -galaktozidáz, vagyis az A^- mutáció domináns, ezért I^S -nek felel meg. Másrészt, az 5. sor részleges diploidjának fenotípusa megegyezik a vad törzsével. Ezért az 5. törzsben a mutáció (A^-) recesszív, azaz $A^- = I^-$. Ezért a két genotípus:



ÖSSZEFOGLALÁS

Az RNS-polimeráz a transzkripció folyamat főszereplője. Az *E. coli* enzime a core-enzimből és a σ -faktornak nevezett polipeptidből áll. A core-enzim az alapvető transzkripció gépezet, a σ -faktor pedig meghatározott gének átírására irányítja a core-enzimet. A σ -faktor lehetővé teszi a transzkripció iniciációját, mert biztosítja az RNS-polimeráz holoenzimének szoros kötődését a promóteren, előidézi a DNS helyi olvadását.

Az egymással funkcionális kapcsolatban álló bakteriális gének gyakran operonokba csoportosulnak és egy közös promóter irányítása alá tartoznak. Például a laktóz lebontásában szereplő három enzim génjei az *E. coli* esetében a *lac* operonban tömörülnek. Ennek az operonnak pozitív (cAMP és katabolitaktivátor-fehérje – CAP) és negatív (*lac* represszor) szabályozása is van.

A *trp* operon azokat az enzimeket kódolja, amelyek a triptofán szintézisében szerepelnek. A *trp* represszor és a triptofán korepresszor közreműködésével negatív szabályozás alatt áll. A represszor-operátor rendszeren felül a *trp* operon működését az attenuáció is kontrollálja. A folyamat lényege, hogy idő előtt leállítja az operon transzkripcióját, amennyiben az operon terméke bőségesen rendelkezésre áll.

Az RNS-polimeráz által felismert, a transzkripció befejezését jelző ún. terminációs jelek vagy terminátorok inverz ismétlődő szekvenciák, amelyeket egy másik szerkezeti motívum követ, rendszerint egy T-sorozat. Az inverz ismétlődő szekvencia transzkriptuma bázispárokat tartalmazó szerkezetet, ún. hajtút képezhet, amely valamilyen módon leállítja a polimerázt. A polimeráz ezután kiváltja a transzkriptum leválását, ezzel az átírás befejeződik. Más terminátorok egy járulékos faktort, ún. ρ -faktort igényelnek az RNS-polimeráz mellett.

A prokariótákban a génműködés szabályozása elsődlegesen a transzkripció szintjén valósul meg. A transzkripció időbeli kontrollját az SPO1 faggal fertőzött *B. subtilis*-sejtekben egy sor, a fág által kódolt σ -faktor irányítja. A σ -faktorok kapcsolódnak a gazdasejt RNS-polimerázának core-enzimjéhez, és átállítják a polimeráz specifikitását a korai, a középső, majd a késői szakasz génjeire. A T7 fág nem új σ -faktort kódol az RNS-polimeráz specifikitásának megváltoztatására, hanem egy teljesen új RNS-polimerázt, amely a késői fággenekre specifikus. A λ -fág litikus ciklusában a transzkripció átkapcsolást antiterminátorok szabályozzák, amelyek áthaladnak a ρ -faktortól függő terminátorokon, és lehetővé teszik a transzkripció folytatását a következő géncsoportban.

A λ -fág replikációja kétféle, litikus vagy lizogén utat követhet. A litikus folyamatban a fág szinte minden génje transzkripcióra és translációra kerül, DNS-e replikálódik. Mindez utódfágok

képződéséhez, majd a gazdasejt liziséhez vezet. Lizogénia esetén a λ -fág DNS-e beépül a sejt genomjába, és ezután csak a λ -represszor génje (*cl*) működik. A gén terméke, a λ -represszor kötődik a fág két korai génjének operátoraihoz, és ezzel meggátolja a fág összes többi génjének transzkripcióját. Ugyanakkor az integrálódott fág-DNS, a profág replikálódik, mivel a gazdasejt DNS-ének részévé vált.

Az, hogy egy sejtet a λ -fág litikus vagy lizogén módon fertőz meg, a CII sejtben belüli koncentrációjának függvénye, amit pedig a környezeti feltételek befolyásolnak.

Ha egy lizogén sejt DNS-e károsodik, az kiváltja az SOS-reakciót. A reakció első lépése a RecA fehérje koproteáz-aktivitásának megjelenése. Ez indukálja a λ -represszor latens proteáz-aktivitását, aminek következtében a λ -represszor két részre hasad, leválik az operátorokról, és beindul a litikus ciklus. A λ -fág ily módon megmenekülhet a gazdasejtet ért károsodások következményeitől.

Számos prokarióta DNS-kötő fehérje, így a λ -represszor, a *trp* represszor és a Cro, egy hélix-fordulat-hélix elem útján kapcsolódik a DNS-hez, amely specifikusan illeszkedik a cél-DNS nagy árkába. A motívumok második ún. felismerő hélixében lévő aminosavak lépnek kontaktusba a nagy árok bázisaival és foszfátcsoportjaival.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Vesse össze az RNS-polimeráz holoenzim és a core-enzim aktivitását, egy rést (nick) nem tartalmazó fág-DNS-en *in vitro*.
- Egy -10 box szekvenciája a következő: CATAGT.
 - Egy C \rightarrow T mutáció az első pozícióban, illetve
 - egy T \rightarrow A mutáció az utolsó pozícióban várhatóan fokozó vagy gyengítő hatású-e?
- Az operon milyen szerkezeti jellegzetességei biztosítják az egy operonba tartozó gének összehangolt szabályozását?
- Tételezzünk fel olyan *E. coli*-sejteket, amelyek az alábbi mutációkat hordozzák:
 - mutáns *lac* operátor (O^c), amely nem képes a represszor megkötésére;
 - mutáns *lac* represszor (az I^- gén terméke), amely nem képes kötődni a *lac* operátorhoz;
 - mutáns *lac* represszor (az I^S gén terméke), amely nem képes megkötni az allolaktózt;
 - mutáns *lac* promóter, amely nem köti meg a CAP-cAMP komplexét.

Milyen hatásuk van az egyes mutációknak a *lac* operon működésére (feltéve, hogy a rendszerben nincs glükóz)?
- Az alábbi táblázat több részleges diploid *E. coli*-törzs genotípusát mutatja a *lac* operonra nézve. Adja meg a fenotípusokat, jelölje

„+” jellel a β -galaktozidáz szintézist és „-” jellel a β -galaktozidáz szintézis hiányát. A kísérleti rendszerek egyikében sincs glükóz. Röviden indokolja is válaszait!

**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
(a) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(b) $I^+ O^+ Z^- / I^+ O^+ Z^+$		
(c) $I^- O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(d) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(e) $I^+ O^c Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		
(f) $I^+ O^c Z^- / I^+ O^+ Z^+$		
(g) $I^+ O^c Z^+ / I^+ O^+ Z^+$		

6. Az alábbi táblázat néhány *lac* mutáns geno- és fenotípusát adja meg, de mindegyik esetben hiányzik egy gén jelölése („x” helyettesíti). A rendelkezésére álló információ alapján töltsé ki a hiányzó jelöléseket! Válaszát indokolja! (Egyes esetekben az „x” vad típust is jelenthet.) $Z = lacZ$, a β -galaktozidáz génje.

**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
(a) $I^+ O^+ Z^+$	+	+
(b) $I^+ O^+ Z^- / I^+ O^+ Z^+$	-	-
(c) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	+ (2 válasz lehetséges)
(d) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	+	+
(e) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	+	+
(f) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	+
(g) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^+ Z^+$	-	-

7. Tétélezzük fel, hogy mutációk történtek a *lac* operon promoterében. Ezek a mutációk meggátolják az RNS-polimeráz kötődését, jelölésük: P^- . Adja meg az alábbi részleges diploidok fenotípusát, feltéve, hogy nincs glükóz a táptalajban. $Z = lacZ$, a β -galaktozidáz génje.

**β -galaktozidáz
termelésére vonatkozó fenotípus**

Genotípus	Nincs induktor	Van induktor
(a) $I^+ O^+ P^- Z^+ / I^+ O^+ P^+ Z^+$		
(b) $I^+ O^+ P^- Z^+ / I^+ O^+ P^- Z^+$		
(c) $I^+ O^+ P^- Z^+ / I^+ O^+ P^+ Z^+$		
(d) $I^+ O^+ P^- Z^+ / I^+ O^+ P^- Z^+$		

8. A *trp* operonban öt struktúrgén van, mégis csak három enzimet kódol. Miként lehetséges ez?

9. Hányszorosára fokozódhat a *trp* transzkripciója a következő *E. coli*-sejtekben, amikor a triptofán koncentrációja a kezdeti magas szintről igen alacsonyra csökken? Miért?

- (a) Vad típus.
 (b) Olyan mutánsok, amelyekben a vezérszekvencia két triptofán-kodonja UGGUGG-ről UGAUGG-re változott (az UGA stopjel!).
 (c) Olyan mutánsok, amelyekben a vezérszekvencia két triptofán-kodonja az UGGUGG-ről UCGUGC-re változott.
 (d) Olyan mutánsok, amelyek attenuátorában a T-füzért G-füzér váltotta fel.

10. Az SPO1-gyel fertőzött *B. subtilis*-sejtekben, mely függének kerülhetnek átírásra, ha a fág alábbi génjeiben történt mutáció? Miért?

- (a) 28. gén.
 (b) 33. gén.
 (c) 34. gén.

11. Milyen hatása lehet a T7 fág 1. génjében bekövetkező mutációnak? Miért?

12. Milyen következménnyel jár, ha a *B. subtilis* σ^C vagy σ^E génjében mutáció történik? Miért?

13. Melyik függén nem működik, miután a λ -fág litikus ciklusa elindult?

14. Mely függének nem működnek egy λ -lizogén sejtben?

15. A pN egy közvetlen korai gén terméke, amely szükséges a késleltetett korai gének transzkripciójához, de nagyon bomlékony. Miért nem okoz ez problémát a litikus ciklusban, a késleltetett korai gének folyamatos transzkripciójában?

16. A P_{RE} -től induló RNS-polimeráz áthalad a σ génen. Eredményezi ez a σ működését? Miért igen, vagy miért nem?

17. Miért nem képes sem a P_{RE} , sem a P_{RM} elkezdni a *cl* gén átírását, más λ -gének működése előtt?

18. A pozitív vagy a negatív szabályozási folyamatok közé sorolná-e a pN antiterminátor aktivitását? Miért?

19. (a) Miért zavaros a λ -fág legtöbb plakkja? (b) Zavaros plakkot ad-e egy cl^- mutáns? Válaszát indokolja!

20. Egy *E. coli*-sejtet N^- mutáns λ -fággal fertőzünk. Milyen eredmény várható: litikus ciklus, lizogénia, vagy pedig egyik sem? Miért?

21. Egy olyan mutáns represszort találtak, amely képes kötődni egy mutáns operátorhoz. A mutáns represszor melyik része különbözhet a vad típusútól?

A megoldások a könyv végén találhatók.

9.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 Az eukariótákban a DNS fehérjékkel együtt kromoszómákba szerveződik.
- 2 Az eukarióta sejtek három RNS-polimerázának szerepe.
- 3 Az eukarióta RNS-polimerázok által felismert promoterek szerkezete.
- 4 A transzkripció faktorok szerepe a háromféle promoter típusból induló átírás aktiválásában.
- 5 Számos eukarióta gén nem folyamatos.
- 6 A transzkripció és a transláció közötti események az eukarióta gének expressziójában.

Az eukarióta genom szerveződése és működése

*A természet étlapja nem hosszú,
de a választék meglehetősen jó.*

Dagmar Ringe
amerikai biológus

A 8. fejezetre visszatekintve, a prokarióta genom szerkezete és működése meglehetősen bonyolultnak tűnik, de ha az eukariótákkal vetjük össze, inkább egyszerűnek. Az egyik legszembetűnőbb példa a prokarióták és az eukarióták közötti különbségre kromoszómáik eltérő felépítése. A prokarióták kromoszómája gyűrű alakú és aránylag kevés fehérje kötődik hozzá. Az eukarióta kromoszóma ezzel szemben nagy mennyiségű szerkezeti fehérjét tartalmaz a DNS mellett. Ebben a fejezetben megismerkedünk az eukarióták kromoszómainak szerkezetével és a bennük levő génekkel. Bemutatjuk, hogy az eukarióta gének expressziója nem csak a transzkripció és a transláció folyamatából áll, hanem egy sor más eseményből is.

A KROMATIN SZERKEZETE

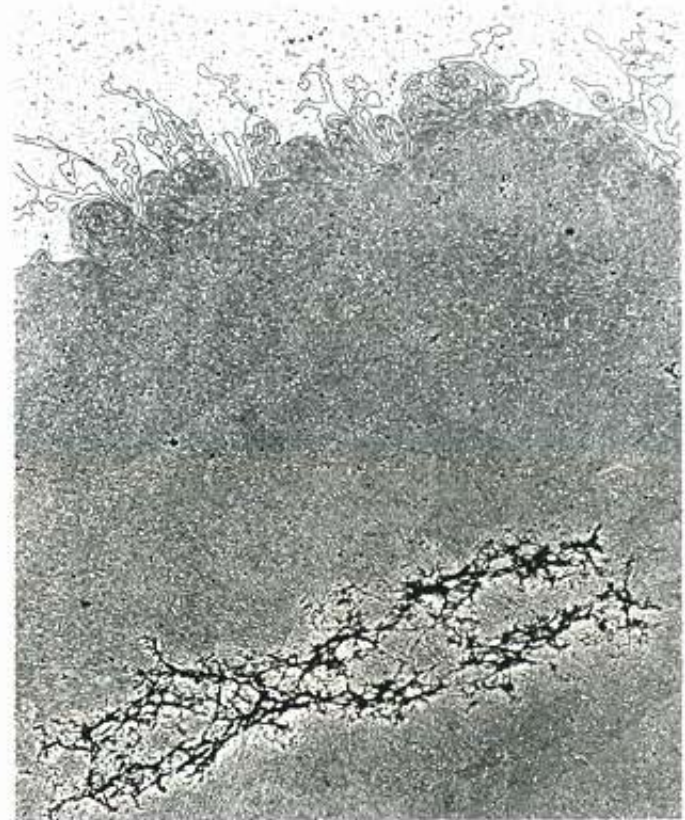
Volt már valaha a kezében egy sárkány eregető zsinórja, egy horgászszinég, esetleg egy szál céma vagy akár egy kerti locsolócső? Ha igen, akkor tudja, hogy a hosszú, vékony tárgyak néha reménytelenül összegubancolódnak. Elég, ha egy pillantást vetünk a 9.1. ábrára, hogy meggyőződünk arról: egy kromoszóma DNS-e arányait tekintve sokkal hosszabb a szélességéhez viszonyítva bármely sárkány zsinégénél. Valójában sokkal magasabbra kellene feleresztenünk egy sárkányt a tengerszinttől, mint a Mount Everest csúcsa, hogy ugyanazt a hosszúság/shélesség arányt érnék el a zsineggel, mint amilyen egy átlagos emberi kromoszóma DNS-ére jellemző (több mint tízmillió az egyhez). Hogyhogy nem gubancolódnak össze ezek a nagyon hosszú molekulák? A magyarázat az, hogy fehérjékkel kapcsolódva összetett struktúrát, ún. **kromatint** alkotnak, és nagyfokú szervezethez felcsavarodnak.

Amikor a kromatint enyhén emésztjük egy DNÁzzal, a *Micrococcus nukleáz*sal, DNS-ből és fehérjéből álló részecskéket, **nukleoszómakat** kapunk (9.2.(a) ábra). A nukleoszómak általában jellemzők az eukariótákra, feltűnően egyforma méretűek, átmérőjük 11 nanométer, mintegy 200 bázispármű DNS-t tartalmaznak.

A nagy gyakoriság és a hasonlóság arra utal, hogy a nukleoszóma a kromatin ismétlődő szerkezeti egységei, amire közvetlen bizonyítékok is vannak. Vegyük például az emlősök SV40 tumorvírusának ún. minikromoszómáját. Amikor ez a vírus megfertőz egy sejtet, cirkuláris DNS-e magához vonzza a gazdasajt hisztonfehérjéit, és kisméretű kromoszómát képez velük. Amikor az ilyen minikromoszómákat tartalmazó oldat sókoncentrációját csökkentjük, gyöngysorszerű struktúrát kapunk, a gyöngyszemek a nukleoszómak (9.2.(b) ábra).

A NUKLEOSZÓMAK A KROMATINSZERVEZŐDÉS ELSŐ SZINTJÉT ALKOTJÁK

A nukleoszóma a 200 bázispármű DNS mellett bázikus fehérjéket, **hisztonokat** tartalmaznak. A legtöbb eukarióta sejtben ötféle hiszton van, a **H1**, a **H2A**, a **H2B**, a **H3** és a **H4**. Az ötféle típus gélelektroforézissel választható szét (9.3. ábra). A nukleoszóma a hisztonmolekulák gömb alakú struktúrába szer-

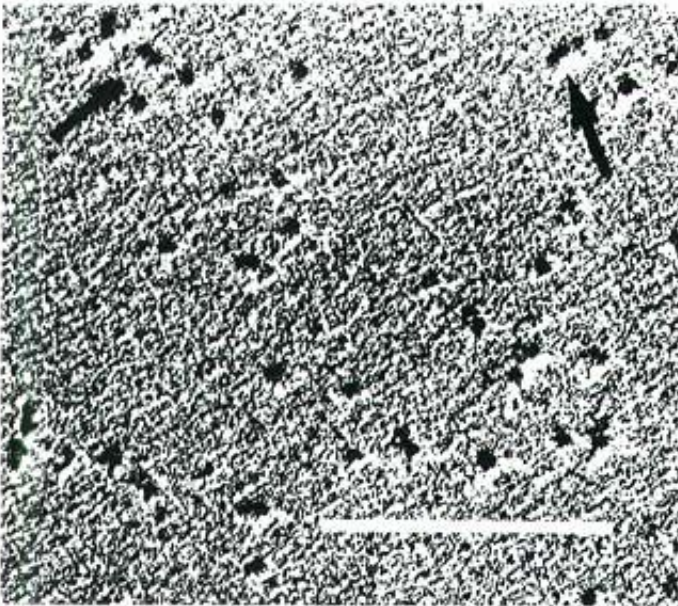


9.1. ábra. DNS egy emberi kromoszómában. HeLa-sejt metafázisos kromoszómájából eltávolították a fehérjék legnagyobb részét. Ennek következtében a DNS letekeredett és csak a kromoszóma váza maradt hátra. A felvétel felső, világosabb részén a DNS összegubancolódott hálózata látható, melyet egyetlen DNS-kettős hélix alkot

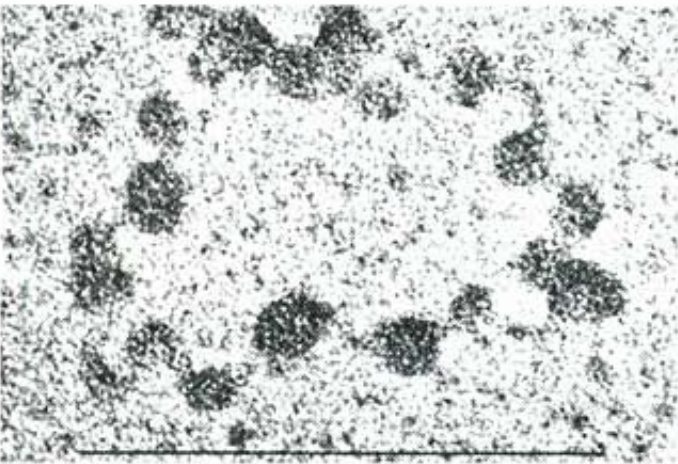
Forrás: Paulson, R. James és Laemmli, U. K.: Cell, 12:820, 1977. © Cell Press

veződnek, e köré csavarodik fel a DNS, mintegy két menetet alkotva. Minden egyes gyöngyszem pontosan nyolc hisztonmolekulát tartalmaz, egy-egy pár H2A-t, H2B-t, H3-at és H4-et. A H1 az összekötő DNS-szakaszokhoz kapcsolódik. Az összekötő DNS erőteljesebb DNÁzos emésztéssel lebontható, és így felszabadítható a nukleoszóma magja (core), amely köré kb. 150 bázispár hosszú DNS hurkolódik. A hisztonok és a DNS valószínű elrendeződését a nukleoszóma magrészében a 9.4. ábra szemlélteti. Úgy tűnik, hogy a magban a hisztonok nem párosával helyezkednek el. A részecske közepén a H3 és a H4 egy tetramert alkot, amelyet balra fent, illetve jobbra lent a H2A-H2B dimerek fognak közre.

A nukleoszóma két sajátja is arra utal, hogy alapvető szerepük lehet a genom szerveződésében. Először is, általában jellemzők az eukariótákra, másodsor, a legtöbb hiszton nem mutat evolúciós változást. Az evolúciós konzervativizmust nagyszerűen példázza, hogy a szarvasmarha és a borsó H4 hisztonjának 102 aminosava közül mindössze kettőben van eltérés. Ráadásul ezek az ún. **konzervatív szubsztitúciók** nem okoznak számottevő változást a fehérje szerkezetében. Más szóval, azóta, hogy a szarvasmarha és a borsó evolúciós vonala elágazott egy közös őstől, a H4 hisztonnak csak két aminosava változott meg. Mindebből



(a)



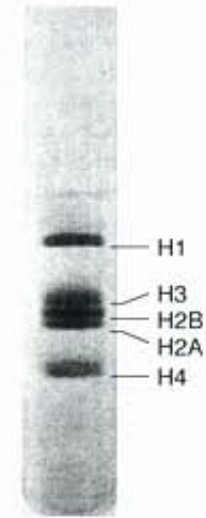
(b)

9.2. ábra. Nukleoszómák. (a) Csirke vörösvérsejtjeinek kromatinjából nukleázos kezeléssel nyert nukleoszómák. A berajzolt szakasz 250 nm-nek felel meg. (b) Nukleoszómák az SV40 vírus minikromoszómaiban. A minikromoszómát alacsony sókoncentrációjú pufferrel kezelték. Jól látható az ennek hatására kialakuló gyöngysorszerű szerkezet. A berajzolt szakasz 100 nm-nek felel meg

Fotó (a) Oudet, P., Gross-Bellards, M. és Chamban, P.: *Cell*, 4:287, 1975. © Cell Press; (b) Dr. Jack Griffith

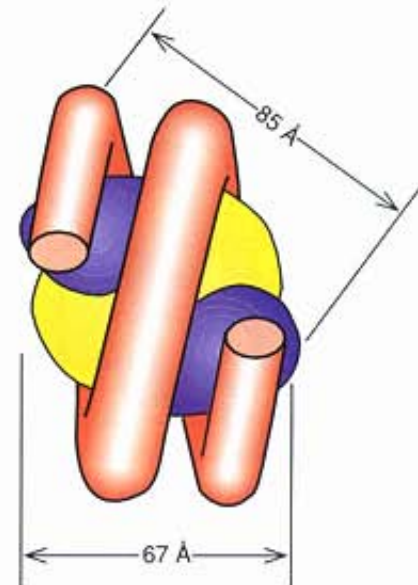
egyértelműen következik, hogy a hisztonok és a belőlük felépülő nukleoszómák létfontosságúak, ellenkező esetben szerkezetük nagyobb evolúciós változáson ment volna keresztül.

A nukleoszómák minden valószínűség szerint a struktúra kialakításában játszanak szerepet, az elsődleges szintet jelentik a rendkívül hosszú és vékony kromoszómafonalak kondenzálódásában. Mindezt nagyon jól szemlélteti a 9.5. ábra, amelyen egy fehérjéitől megfosztott SV40 DNS látható, mellette pedig egy ugyanakkora nagyítással készült felvétel az SV40 minikromoszómájáról. A minikromoszóma szembetűnő rövidülése a nukleoszómák kialakulásának következménye. A számítások szerint a DNS mintegy heted részére kondenzálódik, amikor feltekeredik a nukleoszómákba.



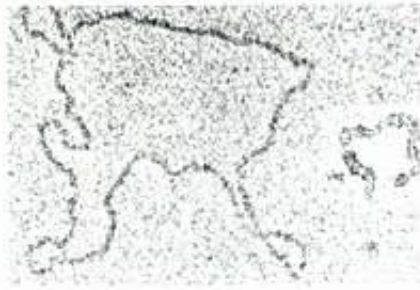
9.3. ábra. A hisztonok elválasztása elektroforézissel. A borjú csecsemőmirigyéből nyert hisztonokat poliakrilamid gélelektroforézissel választották el egymástól

Forrás: Panyim, S. és Chalkley, R.: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 130:343, 6(A) ábra, 1969



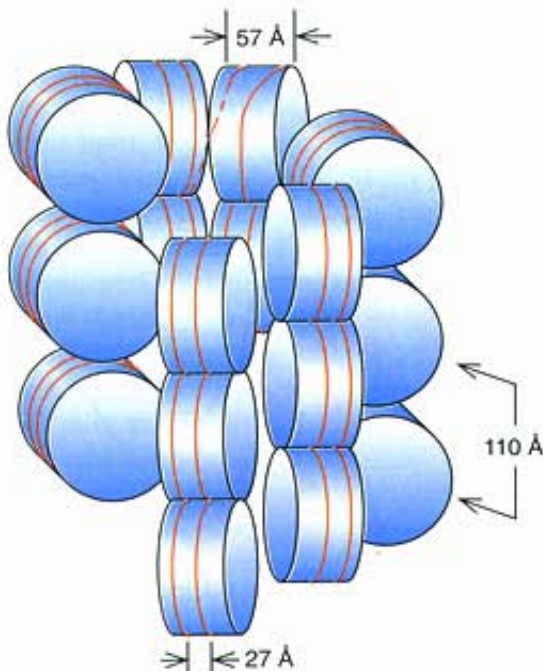
9.4. ábra. A nukleoszóma szerkezetének egy lehetséges ábrázolása, röntgen- és neutrondiffrakciós vizsgálatok alapján. A DNS (piros) feltekeredik a hisztonokból álló mag köré. A fehérjemag középső részét H3–H4 tetramer építi fel (sárga), ennek két végére kapcsolódik egy-egy H2A–H2B dimer (lila)

Az eukarióták DNS-e hisztonoknak nevezett bázikus fehérjékkel együtt nukleoszómákba szerveződik. Ezekben a szerkezeti egységekben négy pár hiszton (H2A, H2B, H3 és H4) egy gömb alakú képletet alkot, amely köré mintegy 200 bázispárnyi DNS tekeredik. A H1 hiszton kívülről kapcsolódik a maghoz. A kromatin elsődleges szerkezeti szintjét a gyöngysorszerűen kapcsolódó nukleoszómák képviselik.



9.5. ábra. A DNS kondenzálódása a nukleoszómákban. Az elektronmikroszkópos felvételen egy fehérjéitől megfosztott SV40 DNS látható, a vírus ugyanakkora nagyságú minikromoszómája mellett (betét). A nukleoszóma kialakulása nyilvánvalóan kondenzációval jár

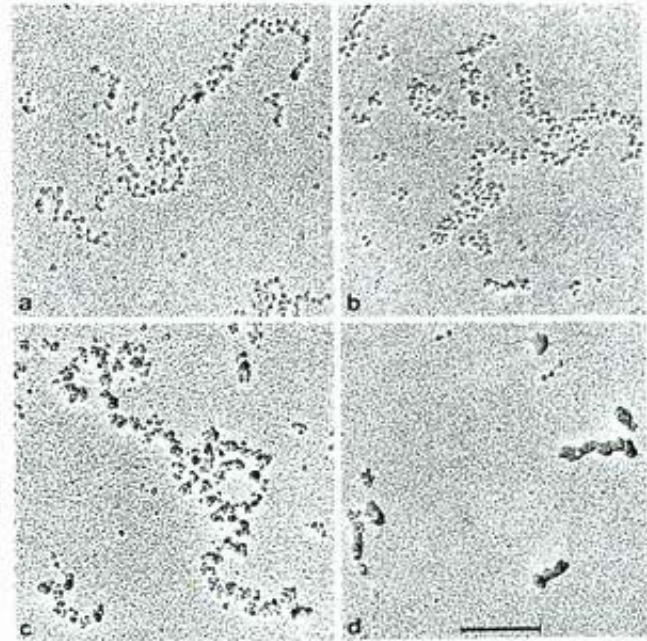
Forrás: Dr. Griffith, Jack: *Chromatin Structure: Deduced from a Minichromosome*. *Science*, 187:1202. 1. ábra, 1975, © American Association for the Advancement of Science



9.6. ábra. A kromatin feltekeredése szolenoiddá. A nukleoszómákból álló füzér egy képzeletbeli tengely körül felcsavarodik, és egy belül üreges struktúrát, szolenoidot alkot. A nukleoszómákat egy-egy világoskék henger szemlélteti, amelyek köré feltekeredik a DNS (piros)

A NUKLEOSZÓMÁKBÓL ÁLLÓ FÜZÉR TOVÁBBI KONDENZÁCIÓJA

Az interfázisos sejtmagokban a kromatin különböző vastagságú lehet. Az egyik jellemző átmérő 11 nm (110 Å), ez megegyezik a nukleoszómákból álló füzér méretével. A következő átmérő mintegy 25 nm (250 Å), amit a nukleoszómák további feltekeredéséből származó, belül üreges tekeres, az ún. **szolenoid** (9.6. ábra) alkot. Aaron Klug, aki először írta le a szolenoid szerkezetét, elektronmikroszkópos felvételeken vizsgálta, hogyan változik a kromatin szerkezete a sókoncentráció növelésével (9.7. ábra). Nagyon alacsony sótartalom mellett a kromatinállomány



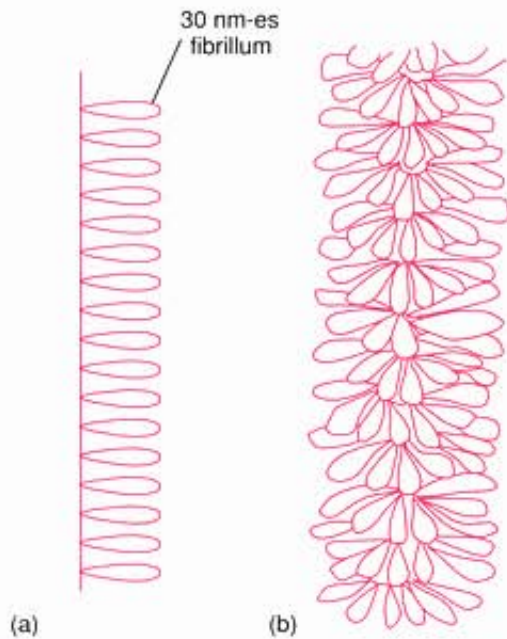
9.7. ábra. A szolenoid kialakulása. (a) A nukleoszómákból álló füzér nagyon alacsony ionerejű közegben kinyúlt formában van jelen. (b) A sókoncentráció emelésével megkezdődik a kondenzálódás, és (c) magasabb sókoncentrációnál tovább folytatódik. (d) Fiziológias sótartalom mellett kialakul az erősen kondenzálódott szolenoid. A berajzolt vonal 200 nm távolságnak felel meg

Forrás: Thoma, F., Koller, T., Klug, A.: *Journal of Cell Biology*, 83:403–27, 1979, © Rockefeller University Press

feltűnően hasonlít az SV40 minikromoszómáihoz (9.2. ábra), nukleoszómákból álló füzérként jelent meg. A sókoncentráció emelésével megkezdődött a feltekeredés, egészen a tipikus szolenoid kialakulásáig. A szolenoid újabb 6–7-szeres kondenzálódását eredményezi a DNS-szálnak. Tudjuk, hogy a folyamatban a H1 is részt vesz. Amikor nincs jelen a H1 fehérje, akkor még magas sótartalom mellett sem tekeredik fel a kromatin.

Úgy tűnik, a feltekeredésben a H1-H1 kölcsönhatások is fontosak. Tudjuk, hogy minden nukleoszómához csak egy H1 kötődik, ezért az egymással kapcsolatot létesítő H1 molekuláknak különböző nukleoszómákon kell lenniük. Egy ilyen típusú kölcsönhatás pedig könnyen okozhatja a kromatin összehajtogatódását, de könnyen lehet a hajtogatódás eredménye is. Egy másik, sokkal összetettebb bizonyíték, azt támasztja alá, hogy a H1-H1 kölcsönhatás az ok, nem pedig következmény.

A kromatin további vizsgálatai arra utalnak, hogy a kromoszómában még legalább egy hajtogatódási szint létezik. Először is, megfigyelték, hogy az eukarióta kromoszómák szupertekercselt szerkezetűek. A 7. fejezetben láttuk, hogy a szupertekercselt struktúra a bakteriális és egyes virális DNS-ekre is jellemző, mivel ezeknek a molekuláknak a cirkuláris szerkezete megakadályozza a feszültség megszűnését. Az eukarióták kromoszómái azonban lineárisak, akkor hogyan jöhet létre bennük szupertekercselt DNS? Az egyik lehetőség, hogy a kromatinfibrillum hurkokat képez, és mindegyik hurok szorosan rögzül az alapjánál (9.8. ábra). Így minden egyes hurok funkcionálisan megfelel egy gyűrűnek, legalábbis a szuperterte-



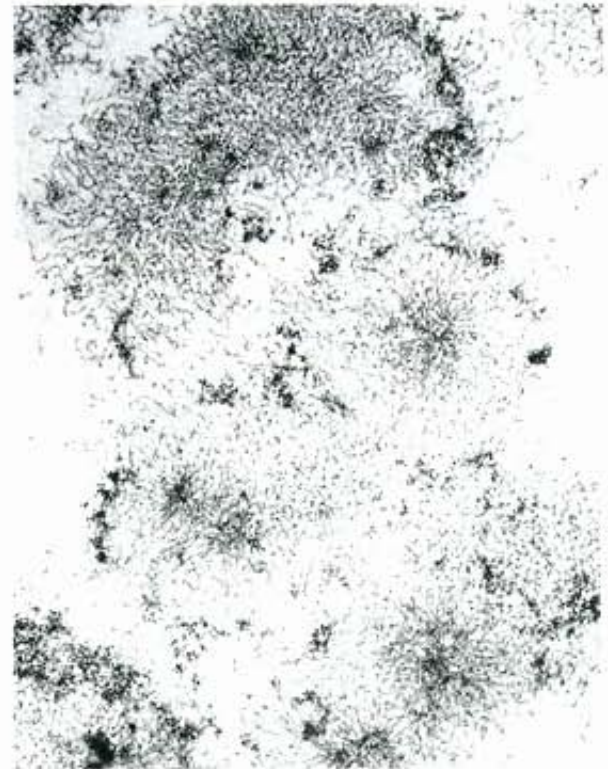
9.8. ábra. A kromatin hajtogatódása sugárirányú hurkok kialakulásával. (a) A modell egy kiragadott részlete, amely a hurkok kapcsolódási módját szemlélteti a központi vázhoz (scaffold). A hurkok mindegyike ugyanannak a folyamatos DNS-molekulának a részét jelenti. (b) A teljes modell, amelyen jól látható, miként rendeződnek a hurkok háromdimenziós szerkezetté a központi váz körül



9.9. ábra. A fehérjéitől megfosztott kromoszóma hurokszerű struktúrát mutat. A centrális váz (scaffold), amelyből a hurkok erednek a felvétel alján látható. A berajzolt vonal 2 mikronnak felel meg
Forrás: Paulson, J. R. és Laemmli, U. K.: Cell, 12:823, 1977, © Cell Press

keres kialakulása szempontjából, és a szuperhelikális szerkezet képződéséhez szükséges feszültséget a DNS nukleoszómák körüli feltekeredése szolgáltatja.

A hurokképződés elméletét támasztja alá a 9.1. ábrán látható emberi kromoszóma elektronmikroszkópos képe is, bár a DNS tömör szerkezete miatt a hurkok nehezen kivehetők.



9.10. ábra. Sugárirányú hurkok metafázisos kromoszómákon. A felvétel alsó részén a kromatidák keresztmetszetben láthatók, míg a felső részen hosszsmetszetben

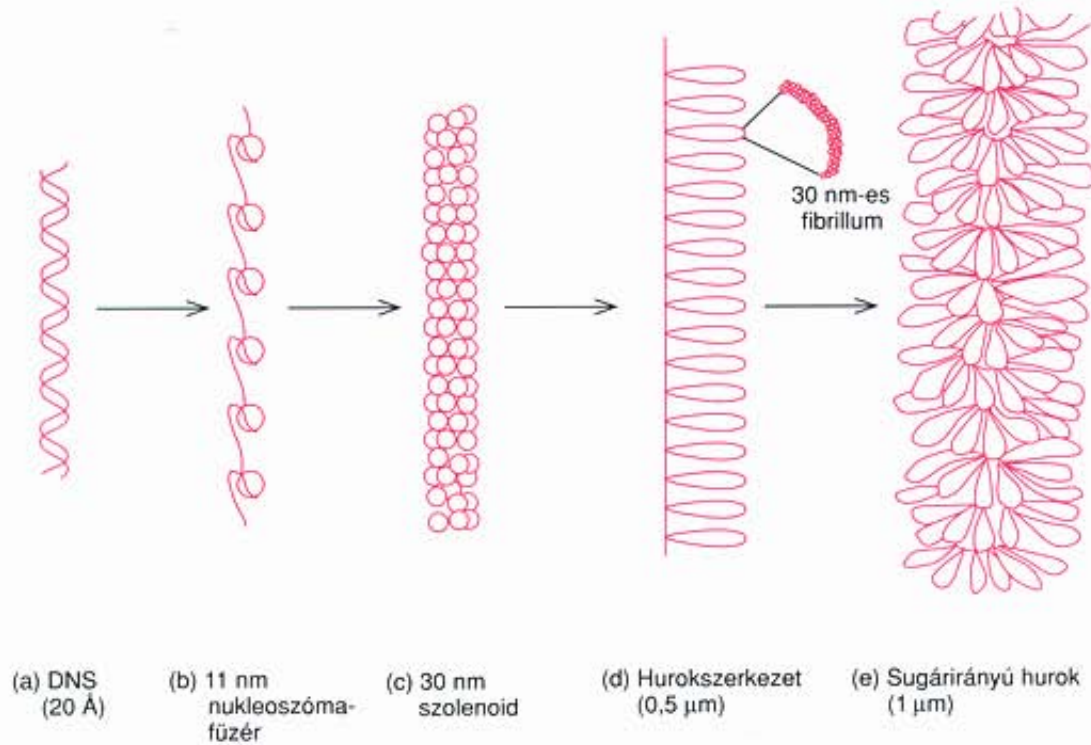
Forrás: Marsden, M. P. F. és Laemmli, U. K.: Cell, 17:851, 1979, © Cell Press

A 9.9. ábra ugyancsak egy fehérjéitől megfosztott kromoszómát mutat be. Ezen a felvételen már tisztán kivehető, hogy a hurkok a kromoszóma vázának szomszédos pontjairól indulnak ki, és oda érkeznek vissza. A 9.10. ábrán több vastag, metafázisos kromoszóma keresztmetszetéről készült elektronmikroszkópos felvétel látható, ami ugyancsak alátámasztja a sugárirányú hurkok létezését. Jelenlegi tudásunkat a kromatin szerveződéséről – a 2 nm-es csupasz DNS-száltól az előbb ismertetett, sugárirányú hurkokat tartalmazó kromoszómáig – a 9.11. ábra összegzi.

A kromatin kondenzálódásának második szintjét a 25 nm vastag szolenoid jelenti, amelyben a nukleoszómákból álló fűzér csavarodik fel. A folyamatban minden bizonnyal fontos szerepe van a H1 hisztonok közötti kölcsönhatásnak. A kondenzálódás harmadik szintje valószínűleg a 25 nm-es fonál hurkolódása egy kefeszerű struktúrába, amelyben a sugárirányú hurkok egy centrális mátrixhoz rögzülnek.

A KROMATIN SZERKEZETE ÉS A GÉN MŰKÖDÉS

Egy gén közelében lévő kromatin fizikai állapota és a gén aktivitása között szoros összefüggés mutatható ki. Kezdjük azzal, hogy a kromatin szerkezetének két alapvető típusát különböztetjük meg: a **heterokromatint** és az **eukromatint**. Az eukro-



9.11. ábra. A kromatin kondenzálódásának szintjei. Az (a), (b) és (c) szerkezetek létezésének komoly kísérleti bizonyítékai vannak, míg a 9.8. ábrán is látható (d) és (e) inkább spekulatív

Annual Review of Genetics, Vol. 12, 1978, © Annual Reviews, Inc. engedélyével



9.12. ábra. Az interfázisos sejtmag heterokromatinja. Denevérgyomor epithelsejtje, középen a sejtmaggal. A sejtmag peremén látható sötét állomány, a heterokromatin (H)

Dr. Keith Porter engedélyével

matin viszonylag laza és kinyúlt állapotú. Ezzel ellentétben, a heterokromatin erősen kondenzált, DNS-e szinte hozzáférhetetlen, elektronmikroszkópos felvételeken rendkívül sötétnek tűnik (9.12. ábra). Heterokromatin található például a kromoszómák centromeronjainál vagy azok közelében. A centromeron DNS-e a genom nagyfokú ismétlődést mutató részéhez tartozik, szemben a struktúrgénekkel, amelyek általában egy vagy kisszámú kópiában fordulnak elő. Ez a centromeron körüli ún. **pericentrikus** DNS fehérjével alkot komplexet, erősen kondenzált, és ilyen állapotban nyilvánvalóan nem érhető el az RNS-polimeráz számára, vagyis nem íródik át.

Mindez nem jelenti azt, hogy az aránylag laza szerkezetű eukromatin automatikusan transzkripcióra is kerül, csak azért, mert fizikailag kölcsönhatásba léphet az RNS-polimerázzal. Ezzel ellentétben, egy adott sejtben az eukromatin legnagyobb része inaktív. Miért van ez így? Ez egy rendkívül fontos kérdés, hiszen ugyanazt jelenti, mintha azt vetnénk fel, mi szabályozza az eukarióta gének működését. Ebben a fejezetben megismerkedünk az általános és génspecifikus transzkripció faktorok jelentőségével. A 14. fejezetben pedig sokkal részletesebben vizsgáljuk meg ezt a kérdést.

Az eukarióta sejtekben a kromatin két formában lehet jelen. A heterokromatin erősen kondenzált és transzkripcionálisan inaktív. Az eukromatin lazább szerkezetű és potenciálisan aktív.

AZ RNS-POLIMERÁZOK ÉS SZEREPÜK

A 8. fejezetben láttuk, hogy a prokariótáknak egyetlen RNS-polimerázuk van (eltekintve a primáztól), és az szintetizálja a sejt összes RNS-féleségét. Az igaz, hogy a szigma-faktor a környezeti igényeknek megfelelően változik, de a core-enzim lényegében változatlan. Továbbá, a szabályos holoenzim képes mindhárom RNS-típus: a messenger RNS, a riboszomális RNS és a transzfer RNS szintézisére is. (Ez utóbbi két RNS-féleség a transláció folyamatában szerepel, amivel részletesen a 10. fejezetben foglalkozunk.) Az eukariótákban viszont egészen más a helyzet. Robert Roeder és William Rutter 1969-ben kimutatták, hogy az eukarióta sejtek magjában nem egy, hanem három különféle RNS-polimeráz található. Ez a három enzim különböző feladatot lát el a sejtben, mindegyik másféle RNS-t szintetizál.

Figyelemre méltó, hogy három különböző RNS-polimeráz és ugyanannyi RNS-típus (mRNS, rRNS, tRNS) létezik. A XIV. században William of Occam skolasztikus filozófus megfogalmazott egy tudományos és filozófiai alapszabályt, mely szerint, ha egy jelenségre több lehetséges magyarázat létezik, akkor a legegyszerűbbet kell választani közülük. A három polimeráz és a három RNS létére a legkézenfekvőbb magyarázat nyilvánvalóan az, hogy mindegyik polimeráz más-más RNS-t szintetizál. A valóságban is így történik: az RNS-polimeráz I a riboszomális RNS (18S, 28S és 5,8S méretű), az RNS-polimeráz II az mRNS, végül az RNS-polimeráz III a tRNS szintézisében közreműködik.

Természetesen a helyzet nem ennyire egyszerű, van néhány zavaró körülmény is! Az egyik az, hogy a háromféle RNS mindegyike nagyobb prekursor molekulaként szintetizálódik, érett formájuk utólagos átalakulás eredménye. Ezért a valóságnak inkább megfelel, ha például azt mondjuk, hogy az RNS-polimeráz I rRNS prekursorát szintetizál, és nem magát az rRNS-t. Ezenkívül átsiklottunk még egy tény fölött: az rRNS-nek létezik egy kisebb változata, az 5S rRNS, amelynek szintézisében az RNS-polimeráz III vesz részt, ugyanúgy, mint sok más kisméretű, változatos funkciójú RNS szintézisében. Az RNS-polimeráz III tehát a kisebb RNS-molekulák szintézisére specializálódott. A három RNS-polimeráz szerepét a 9.1. táblázat foglalja össze.

9.1. táblázat. Az eukarióta RNS-polimerázok szerepe

Polimeráz	RNS-termék
I	rRNS prekursorok (18S + 28S + 5,8S)
II	mRNS prekursor
III	tRNS prekursor, 5S rRNS prekursor

Az eukarióta sejtek három különböző RNS-polimeráz tartalmaznak, az RNS-polimeráz I-et, az RNS-polimeráz II-t és az RNS-polimeráz III-at. Az RNS-polimeráz I a nagy rRNS, az RNS-polimeráz II az mRNS, az RNS-polimeráz III a tRNS és az 5S rRNS prekursorait szintetizálja.

A PROMOTEREK

Mivel az eukarióták sejtmagjában három különböző RNS-polimeráz van, azt várnánk, hogy ennek megfelelően háromféle promóter létezik. Ez részben így is van, mivel az RNS-polimeráz I és II egy-egy promóter típust ismer fel, de a polimeráz III két különböző promóter osztályt használ. Ezenkívül az eukarióta RNS-polimerázok, eltérően prokarióta megfelelőiktől, nem képesek önállóan kapcsolódni saját promóterükhöz. Kötődésükhöz segédfehérjéket, **transzkripciós faktorokat** igényelnek. A transzkripciós faktoroknak két csoportjuk van: **általános transzkripciós faktorok** és **gén-specifikus transzkripciós faktorok**, más szóval **génaktivátorok**. Az általános transzkripciós faktorok a promóteren belüli DNS-szakaszokhoz kötődnek, és képesek az RNS-polimerázokat saját, megfelelő promóterükhöz juttatni, ezzel a gének átírását elindítani. Ugyanakkor a transzkripció kis sebességgel, alapszinten folyik. Ez azt jelenti, hogy az általános transzkripciós faktorok és a polimerázok önmagukban csak minimális transzkripciós szabályozást tesznek lehetővé, de a valóságban a sejtekben nagyon finoman szabályozott az átírás.

A gén-specifikus transzkripciós faktoroknak kétféle szerepük van. Először is, az általános transzkripciós faktorokkal közösen jóval az alapszint fölé emelik a transzkripció sebességét, egyes esetekben kiugróan magas intenzitás alakul ki. Ugyanakkor, bizonyos körülmények között gátolhatják is az átírást. Másodszor, lehetővé teszik a transzkripció finom szabályozását. Ez utóbbi feladatukat úgy látják el, hogy speciális, a promótertől rendszerint különböző DNS-szakaszokhoz, ún. **enhancer régiókhoz** (erősítő, fokozó) kötődnek. Ebben a fejezetben áttekintjük a promóterek különböző típusait, a háromféle RNS-polimeráz és a transzkripciós faktorok működését. Emellett megismerkedünk néhány enhancer régióval, a génaktivátorok célszekvenciáival, illetve azokkal a DNS-szakaszokkal, amelyek a transzkripciós faktorokkal együttműködve gátolják a transzkripciót.

AZ RNS-POLIMERÁZ II ÁLTAL FELISMERT PROMOTEREK

A promóterek ismertetését a polimeráz II által felismert promóterekkel kezdjük, mert ezek emlékeztetnek a legjobban a már megismert prokarióta promóterekre. Ráadásul az RNS-polimeráz II felelős a fehérjéket kódoló gének nagy többségének az átírásáért. Általában a polimeráz II promóterek egynél több elem-ből állnak.

A TATA-box

A transzkripció kezdőpontjához legközelebb, körülbelül a -30 pozíciónál, található egy A-T bázispárokban gazdag szekvencia, amely majdnem minden polimeráz II promoternak állandó eleme. Konszenzus szekvenciája TATAAAA, bár az ötödik és a hetedik pozícióban gyakran T helyettesíti az A-t. Az első négy bázis alapján a szekvencia neve **TATA-box**.

Az eukarióta TATA-box és a prokarióta -10 box között nyilvánvaló a nagyfokú hasonlóság. De figyeljük meg, mennyivel feljebb (upstream) helyezkedik el a prokarióta megfelelőjéhez képest, -30 pozícióban a -10 helyett. Ráadásul, mint minden konszenzus szekvencia esetében, vannak kivételek a szabály alól, a TATA-boxban néha G és C is lehet. A nyúl β -globin génje például citozinnal kezdődik (CATA). Esetenként egyáltalán nincs is felismerhető TATA-box.

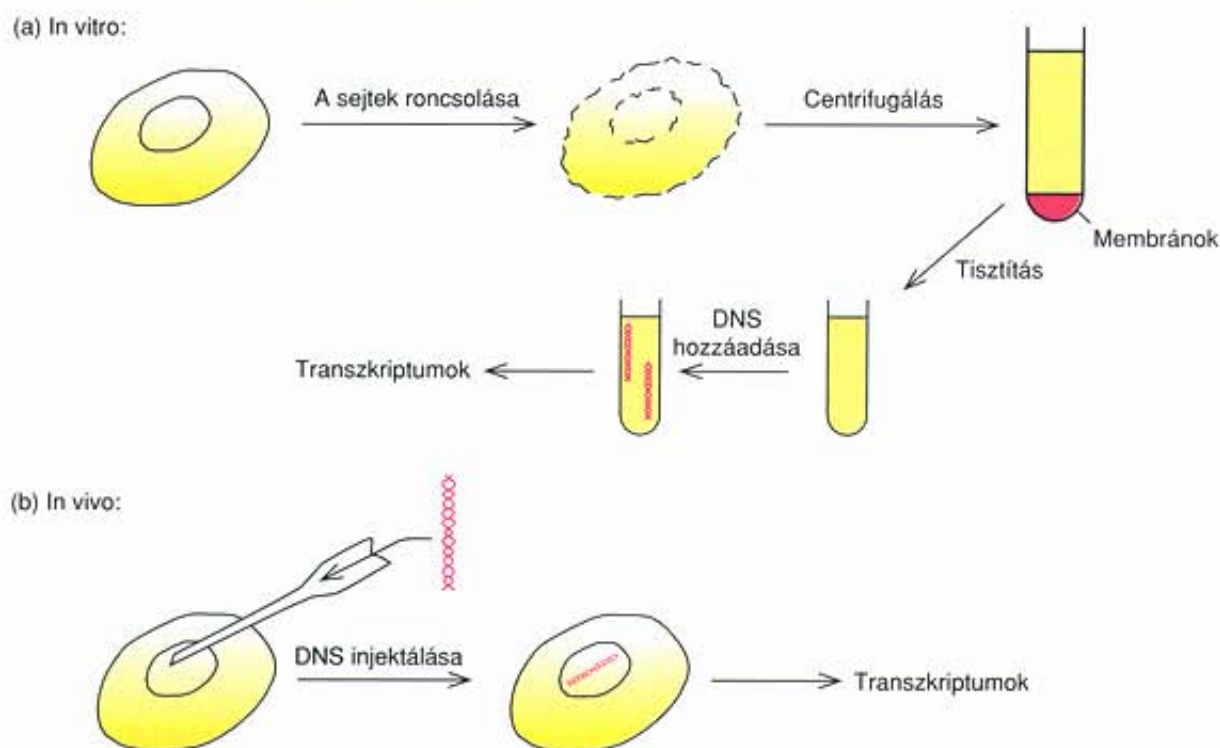
A másik állandó szekvencia a polimeráz II promotereiben nem olyan gyakori, mint a TATA-box. Rendszerint mintegy ötven bázispárral feljebb található, megközelítőleg a -75 pozíciónál. Konszenzus szekvenciája GGCCAATCT. A szekvencia a tréfas **CCAAT-box**, röviden „cat box” elnevezést kapta.

Az egyik feladat, hogy megtaláljunk egy állandó szekvenciát a transzkripció starthely felett, a másik, hogy bizonyítsuk róla, valóban a promoter részeként működik. A TATA- és a CCAAT-box esetében mindez már sikerült, a vizsgálatokban kiemelkedő szerepük volt a klónozott géneknek. A kísérleti terv lényege az volt, hogy klónozással nagy mennyiségben előállítsanak egy olyan gént, amelyet a polimeráz II ír át, majd promotereiben mutációkat indukálnak, és megfigyelik hatásukat a gén transzkripciójára. Ezek a mutációk alapvetően különböznek a természetben véletlenszerűen bekövetkező mutációktól, mert

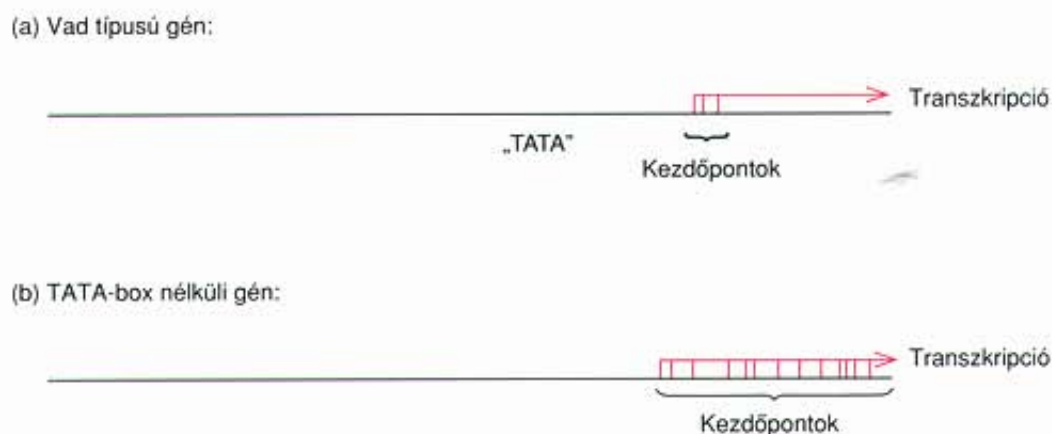
pontosan meghatározható, hogy melyik bázis és hogyan változik meg. Erre utal a folyamat neve is: irányított mutagenézis. (A módszerrel részletesebben a 15. fejezetben foglalkozunk.)

Ahhoz, hogy tesztelni tudjuk a TATA-box mutációjának hatását, hozzá kell adni a klónozott géneket (mutáns vagy vad típusút) valamilyen transzkripció rendszerhez, így megfigyelhetjük az átírásban mutatkozó különbségeket. A transzkripció rendszerek két alapvető típusa az *in vitro* és az *in vivo* rendszer (9.13. ábra). Az *in vitro* rendszer előállításához először roncsolják a sejteket, majd kémiletes tisztítással ún. sejtmentes kivonatot állítanak elő. Ez általában tartalmazza az RNS-polimerázokat és minden olyan faktort, amely a vizsgálandó DNS átírásához szükséges, feltéve, ha a DNS tartalmaz olyan promoter szekvenciát, amelyet a kivonat enzimeit felismernek. Az *in vivo* rendszerek többfélék lehetnek, de mindegyikük élő sejteket tartalmaz, azokhoz adják a vizsgálandó DNS-t. A következő lépés, hogy valamilyen módszerrel meghatározzák, hogy a vizsgált DNS átíródott-e vagy sem.

A TATA-boxban mutációkat tartalmazó gének első vizsgálataiban meglepő dolog történt. A várakozásokkal ellentétben, a transzkripció megszűnése helyett ezekben a génekben a TATA-box mutációi növelték a különböző transzkripció kezdőhelyek számát. A 9.14. ábra Pierre Chambon és munkatársainak az eredményeit mutatja azokban a kísérletekben, amelyeket az SV40 tumorvírus korai promotereinek TATA-box mutánsaival végeztek, *in vitro* transzkripció rendszerben. Míg a vad típusú DNS-en három, szorosan egymás mellett elhelyezkedő transzkripció kezdőponttól indult az átírás, addig a TATA-box nélküli mutánsban több mint húsz különböző pontból.



9.13. ábra. *In vitro* és *in vivo* transzkripció rendszerek. (a) Az *in vitro* rendszerben roncsolt sejtekből készült kivonat található. (b) Az *in vivo* rendszer ép sejteket tartalmaz. Az idegen DNS-t (piros) mindkét esetben mesterségesen juttatják a rendszerbe, majd mérik transzkripcióját



9.14. ábra. A TATA-box hatása a transzkripció iniciációjára. (a) A vad típusú SV40 korai génje egy TATA-boxot tartalmaz. Az átírás három szorosan kapcsolódó helyről indul. (b) A TATA-boxot nem tartalmazó mutánsban nagyszámú transzkripciós kezdőpont figyelhető meg

Ugyanakkor, bizonyos génekben (például a nyúl β -globin génjében) a TATA-box mutációja nem változtatta meg a transzkripciós kezdőhelyet. Ehelyett jelentősen lecsökkent a transzkripció hatékonysága. Mindez arra utal, hogy a TATA-box a különböző promoterekben más-más szerepet játszik.

Upstream promoter elemek

Számos génben hasonló módszerekkel vizsgálták a TATA-box-tól felfelé (upstream) elhelyezkedő szekvenciák eltávolításának vagy módosításának hatását. Úgy tűnik, hogy a CCAAT-box például a promoter aktivitását befolyásolja. Ha a CCAAT-boxot eltávolítják a nyúl β -globin génjének promoteréből, a promoter elveszti aktivitásának legnagyobb részét. Hasonló szerepe van a CCAAT-boxnak a herpes simplex vírus (HSV) timidin kináz génjének promoterében is. Az SV40 vírus korai promotere szintén tartalmaz egy fontos upstream szakaszt: a CCAAT-box helyett háromszoros ismétlésben egy 21 bázispárnyi szekvenciát, a -40 és a -103 pozíciók között, éppen a TATA-box felett. Minden ilyen 21 bázispárnyi szakasz a **GC-box** két kópiáját tartalmazza, GGGCGG szekvenciával a néma szállban. A HSV timidin kináz promoterében szintén található GC-boxok, a CCAAT-box mindkét oldalán egy-egy. (A herpes simplex vírusok embernél a szájüreg és az ivarszervek herpeszes fertőzést okozzák.)

Az RNS-polimeráz II által felismert promoterekre általánosan jellemző, hogy a transzkripciós kezdőpont közelében tartalmaznak egy TATA-boxot, és legalább még egy fontos elemet attól felfelé (upstream). A fejezet későbbi részében látjuk majd, hogy ezek az elemek kötőhelyei azoknak a transzkripciós faktoroknak, amelyek aktiválják a hozzájuk csatlakozó géneket.

Számos eukarióta gén tartalmaz további upstream elemeket a határoló régiókban (vagy magukban a génekben), amelyek kulcsfontosságúak az aktív transzkripcióban. Ezek az enhancer, azaz erősítő régiók nem szigorúan a promoterek részei. (A fejezet későbbi részében még részletesebben foglalkozunk velük.) A 9.15.(a) és 9.15.(b) ábra az SV40 korai génjének, illetve a HSV timidin kináz génjének promoter elemeit szemlélteti. A 9.15.(c)

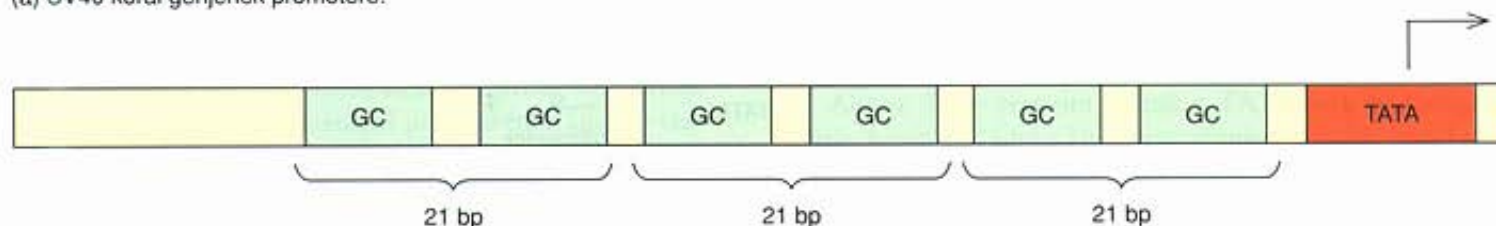
ábra egy jellemző génstruktúrát mutat be, beleértve a promotert és az enhancer régiót is, amelyet az RNS-polimeráz II felismer.

Az RNS-polimeráz II által felismert eukarióta promotereknek legalább egy közös vonásuk van: a transzkripciós kezdőpont előtt körülbelül 30 bázispárral egy konszenzus szekvenciát, TATA-boxot tartalmaznak. Rendszerint a TATA-box határozza meg a transzkripciós kezdőpontját (mintegy 30 bázispárral lefelé – downstream). A legtöbb polimeráz II promoter további fontos szekvenciákat tartalmaz a TATA-box felett (upstream), ilyen például a CCAAT- és a GC-box.

AZ RNS-POLIMERÁZ I ÁLTAL FELISMERT PROMOTEREK

Több kutatócsoport is kereste az RNS-polimeráz I promotereinek állandó szekvenciáit, és irányított mutagenezissel próbálta tisztázni jellemzőit. A promoter itt egyes számban szerepel, mert minden fajnak csak egy olyan géntípusa van, amelyet az RNS-polimeráz I felismer, nevezetesen az rRNS prekursor génje. Igaz, hogy ez a gén több száz példányban szerepel minden sejtben, de valójában mindegyik kópiájuk azonos, beleértve promoter szekvenciájukat is. Robert Tjian és munkatársai a humán rRNS promotereinek két fontos régióját azonosították mutagenezis segítségével (9.16. ábra). Egyszerre 10 bázispárt helyettesítettek benne idegen DNS-sel, és megfigyelték a helyettesítések hatását a transzkripció hatékonyságára. Azt találták, hogy a hatékony transzkripcióhoz szükséges egy **központi (core) elem** a -45 és a $+20$ pozíciók között, valamint egy **upstream kontroll elem (UCE)** a -156 és -107 helyek között. Ezek a DNS-szakaszok csak annyiban hasonlóak a polimeráz II promotereihez, hogy a gén 5' határoló régiójában található (azaz, a transzkripciós kezdőhely felett). Bázissorrendjük egyáltalán nem emlékeztet a TATA-, a GC- vagy a CCAAT-boxokéra. (Az 5'-vég egy gén-

(a) SV40 korai génjének promotere:



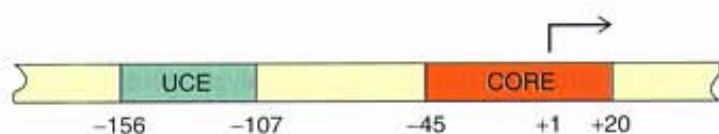
(b) Herpes simplex vírus timidin kináz génjének promotere:



(c) Az RNS-polimeráz II jellemző promotere + enhancer:



9.15. ábra. Az RNS-polimeráz II által felismert promoterek szerkezete. (a) Az SV40 korai génjének promotere egy TATA-boxot (piros) és egy upstream kontroll elemet tartalmaz, amely három 21 bp hosszú ismétlődő egységből áll. Mindegyik ismétlődésben két 6 bázisnyi GC-box (zöld) van. (b) A HSV timidin kináz génjének promoterében egy TATA-box (piros), valamint három upstream kontroll elem található: két GC-box (zöld) és egy CCAAT-box (lila). (c) Az RNS-polimeráz II jellemző promotere egy TATA-boxból és legalább egy upstream kontroll elemből áll. Emellett rendszerint egy enhancer régió (kék) is csatlakozik hozzá, többnyire a promoter felett (upstream)



9.16. ábra. Az ember rRNS génjének promotere. A hatékony transzkripcióhoz két szakasz fontos, egy központi, core elem és egy felső szabályozó elem (UCE)

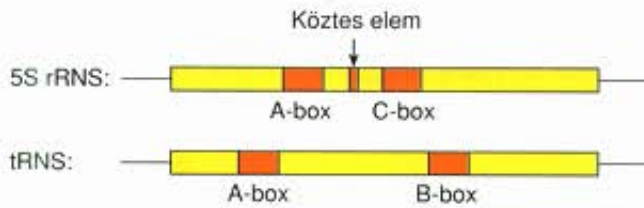
nek az a pontja, ahonnan a transzkripció indul. Ez a néma szál 5'-végét jelenti és egyben a transzkriptum 5'-végét is.)

Az RNS-polimeráz I által felismert promoter, a polimeráz II promoterjéhez hasonlóan, szintén a gén (rRNS prekurzorának génje) 5' határoló régiójában van. A hatékony transzkripcióhoz két DNS-szakasz, egy központi (core) elem és egy upstream kontroll elem (UCE) szükséges.

A POLIMERÁZ III PROMOTEREI

A polimeráz III promoterei, amelyek az 5S rRNS és a tRNS gének szabályozó szakaszai, gyökeresen eltérnek az RNS-polimeráz I és II, valamint a bakteriális RNS-polimeráz promotereitől. Elemei nem az 5' határoló régióban helyezkednek el, mint minden más promoter esetében, hanem az általuk vezérelt gén belsőjében.

Erre a meglepő következtetésre elsőként Donald Brown és munkatársai jutottak a *Xenopus* 5S rRNS klónozott génjével végzett kísérleteikben. Munkájuk során mutációkat indukáltak az 5S rRNS génjében, és *in vitro* transzkripció rendszerben vizsgálták a mutációk hatását. A transzkripció eredményességét a transzkriptum méretének gélelektroforetikus vizsgálatával határozták meg. A megközelítőleg 120 bázisnyi RNS-t (az 5S RNS mérete) tekintették pontos transzkriptumnak, még akkor is, ha szekvenciája nem egyezett meg teljesen a valódi 5S rRNS-ével. A transzkriptum nem egészen pontos bázissorrendje a következő megfontolásból elfogadható: a gén belső



9.17. ábra. Az RNS-polimeráz III promoterek jellegzetességei. A promotereket, másként belső szabályozó régiókat (ICR) piros négyzetek jelölik az általuk vezérelt gén belsejében

szekvenciájának megváltoztatása azért, hogy megszakítsuk a promotert, automatikusan módosítja a transzkriptum bázissorrendjét is.

Az eredmény meglepő volt: a teljes 5' határoló régió eltávolítása nem befolyásolta lényegesen az átírást. Ráadásul, a gén nagyobb szakaszainak kihasítása, vagy éppen ellenkezőleg, tekintélyes méretű DNS-darabok beépítése ellenére a 120 bázisnyi transzkriptum elkészült. A génnek egyetlen érzékeny szakasza volt, az átírt szekvencia 50-edik és 83-adik bázisa között, amelynek módosítása a promoter funkció elvesztésével járt. A *Xenopus* 5S génjében ez a promoter, más szóval a **belső kontroll régió (ICR)** helye.

Egy sokkal részletesebb vizsgálat kimutatta, hogy az 5S rRNS promotere két nagyobb szakaszra, az ún. **A-boxra** és a **C-boxra**, valamint a kettő közötti rövid szekvenciára, a **köztes elemre** (ICR) osztható. A 9.17. ábrán foglaltuk össze a fenti kísérlet és a tRNS génekkel végzett hasonló vizsgálatok eredményeit. A tRNS gének promoterei még inkább tagoltak, mint az 5S rRNS-é. Ezek belső kontroll régiójában is megtalálható az A-box, de hiányzik belőlük a köztes elem (ICR) és C-box. Ez utóbbi helyett egy B-box van bennük. A két rész közötti távolság bizonyos mértékig módosítható a promoter működésének változása nélkül, de ha túl hosszú szakaszt építenek be az A- és a B-box közé, az átírás hatékonysága csökken.

Az 5S rRNS és a tRNS gének klasszikus polimeráz III gének. A polimeráz III más, kisméretű RNS-t kódoló géneket is átír, így például a 7SL RNS génjét. De különösen ezeknek a nem tipikus géneknek nincs belső szabályozó régiójuk, promoterük a gén 5' határoló régiójában található.

Az RNS-polimeráz III egy sor kisméretű gént átír, köztük az 5S rRNS és a tRNS-ek génjeit. A klasszikus polimeráz III gének promotere a vezérelt génben található belső kontroll régióból (ICR) áll. Az 5S RNS három részre tagoló belső szabályozó régiója az átírási szakasz 50-edik és 83-adik bázisa között van. A tRNS gének belső kontroll régiója két részre oszlik. A nem tipikus polimeráz III gének (pl. 7SL RNS) promotere az 5' határoló részben található.

A TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSA

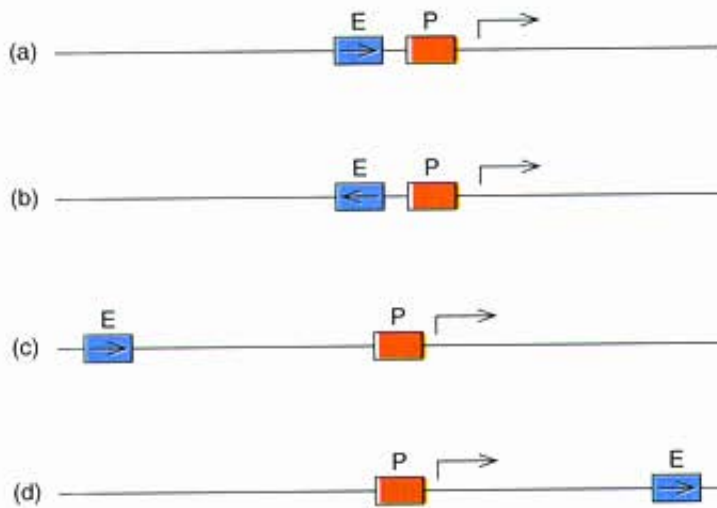
A 8. fejezetben szó volt arról, hogy a génműködés szabályozása a baktériumokban létfontosságú, hiszen ha minden génjük egyszerre működne, az jóval több energiát emésztene fel, mint amennyit a sejt biztosítani tud. Ez az állítás még inkább igaz az eukarióta szervezetekre. Kezdjük azzal, hogy az eukarióta sejtekben sokkal több gén van, ráadásul, a magasabb rendű eukarióták bonyolult szerveikkel és sejteikkel jóval specializáltabbak. A különböző szövetek sejtei eltérő működésűek, mert más-más gének működnek bennük, ahogyan azt a 14. fejezetben még részletezzük. Ezek a bonyolult szervezetek nem alakulhattak volna ki szabályozott génműködés hiányában.

Már láttuk, hogy a baktériumok génműködésének szabályozása elsősorban a transzkripció szintjén történik. Általánosan jellemző, hogy azok a gének, amelyek termékeire a sejtnek nincs szüksége, nem íródnak át. Ez az általánosítás az eukariótákra is igaz, bár vannak kivételek. Az eukarióta génműködés szabályozásának leglényegesebb pontja a transzkripció iniciációja, ezért nagyon fontos annak ismerete, hogy mi eredményezi az iniciációt. A következőkben bemutatjuk, hogy sok promoter jellegzetes, *asz*-hatású DNS-szakaszokkal, ún. erősítő vagy enhancer régiókkal áll kapcsolatban, amelyek nagymértékben fokozzák az átírást. Néhány promoter pedig negatív szabályozó elemekkel, ún. csillapító vagy silencer régiókkal kapcsolt. Mindezek felül az eukarióta gének transzkripciója nem csak az RNS-polimeráztól függ, hanem egy sor *transz*-hatású fehérjétől, ún. transzkripciós faktortól is, amelyek kapcsolatot teremtenek a promoterekkel és az erősítő szekvenciákkal.

ERŐSÍTŐ ÉS CSILLAPÍTÓ SZEKVENCIÁK

Azok a kezdeti irányított mutagenézis kísérletek, amelyeket a polimeráz II promoterein végeztek, rávilágítottak az 5' határoló régiók nagyon fontos területeire, a TATA-box és a már tárgyalt upstream szabályozó elemek mellett. Az upstream szekvenciák egyik legtöbbet tanulmányozott eleme egy **72-bázispárnyi ismétlődő szekvencia** az SV40 tumorvírus korai génjének régiójában. Az SV40 korai régiója egy **T-antigén** nevű fehérjét kódol, amely szükséges a vírus-DNS szintéziséhez, valamint a normál sejt malignus transzformációjához. Más szóval, a korai régió teszi az SV40 vírust rákkeltő, tumorvírussá. A 72 bp ismétlődő szekvencia az SV40 korai régiójának 5' határoló szakaszában, közvetlenül a három 21 bp ismétlődő szekvencia fölött található.

A 72 bp ismétlődő szekvencia nevének megfelelően egy 72 bázispár hosszú szakasz egymást követő duplikációja. Amikor ezt az elemet eltávolították az SV40 korai régiójából, a transzkripció jelentősen lecsökkent. Pontosán ez várható egy promoter alkotórészétől, de akkor miért nem említettük ezt a szakaszt a polimeráz II promotereinek tárgyalásánál? Azért, mert ennek a DNS-elemnek két olyan jellegzetessége is van, amely egyáltalán nem jellemző a promoterekre. Először is, akár több ezer bázispár távolságra elmozdítható az SV40 korai promotereinek közeléből – akár az elé vagy a mögé –, mégis fokozza az átírást (9.18. ábra). Másodsor, megfordítható anélkül, hogy hatását elveszítené. Ezért a 72 bp ismétlődést és a hasonló tulajdonságú eleme-



9.18. ábra. Az enhancer régiók működése független az orientációtól és a pozíciótól. (a) Jellemző (vad típusú) kapcsolat egy tipikus enhancer régió (kék) és promotere (piros) között. (b) Az enhancer orientációját megváltoztatták. (c) Az enhancer régiót néhány ezer bázispárral a promotor fölé (upstream) helyezték. (d) Az enhancer régiót néhány ezer bázispárral a promotor alá (downstream) helyezték. Az enhancer mind a négy esetben szabályosan működött

ket az **enhancer** (erősítő) szekvenciák közé soroljuk, amelyek stimulálják a promoterektől kiinduló átírást, de maguk nem részei a promotereknek. A promotor elnevezés ugyanis azokra az elemekre vonatkozik, amelyek térbeli kapcsolata viszonylag állandó az általuk kontrollált génnel.

Sokféle génnel összefüggésben találtak enhancer szekvenciákat – eukariótákban és vírusaikban, illetve mindhárom RNS-polimeráz által átírt génekben. Az enhancer szekvenciák rendszerint szövetspecifikusak, vagyis egy gén és egy adott enhancer csak bizonyos sejttípusokban működőképes. Például az egér immunoglobulin enhancer szekvenciája csak azokban a sejtekben fejtheti ki hatását, amelyekben az immunoglobulin gének működnek (az immunrendszer sejteiben), más kötőszöveti sejtekben nem. A szövetspecifitás annak a következménye, hogy az enhancer szekvenciák transzkripció faktoroktól függenek, és ezek a faktorok csak bizonyos szövetekben képződnek. Egyes enhancer régiókban közös szekvenciák figyelhetők meg, de ezek nem minden enhancerre jellemző, valódi konszenzus szekvenciák.

Bizonyos esetekben a transzkripció faktorok inkább gátolják, mint serkentik az átírást. Az ember pajzsmirigy hormonjának receptora a hormon jelenlétében serkenti a transzkripciót. De hormonhiány esetén, ugyanahhoz az enhancerhez kötődik, és gátolja az átírást.

Az enhancer szekvenciák mellett vannak más DNS-elemek is, amelyek a géntől bizonyos távolságra is kifejthetik hatásukat a gén átírására. Ilyenek a **silencer** (csillapító) szekvenciák is, amelyek gátolják a transzkripciót. Jó példa erre az élesztő ivaros szaporodási rendszere, a *MAT* (mating system). Az élesztő III. kromoszómáján van három, nagyon hasonló bázisszekvenciájú gén, a *MAT*, a *HML* és a *HMR*. Mialatt a *MAT* működik, a másik kettő nem. Az inaktív állapotért pedig a legalább 1 kb távolságra lévő silencer szekvenciák felelősek. Tudjuk, hogy a hiba az inaktív géneken kívül van, mivel ha aktív élesztőgénnel helyettesítjük a *HML* vagy *HMR* lokuszokat, a transzplantált gének is inaktívvá válnak. Mind-

ez tehát valamilyen külső negatív hatást valószínűsít. Hogyan működnek a silencer szekvenciák? Annyit már tudunk róluk, hogy olyan speciális fehérjéktől függenek, amelyek a silencer DNS-hez kötődnek, és valamilyen módon represszálják a környező géneket. A represszió pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen.

Az enhancer szekvenciák olyan DNS-elemek, amelyek jelentősen fokozzák a velük kapcsolatban álló eukarióta promoterektől kiinduló transzkripciót. Abban különböznek a promotor elemektől, hogy mindkét orientációban működőképesek, és a génektől bizonyos távolságra is kifejthetik szabályozó hatásukat. A silencer szekvenciák szintén távolról hatnak, de gátolják az átírást.

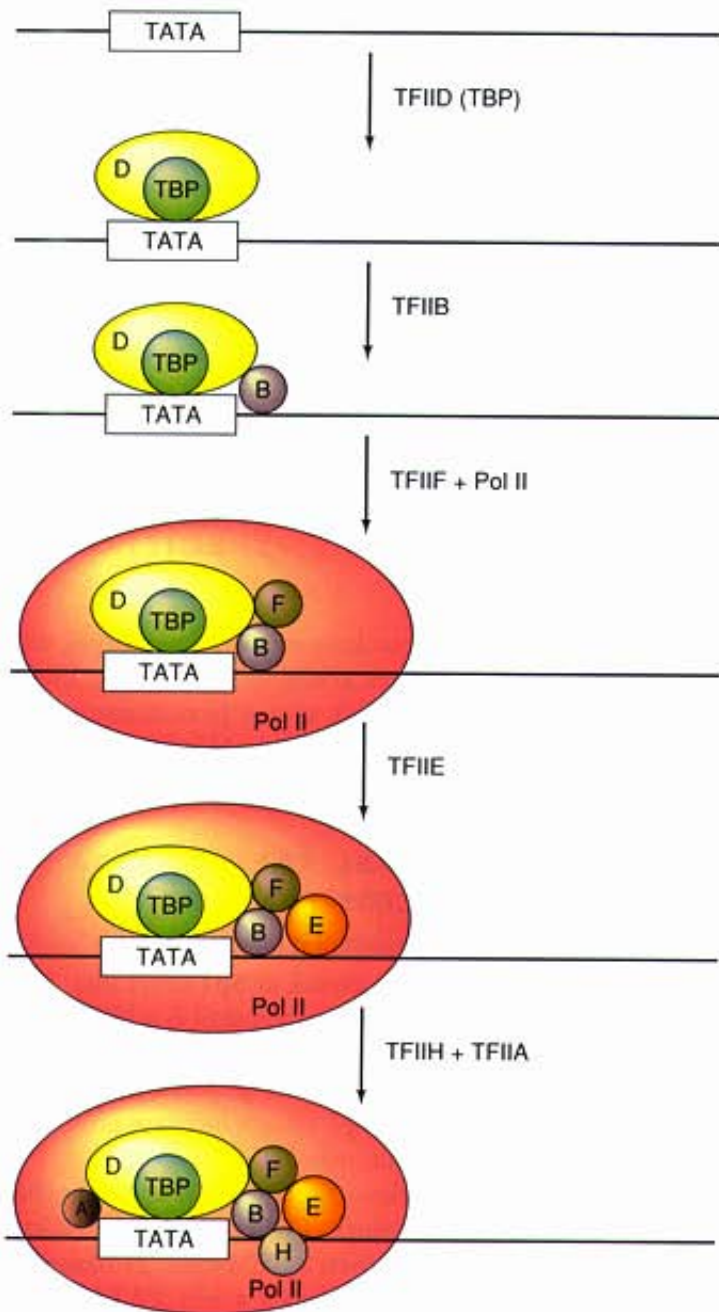
AZ RNS-POLIMERÁZ II TRANZKRIPCIÓS FAKTORAI

Az RNS-polimeráz II által felismert promoterek nagyfokú változossága alapján várható, hogy hasonlóan változatosak az RNS-polimeráz II transzkripció faktorai is. A polimeráz II transzkripció faktorai, röviden II faktorok, két csoportra oszthatók. Az általános transzkripció faktorok a legtöbb, de valószínűleg mindegyik polimeráz II-re specifikus gén átírásában szerepelnek. Specifitásuk meglehetősen tág, ami alapján megjósolható, hogy a legtöbb polimeráz II promotorban megtalálható elemmel (pl. TATA-box) lépnek kölcsönhatásba, esetleg más faktorokkal, vagy magával az RNS-polimeráz II-vel. A polimeráz II-vel kooperáló általános transzkripció faktorok, a **TFIIA**, a **TFIIB**, a **TFIID**, a **TFIIE**, a **TFIIF** és a **TFIIH** (a „TFII” a transzkripció faktor a polimeráz II számára rövidítése).

A felsorolt faktorok közül a TFIID-t tanulmányozták a legalaposabban. A magasabb rendű eukariótákban, köztük az emlősökben, ez a faktor több polipeptid alegységből áll, legfontosabb közülük a **TATA-box kötő fehérje**, röviden **TBP**. A TFIID többi alegységét **TBP-hez asszociált faktorok** (TAF) néven foglalják össze. A TBP kapcsolódik a TATA-boxhoz, és magával viszi többi alegységét is. A TFIID kötődése kiindulópontja a többi transzkripció faktor elrendeződésének a promotor körül. A faktorok kötődési sorrendje a következő: D, B, F + polimeráz II, E és H. Úgy tűnik, a TFIIA bármikor kapcsolódhat. A TFIIF és a polimeráz II viszont egyszerre kötődnek, mivel a TFIIF feladata éppen az, hogy a növekvő komplexhez szállítsa a polimeráz II-t. A promotor a hozzákapcsolódó polimeráz II-vel és az összes faktorialtal alkotja a polimeráz II **preiniciációs komplexet** (9.19. ábra), amelynek kialakulása az átírás iniciációjának előfeltétele.

Mi a helyzet azokkal a promoterekkel, amelyekben nincsen TATA-box? Ezeknek az átírásában is kulcsfontosságú a TFIID, és minden bizonnyal ugyanolyan szervező funkciót tölt be. De TATA-box hiányában DNS-hez való kötődését más faktorok is segítik.

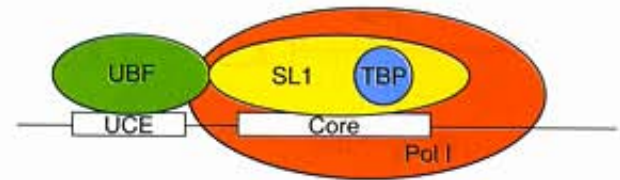
Az általános transzkripció faktorok mellett változatos génspecifikus transzkripció faktorok is léteznek. Vannak közöttük olyanok, amelyek a GC- vagy a CCAAT-boxhoz kötődnek, és sok emlősfaj promotorében megtalálhatók. Mások sokkal specifikusabb elemekhez kötődnek, például az enhancer régiókhoz. Ezek a poli-



9.19. ábra. A polimeráz II preiniciációs komplex szerveződése. A transzkripció faktorok méretaránya nem feltétlenül pontos, elrendezésük hipotetikus. A TFIIA korábban is bekötődhet

meráz II-re specifikus gének egy kisebb csoportjára jellemzőek. A specifikus faktorokra a fejezet későbbi részében még visszatérünk.

Az RNS-polimeráz II működését legalább hat általános transzkripció faktor segíti, a TFIIA, B, D, E, F és H, valamint egyéb génspecifikus transzkripció faktorok. Ez utóbbiak többsége bizonyos gének enhancer régióhoz kapcsolódik. A TFIID egyik eleme a TATA-box kötő fehérje (TBP), amely a promoter TATA-boxához kapcsolódva kiindulópontja az ún. preiniciációs komplex szerveződésének.



9.20. ábra. A polimeráz I preiniciációs komplex szerkezete. Az rRNS-gén promoterének két részét (UCE és core) fehér négyzetek jelzik

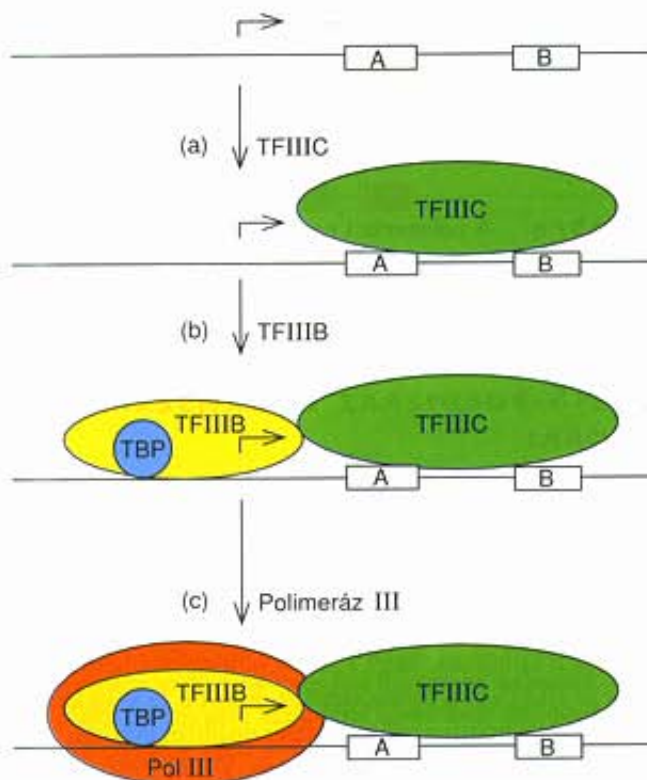
AZ RNS-POLIMERÁZ I TRANZKRIPCIÓS FAKTORAI

Az rRNS promoterénél kialakuló preiniciációs komplex sokkal egyszerűbb a polimeráz II preiniciációs komplexénél. Az RNS-polimeráz I mellett mindössze két transzkripció faktor szerepel benne, az **SL1** és a promoter **felső (upstream) szakaszához kötődő faktor**, az **UBF**. Az SL1-et Robert Tjian fedezte fel 1985-ben, aki azt is kimutatta, hogy a faktor önmagában nem képes kapcsolódni az rRNS gén promoteréhez. Később az is kiderült, hogy a tisztított RNS-polimeráz I sem képes önállóan kötődni a promoterhez, sőt még az SL1 segítségével sem. Végül 1988-ban Tjian és munkatársai kimutatták, hogy egy másik faktor, az UBF kapcsolódik elsőként a promoter upstream kontroll régiójához (UCE), és ennek következménye a polimeráz I kötődése a transzkripció kezdőpont közelébe. Amikor az UBF már kötődött, az SL1 is kapcsolódhat a komplexhez, és erősíti a polimeráz I kötődését, ezzel a preiniciációs komplex kialakulását. Érdekes, hogy az SL1 annyiban hasonlít a TFIID-hez, hogy tartalmaz TATA-box kötő fehérjét (TBP), bár az rRNS-gének promoteriben nincs TATA-box. Ráadásul, a TBP mellett az SL1-ben három TAF is szerepel, de ezek nem azonosak a TFIID segédfaktoraival. A polimeráz I preiniciációs komplexének vázlata a 9.20. ábrán látható.

A polimeráz I preiniciációs komplexben az RNS-polimeráz I mellett két transzkripció faktor szerepel. Az upstream kontroll régióhoz (UCE) kötődő faktor, az UBF biztosítja az RNS-polimeráz I kapcsolódását a promoter központi részéhez (core), a transzkripció kezdőpont közelébe. A polimeráz kötődését az SL1, egy TBP-tartalmú faktor erősíti.

Az RNS-polimeráz III transzkripció faktorok

Donald Brown, illetve Robert Roeder kutatócsoportja egymástól függetlenül dolgoztak azon, hogy kiderítsék, milyen transzkripció faktorok működnek együtt az RNS-polimeráz III-mal az 5S rRNS és a tRNS gének transzkripciójában. Az 5S rRNS átírásában három faktor szerepel, a TFIIIA, a TFIIIB és a TFIIIC. Közülük kettő, a TFIIIB és C a tRNS-ek átírásában is közreműködik. Ma már bizonyos, hogy az RNS-polimeráz III valódi transzkripció iniciációs faktora a TFIIIB. A másik két faktor elősegíti a TFIIIB kötődését a DNS megfelelő helyére, valamivel a transzkripció kezdőpont fölé. Ezt követően a TFIIIB lehetővé teszi az RNS-polimeráz III kap-



9.21. ábra. A polimeráz III preiniciációs komplex kialakulásának feltételezett útja egy klasszikus polimeráz III promoter (tRNS) esetében. (a) A TFIIC (zöld) a génen belüli promoter A- és B-boxához kapcsolódik. (b) A TFIIC elősegíti a TBP-t (kék) tartalmazó TFIIB (sárga) kötődését a transzkripció kezdőpont fölött. (c) A TFIIB elősegíti a polimeráz III (piros) kötődését a kezdőponthoz, ezzel kezdetét veheti az átírás

csolódását kissé lejjebb, egy olyan pozícióba, ahonnan elkezdődhet az átírás. A három faktor így módon egy kötődési kaszkád részese.

Először a TFIIA és C (az 5S rRNS esetében), illetve egyedül a TFIIC (a tRNS-gének esetében) kötődik a belső promoterhez, majd fehérje-fehérje kölcsönhatás révén lehetővé válik a TFIIB kapcsolódása is a transzkripció kezdőhely közelébe. Ezután a TFIIB megfelelő pozícióba állítja az RNS-polimeráz III-at a kezdőhelyen. A 9.21. ábra a tRNS promoterén mutatja be az egyes lépéseket. A folyamat hasonlít a polimeráz I iniciációs komplexnél látottakhoz (9.20. ábra), de ez esetben a TFIIB játszik ugyanolyan szerepet, mint az SL1 az RNS-polimeráz I kötődésénél. A TFIIA és C, illetve önállóan a TFIIC működése megfelel az UBF-ének. A TFIIB és az SL1 hasonló funkciója nem meglepő, hiszen mindkettőben megtalálható a TATA-box kötő fehérje. A polimeráz I promoterekhez hasonlóan, a polimeráz III klasszikus promoterei sem tartalmaznak TATA-boxot.

Most már láttunk példákat arra, hogy a TATA-boxot nem tartalmazó promotereket mindhárom polimeráz felismerheti. De mindegyik esetben szerepelt a folyamatban egy TBP-tartalmú faktor, az SL1, a TFIID és a TFIIB. Minthogy mind a három faktorban ugyanaz a TBP található, ennek ellenére másféle promotert ismernek fel, a specificitást a faktorok járulékos fehérjéinek – TAF – kell biztosítaniuk. Ugyancsak minden esetben szükség van az összeszerelődést szervező faktorokra, az UBF-re (polimeráz I), a TFIIA-ra és C-re vagy

önállóan a TFIIC-re (polimeráz III). A TATA-boxot nem tartalmazó polimeráz II promoterek esetében egy egész sor ilyen fehérje van, melyek közül az Sp1-gyel a fejezet következő részében foglalkozunk.

A klasszikus polimeráz III promoterek kétféle általános transzkripció faktorral működnek. Egyrészt az összerakó faktorokkal: TFIIA és C (5S rRNS gének), illetve önállóan a TFIIC (tRNS gének). Másrészt egy iniciációs faktorral, a TFIIB-vel, amely az átíráshoz megfelelő pozícióba igazítja a polimeráz III-at.

A POLIMERÁZ II GÉNSPECIFIKUS TRANSZKRIPCIÓS FAKTORAI

Az általános transzkripció faktorokat a génspecifikus faktorok változatos csoportjai egészítik ki. Ezek között vannak olyanok, amelyek sokféle sejt típus, köztük az emlősök számos promoterére jellemző GC-, illetve CCAAT-boxokhoz kötődnek. Más faktorok egy-egy kisebb géncsoport enhancer szekvenciáival lépnek kölcsönhatásba.

PROMOTER ELEMekkel KAPCSOLATBA LÉPŐ TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK

Robert Tjian emberi tumorsejtekből (HeLa-sejtek, l. 9.1. melléklet) izolált egy fehérjefaktort, amelynek az Sp1 nevet adta. A faktor erősen fokozza az SV40 korai promoterétől és a HSV timidin kináz promoterétől kiinduló átírást, ugyanakkor lassítja egy másik emberi vírus, az adenovírus egyik késői génjének transzkripcióját. Ez tehát azt jelenti, hogy az Sp1 válogat bizonyos promoterek között, egyesek átírását serkenti, másokét gátolja.

Az Sp1 aktivitásának kulcsa az, hogy képes kötődni néhány promoter 5' határoló régiójának GC-boxaihoz. Már láttuk, hogy az SV40 korai promoterében a GC-boxok 21 bázispárnyi ismétlődő szekvenciákban vannak jelen a gén TATA-boxa és enhancere között (l. 9.15. ábra). A GC-boxok közötti távolság majdnem pontosan két teljes fordulata a DNS kettős hélixének, így a kötésben levő Sp1 faktorok a DNS-molekulának ugyanarra az oldalára kerülnek. Az Sp1 egyenként kötődhet minden egyes GC-boxhoz, de mivel néhány hely kissé közel kerül egymáshoz, a hat közül csak ötöt fednek le eredményesen.

A HSV timidin kináz promoterében és más promoterekben levő CCAAT-boxok saját transzkripció faktorral, az ún. CCAAT-box transzkripció faktorral (CTF) rendelkeznek. A 9.22. ábra két részletesen tanulmányozott polimeráz II promoter (az SV40 korai és a HSV timidin kináz promoter) és transzkripció faktorai kölcsönhatását szemlélteti.

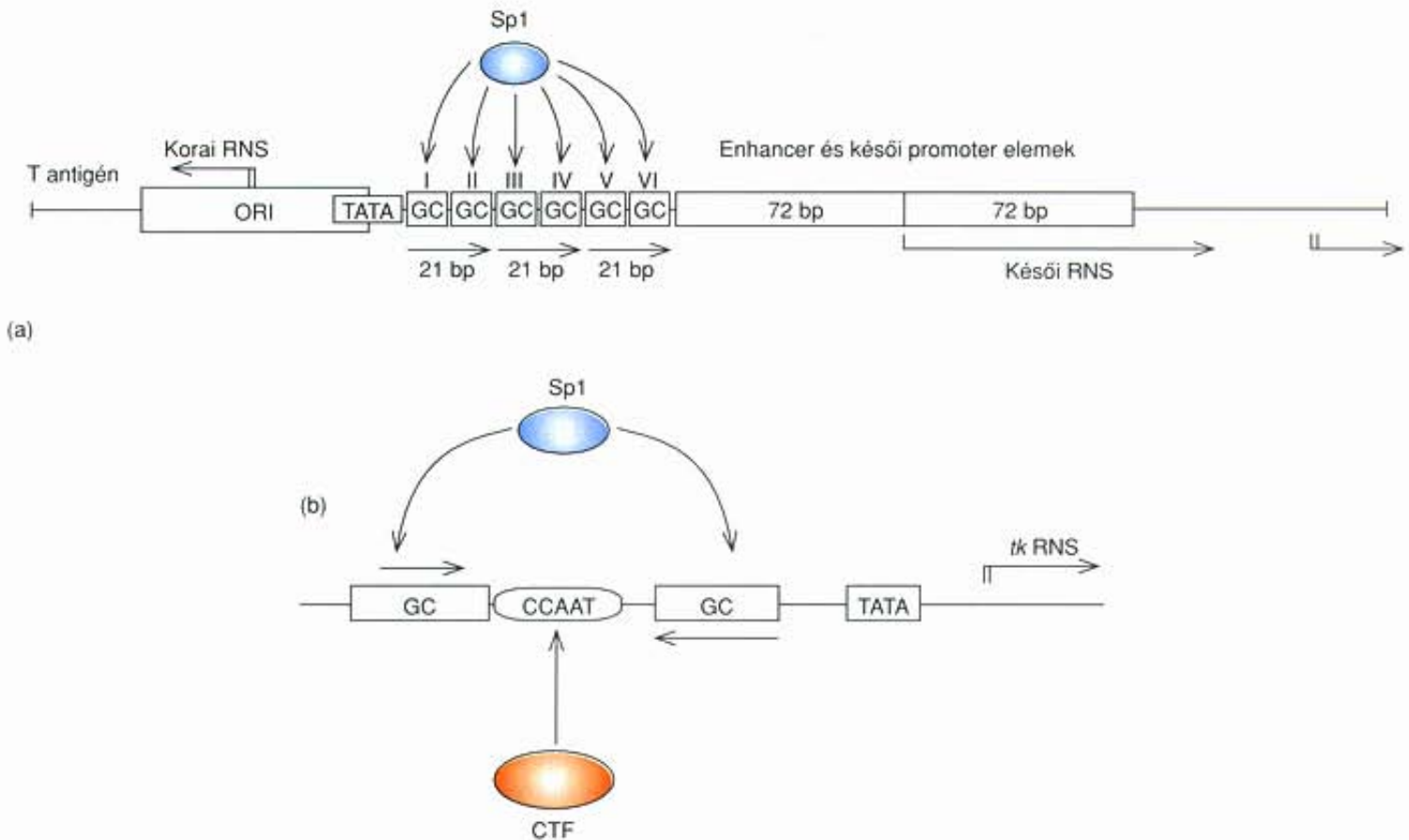
ENHANCER RÉGIÓKKAL KAPCSOLATBA LÉPŐ TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK

Az enhancer régiókhöz kötődő transzkripció faktorok sokkal specifikusabbak, mint az Sp1 vagy a CTF, hiszen egy

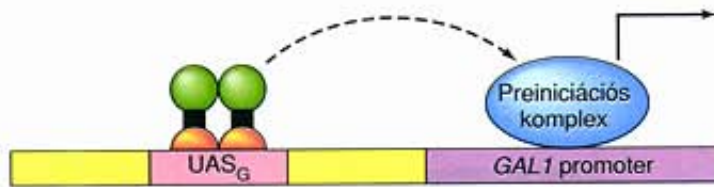
9.1. HeLa-sejtek

Amikor valaki először olvassa a *HeLa*-sejt kifejezést, azt gondolhatja, tévesen írták le a szót. Nem kisbetűvel kellett volna írni az L betűt? Nem, ez így helyes, a nagy *H* és *L* egy hölgy, Henrietta Lacks nevére utal, róla nevezték el ezeket a sejteket. 1952-ben George Gey a Johns Hopkins Egyetemen emberi ráksejteket próbált mesterségesen tenyészteni. Ez mindaddig senkinek sem sikerült, de Gey fáradozása eredményesnek bizonyult, amikor rákos méhnyaksejtekkel próbálkozott szérumalvadékon. A mesterséges tenyésztetben fenntartott sejtek Henrietta Lacks tumorából származtak, ezért jelölte meg a tenyészetet Gey a HeLa azonosítóval. Miss Lacks nem

sokkal ezután belehalt betegségébe, de bizonyos értelemben mégis halhatatlanságra tett szert, hiszen sejteit mind a mai napig tenyésztik világszerte a laboratóriumokban. A molekuláris genetikai kutatásokhoz ez az egyik leggyakrabban használt emberi sejtvonal. Annyira könnyen fenntartható, hogy néhányan véletlenül tenyésztették. Előfordult, hogy más sejtenyészetek *HeLa*-sejtekkel fertőződtek, amelyek túlnőtték a tenyészet eredeti sejteit, és végül csak a *HeLa*-sejtek maradtak meg bennük. A változást esetenként nem is vették észre, és több vizsgálatot, amelyeket eredetileg más sejtek viselkedésének tisztázására terveztek, a már elég jól tanulmányozott *HeLa*-sejtekkel végezték.



9.22. ábra. Transzkripciós faktorok kölcsönhatása két promoterral. (a) Az SV40 teljes szabályozó régiója a késői és a korai promoterekkel. Figyeljük meg, hogy a korai gén promotere ellentétes irányultságú, mint a 9.14. ábrán. A rajz szemlélteti az Sp1 transzkripciós faktor és a hat GC-box közötti kölcsönhatást is. (Normál körülmények között a IV. box kevéssé vagy egyáltalán nem vesz részt a kölcsönhatásban.) (b) A HSV timidin kináz promoterének elemei és azok kölcsönhatása az Sp1 és a CTF transzkripciós faktorokkal



9.23. ábra. A GAL4 működése. A transzkripció aktivátor GAL4 kötődik célhelyére, az UAS_G régióhoz, ami ez esetben az egyik GAL gén, a GAL1 promotere fölött (upstream) van. A kötődés elősegíti a preiniciációs komplex (RNS-polimeráz és általános transzkripciós faktorok) szerveződését, s ezzel magát az átírást is

adott enhancerrel bíró gének száma kisebb, mint a GC- vagy CCAAT-boxot tartalmazó géneké. Mindemellett, egyes enhancerek sokféle gén közelében megtalálhatók, így a hozzájuk kötődő génspecifikus transzkripciós faktorok több gén működését is szabályozzák. Vizsgáljunk meg néhány ilyen példát.

A GAL4 fehérje a génspecifikus transzkripciós faktorok egyik alaptípusa. Az élesztősejtek egyik aktivátora, amely a galaktóz metabolizmusáért felelős géncsoport működését szabályozza. A géncsoport mindegyik tagja tartalmaz egy UAS_G (upstream activating sequence a GAL génekre) célszekvenciát a transzkripció kezdőponttól felfelé. A GAL4 dimerként kötődik az UAS_G szekvenciához, és aktiválja az alatta levő (downstream) promotertől kiindulva az átírást (9.23. ábra).

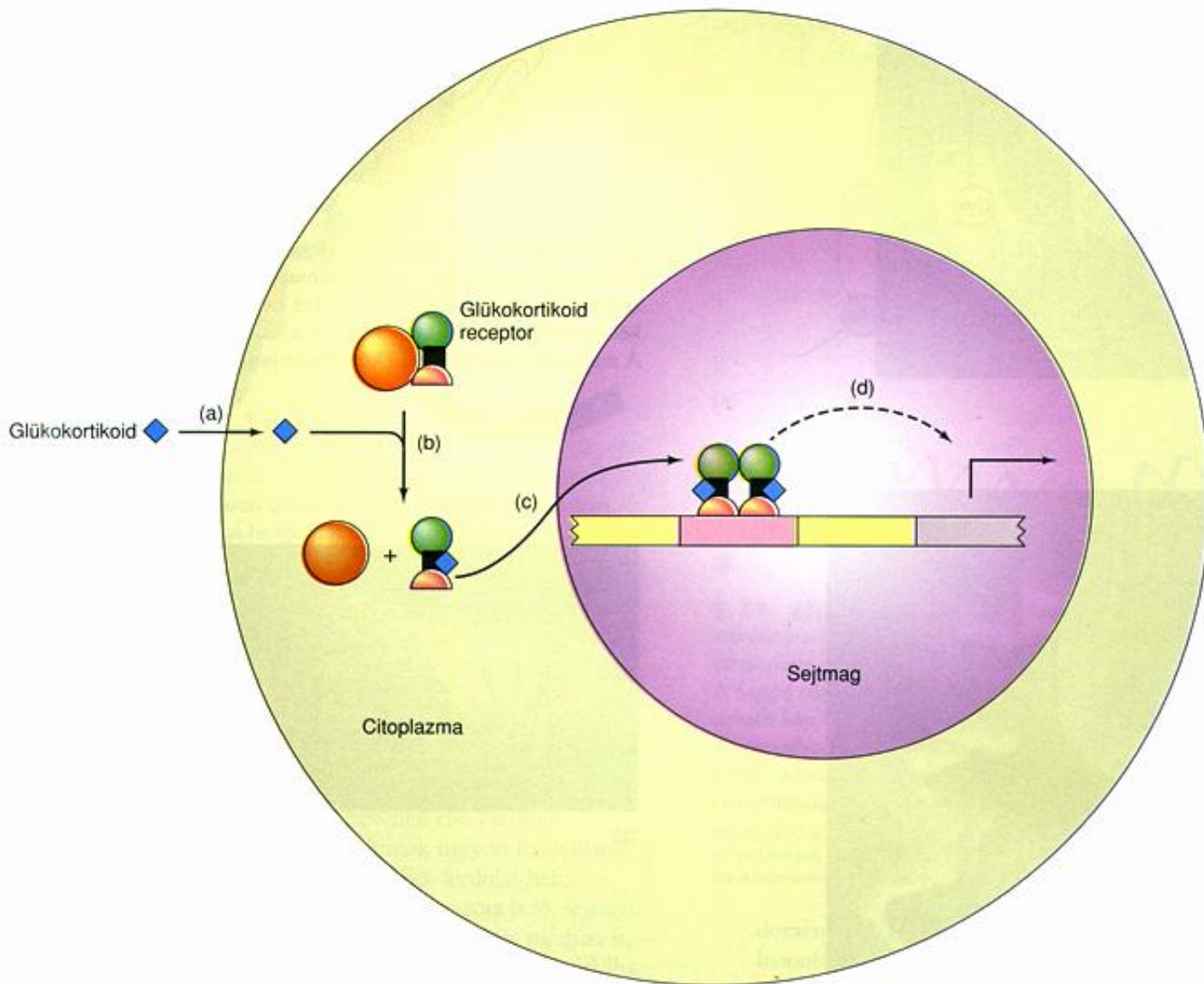
A **sejtmagi receptorok** alkotják az enhancer régióhoz kötődő fehérjék másik fontos csoportját. Ezek a fehérjék olyan szteroid vagy más apoláris hormonokkal reagálnak, amelyek képesek átdiffundálni a sejtmembránra. A képződő hormon-receptor komplex aktivátorként működik, kötődik a hormonválaszban szerepet játszó enhancer régiókhoz, és fokozza a kapcsolódó gének transzkripcióját. Így hatnak például az ivari hormonok (androgének, ösztrogének, progeszteron); a glükokortikoidok, köztük a kortizol; a veseműködést szabályozó mineralokortikoidok; a kalcium-anyagcserét szabályozó D-vitamin; a pajzsmirigy tirozinja és trijód-tironinja; a retininsav, amely a génműködés egyik szabályozója a differenciálódás során. Mindegyik hormon saját specifikus receptorához kötődik, és azzal együtt aktiválja az irányítása alatt álló géneket. (A kérdéssel a 14. fejezetben még részletesebben foglalkozunk.) Néhány nukleáris receptor (pl. a glükokortikoid receptor) a citoplazmában alkot komplexet egy hőssok fehérjével (hsp90). Amikor ligandumuk, hormonjuk megjelenik a citoplazmában, ledisszociál róluk a hőssokfehérje, megváltozik konformációjuk, és összekapcsolódnak a hormonnal. Ez a hormon-receptor komplex jut be a sejtmagba, ahol kifejti hatását (9.24. ábra). Más receptorok, például a pajzsmirigy-hormon, a tirozin receptora, a sejtmagban található. A hormon hiányában saját enhancer régiójukhoz kötődnek, és represszálják a velük kapcsolatban álló gének átírását. Amikor azonban a hormon bejut a sejtmagba, azzal kapcsolódnak, és komplexük ugyanahhoz az enhancer szakaszhoz kötődve aktiválja az átírást.

A GÉNSPECIFIKUS TRANZKRIPCIÓS FAKTOROK SZERKEZETE

Sok transzkripciós faktor, köztük az enhancer kötő fehérjék is, három funkcionális doménből állnak. Egy DNS-kötő, egy transzkripciót aktiváló és egy dimerizáló (vagy oligomerizáló) doménből. A DNS-kötő és a transzkripciót aktiváló doméneket külön-külön ismertetjük, majd együtt mutatjuk be a DNS-kötő és a dimerizáló domének sajátosságait.

1. **DNS-kötő domének.** A legtöbb ilyen szerkezeti elem az alábbi osztályok valamelyikébe sorolható.
 - (a) **Cinkujjak.** A cinkujjakat először a TFIIIA-ban fedezték fel, majd később az Sp1-ben, de újabban sok más transzkripciós faktorban leírták őket. Az Sp1 szerkezetének vizsgálatakor feltárták egy ismétlődő domént, amelyről előre megjósolták, hogy ujjszerű struktúrája lehet (9.25.(a) ábra). Az ujjszerű domének mindegyike egy Zn-iont köt meg, ezért **cinkujjaknak** nevezik őket. A 9.25.(b) ábrán látható a *Xenopus Xfin* fehérjéjének háromdimenziós szerkezete. Az *Xfin* a polimeráz II promoterek egyik aktivátora. Figyeljük meg, hogy a szerkezet valóban ujjszerű, ugyanúgy, mint a TFIIIA és az Sp1 esetében, amelyeknél azt előre meg is jósolták. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez a struktúra önmagában nem indokolja a kötődési specifitást, hiszen sok ilyen ujjszerű fehérje létezik, de mindegyik csak valamilyen egyedi célszekvenciához kapcsolódik. Tehát a kötődési specifitásért egy vagy akár több ujj aminosavszekvenciája, illetve a fehérje szomszédos részeinek szerkezete lehet a felelős.

Hogyan kerülnek kölcsönhatásba az ujjak a DNS-sel? Carl Pabo és munkatársai röntgenkristallográfiával vizsgálták annak a komplexnek a szerkezetét, amely az egér Zif268 fehérjéje és DNS-c között létesül. Ez a fehérje az ún. **közvetlen korai gén** terméke, amely az egyik legelőször aktiválódó gén az osztódásra készülő, nyugalmi állapotú emlősejtekben. A Zif268 fehérjében három szomszédos cinkujj van, amelyek a DNS kettős hélixének nagy árkába illeszkednek. A 9.26. ábra az első cinkujj szerkezetét mutatja be. Ebben az ábrázolásban talán nem annyira nyilvánvaló az ujj alakú struktúra, mint a 9.25. ábrán. Közelebbről megvizsgálva azonban kivehető a szerkezet körvonala, amit szaggatott vonal is jelez. Ugyancsak eltér az előző ábrázolástól, hogy az ujj lefelé irányul. Az *Xfin* cinkujjakhoz hasonlóan, a Zif268 ujjainak jobb oldala is egy α -hélix, amit felül egy rövid hurok köt össze a bal oldalon elhelyezkedő antiparalel β -lemezzel. Ne tévesszük össze a β -lemezt magával a cinkujjal, hiszen ez annak csak a fele. A Zn-ion középen helyezkedik el, és két hisztidinnel kapcsolódik az α -hélixhez, két ciszteinnel pedig a β -lemezhez.



9.24. ábra. A glükokortikoidok hatásmechanizmusa. A glükokortikoid receptor (GR) a sejtmagi receptorok jellemző képviselője. Inaktív formában egy hőszokkfehérjével (hsp90) alkot komplexet a citoplazmában. (a) A glükokortikoid (kék négyszög) a sejtmembránon át bediffundál a citoplazmába. (b) A glükokortikoid kapcsolódik receptorához (GR, piros és zöld), amelynek ezért megváltozik a konformációja, és disszociál a hőszokk-fehérjéről (narancssárga). (c) A hormon-receptor komplex (HR) bejut a sejtmagba, dimert alkot egy másik HR-rel, és kötődik az enhancer régióhoz (rózsaszín) a vezérelt gén (barna) fölött. (d) A HR dimer kötődése az enhancer régióhoz aktiválja (szaggatott nyíl) a gén transzkripcióját (folyamatos nyíl)

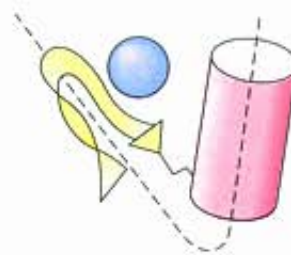
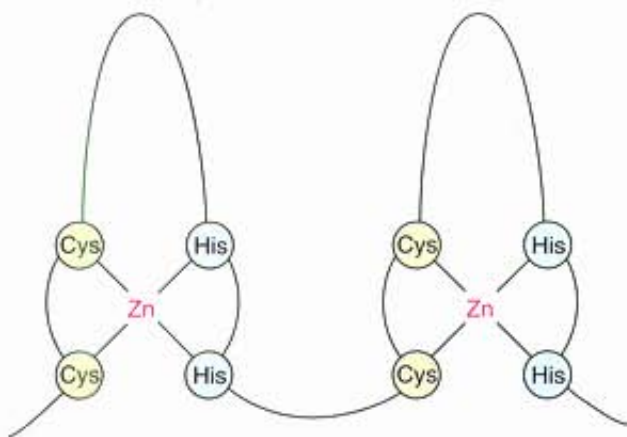
A Zif268 mindhárom ujjá csaknem pontosan ilyen szerkezetű. A 9.27. ábrán látható, hogyan illeszkedik a három cinkujj a cél-DNS nagy árkába. A valóságban a három ujj egy C alakú ív mentén helyezkedik el, ami megfelel a kettős hélix görbületének. Mindegyik ujj ugyanolyan szögben kapcsolódik a DNS-hez, ezért a fehérje-DNS kontaktus geometriája mindhárom esetben nagyon hasonló.

A kontaktus legnagyobb részét az α -hélix aminosavai és a nagy árok bázisai között jön létre, ami újabb példa az α -hélix szerepére a DNS azonosításában (8. fejezet).

A szteroid hormonok receptoraiban is Zn-tartalmú domének vannak, de a cinkkel létesített koordinatív kötésben 4 cisztein vesz részt (hisztidin nem). Emiatt

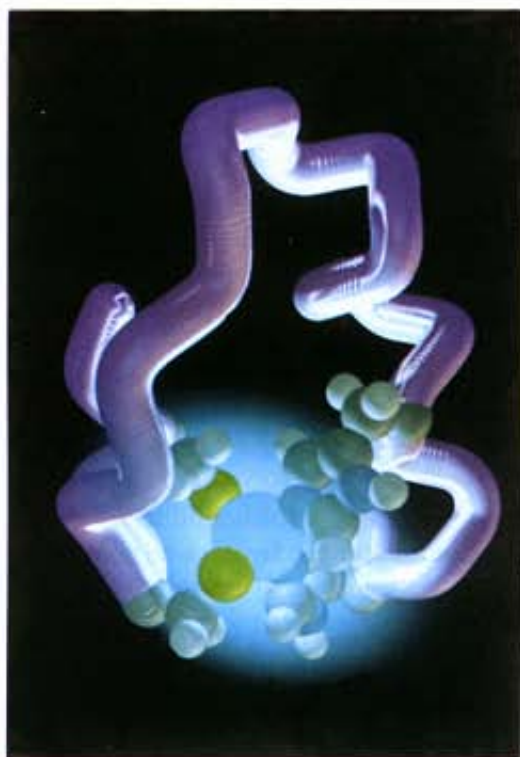
a domének alakja kissé eltér a klasszikus cinkujjakétól. Az ösztrogént és a progeszteront kötő fehérjék némileg különböző célszekvenciákhoz kapcsolódnak. Az eltérő specificitás annak az eredménye, hogy a két fehérje cinkdoménjeinek alapi részében más aminosavak vannak.

- (b) *Homeodomének (HD)*. A **homeodomének** körülbelül 60 aminosavból állnak. Először a *Drosophila* egyedfejlődését szabályozó DNS-kötő fehérjékben fedezték fel őket (14. fejezet). Egy sor transzkripció faktor, például a Pit-1, az OCT-1 és 2, az Unc-86 alkotórészei. A három felsorolt csoportban a HD egy másik motívummal – *POU-box* –



9.26. ábra. A Zif268 első cinkujjának vázlata. Az ujj bal oldalán egy antiparalel lefutású β-lemez (sárga), jobb oldalán egy α-hélix (piros) látható. A β-lemez két ciszteinje és az α-hélix két hisztidinje koordinálja a középső cinkiont (kék). A szaggatott vonal a cinkujj körvonalát jelzi

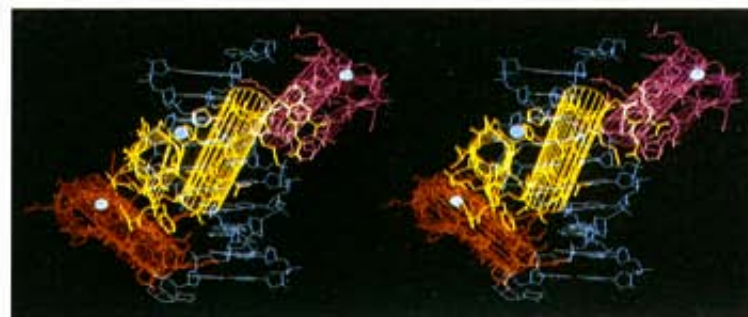
(a)



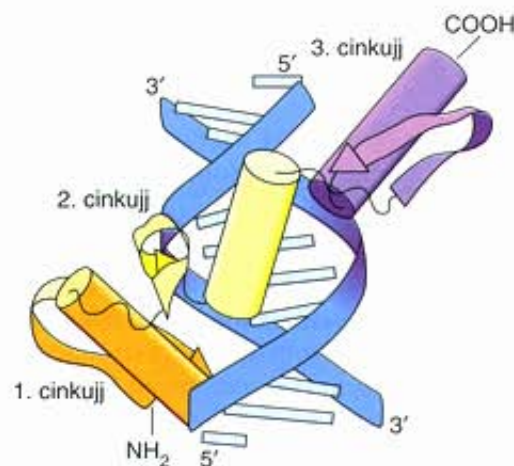
(b)

9.25. ábra. A cinkujj felépítése. (a) Két szomszédos cinkujj vázlatos rajza. A cink (piros) minden egyes ujjban négy aminosavhoz kapcsolódik: két ciszteinhez (sárga) és két hisztidinhez (kék). Ez biztosítja a cinkujj megfelelő konformációját a DNS-hez való kötődéshez. Ezek a kulcsfontosságú aminosavak mindegyik cinkujjban azonos helyen vannak. (b) A *Xenopus Xfin* fehérjéjében található cinkujjak egyikének háromdimenziós szerkezete. A cink helyzetét türkizkék gömb jelöli alul, középen. Ettől balra láthatók a két cisztein S-atomját jelképező sárga gömbök, jobbra lent pedig a két hisztidint szemléltető kék és zöld struktúrák. A cinkujj gerincét a lila hurok adja

Forrás: (b) Wright, P. és Lee, N. S.: *Three Dimensional Solution Structure of a Single Zinc Finger DNA-Binding Domain*. *Science*, 245:639, August 1989, © AAAS 1989;
Fotó: Pique, M. Wright, P.: *Dept. of Molecular Biology, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California*



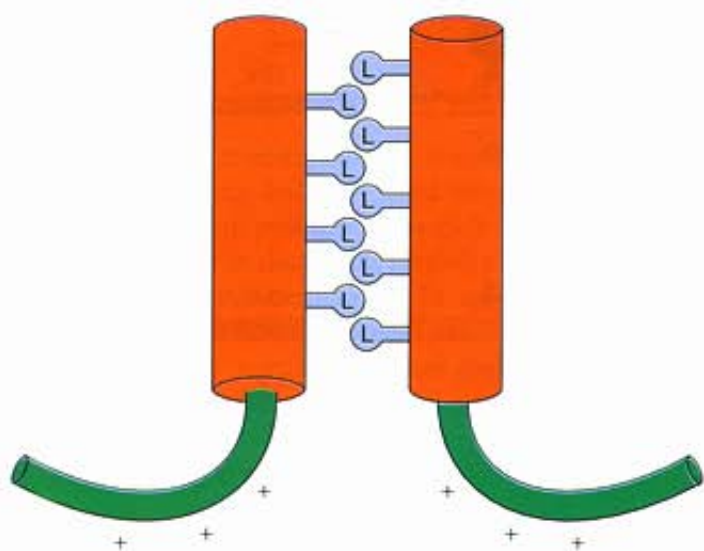
(a)



(b)

9.27. ábra. A Zif268 három cinkujja egy ív mentén helyezkedik el, így illeszkedik a DNS nagy árkába. (a) A fehérje-DNS komplex térbeli ábrázolása. (Az első ujj narancssárga, a második sárga, a harmadik lila. A DNS kék, a Zn-ionok világoskék gömbök.) A hengerek az α-hélixeknek, a szalagok a β-lemezeknek felelnek meg. (b) A fehérje-DNS komplex vázlatos rajza, a Zn-ionok feltüntetése nélkül

Forrás: (b) Pavletich és Pabo: *Zinc finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1Å*. *Science*, 252:749–888, 1991, © AAAS



9.28. ábra. A leucin cipzár modellje. A két fehérjemolekula α -hélixet tartalmaz (piros henger). A hélixek felszínén sorakozó leucin oldalláncok (L, kék kör) között olyan kölcsönhatás alakul ki, mint egy cipzár két fele között. A leucin cipzár területén kívül eső, pozitív töltésű, bázikus régiók (zöld) vesznek részt a DNS-kötésben, de csak akkor, amikor a cipzár záródott, azaz kialakult a dimer. A modell hipotetikus, háromdimenziós szerkezetét még nem tisztázták

alkot párt, a kettő együtt alakítja ki az ún. *POU domént*. A rövidítés a felsorolt HD-k nevének első betűiből származik. A HD-k és a POU-boxok nagyon hasonlítanak a prokarióta DNS-kötő fehérjék hélix-fordulat-hélix fehérjéihez, mint amilyen a λ -fág represszora is (8. fejezet). A hasonlóság kiterjed a DNS-hez való kötődés módjára is, mert a fehérje felismerő hélice a célszekvencia nagy árkába illeszkedik.

- (c) *bZIP domének*. A legtöbb transzkripció faktor dimerként, esetleg tetramerként kötődik a DNS-hez. Ez lehetőséget teremt a kooperatív kötődésre, ami növeli a fehérje és a DNS egymáshoz való affinitását, és lehetővé teszi a transzkripció faktorok hatékony kapcsolódását, akkor is, ha csak igen kis mennyiségben vannak jelen a sejtben. Ezért a legtöbb transzkripció faktornak van dimerizációs (oligomerizációs) doménje. A bZIP domén nagyon jó példa arra, mennyire nehéz különbséget tenni a DNS-kötő domén és a dimerizációs domén között. A DNS-kötő domén akkor alakul ki, amikor a két monomer dimerré áll össze. Vagyis dimerizáció nélkül ebben az esetben nincs DNS-kötő domén.

A bZIP domén ZIP része egy „cipzár”, rendszerint egy **leucin cipzár**, amely lehetővé teszi a dimerizációt. A bZIP fehérje mindegyik monomerjében van egy olyan α -hélix, amelyben leucinok vagy más hidrofób aminosavak sorakoznak egymástól hét aminosavnyi távolságra. Ez biztosítja, hogy az összes leucin az α -hélix azonos oldalára kerüljön, mégpedig olyan pozícióba, hogy kölcsönhatásba léphessen egy másik bZIP fehérje



(a)



(b)

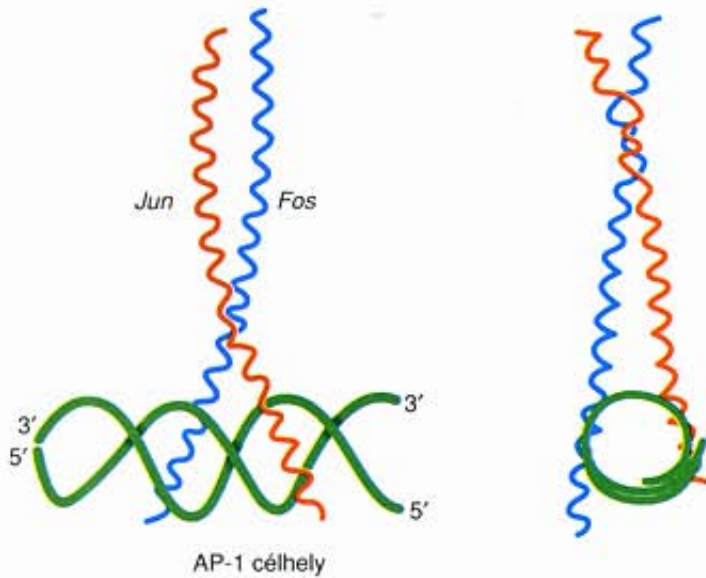
9.29. ábra. A leucin cipzár szerkezete. (a) Kim, Alber és munkatársaik kikristályosítottak egy 33 tagú peptidet, amely tartalmazta a GCN4 transzkripció faktor leucin cipzár motívumát. A peptid röntgenkristallográfias vizsgálatának eredménye az ábrán látható kép, a cipzár tengelye mentén, a papír síkjából kifelé mutató szupercsavarulattal. (b) A superhélix oldalnézeti képe, pirosra és kékre színezett α -hélixekkel. Figyeljük meg, hogy mindkét peptid N-terminálisa bal oldalra esik, tehát a superhélix paralel lefutású

Forrás: (a) O'Shea, Klemm, Kim és Alber: *X-Ray Structure of the GCN4 Leucine Zipper, a Two Stranded, Parallel Coiled Coil*. *Science*, 254:541, 1991, © American Association for the Advancement of Science

doménjével. A két hélix ily módon egy cipzár két feléhez hasonlóan működik (9.28. ábra).

A 9.28. ábra erősen vázlatos, ezért némi kiegészítésre szorul. Először is, a cipzár α -hélicei felcsavarodnak egymás körül, és a 9.29. ábrán látható superhélixet hozzák létre. Másodsor, a hélixekhez kapcsolódó, + jelekkel jelzett szakaszok (zöld) a fehérje bázikus régióit jelzik, ezek a bZIP domén DNS-kötő régiói. A 9.30. ábra szemlélteti a bZIP domén és a célszekvencia kapcsolódását. Figyeljük meg, hogy a leucin cipzár nem pusztán egymás közelébe hozza a monomereket, hanem olyan pozícióban tartja a domén bázikus részeit, hogy azok, mint egy csipesz, közrefoghassák a DNS-t, és beilleszkedhessenek a nagyobb barázdájába.

- Transzkripcióaktiváló domének*. A legtöbb transzkripció faktorban található egy ilyen domén, némelyekben akár több is. A domének többsége besorolható az alábbi három csoport valamelyikébe.
 - Savas*. Az élesztő GAL4 transzkripció faktora a csoport jellemző tagja. Tartalmaz egy 49 aminosavból álló domént, amelyben a savas oldalláncú aminosavak száma 11.
 - Glutaminban gazdag*. Az Sp1 transzkripció faktorban két ilyen, mintegy 25% glutamint tartalmazó domén található. Az egyikben 39 glutamin van egy 143 aminosavból álló



9.30. ábra. A bZIP domén és célszekvenciájának kölcsönhatása. A bZIP domén-DNS komplex röntgenkristallográfiás vizsgálatával kapott szerkezete. A bZIP domén az ember egyik génspecifikus transzkripció faktorából, az AP-1-ből származik. A molekula heterodimer, egy Jun (piros) és egy Fos (kék) alegységekből áll össze. A kristály elkészítéséhez felhasznált DNS-en megtalálható az AP-1 célhely. Az ábrán megfigyelhető a bZIP domén szuperhélix szerkezete

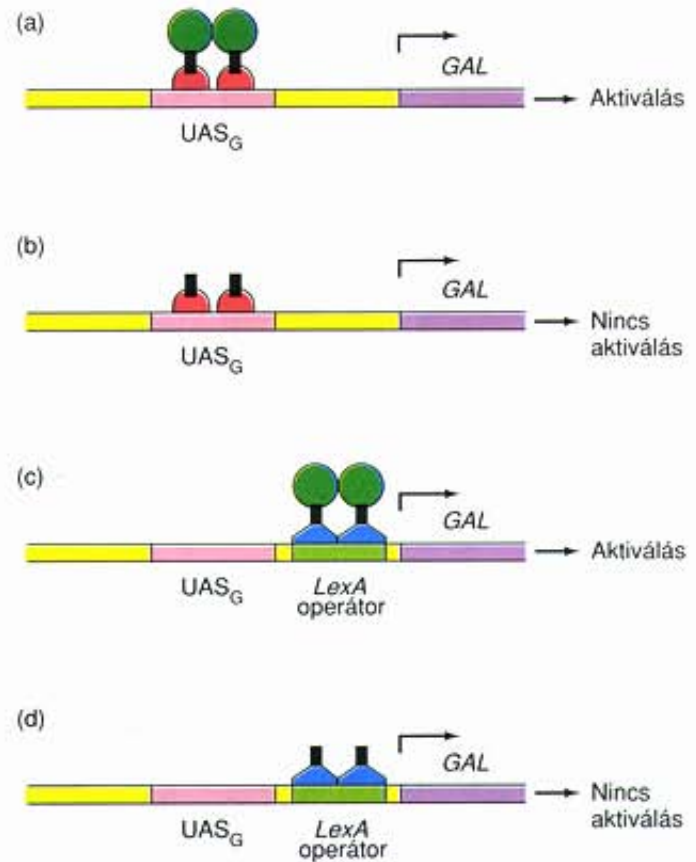
lánokban. Az Sp1 ezek mellett még két másik aktiváló domént tartalmaz, amelyek nem sorolhatók a három kategória egyikébe sem.

- (c) *Prolinban gazdag.* Az egyik példa a CTF transzkripció faktor, amelynek 84 aminosavból álló doménjében 19 prolin található.

Hogyan hatnak a transzkripció aktiváló domének? Valószínű, hogy más fehérjékkel, főként az általános transzkripció faktorokkal (TFIIB, TFIID), esetleg az RNS-polimerázzal lépnek kölcsönhatásba, és segítik a preiniciációs komplex kialakulását, ezen keresztül pedig a transzkripciót.

Elkülönült DNS-kötő és transzkripcióaktiváló domének

A fent tárgyalt transzkripció aktiváló domének szerkezetileg és működésükben is elkülönülnek a fehérje DNS-kötő doménjétől. Mark Ptashne és munkatársai egy szellemes kísérlettel bizonyították ezt, amelyet az élesztő GAL4 transzkripció aktivátorával végeztek. Ez a faktor aktiválja az élesztő *GAL* génjeit, oly módon, hogy kapcsolódik az UAS_G régióhoz (9.31.(a) ábra). A *GAL4* gén klónozásával és manipulálásával Ptashne előállított egy olyan „fél-fehérjét”, amely csak a DNS-kötő domént tartalmazta. Ahogy az a 9.31.(b) ábrán is látható, a fehérje képes az UAS_G -hez kapcsolódni, de nem alkalmas a transzkripció aktiválására. A következő lépésben Ptashne előállított egy hibrid fehérjét, amely a LexA bakteriális represszor DNS-kötő doménjét és a GAL4 transzkripcióaktiváló doménjét tartalmazta. Az ilyen hibridek a **kimérák**. Nyilvánvaló, hogy ez a kiméra nem kötődhetett az UAS_G -hez, ezért nem is aktiválhatta a *GAL* gén átírását. Ezután Ptashne beépítette a *lexA*



9.31. ábra. Egy transzkripció faktor egymástól független DNS-kötő és transzkripció aktiváló doménje. (a) A GAL4 fehérje két doménből áll: az egyik a DNS-kötő (piros), a másik a transzkripciót aktiváló (zöld). (a) A fehérjét a *GAL* gén felett található kötőhelyén, az UAS_G szekvenciához (rózsaszín) kapcsolva ábrázoltuk. Ilyenkor a transzkripció aktivált. (b) A GAL4 fragmentum csak a DNS-kötő domént tartalmazza, ami kapcsolódik az UAS_G elemhez, de nem aktiválja a transzkripciót. (c) A GAL4 transzkripció aktiváló doménjét (zöld) és a bakteriális LexA represszor DNS-kötő doménjét tartalmazó kiméra kötődik a *GAL* gén elé beépített *lexA* operátorhoz (világoskék). A *GAL* gén transzkripciója is aktiválódik. (d) A kontroll kísérletben a LexA DNS-kötő doménje a transzkripcióaktiváló domén hiányában nem képes aktiválásra. A kísérletek igazolják, hogy a GAL4 fehérje két doménje egymástól független. A kimérát dimerként ábrázoltuk, bár ez még nem bizonyított

operátorát a *GAL* gén transzkripció kezdőhelyének közelébe (9.31.(c) ábra). A LexA DNS-kötő domén jelenlétében a kiméra kötődik a *lexA* operátorhoz a *GAL* gén fölött, GAL4 transzkripcióaktiváló doménjével pedig aktiválja a *GAL* átírását. Tehát, a GAL4 DNS-kötő és transzkripcióaktiváló doménjei egyértelműen elkülönülnek, sőt ki is cserélhetők más fehérjékkel.

Az RNS-polimeráz II génspecifikus transzkripció faktorai kötődhetnek a promoter elemeihez, például a GC- és a CCAAT-boxokhoz vagy a gének enhancer régióhoz. A faktorok többségének működését három domén biztosítja: a DNS-kötő, a transzkripcióaktiváló és a dimerizáló domén. Egyes esetekben (bZIP fehérjék) a DNS-kötő és a dimerizáló domén nem különíthető el.

A GÉNSZERKEZET ÉS A GÉN MŰKÖDÉS KAPCSOLATA

Az eukarióta gének transzkripciójának tárgyalása során eddig nem vettünk figyelembe egy kulcsfontosságú tény: sok eukarióta gén alapvetően különbözik prokarióta megfelelőjétől. Egy prokarióta struktúráján egyszerű szerkezetű, kezdetétől a végéig folyamatosan olvasható, nincs benne megszakítás. Ez annyira kézenfekvőnek tűnt, hogy senki sem feltételezett ettől eltérő eukarióta génstruktúrát. De tény, hogy az eukarióta gének gyakran darabokban találhatók a kromoszómákban, más szóval nem folyamatosak.

MEGSZAKÍTOTT GÉNEK

Az emberi β -globin génen belül például két értelmetlen szakasz található olyan szekvenciákkal, amelyeknek egyáltalán nincs kapcsolatuk a környező kódoló régiókkal. Az értelmetlen szakaszokat helyenként **beékelődő szekvenciának** (röviden IVS, az angol intervening sequence alapján) nevezik, de sokkal elterjedtebb a Walter Gilbert által adott név, az **intron**. Ugyanilyen gondolatmenetet követve, a gén értelmes szakaszait kódoló vagy expresszálandó régiókként említik, de itt is Gilbert elnevezése, az **exon** elterjedtebb. Egyes génekben egyáltalán nincsenek intronok, míg másokban igen nagy számban fordulnak elő. Az eddig ismert rekordot a disztrófin génje tartja hatvan intronnal. Ennek a génnek a rendellenessége okozza a Duchenne-féle izomdisztrófiát.

Az intronok előnyeit, használhatóságát homály fedi. Szerencsére, leírásukkal jobban állunk – meg tudjuk állapítani,

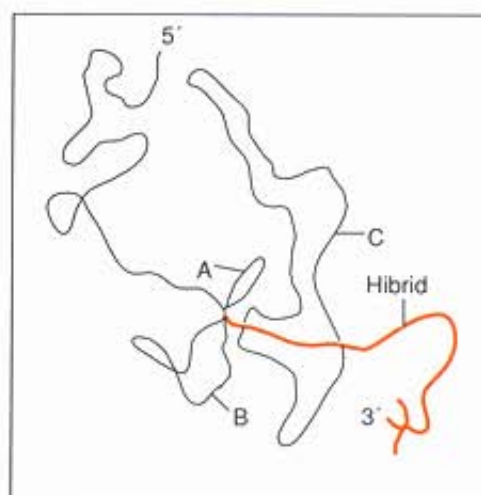
hol helyezkednek el, milyen szekvenciákból állnak. Vegyük például az adenovírus fő késői génjét! Ez a gén a génműködés tanulmányozásának egyik közkezdelt tárgya, Phillip Sharp, Richard Roberts és munkatársaik ebben találták az első intront 1977-ben. Ekkorra már sok bizonyíték mutatott arra, hogy az adenovírus fő késői génje nem folyamatos, hanem megszakításokat tartalmaz, de a legkönnyebben érthető bizonyítékot talán az *R-hurok* technika alkalmazása adta, amely lehetővé teszi az intronok vizuális megjelenítését az elektronmikroszkópban.

Az R-hurkos kísérletekben az RNS-t DNS templátjával hibridizálják. Elválasztják egymástól a templát fonálait, és egyiküket hibridizálják saját RNS-termékével, így módon kétszálú hibrid molekulát állítanak elő. A kísérlet feltételei olyanok, hogy a hibrid molekula valamivel stabilabb a kétfonalas DNS-nél. A hibridet ezután elektronmikroszkópban vizsgálják. Ezekben a kísérletekben alapvetően kétféle módszert alkalmaznak: (1) A DNS két szálát csak annyira választják szét, hogy hibridizálhasson az RNS-sel; (2) Teljesen elválasztják egymástól a DNS két fonálát. Sharp az utóbbi módszert alkalmazta, az adenovírus egyfonalas DNS-ével hibridizáltatta a vírus egyik burokfóhéjje, az ún. hexon érett mRNS-ét (9.32. ábra).

Ha a hexon génjében nem lennének intronok, sima lineáris hibrid alakulna ki ott, ahol az RNS egyszálú templátjához kapcsolódik. De mi várható akkor, ha intronok vannak a génben? Az érett mRNS-ben már nem lehetnek intronok, mert akkor a fehérjetermékbe értelmetlen szakaszok kerülnének. Tehát az intronok olyan szekvenciák,



(a)



(b)



9.32. ábra. Az intronok jelenlétének kimutatása adenovírusban R-hurkok elektronmikroszkópos vizsgálatával. (a) Az adenovírus-DNS klónozott fragmentumának elektronmikroszkópos képe. A fragmentum tartalmazza a vírus késői hexon génjének 5'-részét, amely hibridizálódik az érett hexon mRNS-sel. A hurkok a génnek azokat az intronjait képviselik, amelyek nem hibridizálódhatnak az mRNS-sel. (b) Az elektronmikroszkópos kép magyarázata a három intron eredetű hurok (A, B, C), a hibrid (vastag piros vonal) és a DNS gén fölötti, nem hibridizálódott részének (balra fent) feltüntetésével. A jobb alsó részen lévő villát az mRNS 3'-vége alkotja, amely nem hibridizálódhat, mert hiányzik a gén 3'-vége. Emiatt az mRNS intramolekuláris kötések révén kétfonalas, villa alakú szerkezetet vesz fel. (c) A hexont kódoló gén lineáris elrendezése. A három rövid vezér exont az A és B intronok választják el egymástól, míg a hosszú belső intron (C) a vezér szekvenciák és a gén kódoló régiója között található. Az exonokat piros négyzetek jelölik

Fotó: Berget, Susan M., Sharp, Philip: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:3173, 1977

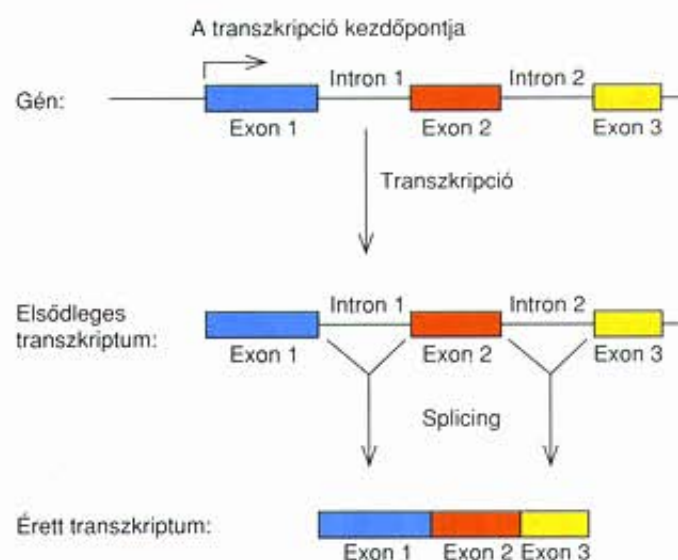
amelyek a DNS-ben megtalálhatók, de az érett mRNS-ben nem. Ez viszont azt is jelenti, hogy a hexon DNS és a hexon mRNS nem képezhet egy sima, lineáris hibridet. A DNS intronjainak komplementerei hiányoznak az mRNS-ből, ezért egyszálú hurkokat alkotnak. A kísérlet pontosan ezt az eredményt adta, mint az a 9.32. ábrán is látható. Bár a kihurkolódott részek DNS-ből állnak, mégis R-huroknak nevezzük őket, mert RNS-sel való hibridizáció során keletkeztek.

Az elektronmikroszkópos kép egy RNS-DNS hibridet mutat, három egyfonalas DNS-hurokkal (A, B és C). A hurkok a hexon génjének intronjai. Mindegyik hurok előtt egy rövid hibrid régió található, az utolsó hurok után pedig egy hosszú hibrid szakasz következik. Ez azt jelenti, hogy négy exon van a génben: három rövid, a gén elejének közelében, és ezután egy nagy. A három rövid exon **vezérszekvenciákká** (leader) íródik át a hexon mRNS 5'-végénél a kódoló rész előtt; a hosszú exon felel meg a gén kódoló régiójának.

Sokszor hivatkoztunk ebben a fejezetben eukarióták vírusaival végzett kísérletekre. Ennek oka, hogy sok olyan vizsgálatot, amelyek a célja az eukarióták génműködésének felderítése volt, először vírusokkal végeztek el. Miért? A vírusok genetikailag sokkal egyszerűbbek gazdasejtjeiknél, így könnyebben is tanulmányozhatók. Ezenkívül, a DNS-vírusok, köztük az adenovírus és az SV40, a gazdasejt magjában replikálódnak, így ugyanazt a gén-expressziós gépezetet használják, mint gazdasejtjük. Amit meg tudunk a vírusok génműködéséről, az sokat elárul a gazdasejt géneiről is.

Amikor azonban olyan megdöbbentő dolgokra bukkan egy kutató, mint amilyenek az intronok egy vírusban, eltöpreng, vajon ez csak a vírusokra jellemző-e, és nincs-e kapcsolatban az eukarióta sejt folyamataival. Ezért fontos volt annak kiderítése, hogy vannak-e az eukarióta sejtekben is intronok. Az első bizonyítékok egyikét Pierre Chambon és munkatársai szolgáltatották csirke ovalbumin génjével végzett R-hurok kísérletükben. A csirke ovalbumin génjében hat különböző méretű DNS-hurkot találtak, amelyek nem hibridizáltak az érett mRNS-sel, vagyis ebben a génben hat intron van hét exon között. Az is figyelemre méltó volt, hogy az intronok többsége hosszabb volt az exonoknál. Azóta kiderült, hogy ez jellemző a magasabb rendű eukarióták géneire. Az alacsonyabb rendűekben, például az élesztőben, az intronok jóval ritkábban fordulnak elő.

Az eddigiekben csak az mRNS-génekben lévő intronokról volt szó, de a tRNS- és esetenként az rRNS-gének is tartalmaznak intronokat. De a két utóbbi géntípus intronjai kissé különböznek az mRNS-gének intronjaitól. A tRNS intronok például viszonylag kisméretűek, 4-50 bázis hosszúságúak. Nem mindegyik tRNS-génben van intron, és amelyekben van, azokban is csak egy, éppen a tRNS antikodonjának megfelelő DNS-bázisok szomszédságában. A mitokondriumok és a kloroplasztiszok génjeiben is lehetnek intronok. Sőt, mint ahogyan azt látjuk majd, sok szempontból azok a legérdekesebbek.



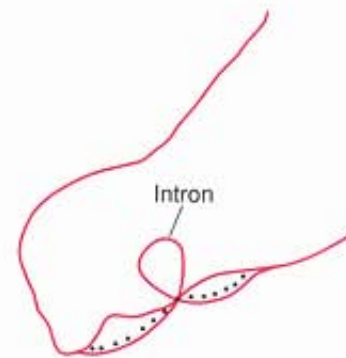
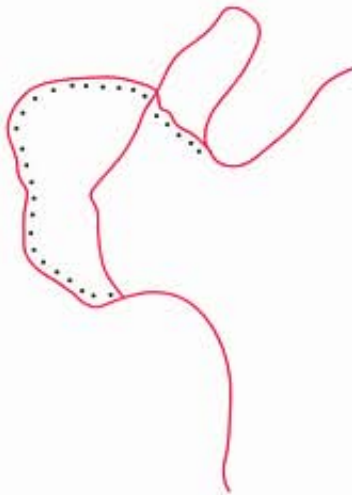
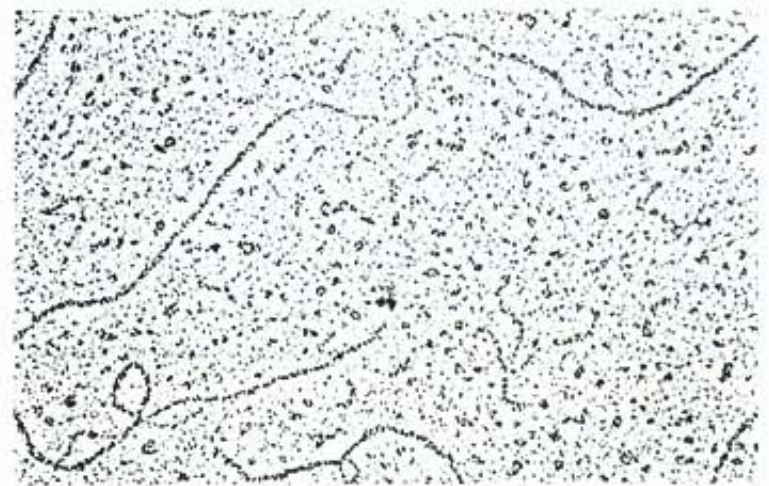
9.33. ábra. A splicing vázlatos menete. Egy gén intronjai az exonokkal (színes négyzetek) együtt íródnak át elsődleges transzkriptummá. A splicing során az intronok kihasításra kerülnek, és az exonok egymás mellé rendeződnek

A legtöbb magasabb rendű eukarióta szervezet mRNS és tRNS génjét, valamint egyes rRNS-géneket értelmetlen szakaszok, intronok szakítják meg. A gének intronok körüli részei az exonok. Ezek tartalmazzák azokat a szekvenciákat, amelyek megjelennek az érett RNS-termékben is. Az mRNS-t kódoló génekben az intronok száma 0 és 60 között változhat. A tRNS-génekben nincs intron, vagy csak egy van.

RNS-splicing

Vizsgáljuk meg, milyen problémákat vet fel az intronok létezése. Jelen vannak a génekben, de hiányoznak az érett RNS-ből. Miként lehetséges az, hogy az intronokban levő információ nem található meg a gének érett RNS-termékében? Lényegében két lehetőség van: (1) Az intronok sosem íródnak át, a polimeráz valahogyan átugrik egyik exonról a másikra, kihagyja a közöttük lévő intront; (2) Az intronok átíródnak, majd az így kialakult túlméretezett géntermék, az **elsődleges transzkriptum** méretre vágódik az intronok kihasításával. Bármennyire is gazdaságtalannak tűnik az utóbbi eljárás, ez valósul meg. Annak a folyamatnak a neve, amely során az éretlen RNS-ekből az intronok kihasításra kerülnek, az exonok pedig összekapcsolódnak végtermékké: az **RNS-splicing**. A folyamatot a 9.33. ábra vázolja, bár később látjuk, hogy ez a kép túlságosan leegyszerűsített.

Hogyan játszódik le a splicing? Abban az időben, amikor az intronokat felfedezték, a splicing léteéről már voltak bizonyítékok. Találtak egy nagyméretű, sejtmagban lokalizált RNS-típust, a **heterogén nukleáris RNS-t**, röviden **hnRNS-t**, amelyről azt tartották, hogy az mRNS prekurzora. Ezek mérete (nagyobbak az mRNS-eknél), lokalizációja (sejtmag) megfelelt az mRNS-prekurzornak. Továbbá, a hnRNS-re gyors turnover jellemző: gyorsan keletkezik és nagy sebességgel degradálódik kisebb RNS-re. Mind-



(a)

(b)

9.34. ábra. Az intronok átíródnak. (a) R-hurok kísérlet, amelyben az egér globin mRNS-ének prekursorát klónozott β -globin génnel hibridizálták. Sima, lineáris hibrid molekula keletkezett, jelezve, hogy a prekursor mRNS-ekben megtalálhatók az intronok. (b) Hasonló R-hurok kísérlet, de a hibridizáláshoz érett mRNS-t használtak, nem prekuzort. A gén nagy intronja kihurkolódott, jelezve, hogy komplementere az érett mRNS-ben már nincs jelen. A kis intront nem azonosították ebben a kísérletben. A magyarázó diagramon a pontozott vonal az RNS-nek, a folyamatos piros vonal a DNS-nek felel meg

Fotó: Shirley Tilgham, Peter Curtis, David Tiemeier, Philip Leder, Charles Weissmann: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75:1312, 1978

ez szintén arra utal, hogy ezek az RNS-ek csak köztes termékek a stabil RNS-formák kialakulása során. Ugyanakkor nem volt közvetlen bizonyíték arra, hogy a hnRNS-ből splicing révén mRNS keletkezik.

Az egér β -globin mRNS-e és prekuzora minden szempontból megfelelőnek bizonyult a vizsgálatokhoz. Az egér globin mRNS-ének prekuzora a hnRNS-ek közé tartozik. Csak a sejtmagban található, gyorsan lebomlik, és körülbelül kétszer akkora (1500 bázis), mint az érett globin mRNS (750 bázis). Az éretlen vörösvérsejtek olyan sok globint termelnek (fehérjeteralmuknak körülbelül 90%-a), hogy az α - és β -globin mRNS nagy mennyiségű, viszonylag könnyen kinyerhető, tisztítható. Emellett prekuzora is elfogadható mennyiségben van jelen. A prekuzor mérete is éppen megfelelő, intronok és exonok egyaránt vannak benne. Charles Weissmann, Philip Leder és munkatársaik az R-hurok módszert alkalmazták annak a hipotézisnek az igazolására, mely szerint a prekuzor még tartalmazza az intronokat.

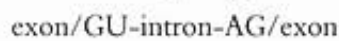
A kísérleti terv szerint az érett globin mRNS-t, vagy prekuzorát hibridizálták a klónozott globin génnel, majd megfigyelték a képződött R-hurkokat (9.34. ábra). Már tudjuk, milyen eredmény várható az érett mRNS esetében. Mivel nem tartalmaz az intronoknak megfelelő szekvenciákat, a gén intronjainak ki kell hurkolódnuk. Másrészt, ha a prekuzor RNS még tartalmazza az intronokkal komplementer régiókat, akkor nem képződik egyetlen hurok sem. Az eredmény megfelelt a várakozásoknak. A 9.34. ábra struktúráinak azonosítása problémát jelenthet, mivel a kísérletet kétfonális DNS-sel végezték, nem egyfonalossal. Az RNS egyszerűen hibridizálódik az egyik DNS-szállhoz, helyettesítve a másikat. A prekuzor RNS sima, megszakítást nem tartalmazó R-hurkot adott, az érett mRNS pedig egy megszakított hurkot, amelyet a kétfonális DNS hurka szakít meg, ami tulajdonképpen az intron. A kis intront nem sikerült kimutatni ebben a kísérletben. Jegyezzük meg, hogy az *intron* fogalom mind a DNS-ben, mind az RNS-ben lévő közbeeső szekvenciákra használható.

A messenger RNS előállítása az eukariótákban szakaszokban történik. Az első szakasz az elsődleges transzkriptum szintézise, vagyis egy olyan mRNS prekursoré, amely még tartalmazza a génről lemásolt intronokat is, feltéve, ha voltak ilyenek a génben. A prekursor a nagy nukleáris RNS-ek, az ún. hnRNS-ek képviselője. A második szakasz az mRNS érése. A folyamat része az intronok eltávolítása a splicing során, amelynek végeredménye a megfelelő méretű érett mRNS.

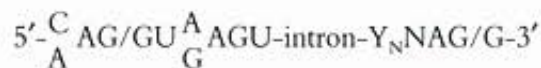
A splicing jelei

A pontos splicing jelentősége egészen nyilvánvaló. Ha túl rövid RNS-szakasz kerül kihasításra az mRNS prekurból, akkor az érett mRNS-t megszakítja egy fölösleges rész. Ha túl sok nukleotidot távolít el a mechanizmus, fontos szekvenciák veszhetnek el.

A pontos splicing jelentőségét figyelembe véve, lenniük kell olyan jeleknek az mRNS prekursorokban, amelyek egyértelműen megmutatják a splicing gépezetének, hol történjen a hasítás és az összekapcsolás. Melyek ezek a szignálok? Megtalálásuk egyik módja lehet, ha megvizsgáljuk több különböző gén szekvenciáit az intronok határainál, és felderítjük bennük a közös elemeket. Elvben a közös szekvenciák részei lehetnek a splicing szignáljainak. A legérdekesebb megfigyelés, amelyre először Chambon jutott, az volt, hogy a nukleáris mRNS-ekben csaknem minden intron ugyanúgy kezdődik és végződik:

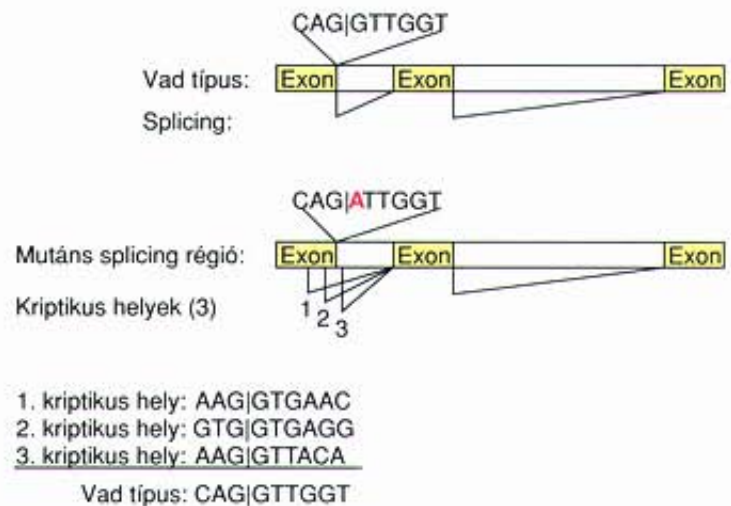


Más szóval az első két bázis egy transzkriptum intronjában GU, az utolsó kettő pedig AG. Ez a fajta konzervativitás nem lehet véletlen, a GU-AG motívum biztosan része annak a szignálnak, amely a splicing helyét jelzi. A GU-AG motívum azonban túlságosan gyakori. Egy átlagos intronon belül több GU és AG szekvencia is lehet. Azoknál miért nem történik splicing? A válasz az, hogy nem csak a GU-AG motívumok lényegesek, a splicing jelei ennél sokkal összetettebbek. Napjainkra már sok intron/exon határ bázissorrendjét elemezték, és a következő konszenzus szekvenciát találták:



ahol az Y_N egy körülbelül 9 pirimidinből (U és C) álló szakasz az N pedig bármelyik bázis lehet.

Egy konszenzus szekvencia megtalálása még nem minden, ki is kell mutatni, hogy valóban fontos. Több kutatócsoport is talált olyan bizonyítékokat, amelyek alátámasztják a splicing konszenzus szekvenciák jelentőségét. Ezeket a kísérleteket két fő típusba sorolhatjuk. Az egyikben mutációt hajtanak végre klónozott gének splicing konszenzus szekvenciáiban, majd elemzik, milyen változás történt a splicing folyamatában. A másikban beteg páciensekből defektes géneket izolálnak, olyanokat, amelyek feltehetőleg valamilyen splicingra visszavezethető eltérés miatt nem működnek, majd megvizsgálják a splicing határok közelében bekövetkezett mutációk hatásait. Mindkét vizsgálati módszerrel ugyanazok a válaszok születtek: a kon-



9.35. ábra. A konszenzus szekvenciák fontossága a splicing régiókban. A vad típusú exon-intron határon a splicing szabályos. Amennyiben az intron első guaninja (G) adeninre (A) változik (piros), már nem következhet be splicing a kérdéses ponton, hanem három alternatív, ún. kriptikus helyen. Az ábra alsó részén a három kriptikus hely szekvenciája és az összehasonlítást szolgáló vad típusú szekvencia szerepel. Ezek DNS-szekvenciák, ezért az intronok GT-vel kezdődnek, nem GU-val

szenzus szekvencia módosítása megzavarja a normális splicing folyamatát.

Vizsgáljuk meg például a β -globin gént. A **béta-thalasszémia**, egy gyakran végzetes kimenetelű örökletes betegség, amely arra vezethető vissza, hogy a citoplazmában nincs működőképes β -globin mRNS. Ennek sokféle oka lehet, az itt ismertetett esetekben az érintett személyek β -globin génje defektes a splicing régióban. A 9.35. ábra a mutáns β -globin gén konszenzus szekvenciáját mutatja be három *thalasszémias* betegnél. Mindhárom esetben egyetlen bázis cseréje a kulcsfontosságú GT helyen szüntette meg a normál splicing helyét az első intron kezdeténél. Ennek következtében a splicing gépezete olyan alternatív helyeket, ún. *kriptikus helyeket* használt, amelyeknél normál körülmények között nem történik splicing. Kettő közülük a szabályos splicing régió fölött van az első exonban, a harmadik pedig alatta, az intron belsejében.

A kriptikus helyek szekvenciája hasonló a szabályos régiókéhoz. A splicing gépezete pedig egy olyan kisgyerekhez hasonlítható, aki mindig ugyanazt a fajta cukorkát vásárolja, míg egy nap ki nem fogy. A gyerek ezért más fajtákat választ azok közül, amelyek kedvére valónak tűnnek, de nem egy-, hanem háromfélét. Amíg kedvence is ott volt, nem figyelt fel ezekre a cukorkákra, pedig jól látható helyen voltak a pulton.

A kriptikus helyek nem a megfelelő pontokon vannak, tehát nem a szabályos szekvenciák kerülnek kihasításra az mRNS prekursorokból. Az első két esetben az első exon egy szakasza elvész, a harmadikban pedig az első intron egy darabkája nem nyíródik ki. Ezért egyik esetben sem képződhet működőképes mRNS. A nem megfelelő splicing következtében a mutáns allél működésképtelen, annak ellenére, hogy kódoló szekvenciája hibátlan. A mutáció következményei életveszélyesek is lehetnek.

A nukleáris mRNS prekurzorok splicing jelei figyelemre méltóan egységesek. Az intron első két bázisa majdnem mindig GU, az utolsó kettő pedig AG. Az 5'- és 3'-splice-helyeknek konszenzus szekvenciájuk van, amelyek túlnyúlnak a GU és az AG motívumokon. A teljes konszenzus szekvencia fontos a szabályos splicing folyamatához, mutációjuk következtében a splicing rendellenes lesz.

A KIS NUKLEÁRIS RNS-EK SZEREPE A SPLICING FOLYAMATÁBAN

Joan Steitz és munkatársai voltak azok, akiknek a figyelmét először felkeltették a **kis nukleáris RNS-ek**, röviden **snRNS-ek** (small nuclear), mint a splicing lehetséges végrehajtói (9.36. ábra). Az snRNS-ek a sejtben fehérjékkel alkotnak komplexet, ún. **kis nukleáris ribonukleoproteinek** (**snRNP**). Steitz fedezte fel, hogy az egyik snRNP, az U1 rendelkezik egy olyan szekvenciával, amely csaknem teljesen komplementere mind az 5'-, mind a 3'-splice-helyek konszenzus szekvenciáinak. Elvben ez lehetővé teszi a bázispárosodást az U1 RNS és egy mRNS prekurzor között. Ez a valószínűleg meg is történik, de valószínűleg csak az 5'-splice-helyeken.

Honnan tudjuk, hogy az snRNP-ek részt vesznek a splicing folyamatában? A bizonyítékok egy sora azokból az *in vitro* splicing vizsgálatokból származik, amelyekben snRNP-ek elleni antitesteket alkalmaztak. Az antitestek specifikusan kötődnek bizonyos anyagokhoz, és ezzel meggátolhatják működésüket. Ezért, ha az snRNP-ek szükségesek a splicing folyamatához, akkor az antitestekkel való kapcsolódás megakadályozza a folyamatot. A kísérletek igazolták ezt a feltételezést.

Ismert az is, hogy a sejtben az mRNS prekurzorok szerkesztése egy összetett részecskén (**spliceosoma**) megy végbe. Az emlősökben ez a képződmény a nagy riboszomális alegységgel azonos méretű (50–60S). Szerepel benne az mRNS prekurzor, és egy sor snRNP: U1, U2, U4, U5 és U6, bár az U1 snRNP viszonylag könnyen elvész a részecskéből a tisztítás során.

A SPLICING LASSZÓ ALAKÚ KÖZTES TERMÉKE

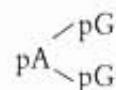
Az mRNS prekurzorok érésének részletes mechanizmusa első pillanatban annyira ésszerűtlennek tűnik, hogy célszerűbb először a következtetéseket ismertetni, és csak utána a bizonyítékokat. A 9.37. ábra a splicing kétlépéses **lasszó-modelljét** szemlélteti. Az első lépés egy hurkolt szerkezetű, lasszóra hasonlító köztes termék kialakulása. Ez akkor jön létre, amikor egy nukleotid, amely az intron közepén található, megtámadja a foszfodiészter-kötést az első exon és intron között. A hurok a foszfodiészter-kötés felszakadásával egyidejűleg alakul ki. A folyamat akkor fejeződik be, amikor az első exon 3'-vége megtámadja a második exon 5'-végét, kialakítja az exon-exon foszfodiészter-kötést, és ezzel együtt kiválik az intron is egy lasszó alakú struktúrát képezve.



9.36. ábra. A kis nukleáris RNS-ek (snRNS) elektroforézise. Egértumorsejtekből előállított snRNS-ek méret szerinti szétválasztása poliakrilamid gélen. A gélen az 5S és az 5,8S rRNS is szerepelnek mint markerek. Az elektroforézis kiindulópontja felül van

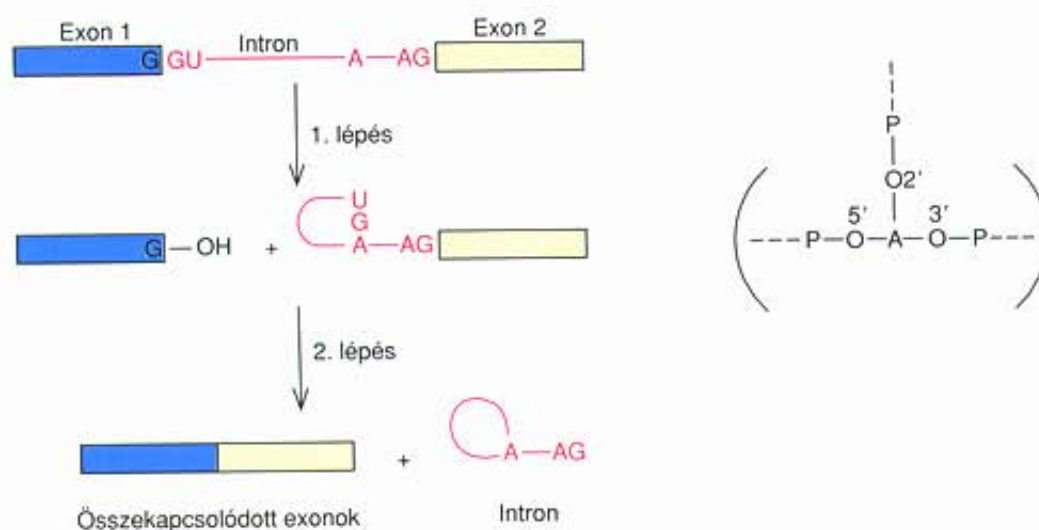
Forrás: Lerner, Michael R., Boyle, John A., Mount, Stephen M., Wolin, Sandra L. és Steitz, Joan A.: *Nature*, 283:221, 1980, © Macmillan Magazines Ltd.

Ez a mechanizmus eléggé valószínűtlennek tűnik ahhoz, hogy csak minden kétséget kizáró bizonyítékok esetén fogadják el. A 9.37. ábrán látható köztes termékek mindegyikének létezését megbízható megfigyelések támasztják alá, többségüket Sharp és munkacsoportja gyűjtötte össze. Közülük csak néhányat ismertünk itt. A teljes folyamat kulcsa egy elágazó adenzin nukleotid a lasszó „csomójánál”. Különlegessége, hogy három foszfodiészter-kötést képez a szokásos kettő helyett (l. a zárójeles részt a 9.37. ábrán). A számfeletti kötés az adenzin 2'-hidroxilcsoportja és az intron 5'-végén levő guanozin nukleotid 5'-foszfátja között jön létre. Ha sikerül a lasszó-szerkezetet RNÁzsal emészteni, akkor a végtermékek között meg kell jelennie az elágazásnak (branch):



Sharp munkacsoportja meg is találta ezt a feltételezett struktúrát.

A 9.38. ábra mai tudásunknak megfelelően mutatja be a lasszó-modell, feltüntetve az snRNP-ek szerepét a splicing egyes lépéseinél. Az első komplex, amely létrejön, az ún. **elkötelezettségi komplex** (commitment complex – CC), amely tartalmazza a még



9.37. ábra. A splicing lasszó-modellje. Az 1. lépésben az első exon (kék) és az intron közötti kötés felszakad, és az intron terminális guanozinja kötést létesít az intron belsejében lévő adenzinnal, egy lasszó alakú átmeneti formát képezve. Az elágazást képző nukleotid (A) pontosabb helyzete az intronon belül a jobb oldali zárójelben látható. A 2. lépésben az első exon (kék) hozzákapcsolódik a másodikhoz (sárga), a lasszó alakú intron (piros) pedig felszabadul

ép prekurzor RNS-t és a vele bázispárokat képző U1 RNS-t. A komplex, mint ahogy neve is mutatja, annak az intronnak a kivágására kötelezi el magát, amelynél összeáll. A következő lépésben ATP-ből származó energia felhasználásával az U2 bázispárok révén kapcsolódik az intronnak arra helyére, ahol a lasszó elágazása lesz, és kialakul az ún. **A-komplex**. Ezután az U5, valamint az U4 és az U6 komplexe kötődik, létrehozva a **B1-komplexet** (nincs ábrázolva). Az U4 ledisszociál az U6-ról, ezzel bázispárok alakulhatnak ki az U2 és az U6 között, ami a **B2-komplex** kialakulását jelenti. Ebben az U5 mindkét exonhoz kapcsolódik, és olyan helyzetbe hozza őket, hogy egy későbbi lépésben összekapcsolhatók legyenek. Majd az U6 lép az U1 helyére az 5'-splice-helynél. Ezután ATP felhasználásával megtörténik a splicing első lépése, ami elválasztja a két exont, és létrejön a lasszó alakú átmeneti forma. Az egész rendszer ilyenkor a **C1-komplexbe** szerveződik. Egy következő ATP felhasználásával lejátszódik a splicing második lépése, összekapcsolódik a két exon, kialakul a lasszó alakú intron, a **C2-komplex** komponenseivel. A következő lépésnél az érett mRNS kilép a komplexből, hátrahagyva az intront tartalmazó **I-komplexet**. Végül az I-komplex elemeire disszociál, amelyek beléphetnek egy másik splicing folyamatba, a lasszó alakú köztes termék lebomlik.

A lasszó-modellből érdekes kérdések adódnak: Mi lehet az előnye ennek a mechanizmusnak egy kevésbé bonyolulttal szemben? A válasz valószínűleg az, hogy ez a mechanizmus evolúciós maradvány. Látjuk majd, hogy egyes eukarióta RNS-prekurzorok képesek saját összeszerkesztésüket elvégezni, és az egyik ilyen csoportban a folyamat lasszó alakú köztes termék kialakulásával jár. A magasabb rendű eukarióták feltehetőleg alkalmazkodtak ehhez a mechanizmushoz, újabb fehérjék és RNS-ek bevonásával, amelyek végül átvehették a nukleáris pre-mRNS-ek szerkesztését.

Felmerül egy kérdés az első exon kihagyásával kapcsolatban is, hiszen anélkül válik el a prekurzor maradékától, hogy egy új kötést létesített volna a második exonnal. Ez pedig magában rejti az első exon elvesztésének veszélyét. A spliceosoma azonban

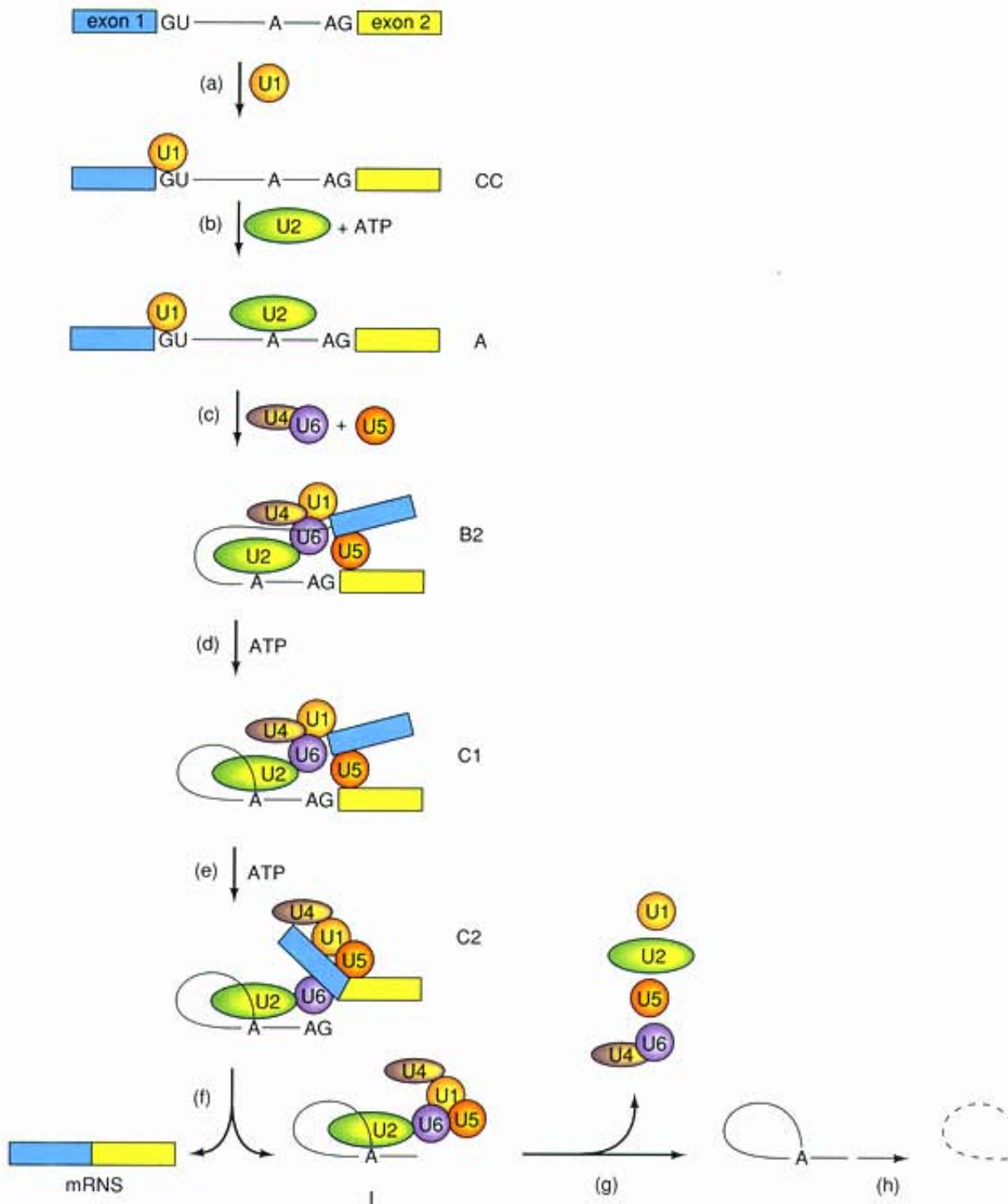
valószínűleg szorosan megkötöti az első exont, így az biztosan hozzákapcsolódhat a másodikhoz.

A kis nukleáris RNS-ek (snRNS) egyik csoportjának fontos szerepe van az mRNS-prekurzorok splicing folyamatában. Az U1 snRNS-nek például van olyan régiója, amely komplementer az mRNS-prekurzorok splice helyének konszenzus szekvenciáival. Ez az RNS *in vivo* bázispárosodásra képes az mRNS-prekurzorok 5'-splice-helyével. A splicing mechanizmusának lényege: az első exon és az intron közötti kötés felszakad, az intron terminális guanozinja kötést létesít az intron belsejében lévő adenzinnal, egy lasszó alakú átmeneti formát képezve. Ezután a két exon összekapcsolódik, és a még mindig lasszó alakú intron kiválik.

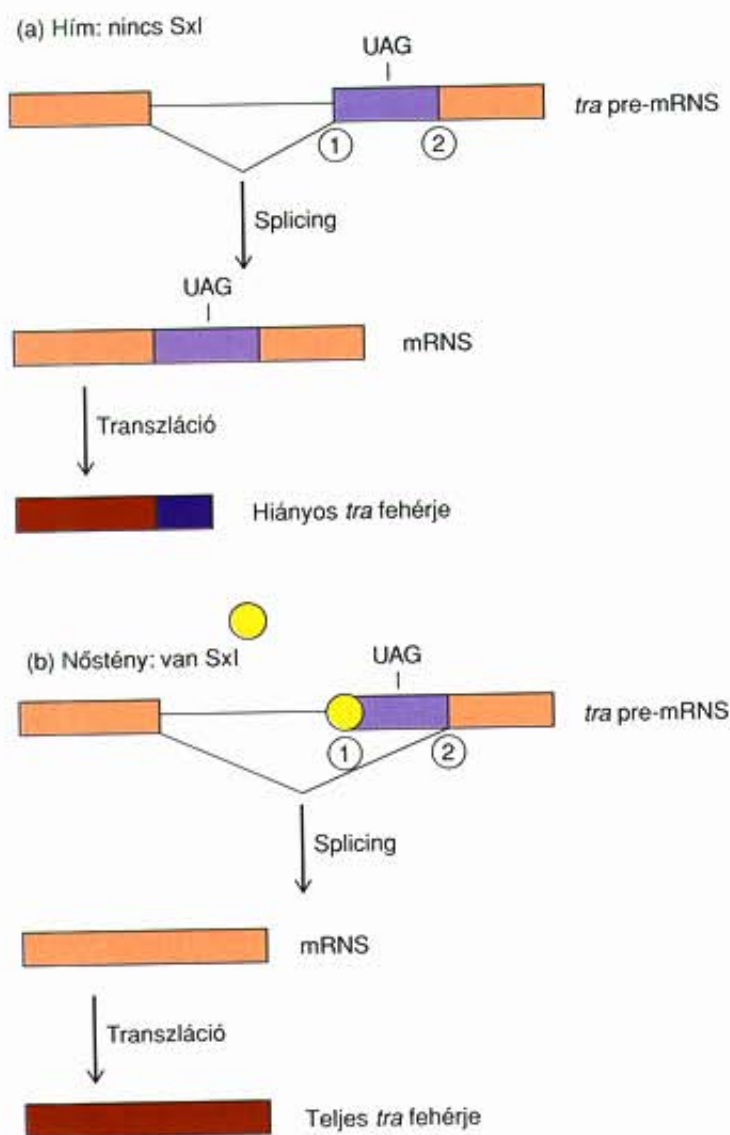
ALTERNATÍV SPLICING

Láttuk már, hogy a génekben alternatív splice-helyek, ún. kriptikus helyek találhatóak, amelyek használatára csak akkor kerül sor, amikor a normális helyek mutációval megváltoznak. Van azonban olyan gének is, amelyeknek valódi alternatív splice-helyeik vannak, amelyek a génműködés szabályozására szolgálnak. Amikor a splicing a pre-mRNS egyik helyén következik be, akkor egy adott fehérjetermék képződik, míg az alternatív helyen fellépő splicing, más fehérjét eredményez, esetleg egyáltalán nem képződik protein.

Jó példa erre a *Drosophila* ivarmeghatározásának szabályozása. Az egyed nemét az ecetmuslicánál több alternatív splicing lépést is magában foglaló folyamatsor alakítja ki. Az első lépések egyikében szerepet játszik a *Sex letális (Sxl)* gén terméke, amely irányítja saját pre-mRNS-ének splicing folyamatát, és a reakció-



9.38. ábra. A snRNP-ek szerepe a splicing folyamatában. (a) Az U1 RNS (narancssárga) bázispárok révén kötődik a pre-mRNS 5'-splice-helyéhez, és létrejön az elkötelezettségi komplex (CC). (b) Az U2 (zöld) ATP felhasználásával alakít ki bázispárokat az intronnak azzal a részével, amelyikben az elágazást kialakító adenzin található. Így létrejön az A-komplex. (c) Az U4 (barna) és az U6 (lila) bázispárokkal kapcsolódik, majd kötődik a komplexhez. Az U4 disszociál az U6-ról, ezután bázispárokat alkot az 5'-splice-hellyel, felváltva az U1-et. Ezzel egyidejűleg az U5 (piros) kötődik az exonok végéhez, és a megfelelő helyzetbe igazítja őket. Ennek eredménye a B2-komplex. (d) Felszakad az első exon (kék) és az intron közötti kötés, létrejön a lassó alakú közttes forma. A folyamathoz ATP szükséges, végeredménye a C1-komplex kialakulása. (e) A két exon összekapcsolódik, a lassó alakú intron kiválik. Ebben az állapotban még mindegyik komponens ugyanannak a C2 komplexnek a része. A folyamat itt is ATP-t igényel. (f) Az érett mRNS az összekapcsolódott exonokkal leválik, a lassó alakú intron az snRNP-ekhez kapcsolódik az I-komplexben. (g) A lassó alakú intron kiválik, felnyílik és lebomlik (h)



9.39. ábra. Az *Sxl* hatása a *tra* pre-mRNS splicingjára. (a) A hímekben nincs *Sxl* fehérje. A *tra* pre-mRNS mindkét (1 és 2) 3'-splice-helye hozzáférhető, ezért a közelebbi (vagyis az 1.) szerepel a folyamatban. Így működésképtelen *tra* mRNS keletkezik, mert tartalmaz egy korai transzlációs stopjelet (UAG), ami megakadályozza a második exon transzlációját. Tehát csak hiányos fehérjetermék képződik, a *tra* nem működik. (b) A nőstényekben van *Sxl* fehérje, ami hozzákapcsolódik az első 3'-splice-helyhez, ezzel azon a ponton megakadályozza a splicing folyamatát. Így csak a 2. helyen következhet be splicing, ami működőképes *tra* mRNS-t és fehérjét eredményez. Vagyis az *Sxl* szabályozza a *tra* működését, mégpedig a pre-mRNS splicing irányításával

út következő génjének, a *transformer (tra)* gén mRNS prekursorát is. A folyamatot a 9.39. ábra szemlélteti.

A *tra* mRNS prekursora kétféle módon alakulhat át. Az egyik mechanizmussal képződő mRNS hosszú kódoló régiót tartalmaz, amelynek fehérjeterméke működőképes. A másik splicing eredményeként korai stop kodon (UAG) alakul ki, ami meggátolja az aktív fehérje keletkezését. Úgy tűnik, hogy az *Sxl* gén terméke befolyásolja a *tra* pre-mRNS splicing folyamatát, méghozzá a 3'-splice-helyhez való kapcsolódásával, amivel azon a helyen gátolja a splicing

lejátszódását. Emiatt a splicing a következő alkalmas helyre „kényszerül”, és ezzel aktív *tra* termék keletkezhet. Ez a folyamat a nőstényekben játszódik le. Ugyanakkor a hímekben nem termelődik az *Sxl* terméke, ezért a 3'-splice-hely hozzáférhető marad, és ott következik be a splicing. Emiatt a *tra* nem hatékonyan működik a hímekben. Vagyis a hímnem kialakulása egy „hiba” következménye a *Drosophilánál*. Ennek az állapotnak a megváltoztatásához a nőstényekben működni kell a *tra* génnek, ami viszont az *Sxl* működését igényli.

Az rRNS self-splicing folyamata

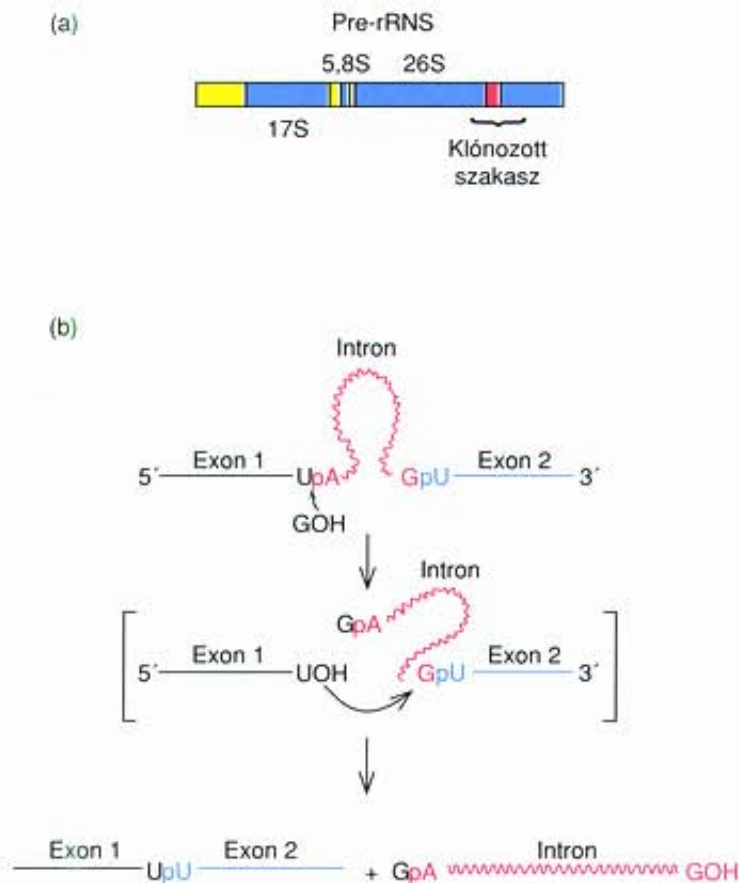
Ahogy azt a későbbiekben még látjuk, az eukarióták nagy rRNS-eit egyetlen közös gén kódolja. Vagyis az 5,8S, a 18S és a 28S rRNS vagy megfelelőik együtt, egyetlen prekursorba íródnak át, amely azután hasításra kerül, más szóval **processzálódik**, és kialakulnak az érett RNS-molekulák. Ennek a folyamatnak része a 18S és a 28S rRNS-ek közötti elválasztó szakasz eltávolítása, ami azonban nem intron, és eltávolítása nem splicing. A különbség abban áll, hogy a két RNS a processzálódás után független marad, nem kapcsolódnak össze, mint az exonok. Mindemellett, a *Tetrahymena* egysejtű rRNS prekursorának 26S részében (az emlősök 28S rRNS-ének megfelelője) van egy intron, amelynek splicing folyamata egészen különleges: az RNS szerkeszti össze, enzimek segítségével nélkül!

A 9.40.(a) ábrán látható a *Tetrahymena* rRNS prekursora. Az eltávolítandó köztes szakaszok mellett 17S, 5,8S és 26S szekvenciák szerepelnek benne. A 26S régió belül van egy intron is. A molekula processzálódásának vizsgálatára Thomas Cech és munkatársai klónozták a gén darabját (az ábrán kapcsos zárójellel jelölve), és az *E. coli* RNS-polimerázával átírták a fragmentumot. Így előállították az intront tartalmazó RNS-darabot. És mindenki legnagyobb meglepetésére ez a kis RNS-szakasz képes volt önmaga szerkesztésére (self-splicing).

A 9.40.(b) ábra vázolja a splicing lényegét. Az első lépésben egy guanozin nukleotid (GMP) támadja meg az intron 5'-végét felszakítva az exon/intron kötést. Majd az első exon 3'-vége támadja meg a második exon 5'-végét, a két exon összekapcsolódik (splicing lépés), és az intron lineáris formában lehasad. Az intron határoló régiói egyáltalán nem hasonlítanak a nukleáris mRNS-ek intronjaihoz.

A *Tetrahymena* sejtmagjainak nukleáris rRNS prekursora és az élesztő mitokondriális rRNS prekursora az ún. **I. introncsoport** tagja. Az ide sorolt prekursorok mindegyike guanozin nukleotid segítségével self-splicingra képes, az első lépést a nukleotid indítja be. Az intronok másik csoportja, a **II. introncsoport** tagjai, szintén képesek self-splicingra, de a reakció kezdőlépése nem igényel guanozint. Helyette az RNS intronján belül elhelyezkedő adenozin vesz részt a kezdőlépésben. Amikor ez megtámadja az intron és az első exon közötti kötést, kialakul a lasszóforma, ugyanúgy, ahogy azt a nukleáris mRNS splicing folyamatában láttuk.

Mindig könnyebben hihető az, amit saját szemünkkel látunk. Ez esetben Amberg és munkatársai készítettek elektronmikroszkópos felvételeket (9.41. ábra), amelyek igazolják a II. introncsoport lasszó alakú köztes termékét (intron és a 2. exon) és a terméket (intron). A bemutatott RNS-ek az élesztő egyik rRNS-ének splicing folyamatából származnak. Nem az élesztő sejtmagjában található rRNS prekursorról van szó, hanem a mitokondriális eredetű RNS-ről.



9.40. ábra. A *Tetrahymena* rRNS prekursor self-splicing folyamata. (a) Az rRNS prekursorban szerepel a 17S, az 5,8S és a 26S szekvencia. A 26S régió belül egy intron található (piros). A kísérletben vizsgált klónozott szakaszt kapcsos zárójel jelöli. (b) A self-splicing vázlatos áttekintése. Az első lépésben egy guanozin nukleotid támadja meg az intron 5'-végénél lévő adenint, és leválasztja az 1. exont (fekete) a molekula többi részéről. Ezzel kialakul az ábra középső részén, zárójelben látható hipotetikus köztes termék. A második lépésben az 1. exon (fekete) megtámadja a 2. exont (kék). Megtörténik a splicing, a lineáris szerkezetű intron kiválik a molekulából, a két exon összekapcsolódik. Végül, egy itt nem részletezett reakcióssal az intron 5'-végéről lehasításra kerül 19 bázis

A fő különbség a nukleáris mRNS prekursorok és a II. intron-csoportba tartozó RNS-ek között az, hogy az utóbbiak önmaguk végzik el a splicing lépéseit, spliceosoma nélkül. Milyen génekben vannak a II. csoportba sorolható intronok? Egyes fehérjéket kódoló, mitokondriális géneknek vannak ilyen intronjaik. A 9.42. ábra mindhárom introncsoport splicing mechanizmusát összegzi.

A self-splicingra képes RNS-ek azon kívül, hogy felkeltik a molekuláris biológusok képzeletét, egy sor érdekességgel bírnak. Ezek közül az egyik, hogy enzimeként működnek, legalábbis annyiban, hogy katalitikus aktivitásuk van. Az 1980-as évek előtt széles körben elfogadott nézet volt, hogy a biológiai rendszerek molekulái közül csak a fehérjéknek van ilyen képességük. A katalitikus hatású RNS-ek létezése segíthet az élet eredetének tisztázásában. Ha feltételezzük, hogy csak a fehérjék működhetnek enzimeként, az élet eredetének kérdése hasonlítana a „22-es csapdájához”: az első szervezeteknek fehérjékre volt szükségük, amelyek katali-



9.41. ábra. A splicing lasszó alakú köztes és végterméke. Az élesztő mitokondriális rRNS splicing folyamatának köztes és végtermékei közvetlen bizonyítékai a lasszóforma létezésének. (fent) Két lasszó alakú intron. (lent) Lét lasszó formájú köztes termék, amelyek az intronból és a második exonból állnak

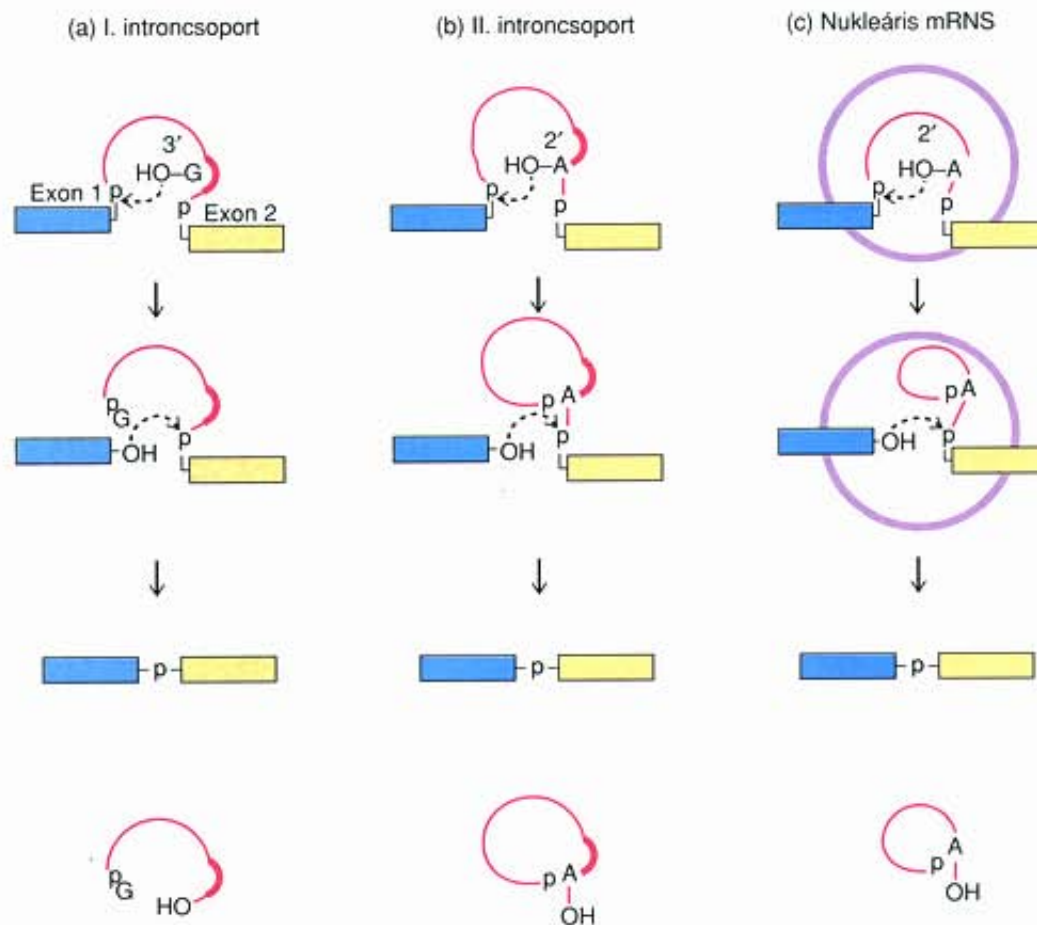
Forrás: Arnberg, A., Van der Horst, G. és Tabak, H. F.: Cell, 144/2, 01, 1986, © Cell Press

zálták géneik replikációját, de nem voltak képesek fehérjéket szintetizálni katalizátorok nélkül. A katalitikus hatású nukleinsavak segítenek feloldani ezt a paradoxont: az élet legkorábbi formáiban az RNS mind a genom, mind a katalizátor funkciót elláthatta.

Az egysejtű *Tetrahymena* rRNS prekursora a molekula 26S részében egy intront tartalmaz. Ennek az I. csoportba tartozó intronnak a splicing lépéseit *in vitro* maga a prekursor is elvégezheti. A mechanizmusban szerepel egy sor foszfodiészter-kötés felbontása és létrehozása, aminek eredménye az exon-exon kötés kialakulása, és az intron lineáris molekula formájában történő kihalás. A II. introncsoport tagjainak splicingja szintén autokatalitikus. Az első lépésben egy intronon belüli nukleotid megtámadja az 5'-exon/intron határon levő nukleotidot. A folyamat lasszó alakú átmeneti forma, majd végtermék kialakulásával jár.

AZ RNS ÉRÉSÉNEK MÁS ESEMÉNYEI

A splicing az egyik esemény, ami az RNS szintézise és citoplazmába való kijutása között történik, hogy ott részt vegyen a fehérjeszintézisben. Ebben az ún. **poszttranszkripció**s periódusban egy sor más folyamat is történik. Ezek közül néhány speciálisan az mRNS-ekre, az rRNS-ekre vagy a tRNS-ekre jellemző, míg mások mindhárom



9.42. ábra. A splicing három típusának összefoglalása. A három mechanizmus leginkább az első lépésben különbözik. Az I. intron csoport tagjainak self-splicing folyamatát (a) egy guanozin nukleotid kezdi el, amely valószínűleg az intron zsebhez hasonló konformációjú részében helyezkedik el (vastagított félkör). Ez a guanozin támadja meg az 1. exont (kék) és az intront (piros) összekapcsoló foszfátot. A II. intron csoportban (b) egy olyan adenozin nukleotid kezdi a folyamatot, amely magának az intronnak a része, és működése egy lasszó alakú köztes termék kialakulásával jár. Az adenozin az I. intron csoport zsebszerű részéhez hasonló konformáció közvetlen szomszédságában található. A nukleáris mRNS-ek prekurzorainak (c) splicing folyamata feltűnően hasonló a II. csoportéhoz. A legfontosabb eltérés, hogy az átalakulás az ún. spliceosoma (lila) jelenlétében történik.

RNS-típusra. Minden ilyen esemény az **RNS-érés** része. Az érési folyamatba tartozik: (1) az RNS prekurzorok hasítása a kódoló régió kívüli szakaszokban; (2) Az RNS metilálása (metilcsoportok rákapcsolása); (3) Nukleotidok ráépítése a 3'-végre; (4) Az mRNS-ek 5'-végeinek védelme ún. cap (sapka) kialakításával.

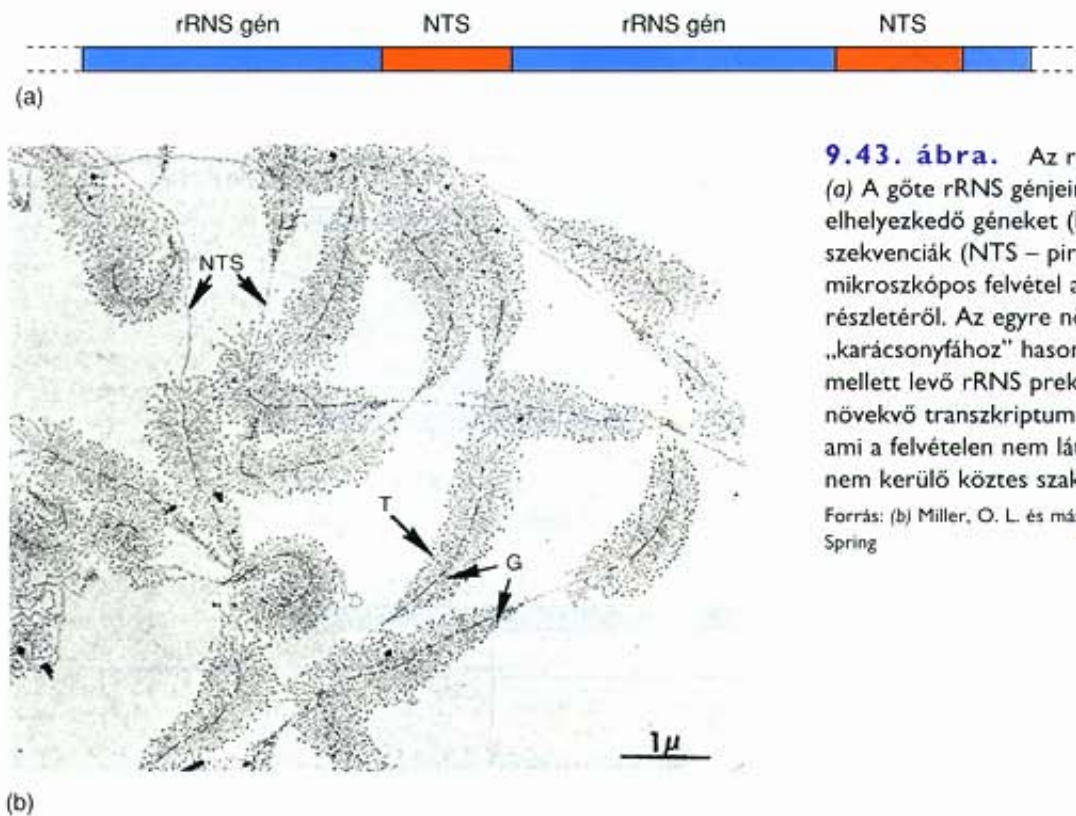
A RIBOSZOMÁLIS RNS-PREKURZOROK RÖVIDÍTÉSE

Az eukarióták rRNS génjei több százszoros ismétlésben fordulnak elő, és a sejtmagvacskában tömörülnek. Elrendezésüket sokat tanulmányozták kétéltűek sejteiben (9.43.(a) ábra). Eszerint az ismétlődő géneket át nem íródó köztes szakaszok választják el egymástól. Ezek a régiók nem azonosak azokkal a köztes szekvenciákkal, amelyek átíródnak az rRNS prekurzorok részeként, majd pedig hasításra kerülnek a prekurzor rRNS-sé érése során.

Az a tény, hogy az ismétlődő rRNS-gének a sejtmagvacskában csoportosulnak, megkönnyíti lokalizálásukat. Ezt használták ki Oscar Miller munkatársai a génműködés megfigyelésére. Kétéltűek sejtmagjait tanulmányozták elektronmikroszkóppal, és ér-

dekes eredményre jutottak (9.43.(b) ábra). A felvételen, az rRNS-géneket tartalmazó DNS tekervényei között jól láthatók a jellegzetes, karácsonyfára emlékeztető struktúrák. Ezek törzsét az rRNS-gének alkotják, az ágakat pedig az egyre hosszabb rRNS-transzkriptumok. Ne feledjük, hogy a transzkriptumok valójában az rRNS prekurzorai, nem az érett rRNS-molekulák (részletesen később). A „karácsonyfák” közötti fonalrészek természetesen az át nem íródó köztes szakaszok. A transzkriptumok hosszából a transzkripció iránya is meghatározható, a gén kezdeténél a rövidebb, a végénél pedig a hosszabb RNS-ek vannak.

A riboszomális és a transzfer RNS-eket helyenként *stabil* RNS-eknek is nevezik, mert jóval hosszabb ideig fennmaradnak a sejtben, mint az mRNS-ek. Néha célravezető az rRNS-ek és a tRNS-ek egy csoportban való tárgyalása, mert több szempontból is eltérően viselkednek az mRNS-től. Ilyen például az érési folyamatuk. Az rRNS-ek és a tRNS-ek olyan prekurzorok formájában szintetizálódnak, amelyek átalakulása sokszor splicingot igényel, de emellett végeiken, sőt néha még belsejükben is vannak fölösleges, eltávolításra váró nukleotidok az érett RNS-szekvenciák (pl. 5,8S, 18S, 28S rRNS) kialakulásáig.



9.43. ábra. Az rRNS prekursor gének átírása.

(a) A göte rRNS génjeinek egy csoportja, ahol a felváltva elhelyezkedő géneket (kék) átírásra nem kerülő köztes szekvenciák (NTS – piros) szakítják meg. (b) Elektronmikroszkópos felvétel a göte sejtmagvacskájának egy részletéről. Az egyre növekvő elsődleges transzkriptumok (T) „karácsonyfához” hasonló mintázatot hoznak létre az egymás mellett levő rRNS prekursor géneken (G). Minden egyes növekvő transzkriptum alapjánál egy-egy RNS-polimeráz I van, ami a felvételen nem látható. A géneket transzkripcióra nem kerülő köztes szakaszok (NTS) választják el egymástól

Forrás: (b) Miller, O. L. és mások: *Symposia on Quantitative Biology*, 35-506, 1970, © Cold Spring

A gerincesek rRNS prekursorai sokkal jellemzőbbek, mint amilyenek a *Tetrahymena* sejtjeiben találhatóak, mert nincs bennük intron. A 9.44. ábra az ember 45S rRNS prekursorának szerkezetét és érésének folyamatát szemlélteti. A molekula átíródó köztes szakaszok közé ágyazva 28S, 18S és 5,8S szekvenciákat tartalmaz. A prekursor érése a sejtmagvacskában történik. Az első lépés az 5'-végnél található szekvencia lehasítása, amellyel egy 41S intermedier keletkezik. Ezt követi a 41S RNS két darabra vágása, aminek eredménye egy 32S és egy 20S termék. Az előbbi tartalmazza a 28S és az 5,8S, az utóbbi pedig a 18S szekvenciákat. Végül a 32S prekursor egymás között bázispárokat kialakító érett 28S és 5,8S rRNS-re hasad, a 20S prekursor pedig érett 18S rRNS-re rövidül.

A pontos lépései a folyamatnak nem általánosak; az egérnél kissé eltérőek, a békák prekursora pedig csak 40S, valamivel kisebb, mint 45S. Mégis az rRNS-érés alapvető mechanizmusa, beleértve az érett szekvenciák sorrendjét a prekursorban, konzerválódott az eukarióták országaiban.

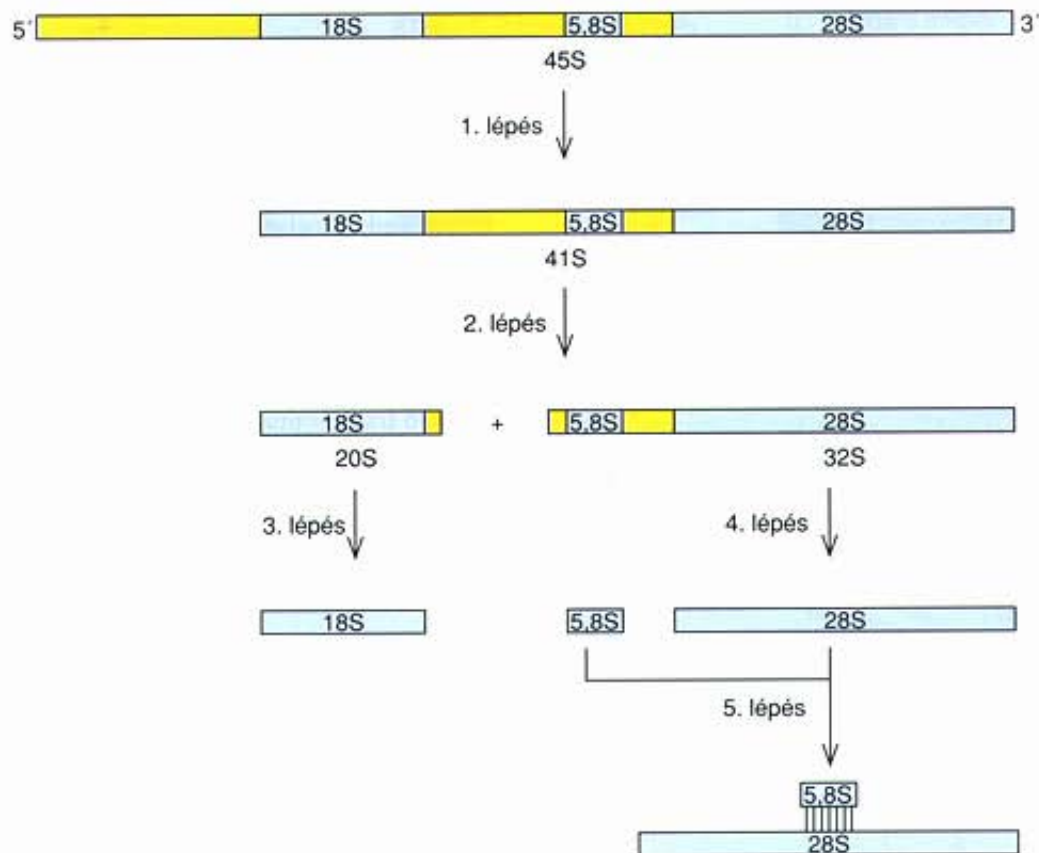
A POLI(A)-VÉGEK

Már láttuk, hogy a hnRNS az mRNS prekursora. Az egyik olyan felfedezés, amely alátámasztotta a két RNS közti kapcsolatot, az volt, hogy mindkét molekula ugyanolyan különleges szekvenciát hordoz 3'-végén, nevezetesen egy hosszú poli(A)-láncot. Sem az rRNS-en, sem a tRNS-en nem található ilyen poli(A)-fárok. A poli(A)-fárok szerkezetét és RNS-hez való kapcsolódását a poliadeniláció során James Darnell és munkatársai az elsők között vizsgálták. Ribonukleázos kezeléssel sikerült leválasztaniuk az ép poli(A)-szakaszt az mRNS többi részétől. A

hasításhoz kétféle enzimet használtak: a ribonukleáz A a pirimidin nukleotidok (C és U) után hasít, a ribonukleáz T1 pedig a G után. Vagyis minden nukleotid után hidrolizálták az RNS-t, kivéve azokon a helyeken, ahol több adozin kapcsolódott össze. Elektroforézissel meghatározták az így kapott poli(A)-fragmentumok méretét, ami átlagosan 150-200 nukleotidnak felelt meg. Mindez egyben azt is jelenti, hogy a poli(A)-szakaszt nem szakítja meg másféle nukleotid, mert különben az RNázok elbontották volna.

Bizonyos, hogy a poli(A)-fárok az mRNS vagy a hnRNS 3'-végéhez kapcsolódik, mert nagyon gyorsan leválasztható egy olyan enzimmel, amely a 3'-végnél kezdi hidrolizálni a molekulát. Tény, hogy a poli(A)-fárok a transzkripció után kerül az RNS-re, mert a DNS-ben nincsenek ilyen hosszú poli(T)-régiónok. A sejtmagban van egy enzim, a poli(A)-polimeráz, amely egyesével AMP-részleteket kapcsol az mRNS prekursoraihoz, ha azok már teljesekek. Tudjuk, hogy a poli(A)-fárok az mRNS prekursoraira kerül rá, mert a hnRNS-ben már megtalálható. Ha közelebbről megvizsgáljuk, az is kiderül, hogy speciális, splicingra nem kerülő mRNS prekursorok (pl. egér globin 15S mRNS prekursor) hordozzák a poli(A)-véget. Amikor egy mRNS belép a citoplazmába, poli(A)-farkát RNázok állandóan hidrolizálják, a citoplazmatikus poli(A)-polimeráz pedig újraépíti.

A legtöbb mRNS tartalmaz poli(A)-véget. Az egyik nevezetes kivétel a hiszton mRNS, amelyik kimutatható poli(A)-fárok nélkül is ellátja feladatát. A poli(A)-fárok csaknem univerzális előfordulása arra utal, hogy fontos szerepe van. De vajon mi lehet az? A legvalószínűbb, hogy a poli(A)-fárok védi a reakcióképes mRNS-t a lebontástól, a sejtben levő ribonukleázoktól.



9.44. ábra. Az ember 45S rRNS prekursor érési folyamata (HeLa-sejtből). 1. lépés: A 45S rRNS prekursor 5'-végének eltávolításával 41S prekursor alakul ki. 2. lépés: A 41S prekursor két részre hasad. Az így keletkező 20S méretű szakaszban van a 18S rRNS, a 32S méretű részben pedig a 28S és az 5,8S rRNS. 3. lépés: A 20S prekursor 3'-végének eltávolításával kialakul az érett 18S rRNS. 4. lépés: A 32S prekursorból felszabadul az 5,8S és a 28S rRNS. 5. lépés: Az 5,8 S és a 28S rRNS bázispárokkal kapcsolódik egymáshoz

Másik funkciója, hogy serkenti az mRNS-ek translációját. Egyes mRNS-ek egyáltalán nem kerülhetnek translációra addig, amíg poliadeniláltak.

A legtöbb eukarióta mRNS-re jellemző egy átlagosan 150-200 nukleotid hosszú poli(A)-farok a molekula 3'-végén, amit a poli(A)-polimeráz épít az mRNS prekursorára a sejtmagban. A poli(A)-farok az mRNS-en marad a splicing és a citoplazmába történő transzport során. Védi az mRNS-t a lebontástól, és számos esetben serkenti a translációt.

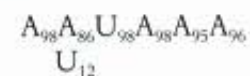
A POLIADENILÁCIÓ

Ésszerűnek tűnik az a feltételezés, hogy a poli(A)-polimeráz közvetlenül a transzkriptum elkészülte után rákapcsolja a poli(A)-szakaszt a 3'-végre. Rendszerint azonban nem ez történik. A poliadeniláció folyamata általában az mRNS prekursor hasításával jár, még a transzkripció befejeződése előtt. A poli(A)-farok pedig az újonnan keletkezett 3'-véghez kapcsolódik (9.45. ábra). A várakozásokkal ellentétben tehát, a poliadeniláció nem szükségszerűen jár együtt a transzkripció lezárásával. A polimeráz II még hosszabbíthatja az RNS-láncot, amíg el nem éri a terminációs jelet, ez alatt a poliadeniláló apparátus talál valahol egy

poliadenilációs jelet, elmettzi a még növekvő RNS-t, és poliadenilálja.

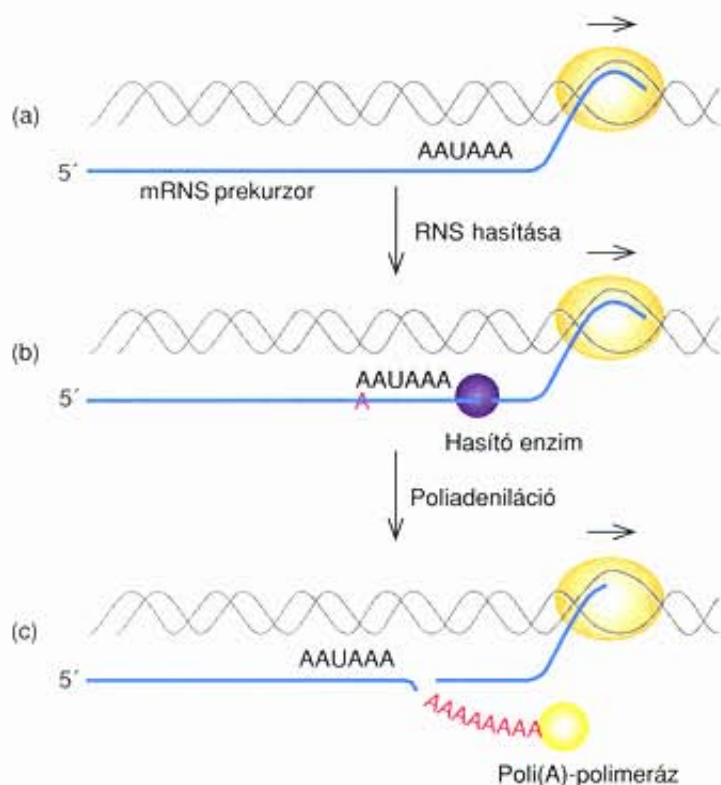
Milyen a felépítése egy poliadenilációs jelnek? A transzkriptumban egy konszenzus szekvencia található, körülbelül húszbázisnyira a poliadenilációs hely fölött (upstream). A magasabbrendű eukariótákban általában AAUAAA, bár vannak eltérések, főleg az AAUAAA szekvencia fordul elő.

Amikor összehasonlították 269 különböző mRNS bázisszekvenciáját, az alábbi gyakorisággal találtak „szabályos” bázisokat a konszenzus szekvenciákban:



Más szóval, kismértékben eltérő szekvenciák még elviselhetők, a leggyakoribb köztük az AAUAAA, ami a poliadenilációs jelek mintegy 12%-ában található. A legtöbb poliadenilációs jel másik része egy GU-ban gazdag szekvencia, éppen a poliadenilációs hely alatt (downstream). Ez a szekvencia természetesen csak a szál hasításában fontos, mert a poliadeniláció megkezdése előtt leválik.

De mit tudunk az eukarióták terminációs jeleiről vagy terminátorairól? Sajnos kevés ismerettel rendelkezünk ezekről a szekvenciákról. A nehézséget az jelenti, hogy a legtöbb polimeráz II transzkriptum terminációja felületes; a termináció különböző helyeken történhet, több száz vagy akár több ezer bázis



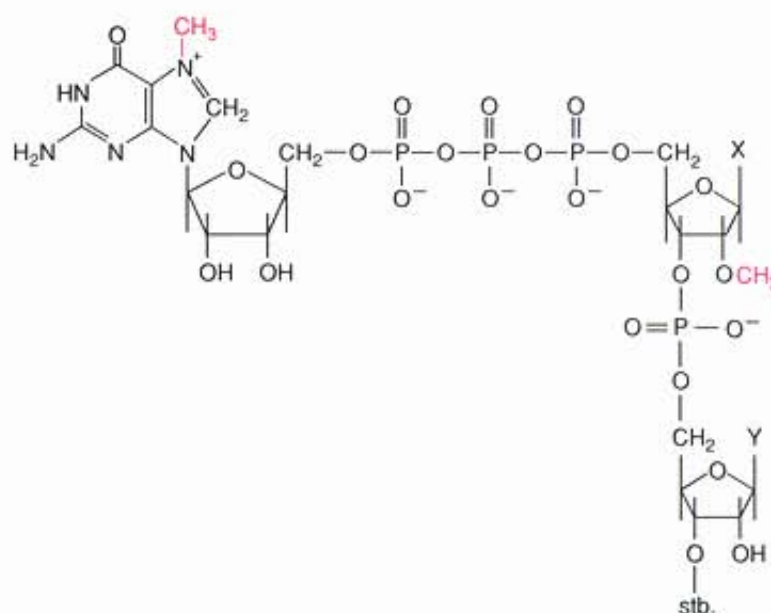
9.45. ábra. A poliadeniláció. (a) Az mRNS prekuzort (kék) szintetizálja az RNS-polimeráz II (narancssárga). (b) A hasító enzim (lila) felismeri a poliadenilációs jelet (AAUAAA) és körülbelül húsz bázissal lejjebb elvágja a növekvő RNS-láncot. (c) A poli(A)-polimeráz (sárga) AMP-egységeket (piros) kapcsol az új 3'-véghöz, miközben az átírás tovább halad. A transzkriptumnak az a része, amely a poliadenilációs hely mögött volt, valószínűleg lebomlik

hosszú szakaszon. Ez minden bizonnyal nem probléma, mivel az eukarióták rendelkeznek olyan hasító és poliadenilációs rendszerrel, amely rendbe teszi az mRNS-ek 3'-végét.

A poliadeniláció a transzkriptum hasításával történik a 3'-vég felett, sokszor még a transzkripció alatt. Ezután az újonnan keletkezett 3'-végre poli(A)-farok épül. A hasítás és a poliadeniláció jele – legalábbis a magasabb rendű eukariótákban – az AAUAAA konszenzus szekvencia, valamint egy GU-ban gazdag szakasz a hasítási pont alatt. A polimeráz II által átírt gének terminációs jeleit még nem sikerült azonosítani.

SAPKAKÉPZŐDÉS AZ EUKARIÓTA mRNS-EN

Az eukarióták mRNS-e nemcsak 3'-végében különbözik prokarióta megfelelőjétől, 5'-végén „sapka” (cap) található. A sapka szerkezete kismértékben változhat, jellemző felépítését a 9.46. ábra szemlélteti. Tartalmaz egy metilált guanozin nukleotidot, amely egy trifoszfát kapcsolódásával kerül az utolsó előtti

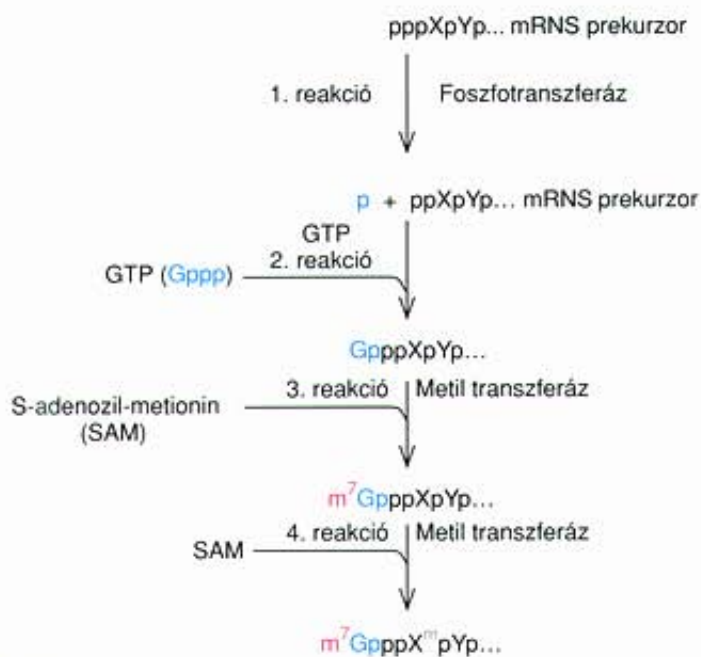


9.46. ábra. Egy mRNS 1. típusú sapkájának szerkezete. A sapka metilcsoportjai piros színűek. Az X és az Y a második, illetve a harmadik nukleotidon lévő bázisokat jelenti. A 0. típusú sapkán nincs metilcsoport az utolsó előtti ribózon. A 2. típusú sapkán (ritka) megtalálható az 1. típusú sapka mindkét metilcsoportja, valamint még egy az Y bázishoz kapcsolódó ribózon

nukleotidra. Gyakran az utolsó előtti nukleotid is metilált, de ennek metilcsoportja nem a bázison, hanem a ribóz 2'-hidroxilcsoportján van.

A sapkaképződés folyamatát a 9.47. ábra mutatja be. A növekvő RNS 5'-végén a prokarióta mRNS-hez hasonlóan trifoszfát-csoport van. Mielőtt még az RNS elérné az 50 bázis hosszúságot, egy enzim GTP-t kapcsol 5'-végre. Ez a reakció több vonatkozásban is eltér a szabályos RNS-polimeráz reakciótól: (1) A nukleotid az mRNS-nek nem a 3'-végehez, hanem az 5'-végehez épül be; (2) Az egyszerű foszfodiészter-kötés helyett trifoszfát-kötés jön létre a két végállású nukleotid között; (3) A trifoszfát nem egy nukleotid 3'-végét kapcsolja össze egy másik nukleotid 5'-végével, hanem két végállású nukleotid 5'-pozícióit köti össze. Így a sapka utolsó nukleotidja „háttal áll” a növekvő RNS-láncnak. A sapkaképződést lezáró metilációt két enzim, a **metil transzferázok** katalizálják. Az **S-adenozil-metionintól** (SAM) származó metilcsoportot szállítják a megfelelő helyre. Szigorúan véve a sapkaképződés nem poszttranszkripciósi folyamat, hiszen az átírás teljessé válása előtt elkezdődik. Helyesebb lenne „kotraskripciósi” folyamatnak tekinteni.

Yasuhiro Furuichi és Aaron Shatkin munkatársaikkal 1974-ben fedezték fel ezt a struktúrát egy víruseredetű mRNS-ben. Ahogy az a váratlan felfedezések esetén gyakran előfordul, a kutatók vizsgálni kezdték, hogy általános jelenség-e, vagy pedig csak ritka kivétel. Kiderült, hogy a sapka az eukarióták körében általánosan elterjedt. Mi lehet ezeknek a széles körben elterjedt struktúráknak a funkciója? Furuichi két fontos szerepüket mutatta ki. Először is, a poli(A)-farokkal együtt védik az mRNS középső, érzékeny szakaszát a ri-



9.47. ábra. A sapkaképződés és a metilálás mechanizmusa. 1. reakció: Egy nukleotid foszfortranszferáz eltávolítja az 5'-terminális foszfátot az mRNS prekuzorról. 2. reakció: Egy GTP kapcsolódik az mRNS prekuzor végéhez. A kézzel kiemelt p azt jelzi, hogy a GTP-nek csak egy foszfátcsoportja szerepel a sapkában. 3. reakció: A metil transzferáz a terminális guanozin N7-es pozíciójára egy metilcsoportot kapcsol az S-adenozil-metioninról (SAM). 4. reakció: Egy másik metil transzferáz (szürke) metilálja az utolsó előtti nukleotid 2'-hidroxilcsoportját

bonukleázok ellen. Másodszor, a sapka részt vesz az mRNS riboszómához való kötődésében is. Hiányában az mRNS translációja lassú, ha egyáltalán megtörténik.

Az eukarióta mRNS-ek 5'-végét egy sapkának (cap) nevezett struktúra zárja le, melyet egy speciális enzim GTP felhasználásával, 5'-5' trifoszfát-kötéssel kapcsol az utolsó előtti nukleotidhoz. Ezután a metil transzferázok metilcsoportokat kötnek a terminális guanozinhoz (N7) és az utolsó előtti ribóz 2'-hidroxiljához. A sapkák kettős célt szolgálnak: védik az mRNS-t a lebontástól, és lehetővé teszik kapcsolódását a riboszómákhoz, ahol megtörténik a transláció.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Az alábbiakban egy RNS-polimeráz II enzimre specifikus hipotetikus emlősgén néma szálának szekvenciája látható:

5'GAATGTATAAATGCGCAATCGAACGTGACATCGTCCTTG
CCTGA

Azonosítsa a legvalószínűbb transzkripció kezdőpontot (a sapka kapcsolódásának helyét)!

MEGOLDÁS

Először keresse meg a TATA-boxot. Van egy olyan szekvencia (TATAAAT) az 5'-vég közelében, amelyik nagyon hasonló a TATA-box konszenzus szekvenciájához (TATAAAA). Mivel emlősgénben az RNS-polimeráz II enzim által átírt gén sapka-kötőhelye általában 30 bázissal lefelé (3'-irányban) található a TATA-box közepétől, haladjon 25 bázisnyit a szekvencia középső része felé. Ezzel a CTTGCCT szekvenciához ér, ahol a vastagon szedett G pontosan a 25-ik bázis a TATA-box közepétől számítva. Mivel az átírás legnagyobb valószínűséggel egy purinnal kezdődik, valószínűleg ez lesz a kezdőpont, bár a lejjebb fekvő G és A szintén szóba jöhet, mint alternatív kezdőhely egy valódi génben.

2. FELADAT

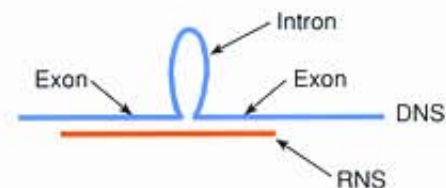
Egy egyszerű, egyetlen intront tartalmazó gén szerkezete az alábbi:



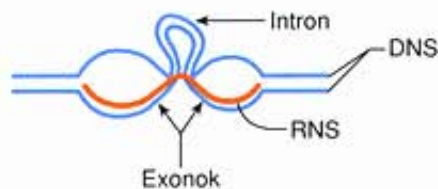
A négyzetek az exonok, a vonal az intron. Hibridizálthatjuk a gén DNS-ét (beleértve a gént határoló szekvenciákat is) a génről készült mRNS-sel, majd megvizsgálhatjuk a hibridet elektronmikroszkóppal. A következőkben (a)-(d) vázlatosan ismertesse, milyenek lehetnek a hibridek! Jelölje meg a hibrid molekulában az RNS-t és a DNS-t, valamint mutassa meg az exonok és az intron helyét! Hagyja figyelmen kívül az (a)-(c) részben a poli(A)-véget! (a) Milyen lenne a hibrid, ha a hibridizációt egyfonalas DNS-sel és érett mRNS-sel végzik? (b) Milyen lenne a hibrid, ha kétfonalas DNS-sel és érett mRNS-sel végeznénk? (c) Hogyan nézne ki a hibrid kétszálú DNS-sel és splicingon át nem esett mRNS prekuzorral? (d) Milyen lenne a (c) kérdés szerinti hibrid, ha figyelembe vesszük az mRNS prekuzoron a poli(A)-véget?

MEGOLDÁS

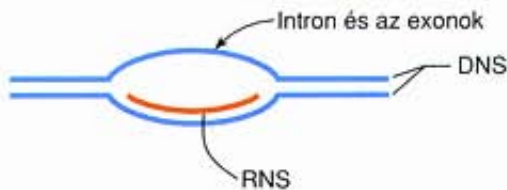
(a) Mivel az intron már eltávolításra került az mRNS-ből, az egyfonalas DNS-ben meglévő intron nem tud hibridizálódni, kihurkolódik:



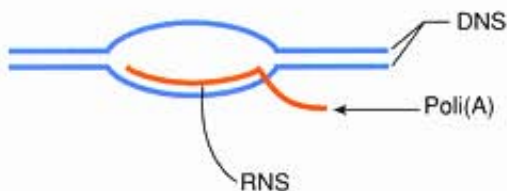
(b) Mivel az intron a splicing során eltávolításra került az mRNS-ből, a kétszálú DNS intronja nem tud hibridizálódni, ezért kihurkolódik. A kétszálú intron mindkét oldala kihurkolódik. Látható, hogy az RNS hibridizálódik a DNS egyik szálával, úgy, hogy helyet cserél a másik szállal, amelyen kialakul az R-hurok.



- (c) Mivel az mRNA prekursor splicingja nem történt meg, az intron megtalálható az RNS-ben, így hibridizálódni tud a DNS intron szakaszával. Természetesen az exonok is hibridizálódnak, ezért egy nagyon hosszú R-hurkot látunk.



- (d) A hibrid ugyanolyan lesz, mint a (c) esetben, de az RNS poli(A)-farka nem hibridizálódik a DNS-sel. Ezért a hibrid képe a következő lesz:



3. FELADAT

Az alábbi ábrán egy gén szerkezete látható:

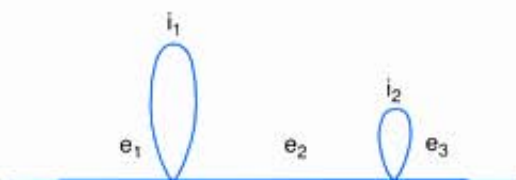


A négyszögek az exonokat (e_1 , e_2 , e_3), a vonalak az intronokat (i_1 , i_2) jelzik. Rajzolja le a génnel végzett R-hurok kísérlet eredményét, amelyet érett mRNA-sel és egyfonalas DNS-sel végeztek! A DNS esetében vegye figyelembe a gén két végét határoló szakaszokat! Két ábrát rajzoljon: (a) egy egyszerű vázlatot, amelyben az egyfonalas DNS-t vékony vonallal, az RNS-DNS hibridet pedig vastag vonallal jelöli; (b) részletesebb magyarázó diagramot, ahol a DNS-t folyamatos, az RNS-t pedig szaggatott vonallal jelöli. A poli(A)-véget hagyja figyelmen kívül. A rajz részeit jelölje (e_1 , i_1 stb.)!

MEGOLDÁS

Mivel az mRNA-ból már kihatásra kerültek az intronok, az RNS az egyfonalas DNS-nek csak az exonjaival hibridizálódik. Az intronok ezért kihurkolódnak, a hurkok mérete a megfelelő intron hosszával arányos.

- (a) Az elektronmikroszkópos képen látszanak a hurkok, de nem mutatkozik különbség a DNS és az RNS között. Az R-hurkok szerkezete az alábbiak szerint alakul:



Az exonokat vastag vonalak jelölik, ezeket DNS-RNS hibridek alkotják. Az intronoknak a vékony vonalak felelnek meg. Az egyszálú DNS-ben az intronok nem alkotnak hibridet, mert az RNS-nek nincs olyan szakasza, amellyel hibridizálódhatna. A hibrid régiók és a hurkok hossza arányos az intronokéval, illetve az exonokéval.

- (b) A részletesebb magyarázó ábrán szaggatott vonal jelöli az exonokkal hibridizálódó mRNA-t



ÖSSZEFOGLALÁS

Az eukarióta kromoszómákat kromatin építi fel, amelyben a DNS öt bázikus jellegű fehérjével, más szóval hisztonnal és számos nem-hiszton fehérjével kapcsolódik. A kromatin szerkezete különböző módon hajtogatódik. Az első szint a nukleoszómákból álló füzér kialakulása. A nukleoszómákat négy pár hisztonból (H2A, H2B, H3 és H4) álló gömb alakú struktúra alkotja, amely körül mintegy 200 bázispár hosszú DNS-szakasz tekeredik fel. Az ötödik hiszton (H1) kívülről kötődik ehhez az egységhez. A kromatin hajtogatódásának második szintje a nukleoszómafüzérből létrejött 25 nm vastag szolenoid. Kialakításában minden bizonnyal fontos a H1-H1 hisztonok kölcsönhatása. A harmadik szint a 25 nm-es kromoszómábrillumok hurkolódásával kialakuló kefeszerű struktúra, amelyben a hurkok egy centrális helyzetű mátrixhoz rögzülnek.

Az eukarióta sejtekben a kromatin kétféle formában van jelen: kondenzált és transzkripcionálisan inaktív heterokromatinként, valamint lazább szerkezetű, potenciálisan aktív eukromatinként.

Az eukarióta sejtekben három RNS-polimeráz működik, az RNS-polimeráz I, II és III. A polimeráz I szintetizálja a nagy rRNS prekursorát; a polimeráz II az mRNA prekursorokat; a polimeráz III a tRNS-ek és az 5S rRNS prekursorait. Az RNS-polimeráz II által felismert promotereknek legalább egy közös vonásuk van: egy konszenzus szekvencia 30 bázispárral a transzkripció kezdőpont előtt (upstream), belsejében a TATA-motívummal. A TATA-box irányítja a transzkripció gépezetét az átírás kezdőpontjához vagy fokozza a transzkripció hatékonyságát, de részt vehet mindkét folyamatban is. A TATA-boxot a TATA-box kötő fehérje, a TBP ismeri fel, amely a TFIID általános transzkripció faktor része. A TBP kötődése biztosítja az öt másik általános transzkripció faktor (TFIIA, B, E, F, H), valamint az RNS-polimeráz II kötődését, ezzel a preiniciációs komplex kialakulását.

A polimeráz II promoterek általában más fontos szekvenciákat is tartalmaznak a TATA-box fölött. Ezek a szekvenciák specifikus aktiváló fehérjék, ún. transzkripció faktorok felismerő régiói. A polimeráz I promoterek szintén az általuk vezérelt gének 5' határoló régiójában találhatóak, de a klasszikus polimeráz III promoterek belső szabályozó régiók (ICR), amelyek a génen belül helyezkednek el.

A polimeráz I promoterei rendszerint két általános transzkripció faktorral, az SL1-gyel és az UBF-fel kölcsönhatásban működnek. A polimeráz III promotor – transzkripció faktor együttműködése

viszonylag egyszerű. A TFIIIA és/vagy a TFIIIC faktorok kötődnek a belső promoterhez, és elősegítik a transzkripció iniciációs faktor, a TFIIIB kötődését az átírás kezdőpontja fölé.

Számos eukarióta génben vagy azok közelében található olyan erősítő, ún. enhancer elemek, amelyek pontos helyüktől és orientációjuktól függetlenül működnek. Ezek nem promoter elemek, de erőteljesen fokozzák a közelükben lévő gének transzkripcióját. Sok gén közelében található ún. csillapító (silencer) elemek, amelyek gátolják az átírást. Az eukarióta enhancer és silencer szekvenciák változatos doménjei különböző transzkripció faktorokkal állnak kölcsönhatásban, és befolyásolják a promoter aktivitását.

A legtöbb mRNS- és tRNS-, valamint néhány rRNS-gén nem folyamatos, hanem közbeékeltek szekvenciák, ún. intronok szakítják meg. A gén translációra kerülő szakaszai, amelyek közrefogják az intronokat: az exonok. Az mRNS prekursor érési folyamatának része az intronok eltávolítása és az exonok összekapcsolása az ún. splicing folyamatában.

A splicing jelei az eukarióta mRNS prekursorokban feltűnően egységesek. Az intron első két bázisa majdnem mindig GU, az utolsó kettő AG. Ezekon kívül konszenzus szekvenciák vannak a splice-helyek 5'- és 3'-végénél. A splice-helyet a spliceosoma ismeri fel, amely számos kis nukleáris ribonukleoproteint (snRNP) és más, a splicing folyamatában részt vevő fehérjéket tartalmaz.

Az egyszéjtű *Tetrahymena* rRNS prekursorjának 26S része tartalmaz egy intront. Ennek eltávolítását *in vitro* maga az RNS prekursor végzi. Néhány mitokondriális mRNS prekursor esetén szintén megfigyelhető a self-splicing.

A legtöbb eukarióta mRNS 3'-végén egy 150–200 bázisnyi poli(A)-fárok található, amelyet egy enzim, a poli(A) polimeráz kapcsol a molekulára a sejtmagban. A fark az mRNS-en marad a splicing és a citoplazmába történő transzport során is. A poli(A)-fárok megvédi az mRNS-t a lebomlástól, és fokozza a transláció intenzitását. Az eukarióta mRNS-ek 5'-végét egy sapka (cap) struktúra blokkolja. A sapka védi az mRNS-t a degradációtól, és lehetővé teszi kapcsolódását a riboszómához a transláció kezdetén.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. A klasszikus polimeráz III promoterekben bekövetkező változás miért módosíthatja a géntermék szekvenciáját?
2. Soroljon fel a nukleoszómák jellegzetességei közül kettőt, amelyek alátámasztják létfontosságukat!
3. Létrejöhet-e a H1 hisztonok nélkül a 11 nm, illetve a 25 nm átmérőjű kromatinfonál? Indokolja választát!
4. Egy nőstény emlős minden szomatikus sejtjében az egyik X-kromoszóma eukromatikus, a másik heterokromatikus szerkezetű. Melyik kromoszómán található az aktív gének?
5. Melyek az eukarióta transzkripció faktorok és a prokarióta σ -faktor közös vonásai? Milyen fontos jellemzőikben különböznek?

6. Vizsgálja meg az alábbi gén szerkezetét:



A négyszögek az exonokat, a vonalak az intronokat jelölik. Rajzolja fel a génnel végzett R-hurok kísérlet várható eredményét, amit érett mRNS-sel és egyszálú DNS-sel végeztek. Jelölje az ábra megfelelő részeit (e₁, i₁ stb.)!

7. Mi lenne az R-hurok kísérlet eredménye, ha a 6. feladatban szereplő gén kétszálú DNS-ét hibridizáltatnánk az érett mRNS-sel? Feltételezzük, hogy mindegyik intron elég hosszú ahhoz, hogy látható hurok képződjön.
8. Milyen eredmény várható, ha a 6. feladatban szereplő gén egyszálú DNS-ét splicing nélküli mRNS prekuzorral hibridizáltatjuk?
9. Az RNS-polimeráz II által átírt hipotetikus eukarióta gén kódoló szekvenciája az alábbi:

5'AATTGCGTATAAATTCGAGACTACTTACGGCTACCCGT
TAGCT

Keresse meg a legvalószínűbb kezdőponto(ka)t!

10. Vázolja fel egy kétélű sejtmagvacskájában az rRNS-gének transzkripciójának karácsonyfára emlékeztető ábráját! Jelölje be rajta a következőket: (a) egy rRNS prekursor gént; (b) egy át nem íródó köztes szakaszt; (c) egy szintetizálódó rRNS prekuzort; (d) egy RNS-polimerázt; (e) a transzkripció irányát.
11. Milyen lenne a sapka (cap) metiláció nélkül?
12. Felfedezte az élet olyan új formáját, amelynek sajátosságai részben a prokariótákra, részben az eukariótákra jellemzőek. Szeretné megtudni, van-e poli(A)-fárok az mRNS-ek 3'-végén. Milyen kísérletet tervezne ennek eldöntésére?
13. Felfedezett egy olyan új eukarióta algacsoportot, amely az óceán mélytengeri hőforrásainak közelében él. Nincs TATA-boxuk, de hasonló pozícióban van egy konzervatív GAGA szekvenciájuk. Tervezzon egy kísérletet, amellyel tisztázni lehet ennek a szekvenciának a fontosságát! Milyen eredményt vár, ha a GAGA hasonlóan viselkedik az SV40 korai promoterének TATA-boxához?
14. Radioaktívan megjelölte a foszfátcsoportot egy exon utolsó nukleozidja és a szomszédos intron 5'-végének guanozinja között. A jelölés helyét a vastagon szedett betű jelzi: Gp/GpUp-intron. Az intronban vagy az exonban jelenik-e meg a radioaktivitás, feltéve, hogy a splicing a lasszó-modell szerint játszódik le?
15. Radioaktívan megjelölte egy intron utolsó nukleozidja és a szomszédos exon 5'-végének guanozinja között levő foszfátcsoportot (intron-ApGp/Gp-exon). Az intronban vagy az exonban jelenik-e meg a radioaktivitás, feltéve, hogy a splicing a lasszó-modell szerint játszódik le?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

10.

F E J E Z E T

A transzláció

Tanulási program

- 1 A fehérjék jellemzői.
- 2 A tRNS és a riboszóma szerkezete.
- 3 A genetikai kód jellemzői.
- 4 A transzláció mechanizmusa.
- 5 Az antibiotikumok hatása a transzlációra.

*Mi az élet titka? – kérdeztem.
A fehérje – válaszolta a bármixer.*

Kurt Vonnegut
Macskabölcső

Az előző fejezetekben tárgyaltuk, hogy a gének tartalmaznak a fehérjék polipeptidláncainak felépítéséhez szükséges információt. A génexpresszió (génkifejeződés) az a folyamat, amelynek során a sejtek az öröklődő információ felhasználásával elkészítik a génterméket: az RNS-t, illetve a fehérjét. Az előző két fejezet a génműködés folyamatának első részét, a transzkripciót tárgyalta. Ebben a fejezetben a második rész, a transláció bemutatása kerül sorra. Bevezetesként tekintünk át a fehérjék jellemzői tulajdonságait!

A FEHÉRJÉK SZERKEZETE

A fehérjék, a nukleinsavakhoz hasonlóan, elágazás nélküli láncmolekulák, amelyek monomerekből épülnek fel. A DNS és RNS monomerjei a nukleotidok, a fehérjék építőkövei pedig az **aminosavak**. Amíg azonban a DNS-t csak négyféle nukleotid építi fel, a fehérjékben húsz különféle aminosav fordulhat elő (10.1. ábra). Az aminosavakat **peptidkötések** kapcsolják össze polimer molekulává, **polipeptidlánccá** (10.2. ábra).

Egy fehérje **elsődleges szerkezete** (primer struktúra) az aminosavsorrend. A **másodlagos szerkezet** (szekunder struktúra), amelyet az aminosavak peptidkötései között fellépő kölcsönhatások alakítanak ki. Leggyakoribb formája az α -hélix. A 10.3. ábrán látható, hogy az α -hélixet az egymás közelébe kerülő peptidkötések között kialakuló H-kötések alakítják ki. A másodlagos szerkezet másik gyakori formája a β -lemez (10.4. ábra). A β -lemezben fehérjelánccok hajtogatódnak egymás mellé, a szerkezetet itt is az egymás mellé kerülő peptidkötések közötti H-hidak stabilizálják. A hernyóselem fibroinja β -lemezekből álló fehérje. A másodlagos szerkezet harmadik változata egyszerű, kanyarodó fonálszakasz, amely összeköti a fehérje α -hélixbe és/vagy β -lemezbe rendeződött szakaszait.

A **harmadlagos szerkezet** (tercier struktúra) szintén háromdimenziós alakzat, amelyet az aminosavak oldalláncai között kialakuló változatos kötések rögzítenek. A 10.5. ábra a mioglobinnal harmadlagos szerkezetét mutatja be. Jól láthatók a másodlagos szerkezet elemei, főként néhány α -hélix és az azokat összekötő szakaszok. Figyelmet érdemel a mioglobin közelítőleg gömbnek tekinthető alakja, **globuláris szerkezete**.

Sok fehérje elég nagy méretű és több kompakt szerkezeti és működési elemet, úgynevezett **domént** tartalmaz. Az antitestek (a szervezet immunrendszeréhez tartozó fehérjék, amelyeket a fehérvsejtek termelnek az idegen anyagok, antigének ellen) jól szemléltetik a domének mibenlétét. A 10.6. ábrán látható, hogy az IgG-típusú antitestek mind a négy polipeptidlánca globuláris doméneket tartalmaz. Az ábrán a fehérjék térszerkezetének következő szintje, a **negyedleges szerkezet** (quaterner struktúra) is megfigyelhető. A negyedleges szerkezet a fehérje alegység szerkezete, benne több harmadlagos szerkezetű polipeptidlánc épül össze.

Térszerkezetük alapján a fehérjék végső soron két nagy csoportba sorolhatók. A **globuláris fehérjék** megközelítőleg gömb alakúak, míg a **fibrilláris fehérjék** szálas, rostos szerkezetűek. Az előbbi csoportba tartoznak az enzimek, az utóbbiba olyan szerkezeti elemek, mint például a szarut alkotó keratin.

A 10.7. ábra a fehérjék ábrázolásának egy másik elterjedt módját mutatja be. A β -lemezeket egymás mellé fektetett lapos nyilak jelképezik, a nyilak hegye a C-terminális felé irányul. Ebben az ábrázolásban az α -hélixek vagy dugóhúzószerűen csavarodott szalagok vagy hengerek (9.26. és 9.27. ábra). A fehérjében két N-terminális (szabad aminocsoportot tartalmazó vég) és két C-terminális (szabad karboxilcsoportot tartalmazó vég) látható, ami elárulja, hogy a molekula két polipeptidlánccból áll. Egyik az ún. α -lánc (sárga, rózsaszín és zöld), a másik az ún. β -lánc (kék). A rajzon a fehérjeszerkezet három szintje figyelhető meg: (1) másodlagos szerkezet – α -hélix, β -lemez, összekötő rész; (2) harmadlagos szerkezet, a globuláris doméneket α , α_2 , α_3 és β_m jelöli; (3) negyedleges szerkezet – a két polipeptidlánc, α és β . A bemutatott fehérje az ember HLA-A2 hisztokompatibilitási antigénje (3. fejezet).

Sokáig úgy gondolták, hogy egy fehérje aminosavsorrendje meghatározza valamennyi magasabb fokú szerveződési struktúráját is, ahogyan ebben a könyvben a betűk lineáris rendje megszabja a szavak, a mondatok és a bekezdések értelmét is. Ez azonban a dolgok túlzott leegyszerűsítése. Sok fehérje nem képes *in vitro*, a sejt sajátos belső környezetén kívül önállóan felvenni a megfelelő térszerkezetet. A fehérjék aminosavszekvenciája mellett egyéb, a sejtben található faktorok is befolyásolják a fehérje konformációját.

A fehérjék aminosavakból álló polimer molekulák, monomerjeiket peptidkötések tartják össze. A polipeptidlánc aminosavsorrendje (elsődleges szerkezet) szabja meg a molekula térszerkezetét. A térszerkezetben másodlagos és harmadlagos szerkezeti szinteket lehet megkülönböztetni, a negyedleges szerkezet pedig harmadlagos szerkezetű polipeptidlánccok – alegységek – összekapcsolódásával jön létre.

A FEHÉRJÉK FUNKCIÓI

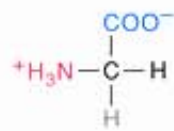
A fehérjék szerepe rendkívül változatos. Fehérjék adják a sejtek alakját, vázát meghatározó struktúrákat. Más fehérjék, pl. a hormonok, információkat visznek egyik sejtől a másikhoz. A hasnyálmirigyben termelődik az inzulin nevű hormon, amely többek között fokozza a máj- és izomsejtek glükózfelvételét a vérből. Megint más fehérjék különböző anyagok megkötésére és szállítására képesek. A hemoglobin például oxigént szállít a tüdőből a test távoli területeire, a mioglobin oxigént tárol az izmokban. Számos fehérje a génműködést szabályozza (8. és 9. fejezet). Végül a legfontosabb, hogy a fehérjék mint enzimek, az élethez nélkülözhetetlen kémiai reakciók ezreit katalizálják. Az enzimek nélkül, életlen testhőmérsékleten ezek a reakciók olyan lassan mennének végbe, hogy az élet lehetetlen lenne.

A GÉNEK ÉS A FEHÉRJÉK KAPCSOLATA

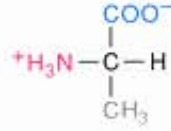
A gének és a fehérjék kapcsolatáról ismereteink 1902-re nyúlnak vissza, amikor Archibald Garrod felfigyelt arra, hogy egy emberi be-



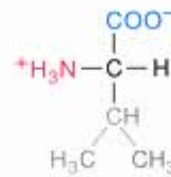
α -aminosav általános szerkezete



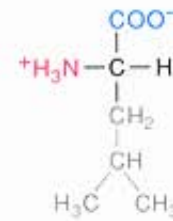
Glicin
(Gly)



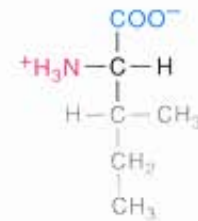
Alanin
(Ala)



Valin
(Val)

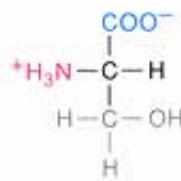


Leucin
(Leu)

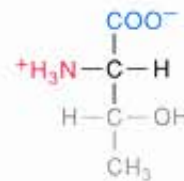


Izoleucin
(Ile)

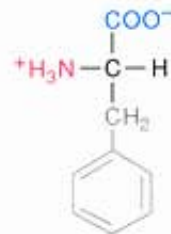
(a)



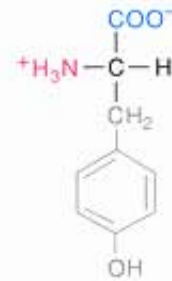
Szerin
(Ser)



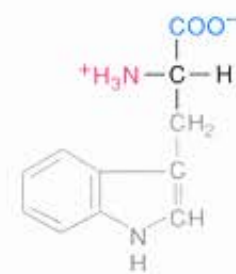
Treonin
(Thr)



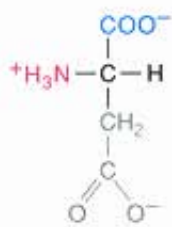
Fenilalanin
(Phe)



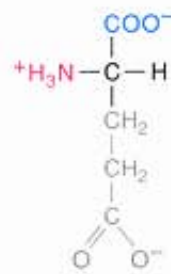
Tirozin
(Tyr)



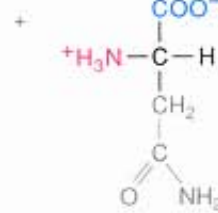
Triptofán
(Trp)



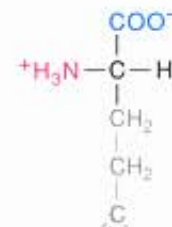
Aszparaginsav
(Asp)



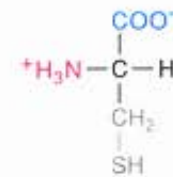
Glutaminsav
(Glu)



Aszparagin
(Asn)

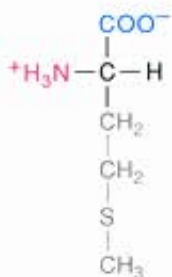


Glutamin
(Gln)

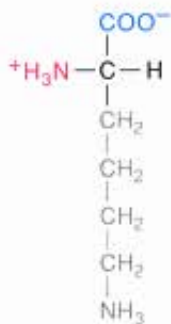


Cisztein
(Cys)

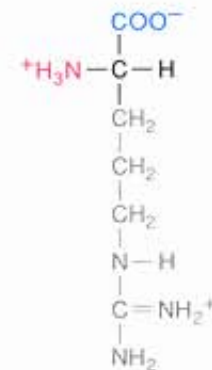
(b)



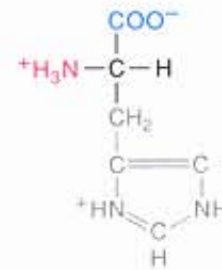
Metionin
(Met)



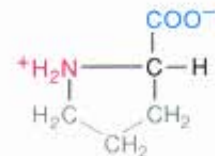
Lizin
(Lys)



Arginin
(Arg)

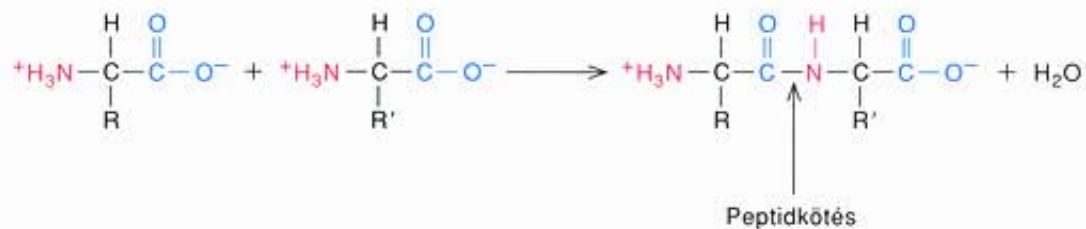


Hisztidin
(His)

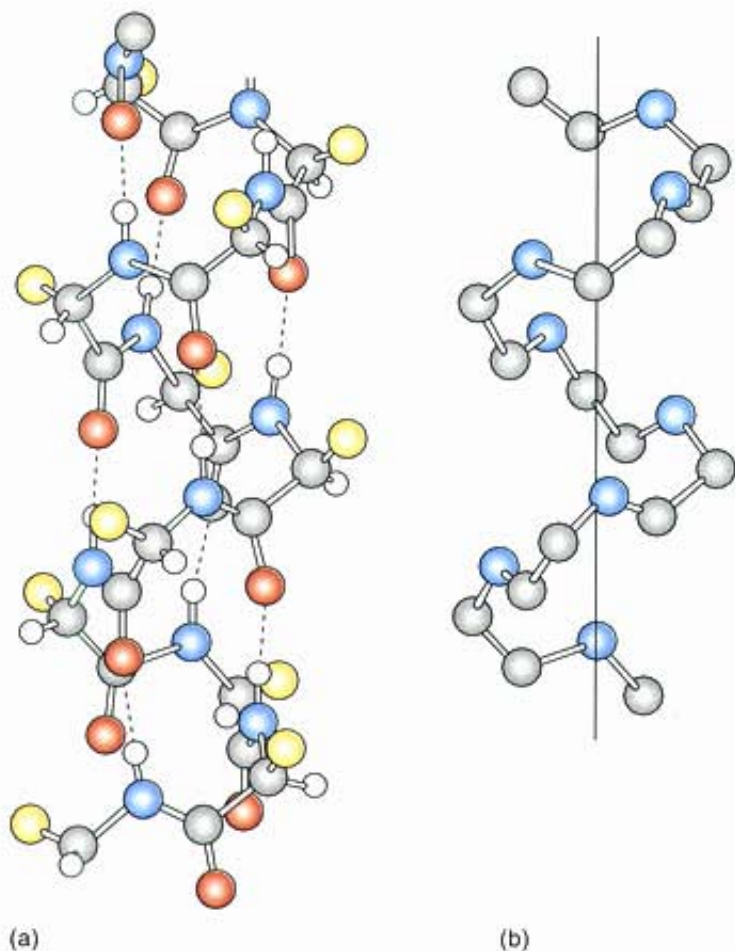


Prolin
(Pro)

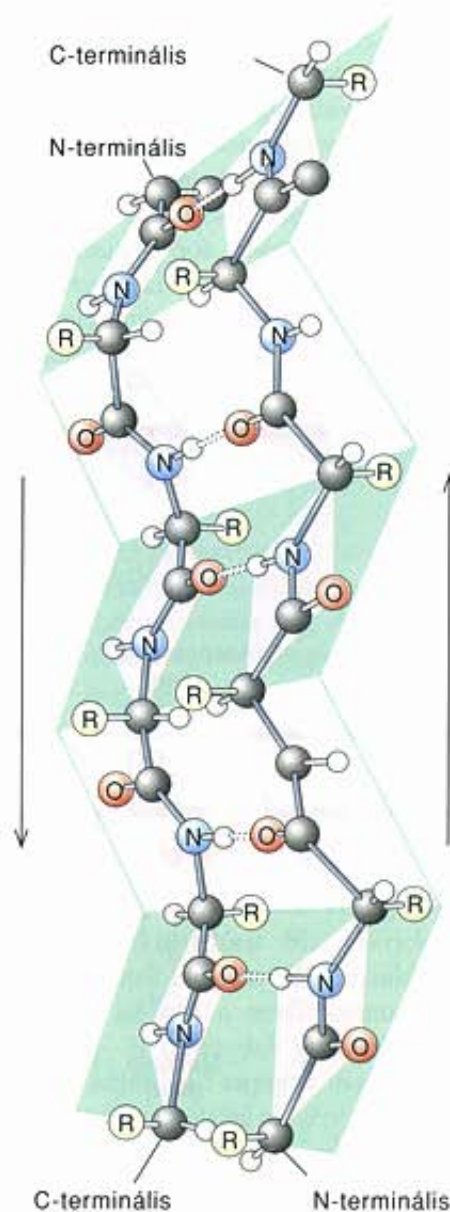
10.1. ábra. Az aminosavak szerkezete. (a) Egy α -aminosav általános felépítése. Az alaplánc α -helyzetű C-atomjához aminocsoport (NH_3^+ , piros) és karboxilcsoport (COO^- ; kék) kapcsolódik. A központi C-atom ezenfelül egy hidrogénnel (H), illetve egy oldallánccal (R; szürke) képez kovalens kötést. (b) A fehérjéket felépítő húszféle aminosav az oldallánckokban különbözik egymástól



10.2. ábra. A peptidkötés kialakulása. R, illetve R' oldalláncokat tartalmazó aminosavak kapcsolódnak egymáshoz. A peptidkötés az első aminosav karboxilcsoportja és a második aminosav aminosocsoportja között jön létre vízkilépéssel. A két összekapcsolódott aminosav egy dipeptidet alkot

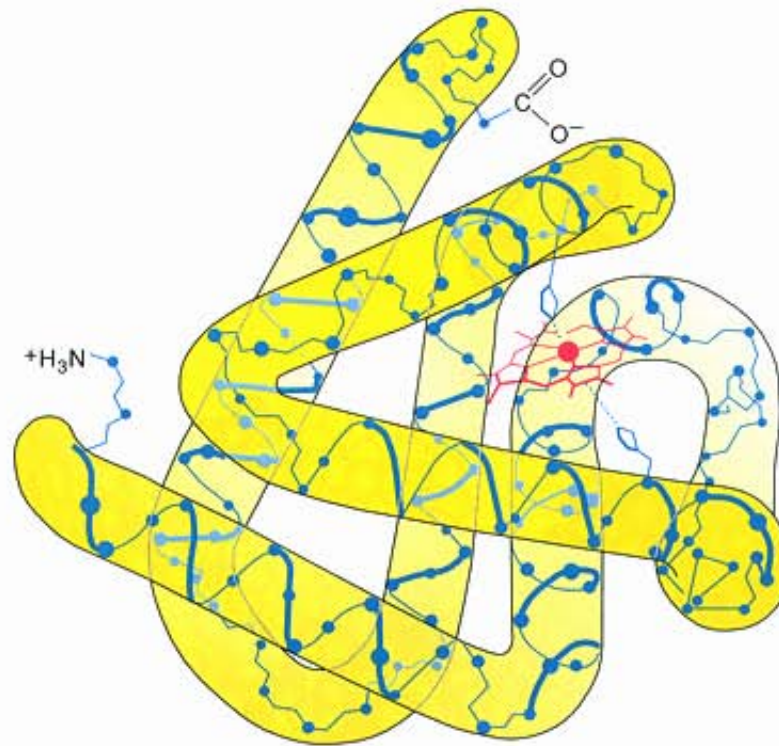


10.3. ábra. Az α -hélix a fehérjék egyik lehetséges másodlagos szerkezete. (a) A hélix gerincét alkotó molekularészleteket szürkével és kékkel jelöltük. A szaggatott vonalak az egymás közelébe kerülő aminosavak peptidkötéseinek H- és O-atomjai között kialakuló H-hidak. A kis fehér körök a H-atomok. (b) Az α -hélix egyszerűsített ábrázolása, amely csak a hélix gerincét szemlélteti



10.4. ábra. Az antiparalel β -lemez. A két egymás mellé rendeződő polipeptidláncot H-kötések (szaggatott vonalak) tartják össze. A zöld és fehér síkok jelzik, hogy a β -lemez redőzött. A láncok antiparalel lefutásúak, az egyikben az N-terminális, a másikban a C-terminális van felül. A két fonal ellentétes lefutását nyilak jelzik. Léteznek paralel β -lemezek is, amelyekben a két lánc azonos lefutású

Forrás: Illusztráció copyright © Irving Geis



10.5. ábra. A mioglobin harmadlagos szerkezete. A fehérje néhány α -hélix szerkezetű régióját kék és zöld csavarulatok jelölik. A héliceket szabálytalan összekötő szakaszok kapcsolják össze. A molekula globuláris szerkezetű, nem-fehérjetermészetű része, a hem (piros) a fehérje két hisztidinjéhez (zöld sokszög) kapcsolódik

tegség, az alkaptonuria úgy viselkedik, mintha egyetlen recesszív allélpár okozná. Szerencsére a két évvel korábban újra felfedezett Mendel-törvények elméleti alapul szolgáltak Garrod megfigyeléseihez. Az alkaptonuriában szenvedő betegek nagy mennyiségű homogentizinsavat választanak ki, amely sötét pigmentté oxidálódik, és feketére színezi a vizeletet. Garrod magyarázata szerint a vegyület megjelenése a vizeletben egy anyagcsereút hibájának következménye. Az átalakulást egy reakciólépés kimaradása gátolja és a köztes termék, a homogentizinsav rendellenes mértékben felhalmozódik. Néhány évvel később Garrod kiderítette, hogy a betegség oka a fenilalanin nevű aminosav lebontásának zavara (10.8. ábra).

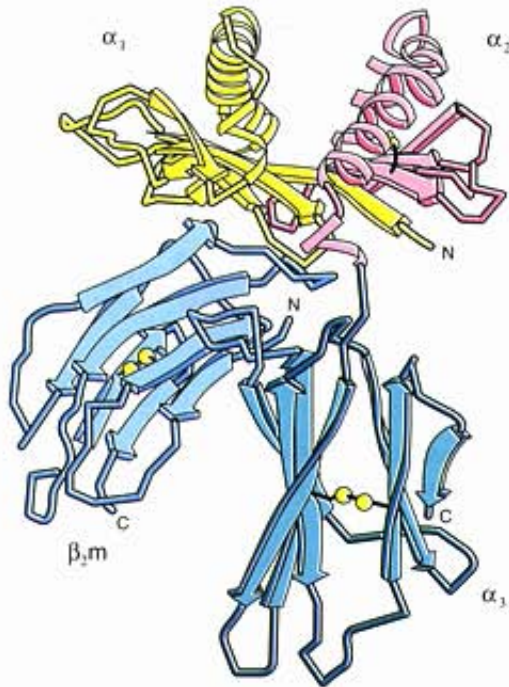
Ebben az időben már évek óta vizsgálták a sejtek anyagcsere-folyamatait és tudták, hogy minden egyes lépést egy-egy enzim katalizál. Ennek alapján arra gondoltak, hogy az alkaptonuriás betegek egyik enzime hibás. Mivel a betegség egyszerű domináns-recesszív módon öröklődik, Garrod arra a következtetésre jutott, hogy egyetlen gén határozza meg az enzim termelését. Amennyiben a gén hibás változatban van jelen, működésképtelen enzim termelődik. Ezzel a megállapítással Garrod alapján véve meghatározta a gének és a fehérjék közötti kapcsolat lényegét.

George Beadle és E. L. Tatum továbbfejlesztette a fenti gondolatot a *Neurospora* nevű tömlősgombán végzett kísérleteivel az 1940-es években. Kísérletük lényege a következő volt: először a *Neurospora* peritéciumát (termőtestét) röntgen- vagy ultrabolya sugárzásnak tették ki, mutációkat hoztak létre bennük. A besugárzott gombák spóráit összegyűjtötték, és elkülönítetten nevelték, hogy tiszta tenyészetet kapjanak. Tenyészetek ezreit vizsgál-

ták át, hogy néhány mutánst találjanak. A mutánsokat annak alapján szelektálták, hogy nem voltak képesek csak cukrot, sót, szervesen N-forrást és biotint tartalmazó, ún. minimál táptalajon növekedni. A vad típusú *Neurospora* jól növekedik minimál táptalajon, míg a mutánsok valamilyen egyéb anyagot is – például másik vitamint – igényelnek életben maradásukhoz.

Ezután Beadle és Tatum biokémiai, valamint genetikai analízisnek vetették alá a mutánsokat. A mutánsok tenyésztéséhez körültekintően egyszerre csak egyféle anyagot adtak, így pontosan megállapíthatták, milyen biokémiai hiba történhetett. Így például a pantoténsav (B_5 -vitamin) szintézisében az utolsó reakciólépés a molekula két felének – a pantoinsavnak és a β -alaninnak – az összekapcsolása. Az egyik pantoténsavhiányos mutáns pantoténsav adagolása mellett képes növekedni, de a vitamin két említett részének jelenlétében már nem. Ez azt mutatja, hogy a reakciósorozat utolsó lépését katalizáló enzim (a 10.9. ábrán a 3. számú) működésképtelen.

A genetikai analízis elég egyszerűen megoldható. A *Neurospora* a tömlősgombákhoz tartozik, amelyek életciklusában a két eltérő párosodási típusba tartozó sejtmagok összeolvadnak, majd meiózis történik, és az aszkuszból nyolc haploid *askospóra* képződik (5. fejezet). Tehát egy mutáns kereszteződhet az ellenkező párosodási típusba tartozó vad típusú törzssel, és a hibrid is nyolc spórát képez (10.10. ábra). Ha a mutáns fenotípus egyetlen génben bekövetkezett mutáció eredménye, akkor a nyolc spóra közül négy mutáns, négy pedig vad típusú lesz. Beadle és Tatum elkülönítették a spórákat, kihajtották és ellenőrizték a gombák fenotípusát. Nagy pontossággal sikerült megállapítaniuk, hogy a nyolc spóra közül való-

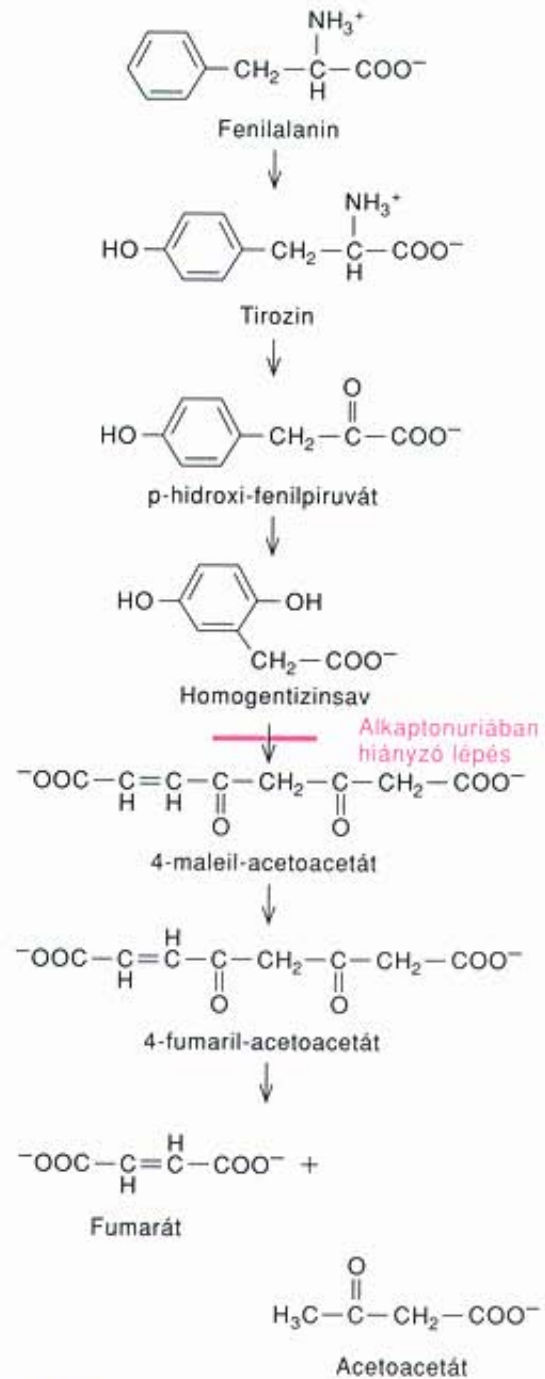


10.7. ábra. Az ember HLA-A2 hisztokompatibilitási antigénjének vázlatos rajza. Figyeljük meg a fehérje szerkezetének három szintjét: (1) Jól látható a másodlagos szerkezet három eleme, az α -hélixek feltekert szalagjai felül, a β -lemezek lapos nyilai alul, végül a szabálytalan kanyarulatok legfeltűnőbbben a β -lemezek között; (2) A rajzon négy globuláris domén azonosítható (α_1 – sárga, α_2 – rózsaszín, α_3 – zöld, β_{2m} – világoskék), amelyek a harmadlagos szerkezet elemei; (3) Az alegységek kapcsolata a negyedleges szerkezet (egy α - és egy β -lánc). Az α -lánc színei a sárga, rózsaszín és zöld, a β -lánc világoskék. A sárga gömbök a cisztein oldalláncok, amelyek diszulfidhiddal kapcsolódnak. A diszulfidhidak biztosítják a fehérje megfelelő alakját

han összehúzódkodva, mint kitárt karokkal és lábakkal. Az 50S alegység mintegy kétszer nagyobb tömegű a 30S alegységnél. A két alegység együtt alkotja a 70S riboszómát. A szedimentációs állandók értékei nem adódnak össze, mivel az állandó a részecske tömegének megközelítőleg $\frac{1}{3}$ -ik hatványával arányos.

A riboszóma alegységek RNS-ből és fehérjékből állnak. A 30S alegységben egy 16S **riboszomális RNS**, röviden **rRNS** és 21 fehérjemolekula van. Az 50S pedig két rRNS-ből (23S és 5S) és 34 fehérjéből áll (10.12. ábra). Természetesen az összes riboszomális fehérje is gének terméke. Tehát a riboszóma kialakításában több tucat gén működik.

Ne felejtjük el, hogy az rRNS-ek részt vesznek ugyan a fehérjeszintézisben, de nem kódolnak fehérjéket. Az rRNS-gének expressziójának egyetlen lépése a transzkripció, bár a transzkriptum kismértékben módosításra kerül (9. fejezet), transláció azonban nem történik.

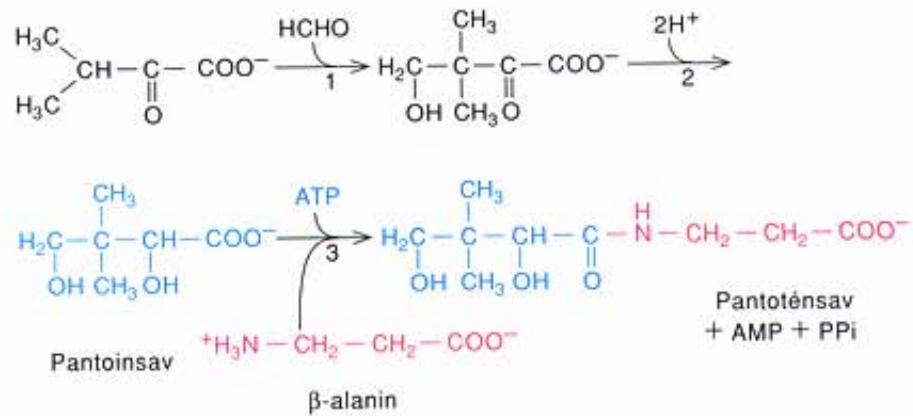


10.8. ábra. A fenilalanin lebontásának folyamata. Az alkaptonuriás betegekben működésképtelen az enzim, amely a homogentizinsavat 4-maleil-acetoacetáttá alakítja

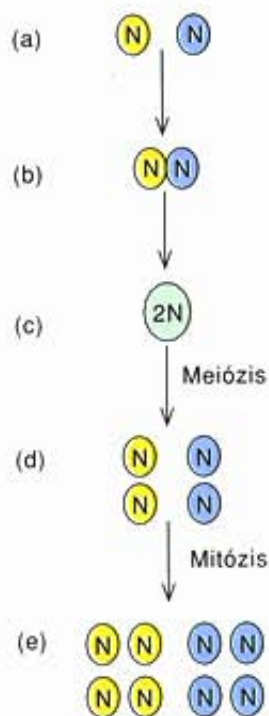
A riboszómák a sejtek fehérjegyárai. A baktériumokban két alegységből (50S és 30S) álló 70S riboszómák találhatóak. Mindegyik alegység riboszomális RNS-t és többféle fehérjét tartalmaz.

A RIBOSZÓMÁK SPONTÁN ÖSSZESZERELŐDÉSE

Pontosan ismert, hogy a riboszómák hány fehérjét tartalmaznak, mivel számos kutatócsoport, elsősorban Masayasu Nomura és



10.9. ábra. A pantoténsav szintézisének lépései. Beadle és Tatum egyik *Neurospora* mutánsában az utolsó enzimatis lépés (3.) nem játszódott le, azaz a pantoténsav kialakulása a pantoinsavból (kék) és a β -alaninból (piros). A lépést katalizáló enzim működésképtelen volt



10.10. ábra. A *Neurospora crassa* spóráképzése.

(a) Két haploid mag, egy vad típusú (sárga) és egy mutáns (kék) olvad össze. (b) Elkezdődik a két sejtmag fúziója. (c) A fúzió lezajlik és diploid sejtmag (zöld) keletkezik. Az egyik kromoszómasorozat a vad típusból, a másik a mutánsból származik. (d) Meiózissal négy haploid sejt képződik. Ha a mutáns fenotípust egy gén mutációja eredményezte, akkor a négy mag közül kettő a mutáns allélt (kék), kettő a vad típusú allélt (sárga) tartalmazza. (e) Lezajlik egy mitózis is, és végeredményül nyolc haploid sejt keletkezik, amelyek aszkospórákká érnek. Négy spóra a mutáns allélt (kék), négy pedig a vad típusú allélt (sárga) tartalmazza. Ha egynél több gén felelős a mutáns fenotípusért, a kép összetettebb



(a)

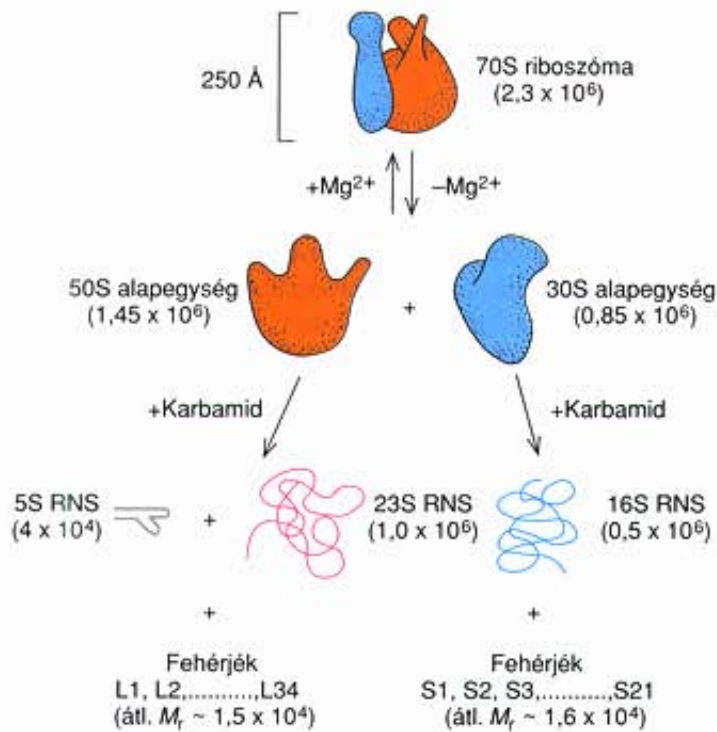


(b)

10.11. ábra. Az *E. coli* riboszómájának felépítése.

(a) A 70S szedimentációs állandójú riboszóma oldalnézetén jól látható a 30S alegység (sárga) és az 50S alegység (piros) illeszkedése. (b) A 70S riboszóma 90°-kal elfordítva. Elöl a 30S alegység, mögötte az 50S alegység

Forrás: Lake, James A.: *Journal of Molecular Biology*, 105:131–59, 1976. © Academic Press



10.12. ábra. Az *E. coli* riboszómájának felépítése.

A felső nyílak a 70S riboszóma alegységeinek disszociációját, illetve összekapcsolódását jelzik a Mg^{2+} -ionok koncentrációjának változására. Az alsó nyílak az egyes alegységek RNS-re és fehérjékre történő szétválasztását mutatják a fehérjéket denaturáló karbamid hatására. A tömegeket zárójelben tüntettük fel (M_r – daltonban)

munkatársai részére bontották riboszómákat, majd az alkotórészekből ismét összerakták azokat. Vizsgálataik a legsikeresebb biokémiai hagyományokat követték. Az alkotórészek szétválasztása, majd az azt követő rekonstrukció, lehetővé tette az aktív riboszóma kialakításához szükséges komponensek azonosítását.

A 10.13. ábra mutatja a 30S alegység fehérjék poliakrilamid gélelektroforézisének eredményét. A fehérjéket S1-től S21-ig megszámozták, ahol az S a kis alegységet jelenti, amelyből a fehérjék származnak. A nagy alegység fehérjéit L1-től L31-ig számozták, az L a nagy alegységre utal. Egyes esetekben két vagy több fehérje együtt futott az elektroforézisben, de további tisztítással ezeket is szétválasztották egymástól. Az oldott állapotú fehérjéket ezután visszajuttatták a 16S rRNS-hez, hogy előállítsák az aktív 30S alegységet. Az aktivitás ellenőrzését úgy végezték, hogy a fenti módon rekonstruált 30S alegységeket az 50S alegységekhez adták, és vizsgálták, hogy a kialakuló 70S riboszóma képes-e *in vitro* translációra.

Milyen a riboszómális fehérjék egymáshoz és az rRNS-hez viszonyított térbeli elhelyezkedése? A kérdés megválaszolására két módszer, a neutrondiffrakció és az immunjelölés elektronmikroszkópia bizonyult a leghasználhatóbbnak, legalábbis az *E. coli* riboszómájának kis alegysége esetében. A neutrondiffrakciónak ugyanaz az alapelve, mint a röntgenkristallográfiának, a mintán átbocsátott neutronsugár szóródási mintázatából következtetni lehet a riboszómák szerkezetére. Az immunjelölés elektronmik-



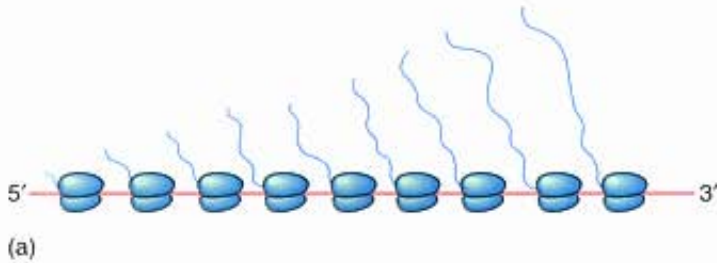
10.13. ábra. Az *E. coli* riboszóma 30S alegységének fehérjéi. A poliakrilamid gélelektroforézissel történő szétválasztás csak részleges eredménnyel járt, mert a sávok száma húsznál kevesebb, egyes sávok tehát több fehérjét tartalmaznak. Az elektroforézissel el nem választható fehérjék kromatográfiával elkülöníthetők

Forrás: Traub, P. és Nomura, M.: Laboratory of Genetics, University of Wisconsin, Madison. *Proceedings of the National Academy of Science*, 59(3):777–784, March 1968.

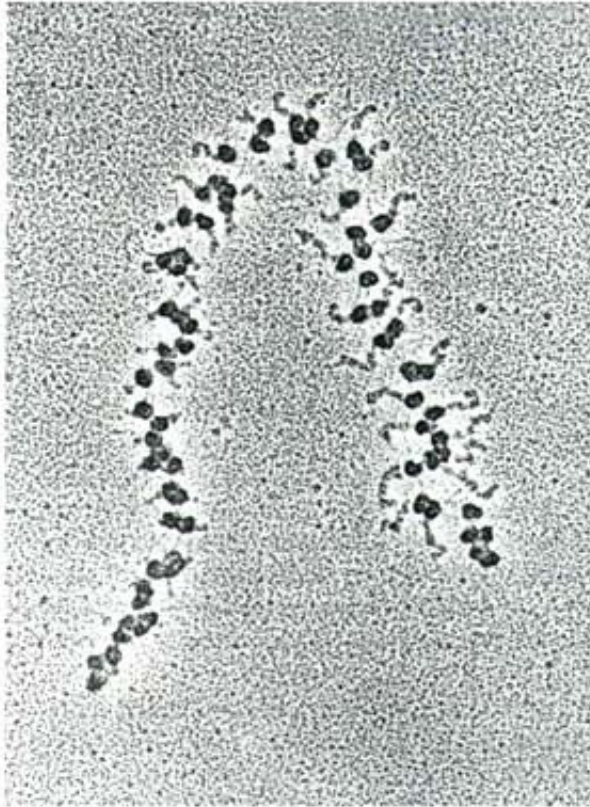
roszkópia azon alapul, hogy léteznek speciális, az egyes riboszómális fehérjékhez specifikusan kötődő ellenanyagok. A riboszóma felületén elektronmikroszkóppal megfigyelhetők az ellenanyagok, jelzik a fehérjék elhelyezkedését a riboszómában. Olyan az ellenanyag, mint egy nyíl, amely éppen rámutat a kérdéses fehérjére. A 10.14.(a) ábra a fehérjék egymáshoz viszonyított elrendeződését mutatja be a 30S alegységben, a 10.14.(b) ábra pedig a 16S rRNS egy részének elhelyezkedését vetíti rá az előző képre.

Az 50S alegység rekonstrukciója sokkal nehezebbnek bizonyult, mint a kis alegységé. Az első kísérletek sikertelenek voltak, mert a reasszociációhoz szükséges hőmérséklet olyan magas volt, hogy néhány fehérje inaktiválódott. Később rájöttek, hogyan megy végbe a nagy riboszóma alegység újraképzése alacsonyabb hőmérsékleten. A kísérletek azt igazolják, hogy a riboszóma **önmagától összeszerelődő rendszer**, a megfelelő fehérjékből és RNS-ekből enzimek vagy egyéb faktorok hozzáadása nélkül is felépül.

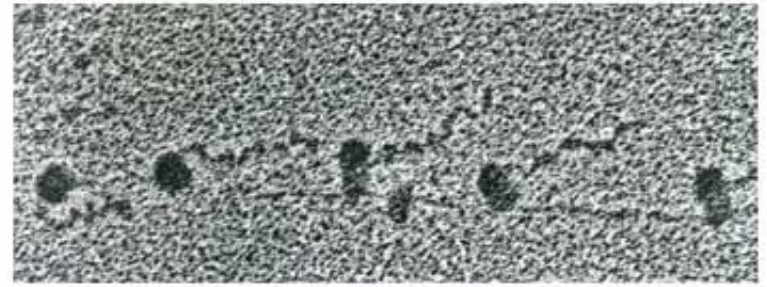
Feltételezhetően hasonló összeszerelési folyamat zajlik le *in vivo* is a prokariótáknál. De mi a helyzet az eukarióták riboszómáival? Maguktól szerelődnek-e össze, és ha igen, hogyan? Az első kérdésre nem tudjuk a választ, mert a komplex eukarióta riboszóma *in vitro* összeszerelődését még nem figyelték meg. Az összeszerelődés helyét azonban ismerjük, és ez a sejtmagvacska. A nagy riboszómális RNS génjei a sejtmagvacskában helyezkednek el, ott szintetizálódnak az 5,8S, 18S és 28S rRNS-ek. Fehérjék azonban nem képződnek a sejtmagban. A riboszómális fehérjék a citoplazmában lévő riboszómákon készülnek, és be kell szállítani őket a sejtmagvacskába. Ott összekapcsolódnak az rRNS-ekkel, majd a felépült riboszóma kijut a citoplazmába, ahol megkezdheti feladatát, a fehérjeszintézist.



(a)



(b)



(c)

10.15. ábra. Poliszómák. (a) Egy poliszóma vázlatos rajza. A riboszómák (zöld) az mRNS-hez (piros) kapcsolódnak a transláció során, és polipeptidláncokat (kék) szintetizálnak. Mivel a polipeptidek hossza jobbra haladva nő, a transláció iránya balról jobbra tart és az mRNS 5'-vége a bal oldalon van. (b) A *Chironomus* sejtjéből preparált poliszóma elektronmikroszkópos felvétele. Az mRNS 5'-vége a kép bal alsó részére került, aztán egy kanyart ír le és jobbra lent végződik. Az mRNS-hez kapcsolódó sötét foltok a riboszómák. A poliriboszóma vagy poliszóma elnevezés arra utal, hogy sok (74) riboszóma kapcsolódik az mRNS-re. A poliszóma felső részénél jól látható, hogy az mRNS 3'-vége felé egyre hosszabbak a riboszómákról lelógó polipeptidláncok. A polipeptideken látható halványabb csomók, a domének. (c) A *Chironomus* poliszómájának nagyobb nagyítású képe. A preparálásakor a poliszómát kiegyenesítették. Látható, hogy a riboszómák két alegységből állnak, és a polipeptidláncok a két alegység közül nyúlnak ki

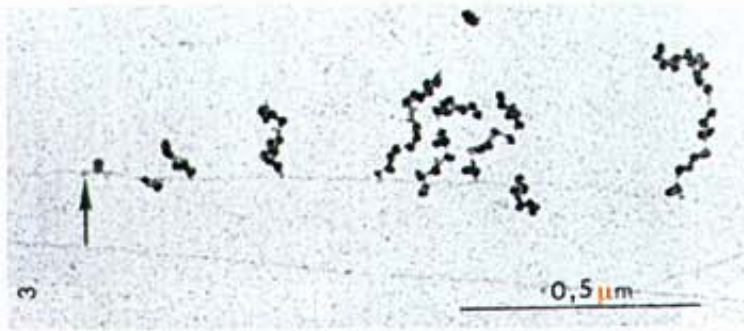
Forrás: (b) és (c) Francke és mások: *Electron Microscopic Visualization of a Discrete Class of Giant Translation Units in Salivary Gland Cells of Chironomus tentans*. *EMBO*, 1:(1-6)59-62, 1982. European Molecular Biology Organization

A POLISZÓMÁK

A 8. és 9. fejezetben ismertettük, hogy egy génről egyidejűleg több RNS-polimeráz is végezhet átírást. Ugyanígy, egy mRNS-ről egyszerre több riboszómán is folyhat transláció. Valójában az a normális, hogy több riboszóma egymás után rákapcsolódik ugyanarra az mRNS-re, amelynek eredményeként a 10.15.(b) ábrán látható poliriboszóma, röviden **poliszóma** jön létre. Ezen a poliszómarészleten is legalább 40 működő riboszómát számolhatunk meg. Ha megfigyeljük a képződő polipeptidláncokat, azt is megállapíthatjuk, melyik a vége és melyik az eleje a poliszómának. A képződő polipeptidláncok a legrövidebbek az mRNS 5'-végén, ahol a transláció kezdődik, és egyre hosszabbak a 3'-vég felé, ahol a transláció befejeződik. Tehát az 5'-vég a bal, a 3'-vég pedig a jobb oldalon van.

A 10.15. ábra poliszómája eukarióta sejtéből származik (árvaszúnyog – *Chironomus sp.*). Mivel az eukarióta sejtben a transzkripció és a transláció elkülönülten zajlik (a transzkripció a sejtmagban, a transláció a citoplazmában), a poliszómák min-

dig a citoplazmában jelennek meg. A prokariótáknak szintén vannak poliszómáik, de ezekben a szervezetekben a kép bonyolultabb, mert egy adott gén transzkripciója és mRNS-ének translációja ugyanazon a helyen egyszerre folyik. Ez azt jelenti, hogy láthatók az éppen szintetizálódó mRNS-ek, és az elkészült szakaszokra kapcsolódott, translációt végző riboszómák. A 10.16. ábrán épp ez a helyzet figyelhető meg *E. coli*-ban. Látható a bakteriális kromoszóma két szegmense, amelyek egymással párhuzamosan, balról jobbra futnak. Csak a felső szegmensről történik transzkripció. A transzkripció a képen balról jobbra halad, mert ebben az irányban növekszik a poliszómák hossza, ugyanis az mRNS-láncok növekedésével egyre több hely lesz rajtuk a riboszómák számára. Megtévesztő lehet a 10.15. és 10.16. ábrák eltérő nagyítása. Az utóbbin a riboszómák kisebbek és a fehérjeláncok sem látszanak. Ne felejtsük el, hogy a 10.16. ábrán látható szálak DNS-szakaszok, a 10.15. ábrán lévők pedig mRNS-ek. A 10.16. ábrán az mRNS-ek többé-kevésbé függőlegesek.



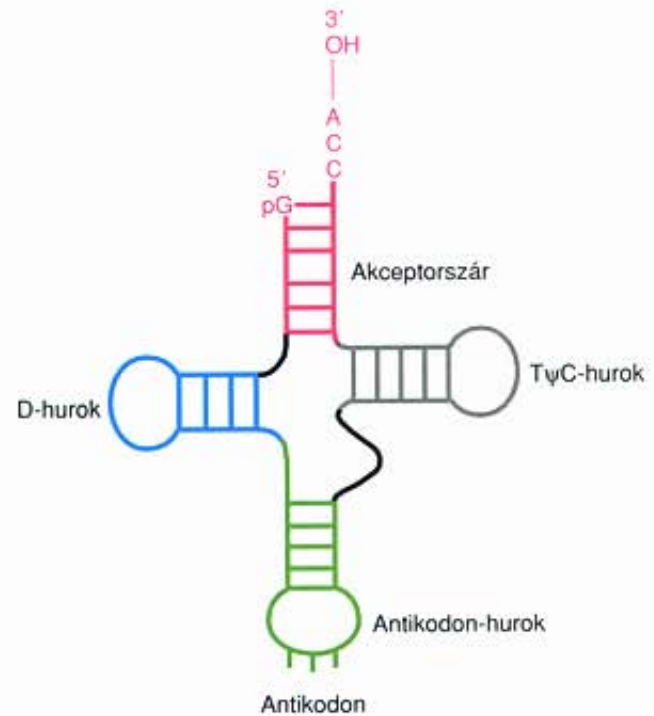
10.16. ábra. Az *E. coli* transzkripciója és transzlációja egy időben zajlik. A felvételen balról jobbra két DNS-szakasz húzódik. Ahogyan az mRNS-ek növekszenek, egyre több riboszóma kapcsolódik rájuk, és azonnal megkezdődik a transzláció. Így alakulnak ki a poliszómák, amelyek sugárirányban leolgnak a DNS-ről. A készülő polipeptidláncok nem látszanak a felvételen. Az ábra bal oldalán lévő nyíl egy halvány foltra mutat, amely talán az RNS-polimeráz, amint éppen elkezdte a gén átírását. Hasonló képletek fedezhetők fel más poliszómák alapjánál is, ahol az mRNS-ek a DNS-hez kapcsolódnak

Forrás: Miller, O. L.: Visualization of Bacterial Genes in Action, Science: 169:394. 1970, © AAAS

A legtöbb mRNS-en egyszerre több riboszóma végez transzlációt. Ennek eredményeként jön létre a poliszóma, amelyen sok riboszóma egymás után fordítja le az mRNS információját a polipeptidlánc aminosavszekvenciájára. Az eukarióta sejtekben a poliszómák a citoplazmában vannak. Prokariótákban egy gén transzkripciója és a keletkező mRNS transzlációja egyidejűleg játszódik le, ezért sok poliszóma kapcsolódik egy-egy aktív génhez.

A TRANSZFER-RNS, AZ ADAPTER MOLEKULA

A transzkripció mechanizmusára kézenfekvő feltételezés adódott. Az RNS olyannyira hasonlít a DNS-re, hogy ugyanazok a bázispárosodási szabályok érvényesek rá. Ezen szabályok alapján az RNS-polimeráz a gén másolatát hozza létre. De milyen szabályok szerint fordítódik le az mRNS bázissorrendje a fehérjék aminosavsorrendjére a riboszómákon? Ez egy igazi fordítási feladat, hiszen a nukleinsavak nyelvét le kell fordítani a fehérjék nyelvére. Francis Crick javasolt egy megoldást erre a problémára egy 1958-as cikkében, mielőtt bármilyen kísérleti bizonyíték rendelkezésre állt volna. Mellette érvelt, hogy egy adapter molekulára van szükség, amely egyaránt felismeri az RNS nukleotidjait és a fehérjék aminosavait. Cricknek igaza volt. Még azt is felvetette, hogy létezik egy kisméretű, addig ismeretlen funkciójú RNS-molekula, amely szóba jöhet adapterként. Hipotézise ismét helyesnek bizonyult, bár volt néhány hibás elképzelés is cikkében, de még azok is fontosak voltak. Crick gondolatai nagyban előse-



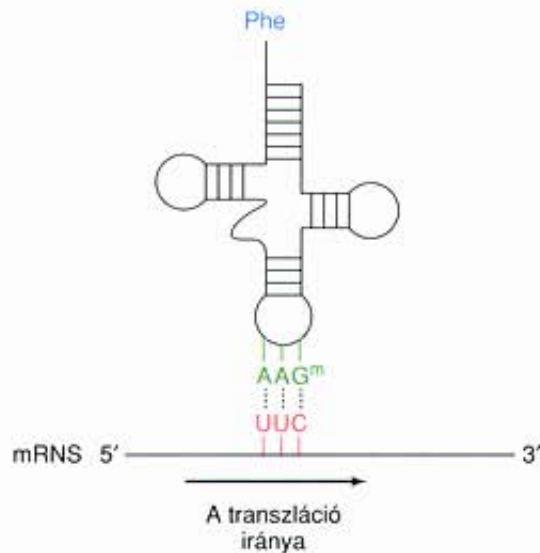
10.17. ábra. Az élesztő tRNA^{Phe} „lóhere” modellje. Felül található az akceptor rész (piros), ahol az aminosav kapcsolódik a 3'-vég adenozinjához. Balra helyezkedik el a dihidouridil hurok (D-hurok, kék), amely legalább egy dihidouracil bázist tartalmaz. Alul az antikodon-hurok (zöld) van, benne az antikodonnal. A TψC-hurok (jobbra, szürke) tartalmazza az állandónak tekinthető TψC-szekvenciát. Mindegyik hurkot egy-egy, bázispárokat tartalmazó szárrész alakítja ki (azonos színnel jelölve)

gítették azokat a kutatásokat (egy részük saját laboratóriumában folyt), amelyek a transzláció rejtélyének megoldásához vezettek.

A tRNS ADAPTER FUNKCIÓJA

A transzláció adapter molekulája a **transzfer RNS**, röviden **tRNS**, egy kisméretű molekula, amely felismeri mind az RNS-t, mind az aminosavat. A 10.17. ábrán az egyik, fenilalanint (Phe) felismerő tRNS vázlatos szerkezete látható. A fejezet későbbi részében részletesen foglalkozunk a tRNS szerkezetével és funkciójával. Most az ún. „lóhere” modellt mutatjuk be, amely ugyan igen kevésbé hasonlít a tRNS valódi alakjára, de kitűnően megfelel annak szemléltetésére, hogy a molekulának két, a működésben igen lényeges részlete van. Az egyik (a modell felső része) az aminosavhoz kapcsolódik. Az ábrán látható fenilalaninra specifikus tRNS (tRNA^{Phe}), csak a fenilalanint köti meg. A kötés kialakulását a fenilalanin-tRNS szintetáz nevű enzim katalizálja. A hasonló reakciókat katalizáló enzimek összefoglaló néven az **aminoacil-tRNS szintetázok**.

A tRNS másik aktív részlete (a modell alsó részén) egy hárombázisnyi szekvencia, amely komplementer az mRNS bázis tripletjének szekvenciájával. Mivel az mRNS bázishármasai a **kodonok**, természetes, hogy a tRNS komplementer bázishármasai az **antikodonok**. A példánkban szereplő kodon egy fenilalanint hordozó tRNS-t köthet meg, vagyis jelentése:



10.18. ábra. A kodon-antikodon felismerés folyamata. Egy mRNS kodonja és egy tRNS megfelelő antikodonja közötti felismerés ugyanazokon a Watson–Crick bázispárosodási szabályokon alapul, mint más nukleotidok illeszkedése. Itt a tRNS^{Phe} 3'AAG^m 5'-antikodonja (zöld) ismeri fel az mRNS 5'UUC3' kodonját (piros). A G^m egy metilált G-t jelent, amely a szabályos G-hez hasonlóan képez bázispárt. Figyeljük meg, hogy a tRNS fordított iránnyal (3' → 5') szerepel a hagyományos felírási módhoz (5' → 3') képest. Ez azért fontos, hogy az antikodon iránya megfeleljen az mRNS-sel való bázispárosodáshoz szükséges antiparalel iránynak (3' → 5'). Az antiparalel lefutás még a legrövidebb kétfonala polinukleotidokra is érvényes, így a három bázisból álló kodon-antikodon párra is

„A fehérjének erre a pontjára kéretik egy fenilalanint beépíteni!” A 10.18. ábrán egy kodon-antikodon illeszkedés látható. Ez a folyamat ugyanazokat a Watson–Crick-féle bázispárosodási szabályokat követi – legalábbis az első kettő bázispár esetében –, mint amelyek bármely más polinukleotidra érvényesek. Ahogyan azt még látjuk majd, a harmadik bázispárnak kicsit nagyobb szabadsága van.

A tRNS-nek két fontos részlete van, amelyek részt vesznek az aminosavak és a nukleinsavak azonosításában. Ezért megfelelnek a Crick által megjósolt adapter molekula szerepének, és kulcsszerepet játszanak a translációban.

A tRNS MÁSODLAGOS SZERKEZETE

Nézzük ismét a tRNS már ismerős, lóherére emlékeztető szerkezetét. Ne feledjük, hogy a molekula háromdimenziós képe valójában nem ilyen. Ez a forma csak a tRNS **másodlagos szerkezetét** hangsúlyozza, vagyis bemutatja a bázispárosodásban lévő régiókat. A rajz felső részén látható a molekula két vége, balra az 5'-, jobbra a 3'-vég. A két vég egymással bázispárokat képezve adja az ún. **akceptorszárat**.

Három másik bázispárokat tartalmazó szár is van, három hurokkal. A **dihidouracil-hurok (D-hurok)** nevét arról a módosított uracilról kapta, amely mindig megtalálható benne. Az **antikodon-hurok** a csúcsa közelében lévő antikodonról nyerte nevét. A **T Ψ C-hurokban** pedig az állandó bázisösszetételű T Ψ C bázishármas található. A pszi (Ψ) egy módosított nukleozid, a **pszeudouridin** jele. Annyiban különbözik a szabályos uridintól, hogy a bázis a ribózhoz az 5-ös C-atomon és nem az 1-es N-en keresztül kapcsolódik. Az antikodon-hurok és a T Ψ C-hurok közötti régió a 10.17. ábrán az ún. **variábilis hurok**, mert hossza 4–13 nukleotid között változik, és a hosszabb hurokban lehet bázispárokat tartalmazó szárrész.

Mivel a tRNS-ek sok módosított bázist tartalmaznak a dihidouracilon kívül, jogosan merül fel a kérdés: a tRNS ezekkel a bázisokkal szintetizálódik-e, vagy bázisai csak a szintézis befejezése után módosulnak. A válasz az, hogy ugyanazzal a négy szabályos bázissal készül, mint a többi RNS, majd a transzkripció után egy összetett enzimrendszer módosítja a bázisokat. Milyen hatással vannak ezek a módosítások a tRNS működésére? Biztosan fontosak, mert legalább kettő, csak a négy normál bázisból álló, *in vitro* szintetizált tRNS-ről bebizonyosodott, hogy nem képesek aminosavak megkötésére.

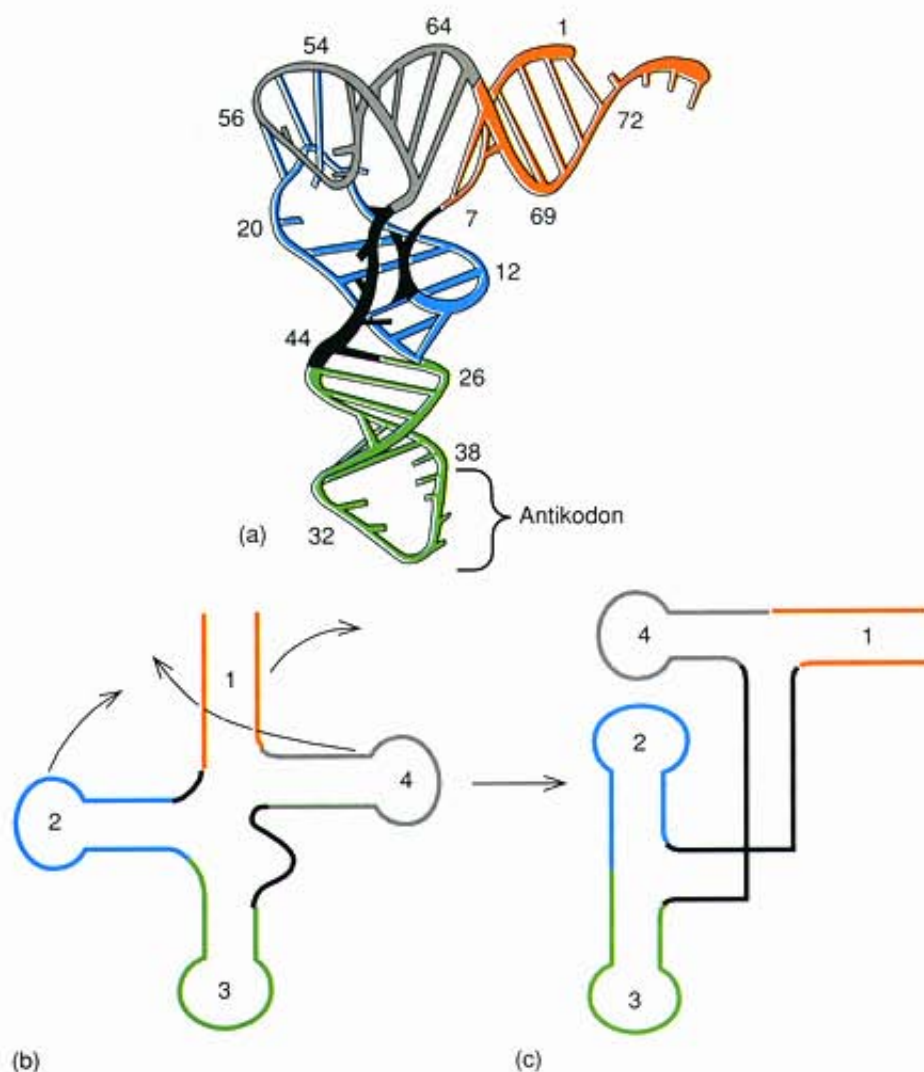
A tRNS lóherére emlékeztető modellje a molekula másodlagos szerkezetét, a bázispárosodásban levő részeket ábrázolja. A molekulának négy ilyen szárrésze van, rajta három hurokkal, a D-, az antikodon- és a T Ψ C-hurokkal. A tRNS-ek sok módosított bázist tartalmaznak, és ezek egy része feltétlenül szükséges a tRNS működéséhez.

A tRNS HÁROMDIMENZIÓS SZERKEZETE

Alexander Rich és munkatársai röntgendiffrakciós vizsgálatokkal derítették fel a tRNS háromdimenziós vagy **harmadlagos szerkezetét**. Mivel lényegében mindegyik tRNS másodlagos szerkezete azonos, lóherére emlékeztető, talán nem okoz nagy meglepetést, hogy harmadlagos szerkezetük is megegyezik, ami megfelel a 10.19. ábrán látható L alakú struktúrának.

A háromdimenziós szerkezet megértéséhez fontos az a tény, hogy minél hosszabb a bázispárokat alkotó régió, annál stabilabb a tRNS. A tRNS-ben növeli a bázispárosodásokat tartalmazó szárok hosszúságát az, hogy két kiterjedt régióban helyezkednek el. Az egyik régió vízszintesen áll és az akceptor valamint a T Ψ C-szárat tartalmazza. A másik régió adja a molekula függőleges tengelyét, és tartalmazza a D- és az antikodon-szárokat. Bár a szárok két része nem tökéletesen illeszkedik, emiatt kicsit meg is hajlanak, az elrendeződés stabil.

A 10.19. ábra még kétdimenziós formában is tisztán mutatja, hogy az antikodon bázisai nem fordulnak befelé, hogy bázis-



10.19. ábra. A tRNS háromdimenziós szerkezete. (a) Az élesztő tRNS^{Phe} háromdimenziós szerkezetének síkbeli vetülete. A molekula egyes részeinek színezése megegyezik az ábra (b) és (c) részeinek színezésével. (b) Az ismert lóherealak. A nyilak azt mutatják, hogyan csavarodnak el a lóhereforma egyes részei a molekula térbeli szerkezetének kialakulásakor. A (c) ábra az elcsavarodás utáni állapotot vázolja

párt alkossanak a tRNS más részeivel. Az antikodon bázisai jobbra kifelé hajlanak, ezért képezhetnek bázispárt az mRNS kodonjával. Az antikodon három bázisa egymás felett párhuzamosan áll, mintha egy helikális szerkezeti elem lenne, és valóban így helyezkedik el, ami jelentős mértékben elősegíti a kodon bázisaival a bázispárok kialakítását. A riboszóma feltehetőleg meg is könnyíti a kapcsolódást.

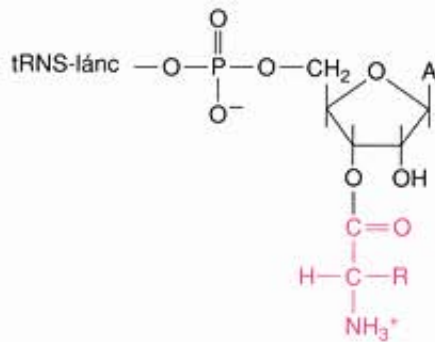
A tRNS háromdimenziós szerkezete egy L alakú képletből áll, amelyben a négy szár rész fed egymást, és két hosszú, kettős hélixet tartalmazó régiót alkot, amelyek stabilizálják a molekulát. Az antikodon bázisai az antikodon-hurokban kifelé fordulnak és egy hélix mentén rendeződnek, így könnyebben képeznek H-kötéseket a kodon három bázisával.

AZ AMINOSAVAK KAPCSOLÓDÁSA A tRNS-HEZ

Amint egy aminosav a tRNS 3'-végéhez kötődik, a tRNS **feltöltődött** az aminosavval. Mindegyik tRNS 3'-végén ugyanaz a három bázis (CCA) található és az aminosav a terminális adenzinhez kötődik. A 10.20. ábra mutatja a terminális CCA szekvenciát és azt, hogyan képez észterkötést az aminosav karboxilcsoportja az adenzin ribózának 3'-hidroxilcsoportjával.

A feltöltés két lépésben zajlik, mindegyiket az **aminoacil-tRNS szintetáz** enzim katalizálja. Az első lépésben (10.21. ábra) az aminosav ATP energiáját felhasználva aktiválódik. A reakció terméke aminoacil-AMP és pirofoszfát. A pirofoszfát a két végállású foszfátcsoport leválásával képződik.

Az ATP (és a többi nukleozid-trifoszfát) foszfátcsoportjai között makroerg kötések találhatók. Amikor a foszfátcsoportok közötti kötések hidrolizálnak, energia szabadul fel. Ebben az



10.20. ábra. A tRNS és egy aminosav kapcsolódása. Egyes aminosavak a tRNS terminális adenzinjának 3'-hidroxilcsoportjához kapcsolódnak észterkötéssel, de vannak olyanok is, amelyek a 2'-hidroxilcsoportozhoz kötődnek. Ebben az esetben az aminosav átkerül a 3'-hidroxilcsoportra, mielőtt beépülne a fehérjébe

esetben az energia az **aminoacil-AMP** kötésébe épül be, ezért nevezzük ezt az állapotot **aktivált aminosavnak**. A második reakcióban az aminoacil-AMP energiája használódik fel az aminosav tRNS-hez való kapcsolására, az **aminoacil-tRNS** képzésére.

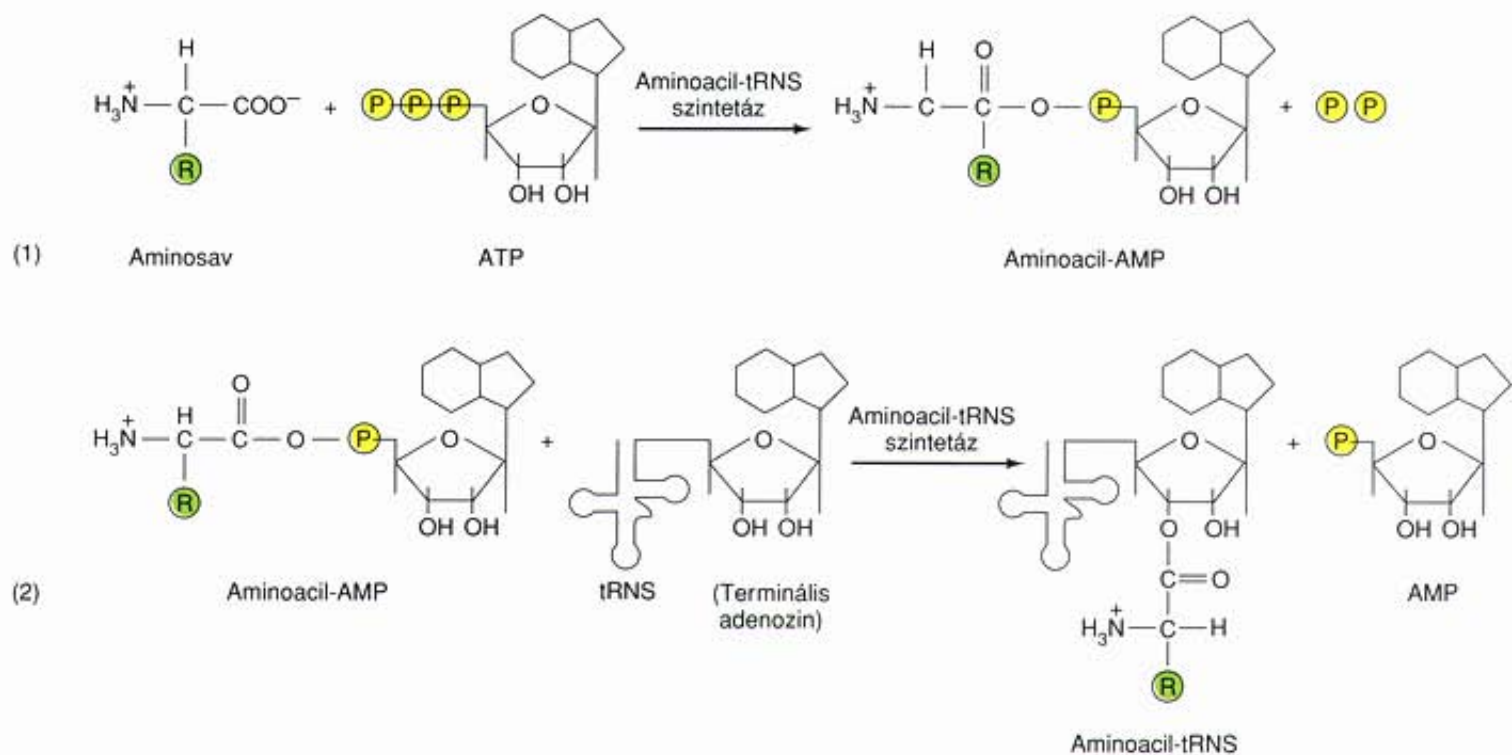
A legtöbb enzimhez hasonlóan az aminoacil-tRNS szintetázok is szubsztrátspecifikus katalizátorok. Csak húsz szintetáz

enzim létezik – mindegyik aminosavhoz egy-egy. Az enzimek nagymértékben specifikusak, szinte hiba nélkül működnek, és a megfelelő tRNS-t a megfelelő aminosavval kapcsolják össze.

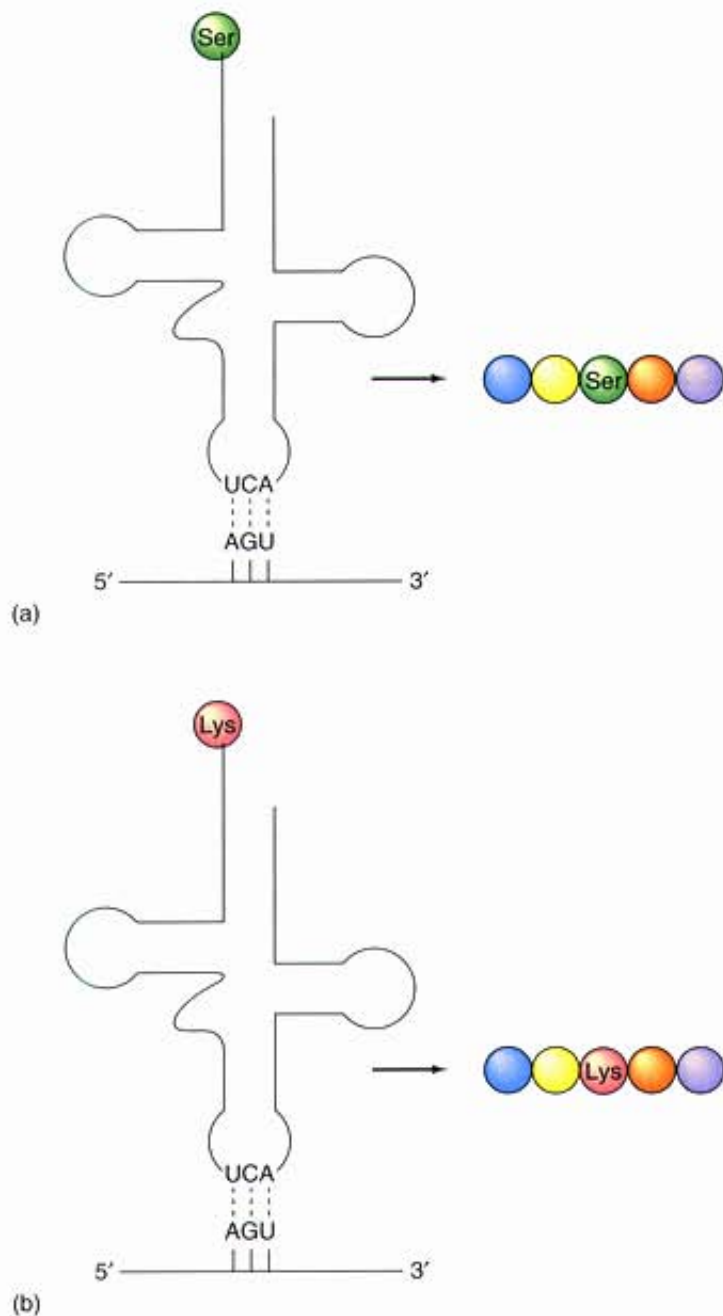
Gondoljuk csak el, mi történne, ha ezek az enzimek gyakran hibáznának! Ha például a szerin-tRNS szintetáz, amelyik az általa felismert tRNS^{Ser}-re kapcsolja a szerint, hirtelen lizint kötne rá, a következmények súlyosak is lehetnek. (10.22. ábra). A lizin-tRNS^{Ser} a szerin kodonjait ismerné fel, hiszen antikodonja változatlan maradt, és az aminosavnak nincs szerepe a kodon-antikodon felismerésben. A hibás aminoacil-tRNS lizint építene be a fehérjébe a szerin helyére! Minthogy a fehérjék térszerkezete és funkciója az elsődleges szerkezettől, vagyis az aminosavsorrendtől függ, a fenti változás minden bizonnyal tönkretenné a fehérjét.

AZ AMINOACIL-tRNS SZINTETÁZOK SPECIFITÁSA

Szerencsére az aminoacil-tRNS szintetázok *nagymértékben* specifikusak, ezért csak nagyon ritkán hibáznak. Mi okozza az enzimek nagyfokú specifitását? Bizonyára mindegyik nagyon speciális kölcsönhatásba kerül egy bizonyos tRNS-sel, de mit azonosíthat, ami a többin nincs jelen? Az egyik ilyen vonás egy tRNS-en az antikodon, ezért nem nehéz megjósolni, hogy szerepe van a felismerésben. Valójában a kép ennél bonyolultabb. Úgy tűnik, a szintetázok a tRNS-nek több régióját is felismerik, ame-



10.21. ábra. Az aminoacil-tRNS szintetáz működése. 1. lépés: Az aminoacil-tRNS szintetáz katalizálja az aminosav-ATP-reakciót, amelyben aminoacil-AMP és melléktermékként pirofoszfát keletkezik. 2. lépés: Az enzim az aktivált aminosavat a tRNS-re kapcsolja. A reakció mellékterméke AMP. Az aminosav a tRNS terminális adenzinjának 3'-hidroxilcsoportjához kötődik. Az egyszerűség kedvéért az adenint csak körvonalával jelöltük



10.22. ábra. Az aminoacil-tRNS szintetáz hibás működésének következménye. (a) Normális esetben a $tRNS^{Ser}$ 3'UCA5' antikodont tartalmaz, vagyis felismeri az AGU kodont. Szerinnel (zöld) töltődik fel, és szerint illeszt a polipeptidláncba (jobbra). (b) Hiba esetén ugyanez a $tRNS^{Ser}$ ugyanezzel az antikodonnal az AGU kodont ismeri fel. Csakhogy nem szerin, hanem lizin (piros) kapcsolódik hozzá, tehát azt fogja a polipeptidláncba illeszteni a szerin helyett. Az aminosavcsere jelentősen megváltoztathatja az elkészült fehérje tulajdonságait. Ne feledjük, hogy a tRNS-ek antikodonja (3' → 5' balról jobbra) antiparalel állású az mRNS-hez képest (5' → 3' balról jobbra)

lyeket Thomas Steitz és munkatársai **felismerési elemeknek** nevezték el.

Az első ezek közül a tRNS akceptorszára. 1972-ben Dieter Söll és munkatársai arra hívták fel a figyelmet, hogy az akceptorszáron a CCA melletti bázis összefüggésben áll a felismert aminosavval. Például az adott pozícióban A-t tartalmazó tRNS-ek hajlamosak apoláris aminosavakkal feltöltődni, míg a G-t tartalmazók polárisakkal, ezért ezeket **diszkriminátor bázisoknak** nevezték el. Ez azonban csak igen durva megkülönböztetés, mert ebben a pozícióban is csak négyféle bázis lehet, de húszféle aminosav van. Több mint huszonöt évvel később Paul Schimmel és munkatársai kimutatták az egyik bázispár fontosságát az akceptorszáron. Azt tapasztalták, hogy egyetlen (G-U) bázispár megváltoztatása a $tRNS^{Ala}$ akceptor szárában megszünteti az alaninhoz való kapcsolódás lehetőségét. Sőt, ha egy G-U párt építenek be cisztein- vagy a fenilalanin-tRNS ugyanazon pontjára, az átalakítja őket alanin-tRNS-sé. Tehát a G-U pár meghatározott pozícióban az alanin-tRNS kulcsfontosságú felismerő eleme. A G-U bázispár egy ún. „lötyögő” bázispár, amelyről a fejezet további részében még említést teszünk.

Söll, Steitz és munkatársaik röntgenkristallográfias módszerrel derítették fel a glutaminil-tRNS szintetáz szerkezetét a $tRNS^{Gln}$ -hez kötött állapotában (10.23. ábra). Az enzim felső részéhez közel látható egy mélyedés, amely az akceptorszárat fogadja be, beleértve a diszkriminátor bázist és a $tRNS^{Ala}$ -nál fontos G-U bázispárnak megfelelő részt. Úgy tűnik, mintha ez a bázispár az enzimmel képzett komplexben felnyílt állapotban volna. Az enzim alsó részén megfigyelhető egy kisebb hasadék, amelybe beleillik a tRNS antikodonja. Ez teszi lehetővé, hogy a szintetáz specifikusan felismerje az antikodont. Ráadásul jól látható az is, hogy az enzim bal oldalának legnagyobb része igen közeli kapcsolatban van a tRNS L-jének belső hajlatával. Lehetséges, hogy az ott található bázisok is felismerő elemként viselkednek.

Egyes kutatók feltételezték, hogy ugyanolyan egyszerű felismerési kód van a szintetáz enzim és a tRNS között, mint a kodon és az antikodon között. Ennek az egyszerű hipotézisnek az alapján „második genetikai kód” elnevezéssel írták le a szintetáz-tRNS felismerési folyamatot. Mára már kiderült, hogy ez az elképzelés túlságosan leegyszerűsíti az enzim és a megfelelő tRNS összetett felismerő elemei közötti bonyolult kölcsönhatást.

Mind egyik aminoacil-tRNS szintetáz specifikus aminosavat kapcsol a megfelelő tRNS-re. A reakció nagymértékben specifikus mind az aminosavra, mind pedig a tRNS-re nézve. A reakció első lépésében az aminosavat az ATP aktiválja, és aminoacil-AMP keletkezik. A második lépésben kapcsolja az enzim az aktivált aminosavat a megfelelő tRNS-re. A szintetázok a tRNS-üket több elemből álló felismerési rendszer alapján azonosítják.



10.23. ábra. A glutamil-tRNS szintetáz enzim háromdimenziós képe az RNS-sel és ATP-vel alkotott komplexben. A szintetáz kék, a tRNS piros és sárga, az ATP zöld. Figyeljük meg az enzim és a tRNS közötti három kapcsolódási zónát: (1) A felül látható mély hasadék tartja a tRNS akceptorszárát és az ATP-t. (2) Balra alul egy kisebb zsebbe illeszkedik a tRNS antikodon része. (3) Az előző két rés közötti terület a tRNS L alakú ivének nagy részéhez illeszkedik

Forrás: Dr. Rould, M. A.: Science, 236: címlapfotó, 1989, © AAAS

A GENETIKAI KÓD

A **genetikai kód** az mRNS három egymást követő bázisból álló kódszavaiból, a **kodonokból** áll, amelyek a fehérjékben található húszféle aminosavat jelentik. Mint minden kódot, ezt is meg kellett fejteni, hogy az értelmére fény derüljön. 1960 előtt még alapvető kérdések vártak válaszra: Átfednek-e az egyes kodonok? Vannak-e „szóközök” vagy „vesszők” a kódban? Hány bázisból áll egy kodon? Ezekre a kérdésekre sikerült választ adni még az 1960-as években, egy sor szellemes kísérlet segítségével, amelyek közül néhányat ismertetünk.

A GENETIKAI KÓD ÁTFEDÉSMENTES

Ha a kód átfedésmentes, akkor egy bázis csak egy kodonhoz tarthat. Az átfedő kódban egy bázis két, de akár három kodon része is lehetne. Tekintsük az alábbi RNS-szakaszt:

AUGUUC

Amennyiben a kód tripletekből áll, azaz három bázis alkot egy kodont, és az üzenet az elejétől olvasódik le, átfedésmentes kód esetén a kodonok: AUG és UUC. Ha a kód átfedő volna, négyféle kodon alakulhatna ki: AUG, UGU, GUU és UUC. Sydney Brenner már 1957-ben felismerte az átfedő kód lehetetlenségét, az alábbi gondolatmenettel. Vegyük pél-

dának az UUC kodont. Ha a kód teljes mértékben átfedő, az éppen előtte lévő kodon a GUU lenne. A G cseréje az AUU, a CUU vagy az UUU kodont adná. Ez a négy kodon négy másik aminosavat jelenthetne a polipeptidlánc utolsó, UUC által kódolt aminosava előtt. Brenner viszont négynél több különböző aminosavat talált az utolsó előtti helyen az addig elemzett fehérjékben. Például a lizinnek 17 különféle N-terminális szomszédját mutatta ki. Az elemzést ugyan megnehezítette, hogy a lizinnek nem egy, hanem két kodonja van, de még így is nyilvánvaló volt, hogy a kód nem lehet teljes mértékben átfedő.

Az 1957-ben rendelkezésre álló kísérleti eredmények alapján a részlegesen átfedő kód még elképzelhető volt. A. Tsugita és H. Frankel-Conrat úgy gondolták, ha a kód átfedésmentes lenne, egy bázis megváltozása az mRNS-ben (**misszensz mutáció**) csak egy aminosavban idézne elő változást a keletkező fehérjében. Vegyük a következő oligonukleotidot:

AUGCUA

Amennyiben a kód tripletekből áll, és a leolvasás az elején kezdődik, a lehetséges kodonok átfedés nélkül: AUG és CUA. A harmadik helyen (G) bekövetkező változás csak az AUG kodont módosítaná, és csak egy aminosav változását idézné elő. Ha azonban a kód átfedő, az érintett G három szomszédos kodon tagja lehetne (AUG, UGC, GUC), aminek következtében három hibás aminosav beépülés történhetne. Amikor a dohány-mozaikvírus (DMV) mRNS-ében egy bázist módosítottak, azt találták, hogy egyetlen aminosavnál történt változás. A kód tehát átfedésmentes.

A KÓD VESSZŐMENTES

Ha a kód translációra nem kerülő bázisokat – szóközöket vagy vesszőket – tartalmazna, akkor egy bázis hozzáadása vagy eltávolítása csak néhány kodont változtatna meg, de a következő vessző után a riboszóma már visszaállhatna a normális menetre. Más szóval, az ilyen mutációk lehetnének letálisak, de számos esetben, amikor a mutáció éppen egy vessző előtt következne be, csak kis hatásuk lenne, ha egyáltalán lenne. Ha azonban nincs vessző, amely helyreállíthatja a riboszóma leolvasó működését, ezek a mutációk letálisak, feltéve, ha nem a translációra kerülő üzenet végén alakulnak ki.

A fenti hatást hozzák létre a leolvasási keretet megváltoztató **frameshift mutációk**. Legyen az mRNS bázissorrendje:

AUGCAGCCAACG

Ha a transláció az elején kezdődik, az egyes kodonok: AUG, CAG, CCA, ACG. Egy számfeletti bázist (X) beépítünk az U után, és az alábbi bázissorrendet kapjuk:

AUXGCAGCCAACG

Ez a következő formában kerülne translációra: AUX, GCA, GCC, AAC. Egy bázis inszerciója nem csak az érintett kodont változtatja meg (AUX), hanem attól a ponttól kezdve mindegyik kodont érinti. A **leolvasási keret** egy bázisnyival balra csúszik. Míg a C eredetileg a második kodon első bázisa volt, most a G van abban a pozícióban. Mintha egy vetítógép ugrana egy perforációt a film szélén, és az egyik kép utolsó harmadát együtt mutatná a következő kép első kétharmadával.

Vesszőket tartalmazó kód esetében mindegyik kodont egy vagy több translációra nem kerülő bázis venne közre, amelyeket az alábbi felírásban „Z”-vel jelöltünk. Ezeknek a bázisoknak az lenne a funkciójuk, hogy a kodont a riboszóma számára kedvező, felismerhető pozícióba igazítsák.

AUGZCAGZCCA ZACGZ

Egy bázis deléciója vagy inszerciója ebben az esetben csak egyetlen kodont változtatna meg, mert a Z (vessző) a hibás kodon után visszaállítja a riboszómát a helyes leolvasási útra. Az első kodonban egy (X) bázis inszerciója az

AUXGZCAGZCCA ZACGZ

bázisrendet eredményezi. Az első kodon (AUXG) hibás, de az összes többi helyesen leolvasható a Z-k korrigáló hatásának köszönhetően.

Amikor Francis Crick és munkatársai akridin festékekkel kezelték baktériumokat, amelyek általában egy bázis inszercióját vagy delécióját okozták, azt tapasztalták, hogy igen súlyos hatású mutációk alakultak ki, a mutáns génekről nem képződött működőképes fehérje. Mivel az inszerciók és a deléciók a leolvasási keretet egészen az üzenet végéig eltolják, a kísérleti adatok alapján vesszőmentes kódot valószínűsíthetünk.

Ezenfelül Crick azt is megfigyelte, hogy egy bázis hozzáadása kiolthatja egy másik bázis deléciójának hatását, és fordítva. Ezt a jelenséget mutatja be a 10.24. ábra olyan mesterséges génnel, amelyet ismétlődő CAT tripletek alkotnak. Ha beépül egy G bázis a harmadik helyre, a leolvasási keret ezt követően úgy toódik el, hogy a továbbiakban TCA tripletek jönnek létre. Ha a vad típusból indulunk ki, és az ötödik helyen lévő A kerül delécióra, a leolvasási keret a másik irányba toódik el, és ATC kodonok alakulnak ki. A fenti két mutáns keresztezéséből néha rekombinálódhat az „ál-vad típusú” gén, amint az az ábra 4. sorában látható. Első két kodonja, a CAG és a TCT, hibásak, de ezután az inszerció és a deléció kioltja egymást. Az eredeti leolvasási keret helyreáll, ettől a ponttól mindegyik kodon CAT.

A KÓD TRIPLETEKBŐL ÁLL

Crick és Leslie Barnett felfedezték, hogy három szomszédos bázis inszerciója vagy deléciója is eredményezhet vad típusú gént (10.24. ábra 5. sor). Ehhez természetesen az szükséges, hogy a kodon három, vagy a három egész számú többszörösének megfelelő bázisból álljon. Crick, amikor meghallotta munkatársától a kísérlet eredményét, tréfásan megjegyezte: „Csak mi vagyunk az a kettős, aki tudja, hogy a kód hármas!”

1. Vad típus:	CAT CAT CAT CAT CAT
2. Egy bázis inszerciója:	CAG TCA TCA TCA TCA
3. Egy bázis deléciója:	CAT CTC ATC ATC ATC
4. #2 és #3 keresztezése:	CAG TCT CAT CAT CAT
5. 3 bázis inszerciója:	CAG GGG CAT CAT CAT

10.24. ábra. Frameshift mutációk. 1. sor: Egy hipotetikus gén ismétlődő CAT kodonokból áll. A függőleges szaggatott vonalak jelzik a kezdőponttól a leolvasási keretet tripletenként. 2. sor: Egy bázis, a G (piros) inszerciója a harmadik helyen megváltoztatja az első kodont, CAG-re, és eltolja a leolvasási keretet egy bázissal balra. Emiatt az összes következő kodon TCA-ra változik. 3. sor: Az ötödik bázis deléciója (kis háromszöggel jelölve) a vad típusú génből a második kodont CTC-re változtatja, és egy bázissal jobbra tolja a leolvasási keretet. Ezért a következő kodonok mindegyike ATC lesz. 4. sor: A 2. és a 3. sorban szereplő mutánsok keresztezésével kialakulhat a vadhoz hasonló típus „ál-vad típus”, ha a beékelődés és a kiesés egymás közelében történt. A bemutatott példában az eredmény olyan DNS-szakasz, amelyen az első két kodon megváltozott, a többi viszont visszaállt az eredeti leolvasási keretre. 5. sor: Három bázis (GGG – piros) inszerciója a második bázis utáni pozícióba, megváltoztatja az első két kodont, de a leolvasási keret megmarad. Ugyanez igaz három bázis deléciójára is

1961-ben Marshall Nirenberg és Johann Heinrich Matthaei végezték azt a döntő fontosságú kísérletet, amellyel lehetővé vált a genetikai kód megfejtése. A kísérlet lenyűgözően egyszerű volt: bizonyította, hogy szintetikus RNS-ről *in vitro* folyhat transláció. Nirenberg és Matthaei a mesterséges poli(U)-RNS translációjával polifenilalanint kapott. Ez természetesen azt jelentette, hogy a fenilalanin kodonja csak U-t tartalmaz. Ez az eredmény önmagában is fontos volt, de legnagyobb jelentősége mégis abban állt, hogy nyilvánvalóvá tette: tervezhető és előállítható meghatározott szekvenciájú mesterséges RNS, analizálható a róla készült fehérjetermék, és ezzel megfejthető a genetikai kód. A módszer gyakorlati megvalósítói Har Gobind Khorana és munkatársai voltak.

Idézzük fel, hogyan bizonyították Khorana mesterséges mRNS-sel végzett kísérletei, hogy a kodonok három bázisból állnak! Először, ha a kodont páratlan számú bázis alkotja, az ismétlődő dinukleotid elemekből álló mRNS [pl. poli(UC), azaz UCUCUCUCUC...] csak kétféle kodont eredményezhet (pl. UCU és CUC), bárhol kezdődjék is a transláció. Ennek következtében a képződő fehérje ismétlődő elemekből áll, két felváltva elhelyezkedő aminosavból. Ha a kodon páros számú bázisból épül fel, akkor csak egy kodon (pl. UCUC) ismétlődne folytonosan. A második bázisnál kezdve a leolvasást, természetesen egy másik ismétlődő kodont kapunk (CUCU). Mindkét esetben csak egyféle aminosavból állna a polipeptidlánc, azaz homopeptid lenne. Khorana kísérletében a poli(UC) alapján kétféle aminosavból álló poli(szerin-leucin) képződött (10.25.(a) ábra), bizonyítva, hogy a kodonokban páratlan számú bázis van.



10.25. ábra. Különböző mesterséges mRNS-ekről készült polipeptidek (a) A poli(UC) két váltakozó kodont ad, UCU-t és CUC-t, amelyek szerint (Ser), illetve leucint (Leu) kódolnak. Az mRNS terméke poli(Ser-Leu) lánc. (b) A poli(UUC) a kezdőponttól függően három kodont adhat, UUC-t, UCU-t és CUU-t, amelyek a fenilalanin (Phe), a szerin (Ser) és a leucin (Leu) megfelelői. Vagyis a termék lehet poli(Phe), poli(Ser) vagy poli(Leu), attól függően, hogy a riboszóma melyik leolvasási keretet használja. (c) A poli(UAUC) négy kodont tartalmaz ismétlődő szekvenciával: UAU, CUA, UCU és AUC, amelyek a tirozin (Tyr), a leucin (Leu), a szerin (Ser) és az izoleucin (Ile) kodonjai. Terméke ezért poli(Tyr-Leu-Ser-Ile)

Az ismétlődő tripletek alapján homopolipeptidek képződnek, ahogyan három bázisból (illetve a három többszöröséből) álló kodon esetén várható. A poli(UUC) esetében a translációval polifenilalanin, poliszerin és polileucin keverékét kapták (10.25.(b) ábra). Azért keletkezett három különböző termék, mert a mesterséges RNS translációja bárhol elkezdődhet. Tehát a poli(UUC) a kezdőponttól függően olvasható UUC, UUC vagy UCU, UCU vagy CUU, CUU sorozat formájában is. Ha vizelmezi a transláció megindul, a rendszer a bázisokat hármassával értelmezi, tehát csak egyféle kodon alapján készül polipeptid.

Az ismétlődő tetranukleotidokból álló RNS-ről keletkező fehérjetermék ismétlődő tetrapeptid egységekből áll. A poli(UAUC)-ről poli(tirozin-leucin-szerin-izoleucin) képződött (10.25.(c) ábra). Gyakorlasként írja fel ezt a szekvenciát, és fordítsa le aminosavszekvenciára. Meggyőződhet róla, hogy csak a három, kilenc, illetve még több tagból álló kodon esetében kap politetrapeptidet, hat bázis azonban semmiképp alkothat egy kodont. Mivel egy kilenc bázis méretű kodon nagyon nehézkes volna, kézenfekvő a tripletekből álló kodon feltételezése. Nézzük a problémát egy másik szempontból: a három bázis a legkevesebb, amellyel előállítható mind a húszféle aminosav meghatározásához elegendő kodon. A négy különböző bázis harmadosztályú ismétléses permutációjával 43, azaz 64 triplet lehetséges. Két bázis felhasználásával $4^2 = 16$, azaz csak 16-féle kodon alakulhat ki, ami nem elegendő a 20-féle aminosav meghatározásához. Ha a kodon 9 bázisból állna, ez $4^9 = 262\,144$ változatot jelentene, de a természet ennél sokkal gazdaságosabban működik.

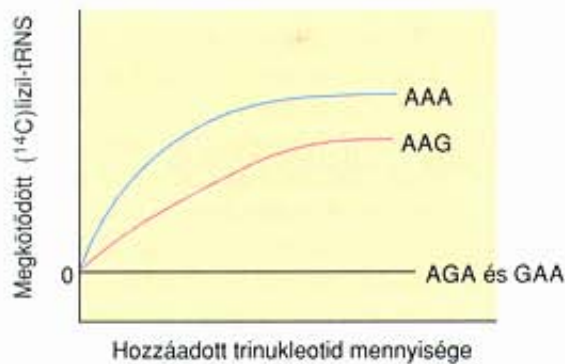
A genetikai kódot három bázisból álló kódszavak, másként kodonok alkotják az mRNS-en. A genetikai kód határozza meg az aminosavak polipeptidláncba épülésének sorrendjét a riboszómán. A kód átfedésmentes, vagyis minden bázis csakis egy kodonhoz tartozik. A kód vesszőmentes, tehát az mRNS kódoló régiójában minden bázis tagja egy kodonnak.

A KÓD MEGFEJTÉSE

Khorana mesterséges mRNS-ei komoly következtetésekre adtak lehetőséget néhány kodonnal kapcsolatban. Mivel pl. a poli(UC) terméke poli(szerin-leucin), biztos, hogy az UCU és CUC kodonok egyike a szeriné, a másik pedig a leuciné. A kérdés az, hogy melyik melyiké. Nirenberg hatékony módszert fejlesztett ki a probléma megoldására. Azt tapasztalta, hogy egy trinukleotid rendszerint már mRNS-ként viselkedik, vagyis elegendő egy specifikus aminoacil-tRNS riboszómához kapcsolásához. Az UUU tripletthez például a fenilalanin-tRNS kapcsolódik, de másféle tRNS nem. Tehát az UUU a fenilalanin kodonja. A módszer azonban nem volt tökéletes, mert egyes kodonok akkor sem eredményezték az aminoacil-tRNS bekötődését, ha kódoltak aminosavat. Nirenberg kísérleti eljárása jól kiegészítette Khorana módszerét, amely önmagában nem egykönnyen vezethetett volna a genetikai kód megfejtéséhez.

A következő példa a két módszer együttes alkalmazását mutatja be. A poli(AAG) translációjával polilizin, poliglutaminsav és poliarginin keletkezett. A szintetikus mRNS-ben háromféle kodon van: AAG, AGA és GAA. Melyik a liziné? Mindhármat megvizsgálták Nirenberg eljárásával, az eredmény a 10.26. ábrán látható. Az AGA és GAA esetén nem kötődött (^{14}C)lilizil-tRNS a riboszómához, az AAG triplettel viszont igen, tehát az AAG a lizin kodonja. Még egy dolgot meg kell azonban jegyeznünk: az AAA triplet ugyancsak lizint kódol. Ez a genetikai kód egy másik fontos tulajdonságára mutat rá, arra, hogy egy aminosavat a legtöbb esetben egynél több triplet kódol, azaz a kód **degenerált**.

A 10.27. ábrán látható a teljes genetikai kód. Amint megjósolták, 64 különböző kodon van és csak 20-féle aminosav, mégis mindegyik kodonnak van értelme. Közöttük három ún. „stopkodon” van, amelyek a polipeptidlánc befejezését jelzik, a többi azonban mind aminosavat jelent. A leucinnak, az argininnek és a szerinnek hat különböző kodonja van, más aminosavaknak, közöttük a prolinnak, a treoninnak és az alaninnak



10.26. ábra. A lizil-tRNS kötődése a riboszómákhoz különböző kodonok esetén. A lizil-tRNS-t radioaktív C-izotóppal (^{14}C) jelölték, és az *E. coli* riboszómáihoz adták a következő trinukleotidok jelenlétében: AAA, AAG, AGA és GAA. A lizil-tRNS-riboszóma komplex kialakulását nitrocellulóz szűrőn való megkötődés alapján mérték. (A komplex megkötődik a nitrocellulóz szűrőn, a riboszómához nem kapcsolódó, szabad lizil-tRNS azonban nem.) Az AAA a lizin kodonja, így azt várták, hogy ehhez a trinukleotidhoz is kapcsolódik majd a komplex

négy, az izoleucinnak három, sok más aminosavnak pedig kettő. Csak két aminosavnak, a triptofánnak és a metioninnak van egy-egy kodonja.

A genetikai kódot szintetikus mRNS-ek és trinukleotidok segítségével fejtették meg. Az első módszerrel a keletkező polipeptidet elemezték, a másodikkal a riboszómához kapcsolódó aminoacil-tRNS-t határozták meg. Összesen 64 kodon van, ebből három stopjel, a többi aminosavat kódol, ami azt jelenti, hogy a kód nagymértékben degenerált.

KÜLÖNÖS BÁZISPÁROK

A KODON ÉS AZ ANTIKODON KÖZÖTT

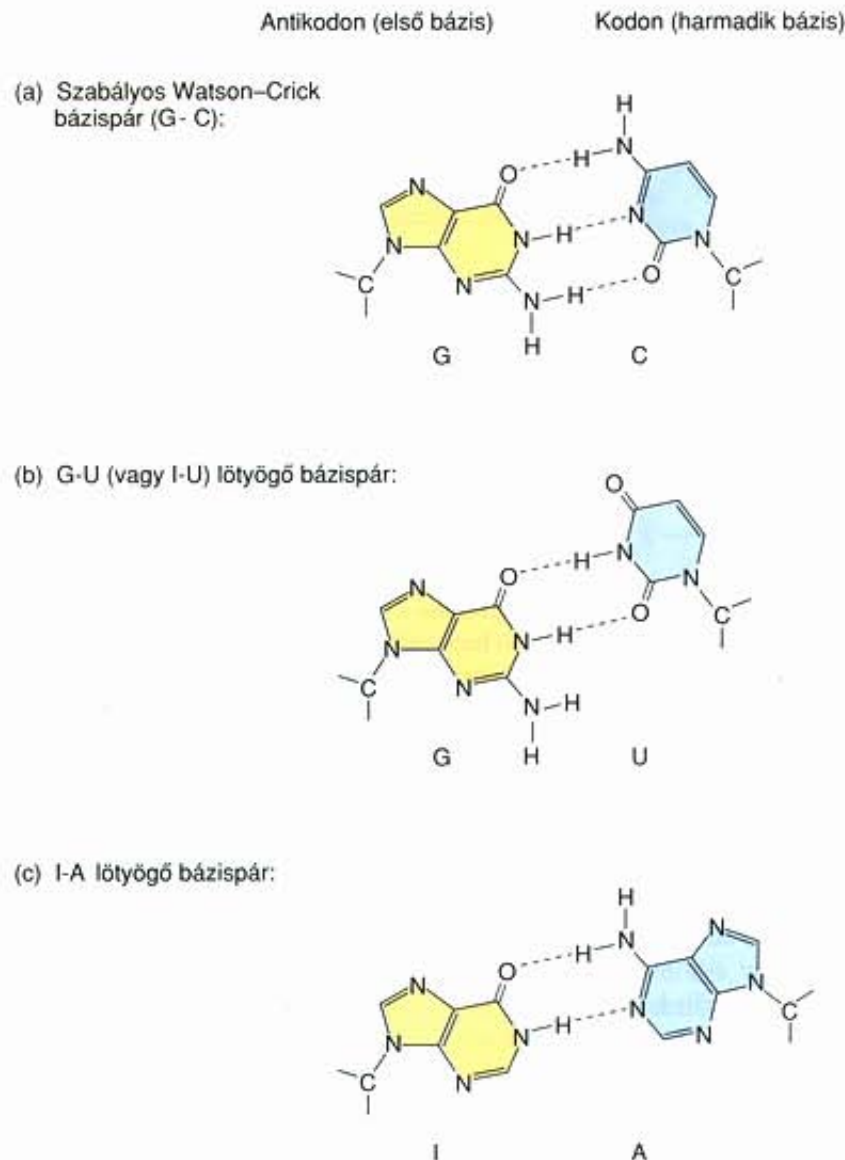
Miként kezeli a transláció azt a problémát, hogy egy aminosavnak különböző kodonjai vannak? Az egyik megoldás az, hogy egy aminosavnak többféle tRNS-e van (**izoakceptor típus**), és mindegyik különböző kodonra specifikus. Ez valójában csak részben ad választ a kérdésre. Lényegesen kevesebb tRNS-t ismerünk ugyanis, mint amennyit ennek az egyszerű hipotézisnek az alapján várnánk. Ismét Francis Crick előzte meg a kísérleti eredményeket egy újabb elmélettel. Feltételezte, hogy a kodon első két bázisának pontosan kell illeszkednie az antikodonhoz a bázispárosodási szabályok alapján, a kodon utolsó bázisa azonban kissé „lötyöghet”, és rendellenes bázispárokat is képezhet az antikodonnal. Ez az ún. **lötyögő kód hipotézis**. Crick felvetette, hogy az antikodon guaninja nemcsak a kodon harmadik pozíciójában lévő citozinnal képezhet bázispárt, hanem az uracillal is. Ez eredményezi a 10.28.(b) ábrán látható **lötyögő bázispárt**. Figyeljük meg, mennyire kibillen az uracil a normális helyzetből a bázispár kialakításához.

Crick felhívta a figyelmet a tRNS egyik szokatlan nukleozidjára, az **inozinra (I)**, amelynek szerkezete a guanozinhoz hasonlít. Ez a nukleozid vagy a guanozinhoz hasonlóan képezhet bázispárt és a citozinhoz kapcsolódik (Watson-Crick bázispár), vagy az uracillal a kodon harmadik pozíciójában (lötyögő bázispár). Crick felvetette, hogy az inozin egy másik lötyögő bázispárt is kialakíthat, a kodon harmadik helyén lévő adeninnel (10.28.(c) ábra). Ez azt jelenti, hogy az inozint első helyen tartalmazó antikodon potenciálisan három különböző kodonnal léphet kapcsolatba, amelyek utolsó tagja C, U vagy A.

A lötyögés jelensége nyilvánvalóan lecsökkenti a genetikai kód translációjához szükséges tRNS-ek számát. Vegyük például az UUU és UUC kodonokat, amelyek fenilalanint jelentenek (10.27. ábra). A lötyögő kód hipotézis szerint mindkettőt felismeri a 3'AAG5' sorrendű antikodon (10.29.(a) ábra). Az antikodon 5'-pozíciójában lévő G szabályos G-C bázispárt képezhet az UUC kodon citozinjával és lötyögő G-U bázispárt az UUU kodon uraciljával. Hasonlóan, az UUA és UUG leucin kodonokat a 3'AAU5' antikodon képes felismerni (10.29.(b) ábra). Az U szabályos bázispárt al-

		Második bázis					
		U	C	A	G		
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U		
	UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C		
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } STOP	UGA } STOP	A		
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } STOP	UGG } Trp	G		
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U		
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U		
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C		
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A		
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U		
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G		

10.27. ábra. A genetikai kód. A táblázatban mind a 64 kodon szerepel az általuk kódolt aminosavakkal együtt. Példaként keressük meg az ACU kodont és olvassuk le jelentését. Az első bázist a széles vízszintes sorokban találjuk, amelyen feltüntették a bázis rövidítését. Az ACU kodon esetében az A kezdetű kodonok a harmadik sorban vannak. Haladjunk jobbra a függőleges oszlopokon a második bázisnak megfelelő C-ig. Most a táblázatnak abban a cellájában vagyunk, amelyben négy kodon van és mindegyik AC-vel kezdődik. Itt keressük meg azt a tripletet, amelynek harmadik bázisa U. Leolvashatjuk azt is, hogy ez a triplet treonint (Thr) kódol, ahogyan a cella másik három kodonja az ACC, az ACA és az ACG is. Választott példánk alátámasztja a kód degenerált jellegét is. Figyeljük meg, hogy három triplet nem kódol aminosavat, ezek a translációs stopjelek



10.28. ábra. Lötyögő bázispárok. (a) A bázisok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése egy szabályos G-C bázispárban. A bal oldali bázis itt és a lötyögő bázispárokban (b) és (c) az első bázis az antikodonban. A jobb oldali bázis a 3. bázis a kodonban. (b) A bázisok egymáshoz viszonyított helyzete egy G-U (vagy I-U) lötyögő bázispárban. Figyeljük meg, hogy az U „felfelé” fordul ahhoz, hogy a guaninnal vagy az inozinnal képezzen bázispárt. (c) A bázisok egymáshoz viszonyított helyzete egy I-A lötyögő bázispárban. Az adeninnek az óramutató járásával ellenkező irányban kell elfordulnia a bázispár kialakításához

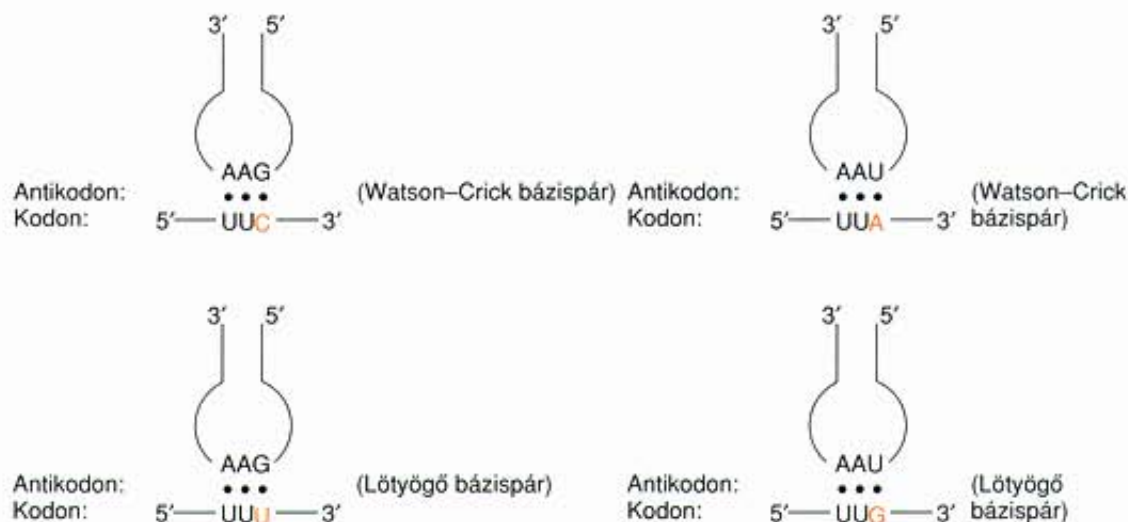
kot az UUA triplet adeninjével, vagy pedig egy lötyögő bázispárt az UUG kodon guaninjával.

A genetikai kód degeneráltságának egy részét kivédik a tRNS-ek izoakceptor típusai, amelyek ugyanazt az aminosavat kötik meg, de különböző kodonokat ismernek fel. A fennmaradó részt a lötyögés jelensége védi ki, amely szerint a kodon harmadik tagja kissé elmozdul normális helyzetéből, és nem Watson–Crick bázispárt képez az antikodonnal. Ez lehetővé teszi, hogy ugyanaz az aminoacil-tRNS egynél több kodonnal kötődjön. A lötyögés alapján létrejöhet a G-U (vagy I-U) és az I-A bázispár.

A KÓD CSAKNEM UNIVERZÁLIS

A genetikai kód megfejtését követő években minden megvizsgált szervezetben, a baktériumoktól az emberig, ugyanazt a kódot találták. Ezért arra a feltételezésre jutottak, hogy a kód univerzális, semmilyen kivétel nincs a szabály alól. Ez a látszólagos egyöntetűség vezetett arra a következtetésre, hogy a földi élet egységes eredetű.

Az elképzelés mellett a következő érvek szólnak. Egyik kodonnak sincs semmilyen genetikai előnye a másikkal szemben. Nincsen nyilvánvaló ok például arra, hogy az UUC pont a fenilalaninnak kedvező kodon, az AAG pedig a lizinnek. A genetikai kód inkább véletlen „balesetnek” tűnik, véletlenszerűen fejlődött így ki. Viszont, amikor már kialakultak a kodonok, nagyon is jó oka volt annak, hogy ne változzanak meg. Az alapvető változások minden bizonnyal letálisak lettek volna.



10.29. ábra. A löttyögő pozíció. (a) Egy lerövidített tRNS, amelyen a 3'-AAG-5' antikodon képez bázispárt az UUC és az UUU kodonokkal, amelyek fenilalanint jelentenek. A löttyögő pozíciót, a kodon harmadik bázisát piros szín emeli ki. Az UUC kodonnál csak Watson-Crick bázispárosodás áll fenn (felül); az UUU kodonnál az első két pozícióban szabályos bázispárt találunk, de a harmadik helyen már löttyögő, G-U bázispárt (alul). (b) Hasonló a helyzet, ahol az AAU antikodont tartalmazó tRNS a leucin két kodonjával, az UUA és az UUG kodonokkal kapcsolódik. Az UUG kodonnál itt is a löttyögő G-U pár van a harmadik helyen

Vizsgáljuk meg ebből a szempontból például a cisztein tRNS-ét, és az általa felismert UGU kodont. A ciszteinil-tRNS antikodonja megváltozhatott, úgy, hogy egy másik kodont ismert fel, mondjuk az UCU-t, amely a szerin kódja. Ezzel egy időben ennek a szervezetnek a genomjában az összes UCU kodon (amely az igen fontos szerin kódolja) módosulhatott más szerin kodonokra, így a továbbiakban már nem lehetett cisztein kodonként azonosítani őket. Annak valószínűsége, hogy ezek a változások egyszerre következnek be, még hatalmas evolúciós változások idején is annyira kicsi, hogy figyelmen kívül hagyható. Ezért emlegetik a genetikai kódot néha „befagyott véletlenként”. Bármilyen ok hozta is létre ebben a formában, ugyanolyannak kell maradnia, ahogyan keletkezett. A fenti gondolatmenet alapján az univerzális kód az élet egységes eredetének nyomós bizonyítéka. Vagyis, ha a földi élet két elkülönült helyen, egymástól függetlenül keletkezett volna, aligha lenne valószínű, hogy a két helyen a kód egészen véletlenül ugyanúgy alakult volna ki!

Mindezek fényében figyelemre méltó, hogy a genetikai kód nem tökéletesen univerzális, azaz vannak az általános szabály alól kivételek. A szabálytalanság először a mitokondriumok genomjának vizsgálatakor derült ki. A *Drosophila melanogaster* mitokondriumaiban az UGA a triptofán kodonja, nem pedig stopjel. Még figyelemre méltóbb, hogy ezekben a mitokondriumokban az AGA a szerin kódja, az általános kódban pedig az argininé. Az emlősök mitokondriumaiban is mutatnak eltéréseket. Mind az AGA, mind az AGG eltérő jelentésű az ember és a szarvasmarha mitokondriumaiban: ezekben stopjel, míg az általános kódban arginin. Továbbá az AUA, amely általánosan az izoleucin kodonja, ezekben a mitokondriumokban a metionint kódolja.

Ezek a különbségek figyelmen kívül hagyhatók, mint nem nagyon fontos, csak a mitokondriumokban előforduló eltérések, hiszen a mitokondriumok genomja nagyon kicsiny, csak néhány fehérjét kódol, és így nagyobb változások mehetnek benne végbe, mint a sejtmagvak genomjában. Vannak azonban kivételes kodonok a nukleáris genomban és a prokarióták genomjában is. Legalább három csillós egysejtűnél, közéjük tartozik a papucsállatka (*Paramecium*) is, az UAA és az UAG a glutamin kódja, noha általában stopjelek. A *Mycoplasma capricolum*ban az UGA a triptofánt kódolja és nem stopjel. Az eddig megismert eltéréseket az általános genetikai kódtól a 10.1. táblázat összegzi.

Az úgynevezett univerzális kód tehát valójában nem egészen egységes. Valóban azt bizonyítják ezek az eltérések, hogy a földi élet nem közös eredetű? Ha az eltérő kodonok alapvetően különböznenek a szabályos kódtól, akkor elgondolkodtató lehetőség volna; de az eltérések kicsik. Sok esetben az új kodonok olyan stopjelek, amelyek egy aminosav, a glutamin vagy a triptofán kódjára változtak. Az ilyen típusú változásoknak van egy jól ismert mechanizmusuk, amelyet a fejezet későbbi részében tárgyalunk. Olyan kodonokra pedig, amelyeknek a jelentése egyik aminosavról egy másikra váltott át, egyedül a mitokondriumokból ismerünk példákat. A mitokondriális genomok pedig, mivel messze kevesebb fehérjét kódolnak, mint akár csak a prokarióták genomja, várhatóan biztonságosabban változtatnak egy-egy kodont időről időre. Összegezve, bár a kódrendszer nem teljesen univerzális, standard kódnak tekinthető, amelyből a jelenleg észlelhető eltérések is kifejlődhetnek. A bizonyítékok tehát az élet eredetének egységes voltára utalnak.

10.1. táblázat. Eltérések az univerzális genetikai kódtól

Forrás	Kodon	Általános jelentés	Új jelentés
Ecetmuslica mitokondriuma	UGA AGA és AGG AUA	Stop Arginin Izoleucin	Triptofán Szerin Metionin
Emlős mitokondriuma	AGA és AGG AUA UGA	Arginin Izoleucin Stop	Stop Metionin Triptofán
Élesztő mitokondriuma	CUN* AUA UGA	Leucin Izoleucin Stop	Triptofán Triptofán Metionin
Magasabb rendű növények mitokondriuma	UGA CGG	Stop Arginin	Triptofán Triptofán
Protozoa sejtmagok <i>Mycoplasma</i>	UAA és UAG UGA	Stop Stop	Glutamin Triptofán

* N = Bármilyen bázis

A genetikai kód nem szigorúan univerzális.

Bizonyos eukarióta sejtmagokban és mitokondriumokban, valamint legalább egy baktériumnál a standard kódban stopjelként működő kodonok aminosavak, pl. a triptofán és a glutamin kodonjai. Több mitokondriális genomban valamely aminosav kodonja egy másik aminosavat jelentő kodonra változott. Ezek az eltérések még mindig nagy biztonsággal visszavezethetők egy standard formára, amelyből nagy valószínűséggel kialakultak.

A TRANZLÁCIÓ MECHANIZMUSA

A transláció, a transzkripcióhoz hasonlóan, három fázisra osztható: iniciáció, elongáció és termináció. Kövessük végig a fázisok eseményeit!

INICIÁCIÓ

E. coli-nál a transláció iniciációja több lépésből áll (10.30.(a) ábra). Először egy riboszómának, amelyik már befejezte egy másik mRNS translációját, alegységeire kell disszociálnia. Ezt a lépést egy **iniciációs faktor**, az **IF-3** segíti, amely a 30S alegységhez kapcsolódik, és megakadályozza reasszociációját a szabad 50S alegységekkel. Valószínűleg az **IF-1** is részt vesz a disszociáció folyamatában, szerepe azonban még nem tisztázott. A következő lépésben a 30S alegység kapcsolódik egy új mRNS-sel. A reakciót az **IF-3** katalizálja. Ezután az **IF-2** iniciációs faktor hozzákapcsolja az első aminoacil-tRNS-t a 30S alegységhez. Az így kialakuló **iniciációs komplexhez** GTP is kötődik. Ezután az

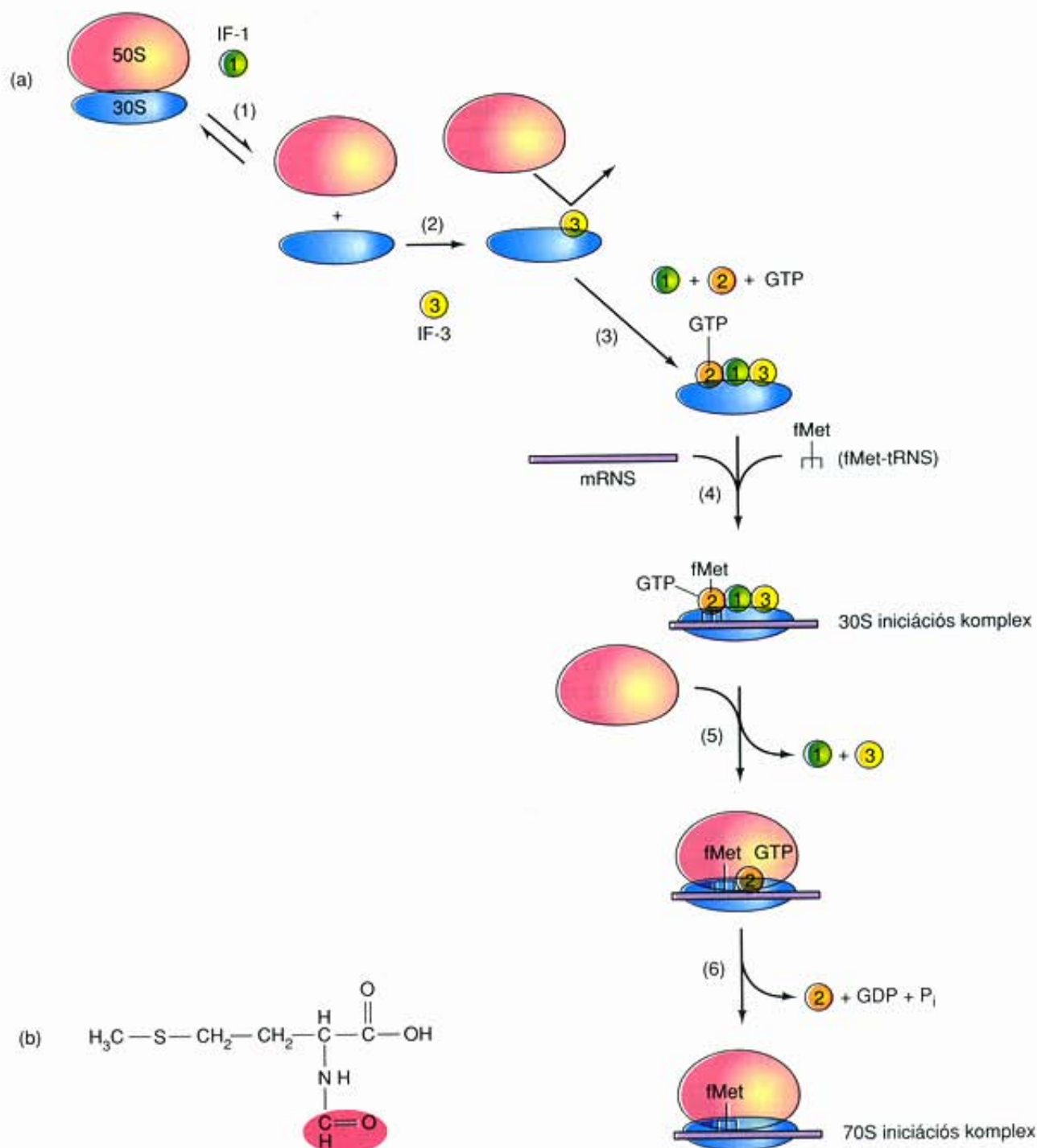
50S alegység csatlakozik a komplexhez és az **IF-3** leválik. Végül a GTP hidrolizál GDP-re és foszfátra, az **IF-2** is leválik, a komplett riboszóma együtt marad az új mRNS-sel és az első aminoacil-tRNS-sel. Az iniciáció ezzel befejeződött.

Prokariótákban az első beépülő aminosav, amellyel a fehérjeszintézis elkezdődik, mindig azonos: **N-formil-metionin**, röviden **fMet**, amelynek szerkezete a 10.30b ábrán látható. Az N-formil-metionil-tRNS (fMet-tRNS) két lépésben képződik. Először a szabályos metionin kötődik egy speciális tRNS-hez, majd a metioninra rákerül a formilcsoport. Ez a különleges aminosav csak az iniciációban vesz részt, sosem épül be a polipeptidlánc belsejébe.

Az iniciáció speciális tRNS-e

Az fMet kodonja az AUG (néha GUG). Ezek a kodonok azonban csak akkor jelzik az iniciációt, amikor egy mRNS 5'-vége közelében találhatók. Az mRNS közepén csupán a szál folytatásában vesznek részt, metionin, illetve valin beépülését okozzák. Van tehát valami jellegzetesség az AUG és a GUG kodonok környezetében az mRNS kezdeténél, ami alapján a rendszer startjelként azonosítja. Az iniciátor kodonokat speciális tRNS, a $tRNS_f^{Met}$ ismeri fel, amelyen az fMet található. Az AUG az mRNS belsejében a $tRNS_m^{Met}$ -t köti meg, illetve a GUG a $tRNS^{Val}$ -t.

Az eukarióták iniciációs mechanizmusa hasonló a prokariótákéhoz, de az iniciátor szerepét általában a metionin tölti be, nem az fMet. A metionin szabályos, de egy speciális, a $tRNS_f^{Met}$ -tel analóg tRNS-hez kapcsolódik, amely csak az iniciációban vesz részt, jele: $tRNS_f^{Met}$ vagy $tRNS_f$. Mivel a metionin csak kezdő aminosavként szolgál, az eukarióták fehérjéiről rendszerint, ha nem is minden esetben, eltávolítódik. A prokariótákban a formilcsoport mindig hasításra kerül, és a legtöbb fehérjéről az fMet is.



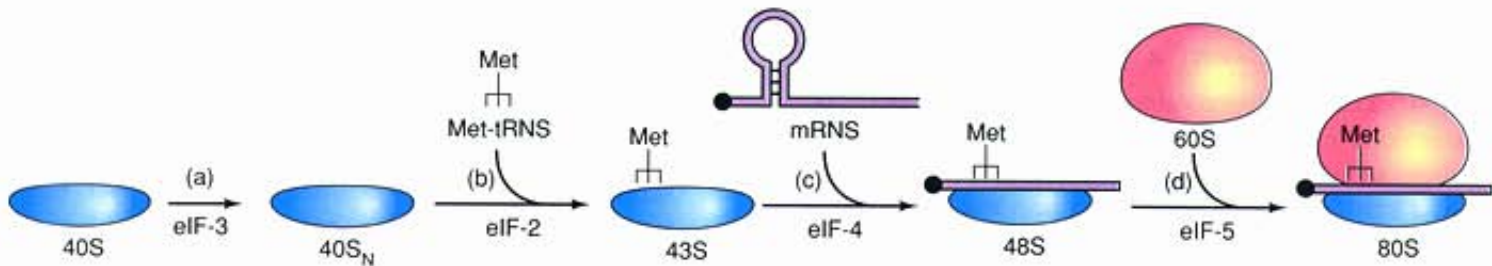
10.30. ábra. A transzláció iniciációja *E. coli*-ban. (a) Az iniciáció lépéseinek összefoglalása. 1. lépés: A 70S riboszóma befejezett egy transzlációt és levált az mRNS-ről. Az alegységek (50S és 30S) disszociációját az IF-1 segíti. 2. lépés: Az IF-3 hozzákapcsolódik a 30S alegységhez és nem engedi újrakapcsolódní a nagy alegységgel. 3. lépés: Az IF-1 és az IF-2 (az utóbbi GTP-vel együtt) hozzákötődik a 30S alegységhez. 4. lépés: Az mRNS és az fMet-tRNS összekapcsolódik, kialakul a 30S iniciációs komplex. 5. lépés: Az IF-1 és az IF-3 leválik a komplexről, az 50S alegység csatlakozik a 30S alegységhez, és kialakul a 70S riboszóma. 6. lépés: A GTP hidrolizál GDP-re és foszfátra, az IF-2 leválik a komplexről. Kialakul a 70S iniciációs komplex, amelyen kezdődhet az elongáció. (b) Az N-formil-metionin szerkezete (a formilcsoport piros)

Iniciációs faktorok az eukariótákban

Az eukarióták iniciációs folyamata annyiban hasonlít a prokariótákéhoz, hogy ugyanazok a lépései: a riboszóma a 40S és 60S alegységekre disszociál, a Met-tRNS és az mRNS kapcsolódik a 40S alegységhez, végül a 60S alegység kötődése egészíti ki az iniciációs komplexet. Az egyik eltérés, hogy a Met-tRNS az mRNS bekötődése előtt kapcsolódik a 40S alegységhez, és nem

egyidejűleg vagy utána, mint a prokariótáknál. Természetesen a folyamathoz iniciációs faktorok is szükségesek, amelyek meglehetősen nagy számban fordulnak elő az eukariótákban.

Jelenlegi ismereteinket az eukarióták iniciációs folyamatáról, az iniciációs faktorok egyes lépésekben betöltött szerepéről a 10.31. ábra foglalja össze. A prokariótáktól való elkülönítés megkönnyítésére az eukarióta iniciációs faktorok jelzése *e* betűvel kez-



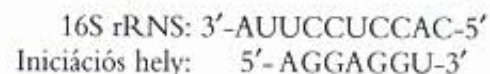
10.31. ábra. A transláció kezdete eukariótákban. (a) Az eIF-3 iniciációs faktor a 40S riboszóma alegységgel együtt kialakítja a 40S_N-t, amely képes fogadni a startjelhez tartozó aminoacil-tRNS-t. (b) A Met-tRNS_i az eIF-2 segítségével a 40S_N-hez kötődik, és kialakul a 43S komplex. (c) Az mRNS az eIF-4 segítségével hozzákapcsolódik a 43S komplexhez, és létrejön a 48S komplex. (d) Az eIF-5 faktor segíti a 60S riboszóma alegység kötődését a 48S komplexhez, és közösen alakítják ki a 80S komplexet, ami megkezdzi az mRNS translációját

Forrás: Rhoads, R. E., *Regulation of Eukaryotic Protein Synthesis of Initiation Factors*. J. Biol. Chem. 268:3108, 1993

dődik. Figyelemre méltó, hogy az eIF-2 az *E. coli* IF-2 faktorához hasonlóan vesz részt a GTP és a Met-tRNS kötésében és azoknak a riboszóma kis alegységéhez való kapcsolásában. Az eIF-4 komplex (10.31. ábra) éppen úgy segíti az eukarióta mRNS kötődését a riboszóma kis alegységéhez, mint az IF-3 a prokariótáknál. Az eIF-4 elemei az eIF-4F és az eIF-4B. Az eIF-4F tartalmazza az eIF-4E faktort, amely felismeri és hozzákapcsolódik az eukarióta mRNS-ek sapkájához. Az eIF-4F tartalmazza még az eIF-4A faktort és a p220 fehérjét. Az eIF-4B egy helikáz, amely felnyitja az mRNS-ek 5'-végén lévő hajtű szerkezetet (ennek jelentőségével a fejezet későbbi részében foglalkozunk). Végül az eIF-5 segíti a 60S riboszóma alegység kapcsolódását az iniciációs komplexhez.

igazolták, hogy a fűg RNS-ének másodlagos szerkezetét felbontva, a transláció hatékonysága általában inkább növekszik, semmint csökken. Tehát úgy tűnik, a bakteriális riboszóma nem egy általános másodlagos szerkezeti elemet ismer fel kötőhelyként.

A másik lehetőség egy közös elsődleges szerkezeti elem jelenléte. J. Shine és L. Dalgarno mutatott rá, hogy az *E. coli* riboszómák által felismert összes iniciációs régió – legalábbis részben – tartalmazza az 5'-AGGAGGU-3' szekvenciát néhány bázissal az iniciációs kodontól felfelé (upstream). Ez a szekvencia komplementer az *E. coli* 16S rRNS-ének legvégén található 5'-CACCUCUUA-3' szekvenciával. A bázispárosodás tehát a következőképpen történhet:



A bázispárosodás megfelelő mechanizmus lehet az mRNS riboszómához való kapcsolódására. A riboszóma 16S rRNS-e egyszerűen bázispárokat alkothat az ún. **Shine–Dalgarno-szekvenciával (SD)** az mRNS iniciációs régiójában. A legtöbb mRNS azonban nem illeszkedik ilyen tökéletesen a 16S rRNS szekvenciájához. Az R17 vírus burokfehérjéjének génje például csak három bázispárosodásra alkalmas bázissal rendelkezik, mégis könnyedén lefordítható. A háromnál kevesebb bázispárt kialakító gének translációja azonban már nem megfelelő.

Az eukarióta mRNS-ek nem tartalmaznak a prokarióták Shine–Dalgarno szekvenciájával analóg szakaszokat. Ehelyett az 5'-vég sapkája (9. fejezet) nyújt „dokkoló helyet” az eIF-4F iniciációs faktornak, amely tartalmazza az eIF-4E sapka kötőfehérjét. Ez egy része azoknak az eseményeknek, amelyek az iniciációs komplex kialakulásához vezetnek.

Az iniciáció magában foglalja az mRNS és az első aminoacil-tRNS megkötését a riboszómán, vagyis az iniciációs komplex kialakulását. Prokarióták esetében három iniciációs faktor (IF-1, IF-2 és IF-3) működik közre. Az eukariótáknak is vannak iniciációs faktoraik, amelyek nagy része a bakteriális megfelelőkhöz hasonlóan működik. A prokariótákban speciális aminosav, az N-formil-metionin (fMet) és tRNS-e (tRNS^{fMet}) szolgál lánckezdőként. Az eukarióták speciális tRNS-sel, (tRNS^{Met}), de a szabályos metioninnal kezdik a polipeptidlánc felépítését. A kezdő kodon, mind a prokariótáknál, mind az eukariótáknál, többnyire az AUG.

Az mRNS riboszomális kötőhelyei

Már szó esett arról, hogy az mRNS kezdetén található AUG kodon környezetében kell lennie valami jellegzetességnek, ami jelzi, hogy nem a szokásos metionin kodont, hanem a transláció startjelét jelenti. Ez lehet egy speciális bázisszekvencia vagy az mRNS jellegzetes másodlagos szerkezete, például egy hajtű szerkezet. Bármilyen legyen is a jel, részét képezi a riboszóma kötőhelynek, vagyis az mRNS azon részének, ahová a riboszóma kapcsolódik a transláció megkezdéséhez.

Az 1960-as évek végén Joan Steitz és munkatársai az R17 RNS-fűgön kimutatták, hogy nincsen olyan másodlagos szerkezet, amely minden iniciációs kodonra jellemző lenne. Továbbá

A legtöbb prokarióta mRNS tartalmaz egy bázisszekvenciát (Shine–Dalgarno-szekvencia) az iniciátor kodon 5'-oldalán, amely többé-kevésbé komplementer a 16S rRNS 3'-végén lévő speciális szekvenciával. Ennek a két régióknak a bázispárosodása valószínűleg segíti a riboszómát abban, hogy felismerje és hozzákötődjön az mRNS iniciátor régiójához. Az eukarióta mRNS-eken nincsen Shine–Dalgarno szekvencia, helyette a sapka biztosítja az mRNS kötődését a riboszómához.

Az iniciátor AUG lokalizálása az eukarióta mRNS-en: a pásztázó modell

Miután a 40S komplex (pontosabban a 43S komplex az iniciációs faktorokkal és a Met-tRNS_i-vel) hozzákapcsolódott az mRNS-hez, az mRNS 3'-vége felé kezd „pásztázni”, hogy megtalálja a kezdőjelet. Ez a kodon majdnem mindig AUG, és rendszerint az első AUG kodon, de vannak kivételek. Előfordul, hogy az első AUG nincs a megfelelő környezetben, a körülötte lévő bázisok nem kedveznek az iniciációnak, ezért a 43S komplex továbbhalad a következő AUG kodonhoz. Marilyn Kozak vizsgálta az iniciációs kodon melletti bázisok mutáns változatait és a következő szekvenciát találta optimálisnak:



ahol az aláhúzott AUG a startjel. A legfontosabb bázisok a vastag betűvel szedett purinok (A vagy G) a -3 és a G a +4 pozícióban. (Az AUG adeninje van a +1 pozícióban.) Sok gerinces gén összehasonlítása után az iniciációs szakasz konszenzus szekvenciájának éppen a fenti optimális szekvenciát találta.

Az iniciációs kodon erőssége fontos tényező, mert sok eukarióta gén szabályozása translációs szinten valósul meg. Kozak és mások öt kiemelten fontos tényezőt találtak, amelyek összefüggésben vannak a **pásztázó modellel**. Ezek a következők:

1. A startjelet körülvevő bázisok.
2. A sapka megléte. Majdnem mindegyik eukarióta mRNS-en van sapka, és hiányában a legtöbb nem kerülhet translációra. A pásztázó modellben a sapka központi szerepet játszik: jelzés az iniciációs faktorok számára, és segít a 43S komplex kialakításában, amely végrehajtja a pásztázást.
3. A pozíció. Az esetek 90%-ában a megfelelő környezetben lévő első AUG a kezdő kodon. Ez a lényege a pásztázó modellnek, hiszen ez az a startjel, amit a pásztázó riboszóma elsőnek felfedez. Néhány esetben a riboszóma akkor is az első AUG-t veszi a kezdő kodonnak, ha annak környezete nem optimális.
4. A vezető szakasz hossza. A **vezető szakasz** a sapka és a kezdő kodon közötti RNS-szakasz. Néha nagyon rövid, csak néhány nukleotid, néha pedig több száz nukleotid hosszúságú. Azt várhatnánk, hogy minél rövidebb a vezető szakasz, annál nagyobb az iniciáció esélye, de a kísérletek épp az ellenkezőjét mutatják. A rendkívül rövid vezető szakasz gátolhatja az iniciációt: azokon az mRNS-eken, amelyeken az AUG a sapkától számított 12 nukleotidon belül volt, a riboszómáknak mintegy a fele eltévesztette az első AUG kodont és a következőtől kezdte a translációt. Ez a kísérleti eredmény illeszkedik a pásztázó modellhez, amely szerint az iniciációs faktoroknak hely kell a kapcsolódáshoz és a 43S komplex kialakításához. 12 nukleotidnyi szakaszon talán nincs az iniciációs faktoroknak elegendő helyük az első AUG

biztonságos felismeréséhez. Húsz nukleotid hosszúságú vezető szekvenciánál a gátló hatás megszűnik, de a 17 és 80 nukleotid hosszúságú vezető szakaszok esetén az iniciáció sikere arányos a szakasz hosszával. Valószínűleg azzal magyarázható a jelenség, hogy a hosszú vezető szakaszok sok riboszóma számára nyújtanak helyet, hogy felsorakozzanak a translációhoz.

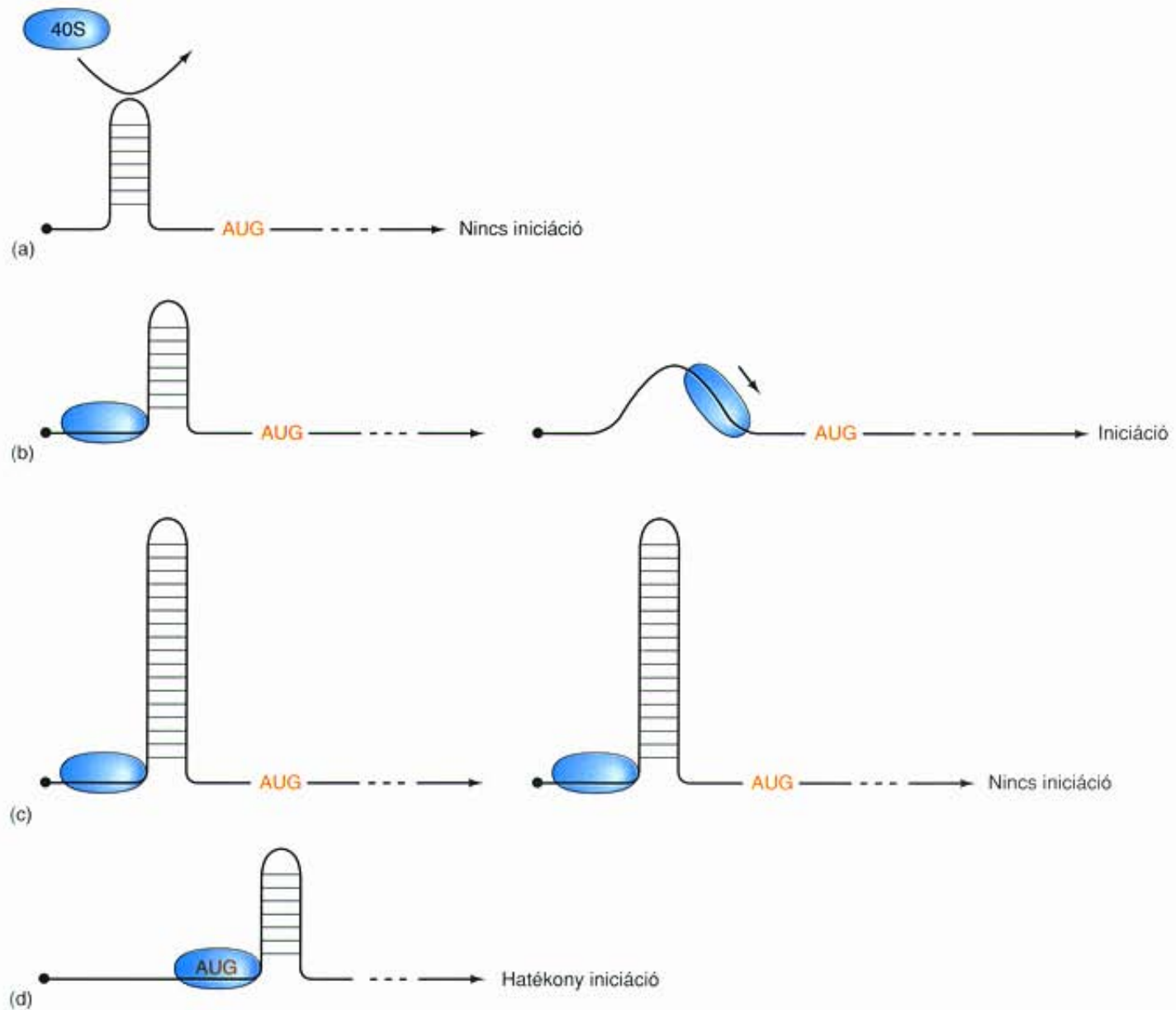
5. A másodlagos szerkezet. A hajtű szerkezet jelenléte, illetve hiánya lehet pozitív és negatív hatású is az iniciációra (10.32. ábra). Amennyiben a hajtű éppen az AUG mögött és a kevésbé jó környezetet jelentő szekvenciában fordul elő, jelentős stimuláló hatása lehet, mert feltarthatja a pásztázó riboszómát, amíg az felismeri az AUG kodont és elkezd a translációt. Ez nyilvánvalóan jól illeszkedik a pásztázó modellhez. Gátló hatású viszont a hajtű szerkezet az AUG kodon előtt, különösen az első 12 bázisban. Ez is beleillik a pásztázó modellbe, mert az iniciációs faktoroknak és a 40S riboszóma alegységnek ebben a régióban kell bekötődnie a pásztázás megkezdéséhez. Az 5'-végtől távolabb kialakuló hajtű is gátolja a pásztázást, ha elég stabil, azaz sok G-C bázispárból áll. A riboszóma inkább széttekeri az instabil hajtűt, semmint átugorja, és akkor elkezdheti a bázispárosodásban lévő AUG-nél a translációt. Mindezek a hatások inkább beleillenek a pásztázó modellbe, mint egy olyan modellbe, amelyben a riboszómának először az mRNS valamely belső részéhez kell kötődnie egy AUG tripletnél.

A 40S riboszóma alegység először az mRNS sapka részének közelében kötődik meg, majd elkezd pásztázni a molekulát a 3'-vég irányában, hogy kedvező helyzetben lévő AUG-t találjon a transláció megkezdéséhez. Egy AUG kodon esélyét arra, hogy iniciációs kodon lehessen az alábbi tényezők szabják meg: a környező nukleotidok, az AUG kodon pozíciója (helyzete az 5'-véghöz képest), a környező terület másodlagos szerkezete (hajtű jelenléte vagy hiánya) és a vezető szakasz hossza. Majdnem minden mRNS-nek szükséges sapka a transláció megkezdéséhez. Ezek a feltételek jól értelmezhetők a pásztázó modell alapján.

ELONGÁCIÓ: AMINOSAVAK KAPCSOLÁSA A NÖVEKVŐ POLIPEPTIDLÁNCHOZ

Az előző fejezetekben benne rejlett, hogy a transláció iránya az mRNS-en 5' → 3', ami megegyezik a transzkripció irányával. A polipeptidlánc amino (N) karboxil (C) irányban szintetizálódik. Más szóval az N-terminális aminosav épül be először, a C-terminális utoljára. Tehát az mRNS 5'-vége kódolja a fehérje amino-terminális részét.

A polipeptidlánc hosszabbítása a fehérjeszintézis során egyszerűbben szemléltethető rajzban, mint ahogy szavakkal leírható. A 10.33. ábra sematikusan mutatja az elongáció két szakaszát (két aminosav beépítését a növekvő polipeptidlánchba) *E. coli*-sejtben.



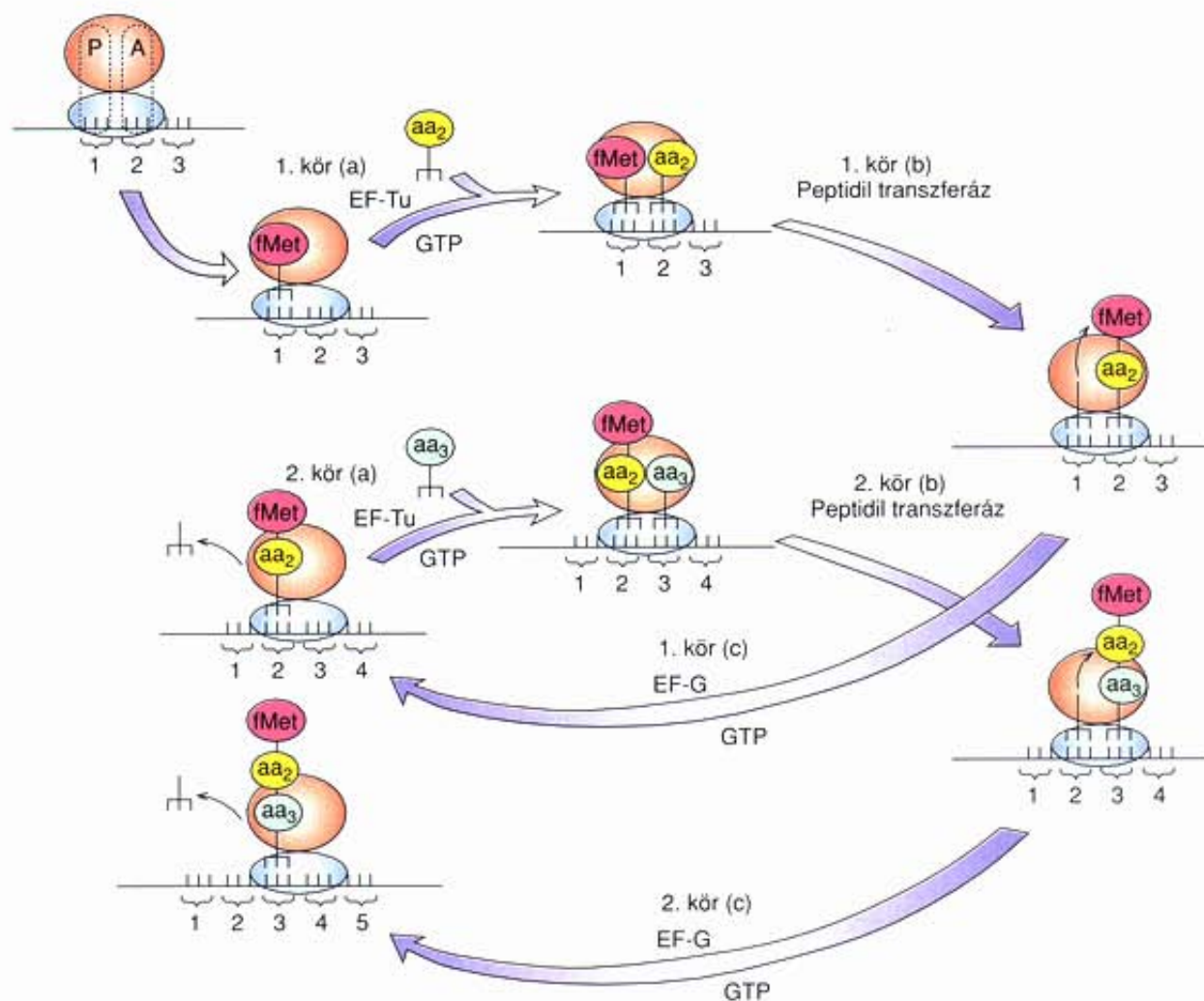
10.32. ábra. Az mRNS másodlagos szerkezetének a transláció iniciációjára gyakorolt hatása. (a) A sapkához nagyon közel található hajtű szerkezet, ha túlságosan kis méretű, megakadályozza a riboszóma kötődését, így a translációt is. (b) A vezető szekvenciában lévő rövid hajtű nem akadályozza a riboszóma pásztázását, mert a riboszóma széttekeri a hurok bázispárjait. (c) A riboszóma nem tudja széttekeríteni a stabil hajtűt, hanem megáll, mielőtt elérné a kezdő kodont. (d) Az éppen a kezdő kodon mögött lévő hajtű leállítja a riboszómát, így annak elég ideje marad a kodon felismerésére. Az ilyen szerkezet kevésbé kedvező környezetben is elősegítheti az AUG kodon felismerését

Kezdjük a riboszómához kötött fMet-tRNS-sel. A riboszómán az aminoacil-tRNS-ek számára két kötőhely van: a **P-hely (peptidil-hely)** és az **A-hely (aminoacil-hely)**. A sematikus ábrán a P-hely balra, az A-hely jobbra helyezkedik el. Az fMet-tRNS a P-helyen van. Az elongáció eseményei a következők:

1. A szálhosszabbításhoz újabb aminosavat kell az elsőhöz kötni, amely tRNS-hez kapcsolva érkezik. Az aminoacil-tRNS minőségét az mRNS második kodonja szabja meg. A második kodon az üres A-helyen van, így a második aminoacil-tRNS erre a helyre fog kapcsolódni. A kötődés katalizátort és energiát igényel. A katalizátor fehérje, az **elongációs faktor (EF)**, az **EF-Tu**. Az energiát GTP szolgáltatja. Az EF-Tu eukarióta homológja az eEF-1 α .

2. A következő lépés az első peptidkötés kialakulása. A **peptidil transzferáz** enzim – a nagy riboszóma alegység integráns része – viszi át az fMet-t a P-helyen lévő tRNS-ről az A-helyen lévő aminoacil-tRNS-re. Így kialakul egy két aminosavból álló dipeptid az A-helyen lévő tRNS-hez kapcsolva. Ez az együttes a **dipeptidil-tRNS**. A P-helyen álló tRNS-ről lekerült az aminosav tehát **dezacilálódott**.

A prokarióták peptidil transzferáz enzimét gátolja egy antibiotikum, a **klóramfenikol**, amelynek szerkezetét több más antibiotikummal együtt a 10.34. ábra mutatja be. Az antibiotikum a legtöbb eukarióta riboszómára nincs hatással, ami szelektívvé teszi a magasabb rendű szervezeteket megtámadó bakteriális fertőzésekkel



10.33. ábra. Elongáció, azaz láncnövekedés a transláció során. Az ábrán a fehérjeszintézis erősen leegyszerűsített vázlata látható. A tRNS-eket például villaszerű rajzok jelképezik, amelyek a molekula két alapvető funkciót ellátó részére utalnak. Balra fent: egy riboszóma a hozzá kapcsolódó mRNS-sel. A P- és A-helyet szaggatott vonalak jelzik. 1. kör: (a) Az EF-Tu a második aminoacil-tRNS-t (sárga) a riboszóma A-helyére kapcsolja. A P-helyet már elfoglalja az fMet-tRNS (piros). (b) A peptidil transferáz kialakítja a peptidkötést az fMet és a második aminoacil-tRNS aminosava között. (c) Az áthelyezési lépésben az EF-G elcsúsztatja az mRNS-t és a tRNS-eket egy kodonnal balra. Ezzel elmozdul a dipeptidil-tRNS a P-helyre, a dezacilált tRNS leválik, és felszabadul az A-hely a következő aminoacil-tRNS számára. A második körben ezek a lépések ismétlődnek, és még egy aminosav (zöld) kötődik a növekvő láncához

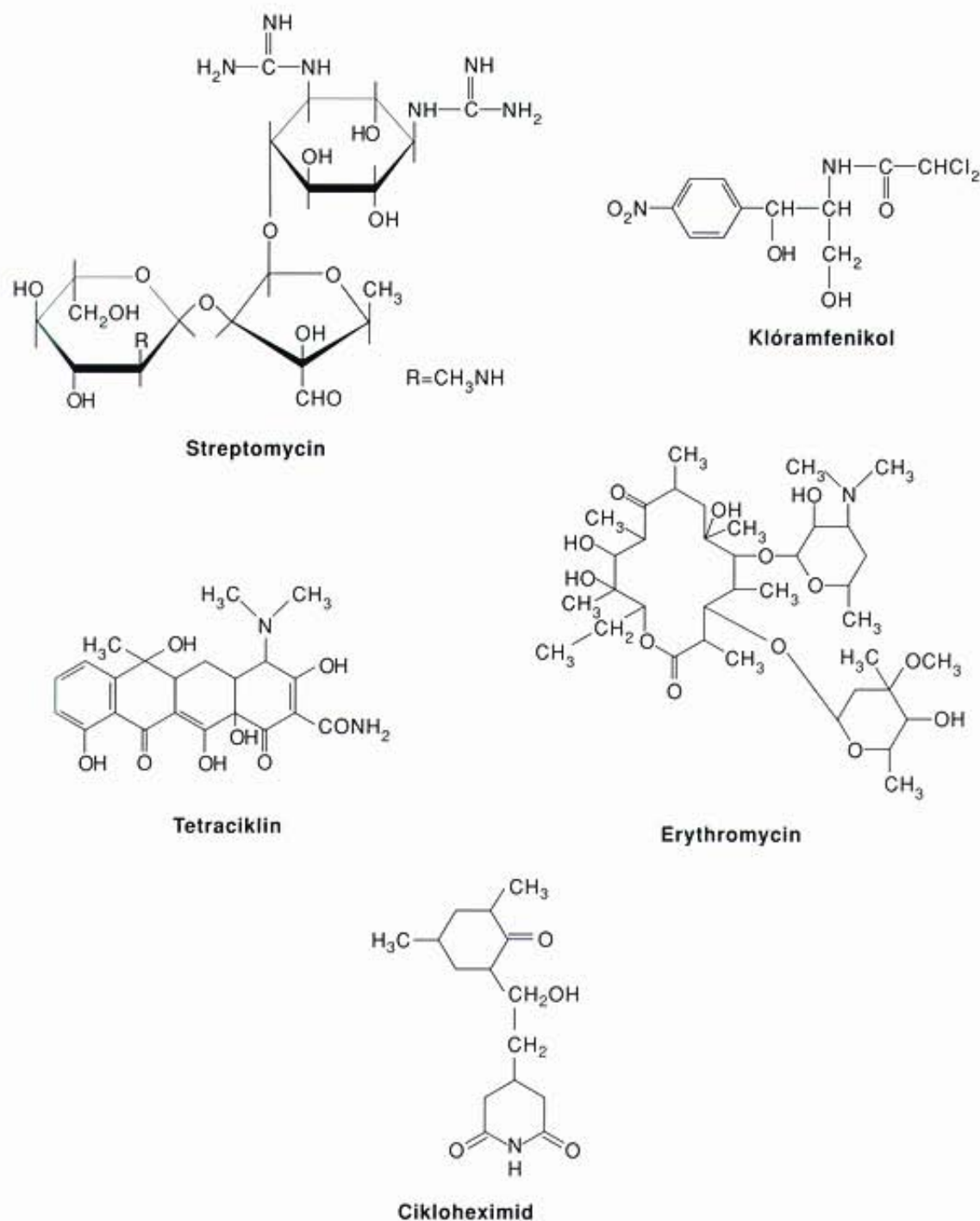
szemben. Ugyanakkor, minthogy az eukarióta mitokondriumoknak saját riboszómáik vannak, a klóramfenikol gátolja azok peptidil transferázát is, tehát szelektivitása a baktériumokra nem kizárólagos. A 10.2. táblázatban több fontos antibiotikum hatásmechanizmusa látható, köztük a klóramfenikolé is, amely a riboszómákkal való kölcsönhatása miatt gátolja a translációt.

3. A következő lépés a **transzlokáció**, amelyben az mRNS az A-helyre kapcsolódó peptidil-tRNS-sel együtt egy kodonnal továbblép balra. Ennek eredménye a következő: (a) A P-helyen levő dezacilált tRNS, amely a peptidil transferáz hatására, a peptidkötés kialakulásakor elvesztette az aminosavát, leválik a riboszómáról. (b) Az A-helyen kötődő dipeptidil tRNS a kodonnal együtt a P-helyre lép.

(c) A jobb oldalra eső, soron következő kodon az A-helyre kerül, kölcsönhatásra készen az újabb aminoacil-tRNS-sel. A transzlokációhoz szükséges az **EF-G** elongációs faktor és GTP-ből származó energia. Az EF-G faktor eukarióta megfelelője az eEF-2.

A folyamat ezután megismétlődik, a következő aminosav hozzákapcsolásakor: (1) Az EF-Tu GTP felhasználásával a megfelelő amino-acil-tRNS-t az A-helyen lévő új kodonhoz illeszti. (2) A peptidil transferáz a P-helyről átszállítja a dipeptidet, és az A-helyen lévő aminoacil-tRNS-re kapcsolja, tripeptidil-tRNS-t kialakítva. (3) Az EF-G ezután GTP energiáját felhasználva áthelyezi a tripeptidil-tRNS-t mRNS kodonjával együtt a P-helyre.

Ezzel két lánchosszabbítási kört követtünk végig. Kezdtük a P-helyen lévő aminoacil-tRNS-sel (fMet-tRNS) és két aminosavval növeltük meg a láncot a tripeptidil-tRNS állapotig. A folyamat



10.34. ábra. Néhány antibiotikum, amely a riboszómához kötődve gátolja a fehérjeszintézist

mindaddig ismétlődik, amíg a riboszóma eléri az utolsó kodont. Ekkor a polipeptidlánc elkészült, és eljött a termináció ideje.

A fentebb ismertetett két kötőhelyes modellben vannak el-
lentmondások, de általános a megegyezés az A- és a P-hely lé-
tezésére vonatkozóan a **puromicinnel** végzett kísérletek ered-
ményei alapján (10.35. ábra). Ennek az antibiotikumnak a szer-
kezete emlékeztet egy aminoacil-tRNS-re, ezért a riboszóma
A-helye elfogadja. Minthogy a puromicin is tartalmaz egy ami-
nocsoportot ugyanabban a pozícióban, mint az aminoacil-
tRNS, a peptidil transzferáz kialakít egy peptidkötést a P-helyen
álló peptid és az A-helyen lévő puromicin között, *peptidil-puro-*

micint eredményezve. Ennél a pontnál a folyamat véget ér. A pu-
romicin nem kapcsolódik az mRNS-sel, és nem mozdítható to-
vább a P-helyre. Ezért a peptidil-puromicin leválik a riboszómá-
ról, és a translációnak idő előtt vége szakad. Ez a magyarázata,
miért pusztítja el a puromicin a baktériumokat és más sejteket.

A puromicin és a két kötőhelyes modell kapcsolata a követ-
kező: A transzlókáció előtt a puromicin nem tud bekötődni és a
peptidet leválasztani, mert az A-helyet elfoglalja a peptidil-tRNS.
A transzlókáció után viszont a peptidil-tRNS átkerül a P-helyre,
az A-hely pedig szabaddá válik. Ebben a helyzetben a puromicin
már bekötődhet, és leválaszthatja a peptidet. Mindezek alapján a

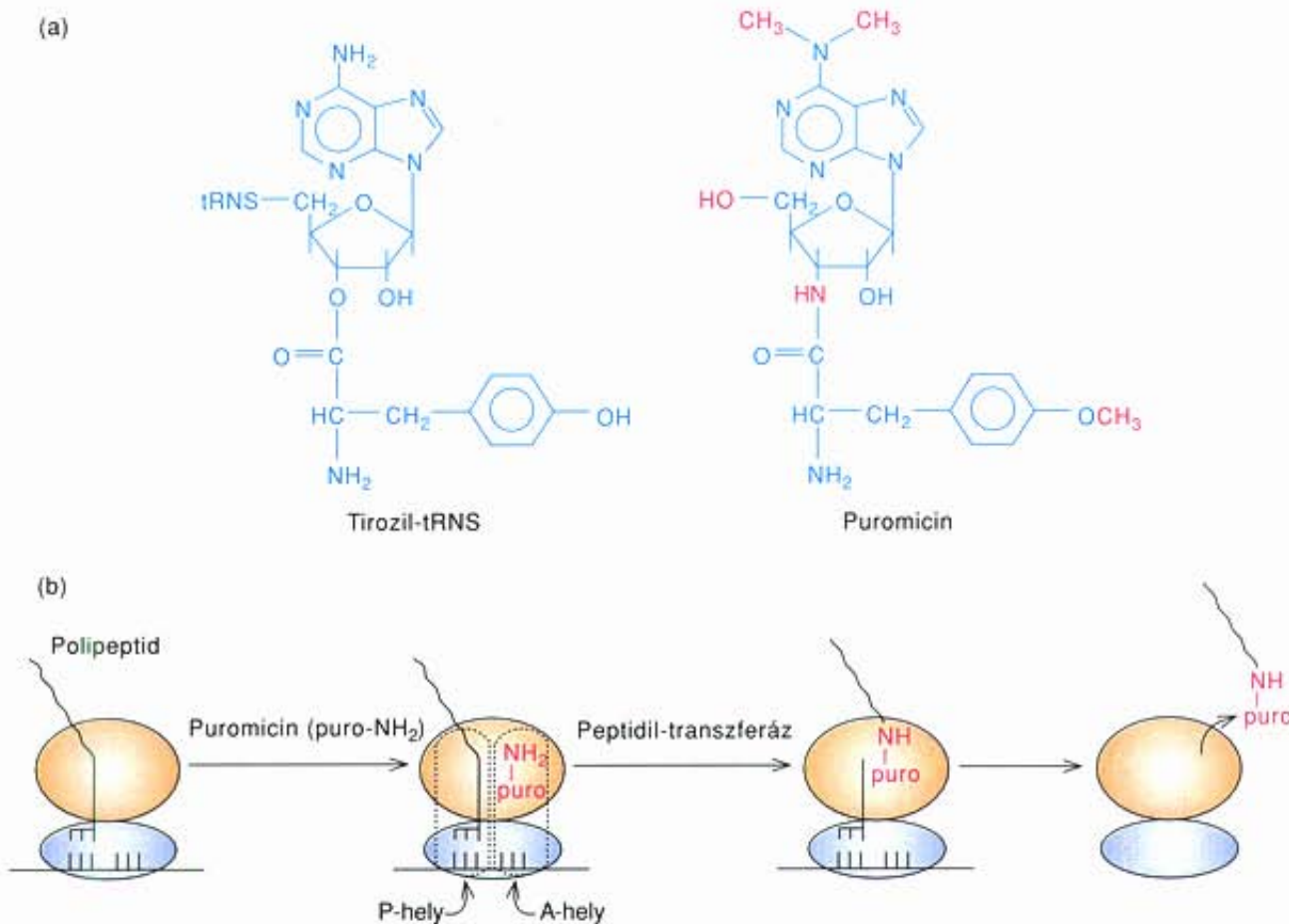
10.2. táblázat. A riboszómával kölcsönhatásba lépő antibiotikumok

Antibiotikum	Hatás
Tetraciklin	Gátolja az aminoacil-tRNS kötődését a prokarióta riboszóma kis alegységéhez.
Klóramfenikol	Gátolja a prokarióta peptidil transzferázt.
Cikloheximid	Gátolja az eukarióta peptidil transzferázt.
Fuzidinsav	Gátolja az EF-G-GDP riboszómáról való disszociációját.
Eritromicin	Gátolja a transzlációt a prokariótákban.
Puromicin	Kovalens kötést alakít ki a növekvő polipeptiddel, leválasztja a riboszómáról, korai transzlációt okoz.
Sztreptomycin	Téves leolvasást okoz prokariótáknál, ezzel rontja a transzláció pontosságát, Gátolja a transzláció iniciációját is.

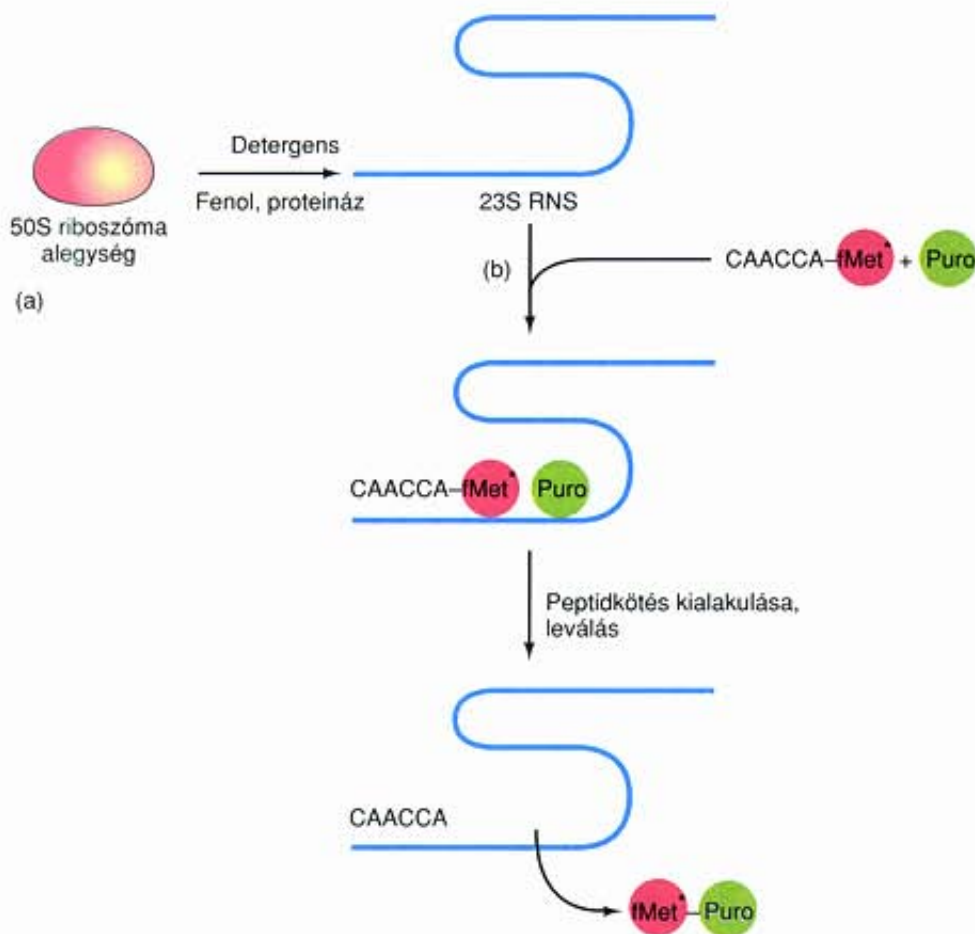
riboszómának két állapota van: a puromicinnel reagálni képes és a puromicinnel reagálni képtelen állapot. A két állapot legalább két peptidil-tRNS kötőhelyet igényel a riboszómán.

Régóta ismert, hogy a nagy riboszóma alegység végzi a peptidil transzferáz reakciót, és azt is feltételezték, hogy a nagy alegység egyik fehérjeje rendelkezik peptidil transzferáz aktivitással. Ugyanakkor az RNS katalizátor tulajdonságának felfedezése után (9. fejezet) sok kutató gondolt arra, hogy a peptidkötés kialakítását valamelyik riboszómális RNS végezheti. Ma már meggyőző bizonyítékok is vannak erre.

Harry Noller és munkatársai erős detergensekkel és fenollal kezelték riboszómákat, amelyek denaturálják a fehérjéket. A riboszómális fehérjék további degradálásához proteinázt adtak a rendszerhez, amely hidrolizálja a fehérjéket. A következő feladat annak kimutatása volt, hogy megmarad-e a sértetlenül maradó rRNS peptidil transzferáz aktivitása. Ez nem olyan egyszerű, mert az igazi peptidil transzferáz működéséhez az egész riboszóma szükséges, beleértve a peptidil- és aminoacil-tRNS-eket. Nem várható, hogy egy izolált rRNS a teljes peptidil transzferáz reakciót végrehajtsa. De képes egy hasonló folyamat, az ún.



10.35. ábra. A puromicin szerkezete és hatása. (a) A tirozil-tRNS és a puromicin szerkezetének összehasonlítása. Figyeljük meg a tRNS-nek az 5'-C-atomhoz kapcsolódó részét, és azt, hogy azon a helyen a puromicinben csak egy hidroxilcsoport található. (b) A hatásmechanizmus: a puromicin (puro-NH₂) bekötődik a riboszóma szabad A-helyére. A következő lépésben a peptidil transzferáz a P-helyen lévő peptidet az A-helyen álló puromicin aminocsoportjához kapcsolja. Végül a képződött peptidil-puromicin leválik a riboszómáról, és ezzel korai terminációt okoz



10.36. ábra. A 23S riboszomális RNS által katalizált fragmentum reakció, mint a peptidil transferáz hatásának modellje. (a) Noller és munkatársai az *E. coli* 50S riboszómáját (rózsaszín) detergenssel, fenollal és proteinázzal kezelték, hogy elroncsolják a fehérjéket, és csak az rRNS-ek (5S és 23S) maradjanak vissza. Az ábrán a 23S rRNS konformációja nem a valóságot tükrözi. (b) Ezután puromicint adtak a rendszerhez (zöld), valamint az fMet-tRNS hat nukleotidot tartalmazó terminális fragmentumát (piros), a hozzá kapcsolt radioaktívan jelölt aminosavval (csillag). A két anyag az rRNS-hez kötődik. (c) A peptidkötés kialakulását az fMet és a puromicin között az rRNS katalizálja. A termék leválik az RNS-ről. A kísérlet igazolja a tisztított 23S rRNS peptidil transferáz aktivitását

fragmentum reakció katalizálására, melynek vázlata a 10.36. ábrán látható.

Noller és munkacsoportja három komponenst kevert össze: 1) detergenssel, fenollal és proteinázzal tisztított *E. coli*-rRNS-t; 2) az fMet-tRNS fragmentumát, amely az RNS utolsó hat nukleotidjából és radioaktívan jelölt formil-metioninből áll; 3) puromicint. Az fMet-tRNS fragmentum meglehetősen hasonlít a teljes iniciátor aminoacil-tRNS-hez, ezért kötődni tud az intakt riboszóma P-helyéhez. A puromicin pedig eléggé hasonlít egy aminoacil-tRNS-hez, hogy kapcsolódjon a riboszóma A-helyéhez. Intakt riboszómán a jelzett fMet-tRNS fragmentum és a puromicin peptidkötéssel összekapcsolódik a riboszóma peptidil transferáz aktivitásának hatására. A kérdés az, vajon a tisztított rRNS is végrehajtja-e a reakciót? A válasz igen, ugyanis a reakció után kimutatható a radioaktív fMet-puromicin. Sőt a klórámfenikol blokkolja a reakciót, ahogyan a riboszómában lévő peptidil

transferázt is gátolja. Végül az RNS-t hidrolizáló ribonukleáz is gátolja a reakciót. Mindez arra utal, hogy nem fehérje, hanem az rRNS rendelkezik peptidil transferáz aktivitással. Természetesen a fehérjék segíthetik, illetve módosíthatják aktivitását.

A polipeptidlánc elongációja három lépésben zajlik.

- (1) Az EF-Tu GTP által szolgáltatott energiával az aminoacil-tRNS-t a riboszóma A-helyéhez kapcsolja.
- (2) A peptidil transferáz peptidkötést alakít ki a P-helyen álló peptid és az A-helyre újonnan érkezett aminoacil-tRNS között. Ezzel a peptid egy aminosavval növekedett, és átkerült az A-helyre.
- (3) Az EF-G szintén GTP-ből származó energiával áthelyezi a peptidil-tRNS-t az mRNA kodonjával együtt a P-helyre.

10.1. Honnan származik az amber mutáció neve?

A kutatók sokszor fantáziadús nevekkel illetnek egyes általuk felfedezett anyagokat és jelenségeket, és néhány közülük az egyébként száraz tudományos nevezéktanban is megmarad. Ilyen például a már említett CCAAT-box, valamint a „varázspont” (magic spot) nevű ritka nukleotid, amely az aminosavéhezkor baktériumokban halmozódik fel. Jól ismert példa az amber (borostyán) kodon is, de nevének eredete valamivel titokzatosabb.

A történetet maga Dr. Harris Bernstein, a névadó mesélte el. Amikor a California Institute of Technology diákja volt, egyik este bement Seymour Benzer laboratóriumába, hogy ott dolgozó két barátját, Charles Steinberget és Richard Epsteint moziba csábítsa. Nem járt sikerrel, mert barátai mutáns fágokkal dolgoztak, és nem tudták abbahagyni a munkát. Ehelyett rávették Bernsteint, hogy hasznosítsa

magát és segítsen nekik. Elmagyarázták az éppen folyó kísérletet, amire Bernstein fellelkesülve elkezdte felvázolni a lehetséges kísérleti eredményeket. Két barátja nem értett vele egyet, és fogadást kötöttek: akinek igaza lesz a mutáns fág tulajdonságait illetően, az nevezheti el a fágot. Bernstein azt jósolta, hogy a mutáns fág egy ugyancsak mutáns *E. coli*-törzsön fog csak növekedni, vad típusú baktériumon nem. Azt is mondta, hogy igaza esetén a mutáns fágot édesanyjáról, Mrs. Bernsteinről nevezzék el.

A mutáns pontosan a Bernstein által megjósolt módon viselkedett. Bernstein ma már nevetve meséli, hogy magyarázata a jelenségre helytelen volt, ráadásul aznap este az összes általa kiszélesztett baktériumot előlte, mert túlforrósította az oltókacsot. Mindezek ellenére őt illette az elnevezés joga. Az *amber* nevet választotta, a német *Bernstein* szó angol megfelelőjét.

TERMINÁCIÓ: A KÉSZ POLIPEPTID LEVÁLÁSA

A genetikai kód tárgyalása során említettük, hogy a három stopjel, az UAG, az UAA és az UGA nem aminosavat, hanem a fehérjeszintézis leállítását jelentik. Az 1960-as évek elején Seymour Benzer és munkatársai a T4 fág egyik mutánsának vizsgálatakor fedezték fel az első stopjelet (később az UAG kodonként azonosították). A mutáns fág kizárólag az *E. coli* speciális, **szuppresszor** törzsében szaporodott, amely kivédte a mutáció hatását. A mutáció az **amber** (borostyán) elnevezést kapta, és gyakran ma is így említik az UAG kodont (10.1. melléklet). Az amber mutáció letális, hiszen az mRNS közepén idő előtt megszakítja a translációt. A jelenséget először az *E. coli* alkalikus foszfatáz génjében lévő amber mutációval igazolták. A mutánsok nem képesek ép alkalikus foszfatázt termelni, hanem csak olyan töredékeket, amelyek a fehérje N-terminális részét tartalmazzák, a stopjel pedig valahol a gén középtáján található.

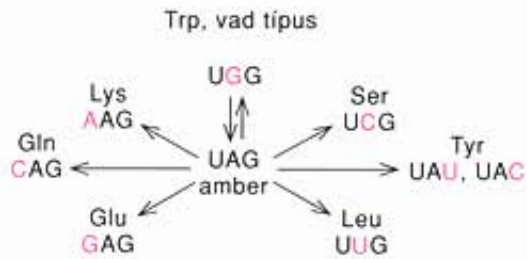
Később egy másik mutáns is felfedeztek, amely az **amber szuppresszor** törzsekben nem, csak más szuppresszor törzsekben volt képes szaporodni. Hogy megtartsák a borostyán mutáns színre utaló nevét, az új mutánsok az **ochre** (okker) elnevezést kapták. Bennük a korai terminációt az UAA kodon okozza. A harmadik stop kodon, az UGA, ugyanilyen megfontolásból az **opál** nevet kapta.

Az amber és az ochre kodon szekvenciáját 1965-ben derítették ki, de nem az mRNS szekvenálásával, hanem a fehérjetermék aminosavsorrendje alapján. A gondolatmenet a következő volt: az amber mutánsok rendszeresen visszaalakultak, **revertáltak** olyan fenotípusra, amely nem igényelte az amber szuppresszort. A **revertánsok** azonban nem pontosan ugyanazt a fehérjét termelték, mint a vad típusok. Abban az aminosavban különböztek, amelyik az amber mutáció helyén állt. Martin Weigert és Alan Garen az *E. coli* alkalikus foszfatáz génjének re-

vertánsait tanulmányozta. A kérdéses aminosav a vad típusú sejtekben a triptofán volt, amelynek kodonja az UGG. Mivel az amber mutáció egyetlen bázis cseréjével keletkezett, tehát egyetlen bázissal különbözik az UGG-től. A báziscsere megfigyéléséhez Weigert és Garen több revertánsban meghatározták a kérdéses ponton álló aminosavat. A stopjel helyén szerint, tirozint, leucint, glutaminsavat, glutamint, lizint találtak. Nem kellett számítógép, hogy megállapítsák: az UAG az egyetlen olyan kodon, amelyik egy bázis változásával a fenti aminosavak, köztük a triptofán kodonjává alakulhat (10.37. ábra).

Figyelembe véve azt a tényt, hogy az amber mutáns egyetlen bázis megváltozásával ochre mutánssá alakulhat, Sydney Brenner és munkatársai a fenti gondolatmenetet követve kiderítették, hogy az ochre mutáció az UAA kodon megjelenése. Severo Ochoa és csoportja igazolták, hogy az UAA stopjel, amikor kimutatták, hogy a szintetikus AUGUUUAAA szekvenciájú RNS-szakasz egy dipeptid, az fMet-Phe szintézisére vezet. (Az AUG az fMet kodonja, az UUU a fenilalaniné, az UAA stopjel.) Mivel az UAG és az UAA az amber, illetve az ochre kodon, az UGA-nak az opál kodonnak kell lennie. Ezt a három kodont, mivel nem jelentenek aminosavat, gyakran **nonszensz kodonként** említik. Az elnevezés nem szerencsés, mert ezek kodonok nem értelmetlenek, hanem a szintézis végét jelző stopjelek.

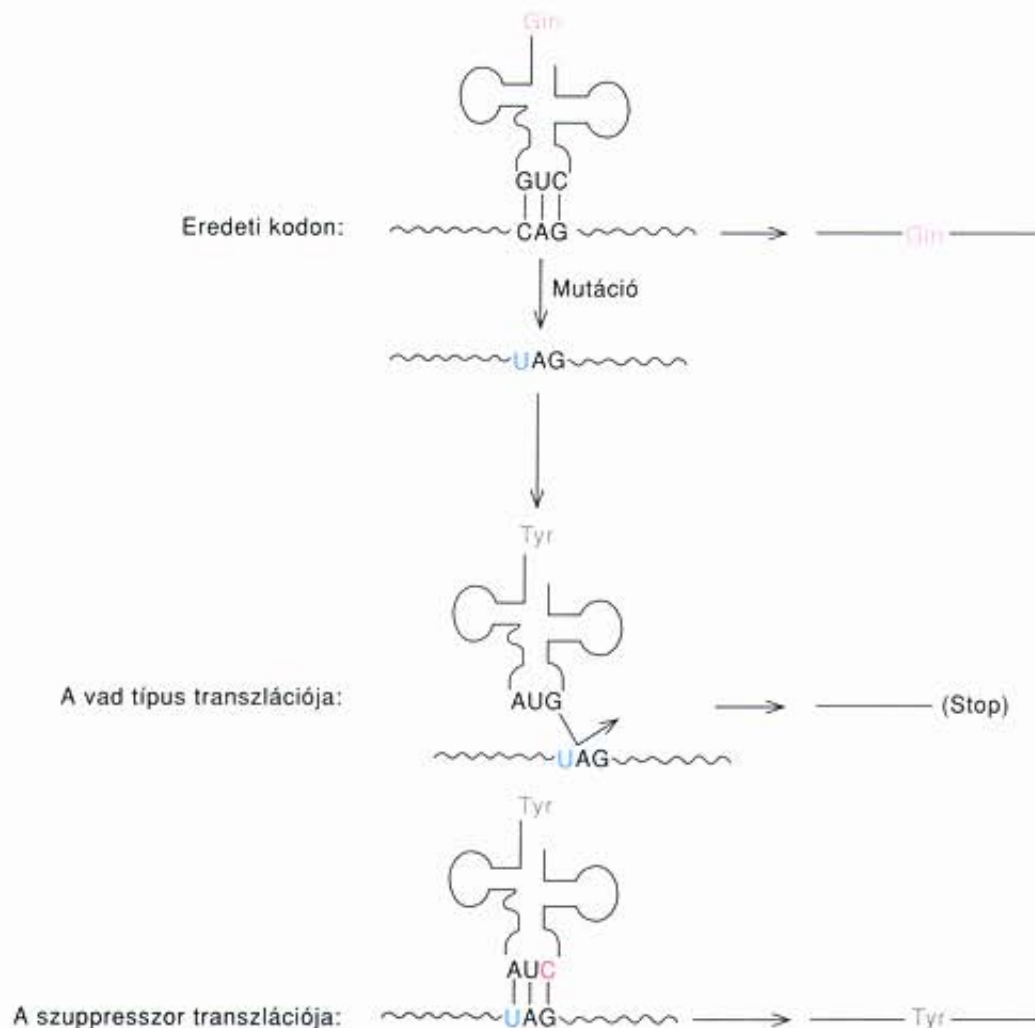
Hogyan küszöbölik ki a szuppresszorok a korai terminációs jelek letális hatását? A megoldás kulcsát az a kísérlet adta, amely igazolta, hogy egy amber szuppresszor törzs tisztított tRNS-e *in vitro* elnyomja az amber mutációt. Tehát a tRNS a szuppresszor molekula. Kiderült az is, hogy a szuppresszor törzsek egy aminosavat építenek a polipeptidláncba a stopjel helyén. A kísérleti adatok összességében arra mutatnak, hogy a szuppresszor törzsek tRNS-e a stopjel helyén beépít egy aminosavat, és ezzel megakadályozza a korai terminációt. Az elképzelés helyességét az a kísérlet igazolta, amelynek során kimutat-



10.37. ábra. Az amber kodon az UAG (középen). Az amber kodon valószínűleg egyetlen bázis cseréjével alakult ki a triptofán kodonjából (UGG). A gén működőképessé revertálhat, ha az amber kodon átalakul egy másik aminosav, a szerin, a tirozin, a leucin, a glutaminsav, a glutamin vagy a lizin kodonjává. A revertánsokban megváltozó bázist pirossal jelöltük, köztük a triptofánt kódoló vad típust is

ták, hogy egy amber szupresszor törzsben tirozin épült az amber kodonnak megfelelő helyen a fehérjébe. Ebben a törzsben a $tRNS^{Tyr}$ antikodonja változott meg: a tirozin kodonjával (UAC) komplementer GUA antikodon helyett a CUA antikodont tartalmazta, amely kötést alakít ki az UAG amber kodonnal, és beépíti a rajta lévő tirozint (10.38. ábra). A szupresszor tehát maga is mutáns. Mutációja a $tRNS$ génjében történt, pontosabban annak antikodont meghatározó részében. (Ez a mutáció nem letális, mivel egy másik izoakceptor $tRNS^{Tyr}$ képes felismerni a tirozin kodonokat.)

Láttuk, hogy a három stopjel (UAG, UAA és UGA) bármelyike egy mRNS-szekvencia közepén korai terminációt vált ki, és megszakítja a translációt. Vajon ugyanezek a terminációs jelek vannak az mRNS-ek végén is? Minden eddig szekvenált mRNS-t kódoló gén



10.38. ábra. A szupresszió mechanizmusa. A vad típusú *E. coli* eredeti kodonja (fent) CAG volt, amelyet a glutamin-tRNS ismer fel. Ez a kodon változott UAG-re, amely a vad típusnál amber stopjel. Ne feledjük, hogy a szabályos tirozin-tRNS antikodonja (AUG) nem képes lefordítani az amber kodont. A szupresszor törzsben (*alul*) mutációval megváltozott a tirozin-tRNS génje, antikodonja a szabályos AUG helyett AUC lett. A módosult antikodon aminosavat jelentő kodonként ismeri fel az amber kodont, ennek megfelelően a stopjel helyén tirozint (szürke) épít a polipeptidláncba és a szintézis nem áll le

(egyes mitokondriális gének kivételével) a stopjelek közül legalább egyet tartalmaz, éppen a polipeptidlánc utolsó aminosavát jelentő kodon után. Gyakran két stopjel is van egymás mellett, mint például az UAAUAG szekvencia az R17 fág burokfehérje génjének végén.

Az eddigiek alapján belátható, hogy a prokarióta mRNS legalább egy **nyitott leolvasási keretet (ORF)**, azaz egy nukleotidszekvenciát tartalmaz, amelyre a következők jellemzők:

1. Iniciátor (leggyakrabban AUG) kodonnal kezdődik.
2. Nincsen stopjel ugyanabban a leolvasási keretben, amelyet az AUG indít, egészen a kódoló rész végéig (erre utal a „nyílt” megjelölés).
3. A végén legalább egy stopjel található ugyanabban a leolvasási keretben.

Mivel az iniciációban egy speciális tRNS vesz részt, logikusnak tűnik a feltételezés, hogy a terminációnak is hasonló mechanizmusa lehet, mivel a terminációs jelek a többihez hasonlóan három bázisból állnak. Az az ötlet is felmerült, miszerint a terminációs jeleket speciális tRNS-ek ismerik fel. Mario Capecchi tervezett egy kísérletet a termináció elemzésére 1967-ben, és felfedezte, hogy korai stopjelet tartalmazó polinukleotidon végzett transláció során a terminációt nem RNS-, hanem fehérjefaktorok indítják el. Ezek az ún. **leválasztó faktorok**, az **RF-1** és **RF-2**, amelyek a következőképpen ismerik fel a stopjeleket. Az RF-1 reagál az UAA és az UAG kodonnal, az RF-2 pedig az UAA-val és az UGA-val. Mindkettő megszakítja a kapcsolatot a polipeptid és a tRNS között, leválasztva ezzel a terméket a riboszómáról. A harmadik faktor, az RF-3 GTP-t köt és segíti a másik két faktor riboszómához kapcsolódását. Eukariótákban egyetlen leválasztó faktor, az **eRF** áll a termináció hátterében. Ez a folyamat a prokarióták terminációjához hasonlóan GTP-igényes, de a GTP-t megkötő fehérjét még nem azonosították.

A leválasztó faktorok, RF-1 és RF-2 ismerik fel a stopjeleket, az UAA, UAG és UGA kodonokat. Az RF-3-mal és GTP-vel együtt leállítják a prokarióták translációját. Az eukariótáknál a GTP energiájának segítségével az eRF látja el ugyanezt a szerepet. Ha mutációval valamelyik kodon stopjelle alakul egy mRNS közepén, akkor a termináció idő előtt bekövetkezik. Ezeket a mutációkat a szuppresszorok, olyan tRNS-ek semlegesíthetik, amelyek a terminátor kodonokhoz kapcsolódva aminosavat építenek a láncba, és így védik ki a terminációt.

A TRANSLÁCIÓ SZABÁLYOZÁSA

A 8. fejezetben tárgyaltuk, hogy a prokarióták génműködésének szabályozása legtöbbször a transzkripció szintjén folyik. A prokarióta mRNS-ek többségének nagyon rövid az élettideje (mindössze 1–3 perc), ami összevág ezzel az elképzeléssel, mert lehetővé teszi a baktériumsejt gyors alkalmazkodását a környezet

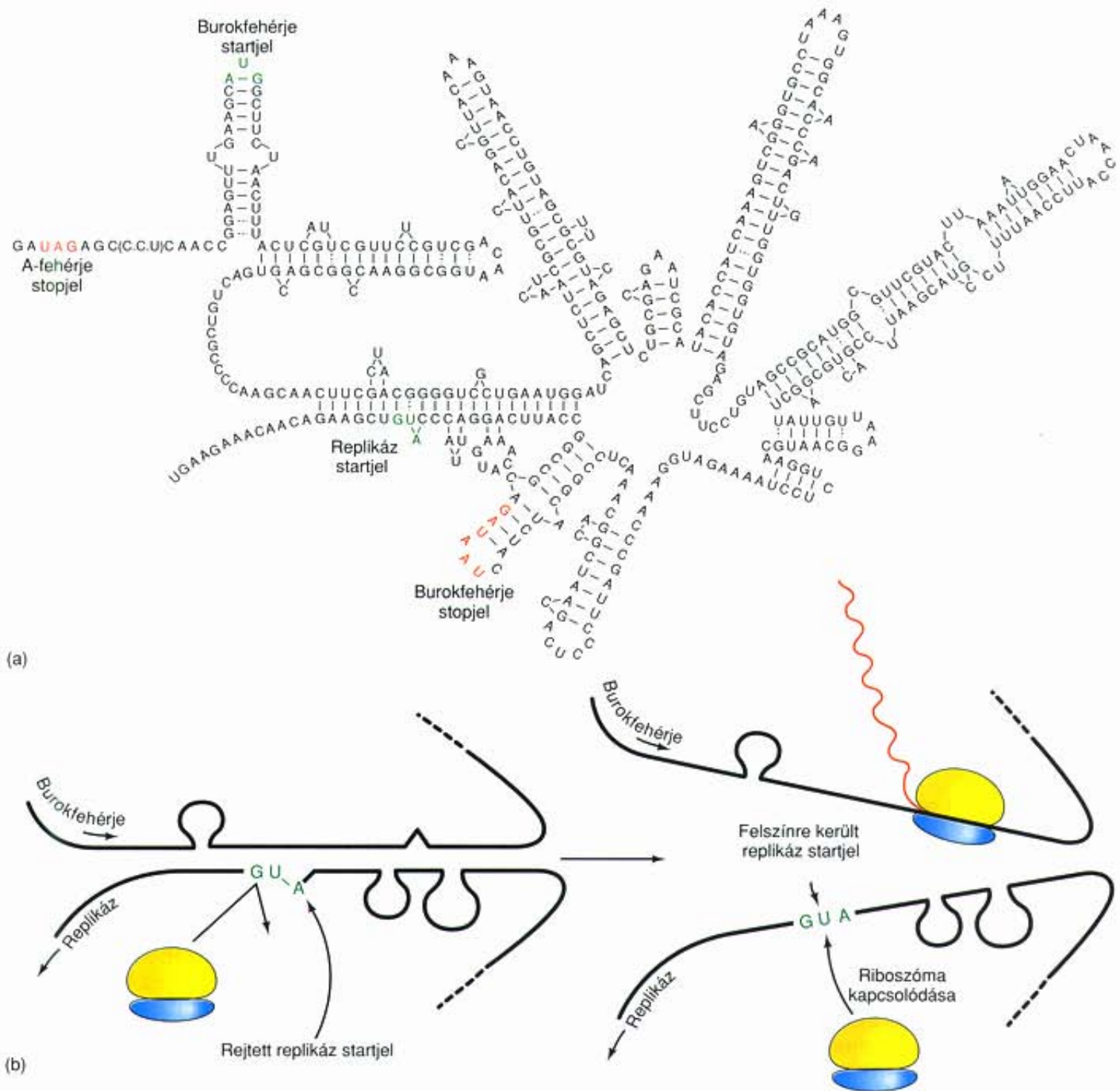
változásaihoz. Az is igaz, hogy a policisztronos mRNS esetén az egyes szakaszokról eltérő intenzitással folyhat a transláció. Például a *lac* operon cisztronjairól – *lacZ*, *Y* és *A* – átíródo fehérjék 10:5:2 molarányban képződnek. Az arány viszonylag különböző környezeti feltételek mellett is állandó, ami arra mutat, hogy a három cisztron Shine–Dalgarno szekvenciájának hatékonysága eltérő. Vannak azonban példák a prokarióta transláció valódi szabályozásra is. Vizsgáljuk meg ezeket.

A PROKARIÓTÁK TRANSLÁCIÓS SZABÁLYOZÁSA

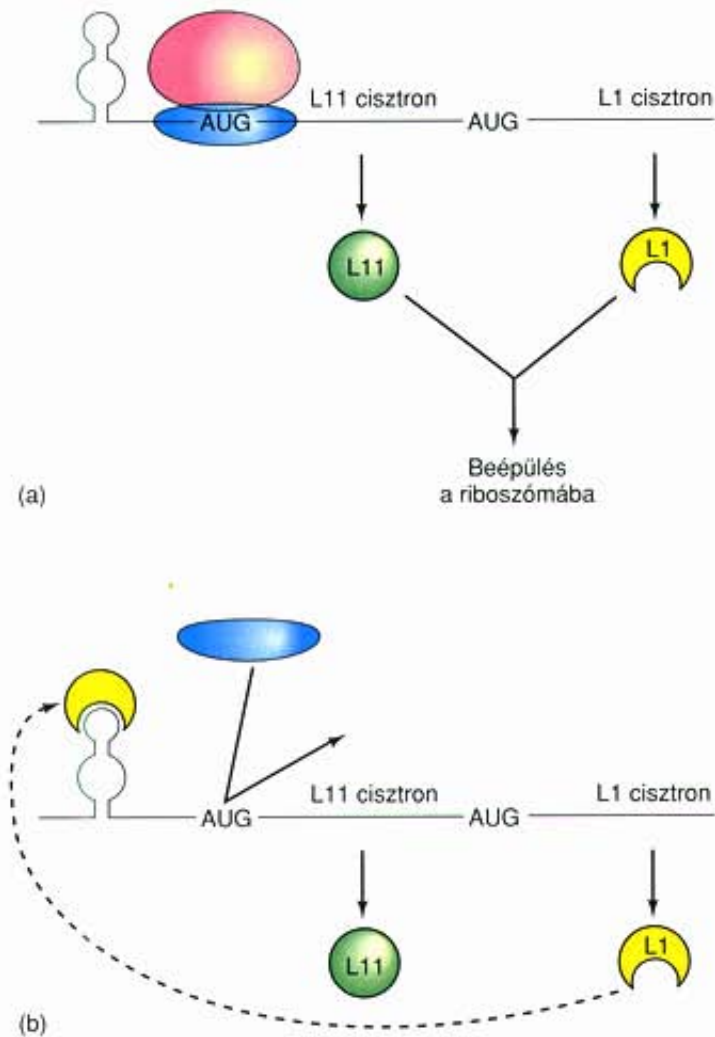
Az mRNS másodlagos szerkezetének szerepe lehet a transláció hatékonyságának alakulásában. Jó példa erre az MS2 bakteriofág és a hozzá hasonló RNS-fágok génexpressziójának szabályozása. Ezek ún. **pozitív fonalas fágok**, ami azt jelenti, hogy genomjuk egyben mRNS-ük is, ezért nagyon jól hasznosíthatók mRNS-forrásként. Felépítésük is nagyon egyszerű, mindössze három génjük van, amelyek három fehérjét az A-fehérjét (éresi fehérjét), a burokfehérjét és a replikáz kódolják. A translációs kezdőpont környezetében mindhárom cisztronban jelentős bázispárosodás, azaz másodlagos szerkezet alakul ki. Az *in vitro* translációs kísérletek kimutatták, hogy az intramolekuláris bázispárosodás mindhárom kezdőpontnál gátló hatású. A bázispárosodás megszüntetése fokozza az iniciációt, ami különösen jellemző a replikáz génjére. Ebben a génben a startjelet egy bázispárokban gazdag szakasz fedi, amely egyben a burokfehérje génjének is része (10.39.(a) ábra). Ez a magyarázata annak, hogy ezekben a fágokban a replikáz génjének translációja nem előzi meg a burokfehérje génjének translációját. A burokfehérje génjén áthaladó riboszómák nyitják fel azt a másodlagos szerkezetet, amely a replikáz gén kezdő kodonját elrejt (10.39.(b) ábra).

A prokarióták translációjánál megfigyelhető a visszacsatolásos (feedback) represszió is, amelynek legismertebb példája az *E. coli* riboszomális fehérjét kódoló policisztronos mRNS-ek cisztronjainak translációja. Az egyik ilyen mRNS tartalmazza az L11 és L1 riboszomális fehérjék génjeit (10.40. ábra). Amikor az L1 fehérje kis mennyiségben termelődik, szorosan kapcsolódik a 23S rRNS hajtú szerkezetéhez. Amikor azonban az L1 (és L11) fehérje fölöslegbe kerül a 23S rRNS-hez képest, az L1 kötődik az L11 cisztron translációs kezdőpontjának közelében található, hasonló szerkezetű hurokhoz. Ennek következtében az L11 és az L1 cisztronok translációja egyaránt gátlás alá kerül. Ez a szabályozás energiatakarékos, mert az rRNS-hez képest fölöslegben levő riboszomális fehérjék egyébként lebontásra kerülnek.

A prokarióták mRNS-ei nagyon rövid élettidejűek, ezért a transláció kontrollja ritka, de előfordul. Az mRNS másodlagos szerkezte szabályozhatja a transláció kezdetét. Erre példa az MS2 fág (és rokonai) replikáz génjének szabályozása és a riboszomális fehérjék translációjának feedback gátlása. Az utóbbi esetben az mRNS L1 és L11 fehérjéket kódoló szakaszának hajtú részéhez kötődő L1 fehérje valósítja meg a gátlást.



10.39. ábra. Az MS2 fág RNS-ének másodlagos szerkezete és hatása a transzlációra. (a) A burokfehérje génje és a határoló részek a feltételezett másodlagos szerkezettel. Kísérleti bizonyítékok vannak arra, hogy a virághoz hasonló forma néhány szíromszerű eleme valóban kialakul a molekulán. Az iniciációs és terminációs kodonokat bejelöltük. (b) A burokfehérjégen transzlációjának hatása a replikáz transzlációjára. A bal oldali ábrarészen a burokfehérjégen transzlációja nem kezdődött el, ezért a replikáz iniciációs kodonja (AUG, zöld) egy bázispárosodott szakaszban rejtőzik. A jobb oldali riboszómán éppen szintetizálódik a burokfehérje. A bázispárosodott szakasz felnyitása után megindulhat a transzláció a replikáz génen is



10.40. ábra. Az L11 operon transzlációjának szabályozása. (a) Az operonról mérsékelt mennyiségű L11 és L1 riboszomális fehérje termelődik. Az összes termék beépül a riboszómákba, ahol az L1 fehérje a 23S rRNS hurok szerkezetéhez kapcsolódik. Ennek felépítése hasonló ahhoz, amit az mRNS-en ábrázoltunk az L11 cisztron transzlációs kezdő kodonjának közelében. (b) Az L11 és az L1 főlegesen termelődik. A fölösleges L1 nem talál elegendő 23S rRNS-t, amelyhez kapcsolódhatna, ezért az L11 cisztron hurok szerkezetéhez kötődik, így a riboszóma nem ér hozzá az L11 cisztronhoz. Mivel a két cisztron transzlációja kapcsolatos, az L1 cisztron sem hozzáférhető, tehát a transzláció mindaddig gátolt, amíg a fölösleges mennyiségű L1 el nem fogy.

AZ EUKARIÓTÁK TRANZLÁCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSA

Az eukarióta mRNS-ek sokkal hosszabb életidejűek a prokariótákénál, így több lehetőség nyílik a transzláció szabályozására. A sebességet meghatározó lépés rendszerint az iniciáció, ezért azt várhatjuk, hogy a legtöbb szabályozó működés itt történik. A legjobban tanulmányozott mechanizmus az iniciációs faktorok

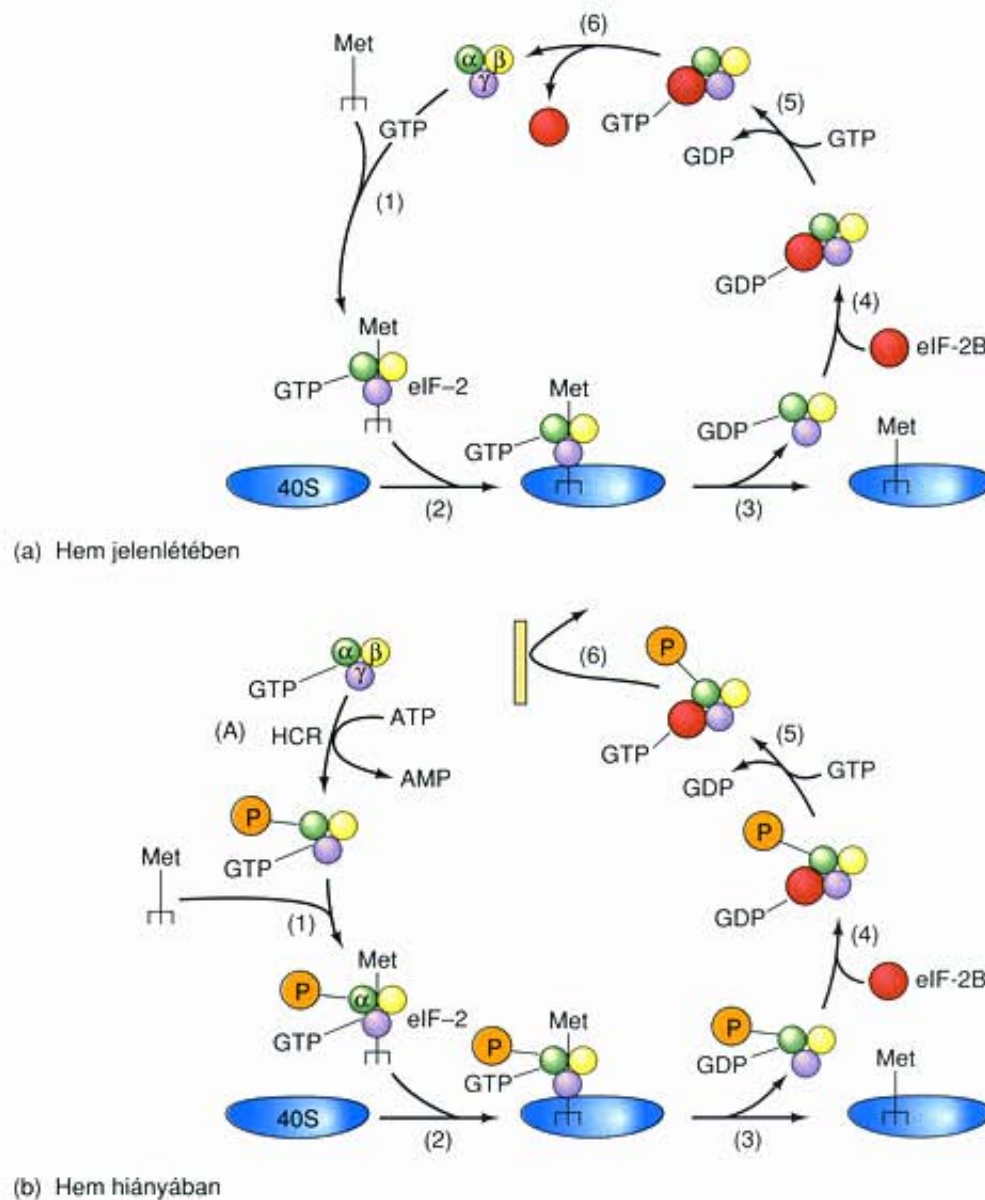
foszforilációja. Ismerünk példákat, amelyekben a foszforiláció gátló hatású, és olyanokat is, amelyekben serkentő.

A gátló hatású foszforiláció legismertebb példája a retikulocitákra vonatkozik. Ezekben a sejtekben szinte kizárólag hemoglobinszintézis folyik. Amikor a szintézishez kevés hem (a hemoglobin vastartalmú része) áll rendelkezésre, csökkenteni kell a fehérjekomponensek, az α - és β -globin láncok szintézisét. A retikulocitákban nem a globin mRNS-ek termelődése kerül gátlás alá, hanem transzlációjuké (10.41. ábra). A hem hiánya egy protein kináz, az ún. **hem által szabályozott represszor, HCR** (másik nevén hem által szabályozott inhibitor, HRI) aktivitását növeli. Ez az enzim az eIF-2 egyik részét, az **eIF-2 α** alegységet foszforilálja. A foszforilált forma erősen kötődik az eIF-2B-hez, amely a GTP-t GDP-vé hasítja az eIF-2 iniciációs faktoron. Amikor az eIF-2B erősen kötődik a foszforilált eIF-2-höz, nem tud leválni, hogy a GTP-t GDP-re cserélje. Ennek következtében az eIF-2 inaktív, GDP-vel kapcsolt állapotban marad, és nem képes a Met-tRNS_i-t a 40S riboszóma alegységhez kötni. Ebben az állapotban a transzláció iniciációja megáll.

Az **interferonok**, a vírusok ellen védő fehérjék is hasonló szabályozó mechanizmust indítanak el. Interferon és kétfonális RNS jelenlétében (amely vírus által fertőzött sejtekben gyakran megtalálható, de egészséges sejtben soha) egy másik eIF-2 α kináz, a **DAI** (kétfonális RNS által aktivált inhibitor rövidítése) aktiválódik. Hatása megegyezik a HCR-ével, vagyis gátolja a transzláció iniciációját. Egy vírussal fertőzött sejtben ez nagyon hasznos, mert a transzláció gátlása az utódvírusok termelődését, ezzel a fertőzést is blokkolja.

Az iniciáció sebességét befolyásolhatja a sapkát megkötő fehérje, az eIF-4E működése, ezért várható, hogy a foszforiláció alanya lehet. Így is van, és foszforilációjának hatása inkább stimuláló, semmint gátló. Már ismerjük azokat a feltételeket, amelyek kedveznek az eIF-2 α foszforilálásának és a transzláció gátlásának (pl. hem hiánya, vírusfertőzés), ezek kedvezőtlenek a sejtnövekedés szempontjából. Ebből már sejthető, hogy azok a körülmények, amelyek kedveznek az eIF-4E foszforilációjának és transzlációjának, előnyösen hatnak a sejtek növekedésére. Például a sejtszétválás stimulálása inzullinnal vagy mitogénekkal növeli az eIF-4E foszforilációját.

Az inzulin és több növekedési faktor, mint az epidermális növekedési faktor (EGF) szintén az eIF-4E bevonásával, de más módon serkenti a transzlációt. A 10.42. ábra vázolja azt a mechanizmust, amellyel ezek a faktorok fokozzák a sejt működést. Egy olyan utat követnek, amelyben nagyon lényeges egy fehérje, a Ras szerepe, amelyet a 17. fejezetben részletesen tárgyalunk. Ezen a reakcióúton a **MAP-kináz** (mitogén által aktivált protein kináz) foszforilálódik. A MAP-kináz egyik célpontja pedig a PHAS-I fehérje, amelyik az eIF-4E-hez kapcsolódva gátolja annak működését. A foszforilált enzim leválik az eIF-4E-ről, aminek következtében az iniciációs faktor képes a sapkához kapcsolódni. Ezért a transzláció stimulálódik.



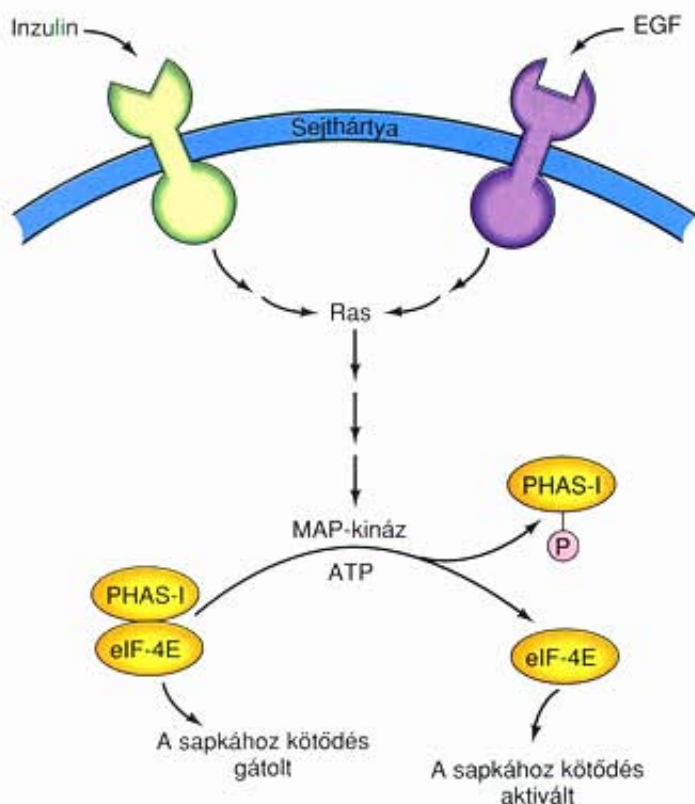
(a) Hem jelenlétében

(b) Hem hiányában

10.41. ábra. A transzláció gátlása az eIF-2 α alegység foszforilálásával. (a) Elegendő hem jelenlétében nincs gátlás. 1. lépés: a Met-tRNS_i kapcsolódik az eIF-2-GTP komplexhez, és kialakít egy nagyobb, három elemből álló komplexet. Az eIF-2 faktor trimer, három, különböző alegységből áll (α – zöld, β – sárga, γ – lila). 2. lépés: a háromrészes komplex a 40S riboszóma alegységhez (kék) kötődik. 3. lépés: a GTP hidrolizál GDP-re és foszfátra, a GDP-eIF-2 komplex leválik a 40S riboszómáról, amelyen kötve marad a Met-tRNS_i. 4. lépés: az eIF-2B (piros) az eIF-2-GDP komplexhez kapcsolódik. 5. lépés: az eIF-2B a GTP-t GDP-re cseréli a komplexen. 6. lépés: az eIF-2B disszociál a komplexről. Ekkor az eIF-2-GTP és a Met-tRNS_i új komplexet alakíthat ki, amely új iniciációs lépésbe kezdhet. (b) A hem hiánya a transzláció gátlását idézi elő. A hem hiánya következtében aktiválódott HCR foszfátot (narancssárga) kapcsol az eIF-2 α -alegységéhez. Ezután az 1–5 lépések következnek, mint az (a) részben. A 6. lépés azonban gátolt, mert az eIF-2B nagy affinitása a foszforilált eIF-2 α -hoz meggátolja a disszociációt. Az eIF-2B kötve marad a komplexben, ezért a transzláció gátolt.

Az eukarióta mRNS-ek életideje viszonylag hosszú, így több lehetőség nyílik a transzláció szabályozására, mint a prokariótákban. A szabályozás gyakori célpontja az eIF-2 α -alegysége. Hem hiányában a retikulocitákban a HCR aktiválódik, foszforilálja az eIF-2 α faktort, ezzel gátolja a transzláció iniciációját. A vírussal fertőzött sejtekben egy másik kináz, a DAI aktiválódik, ami szintén foszforilálja az eIF-2 α -t, és így gátolja a transzláció elindulását.

A sapkához kötődő eIF-4E is a foszforiláció célpontja, de ez általában akkor következik be, amikor a körülmények kedveznek sejtnevekedésnek, ezért a transzláció fokozódik. Az inzulin és számos növekedési faktor serkenti azt a reakciót, amelyben a Ras- és a MAP-kináz szerepel. A MAP-kináz egyik célpontja a PHAS-I fehérje, amely foszforilált állapotban disszociál az eIF-4E-ről, így az aktiválhatja a transzláció iniciációját.



10.42. ábra. A PHAS-I foszforilálása serkenti a transzlációt. Az inzulin és a növekedési faktorok (pl. EGF) sejtfelszíni receptoraikhoz kötődnek. Ez a kötődés egy jelsorozaton keresztül a Ras aktiválásához vezet, amely egy kaszkád beindításával aktiválja a MAP-kinázt. A MAP-kináz egyik célmolekulája a PHAS-I. Amikor a MAP-kináz foszforilálja, a PHAS-I leválik az eIF-4E-ről, és az bekapcsolódhat az iniciáció folyamatába

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Alább egy kétfonalas bakteriális DNS szekvenciája látható. Az alsó szál az átíródo, értelmes szál. Keresse meg és írja fel az erről a génről átíródo mRNS nyílt leolvasási keretét!

5'-ATCCGATGAAACCGTGGACACCCAGATAAATCG-3'
3'-TAGGCTACTTTGGCACCTGTGGGTCTATTTAGC-5'

MEGOLDÁS

Emlékezzünk vissza, hogy az RNS-ben U áll a T helyett, és keressük meg az ATG startkodont a felső szálon az 5'-vég közelében. (A felső szál a néma szál, ennek bázissorrendje egyezik meg az mRNS bázissorrendjével.) A start szekvencia a 6. pozíciónál kezdődik. Írjuk fel a startjelet követő bázisokat hármas csoportokban, amíg stopjelhez (UAG, UAA vagy UGA-nak megfelelő TAG, TAA vagy TGA) nem érünk. A 3'-végtől számított hetedik pozícióban van egy TAA triplet. Hármas csoportokba rendezve a szekvenciát, meggyőződhetünk arról is, hogy nincs közben stopjel:

5' AUG AAA CCG UGG ACA CCC AGA UAA 3'

2. FELADAT

(a) A genetikai kód segítségével állapítsuk meg annak az oligopeptidnek az aminosavsorrendjét, amelyik az alábbi mRNS-ről keletkezhet. Feltételezzük, hogy csak a fiziológiailag fontos iniciációs jelek szerepelnek benne:

5'-AUGAGAUACCAUGGGCCUAAUGUGAAAA-3'

Milyen változások következnek be az aminosavsorrendben, ha az mRNS-ben a következő változások lépnek fel?

- Az első C G-re cserélődik.
- Az első U G-re cserélődik.
- Az első C U-ra cserélődik.
- A második G A-ra cserélődik.
- Az első C delécióra kerül.
- Egy újabb G épül be az első G után.

MEGOLDÁS

(a) Minthogy csak egy fontos iniciációs szekvencia szerepel a felírásban, az mRNS transzlációja az első AUG kodonnal kezdődik. Az üzenet lefordításának megkönnyítésére a bázisszekvenciát hármasával tagoljuk:

AUG AGA UAC CAU GGG CUA AUG UGA AAA

A kódszótár segítségével írjuk fel a kodonoknak megfelelő aminosavakat:

fMet Arg Tyr His Gly Gln Met Stop Lys
AUG AGA UAC CAU GGG CUA AUG UGA AAA

Az utolsó előtti kodon (UGA) stopjel, ezért a transzláció leáll a metionin kodonja után. Az utolsó kodon (AAA, Lys) nem kerül transzlációra, tehát a polipeptid aminosavsorrendje: fMet-Arg-Tyr-His-Gly-Gln-Met.

(b) Az első C cseréje G-ra. Az új mRNS olvasása AUG AGA UAG stb. lesz, ahol a vastagon szedett betű jelzi a megváltozott bázist. Az UAG stopjel, ezért csak az első két kodon kerül transzlációra, és egy dipeptid keletkezik: fMet-Arg.

(c) Az első C U-ra változott. Az új mRNS AUG AGA UAU stb., ahol a vastagon szedett betű jelzi a megváltozott bázist. Az UAU a Tyr kódja, ugyanúgy, mint az UAC, ezért az aminosavsorrend nem változik.

(d) A második G A-ra változott. Az új mRNS AUG AAA stb. lesz, ahol a vastagon szedett betű jelzi a módosult bázist. Az AAA a Lys kodonja, ezért a polipeptid második aminosava Lys lesz, a fennmaradó rész változatlan: fMet-Lys-Tyr-His-Gly-Gln-Met.

(e) Az első G U-ra változott. Ezzel az első kodon AUU lett, tehát nem startjel. Az iniciáció a következő, jobbra található AUG-nél történhet. Figyelembe kell venni, hogy ez nem szükségszerűen esik az eredeti leolvasási keretre, ebben az esetben is ez a helyzet. Az első AUG az új mRNS a 11. bázisánál indul: AUUAGAUACC AUG GGC UAA UGU GAA AA. Az új nyílt leolvasási keret kódoló szakasza és a megfelelő aminosavsorrend:

fMet Gly Stop
AUG GGC UAA UGU GAA AA

Ez az mRNS a fMet-Gly dipeptidet kódolja.

(f) Az első C delécióra kerül. Az új mRNS:

AUG AGA UAC AUG GGC UAA UGU GAA AA

ahol vastagon szedett bázisok a kiesett bázis két oldalán lévőek. A kódoló szekvencia és a megfelelő aminosavsorrend:

fMet Arg Tyr Met Gly Stop Cys Glu
AUG AGA UAC AUG GGC UAA UGU GAA AA

Ez az mRNS a fMet-Arg-Tyr-Met-Gly oligopeptidet eredményezi.

(g) Egy G inszerciója az első G után. Az új mRNS:

AUG GAG AUA CCA UGG GCU AAU GUG AAA A

ahol vastagon szedett a beékelődött bázis. A keletkezett mRNS és a róla készült oligopeptid:

fMet Glu Ile Pro Trp Ala Asn Val Lys
AUG GAG AUA CCA UGG GCU AAU GUG AAA A

Tehát a polipeptid: fMet-Glu-Ile-Pro-Trp-Ala-Asn-Val-Lys.

3. FELADAT

Egy amber szuppresszor mutáns az amber kodonra triptofánt (Trp) épít be a polipeptidbe. Milyen változás jöhetett létre nagy valószínűséggel a tRNS^{Trp} antikodonjában?

MEGOLDÁS

A triptofán kodonja 5'UGG3', amit a 3'ACC5' antikodon ismer fel a vad típusú tRNS^{Trp}-ben. Az amber kodon 5'UAG3', amelyet az amber szuppresszorban legnagyobb valószínűséggel a 3'AUC5' antikodon ismer fel. Ezt az antikodont (3'AUC5') összehasonlítva a vad típusú (3'ACC5') kiderül, hogy a tRNS^{Trp} antikodonjában az amber szuppressziót okozó változás a 3'ACC5' 3'AUC5', azaz a változás a CU tranzíció volt.

ÖSSZEFOGLALÁS

A legtöbb gén egy polipeptid szintéziséhez szükséges információt hordoz. A polipeptidek aminosavakból álló peptidkötésekkel összekapcsolt polimerek. A polipeptidláncok a riboszómákon szintetizálódnak.

A riboszómák alegységei rRNS-ből és fehérjékből álló alegységekre disszociálnak és újra összeépülnek. A riboszóma önmagában, külső segítség nélkül felépülő, önszerveződő egység. A legtöbb mRNS-en egyszerre több riboszóma végez fehérje-szintézist. Az így létrejövő képlet a poliszóma.

A lóhere modell a tRNS másodlagos szerkezetét (a bázis-párosításban részt vevő régiókat) mutatja be. A négy, bázis-párosítással kialakuló szárrész három hurkot alakít ki: a D-hurkot, az antikodon-hurkot és a TΨC-hurkot. A tRNS-ekben sok módosított bázis van, amelyek közül néhány elengedhetetlen a tRNS aktivitásához. A tRNS-ek háromdimenziós szerkezete L alakú. Az antikodon bázisai az egyik oldalon csoportosulnak, és egy hélix mentén helyezkednek el, ami megkönnyíti a három bázisból álló kodonnal való bázispárosítást. Mindegyik aminoacil-tRNS szintetáz egy specifikus aminosavat kapcsol az általa felismert tRNS-ekre.

A genetikai kód háromtagú kódszavakból, bázis-tripletekből, azaz kodonokból áll. Az mRNS-en sorakodó kodonok alapján a riboszóma meghatározott aminosavat épít be a polipeptidláncba. A kód nem átfedő, vagyis mindegyik bázis csak egy kodon tagja. Nem tartalmaz sem szökőzt, sem elválasztó vesszőt, azaz minden bázis az mRNS kódoló régiójában része egy kodonnak. A kód degenerált, vagyis

egynél több kodon felel meg egy-egy aminosavnak. A degeneráltság egy részét az izoakceptor tRNS-ek kompenzálják, amelyek ugyanazt az aminosavat kötik meg, de különböző kodonokat ismernek fel. A fennmaradó hányadot lötyögő bázisok jellemzik: a kodon harmadik bázisa elmozdulhat kissé normál helyzetéből és az antikodonnal nem szabályos, a Watson-Crick bázispároktól eltérő párokat is képezhet.

A transláció iniciációja során az első aminoacil-tRNS a riboszóma-mRNS komplexhez kötődik. A prokarióták iniciációja speciális aminosavat, az N-formil-metionint (fMet), és speciális tRNS-t, a tRNS^{fMet}-t igényel. A prokarióta mRNS-en a Shine-Dalgarno-szekvencia bázisai a kezdő kodon mellett 5'-irányban többé-kevésbé komplementerek a riboszóma 16S rRNS-ének 3'-végével. A két régió bázispárosodása feltehetőleg segíti a riboszómát az mRNS iniciátor régiójának felismerésében és megkötésében.

Az eukarióta mRNS-eken nincs Shine-Dalgarno-szekvencia. Helyette a sapka szolgál a riboszómához való kötődésre. A sapkához először az eIF-4 iniciációs faktor kapcsolódik, majd a 40S riboszóma alegység a Met-tRNS-sel. Iniciációs faktorok pásztázzák végig az mRNS-t, amíg alkalmas kezdő kodont (AUG) találnak. A soron következő AUG kodont át is ugorhatják, ha az nem a megfelelő szekvenciában helyezkedik el (A vagy G a -3 pozícióban, G a +4 pozícióban).

Az elongáció három lépésből áll: (1) az EF-Tu a GTP energiáját felhasználva köti az aminoacil-tRNS-t a riboszóma A-helyére; (2) A peptidil transferáz peptidkötést alakít ki a P-helyen álló peptid és az A-helyen lévő aminoacil-tRNS aminosava között. Ezzel egy aminosavval gyarapodik a peptid, és átkerül az A-helyre; (3) Az EF-G a GTP energiájával áthelyezi a növekvő peptidil-tRNS-t az mRNS kodonjával együtt a P-helyre. A peptidil transferázaktivitása a nagy riboszóma alegységhez kötött.

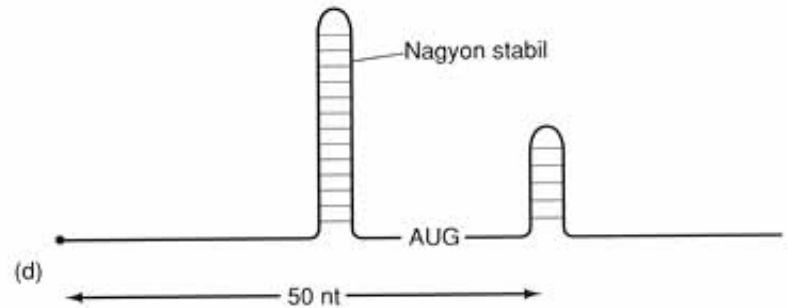
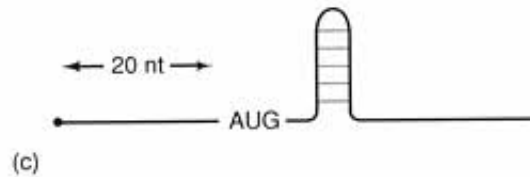
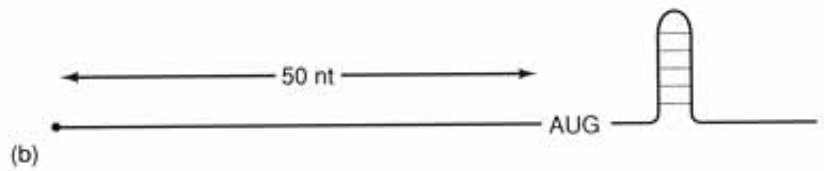
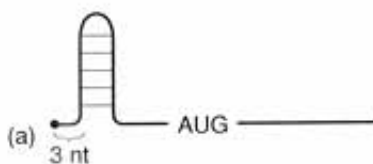
A prokariótákban translációs leválasztó faktorok, az RF-1 és az RF-2 ismerik fel a stopjeleket, az UAA, UAG és UGA kodonokat, majd az RF-3-mal és a GTP-vel együtt leállítják a translációt. Az eukarióta sejtekben az eRF látja el ugyanezt a szerepet a GTP energiájának felhasználásával. Ha mutációval stopjel alakul ki egy mRNS közepén, a termináció idő előtt bekövetkezik. Ezeket a mutációkat semlegesíthetik a szuppresszor tRNS-ek, amelyek a terminátorkodonoknál valamilyen aminosavat építenek be a láncba, így kivédik a korai terminációt.

A prokarióták és az eukarióták egyaránt képesek a transláció szabályozására.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Két olyan tRNS, amelyek az antikodonja komplementer, gyengébben, erősebben vagy ugyanolyan erősséggel kötődne egymáshoz, mint két komplementer trinukleotid? Miért? (Egy kis segítség: a szabad trinukleotidoknak nincs határozott alakjuk, a tRNS-eknek azonban igen.)
- Ha egy a metionint hordozó metionin-tRNS-en kémiai módosítanánk az aminosavat alaninná, hogyan viselkedne ez az alanint hordozó alanil-tRNS^{Met} *in vitro* translációban? Mi lenne az eredmény? Más szóval, hová épülne be a polipeptidláncba az alanin, az alanin vagy pedig a metionin helyére?
- A 2. kérdésre adott válasz alapján, mennyire fontos az aminoacil-tRNS szintetáz a transláció pontosságában?
- Mi az aminoacil-tRNS szintetáz által katalizált reakció terméke?
- Az mRNS szekvenciája a következő: 5'-AUGGCAGUGCCA-3'. Válaszoljon a következő kérdésekre átfedő, illetve nem átfedő genetikai kódot feltételezve: (a) Hány kodon van az oligonuk-

- leotidban? (b) Hány kodon változik meg, ha a második G-t C-re változtatjuk?
6. Mi lenne a leolvasási keretre és a génműködésre kifejtett hatása, ha (a) egy gén közepére két bázist beépítünk? (b) Három bázist beépítünk? (c) Egy bázist beépítünk egy kodonba, egyet pedig elveszünk a következő kodonból?
7. Ha a kodonok hat bázisból állnának, milyen polipeptidlánc alakulna ki a poli(UUCG) egységekből álló mRNS alapján?
8. Egy mutáns *E. coli*-ban az egyik aminoacil-tRNS szintetáz normál hőmérsékleten szabályosan a fenilalanint kapcsolja a tRNS^{Phe}-hoz, de egy mutáció miatt 42 °C-on az arginint. Mi a következménye a mutációnak a magas hőmérsékleten tartott tenyésztetben? Lenne-e hatása a fehérje működésére? Válaszát indokolja!
9. Milyen hatása lehet az mRNS iniciátor kodonjában fellépő mutációnak?
10. (a) A kódszótár felhasználásával adja meg az alábbi oligonukleotid által meghatározott polipeptid aminosavsorrendjét:
5'-AUGUUCAAGAUGGUGACUUGGUAUAUC-3'
- Milyen aminosavsorrendű polipeptid jön létre az első G-t C-re cserélve? (c) Az első C-t U-ra változtatva? (d) Az első C-t G-re cserélve? (e) Az utolsó G-t A-ra változtatva?
11. Keresse meg a lehető leghosszabb nyílt leolvasási keretet a következő mRNS-ben!
- 5'AAUGUUCUGAUGAACCACGACUUAUAGC3'
12. (a) Melyik három aminosavnak van hat kodonja? (b) Melyik az a két aminosav, amelyeknek csak 1-1 kodonjuk van?
13. Hány különböző kodon lenne egy olyan rendszerben, amelyben egy kód 4 bázisból áll?
14. A lötyögés jelenségét figyelembe véve milyen kodonokat ismerhet fel a 3'-GAG-5' antikodon? Írja föl a kodonokat 5' → 3' irányban (ne feledje, hogy a kodon-antikodon illeszkedés antiparalel).
15. Milyen antikodon ismerhetné fel az izoleucin mindhárom kodonját a lötyögés jelenségét figyelembe véve? Írja fel az antikodont 3' → 5' irányban!
16. A kloacin DF13 egy ribonukleáz, amely *E. coli* ép riboszómájában specifikusan egy 49 bázisból álló oligonukleotidot hasít le a 16S rRNS 3'-végéről. Milyen hatással lehet ez a translációra?
17. Amikor a λ -fág *cl* (represszor) génje a P_{RM} promoterről átíródik, a keletkező mRNS-en nincs vezető szakasz. Vagyis az AUG iniciátor kodon az mRNS 5'-végén van. A keletkező mRNS részt vehet-e aktívan a translációban? Válaszát indokolja!
18. A következő eukarióta mRNS-ek közül melyik íródhat át a legaktívabban az adott iniciátor kodontól, és melyik iniciátor kodonja van kedvezőtlen környezetben? Miért kisebb a többi mRNS translációjának hatékonysága?



19. Hol állna le az elongáció, ha mutáció következne be (a) az EF-G; (b) az EF-Tu; (c) a peptidil transzferáz génjében?
20. Az aminoacil-tRNS-ek közül csak egy lép be a riboszóma P-helyére. Melyik ez? Miért lényeges tény az, hogy ez az aminoacil-tRNS nem kerül az A-helyre?
21. Egy bakteriális fehérje 403 aminosavból áll, beleértve a terminális metionint is, amelyik nem válik le róla. Hány peptidil transzferáz reakció játszódik le ennek a fehérjének a szintézise során?
22. Mi történne a QT fág fehérjével egy olyan amber szuppresszor törzsben, ahol a szuppresszor tRNS a tRNS^{Tr}, és a QT fág minden stopjele UAGUGA? Válaszát indokolja!
23. Egy ochre szuppresszor glutamint (Gln) épít be az ochre kodonnál. Mi lehet a legvalószínűbb változás a tRNS^{Gln} antikodonjában, amellyel ez a szuppresszor törzs keletkezett?
24. Ön izolált egy olyan *Neurospora* mutánst, amely képtelen a α aminosav szintézisére. A szintézis a normál törzsben egy x anyagból kiindulva történik egy olyan anyagcseréuton, amelyben három köztes termék a , b , és c szerepel: $x \rightarrow a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow \alpha$. Hogyan bizonyítaná be, hogy a mutánsban a $b \rightarrow c$ reakciót katalizáló enzim génje defektus?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

11.

F E J E Z E T

Génmutáció

Tanulási program

- 1 A mutációk különböző fenotípusos hatásai.
- 2 A kémiai anyagok és a sugárzások károsíthatják a DNS-t és mutációkat okozhatnak.
- 3 A DNS sérüléseit javító mechanizmusok helyreállíthatják.
- 4 A DNS-t károsító anyagok azonosítása.

*Semmi sem bizonyos annyira,
mint a változás.*

John Phillips
The Mamas and the Papas

A 7–10. fejezetben részletesen ismertettük a gének két alapvető jellegzetességét, vagyis azt, hogy nagy pontossággal replikálódnak, valamint magukban hordozzák az RNS- és a fehérjeszintézishez szükséges információkat. A gének harmadik sajátja, hogy változások, vagyis mutációk halmozódnak fel bennük. Könyvünkben már sokszor említettük a mutációt, és tény, hogy e jelenség nélkül a genetika tudománya nem létezne, hiszen rendszerint csak akkor figyelünk fel egy génre, amikor mutációval megváltozik. Nem beszéltünk azonban még azokról a mechanizmusokról, amelyek módosítják a géneket. Ezt a fejezetet ennek a kérdésnek szenteljük.

A mutációk egyes esetekben nem csak egy vagy néhány bázis megváltozását jelentik, hanem a kromoszóma egy nagyobb részét is érinthetik. Ilyen esetekben kromoszómamutációról beszélünk. Az aneuploidia még inkább szembevetendő, hiszen háttérben egész kromoszómák hiánya vagy többlete áll. A kromoszómamutációt és az aneuploidiát már ismertettük az 5. fejezetben, ezért itt már nem foglalkozunk velük. Figyelmünket a **génmutációkra**, vagyis az egy-egy gént érintő változásokra fordítjuk. Látjuk majd, hogy sok mutáció káros, de vannak közöttük közömbösek, sőt jótékony hatásúak is.

A GÉN MUTÁCIÓK TÍPUSAI

A génmutációkat többféle szempont szerint osztályozhatjuk. Az egyik lehetőség például, hogy a mutáns szervezet fenotípusára gyakorolt hatásukat vesszük alapul, a másik pedig, hogy magára az örökítő anyagra kifejtett hatásukat vizsgáljuk. Először tekintsük át azokat a mechanizmusokat, amelyekkel a mutációk a fenotípust befolyásolják.

A SZOMATIKUS MUTÁCIÓK ÉS AZ IVARSEJTEK MUTÁCIÓI

Az ivarosán szaporodó soksejtű szervezetek testi sejtjeiben és ivarsejtjeiben is kialakulhatnak mutációk. Az utóbbi esetben a gaméták megváltoznak, és a mutációk továbbadódnak az utódoknak. Ezek a mutációk az ún. **ivarsejtmutációk** vagy **csírvonal-mutációk**. Viktória angol királynő esetében valószínűleg ilyen mutáció következett be, mivel férfi leszármazottai között voltak hemofiliások – X ivari kromoszómához kötött rendellenesség –, míg ősei között nem (3. fejezet).

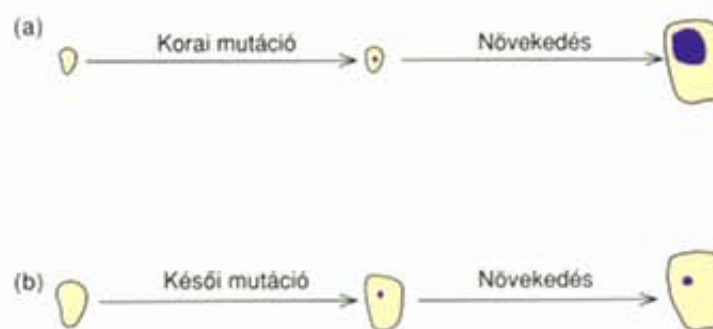
A testi, szöveti, másképpen **szomatikus sejt**ekben fellépő mutációk csak az adott egyed fenotípusát módosítják, a változás nem adódik át az utódokba, mert nem érinti az ivarsejtek genetikai anyagát.

Szomatikus mutációra számos példát ismerünk. Vizsgáljuk meg a 11.1. ábrán látható kukoricaszemet. A vad típusú szemek egyöntetűen bíborszínűek, de egy mutáció következtében a színt kialakító gén inaktiválódott, így ez a szem fehér, bár foltok tarkítják. Minden egyes színes folt egy-egy backmutáción,



11.1. ábra. Szomatikus mutáció. A kukoricaszem minden egyes színes foltja olyan sejtek csoportja, amelyek egyetlen, backmutáción átesett sejt osztódásával alakultak ki. Backmutációk hiányában a kukoricaszem tiszta fehér lenne

Forrás: Fedoroff, Nina V.: *Transposable Genetic Elements in Maize*. *Scientific American*, 1984. június © Scientific American, fotó F. W. Goro



11.2. ábra. A szomatikus mutáció hatását a mutáció időpontja befolyásolja. (a) A mutáció a mag fejlődésének korai szakaszában lép fel, a backmutáción átesett sejtéből nagyszámú sejt képződik, így nagy kiterjedésű színes folt alakul ki. (b) A mutáció a mag fejlődésének késői szakaszában következik be, amikor a teljes kifejlődésig már csak kevés sejtosztódás van hátra, ezért a színes folt kisebb lesz

más szóval reverziónt átment sejt osztódásával képződött, vagyis az érintett sejtben a pigmentszintézisért felelős gén ismét működőképesé vált. Ha a backmutáció a szemképződés korai stádiumában lép fel, amikor még csak néhány sejt van jelen, a színes folt nagy lesz, mert az érintett sejtéből nagyszámú színes utódsejt alakulhat ki, és akár az egész szem is színes lehet (11.2.(a) ábra). Ha azonban a backmutáció a szemfejlődés késői szakaszában történik, amikor már sok sejt kialakult, és csak kevés sejtosztódás van hátra, a folt kicsi lesz (11.2.(b) ábra). Ezek a mutációk a fejlődő kukoricaszem szomatikus sejtjeiben, a színt meghatározó endospermiumban következtek be, tehát szomatikus mutációk, amelyek kialakulásáért az ún. **mozgó genetikai elemek** felelősek (12. fejezet).

Úgy tűnik, hogy a szomatikus mutációknak fontos szerepük van a rák kialakulásában is. Sok esetben egyetlen, szoma-



11.3. ábra. Albinó egér és vad típusú testvére

Forrás: Brinster, R. L.: *Cell*, 27, címlapfotó 1981. november, Cell Press

rikus mutáción átesett sejtől indul el a rosszindulatú átalakulás (17. fejezet).

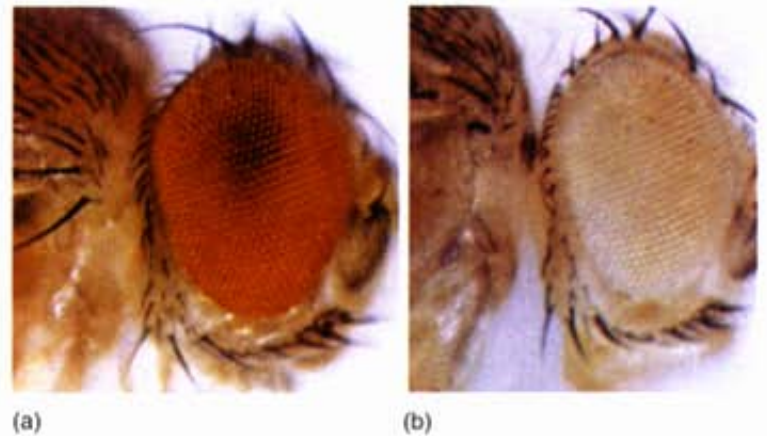
Az ivarsejtmutációk a gamétákat érintik, ezért ezek a változások átkerülhetnek az utódokba. A szomatikus mutációk nem ivarsejtekben, hanem testi sejtekben alakulnak ki. Hatásuk csak a mutáns szervezetet érinti, az utódokban nem jelenik meg.

MORFOLÓGIAI MUTÁCIÓK

A **morfológiai mutációkat** vagy **látható mutációkat** hordozó magasabb rendű szervezetek eltérő megjelenésük alapján legtöbbször könnyen elkülöníthetők a vad típusú egyedektől. Például az **albinó** emlősök, köztük az ember szervezetében is abban a génben történt mutáció, amelyik a bőr és a szőrzet festékanyagának termeléséért felelős. Az érintett gén rendszerint a tirozináz enzim génje, ami kulcsszerepet játszik a haj, a szem és a bőr színét kialakító, sötét színű pigment, a melanin termelésében. A mutáns tirozináz allél terméke inaktív, aminek következtében melanin sem képződhet. Hiányában az albinó emberek bőre és haja nagyon világos, szemük világoskék; az albinó egerek szőrzete fehér, szemük piros (11.3. ábra).

Különösen sok morfológiai mutánsa ismert a *Drosophilának*. Ezek közé tartozik a fehér szemű *white* (11.4. ábra), a csökevényes szárnyú *miniature*, a résszemű *Bar* és a pödrött szárnyú *Curly*.

A mikroorganizmusok, sőt még a vírusok is mutathatnak morfológiai mutációkat. A *Streptococcus pneumoniae* baktérium mutáns törzse, amellyel Avery és munkatársai végezték kísérleteiket a DNS örökítő szerepének bizonyítására, ráncos felszínű telepeket képez, míg a vad típus sima felszínűt (6. fejezet). Az élesztő *petite*



11.4. ábra. *Drosophila* morfológiai mutánsai

(a) Vad típusú, piros szemű ecetmuslica (a); (b) fehér szemű mutáns

Forrás: Rubin, Gerald M.: *Cell*, 40, címlapfotó 1985. április, Cell Press

mutánsainak kolóniái jóval kisebbek a vad típusénál. A T4 fág *r* mutánsa a gazdasejt *gyors (rapid) lízisét* eredményezi, ezért nagyobb és tisztább plakkokat hoz létre a baktériumtenyésztésben, mint a vad típus (13. fejezet). A mikroorganizmusok megváltozott morfológiáját általában nem egyetlen egyeden, hanem azok telepein, illetve vírusok esetében a plakkokon figyelhetjük meg.

A morfológiai mutációk szemmel látható változásokat okoznak az érintett szervezetekben.

AZ ANYAGCSERÉT ÉRINTŐ MUTÁCIÓK

A mikroorganizmusoknak megkülönböztethető ugyan néhány morfológiai mutánsa, de számuk nyilvánvalóan kevés, mivel ezeknek az egyszerű szervezeteknek korlátozott számú morfológiai bélyegük van. Ezért rendszerint kevésbé nyilvánvaló mutáns jellegeket vizsgálhatunk. Közülük leggyakrabban azokat, amelyek miatt a mikroorganizmus nem képes egyszerű táptalajokon növekedni. Bizonyos vad típusú mikroorganizmusok csak ásványi sókat és valamilyen energiaforrást, például glükózt tartalmazó ún. minimál táptalajokon is növekednek. Az ilyen **prototróf** (görög, *proto* = első; *trophe* = táplálás) sejtek minden anyagot képesek előállítani, amelyre szükségük van az életben maradáshoz: aminosavakat, nukleotidokat, vitaminokat stb. Az anyagcserejükre nézve defektes, ún. **auxotróf** mutánsok (latin, *auxilium* = segítség) minimál táptalajon elpusztulnak, mivel fennmaradásukhoz az említettek kivül még egy vagy több anyagot igényelnek.

Például az *E. coli* bio mutánsa életképtelen, ha táptalaja nem tartalmazza a biotin nevű vitamint, a *leu* mutáns pedig a leucin aminosav nélkül pusztul el. Hasonló a 10. fejezetben tárgyalt *Neurospora* mutáns is, amely a pantoténsav nevű vitamin hiányában nem növekedik. Az anyagcserehibák oka nyilvánvalóan az, hogy a biotin, a leucin vagy a pantoténsav előállításához vezető reakcióutak enzimeit működésüképtelenek. Mivel az enzimeket

kódoló gének enzimermékei inaktívak, a sejtekben nem képződik biotin, leucin, illetve pantoténsav, és a sejtek elpusztulnak.

Az anyagcserét érintő mutációk a szervezetet olyan tápanyagoktól teszik függővé, amelyeket a vad típusúak nem igényelnek.

LETÁLIS MUTÁCIÓK

A **letális mutációk** olyan súlyos elváltozásokat okoznak, amiket az érintett szervezet nem élhet túl (3. fejezet). Példa erre az RNS-polimeráz egyik alegységének génjében fellépő mutáció. Ha a változás inaktíválja az RNS-polimerázt, a sejtek nem szintetizálnak RNS-t, ezért életképtelenek. A haploid szervezetek letális mutáció következtében azonnal elpusztulnak, mert nincsen másik, vad típusú alléljuk, amely kompenzálhatná a letális hatást. A diploid szervezetek azonban akár generációkon keresztül is hordozhatnak letális allélokat, feltéve, ha azok recesszívek és az egyed heterozigóta. A mutáció letális hatása csak két heterozigóta kereszteződéséből származó homozigóta recesszív egyedekben jelenik meg. A 3. fejezetben már láttunk erre példát a sárga egerek keresztezésének elemzésekor. A heterozigóta, sárga színű egerek életképesek, homozigóta sárgák azonban nincsenek, mert méhen belül elhalnak. A sárga szőrszín domináns jelleg, de maga a *letalitás* recesszív. A diploid szervezetek legtöbb letális mutációja recesszív. Amennyiben egy létfontosságú fehérjére nézve az egyik szülőből hibás allél kerül a zigótába, a másik szülőből pedig vad típusú allél, az utóbbi rendszerint lehetővé teszi, hogy elegendő fehérjét termeljen a sejt. Csak akkor alakul ki a letális fenotípus, ha két hibás allél kombinálódik egy homozigóta egyedben.

A domináns letális mutáció egyik példája az emberi Huntington-kór. Elgondolkodtató, miként lehetséges, hogy a domináns letális mutáció hordozója hosszú ideig él, sőt örökítheti is a jelleget gyermekeire. Nem ismerjük pontosan a betegség kifejlődését, de azt tudjuk, hogy a heterozigóták akár felnőttkorukig is normális életet élhetnek, gyermekeik lehetnek, mert a degenerációs tünetekkel járó, halálos kór csak később jelentkezik. A 16. fejezetben tárgyaljuk azokat a géntérképezési módszereket, amelyekkel a Huntington-kór és más súlyos genetikai rendellenességek vizsgálhatók.

A letális mutációk az életfontosságú géneket érintik. A letális mutációt szenvedő haploid szervezetek azonnal elpusztulnak, a heterozigóta diploid szervezetek azonban fennmaradhatnak, mivel a letális mutációk rendszerint recesszívek.

KONDITIONÁLIS MUTÁCIÓK

A letális mutációk a haploid szervezetekben általában azonnali halálhoz vezetnek, ezért ezek az élőlények a mutáns gének

termékeit vizsgáló kutatásokban alig használhatók. A fenti probléma megkerülésére kiválóan alkalmasak a **kondicionális letális** mutációk, amelyek csak bizonyos körülmények között letálisak.

Tekintsük például a **hőérzékeny mutánsokat**. Az alacsony hőmérséklet, az ún. **permisszív** hőmérséklet nem gátolja a növekedésüket, de a vad típus számára normál növekedési hőmérsékleten, az ún. **restriktív** vagy **nonpermisszív** hőmérsékleten már életképtelenek. A letalitás tehát a hőmérséklettől függ. Fontos hangsúlyozni, hogy nem maga a gén hőérzékeny, hanem az általa kódolt fehérje. A mutáció következtében olyan enzim képződik, amely sokkal könnyebben **denaturálódik** hő hatására a normál típusúnál. A denaturáció a vad típusú enzimmél is bekövetkezik, de magasabb hőmérsékleten.

Emberben is vannak hőszensitív mutációk. A cisztás fibrózis ($\Delta 508$) egyik típusában a mutáns allél által kódolt fehérje normál testhőmérsékleten nem megfelelő konformációjú, ezért inaktív. Alacsonyabb hőmérsékleten ugyanez a fehérje szabályos szerkezetű és működőképes.

A kondicionális mutációk másik példája a 10. fejezetben már megismert amber mutáció, amely egy translációs stopjelet – „értelmetlen” mutációt – hoz létre egy gén közepén. Ez pedig olyan esemény, amely letális, ha egy normál, nonpermisszív törzs létfontosságú génjét érinti. A kondicionális letalitás azt jelenti, hogy a gén továbbra is működik az amber szuppresszor, permisszív törzsekben. A 10. fejezetben tárgyaltuk, hogy az amber szuppresszor törzsek olyan tRNS-sel rendelkeznek, amely felismeri az amber kodont, beépít egy aminosavat a fehérjébe, és ezzel meggátolja a transláció leállítását. Ezért, ha egy amber mutációt hordozó fág amber szuppresszor törzset fertőz meg, akkor fennmaradhat.

Egy mutáció akkor is lehet kondicionális, ha nem letális. A sziámi macskák (11.5. ábra) mutációt hordoznak a sötét szőrszínért felelős génjükben, az albinó egerekkel ellentétben mégsem tiszta fehérek. Lábaikon, orrukon és füleiken, vagyis a valamivel alacsonyabb hőmérsékletű testrészeiken, sötét színű a szőr. Ez arra enged következtetni, hogy a mutáns allél hőérzékeny fehérjét kódol. A macska bőrének legnagyobb részén elég magas a hőmérséklet a pigmentet termelő enzim inaktiválódásához,



11.5. ábra. Sziámi macska

Fotó: Copyright © Carl W. May, Biological Photo Service

ezért ezek a testrészek fehérek vagy nagyon halványak. A hidegebb területeken azonban működőképes az enzim, így képződik sötét festékanyag.

A kondicionális mutációk csak bizonyos feltételek mellett hatnak. A hőérzékeny mutánsokban a kódolt fehérje magasabb hőmérsékleten denaturálódik, de alacsonyabb hőmérsékleten aktív marad. Az amber mutáns normál körülmények között nem termel működőképes fehérjét, de az amber szuppresszor tRNS-sel rendelkező szervezetekben igen. Ha a kondicionális mutáció nonpermisszív feltételek esetén letális, akkor a mutáció kondicionális letális.

A MUTÁCIÓK HATÁSA AZ ÖRÖKÍTŐ ANYAGRA

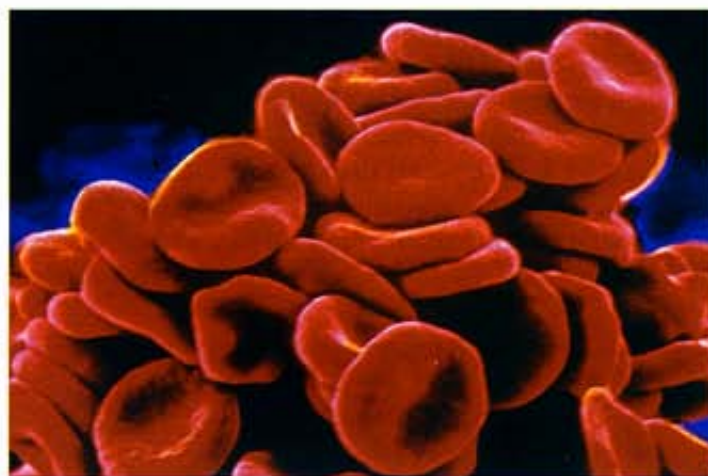
A mutációkat annak alapján is osztályozhatjuk, milyen változást okoznak a DNS szerkezetében. Ebben a fejezetben a **pontmutációkkal** foglalkozunk, amelyek egy vagy néhány bázis megváltozásával, beékelődésével (inszerció) vagy kiesésével (delécio) járnak.

MISSZENZS ÉS NONSZENZS MUTÁCIÓK

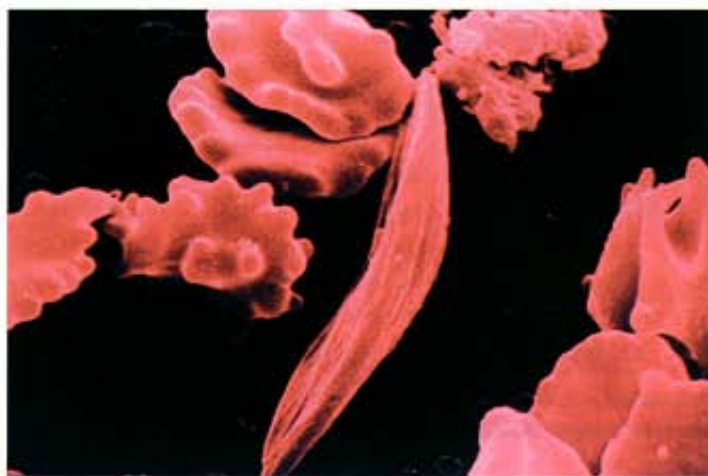
A mutáció következtében az öröklődő információ gyakran úgy módosul, hogy egy bázis megváltozása miatt a bázishármas más aminosavat kódol. Ha például mutáció következtében a prolint kódoló CCG kodon CGG-re változik, akkor a prolin helyére arginin épül a polipeptidláncba. Az ilyen típusú pontmutációk a **misszensz** (megváltozott értelmű) **mutációk**.

Misszensz mutáció következménye a **sarlósejtes anémia**. A sarlósejtes anémia alléljára homozigóta emberek vörösvérsejtjei normális megjelenésűek, amennyiben vérük sok oxigént tartalmaz. A szabályos vörösvérsejt alakja egy *középen belapult korongéra* hasonlít. Amikor a sarlósejtes anémiában szenvedő emberek vérenek oxigéntartalma fizikai megterhelés vagy valamilyen más ok miatt lecsökken, a vörösvérsejt drámai változáson mennek keresztül, sarló vagy félhold alakúvá válnak (11.6. ábra). Az alakváltozás következményei végzetesek, a vörösvérsejt nehezen jutnak át a szűk kapillárisokon, elzárják és roncsolják azokat. A szövetek éheznek és oxigénhiányosak, mert nem áramlik át rajtuk elegendő vér. Ráadásul a roncsolódás miatt belső bevérzések lépnek fel. A sarló alakú sejtek sérülékenyek, könnyen szétesnek, a beteg vérszegény lesz. Orvosi felügyelet nélkül az érintett személyek krízishelyzetbe, életveszélyes állapotba kerülnek.

Mi okozza a sarlósejtes anémiát? A változás a **hemoglobinban**, a vörösvérsejt oxigénszállító fehérjéjében történik. A vad típusú hemoglobin normál fiziológiai körülmények között oldott állapotban marad, a sarlósejtes anémiában szenvedő betegek hemoglobinja azonban kicsapódik a vér oxi-



(a)



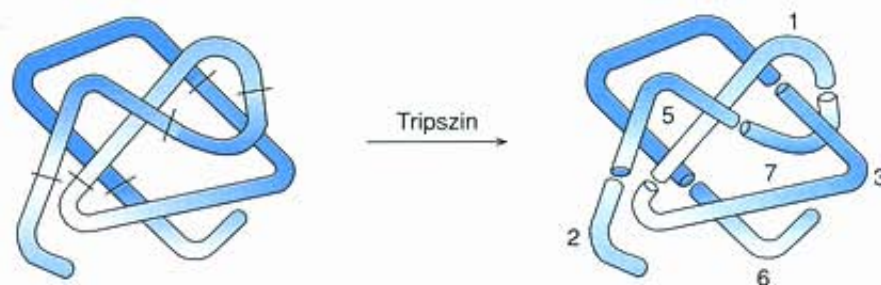
(b)

11.6. ábra. Normál és sarlósejtes vörösvérsejt. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken jól megkülönböztethetők (a) a szabályos, korong alakú vörösvérsejt (b) a beteg emberből származó torz, sarló alakú vörösvérsejtektől. Nagyítás: (a) 3333 \times , (b) 5555 \times

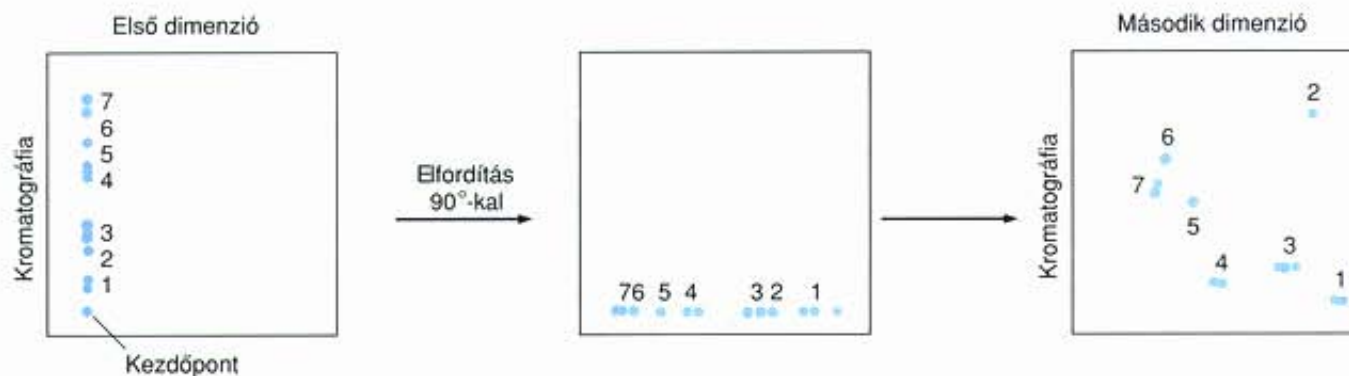
Forrás: (a) Jeroboam/Photo Researchers, Inc.; (b) Omikron/Photo Researchers, Inc.

gén szintjének csökkenése miatt, hosszú, szál aszaggátumokat képez, amelyek eltorzítják a vörösvérsejt alakját.

Mi a különbség a normál hemoglobin (HbA) és a sarlósejtes hemoglobin (HbS) között? A kérdésre Vernon Ingram találta meg a választ 1957-ben. Mindkét fehérje polipeptidláncainak aminosavsorrendjét meghatározta a Sanger-féle **fehérjeszekvenálási módszerrel**. A négy alegységből álló hemoglobin kétféle globinláncainak egyikét, a β -globint vizsgálta. Először olyan enzimmel hasította a láncot, amely meghatározott peptidkötésnél, specifikus helyen hidrolizál. A képződő **peptideket** kétdimenziós papírkromatográfiával választotta szét (11.7. ábra). Az egyik futtatáshoz használt oldószerrel részben elválasztotta egymástól a peptideket, majd 90°-kal elfordította a papírt, és egy másik oldószerrel folytatta az elválasztást. A peptidek szétváltak egymástól, és különálló foltokként jelentek meg a papíron. A különböző fehérjék, eltérő aminosavösszetételük miatt különböző foltmintázatot adnak. Ezeket a mintázatokat találóan **ujjlenyomatnak** (fingerprint) nevezik.



(a) A fehérje hidrolízise peptidekre



(b) A peptidek kétdimenziós elválasztása

11.7. ábra. Ujjlenyomat (fingerprint) készítése egy fehérjéből. (a) Egy hipotetikus fehérje 6, tripszinre specifikus hasítási pontját vonalakkal jelöltük. A tripszinnel végzett hidrolízis után 7 peptid keletkezik. (b) A peptidek egydimenziós kromatográfiával részlegesen szétválaszthatók. A szétválasztás teljessé tehető, ha a papírt 90°-kal elforgatjuk, és egy másik oldószerrel a második dimenzióban is elvégezzük a kromatográfiát

Amikor Ingram összehasonlította a HbS és a HbA ujjlenyomatait, azt találta, hogy egyetlen kivétellel minden folt megegyezik (11.8. ábra). Egy folt mobilitása eltért a kétféle hemoglobin ujjlenyomatában, amiből következik, hogy aminosav-összetételük is eltérő. Ingram megvizsgálta a kérdéses foltokban lévő peptidek összetételét, és megállapította, hogy ezek az N-terminális peptidek, vagyis mindkét fehérjének a legelején találhatók, és csak egyetlen aminosavban különböznek egymástól. A hatodik helyen a HbA-ban glutaminsav, míg a HbS-ben valin található (11.9. ábra). Mindössze ennyi a két fehérje aminosavszekvenciájában a különbség, de ez elegendő ahhoz, hogy a fehérje viselkedése alapvetően megváltozzon.

A genetikai kód ismeretében feltehetjük a kérdést: milyen változás történt a β -globin génjében amely az Ingram által kimutatott különbséget magyarázza? A glutaminsavat (Glu) meghatározó két kodon az mRNS-ben a GAA, illetve a GAG. A valin (Val) négy mRNS kodonja közül kettő a GUA, illetve a GUG. Ha a glutaminsav kodonja a HbA-ban GAG, akkor egyetlen báziscserével GUG-re módosulhat (CTC \rightarrow CAC vagy GAG \rightarrow GTG báziscsere a DNS egyik vagy másik láncon), és így a hemoglobinba glutaminsav helyett valin kerül. Hasonló magyarázatot lehet adni a GAA \rightarrow GUA (CTT \rightarrow CAT, illetve GAA \rightarrow GTA a DNS-ben) változásra is. A 11.10. ábra összegzi a mutációk következményeit. Látható, hogyan módosul a fehérjébe épülő aminosav a gén bázissorrendjének megváltozása miatt.



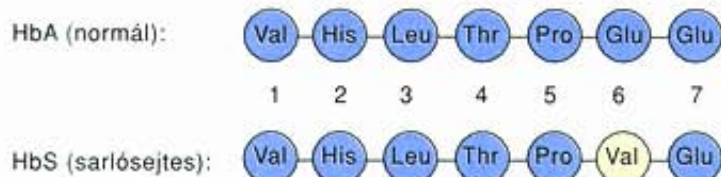
11.8. ábra. A hemoglobin A és a hemoglobin S ujjlenyomata. A két ujjlenyomat egyetlen peptid (bekeretezve) kivételével azonos. A kérdéses folt a hemoglobin S-ben a normálhoz képest balra és felfelé helyezkedik el

Dr. Corrado Baglioni engedélyével

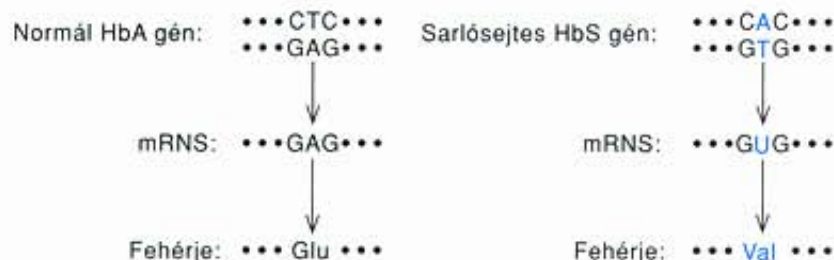
A 10. fejezetben láttuk, hogy egy kodon mutációval stopjel is alakulhat, amely nem határoz meg aminosavat („nonszensz” kodon), hanem leállítja a translációt. A triptofán UGG kodonja például egyetlen báziscserével stopjellé alakulhat, UGA vagy UAG kodon lehet belőle. A mutáció természetesen a DNS-ben következik be, és a fenti példában a TGG, illetve az ACC triplet változhat meg mutációval, az első esetben TGA, illetve ACT, a másodikban TAG, illetve ATC tripletté. A példában az RNS kodonjait tüntettük fel, mert a kodonok felírásának ez a szokványos módja. A 10. fejezetben ismertettük a **frameshift mutációt**, amelynek lényege, hogy egy bázis inserciója vagy deléciónja a gén köztes részében megváltoztathatja a leolvasási keretet, aminek következtében egészen más aminosavsorrendű fehérje keletkezhet.

Vizsgálhatjuk a báziscserét kémiai szempontból is. A legegyszerűbben szemlélve az ilyen mutációk két csoportba sorolhatók: (1) **tranzíciók**, amelyekben egy pirimidin bázis helyére egy másik pirimidin ($C \rightarrow T$ vagy $T \rightarrow C$), illetve egy purin bázis helyére a másik purin ($A \rightarrow G$ vagy $G \rightarrow A$) lép; (2) a **transzverziók** komolyabb változást jelentenek, mivel ilyenkor purin bázis helyettesít pirimidin bázist vagy fordítva.

Miért okoz mélyrehatóbb változást a transzverzió a tranzíciónál? Azért, mert kémiaiag sokkal jobban hasonlít egy purin bázis egy másik purinra, illetve egy pirimidin egy másik pirimidinre, mint a purinok a pirimidinekre. A tranzíció és a transzverzió megkülönböztetésének a kód degeneráltsága miatt genetikai értelme is van. A 10. fejezetben ismertettük, hogy két hasonló, pirimidinre végződő kodon, például az UUU és az UUC, nagyobb valószínűséggel kódolnak azonos aminosavat – esetünkben fenilalanint –, mint az a két kodon, amelyek közül az egyik purinra, a másik pedig pirimidinre végződik (az UUU



11.9. ábra. A β -globin N-terminális peptidjének szekvenciája normál és sarlósejtes vörösvérsejtekben. A számok az aminosav helyét jelzik a polipeptidláncban. Csak a 6. pozícióban van különbség, ahol a HbS-ben valin (Val), míg a HbA-ban glutaminsav (Glu) található



11.10. ábra. A sarlósejtes anémiát okozó mutáció és következményei. A normál gén értelmes szálanak hatodik bázishármasa CTC-ről CAC-re változik, vagy a másik szálon $GAG \rightarrow GTG$ csere következik be. Emiatt a mutánsban a β -globin mRNS-ének hatodik kodonja GAG-ről GUG-re módosul. Mindez a polipeptidlánc hatodik pozíciójában glutaminsav helyett valin beépülését eredményezi

fenilalanint, az UUG leucint kódol). Ugyanígy, két purinra végződő kodon is nagyobb valószínűséggel kódolja ugyanazt az aminosavat (például a GAA és a GAG a glutaminsav kodonjai, míg a GAU és GAC az aszparaginsavé). Ezért a kodon harmadik helyén az egyik pirimidin bázis cseréje a másik pirimidin bázisra (vagy egyik purin kicserélődése a másikra) kisebb valószínűséggel változtatja meg a kodon értelmét, mint a purin cseréje pirimidinre vagy fordítva.

A misszensz mutációk hatására egy aminosavat jelentő kodon egy másik aminosavat jelentő kodonra változik. Klasszikus példa erre a sarlósejtes anémia, az ember egyik genetikai rendellenessége, melynek hátterében egyetlen bázis cseréje áll a hemoglobin β -globin génjében. A báziscsere következtében a polipeptidlánc meghatározott helyére nem a megfelelő aminosav épül be. A fehérje konformációja oxigénhiányos állapotban megváltozik, ezért a vörösvérsejtek alakja torzul. Ez a példa jól illusztrálja a genetikai egyik alaptételét: egy gén megváltozása egyben a gén enzimettermékét is módosítja. A nonszensz mutáció, amikor egy gén belsejében stopjel alakul ki, és a polipeptid translációja idő előtt leáll, egyetlen báziscsere következménye is lehet. A tranzíció olyan báziscsere, amikor purin bázis cserélődik a másik purinra, illetve pirimidin a másik pirimidinre. A transzverzió purin–pirimidin, illetve pirimidin–purin cserét jelent.

SPONTÁN MUTÁCIÓK

Természetesen minden mutációnak van valamilyen oka, de esetenként a mutáció **mutagén** hatás hiányában is kialakul. Ezeknek az ún. spontán mutációknak is számos magyarázatuk lehet.

A DNS replikációs mechanizmusa miatt kialakuló mutációk

A 8. fejezetben láttuk, hogy a replikáció nagy pontossággal zajlik, de nem tökéletes, így a mutációk egy része a DNS-szintézisben bekövetkező hibára vezethető vissza.

A hibás replikáció hatásai különösen jól tanulmányozhatók az *E. coli* **mutátor** törzsein. A mutáns törzsek DNS-ének repli-

kációjakor a szokásosnál gyakrabban következik be hiba, mutációs rátájuk magasabb a normálisnál. Mutátor mutációkat több különböző génben sikerült kimutatni, néhányukat már azonosították is. Például a *mutD* gén a DNS-polimeráz III holoenzim (epszilon) alegységét kódolja. Ez a polipeptid felelős a holoenzim 3' → 5' exonukleáz aktivitásáért, amely nélkül a leolvasást ellenőrző funkció nem működik, így az újonnan szintetizálódó DNS-láncban sok mutáció marad (7. fejezet). A *mutH*, *mutL* és *mutS* mutációk szintén mutátor jellegűek, és a mismatch reparációval kapcsolatosak. Ez a mechanizmus azokat a bázispárosodási hibákat javítja ki, amelyeket a leolvasást ellenőrző rendszer nem vett észre. A mismatch reparációt a fejezet további részében tárgyaljuk.

Bár első pillantásra nagyon valószínűtlennek látszik, de olyan mutációk is vannak, amelyek éppen ellenkezően hatnak: még pontosabbá teszik a DNS-replikációt. Felmerül a kérdés, ha létezik kevesebb hibával működő rendszer, miért alakult ki az *E. coli*-ban egy kevésbé hatékony replikációs mechanizmus? A válasz talán az, hogy a nagyon nagy pontosságú rendszerrel bíró mutánsok evolúciója igen lassú, nem eléggé rugalmasak ahhoz, hogy a változó környezethez könnyebben alkalmazkodó szervezetekkel felvegyék a versenyt.

A DNS-bázisok miatt fellépő replikációs hibák

A DNS-bázisok rendszerint két lehetséges szerkezeti formájuk, más szóval **tautomerjük** egyikében vannak jelen. A timin általában a 11.11.(a) ábrán látható **ketoformát** veszi fel, ez alkot bázispárt az adeninnel. A 11.11. ábrán a ritkábban kialakuló **enolforma** is megfigyelhető. A két tautomer konstitúciós izomer, tehát összegképletük azonos, de atomjaik kapcsolódása eltérő. Az enolforma a guaninnal képez bázispárt az adenin helyett. Ha replikáció közben a timin éppen enolformában van a bázispár kialakulásának pillanatában, az adenin helyére guanin épül be. Ha a hiba kijavítatlan marad, a következő DNS-replikáció állandósítja azt, és mutáció jön létre.

A 11.11.(b) ábrán az adenin két tautomerje látható. Az **aminoforma** jóval gyakoribb, ez alkot bázispárt a timinnel. Esetenként átrendeződhet **iminoformává**, ami a citozinnal áll párba. Ha az adenin éppen iminoformában van, amikor a polimeráz kialakítja a kötést, a T helyére C épül be. Amennyiben a hiba megmarad a következő DNS-replikációig, mutáció következik be, GC bázispár alakul ki az AT helyett. A 11.11.(c) ábra a citozin **tautomerizációját** szemlélteti a ritka iminoformára, illetve a guaninét a szintén ritka enolformára. Tüzetesen megvizsgálva ezeket a ritka tautomereket, meggyőződhetünk arról, hogy szabálytalan CA, illetve GT bázispárokat képeznek.

Mindeddig azt vizsgáltuk, mi történik, ha a replikálódó DNS templát szálában van a ritka tautomer. De az is előfordulhat, hogy a beépítés pillanatában az újonnan beillesztett bázis nem a megfelelő tautomer, ami ugyanúgy hibás bázispárosodáshoz vezet, mint az előző eset.

A replikáció során kialakuló spontán frameshift mutációk

Néha a DNS-replikáció során egy vagy több bázis inszerciója, illetve delécioja következik be egy gén kódoló régiójában, és attól a ponttól kezdve megváltozik a translációs leolvasási keret (10. fejezet). Az ilyen **frameshift mutációk** nagyon súlyos hatásúak, mert a mutáció helyétől az mRNS végéig mindegyik kodon megváltozik. Mivel az új kodonok között rendszerint stopjel is kialakul, a frameshift mutációk gyakori következménye a transláció idő előtti leállása. A folyamatot a 11.12. ábra szemlélteti: (a) egy hipotetikus gén darabja, amelynek minden kodonja átíródik és translációra kerül; (b) ugyanaz a génszakasz, de egy adenin beépül a negyedik pozícióba, és egy bázissal balra eltolja a leolvasási keretet. Ettől a ponttól kezdve mindegyik kodon megváltozik. Az egyik új kodon a jobb szélén stopjel lett, amelynél a transláció leáll.

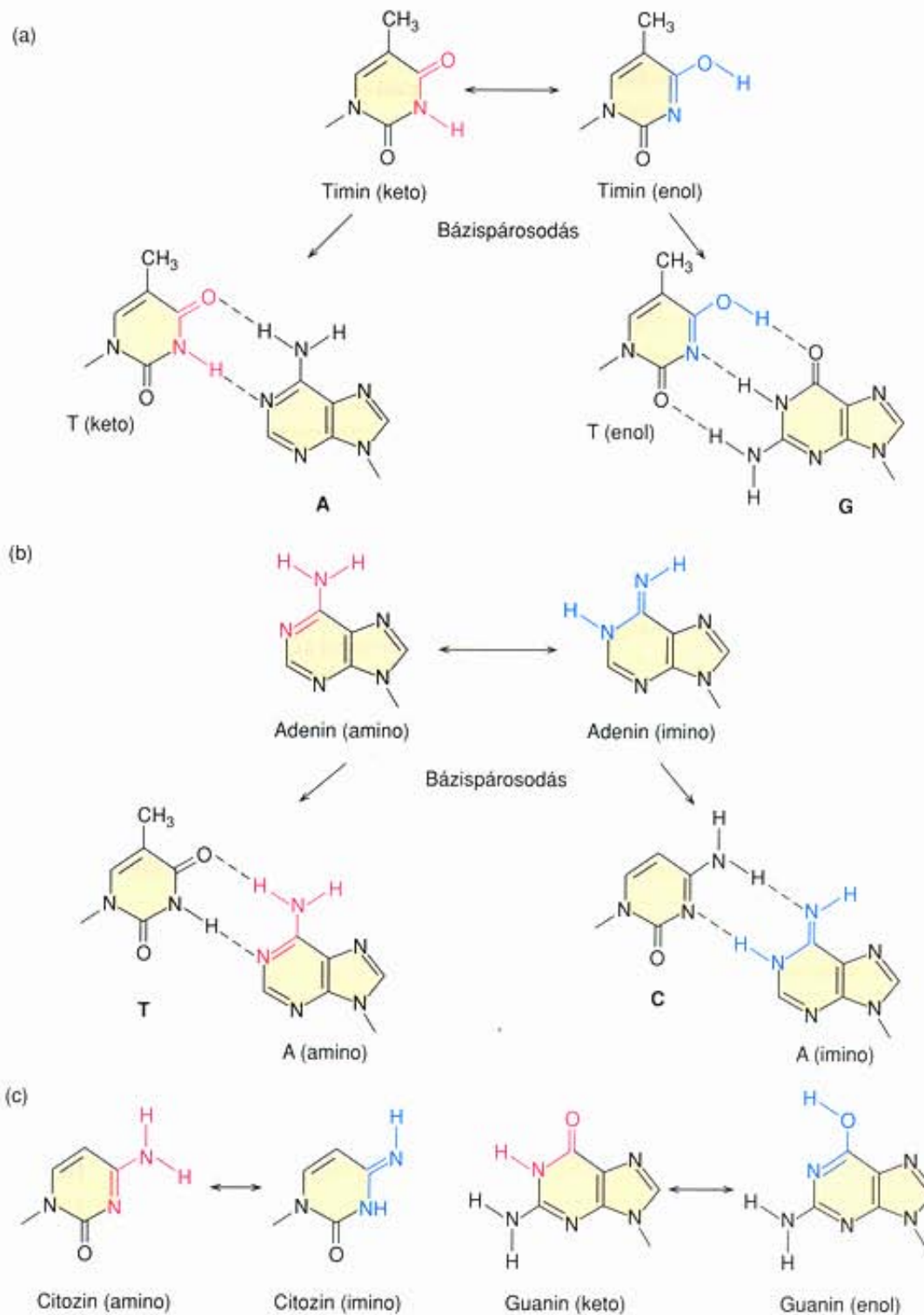
Hogyan jönnek létre az inszerciók és a delécio? A pontos mechanizmus nem ismert, az egyik hipotézist a 11.13. ábra mutatja. Eszerint a DNS replikációs mechanizmusa időnként kihagy egy-egy lépést. Ezért a kettős hélix egyik láncának egy bázisa nem képez párt a komplementer szállal, és kis hurok keletkezik rajta. A hurkolódás különösen az olyan DNS-fonalak esetében valószínű, amelyeken egy bázis sorozatban ismétlődik. Ha egy bázis a templát fonálon hurkolódik ki, akkor az utódszáiba eggyel kevesebb bázis épül be, tehát delécio alakul ki. Amennyiben az utódfonál egyik bázisa képi a hurkot, akkor eggyel több bázis épülhet be a száiba, tehát az eredmény inszerció.

A dezamináció következtében kialakuló spontán mutációk

Nem csak a replikációs gépezet hibái miatt léphetnek fel mutációk. A bázisok, különösen a citozin, hajlamosak aminocsoportjuk elvesztésére, más szóval **dezaminációra**. A citozin dezaminálásaikor az aminocsoport helyett oxocsoport alakul ki, ezáltal uracil képződik. Az uracil az adeninnel képez bázispárt, nem pedig a guaninnal. Az adenin szintén dezaminálódhat, és hipoxantinná alakulhat, amely a citozinnal képez párt, nem a timinnel. A dezamináció mindkét esetben mutációhoz vezet az új bázispárosodás miatt. A 11.14. ábrán láthatjuk a változásokat, illetve a citozin és az adenin dezaminálásával keletkezett új típusú bázispárokat.

A dezamináció leggyakoribb formája, a citozin uracillá alakulása rendszerint nem vezet mutációra, mert a sejtek rendelkeznek azzal a mechanizmussal, amely a DNS-be került uracilt eltávolítja. A folyamatban részt vevő enzim az uracil-DNS-glikozidáz (11.15. ábra), amely hidrolizálja az uracil és a dezoxiribóz közti kötést, eltávolítja az uracilt, szabaddá téve a pentóz-foszfát gerincet. Ezután egy másik enzim hamarosan beépíti a citozint a komplementer szál guaninjával szemben.

Egyes szervezetekben a DNS a szokásos négy bázis mellett kis mennyiségben módosított bázisokat is tartalmaz. Közülük leggyakoribb az 5-metil-citozin (11.16.(a) ábra), amely ugyanúgy a guaninnal képez bázispárt, mint a citozin. Ugyanakkor nem



11.11. ábra. A tautomerizáció következtében fellépő spontán mutáció. (a) A timin normál (keto) tautomerje (balra) az adeninnel képez bázispárt, de az enolformába való ritka átrendeződés után már a guaninnal párosodik. A szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelzik. (b) Az adenin normál (amino) tautomerje timinnel képez pár. A ritka iminofarmába történő átrendeződés után (jobbra) a citozinnal alakít ki bázispárt. (c) Balra: a citozin gyakori amino tautomerje esetenként iminofarmába rendeződik, amely az adeninnel kapcsolódik (nincs feltüntetve). Jobbra: a guanin normál ketoformája ritkán átalakulhat enolformává, amely a timinnel képezte párt (nincs feltüntetve). A megváltozott bázispárok sajátosságai azonosak a (b) és az (a) ábrarészleten levőkkel

minden tekintetben viselkedik egyformán a citozinnal. Az 5-metil-citozint tartalmazó helyek a spontán mutáció szempontjából forró pontokat jelentenek, mivel a bázis könnyen dezaminálódik.

Miért mutagén hatású az 5-metil-citozin dezaminálódása, ha a citozin megváltozása általában nem az? A válasz egyszerű: a citozin dezaminációval uracillá alakul, amit a javító enzimek könnyen felismernek és eltávolítanak. Az 5-metil-citozimból azonban szabályos DNS-bázis, timin keletkezik, így a javító mechanizmus nem ismeri fel a hibát. Ez azt is jelenti, hogy az 5-metil-citozin dezaminálásával G-T mismatch mutáció alakul ki. A következő replikáció után az egyik utód DNS-ben a vad típusú G-C bázispár lesz, a másik azonban a mutáns A-T bázispárt hordozza (11.16.(b) ábra).

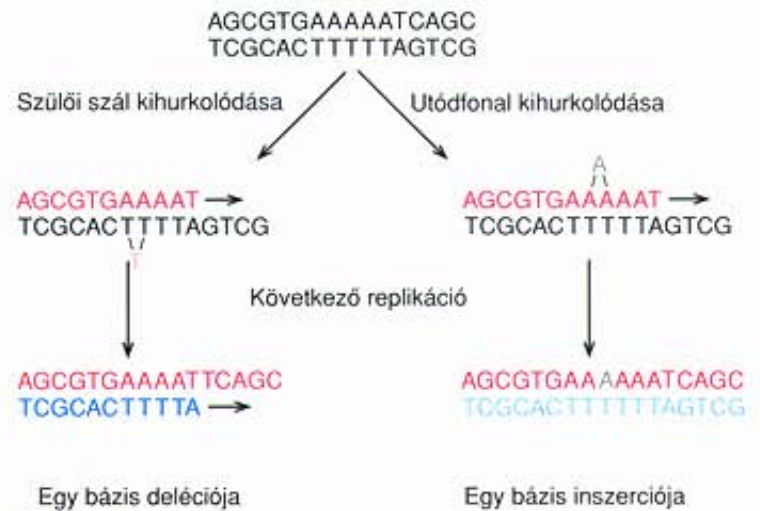
Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Ile Arg
ATGGCCCTGTGGATCCGCTTCATTAGG---

(a)

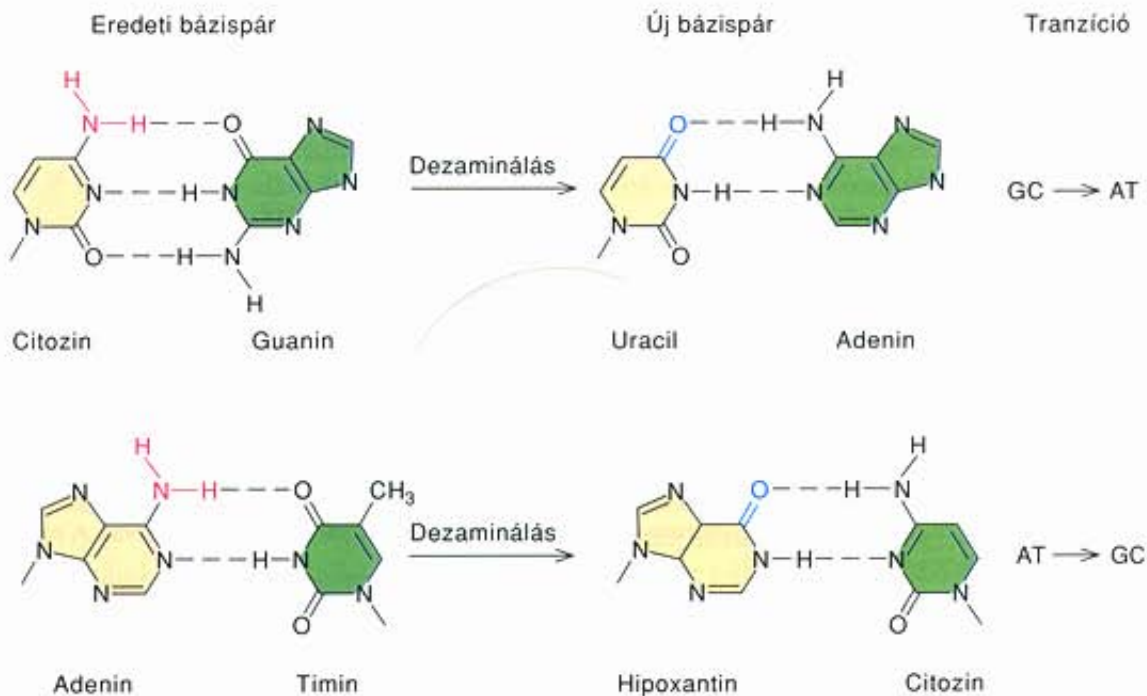
Met Ser Pro Val Asp Pro Leu His Stop — Új leolvasási keret
ATGAGCCCTGTGGATCCGCTTCATTAGG ---
Met Ala Leu Trp Ile Arg Phe Ile Arg — Eredeti leolvasási keret

(b)

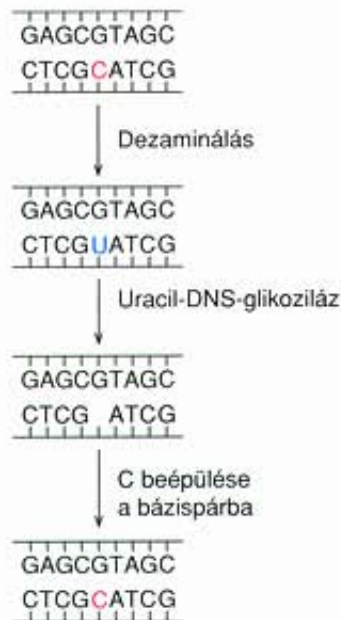
11.12. ábra. A frameshift mutáció. (a) Egy gén részletének normál leolvasási kerete. (b) Adenin ékelődik be a kódoló régió negyedik pozíciójába (szürke), és ezzel egy bázissal balra tolódik a leolvasási keret. Az új leolvasási keret által kódolt aminosav-sorrend a DNS bázissorrendje felett olvasható (piros), míg az eredeti aminosav-szekvencia a DNS-szál alatt (kék). Egy bázis deléciója egy bázissal jobbra tolná el a leolvasási keretet



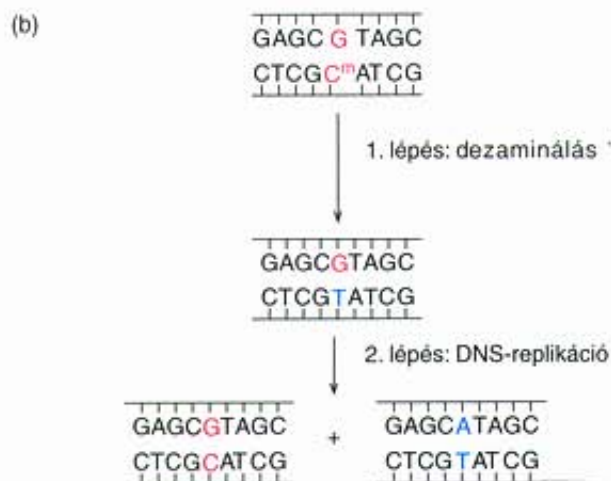
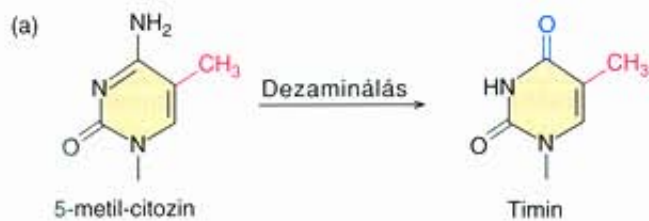
11.13. ábra. A frameshift mutációk feltételezett mechanizmusa. Egy szülői DNS-kettős hélix egymás után öt A-T bázispárt tartalmaz (felül). Replikáció közben ezen a szakaszon átmenetileg megtörténhet a szülői fonál kihurkolódása. Az ábra bal oldali részén a rózsaszínnel jelzett T hurkolódik ki. Emiatt csak a négy megmaradt T képez szabályos bázispárokat az adeninnel az újonnan szintetizálódó láncban (piros). A következő DNS-szintézisben a négy A már csak négy T beépüléséhez ad templátot (kék). Ennek következtében az újonnan szintetizált DNS-ben csak négy A-T bázispár lesz az eredeti öt helyett, tehát egy bázis deléciója történt. Az ábra jobb oldali részén az újonnan beépült egyik A (szürke) hurkolódik ki az utódfonálon (piros), és emiatt öt helyett hat A lesz a fonálban, ami a következő replikáció során hat A-T párt eredményez az utódfonalban (világoskék), tehát egy bázis beékelődött az eredeti szekvenciába



11.14. ábra. A citozin és az adenin dezaminálása. A dezaminálás után uracil, illetve hipoxantin keletkezik. Az uracil az adeninnel, a hipoxantin a citozinnal képez bázispárt, tehát mindkét esetben tranzíció következik be



11.15. ábra. A dezaminált citozin javítása. Dezaminálás következtében a C (piros) uracillá (kék) alakult (felül). Az uracil-DNS-glikoziláz felismeri az idegen uracilt a DNS-ben és eltávolítja (középen). Az alsó DNS-fonálon visszamarad egy bázis nélküli pentóz. A javítási folyamat következő lépésében a felső szál guaninjával C áll párba (alul)



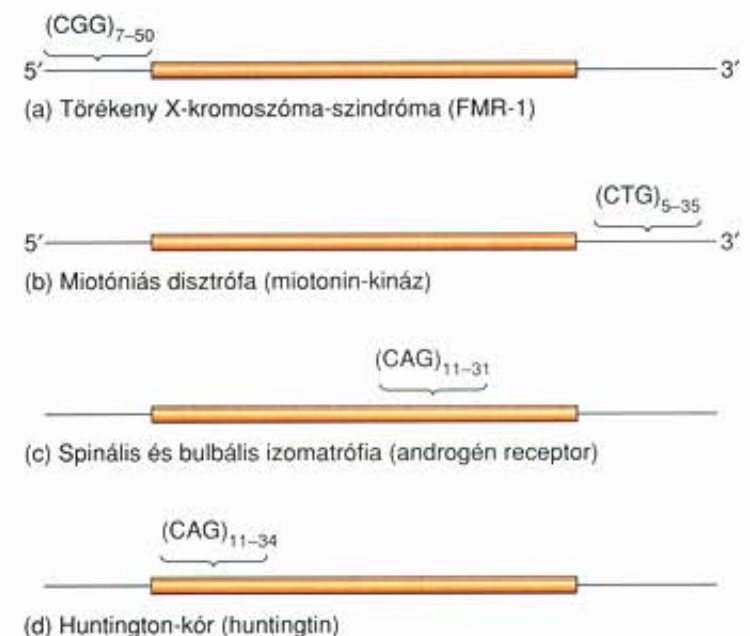
11.16. ábra. Az 5-metil-citozin dezaminálásával kialakuló mutáció. (a) A dezaminálás során az 5-metil-citozin timinné alakul. (b) A változás maradandóvá válik. Az 1. lépésben az 5-metil-citozin (piros) timinné (kék) alakul. Mivel a timin nem idegen bázis, a javító mechanizmus nem ismeri fel, és nem távolítja el. A 2. lépésben, a DNS replikációjakor képződik egy vad típusú (eredeti szekvenciájú) GC bázispár (piros) és egy mutáns, AT bázispár (kék)

A citozinok metilációs mintázata a baktériumokban és a magasabb rendű eukariótákban specifikus, vagyis meghatározott citozinmolekulák metiláltak, az összes többi nem. Emlősökben például bizonyos CG szekvenciák a metilálás célpontjai. A specifikusság következményei előre megjósolhatóak: a CG szekvenciák sokkal ritkábbá válnak, mint a többi lehetséges dinukleotid-szekvencia, feltehetőleg azért, mert a dezaminálás miatt a legtöbb CG az evolúció folyamán TG-vé alakul. A metilált citozinok a baktériumokban is mutációs forró pontok.

Ismétlődő tripletek

1991 óta ismerünk egy nagyon fontos, bár váratlan típusú mutációt. Több öröklődő emberi betegségről bebizonyosodott, hogy a betegséget okozó hibás allélban megnövekedett az ismétlődő tripletek mennyisége. Ilyen például a spinális és bulbális izomatófia, a törékeny X-kromoszóma-szindróma, a miotóniás disztrofia és a Huntington-kór. A kérdéses triplet a normál allélban is bizonyos számban ismétlődik, de a hibás allélokban ez az ismétlődés jóval nagyobb mértékű (11.17. ábra).

A törékeny X-szindróma X-kromoszómához kötött recesszíven öröklődő rendellenesség, amely jellegzetes testfelépítésbeli eltérésekkel és változó mértékű szellemi visszamaradottsággal jár. Ez az értelmi fogyatékoság egyik leggyakoribb formája, 1250 férfiból egyet érint. Az érintett gén az *FMR-1*, melynek normál alléja 6–54 ismétlődésben tartalmazza a CGG tripletet a translációra nem kerülő 5'-végen. A mutáns allélban a CGG triplet több százszor vagy akár több ezerszer ismétlődhet. A Huntington-kór fokozatosan ki-



11.17. ábra. Ismétlődő tripletek négy öröklődő emberi rendellenességgel kapcsolatos génben. Az ábrán az ismétlődő tripletek kódoló régiókhöz (piros) viszonyított helyzete és a normál genomban található triplet ismétlődések száma látható. A betegségben szenvedőknél az ismétlődések száma minden esetben magasabb (a–d). Elsőként a genetikai rendellenesség, majd zárójelben a gén által meghatározott fehérje nevét adtuk meg

fejlődő idegrendszeri károsodás, amely általában a középkorú betegeknel jelenik meg, de néha már gyermekkorban jelentkeznek. A legtöbb betegnél a mutáns génben a CAG triplet ismétlődése 42–86 között változott, míg a normál allélban az ismétlődések száma mindössze 11–34. Bár az ismétlődések száma nem olyan magas, mint a törékeny X-kromoszóma-szindrómában előforduló értékek, de a hatás nagyon súlyos. Ráadásul az ismétlődések száma korrelációt mutat az életkorral, amikor a betegség kialakul. Minél több az ismétlődő tripletek száma, annál fiatalabb korban jelenik meg a betegség.

Nem ismert, hogyan történik a tripletek sokszorozódása, de az ember genomjában gyakori. Ráadásul különösen nagy mértékben instabilak, vagyis az ismétlődések száma egy adott génben egyedi, személyenként nagy változatosságot mutat. Erre a jelenségre és gyakorlati vonatkozásaira a 16. fejezetben még visszatérünk. Az sem pontosan ismert, hogyan nő az ismétlődések száma, és ez miként vezet betegséghez. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy az ismétlődéseket tartalmazó részek a replikációs apparátus „csúszását” okozzák, emiatt túl sok vagy éppen túl kevés triplet épül be az újonnan készülő polinukleotid-láncba. Úgy tűnik, a folyamatnak küszöbértéke is van. Ha az ismétlődések száma túllépi a küszöbértéket, a régió instabilitása rohamosan fokozódik, és az ismétlődések száma gyorsan eléri a veszélyes szintet. Ez a jelenség vezet el az ún. **dinamikus mutáció** fogalmához.

Spontán mutációk többféle módon kialakulhatnak:

(1) A DNS replikációs mechanizmusa hibázik, és a hibák javítás nélkül maradnak; (2) A DNS templát szálában vagy az újonnan beépülő bázisában tautomer átalakulás történik, amely szabálytalan bázispárosodást eredményez; (3) Túl sok vagy túl kevés bázis épül be, amely frameshift mutációt idéz elő; (4) Bizonyos bázisok dezaminálódnak, és ezzel megváltozik bázispárosodási sajátságuk is; (5) Egy génben az ismétlődő tripletek száma növekedik, ami megváltoztathatja a gén által kódolt fehérjét is. A dinamikus mutációkat az (1) típus variációinak is tekinthetjük, mivel az ismétlődő tripletek számának növekedése kiválthatja a replikációs apparátus megcsúszását a DNS-szintézis során.

A spontán mutációs ráta mérése

Elég nehéz meghatározni, milyen gyakran következnek be spontán mutációk. Sok mutáció a szokásos módszerekkel kimutathatatlan, ezen a módon tehát nem is vehető számba. Ezekről az ún. csendes mutációkról később lesz szó. Az is probléma, hogy a mutációk ritkák, ezért sok egyedet kell megvizsgálni ahhoz, hogy a mutánsok száma szignifikáns legyen. Ha sikerült kimutatni megfelelő számú mutáns, meg kell határozni keletkezésük gyakoriságát, vagyis az időegységre eső mutációk számát. A genetikában azonban másként mérik az időt, mint a fizikában. A **mutációs ráta** az egy percre, napra vagy évre jutó mutációk száma helyett az egy generációra vagy egy sejtszétválásra eső mutációkat jelenti. A magasabb rendű eukariótákban, beleértve az embert is, a generációk egyedszáma helyett a vizsgált populáció gamétáinak számát

veszik számba. Mivel minden diploid zigóta két ivarsejt egyesülésével alakul ki, az ivarsejtek számát a populáció egyedszámának megkétszerezésével számítják. Például egy 50 000 emberből álló populációban a gaméták számát 100 000-nek veszik.

A 11.1. táblázatban különféle szervezetek mutációs rátái olvashatók. Még nem teljesen ismert, miért különbözik ilyen jelentősen az egyes szervezetek mutációs rátája. Az egyik tényező valószínűleg a leolvasás helyességet ellenőrző rendszer hatékonysága a DNS-szintézisben (7. fejezet). A másik tényező a mismatch reparáció eredményessége lehet, amelyről a fejezet következő részeiben lesz szó.

A spontán mutációs ráta – a mutációk száma gamétánként vagy generációnként – fajonként jelentősen eltérő. A spontán mutációs rátát az ember esetében úgy számítjuk, hogy mutáns a fenotípusú egyedek számát elosztjuk a populáció egyedszámának a kétszeresével.

A KÉMIAI MUTAGENEZIS

A korábbiakban tárgyaltuk, hogy a mutációk előfordulnak spontán is, de gyakoriságuk megnő környezeti tényezők, kémiai hatóanyagok és sugárzások hatására. Először a kémiai mutagéneket tárgyaljuk.

Egyes vegyi anyagok hatására a spontán mutációs ráta növekszik. A spontán mutációk mechanizmusai között szó esett a dezaminálásról, a frameshift mutációról és a tautomerizációról. A dezaminálás mértékét jelentősen növeli a salétromsav, a hidrogén-szulfidok, sőt még a hő is. A frameshift mutációk gyakoriságát növelik a síkalkatú molekulák, pl. az akridin festékek (11.18. ábra), amelyek **beékelődnek** a DNS bázispárjai közé. Ez a torzítás stabilizálhatja a kihurkolódást, amely szerepet játszik a frameshift mutációk kialakulásában (11.8. ábra).

Bázisanalógok hatására bekövetkező mutációk

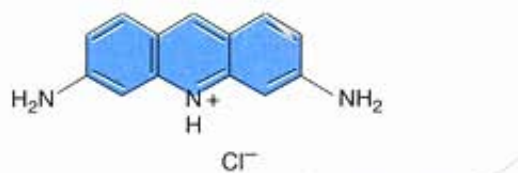
Egyes szintetikus anyagok fokozzák a tautomerizáció gyakoriságát, és ezzel mutációkat indukálnak. Az ilyen mutagének klasszikus példája az **5-bróm-uracil**, röviden **5Bu**, amelynek szerkezete megegyezik a timinével, csak az 5-ös pozíciójú metilcsoportot helyettesíti brómatom (11.19. ábra). Ha az 5Bu beépül egy timin helyére, mutációt okozhat. A mutáció oka az, hogy az 5Bu sokkal hajlamosabb az enolforma felvételére, ami pedig citozinként képez bázispárt, nem timinként.

Bázisok alkilezése következtében kialakuló mutációk

Környezetünkben néhány természetes, illetve szintetikus eredetű anyag **elektrofil** jellegű. A név jelentése: elektronokat (vagy negatív töltéseket) kedvelő. Az elektrofil anyagok más molekulák negatív töltéscentrumaihoz kötődnek. Sok, környezetünkben előforduló anyag az élő szervezet lebontó folyamataiban elektrofil vegyületté alakul. Nyilvánvaló, hogy a DNS nagyon sok ne-

11.1. táblázat. Különböző szervezetek spontán mutációs rátái

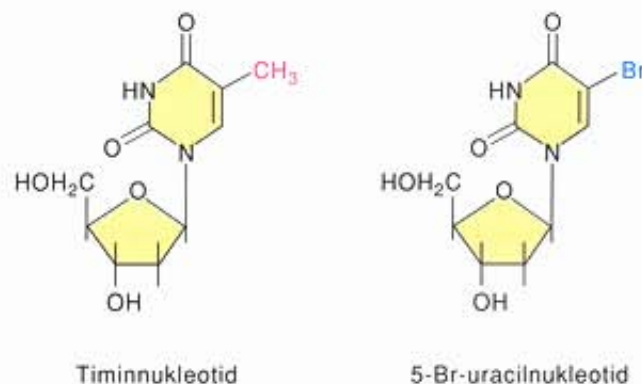
Szervezet	Tulajdonság	Ráta	Egység
Bakteriofág T2	Lízis gátlása, $r \rightarrow r^+$ Gazdaspecificitás, $h^+ \rightarrow h$	1×10^{-8} 3×10^{-9}	/Gén/replikáció
Baktériumok: <i>Escherichia coli</i>	Laktóz hasznosítása, $lac^- \rightarrow lac^+$ T1fág érzékenység, T1-s \rightarrow T1-r Hisztidinigény, $his^- \rightarrow his^+$ $his^+ \rightarrow his^-$	2×10^{-7} 2×10^{-8} 4×10^{-8} 2×10^{-6}	/Sejt/osztódás
Algák: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Streptomycinérzékenység, $str-s \rightarrow str-d$ $str-d \rightarrow str-s$	1×10^{-9} 1×10^{-8}	
Gombák: <i>Neurospora crassa</i>	Inozitoligén, $inos^- \rightarrow inos^+$ Adeninigény, $ade^- \rightarrow ade^+$	8×10^{-8} 4×10^{-8}	Mutáns aszexuális spórák gyakorisága
Kukorica: <i>Zea mays</i>	Zsugorodott szem, $Sh \rightarrow sh$ Bibor szem, $P \rightarrow p$	1×10^{-5} 1×10^{-6}	
Ecetmuslica: <i>Drosophila melanogaster</i>	Sárga test, $y^+ \rightarrow y$, hímekben $y^+ \rightarrow y$, nőstényekben Fehér szem, $w^+ \rightarrow w$ Barna szem, $bw^+ \rightarrow bw$	1×10^{-4} 1×10^{-5} 4×10^{-5} 3×10^{-5}	Mutáns gyakoriság/gaméta/generáció
Egér: <i>Mus musculus</i>	Foltos bunda, $S \rightarrow s$ Hamvas szőr, $D \rightarrow d$	3×10^{-5} 3×10^{-5}	
Ember: <i>Homo sapiens</i> Csontvelősejtek szövettenyésztésben	Normál \rightarrow hemofiliás Normál \rightarrow albinó Normál \rightarrow 8-azaguanin-rezisztens Normál \rightarrow 8-azaguanin-rezisztens	3×10^{-5} 3×10^{-5} 7×10^{-4} 1×10^{-6}	/sejt/osztódás



11.18. ábra. Egy akridin festék, a proflavin (hidroklorid) szerkezete

gatív töltést tartalmaz. Minden egyes nukleotidjában a foszfát egy teljes negatív töltést, a bázis pedig részleges negatív töltéseket tartalmaz. Amikor **elektrofil** anyagok támadják a negatív töltésű részeket, rendszerint **alkilálás** történik, mert a kémiai reakció során **alkilcsoportok** kapcsolódnak a negatív töltésekhez.

Az alkilálószerkezt kedvelt támadási pontja a foszfodiészter-kötések mellett a guanin N⁷ és az adenin N³ atomja (11.20. ábra). Mivel egyik hely sem vesz részt a bázispárok kialakításában, az alkilálás nem vezet közvetlenül hibás párosodásra. Az alkilcsoportok labilisabbá teszik a cukor és a bázis közötti kötések, tehát ezek könnyebben felszakadnak. Ha a kötés felszakad, visszamarad a purin bázis nélküli pentóz, vagyis egy apurin hely. A bázismentes hely nyilvánvalóan nem replikálódhat megfelelő módon, csak ha a javító mechanizmus helyreállítja. Ugyanakkor a sejt megkísérelheti replikálni a purinhiányos DNS-t, de gyakran rossz bázist



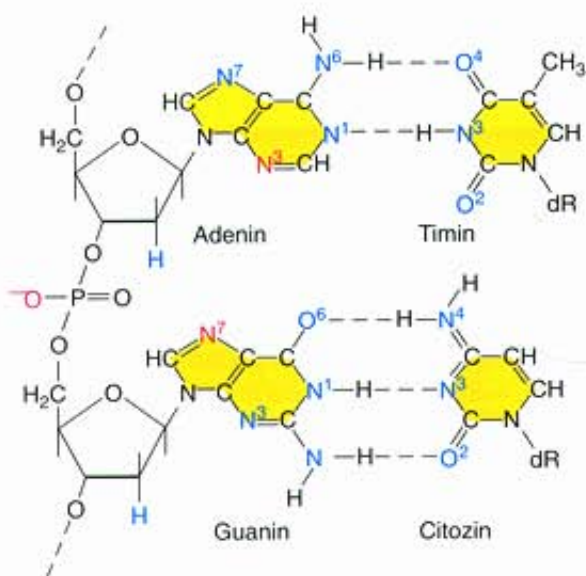
11.19. ábra. A timin és az 5-bróm-uracil szerkezete

épít be, ami mutációt okoz. Az alkilálás másik hatása, hogy fokozza a bázis hajlamát a ritka, tautomer forma kialakítására, ami ugyancsak mutációhoz vezet. A bázispárképzésben szereplő összes N- és O-atomon is történhet alkilálás, amely közvetlenül szétválasztja a bázispárokat, és sérülést okoz (11.21. ábra).

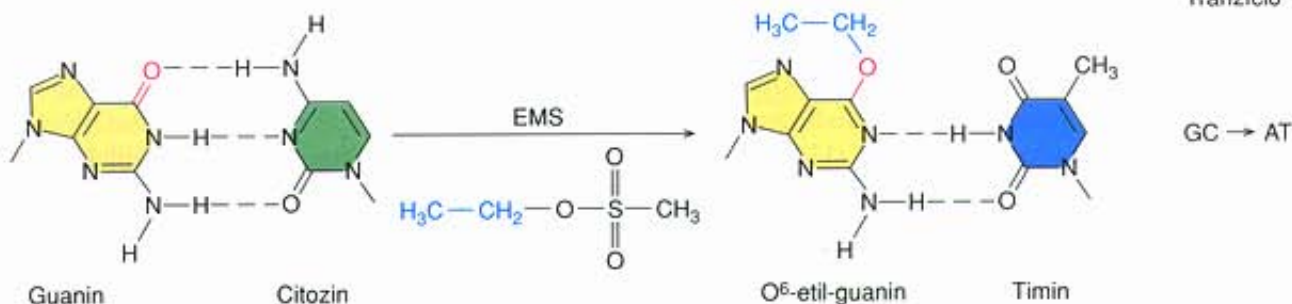
A 17. fejezetben tárgyaljuk, hogy sok, környezetünkben előforduló **karcinogén**, azaz rákkeltő anyag elektrofil, amely a DNS-t alkilálja. Sok mutagén anyag, amelyeket laboratóriumokban előszeretettel használnak mutációk kiváltására, szintén

alkilálószerke. Ilyen például az etil-metán-szulfonát (EMS), ami etilcsoportokat ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$) visz a DNS-re (11.21. ábra).

A különböző kémiai anyagok más-más károsodást okoznak a DNS-ben. A salétromosav és a hidrogén-szulfidok dezaminálják a bázisokat, különösen a citozint, ezzel hibás bázispárosodásokat váltanak ki. Az alkiláló ágensek, pl. az etil-metán-szulfonát, nagy alkilcsoportokat kapcsolnak a bázisokra, megbontják a bázispárok hidrogénkötéseit vagy báziskiesést okoznak. Mindegyik esemény következménye hibás DNS-replikáció vagy reparáció. A bázisanalógok, mint az 5Bu, beépülnek a DNS-be és rendellenes bázispárosodást okoznak. Egyes síkalkatú molekulák, pl. az akridin festékek, főleg bázisok beépüléséhez vagy bázisok kieséséhez vezetnek a DNS replikációjakor, ami megváltoztatja a gén leolvasási keretét.



11.20. ábra. A DNS negatív töltésű pontjai. Az elektrofil csoportok leggyakrabban a foszfátcsoport, a guanin N^7 nitrogénjét és az adenin N^7 nitrogénjét (piros) támadják meg. A többi reakcióképes helyet kézzel jelöltük



11.21. ábra. A guanin alkilálása EMS-sel. Balra a normál guanin-citozin bázispár látható. Figyeljük meg a szabad O^6 -ot (piros), amelyre az etil-metán-szulfonát (EMS) etilcsoportot kapcsol (kék). A reakcióban O^6 -etil-guanin alakul ki (jobb), ami nem citozinnal, hanem timinnel képez bázispárt

SUGÁRZÁSOK ÁLTAL INDUKÁLT MUTÁCIÓK

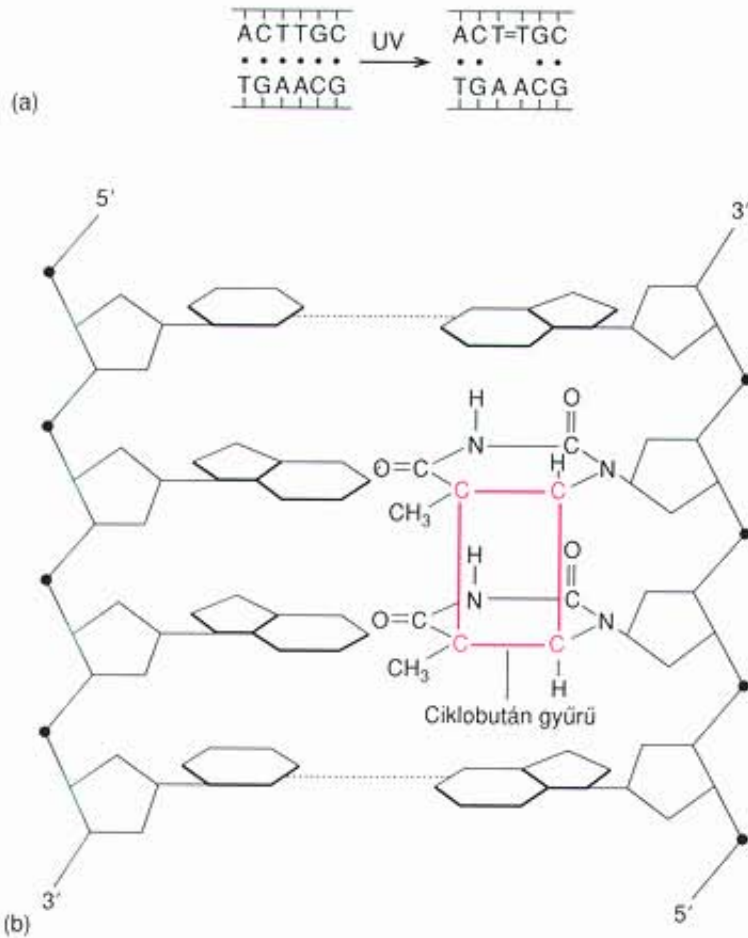
A természetes környezetben jelenlevő és laboratóriumi vizsgálatokban is alkalmazott ultraibolya, gamma- és röntgensugárzás gyakori típusai a mutagén sugárzásoknak. A felsorolt sugárzások energiataralmukat tekintve jelentősen különböznek egymástól, ezért eltérő károsodásokat okoznak a DNS-ben.

Az ultraibolya sugárzás

Az **ultraibolya sugárzás** energiája viszonylag alacsony, ezért mérsékelt károsodásokat okoz. Keresztkötéseket alakít ki az azonos számon lévő szomszédos pirimidin bázisok között, tehát dimereket képez, amelyek közül a leggyakoribbak a **timin dimerek**. A 11.22. ábra szemlélteti a timin dimerek szerkezetét és azt, hogyan szakítják meg a két DNS-fonál közötti bázispárosodást. A dimerizáció leállítja a replikációt, mert a replikációs rendszer nem képes a dimerrel szemben bázisokat beépíteni. Néha azonban a replikáció tovább lép és véletlenszerűen beilleszt bázisokat. Amennyiben ezek nem a megfelelő párok (rendszerint azok), mutáció történik.

A DNS-re leginkább káros ultraibolya sugárzás hullámhossza 260 nm körül van, ami nem meglepő, mert a DNS pontosan ezt a hullámhosszú sugárzást absorbeálja legnagyobb mértékben. A 260 nm-es sugárzásnak biológiai szempontból nagy a jelentősége. Mivel megtalálható a napfény spektrumában, ezért hatása az élet legtöbb formáját érintheti. Az ultraibolya sugárzás mutagén hatása megmagyarázza, miért okozhat a napsugárzás bőrrákot. A sugárzás károsítja a bőrben található sejtek DNS-ét, amely a sejtosztódás feletti kontroll elvesztéséhez vezethet.

Az ultraibolya sugárzás veszélyei ellen szerencsére van védőpajzsunk – az ózonréteg. Az ózonpajzs a Föld atmoszférájának felső rétegében található és absorbeálja a káros sugárzás zömét. Napjainkban azonban az ózonpajzs veszélyesen elvékonyodott, a legjelentősebb hiány az Antarktisz felett alakult ki. Az ózontartalom csökkenésének okai csak részben tisztázottak, de szerepe van benne a légkondicionálókban, a hűtőgépekben és a műanyaggyártásban alkalmazott anyagoknak is. Ha nem tudjuk megállítani az ózonpajzs pusztulását, többet fogunk szenvedni az UV-sugárzás hatásaitól, beleértve a bőrrákot is.



11.22. ábra. Timin dimerek. (a) Az UV-sugárzás kereszt-kötéseket alakít ki két szomszédos timin között a felső DNS-szálon. Emiatt torzul a DNS szerkezete, és a két timin nem képez bázispárt a másik szál adeninjeivel. (b) A timineket összekapcsoló kötések négytagú ciklobután gyűrűt képeznek (piros)

A gamma- és a röntgensugárzás

Az UV-sugárzáshoz képest sokkal nagyobb energiájú **gamma-sugárzás** és **röntgensugárzás** közvetlenül hat a DNS-molekulára, de a károsodás nagyobbbrészt ionizáció miatt jön létre, amely főleg a DNS-t körülvevő vízmolekulákat érinti. Az ionizáció következtében **szabad gyökök**, azaz párosítatlan elektronokat tartalmazó részecskék jönnek létre. A szabad gyökök – különösen azok, amelyek oxigént tartalmaznak – rendkívül reakcióképesek, és azonnal megtámadják a szomszédos molekulákat. Amikor egy ilyen szabad gyök a DNS-sel lép reakcióba, megváltoztathat egy bázist, de gyakran törést is okozhat az egyik vagy mindkét láncban. Az egyik lánc törése, általában nem jár súlyos következménnyel, mert könnyen helyreállítható. Ha azonban a törés mindkét láncot érinti, nagyon nehéz megfelelő-

en kijavítani, így ez a törés gyakran vezet kromoszómamutációhoz. Minthogy az ionizáló sugárzás kromoszómátörést okozhat, nemcsak mutagén, hanem **klasztogén** (törést kiváltó) hatású is.

A különféle sugárzások eltérő mutációkat okoznak.

Az ultraibolya sugárzás viszonylag kis energiájú és mérsékelt károsodással jár: timin dimereket hoz létre. A gamma- és a röntgensugárzás energiája sokkal nagyobb. Ezek ionizálják a DNS-t körülvevő molekulákat és reakcióképes szabad gyököket hoznak létre. A szabad gyökök reakcióba léphetnek a DNS-sel, módosítják bázisait vagy eltörik a láncot.

CSENDES MUTÁCIÓK

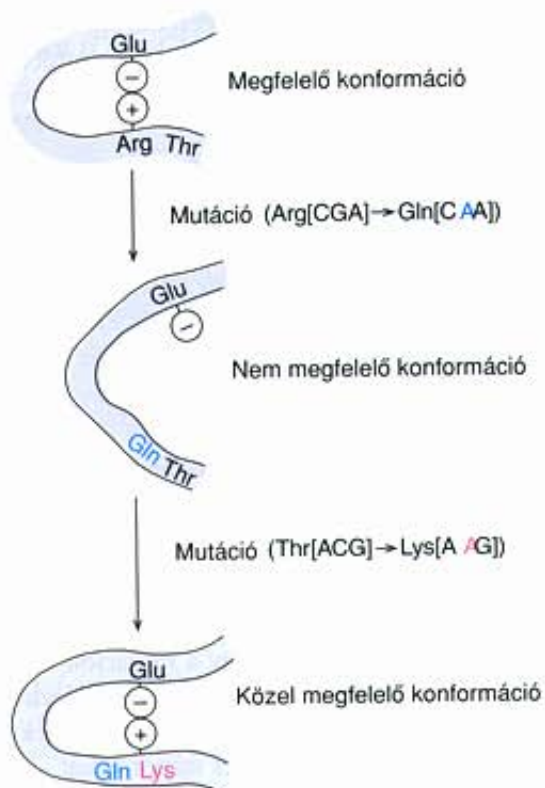
A legtöbb észrevehető mutáció veszélyes, mert hibás fehérje vagy RNS termeléséhez vezet. Mivel az élőlények nem tökéletesek, mindig javításra szorulnak, így a mutációk néha előnyösen módosítják a géneket. Olyan változást idézhetnek elő, amelynek hatására a gén által kódolt fehérjék hatékonyabbak, jobban segítik a szervezet túlélését és szaporodását.

Sok mutáció nem mutatható ki a szokásos genetikai módszerekkel. Ezek a **csendes mutációk**. Például az UCA kodon mutáció következtében UCG-ra változhat, vagyis báziskicserelődés történik. Ugyanakkor a képződő fehérje aminosavsorrendje nem módosul, mert mindkét triplet ugyanazt az aminosavat, a szerint kódolja, tehát a mutáció csendes. Csak akkor győződhetünk meg biztosan a mutáció bekövetkezéséről, ha meghatározzuk a mutáns gént változat báziszekvenciáját. A kodon harmadik bázisánál, a **lötyөгő pozícióban** fellépő mutációk nagyobb valószínűséggel csendesek, mert ritkábban változtatják meg a kodon jelentését. Ennélfogva ezek a mutációk sokkal gyakrabban fordulnak elő, mint a kodon első két pozíciójának mutációi. Csendes mutációk történhetnek az intronokban, ahol rendszerint nincs hatásuk a gén működésére, vagy a génen kívüli, intergénikus régiókban, amelyek általában ugyancsak nem befolyásolják a fenotípust. Egyes kódoló régióknál kívüli mutációknak azonban alapvető következményük is lehet. Ilyen például az intronban bekövetkező mutáció, amely megakadályozza a splicing folyamatát, vagy a promotor olyan változása, amely meggátolja az átírást. Értelemszerűen, ezeket semmiképp sem tekinthetjük csendes mutációknak.

Azokat a mutációkat, amelyeknek nincs mérhető fenotípusos hatásuk, azaz nem változtatják meg a gén által kódolt fehérje aminosavsorrendjét vagy a génműködést, csendes mutációknak nevezzük.

A REVERZÍÓ

A pontmutációknak, különösen a frameshift mutációknak, súlyos hatásuk lehet, de visszafordíthatók. A **reverzió**, az eredeti fenotípushoz való visszatérés, két módon lehetséges: a **valódi**



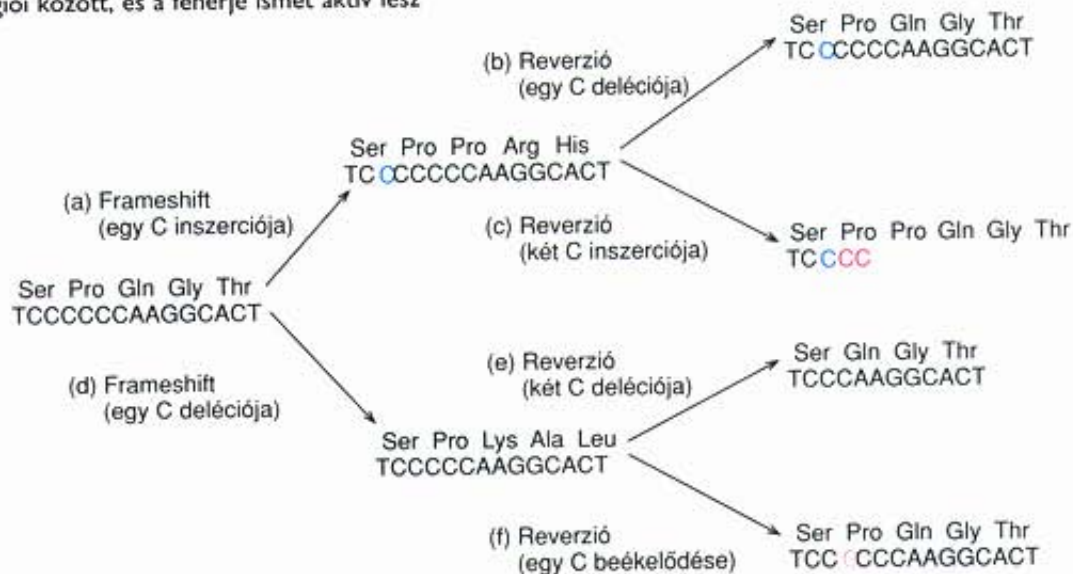
11.23. ábra. A második helyen bekövetkező reverzió. Az eredeti G → A mutáció (kék) miatt a pozitív töltésű arginint semleges glutamin váltja fel (kék). A pozitív töltés megszűnése miatt a molekula más részén lévő negatív töltésű glutaminsav nem létesíthet kötést, ezért a fehérje inaktívulódik. A C → A reverzió révén (piros) a szomszédos treonint pozitív töltésű lizin váltja fel (piros). Ez helyreállítja az aktivitáshoz szükséges kölcsönhatásokat a fehérje kérdéses régiói között, és a fehérje ismét aktív lesz

reverz mutáció vagy **backmutáció** a mutáns bázis visszaalakulása az eredeti állapotnak megfelelően. A másik lehetőség egy olyan változás a gén egy másik részében, amely kompenzálja az első mutációt. Vegyünk például egy olyan gént, amelynek fehérjéjében egy pozitív töltésű aminosav (arginin) kölcsönhatásba lép egy negatív töltésűvel (glutaminsav), ahogyan az a 11.23. ábrán látható! Ez a kölcsönhatás alakítja ki a fehérje megfelelő konformációját, amely nélkülözhetetlen a fehérje működéséhez.

Tegyük fel, hogy a vad típustól eltérést okozó, **előremutató mutáció** (forward mutáció) történik az arginin kodonjában, amely meggátolja a fehérje megfelelő konformációjának kialakulását, és a fehérje működésképtelen lesz! Bekövetkezhet egy újabb mutáció, amelynek hatására egy másik pozitív töltésű aminosav (pl. lizin) kerül az elveszett arginin helyének közvetlen közelébe. Amennyiben ez a lizin helyettesíteni tudja az arginint a fehérje térszerkezetének kialakításában, akkor helyreáll a működőképesség. Tehát az új lizin jelentésű kodont kialakító mutáció reverzió. De nem valódi reverzió, mert nem az eredeti bázissorrend állt helyre.

A példában szereplő reverzió **szuppresszor mutáció**, mert az egyik mutáció hatását egy másik mutáció elnyomja. **Intragénikus szuppresszió** esetén mindkét mutáció ugyanabban a génben történik, **intergénikus szuppresszió** esetén pedig a mutációt egy másik génben fellépő mutáció kompenzálja. Az intergénikus szuppresszió nem reverzió, mert két gén működésén alapul. Az intergénikus szuppresszió egyik jól ismert példája a nonszensz kodonok szuppressziója – pl. az amber kodonok – kivédése mutáns tRNS-sel (amber szuppresszorral), amely felismeri ezeket a kodonokat (10. fejezet).

A frameshift mutációk helyreállítása többféle reverzióval is lehetséges (11.24. ábra). A bázis delécióját kompenzálhatja egy bá-



11.24. ábra. A frameshift mutációk reverziója. A DNS néma szálában az eredeti bázisszekvencia (balra) hat citozinból álló füzért tartalmaz. (a) Egy újabb C (kék) beékelődése miatt eltolódik a leolvasási keret, a harmadik kodontól megváltozik a jelentése. (b) Az eltolódás könnyen helyreállhat az egyik C deléciójával, amely visszaállítja az eredeti leolvasási keretet. (c) A leolvasási keret visszaállhat két további C (piros) beékelődésével is. Ekkor a beékelődött bázisok száma összesen három lesz, azaz egy teljes új kodon (CCC) keletkezik. A végeredmény egy kissé megváltozott fehérje, egy számfeletti prolinnal. (d) A leolvasási keret eltolódását egy C deléciója okozza. Emiatt megváltozik a gén leolvasási kerete, és a harmadik kodontól a jelentése is. (e) A keret helyreállhat további két C deléciójával, de ilyenkor elvész egy kodon (CCC), és a fehérjéből hiányzik egy prolin. (f) A leolvasási keret helyreállhat egyszerűen egy C beékelődésével, ami pótolja az elveszett bázist

zis inszerciója, illetve egy bázis elvesztését egy szám felett beépült bázis. Az első deléció után két további bázis elvesztése megszünteti a kereteltolódást, vagy beépülhetnek további számfeletti bázisok, háromra emelve az összes beépült bázisok számát. A többszörös deléciók és inszerciók valószínűsége természetes körülmények között kicsi, ezért a frameshift mutációk reverziójához általában újabb frameshiftet előidéző mutagén anyagok szükségesek.

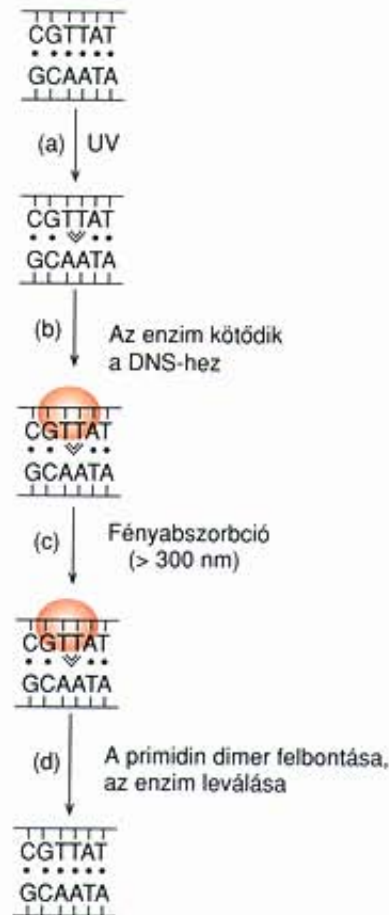
A reverzió olyan változás, amely helyreállítja az eredeti fenotípust. A folyamat lehet (1) valódi reverzió, ami az eredeti bázissorrendet állítja vissza; (2) szuppresszió vagy másik helyen történő reverzió, amikor a DNS-szál egy másik pontján bekövetkező újabb mutáció kompenzálja az előző hatását.

A DNS HIBÁINAK KIJAVÍTÁSA, A REPARÁCIÓ

A DNS károsodásának sokféle módját tárgyaltuk. Mivel a károsodások nagy része elég súlyos ahhoz, hogy az egyedek életképtelené tegye, a szervezetek különféle mechanizmusokat fejlesztettek ki a hibák kijavítására. A mutáció kivédésének egyik lehetősége a hiba kijavítása, az eredeti állapot visszaállítása, amelynek alapvetően két módja van: (1) a károsodás közvetlen javítása; (2) a sérült DNS-szakasz kivágása, és a keletkezett hiány pótlása új DNS-sel.

A DNS KÁROSODÁSAINAK KÖZVETLEN KIJAVÍTÁSA

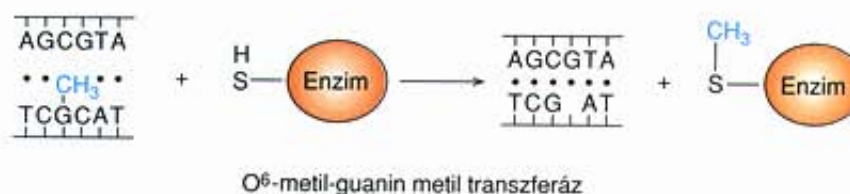
Az 1940-es évek végén Albert Kelner azt akarta vizsgálni, hogyan hat a hőmérséklet az UV okozta károsodások kijavítására *Streptomyces* baktériumokban. Észrevette, hogy azonos hőmérsékleten egyes baktériumspórákban sokkal gyorsabb a sérülések javítása, mint másokban. Ezzel nyilvánvalóvá vált, hogy a hőmérséklet mellett más hatások is közreműködnek a folyamatban. Kelner azt is megfigyelte, hogy azok a spórák javították ki leggyorsabban a károsodást, amelyeket a legtöbb napfény érte a laboratórium ablakán át. Amikor a kontrollkísérleteket sötétben tartott spórákkal is elvégezte, egyáltalán nem tapasztalt reparációt. Renato Dulbecco nemsokára ugyanezt a hatást figyelte meg UV-károsított faggal fertőzött baktériumokon. Úgy tűnik, hogy a legtöbb élőlény rendelkezik ezzel a fontos hibajavító mechanizmussal, a **fotoaktivációval** vagy más néven **fényreparációval**.



11.25. ábra. A fotoreaktiváció modellje. (a) UV-sugárzás hatására timin dimer keletkezik. (b) A fényreparáció enzime (piros) a DNS károsodott régiójához kötődik. (c) Az enzim abszorbeálja a látható fényt. (d) Az enzim felbontja a dimert és a kijavított a DNS-ről leválik

Az 1950-es évek végén fedezték fel, hogy a fotoreaktivációt egy enzim, a **fotoreaktiváló enzim** vagy **DNS-fotoliáz** katalizálja. Az enzim a 11.25. ábrán vázolt mechanizmus szerint működik. Először felismeri az UV által károsított helyeket (a pirimidin dimereket) a DNS-en, majd hozzájuk kötődik. Ezután abszorbeálja a látható fényt, amelynek hatására aktiválódik, és ezzel az energiával képes felszakítani a pirimidin dimert összetartó kötésekkel. A pirimidinek eredeti, független állapotának helyreállítása után az enzim leválik a DNS-ről.

Sok élő szervezet, az *E. coli*tól az emberig, rendelkezik egy olyan mechanizmussal, amely közvetlenül helyreállít egy másik mutációt, a guanin O⁶-jának alkilálását. A DNS metilálása vagy etilálása után egy enzim, az **O⁶-metil-guanin metil transferáz**



11.26. ábra. Az O⁶-metil-guanin metil transferáz működése. Az enzim szulfhidrilcsoportja veszi át a metilcsoportot (kék) a DNS guaninjáról, és ezzel inaktíválódik

javitja ki a hibát. A 11.26. ábrán bemutatott módon megköti a metil- vagy etilcsoportot. Az enzim alkil-akceptor helye az egyik cisztein kénatomja. Szorosan véve ez azt jelenti, hogy a metiltranszferáz nem tesz eleget az enzim definíciójában szereplő egyik kritériumnak, vagyis nem alakul vissza a reakció után eredeti állapotába.

Ezzel szemben az enzimfehérje irreverzibilisen inaktiválódik, ezért „öngyilkos enzimnek” is nevezik. Látható, hogy ez a javító mechanizmus energiaigényes, mivel mindegyik hiba kijavítása egy enzimmolekulába kerül. Az O⁶-metil-guanin transzferáznak van még egy említésre méltó tulajdonsága: az enzimet, legalábbis *E. coli*-ban, a DNS alkilezése indukálja. Ez azt jelenti, hogy azok a baktériumsejtek, amelyekre már hatott valamilyen alkilálószer, ellenállóbbak, mint azok, amelyek először vannak a mutagén hatásnak kitéve.

A DNS ultraibolya sugárzás okozta károsodását (a pirimidin dimerek keletkezését) a fotoreaktiváló enzim közvetlenül javítja. A fotoliáz enzim abszorbeálja a látható fény energiáját, és elbontja a két pirimidin bázist összetartó kötéseket. A guanin O⁶-atomjának alkilezését az O⁶-metil-guanin transzferáz, más néven öngyilkos enzim szünteti meg úgy, hogy saját aminosavához kapcsolja az alkilcsoportot.

EXCÍZIÓS REPARÁCIÓ

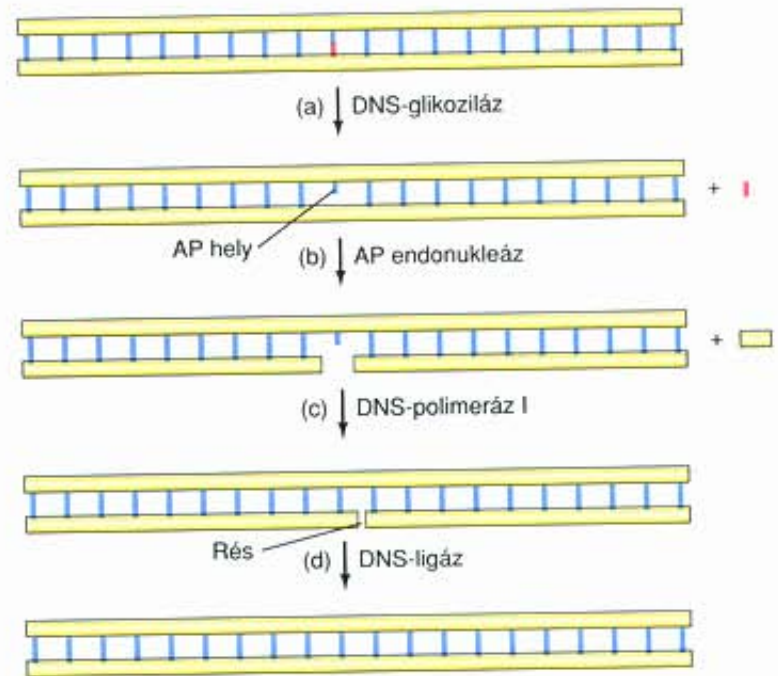
A mutációk kis része javítható ki közvetlen módon. A legtöbb mutációban nem pirimidin dimer vagy O⁶-alkil-guanin alakul ki, ezért a helyreállítás módjának is eltérőnek kell lennie. Legnagyobb részüket az **excíziós reparáció** távolítja el, melynek során enzimek kivágják a hibás szakaszt, majd a hiányzó molekularészletet pótolják. A folyamat kétféle mechanizmussal, *bázis excíziós reparációval*, illetve *nukleotid excíziós reparációval* történhet.

Bázis excíziós reparáció

Bizonyos mutációkat egy speciális enzim, a **DNS-glikoziláz** ismer fel, amely elbontja a **glikozidos kötést** a sérült bázis és a pentóz között (11.27. ábra). Ekkor visszamarad egy bázismentes **apurin** vagy **apirimidin hely (AP hely)**. Ha az AP hely kialakult, az **AP endonukleázok** felismerik és elhasítják a DNS foszfodiészter-kötéseit az AP hely mellett, és eltávolítják a hibás szakaszt. (Az „endo” előtag az enzim nevében azt jelzi, hogy a DNS-lánc hasítása nem a szabad végnél, hanem a molekula belsejében következik be.) A DNS-en keletkezett rést (nick) a DNS-polimeráz I enzim tölti ki a másik szálát használva templátként. Végül a cukor-foszfát gerincet a DNS-ligáz kapcsolja össze.

Nukleotid excíziós reparáció

A nagyobb báziskárosodások – köztük a timin dimerek – a DNS-glikoziláz közreműködése nélkül, közvetlenül is eltávolít-

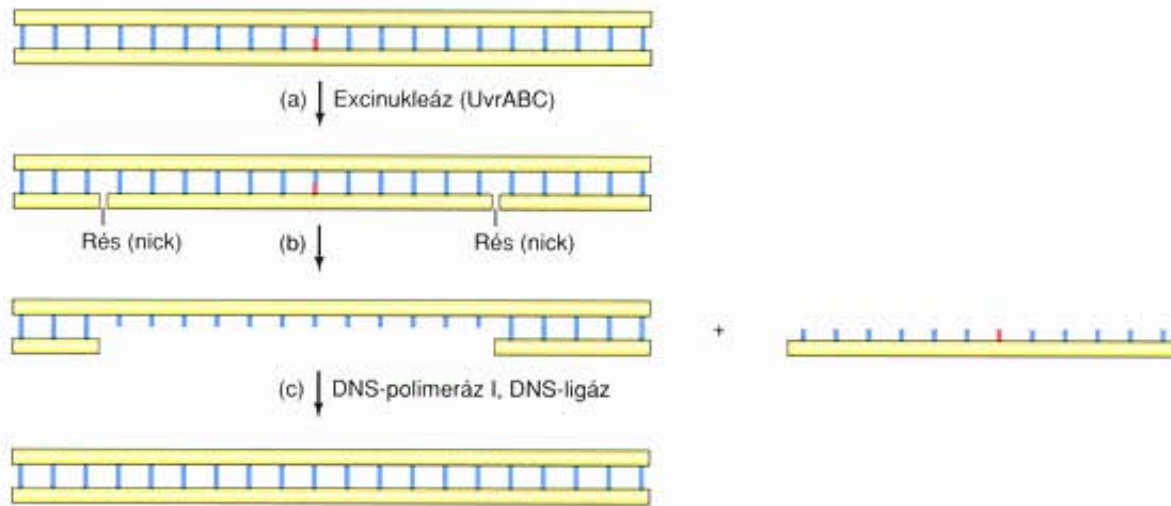


11.27. ábra. Bázis excíziós reparáció *E. coli*-ban.

(a) A DNS-glikoziláz eltávolítja hibás bázist (piros), és egy apurin vagy apirimidin helyet (AP) hagy hátra az alsó DNS-szálon. (b) AP-endonukleázok a DNS-t az AP hely mellett elvágják, és eltávolítják az AP pentóz-foszfátot (sárga). (c) A DNS-polimeráz I kitölti a rést a megfelelő nukleotiddal. (d) A DNS-ligáz összekapcsolja szomszédos nukleotidokat

hatók. Ekkor a javító enzimrendszer a károsodott bázisokkal együtt oligonukleotidot távolít el (11.28. ábra). *E. coli*-sejtekben a folyamat kulcsenzime az **uvrABC-endonukleáz**. Az enzim három polipeptidláncot tartalmaz, melyeket az *uvrA*, *uvrB* és *uvrC* gének határoznak meg. Az enzim működése során egy 12–13 bázist tartalmazó oligonukleotidot távolít el. Az oligonukleotid mérete attól függ, hogy a javítandó hiba egy nukleotidot (pl. alkiláció) vagy két nukleotidot (pl. pirimidin dimer) érint. A nukleotid excíziós reparációt végző enzimeket az excíziós nukleázok névből képezve **excinukleázoknak** nevezik. Az excinukleázok az eukarióta sejtekben sokkal összetettebb rendszert képeznek, mint az *E. coli* sejteiben, és nagyobb, 27–30 tagú oligonukleotidokat távolítanak el. A javítást a nukleotid excíziós reparációban is a DNS-polimeráz I és a DNS-ligáz fejezi be.

A legtöbb DNS-károsodást az excíziós reparáció állítja helyre, amely a sérült DNS-szakaszt eltávolítja és a megfelelő nukleotidokkal helyettesíti. A reparációnak két útja lehetséges: (1) A módosult bázist a DNS-glikoziláz kivágja és apurin vagy apirimidin helyet hagy hátra. Ezután a bázis-hiányos helyet az enzimek pótolják. (2) A károsodott DNS-szakaszból az endonukleázok oligonukleotidot távolítanak el. A visszamaradó hézagot a DNS-polimeráz I tölti ki, majd a DNS-ligáz újraképezi a foszfodiészter-kötéseket.



11.28. ábra. Nukleotid excíziós reparáció *E. coli*-ban. (a) Az UvrABC excinukleáz elvágja a szálat a módosult bázis (piros) mindkét oldalán és (b) eltávolít egy 12 nukleotidból álló oligonukleotidot. Timin dimer esetén az oligonukleotid 13 bázisból állna. (c) A DNS-polimeráz I kitölti a hiányzó nukleotidok helyét, a felső szálat használva templátként. Végül a ligáz összekapcsolja a nukleotidokat

A MISMATCH REPARÁCIÓ

Eddig a külső hatások által kiváltott DNS-károsodások javítását tárgyaltuk. De mi történik azzal a DNS-sel, amelybe hibás bázispár került a replikáció során, és azt a leolvasás helyességét ellenőrző rendszer nem javította ki (7. fejezet)? Első pillantásra az ilyen hiba javítása nehéznek tűnik, mert nem könnyű eldönteni, melyik lánc szintetizálódik újonnan és melyik a szülői DNS-lánc, amelyet érintetlenül kell hagyni. *E. coli*-nál ez azért nem probléma, mert az eredeti szálon azonosító jelek vannak, amelyek megkülönböztetik az utódszáltól. Az azonosító jelek metilált adeninek, amelyeket egy metiláló enzim alakít ki. Az enzim felismeri a GATC szekvenciát, és ráépít egy metilcsoportot az A-ra. Mivel ez a négybázisos szekvencia átlagosan minden 250 bázispárban előfordul, rendszerint található egy az újonnan képződő mismatch (téves bázispárosodás) közelében is.

Ezenfelül a GATC palindróm szekvencia, vagyis az ellenkező láncon szintén GATC a szekvencia az 5' → 3' irányban. Tehát a komplementer lánc is metilálódik a metilált GATC-val szemben, de csak kicsit később. A **mismatch reparáció** (11.29. ábra) kihasználja ezt a késést, és a szülői fonál metilációja használja jelként. Tehát békén hagyja a metilált szálat, de korrigálja a bázispárosodási hibát a nem metilált utódszálon. A rendszernek gyorsan működésbe kell lépnie, különben az új fonál is metilálódik, és már nem lehet elkülöníteni a régi és az új szálat. Még nem egészen tisztázott, hogyan folyik eukarióta sejtekben a mismatch reparáció, de a hibajavító enzimek génjei nem nagyon változtak az evolúció folyamán, ami hasonló mechanizmusra enged következtetni.

Az *E. coli* mismatch reparációs rendszere felismeri a szülői DNS-szálat a GATC szekvenciák metilált adeninei alapján, majd kicseréli a hibásan beépült bázist az újonnan szintetizálódó láncon.

A MUTÁCIÓ HATÁSÁNAK MEGSZÜNTETÉSE A DNS JAVÍTÁSA NÉLKÜL

A közvetlen javítás és az excíziós reparáció valódi javító mechanizmusok, mert teljes egészében eltávolítják a DNS-ben keletkező hibákat. A sejtek azonban rendelkeznek olyan mechanizmusokkal is, amelyek segítségével eredményesen küzdenek a mutációk hatásaival, de nem szüntetik meg a problémát, hanem egyszerűen megkerülik. Általában ezeket is javító mechanizmusoknak nevezik, bár valójában nem azok.

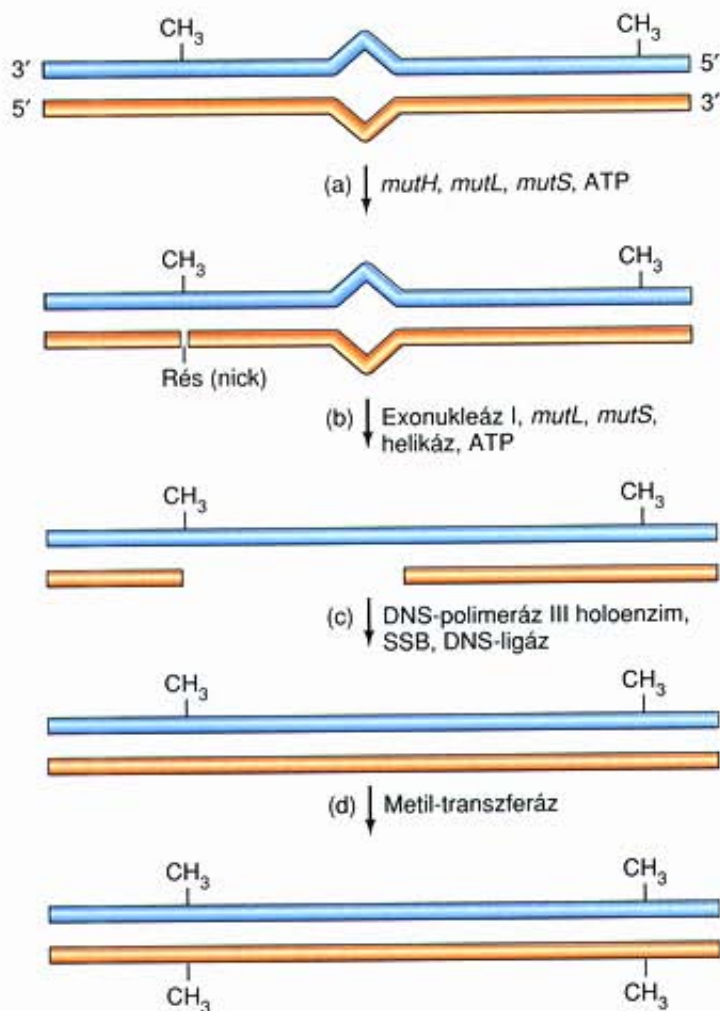
Rekombinációs hibajavítás

A fenti mechanizmusok közül a **rekombinációs hibajavítás** (reparáció) a legfontosabb. Mivel a DNS replikációja után játszódik le, helyenként **posztreplikációs reparációnak** is nevezik.

A 11.30. ábrán látható, hogyan működik a rekombinációs reparáció. A DNS replikációja során problémát okoz a pirimidin dimerek jelenléte, mert a dimerek leállítják a replikációs gépezetet. Ennek ellenére a replikáció egy kis szünet után folytatódik, de marad egy rés a dimerrel szemben. (A DNS-szintézis újratekésítéséhez valószínűleg egy új primer szükséges.) Ezután rekombináció történik a rést tartalmazó lánc és a másik DNS-hélixen lévő homológ szakasz között. Ez a rekombináció a *mecA* gén termékétől függ, amely kicseréli a homológ DNS-fonalakat (7. fejezet). A rekombináció hatására a pirimidin dimerekkel szemben keletkezett rés feltöltődik, ugyanakkor kialakul egy rés a másik DNS-hélixen. Ezen a DNS-hélixen azonban nincs dimer, ezért a rést könnyedén pótolhatja a DNS-polimeráz és a ligáz. Ne feledjük, hogy a DNS károsodása nem szünt meg, de a sejt legalább képes volt a DNS replikációjára! Előbb-utóbb a valódi javító mechanizmusokra is sor kerülhet.

A hibázásra hajlamos reparáció

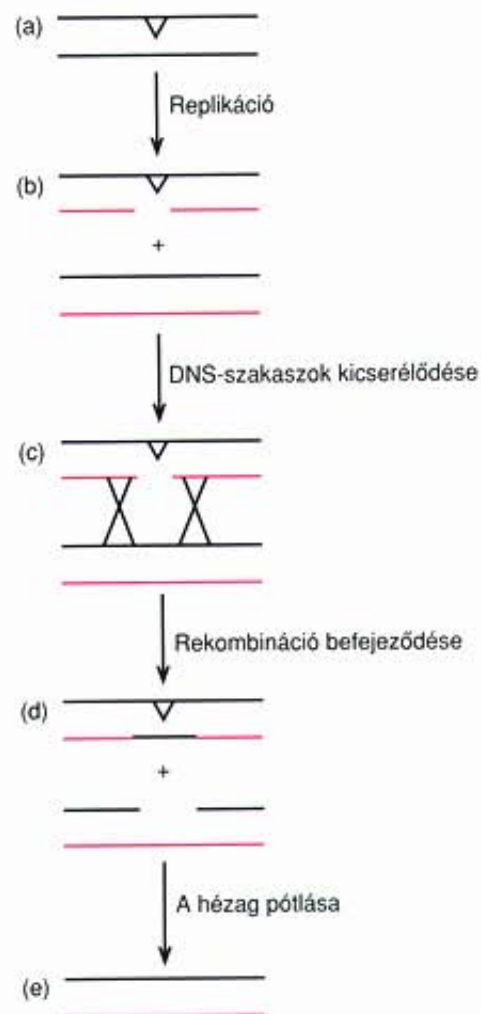
Az ún. **hibázásra hajlamos reparáció** (error-prone repair) egy másik módja a károsodás kezelésének a hiba kijavítása nélkül.



11.29. ábra. Mismatch reparáció *E. coli*-ban. (a) A *mutH*, *mutL* és *mutS* gének által kódolt fehérjék ATP jelenlétében azonosítják a hibás bázispárt (középen). Az újonnan szintetizált szálat arról ismerik fel, hogy hiányoznak róla a metilcsoportok a GATC szekvenciákban. Az enzimek elhasítják a DNS-t a hibás nukleotid fölött. (b) Az exonukleáz I a MutL, a MutS, a DNS-helikáz és ATP segítségével eltávolítja a kihalmozott DNS-szakaszt és vele együtt a hibás nukleotidot. (c) A DNS-polimeráz III holoenzim az SSB fehérje segítségével kiegészíti a keletkező rést, a ligáz pedig összekapcsolja a cukor-foszfát gerincet. (d) Az új szálaban a metiltranszferáz metilálja a GATC szekvenciák adeninjét az eredeti szál metilált GATC szekvenciáival szemben. A metilálást követően a javító mechanizmus már nem képes megállapítani, melyik volt az eredeti és melyik az új szál

A mechanizmust a DNS módosulása indukálja, beleértve az UV-sugárzás által okozott sérüléseket is, és szintén a *recA* gén terméktől függ. A *recA* génnel a 8. fejezetben az SOS válasszal kapcsolatos lambda-profág indukció elemzésekor, a 7. fejezetben pedig a rekombinációval kapcsolatban már foglalkoztunk. A hibázásra hajlamos reparáció az SOS válasz része is.

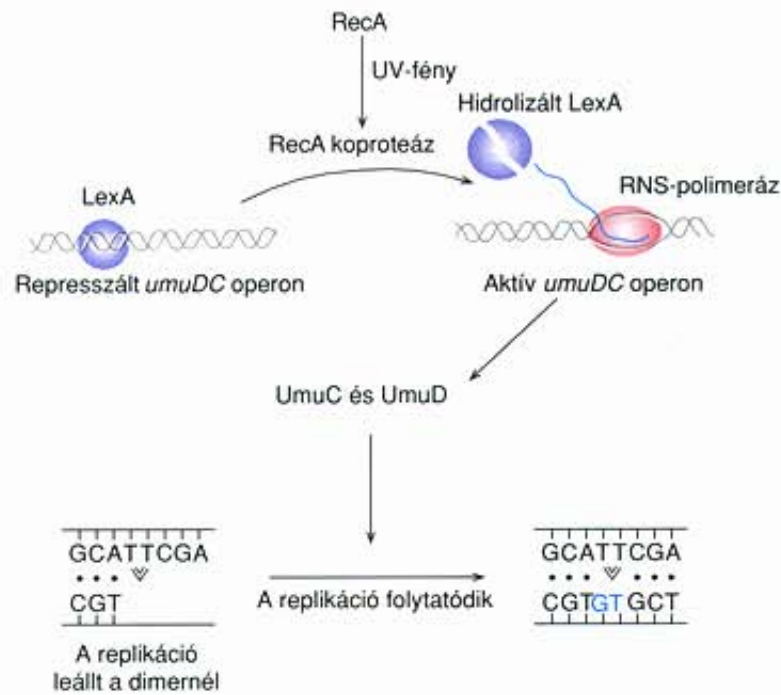
Az események sorrendje a következő (11.31. ábra): az UV-sugárzás vagy más mutagén hatás valamilyen módon aktiválja a RecA koproteáz funkcióját. A koproteáz egyik célpontja a lambda-represszor, a másik a *lexA* gén által kódolt **LexA fehérje**. A LexA sok génre, közöttük a hibajavítás géneire is ható rep-



11.30. ábra. Rekombinációs reparáció (a) A DNS pirimidin dimert tartalmaz, amelynek helyét V jelzi. (b) A replikáció során a replikációs apparátus átgorja a dimert, és egy rést hagy vele szemben az új szálaban. A komplementer szálon szabályosan folyik a replikáció. A két újonnan szintetizálódott szálat pirossal jelöltük. (c) A homológ szakaszok között rekombináció játszódik le. (d) A rekombináció betölti a dimerrel szemközti rést, a másik utód DNS-en azonban rés marad. (e) Ez a rés a normál komplementer szálat templátként használva könnyen kiegészíthető

resszor. Amint a RecA koproteáz aktiválva, a LexA autokatalitikusan hasad, és az összes általa szabályozott gén indukálódik.

Az újonnan indukálódó gének közül kettő, az *umuC* és az *umuD*, amelyek egy operont alkotnak (*umuDC*). A gének által kódolt fehérjék valamely ismeretlen módon segítik a hibázásra hajlamos reparáció működését. Ez biztosan így van, mert mind az *umuC*, mind az *umuD* mutációi megakadályozzák a rendszer működését, bár egyelőre még ismeretlen módon. Egy azonban biztos: a hibázásra hajlamos reparációhoz szükséges a DNS replikációja. Ha a DNS-polimeráz III egyik géne mutáns, nem történik hibázásra hajlamos reparáció. Ugy tűnik, hogy a hibázásra hajlamos reparáció akkor is elvégzi a pirimidin dimert tartalmazó DNS replikációját, ha a hibás szál pontos leolvasása lehetetlen. Így elkerüli ugyan a rendszer a rés keletkezését, de rendszerint hibás bázist épít be az új DNS-be (innen a



11.31. ábra. Hibázásra hajlamos (SOS) reparáció. Az UV-fény aktiválja a RecA koproteázt, amely serkenti a LexA fehérje (lila) autokatalitikus hidrolízisét. Az elhasított represszor leválik az *umuDC* operonról. A represszió megszűnése az UmuC és UmuD fehérjék termelődését eredményezi. A fehérjék képesek átsegíteni a DNS-szintézist a hibás, timin dimereket tartalmazó szakaszon, bár hibák (kék) keletkezése árán

reparáció neve). A következő DNS-szintézis során a hibák rögzülnek.

A sejtekben vannak olyan mechanizmusok, amelyek nem javítják ki a DNS-ben keletkező hibákat, hanem a mutáció által okozott problémát valamilyen módon megkerülik. Az egyik a rekombinációs hibajavítás, amelynek során a károsodott fonállal szemközti, rést tartalmazó DNS-szál a másik, normál, utód DNS-sel rekombinálódik. Ezzel megoldódik a rés okozta probléma, de az eredeti mutáció nem javítódik ki. A másik lehetőség az SOS válasz indukálása, amely még akkor is kikényszeríti a DNS replikációjának folytatódását, ha a károsodott régió nem olvasható le pontosan, és emiatt hibák kerülnek az utód DNS-be. Ez a folyamat a hibázásra hajlamos reparáció.

A REPARÁCIÓS RENDSZER HIBÁINAK SÚLYOS KÖVETKEZMÉNYEI

A vad típusú *E. coli*-sejt reparációs rendszere nagyon jól működik, ezért akár ötven pirimidin dimert is képes hatástalanítani az örökítő anyag károsodása nélkül. Azok a baktériumsejtek, amelyekből hiányzik valamelyik *uvr* gén, nem képesek excíziós reparációra, ezért érzékenyebbek ultraibolya sugárzásra, de képesek a DNS-hibák bizonyos mértékű javítására. Azok a mutánsok azonban, amelyekben mind az *uvr*, mind a *recA* gének hibásak, sem az excíziós, sem a rekombinációs reparációra nem képesek,

és különösen érzékenyek az UV-sugárzásra. Ezekben a sejtekben már egy-két pirimidin dimer letális dózissnak számít.

Hasonló helyzet embernél is kialakulhat. A veleszületett hibák a DNS-reparációban különféle betegségeket okoznak. Ezek közé tartozik a xeroderma pigmentosum, a Fanconi-féle vérszegénység és a Bloom-szindróma. Az utóbbi kettőre megnövekedett gyakoriságú kromoszóma-rendellenesség jellemző, főként rések és törések. A Bloom-szindróma esetében hiányzik a DNS-ligáz, amely a DNS töréseit javítja. Még nem tisztázott, hogy a ligáz enzim hiánya, miként vezet a sérült kromoszómák regenerációjának elmaradásához, de az egyértelmű, hogy a felsorolt betegségekből szenvedő emberek sokkal hajlamosabbak a rákra, mint a populáció átlaga.

A xeroderma pigmentosum genetikai háttere jobban ismert. A legtöbb betegnek, ha ki van téve a napfény közvetlen hatásának, több ezerszer nagyobb valószínűséggel lesz bőrrákja, mint a populáció egészséges egyedeinek (11.32. ábra). A közvetlen fény hatására a betegek bőrén elszórtan rákos foltok jelennek meg. A fényérzékenység arra enged következtetni, hogy a betegek sejtjeiben az excíziós reparáció tökéletlen, ezért kis határfokkal szünteti meg a pirimidin dimereket. Ráadásul a xeroderma pigmentosumban szenvedő emberekben az átlagnál nagyobb valószínűséggel alakulnak ki a belső szerveket érintő tumorok is, ami azt valószínűsíti, hogy hiba történik a kémiai mutagének által okozott DNS-károsodások javításában is. A gondolatmenet magában rejti azt a feltételezést is, hogy a ki nem javított genetikai károsodások rákhoz vezethetnek. Ezt a témát a 17. fejezetben részletezzük.

Milyen reparációs lépések sérülnek a xeroderma pigmentosum esetében? Nem könnyű a kérdésre válaszolni. A probléma felderítésére különböző betegekből származó sejteket fuzionáltattak



11.32. ábra. Elsötétített szobák lakói. A két kislány xeroderma pigmentosumban szenved. Kerülniük kell a napot és minden ultraibolya sugárzást kibocsátó fényforrást, mivel sejteikben rosszul működik az UV-sugárzás mutagén hatásait kijavító mechanizmus

People Weekly, © Kim Komenich

annak tisztázására, hogy a fuzionált sejtek defektesek maradnak-e, vagy sem. Gyakran nem, mert a különböző betegekből származó gének kiegyenlítik egymás hibáit (3. fejezet). A jelenség azt valószínűsíti, hogy az egyes betegekből különböző génhibák voltak. Eddig hét különböző komplementációs csoportot azonosítottak, ami arra mutat, hogy a hiba hét különböző génben (*XPA–XPG*) lehet. Úgy tűnik, leggyakrabban az excíziós reparáció első lépése, az incízió, azaz a hibás DNS-szakasz elhasítása a defektes. Az emberben a hét említett gén mellett még legalább három szükséges az excíziós reparációhoz. Ezeknek a hibája nem vezet xeroderma pigmentosumhoz, de okozhat más betegségeket, például egy idegrendszeri fejlődési rendellenességet, a Cockayne-szindrómát.

A xeroderma pigmentosum hátterében álló gének közül kettő, az *XPB* és az *XPD* az általános transzkripció faktor, a TFIIH két alegységét kódolja. Ez a faktor két módon segíti a transzkripciót: foszforilálja az RNS-polimeráz II egyik alegységét, ezzel lehetővé teszi, hogy elkezdődjék az átírás. Másodszer, a TFIIH egyben DNS-helikáz is, amely képes széttekerni a kettős hélix szálait, és ezzel is segíti az átírás megkezdését. Az a tény, hogy egy transzkripció faktorának köze van az excíziós reparációhoz, arra enged következtetni, hogy a transzkripció és a reparáció összefügg. Erre utal az is, hogy elsősorban az átírt szál javítódik ki. Jelenlegi ismereteink szerint úgy képzeljük, hogy az RNS-polimeráz leáll a hibás bázisnál, a segédfaktorok pedig összeszerelik a TFIIH-t és a ja-

vításhoz szükséges egyéb faktorokat. A TFIIH szerepe az, hogy helikáz aktivitása révén szétnyitja a kettős hélixet a módosult bázis környékén, ami lehetővé teszi a hibás részt tartalmazó oligonukleotid kihalását. Ha a DNS kettős hélix formában volna, nehézségekbe ütközne egy oligonukleotid kivágása.

A mismatch reparáció hibája is súlyos következményekkel járhat, beleértve a rákos elfajulásokat is. Az egyik **öröklődő vastagbélrák**, amelynek rövidítése **HNPCC**, elég gyakori öröklődő betegség. Az Amerikai Egyesült Államokban a vastagbélrákos megbetegedések 15%-a ebbe a csoportba tartozik, minden kétszázadik ember érintett. A betegek genomjának jellegzetessége a **mikroszatellit instabilitása**, ami azt jelenti, hogy az 1–4 bázispárnyi tandem ismétlődő szakaszok, köztük a korábbi fejezetrészben már tárgyalt ismétlődő tripletek száma nem állandó, hanem a beteg élete során változik. Az ilyen fajta instabilitás szokatlan. Az ismétlődések számában az egyes emberek között eltérés van, de egy személy egész életében és minden szövetében általában azonos. A mikroszatellit instabilitása és a mismatch reparáció között a következő kapcsolat áll fenn: a mismatch reparáció felelős a kihurkolódó bázisok felismeréséért, kijavításáért. A kihurkolódás annak következménye, hogy a replikációs rendszer megcsúszik, és az ismétlődő szekvenciákból túl sok vagy túl kevés kópia épül be a replikáció során. Ha a reparáció hibás, a megcsúszás következtében kialakuló hibák több génben kijavítatlanul maradnak, és mutációkat eredményeznek valahányszor a DNS replikálódik a sejtosztódás előtt. A genetikai instabilitás rákos elfajuláshoz vezethet, mert érinti az onkogéneket és a tumorszuppresszor géneket is (17. fejezet).

A genetikai károsodás javításának hiánya a szervezet számára életveszélyes. Azok az *E. coli*-sejtek, amelyekben mind az excíziós, mind a rekombinációs reparáció gátolt, csak kis hányadát viselik el annak az UV-sugárzásnak, amely a vad típusú baktériumra még hatástalan. Az excíziós reparáció hibája emberben többféle betegséget okoz, amelyek közül a xeroderma pigmentosum ismert a legjobban. Az UV-sugárzás következtében kialakult károsodás a bőr sejteiben megmarad, és rákos gócok kialakulásához vezet. A mismatch reparáció hiánya emberben mikroszatellit instabilitást, végső soron pedig rákot okozhat.

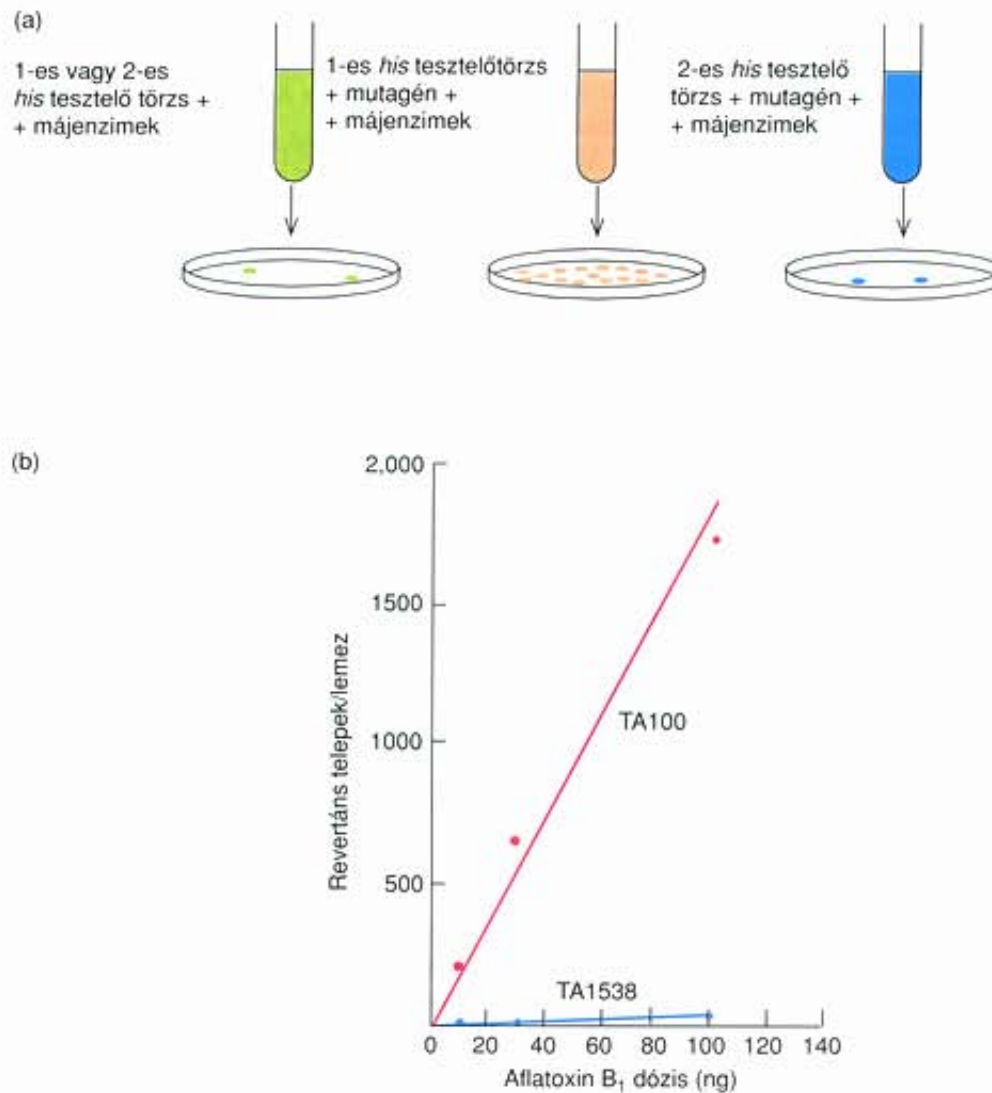
A MUTAGÉNEK KIMUTATÁSA

A fejezet korábbi részében tárgyaltuk, hogy sok vegyi anyag mutagén, és a legtöbb mutáció káros. A 17. fejezetben ismerkedünk meg azzal a széles körben elfogadott nézettel, hogy a rákos megbetegedések többségéért a környezetben lévő mutagének a felelősök. Fontos tehát, hogy a mutagén anyagokat azonosítani tudjuk, és korlátozzuk mennyiségüket. Mivel sok potenciális mutagén vár tesztelésre, és nagyon sok egyedre kell megvizsgálni ahhoz, hogy a mutációk száma elegendően nagy legyen, ezért a szokásos teszttálatok, pl. egerek alkalmazása rendkívül költséges és időigényes.

Szerencsére kiváló, baktériumokat felhasználó mutagén tesztszervezeteket fejlesztettek ki. A tesztszervezetként alkalmazott baktériumoknak rengeteg előnyük van: könnyen és olcsón tenyészthetők, és egy-két nap alatt temérdek sejtjük vizsgálható. A legismertebb bakteriális tesztszervezetet Bruce Ames fejlesztette ki, ezért **Ames-teszt** néven ismert. Ames először *Salmonella typhimurium* auxotróf hisztidin mutáns törzseivel dolgozott, amelyek a *his* operonban történt mutáció miatt nem képesek hisztidint előállítani, ezért hisztidin hiányában nem életképesek. A teszt alapelve a *his* operon reverziós gyakoriságának megállapítása (11.33. ábra), amely egyszerűen kivitelezhető. Olyan baktériumtelepeket kell keresni, amelyek hisztidinmentes táptalajon is nőnek. Mutagén hatás nélkül a reverzió nagyon ritka, tehát kevés

telep növekedhet. Egy erőteljes hatású mutagén azonban nagyon megnövelheti a mutációs rátát – beleértve a back mutációkat vagy reverziókat is – és több telep növekedése azonosítható.

Ez a koncepció néha zavart kelt, mert az a mutáció, amelyet ilyenkor keresünk, jótékony hatású, hiszen a vad típusra történő reverzió. Ugyanakkor ezt a mutációt sokkal könnyebb azonosítani egy előremutató mutációval. Gondoljuk végig, milyen könnyen megszámlálható a néhány növekedésre képes prototróf baktériumtelep a növekedésre képtelen auxotróf mutánsok óriási túlsúlya esetén is, hiszen rendszerint csak néhány telep nő ki a minimál táptalajon. Hasonlítsuk össze azzal, milyen reménytelennek tűnő vállalkozás a néhány növekedésre képtelen auxotróf mutáns megtalálása a sok-sok növekvő prototróf bak-



11.33. ábra. Az Ames-teszt. (a) A folyamat vázlata. Ebben a példában két *his* tesztelő törzset használunk. Az 1. törzsben egy misszensz mutáció van a *his* operonban, ezért azokat a mutagéneket tudja kimutatni, amelyek ennek reverzióját, illetve backmutációját hozzák létre. A 2. törzs sejtjeiben frameshift mutáció történt a *his* operonban, ezért azok reverziójára érzékeny. A törzseket olyan, májból kivont enzimekkel keverjük el, amelyek a vizsgált vegyületet mutagéné alakítják. A bal oldalon látható kontrollhoz nem adunk mutagént, csak a kezeletlen állat májából kivont enzimeket, így a kontroll csak a ritka spontán reverziókat mutatja ki. Középen a misszensz mutáns tesztelő törzsnél sok revertáns jelent meg a táptalajon, azt jelezve, hogy a vizsgált vegyület ilyen típusú mutációkat okozhat. Jobb oldalon a frameshift mutáns tesztelő törzsnél nincs szignifikáns eltérés a kontrolltól, így ez a vegyület valószínűleg nem okoz frameshift mutációkat. (b) Az aflatoxin B₁ mutagenitási tesztje. A TA100-as tesztelő törzs a fenti hipotetikus I törzshöz hasonlóan a misszensz mutációkat mutatja ki. Az adatokból tisztán látható, hogy az aflatoxin B₁ erős mutagén ebben a törzsben. A frameshift tesztelő TA1538-as törzs viszont az mutatja, hogy a frameshift mutációk reverziójának bekövetkezésére igen csekély a hatása.

térium között. Egységes, összefüggő baktériumpázsitot látnánk, sosem találnánk meg a néhány életképtelen auxotrófot.

Ames egy kissé módosította a baktériumokat, hogy a mutagének detektálásában jól működjenek. Először is számításba vette, hogy a legtöbb kémiai mutagén a szervezetbe kerülés után, az anyagcsere-folyamatok során alakul mutagénné. Az átalakítást a májsejtek enzimeit végzik annak a normál anyagcsereútnak a részeként, amellyel a mérgező anyagokat átalakítjuk és hatástalanítjuk. Mivel a baktériumoknak nincsenek ilyen enzimeik, Ames patkánymáj kivonatát adta a baktériumokhoz, hogy utánozza azt az anyagcsereutat, amelyet a potenciális mutagén bejárna a szervezetben. Ezenkívül olyan mutánsokat szelektált, amelyek át-eresztők az exogén anyagokra, és excíziós reparációjuk is sérült. Egy olyan plazmidot is bevitt a baktériumokba, amely rendelénes *umuDC* operont tartalmaz, és így olyan enzimeket termel, amelyek fokozzák a hibázásra hajlamos SOS reparációt. Ilyen módon a legtöbb DNS-károsodás mutációvá alakul.

Mennyire valós az ilyen mutagenitási tesztelés eredménye? Nem túlságosan érzékenyek-e ezek a törzsek a mutációra? Vajon a baktériumokban mutációt okozó vegyületek az emberben szintén mutagének-e? Igaz, hogy sokkal jobb védekező lehetőségekkel rendelkezünk a mutagének ellen, mint ezek a súlyosan legyengített baktériumok, de az Ames-teszt jó képet ad a különböző vegyületek viszonylagos mutagenitásáról. Mivel a baktériumoknak és az embernek ugyanaz az örökítő anyaga, a baktériumok génjeiben mutációt okozó hatóanyagok valószínűleg az emberi génekben is hasonló hatásúak. De a várakozásokkal ellentétben, az Ames-teszt rossz előrejelzője egy anyag karcinogenitásának, vagyis a baktériumokban mutációt okozó anyagok nem feltétlenül rákeltők az ember szervezetében.

Az Ames-teszt ún. tesztelő baktériumtörzseket használ a kémiai mutagének vizsgálatára. Ezek a *Salmonella*-törzsek hisztidin auxotrófok és rendkívüli mértékben érzékenyek a kémiai mutagénekre. Az Ames-teszt során a baktériumsejtekhez adják a feltételezett mutagént (és azokat a májból származó enzimeket, amelyek a vegyületet átalakítják és esetleg mutagént képeznek belőle), majd megfigyelik a hisztidin prototróf telepek megjelenését. A vegyület mutagenitásának mértéke a revertáns telepek számából becsülhető.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Az alábbi kétfonalas DNS-szekvencia egy bakteriális gén része:

5'CACTATGCTTGCGTGGACGCATTAAC3'
3'GTGATACGAACGCACCTGCGTAATTG5'

Az alsó az értelmes szál.

(a) Feltéve, hogy a transzkripció az első A-nél kezdődik (az RNS-en) és végigfut, mi a génfragmentumról átíródó mRNS szekvenciája?

(b) Milyen aminosavsorrendet kódol ez az mRNS?

Milyen hatása lenne a következő eseményeknek erre a DNS-re és az általa kódolt fehérjére, ha a mutációk javítatlanul maradnának, és végül *mindkét* DNS-szállra vonatkoznának?

(c) Az első T tautomerizációja az enolformára a néma szállban replikációkor.

(d) A második A tautomerizációja az iminofomára az értelmes szállban replikációkor.

(e) A néma szál harmadik C-jának dezaminálása a replikációt megelőzően.

(f) Az értelmes szál negyedik G-jában az O⁶ alkilezése a replikációt megelőzően.

(g) A néma szál harmadik C-jának deléciója.

MEGOLDÁS

(a) Mivel a felső szál a néma szál, ennek polaritása és értelme egyezik meg az mRNS-ével, ezért ez mutatja az mRNS nukleotidszekvenciáját. Az egyetlen különbség az, hogy a DNS néma szállban lévő timinek helyett az mRNS-ben uracilok vannak. Mivel a transzkripció az első adeninnel kezdődik, az első C elhagyásával az mRNS nukleotidszekvenciája a következő:

ACUAUGCUUGCGUGGACGCAUUAAC

(b) A 10. fejezetben található kódszótár felhasználásával, és ugyancsak a 10. fejezet második feladatának megoldási stratégiáját követve, megkeressük az első AUG kodont. A leolvasás az mRNS 4. bázisánál kezdődik. A leolvasási keret és a kódok:

fMet	Leu	Ala	Trp	Thr	His	Stop
AUG	CUU	GCG	UGG	ACG	CAU	UAA

Tehát a fehérje aminosavsorrendje: fMet-Leu-Ala-Trp-Thr-His.

(c) A néma szál második timinjének tautomerizációja enolformára azt eredményezi, hogy citozinhoz hasonlóan képez bázispárt, és itt egy T → C tranzíció történik. Az mRNS szekvenciája emiatt ACU helyett ACC lesz. Az mRNS kódoló funkcióját a mutáció nem befolyásolja, mert a gén kódoló régióján kívül következett be.

(d) A néma szál második adeninjének tautomerizációja iminofomára azt eredményezi, hogy a guaninhoz hasonlóan képez bázispárt és A → G tranzíció következik be. Ennek hatására a néma szállban T → C tranzíció lép fel. A változás az alábbiak szerint összegezhető:

CACTATG---	→	CACTACG---
GTGATAC---		GTGATGC---

A vastagon szedett betűk a megváltozott bázispárt mutatják. Az mRNS szekvenciája így ACUAUG-ról ACUACG-ra változik, ami az AUG kodont ACG-re változtatja. Ezzel a kodon elveszíti startjel funkcióját, és a riboszóma másik AUG kodont keres (a DNS-ben ATG). Mivel ilyen nincs, nem képződik polipeptidlánc.

(e) A néma szál harmadik citozinjának dezaminálása miatt U keletkezik. Javítás hiányában ennek hatására C → T tranzíció következik be. Az új mRNS szekvenciája és kódoló sajátsága a következő:

fMet Phe
ACU AUG UUU stb.,

ahol a vastagon szedett U jelzi a változást. A fehérje tehát fMet-Phe-Ala-Trp-Thr-His lesz, az eredeti Leu helyett Phe épül be.

(f) Az értelmes szál negyedik guaninja az O⁶ alkilálása következtében adeninként képez bázispárt, az eredmény C → T tranzíció a néma szálban. A változás összegezve:

5'CACTATGCTTGC--- CACTATGCTTGTG---
3'GTGATACGAACGC--- → GTGATACGAACAC---

Az új mRNS kódoló funkciója:

fMet Leu Val
ACU AUG CUU GUG stb.,

vagyis a polipeptidlánc aminosavsorrendje most fMet-Leu-Val-Trp-Thr-His, az eredeti Ala helyett valin épül be.

(g) A néma szál harmadik citozinjának deléciója miatt a szekvencia:

CACTATGTTGCGTGGACGCATTAAC
GTGATACAACGCACCTGCGTAATTG

ahol a vastagon szedett bázisok határolták a kiesett bázist. Az új mRNS és kódoló sajátsága:

fMet Leu Arg Gly Arg Ile Asn
ACU AUG UUG CGU GGA CGC AUU AAC

A fehérje így most fMet-Leu-Arg-Gly-Arg-Ile-Asn lesz, a leolvasási keret eltolódása miatt mélyreható változás következik be az aminosavsorrendben.

2. FELADAT

Izoláltuk egy vad típusú szervezet egyik fehérjét és az annak megfelelő hibás fehérjét egy mutánsból. Azt találtuk, hogy a vad típus és a mutáns kérdéses fehérje csak egy aminosavban tér el:

Vad típus: Arg Met Ser
Mutáns: Arg Ile Ser

Három különböző misszensz mutáció történhetett. A kódszótár segítségével írjuk fel a vad típusú gén és a három misszensz mutáns gén néma szálát! Csak azokat a tripleteket mutassa be, amelyeket a mutáció érint, és összegezze a választ egy táblázatban az alábbiak szerint:

Szervezet	Kodon	Tranzíció vagy transzverzió?
Vad típus		
1. mutáns		
2. mutáns		
3. mutáns		

MEGOLDÁS

A mutáns fehérjében bekövetkezett Met-Ile változást kell megmagyaráznunk. A kódszótár szerint a metioninnak csak egyetlen kodonja van, az AUG (a DNS-ben ATG tripletnak felel meg), úgyhogy ez található a vad típusú génben. Az izoleucinnek három kodonja van: AUU, AUC és AUA (a DNS-ben ATT, ATC és ATA). A mutáns génben tehát e három utóbbi valamelyike található. Ha ATA a triplet, akkor G → A tranzíciónak kellett bekövetkeznie,

az egyik purint (G) a másik (A) helyettesítette. Ha a triplet a másik kettő valamelyike, akkor transzverzió zajlott le, mert a purint (G) valamelyik pirimidin (C vagy T) helyettesítette. A táblázatot tehát a következőképpen tölthetjük ki:

Szervezet	Kodon	Tranzíció vagy transzverzió?
Vad típus	ATG	–
1. mutáns	ATA	tranzíció
2. mutáns	ATC	transzverzió
3. mutáns	ATT	transzverzió

3. FELADAT

Az alábbi szekvencia egy mRNS szakasza és az általa kódolt fehérje:

Ser Thr Ala
AGU ACG GCU

Egy pontmutáció megváltoztatta az aminosavsorrendet:

Arg Tyr Gly

Mi volt a pontmutáció? A probléma megoldásához a pontmutációt, mint egyetlen bázis változást, inszercióját vagy delécióját definiáljuk.

MEGOLDÁS

Mivel három egymás után következő kodon változott meg, a mutáció inkább a leolvasási keret eltolódása lehet, mint egy misszensz mutáció. Az eredeti aminosavsorrend Ser-Thr-Ala volt, a mutáció hatására Arg-Tyr-Gly lett. Mivel az első kodon megváltozott, és a frameshift mutáció azt a kodont érinti, amelyikben fellép, valamint az utána következő kodonokat (a 3'-vég felé), a mutáció az első kodonban történt.

Meg kell határozni a frameshift irányát a genetikai kód alapján. Mivel az argininnek hat kodonja van, kissé időigényes lenne mindegyiket megvizsgálni. Az első kodonban történt a mutáció, ami kissé összezavarja a képet. Könnyebb lefelé keresni, és azt megnézni, hogy a leolvasási keret eltolódása balra (–1), vagy jobbra (+1) egy bázissal, miként adná a tirozin és a glicin kodonjait. A tirozinnak csak két kodonja van (UAU és UAC). A –1 és +1 leolvasási kereten kell megkeresni az egyiket. Van egy UAC kodon a –1 leolvasási keretben a vad típusú mRNS harmadik bázisával kezdődően. Ahhoz, hogy –1 eltolódás legyen a leolvasási keretben, a génben egy bázis inszerciójának kellett történnie az első kodonban, az U előtt. Ezzel a harmadik kodon GGC lesz, ami pontosan a várt glicin kodon.

Hová épült be a plusz bázis az AGU kodonban, az A után vagy a G után? A kódszótár alapján csak egyféle inszerció alakíthatja a szerin AGU kodonját az arginin kodonjává: egy A vagy egy G épülhetett be a második és harmadik bázis közé, AGA vagy AGG kodont adva, amelyek az arginin kódjai. Tehát ennek kellett a DNS mutációjának lennie. A mutáns mRNS szekvenciája tehát: AGA UAC GGC U vagy AGG UAC GGC U.

4. FELADAT

Egy koppenhágai kórház szülészeti adatai szerint 94 075 újszülött közül tíz volt akondropláziás. Kettő olyan családban született, ahol előfordult már ez a rendellenesség, úgyhogy csak nyolc jelentett új mutációt. Mekkora az akondroplázia génjének mutációs rátája?

MEGOLDÁS

Mivel az új mutációk száma 8, a gaméták teljes száma pedig az egyedek számának kétszerese, a mutációs ráta $8/(2)(94\ 075) = 4,2 \times 10^{-5}$.

ÖSSZEFOGLALÁS

A mutáció a genetikai anyag öröklődő megváltozása. A mutációk csoportosításának egyik lehetősége, hogy milyen hatást gyakorolnak a mutáns szervezet fenotípusára. A csíravonal-mutációk az ivarsejteket érintik, így ezek a mutációk átadódnak az utódoknak. A szomatikus mutációk nem az ivarsejteket, hanem a testi sejtekben alakulnak ki, tehát nem öröklődnek. A morfológiai mutációk látható változást okoznak a mutáns szervezetben. Az anyagcserét érintő mutációk függővé teszik a mutáns egy bizonyos tápanyagtól, amelyet a vad típusú szervezet nem igényel. A letális mutációk a létfontosságú géneket érintik. Haploid szervezetekben a letális mutáció azonnal az egyed halálát okozza. A letális mutációk általában recesszívek, ezért a diploid szervezetek heterozigóta állapotban túlélhetnek. A kondicionális mutációk hatása a mutáns szervezetben csak bizonyos körülmények között, pl. magas hőmérsékleten nyilvánul meg. Kondicionális letális mutáció esetén a kondicionális mutáció az egyed pusztulását okozza, ha a körülmények nem permisszívek.

A mutációt sokféle hatás kiválthatja. A sugárzás vagy közvetlenül károsítja a DNS-t, vagy szabad gyököket hoz létre, és azok lépnek reakcióba az örökítő anyaggal. Az ultraibolya fény pirimidin dimerek kialakulását okozza, míg a nagyobb energiájú röntgen- és gamma-sugárzás általában törekeket hoz létre a DNS-ben. A vegyi anyagok sokféleképpen módosíthatják a DNS-t: bázisok dezaminálása, alkilálása, hibás bázis, több vagy kevesebb bázis beépülése a replikálódó DNS-be. A kémiai mutagének általában kisebb pontmutációkat okoznak, amelyek visszaalakulhatnak a vad típusúvá. Az egyik gyakori pontmutáció típus a misszensz mutáció, amelyben a DNS egy bázisának megváltozása az mRNS kodonjának módosulását okozza, és így más aminosav kerül a polipeptidláncba. Az emberi szervezetben bekövetkező misszensz mutáció klasszikus példája a sarlósejtes anémiát okozó mutáció.

Minden élő szervezet rendelkezik a genetikai károsodás visszafordításának eszközeivel. Néhány mutációt közvetlenül ki lehet javítani. A fotoreaktiválás enzime például elhasítja a pirimidin dimereket, az O^6 -metil-guanin metil transferáz enzim pedig eltávolítja a guaninról a metil- és etilcsoportokat. A legtöbb DNS-károsodást azonban az excíziós reparáció hozza helyre, amely a mutáns DNS-szakaszt kivágja és, a megfelelő bázissorrendű DNS-szakasszal helyettesíti. A sejtekben olyan mechanizmusok is működnek, amelyek segítségével képesek a sérült DNS replikációjára is. Ennek két példája a rekombinációs, illetve a hibázásra hajlamos (SOS) reparáció.

Az Ames-tesztel a vegyi anyagok mutagén hatása vizsgálható. A teszt azt mutatja ki, milyen mértékben képes egy vegyület reverzió kiváltására az auxotróf baktériumtörzsekben.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. Észrevesz egy piros rózsát, amelyiknek az egyik szirmán egy kis apró folt van. Milyen mutáció okozhatta, szomatikus vagy ivarsejtmutáció? Miért?
2. Két heterozigóta sárga egeret kereszteztek. Utódaik $\frac{1}{2}$ -a sárga, $\frac{1}{2}$ -a vad szőrszínű volt. A sárga szőrű egerek ismét heterozigótának bizonyultak, a homozigóta sárgák méhen belül elhaltak. Domináns vagy recesszív-e a sárga szőrszín? Domináns vagy recesszív-e a letalitás?
3. Egy új baktériumtörzsben a DNS-polimeráz III egyik génjét szeretné térképezni. Felhasználhat-e a térképezéshez olyan mutációkat, amelyek inaktíválják a vizsgált gént? Válaszát indokolja!
4. Milyen típusú mutációk segítségével végezhető el a 3. feladatban említett térképezés?
5. Könnyebben denaturálódik-e egy hőérzékeny mutáns DNS-e, mint a vad típusú?
6. Egy szíáni macska megsérült, és le kellett nyírni bundáját egy olyan testrészen, ahol a szőre majdnem fehér volt. Amikor a gyógyulás után újra kinőtt a szőre, sötét színű volt, de egy idő után ezt a sötét szőrt ismét világos váltotta fel. Adjon magyarázatot a jelenségre!
7. A timin tautomerizációja tranzícióhoz vagy transzverzióhoz vezet-e?
8. (a) Milyen DNS-károsodást okoz az ultraibolya sugárzás?
(b) Miért veszélyes ez a károsodás a sejtekre?
9. (a) Milyen DNS-károsodást okoz a röntgensugárzás?
(b) Miért veszélyes ez a károsodás a sejtekre nézve?
10. Egy hipotetikus mRNS az AUGCGCCUAAAGAGG szekvenciával az fMet-Arg-Leu-Lys-Arg oligopeptidet kódolja. Mi lesz az eredménye az első C deléciójának?
11. Mi lenne a legegyszerűbb második helyen bekövetkező reverzió a 10. feladatban szereplő mutációra?
12. Melyik két enzim működik a közvetlen reparációban? Milyen DNS-károsodást javítanak?
13. Mi a különbség az exonukleázok és az endonukleázok között?
14. Az *E. coli* excíziós reparációja során kétféle módon távolítható el a károsodott DNS-szakasz és foltozható be a keletkező hiány: (1) A DNS-szál eltávolítása és pótlása egy lépésben, a DNS-polimeráz I segítségével; (2) a DNS-szakasz eltávolítása után egy külön lépésben pótlódik a hiányzó szakasz. Milyen különbségeket tud felsorolni a két reparációs mechanizmus között?
15. Miért nem valódi reparáció a rekombinációs és a hibázásra hajlamos (SOS) reparáció?

16. Egy vad típusú és a megfelelő mutáns fehérje egy aminosavban tér el egymástól:

Vad típus:	Ala	Trp	Leu
Mutáns:	Ala	Cys	Leu

(a) Adja meg az mRNS és a DNS értelmes szálának tripletjeit mind a vad, mind a mutáns esetre!

(b) Milyen mutációról van szó: tranzíció, transzverzió, nonszensz, misszensz, frameshift (+1 vagy -1)?

17. Egy mRNS kis szakasza és a kódolt fehérje az alábbi:

Glu	His	Lys
GAG	CAU	AAG

Két különböző frameshift mutációval a fehérje az alábbira módosult: (a) Asp-Ala-Stop, illetve Glu-Ile-Ser. Milyen mutációk történtek?

18. Rajzolja fel a bázispárt, amely a citozin iminoformája és az adenin között alakul ki (11.11. ábra)!
19. Rajzolja fel a bázispárt, amely a guanin enolformája és a timin között alakul ki (11.11. ábra)!

20. Az alábbi egy bakteriális gén szakasza:

5'GTATCGTATGCATGCATCGTGAC3'
3'CATAGCATAACGTACGTAGCACTG5'

Az alsó az értelmes szál.

- (a) Mi lenne a szakaszból átíródó mRNS szekvenciája, ha a transzkripció az első adeninnél kezdődik?
(b) Milyen aminosavsorrendű peptidet kódol ez az mRNS?

Mi lenne az alábbi változások következménye a DNS-re, az mRNS-re és a kódolt polipeptidre, ha a következő sérülések javítás nélkül maradnak, és mindkét DNS-szálat érintik:

- (c) Az értelmes szál harmadik citozinjának dezaminálása.
(d) Az értelmes szál második adeninjének tautomerizációja az iminoformára.
(e) A néma szál utolsó előtti timinjének tautomerizációja az enolformára.
(f) Az értelmes szál utolsó előtti citozinjának dezaminálása.
(g) A néma szál harmadik adeninjének kiesése.

A megoldások a könyv végén találhatóak.

12.

FEJEZET

Mozgó genetikai elemek

Tanulási program

- 1 A mozgó genetikai elemek a genom egyik helyéről a másikkra vándorolnak.
- 2 A mozgó genetikai elemek elősegítik a mutációk kialakulását.
- 3 Az áthelyeződő elemek ki-bekapcsolhatják a géneket.
- 4 A retrovírusokkal megegyező módon replikálódó eukarióta transzpozabilis elemek jellegzetességei.

*Minden mozog, semmi sem
marad egy helyben.*

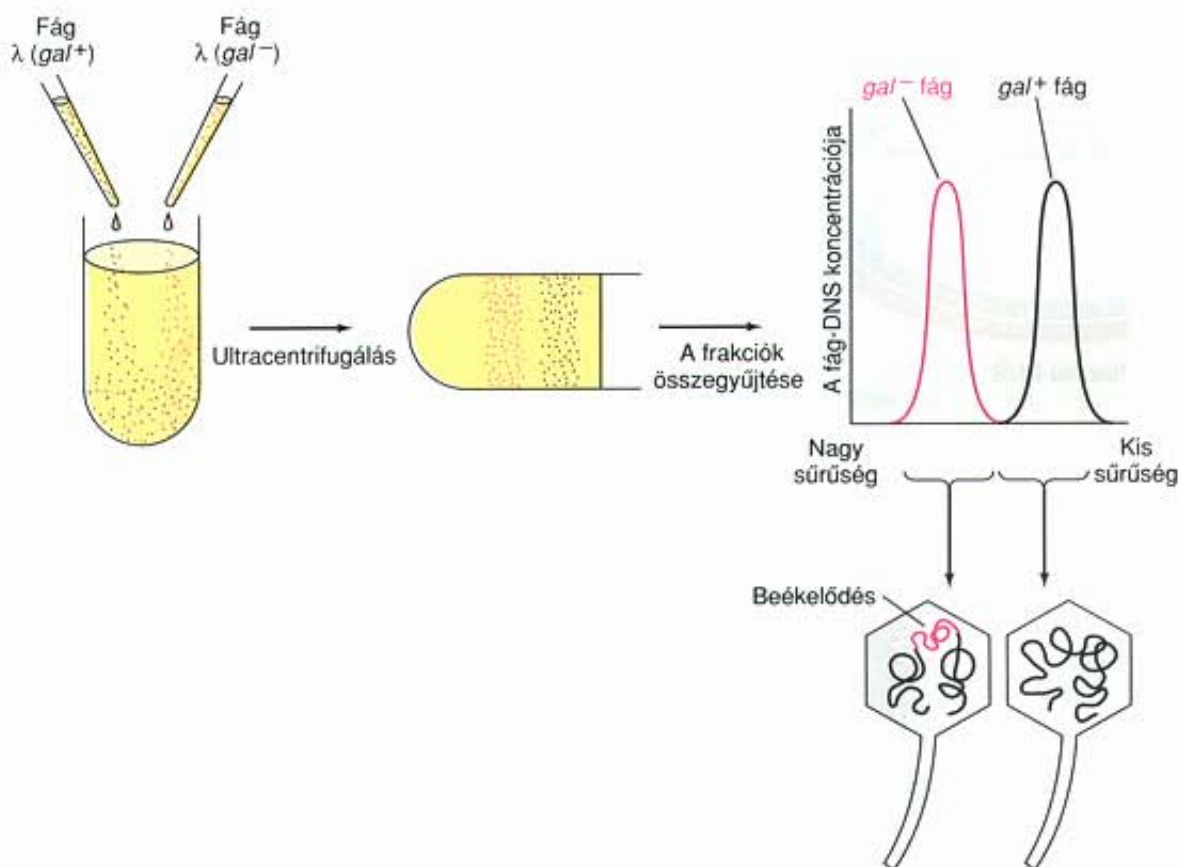
Hérakleitosz
görög filozófus

Már tudjuk, hogy egy szervezet genomja az élet során nem állandó. Véletlenszerű mutációk léphetnek fel benne, vírusok génei épülhetnek bele, sőt az örökítő anyag maga is átrendeződhet. Ez utóbbi lehet előnyös, mint például az immunoglobulin gének szegmentumainak átrendeződése egy működő gén kialakításakor, vagy a *Trypanosoma* felszíni fehérjét kódoló génjének áthelyeződése az expressziós helyre (14. fejezet). De mind a prokariótákban, mind pedig az eukariótákban mozoghatnak a genomban olyan DNS-darabok, amelyek fő funkciója saját replikációjuk. Ezek a **mozgó**, más szóval **transzpozábilis elemek** vagy **transzpozonok** mozgékonyak abban az értelemben, hogy saját kópiáikat beépíthetik a genom minden részébe. Kiválthatják a gazdasejt DNS-ének átrendeződését, fokozhatják a kromozómamutációkat (4. fejezet). A bakteriális és az eukarióta transzpozonok jellegzetességeit egymást követően tárgyaljuk, bemutatjuk, miként okozhatnak mutációkat, beleértve a kromozómamutációkat is.

BAKTERIÁLIS TRANSZPOZONOK

A bakteriális transzpozonokra, mint a normálistól eltérő mutációkra, először az 1960-as évek végén James Shapiro és mások figyel-

tek fel. Ezek a mutációk nem alakultak vissza olyan könnyen, mint a pontmutációk, és a mutáns gének hosszú, extra DNS-szakaszokat tartalmaztak. Shapiro ezt annak a ténynek a felhasználásával mutatta ki, hogy a lambda-fág az *E. coli*-sejtek litikus fertőzése során néha magával visz egy kis darab gazda-DNS-t, amelyet beépít saját genomjába. Shapiro lehetővé tette, hogy a lambda-fágok felvegyék az *E. coli* vad típusú galaktózt hasznosító génjét (*gal⁺*) vagy annak mutánsát (*gal⁻*), majd megmérte azoknak a **rekombináns DNS-eknek** a méretét, amelyek a lambda-fág és a gazda DNS-darabjait tartalmazták (12.1. ábra). A DNS-ek méretét úgy határozta meg, hogy a kétféle típusú fágot cézium-klorid gradiensben centrifugálta (7. fejezet). Mivel a fág burka fehérjéből áll és térfogata állandó, emellett a DNS sokkal sűrűbb a fehérjénél, ezért minél több DNS-t tartalmaz a fág, annál nagyobb lesz a sűrűsége. Kiderült, hogy a *gal⁻* gént hordozó fágok sűrűsége nagyobb a vad típusú gént tartalmazókéknál, tehát több DNS van bennük. A legegyszerűbb magyarázat az, hogy az idegen DNS beépült a *gal* génbe, és megváltoztatta azt. A későbbi kísérletek igazolták, hogy a mutáns *gal* génbe egy olyan 800–1400 bp hosszú szakasz integrálódott, amely nem volt meg a vad típusúban. Azokban a ritka esetekben, amikor ezek a mutánsok visszaalakultak, elveszítették extra DNS-üket. Ezek az **inszerciós szekvenciáknak (IS)** nevezett DNS-darabok, amelyek beépülnek egy génbe és inaktíválják azt, voltak az elsőként felfedezett bakteriális transzpozonok.



12.1. ábra. Mutáció inszercióval. *E. coli*-ből származó vad típusú (*gal⁺*) vagy mutáns (*gal⁻*) gént hordozó lambda-fágokat CsCl sűrűséggradiens ultracentrifugálással vizsgáltak. A fágok két sávja egyértelműen elkülönült egymástól, és a nagyobb sűrűségű sáv (piros) tartalmazta a mutáns fágokat. Mivel a nagyobb sűrűségű fágban több DNS van, az eredmény arra utal, hogy a *gal* gén mutációját egy extra DNS-szakasz inszerciója okozta

Forrás: Cohen, Stanley N. és Shapiro, James A.: *Transposable Genetic Elements*. 1980. © Scientific American, Inc.

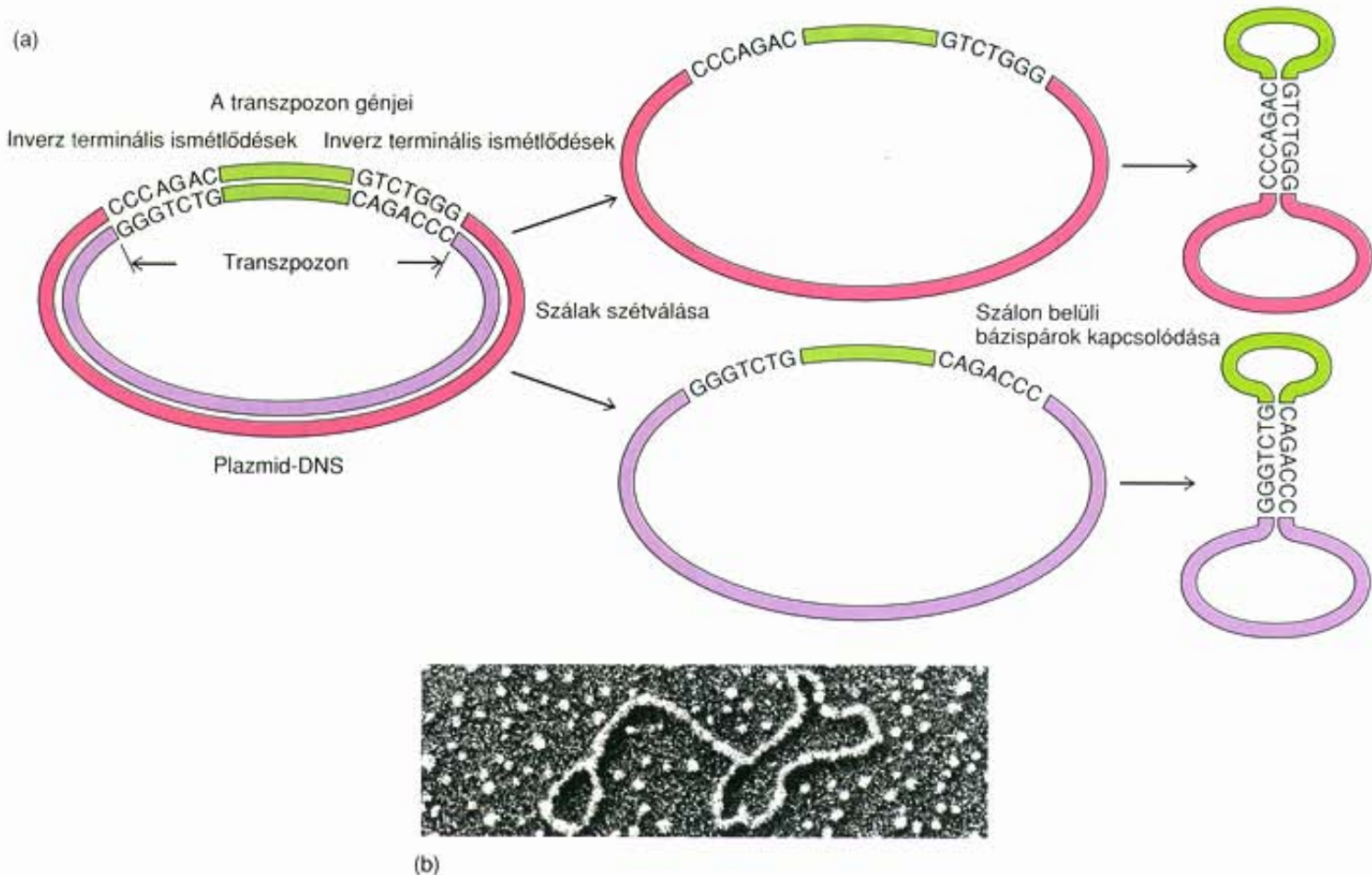
INSZERCÍÓS SZEKVENCIAK: A LEGEGYSZERŰBB TRANSZPOZONOK

A bakteriális inszerciós szekvenciák csak azokat az elemeket tartalmazzák, amelyek az áthelyeződéshez szükségesek. Ezek közé tartoznak a transzpozonok végeinél található olyan speciális szekvenciák, amelyek fordított helyzetű (inverz) ismétlődései egymásnak. A másik elem az áthelyeződést, transzpozíciót katalizáló enzimeket kódoló génekből áll.

Mivel egy inszerciós szekvencia végei fordított helyzetű ismétlődő szekvenciák, ha az egyik végen 5'-ACCGTAG található, akkor ugyanezen szál másik végén a fordított komplementer CTACGGT-3' lesz. Ez hasonló a 8. fejezetben már ismertett fordított helyzetű ismétlődő szekvenciákhoz, de ezekben a két inverz ismétlődést az inszerciós szekvencia testét alkotó bázispárok szálai választják el egymástól. A fent említett hét nukleotidos szekvencia hipotetikus, csak példaként szolgál. A tipikus inszerciós szekvenciák fordított helyzetű ismétlődései ennél valamivel hosszabbak, általában 15-25 bázispárból állnak. Az IS1-ben például 23 bázispár hosszúságúak. A nagyobb transzpozonokban több száz bázispárnyi fordított helyzetű ismétlődés is lehet.

A transzpozon végén lévő fordított helyzetű ismétlődő szekvenciákat Stanley Cohen grafikusan is szemléltette, és kísérlettel is igazolta (12.2.(a) ábra). Egy olyan **plazmidból** indult ki, amely egy transzpozont tartalmazott (12.2.(a) bal felső rész). A plazmidok a baktériumok kisméretű cirkuláris DNS-ek, amelyek a bakteriális genomtól függetlenül replikálódnak. Az eredeti plazmidot a transzpozon fordított ismétlődő szekvenciát tartalmazó végeihez kapcsolták. Cohen úgy gondolkodott, hogyha a transzpozon végein valóban vannak fordított helyzetű ismétlődések, akkor a rekombináns plazmid két szála elválasztható egymástól, és az egy szálon levő inverz ismétlődő szekvenciák a bázispárosodásnak megfelelően szár-hurok szerkezetet hoznak létre (12.2.(a) ábra jobb oldal). A szárok kétfonalas DNS-ek, amelyeket két fordított helyzetű ismétlődő szekvencia alkot, a hurkok pedig egyfonalúak és a DNS fennmaradó részét tartalmazzák. A feltételezett szár-hurok szerkezetet igazoló elektronmikroszkópos felvétel a 12.2.(b) ábrán látható.

Egy inszerciós szekvencia legalább két áthelyeződést katalizáló fehérjét kódol, amelyeket **transzpozázoknak** nevezünk. Hatásmechanizmusukat a fejezet későbbi részében tárgyaljuk.



12.2. ábra. A transzpozonok fordított terminális ismétlődéseket tartalmaznak. (a) A kísérlet vázlata: egy transzpozont hordozó plazmid két fonalt elválasztották egymástól, majd a két szálat elkülönítették, majd lehetővé tették kapcsolódásukat. A fordított ismétlődő szekvenciák bázispárok révén egy szárat alakítanak ki, két végén egyfonalú hurkokkal, amelyek közül az egyik a transzpozon belső génjeinek (kisebb, zöld színű hurkok), a másik a plazmid génjeinek (nagyobb, lila és piros színű hurkok) felel meg. (b) Kísérleti eredmények. A DNS-t nehézfémrel árnyékolták, és elektronmikroszkóppal tanulmányozták. A felvételen egyértelműen azonosítható a hurok-szár-hurkok szerkezet. A szárrész több száz bázispár hosszúságú, jelezve, hogy a transzpozonban sokkal hosszabb az inverz terminális ismétlődő szakasz, mint a sematikus ábrán

Fotó (b) Cohen, Stanley N., Stanford Egyetem

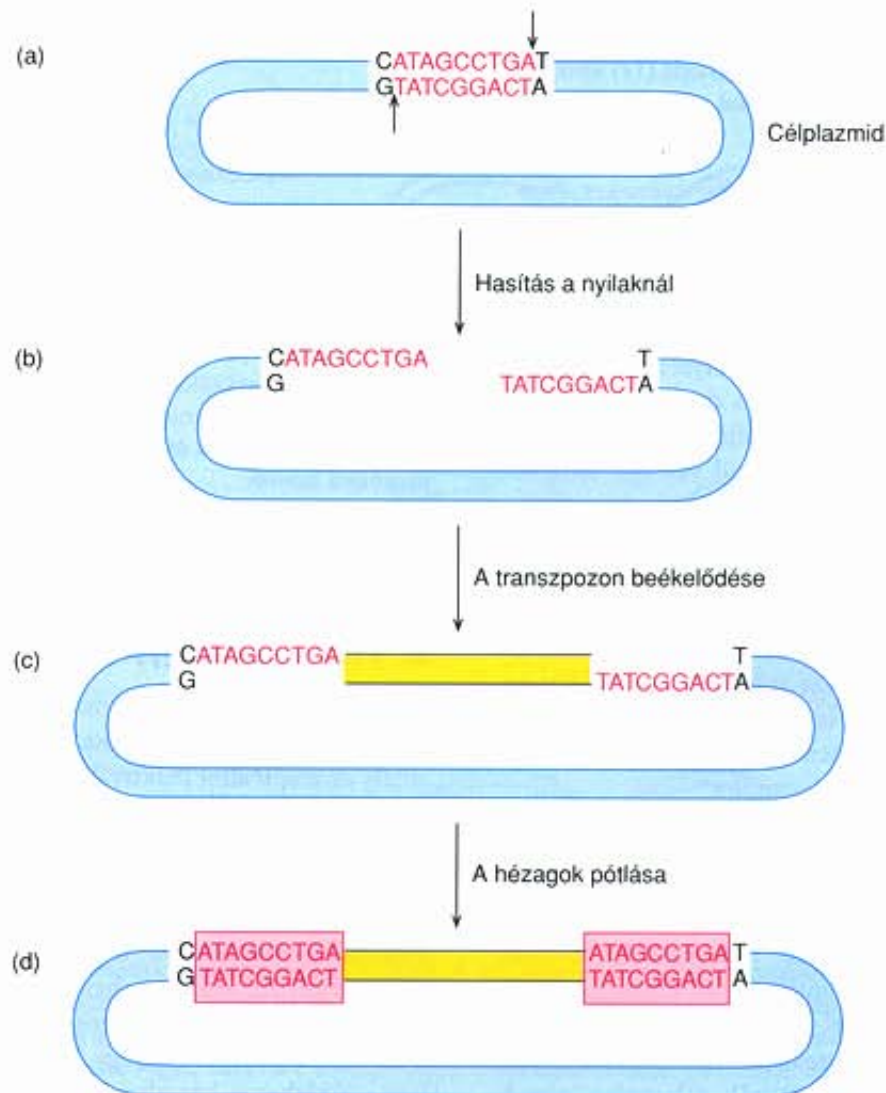
Tudjuk, hogy ezek a fehérjék a transzpozícióhoz szükségesek, mivel az inszerciós szekvencia testében bekövetkező mutációk áthelyeződésre képtelenné tehetik a transzpozont.

Egy inszerciós szekvencia másik, a sokkal összetettebb transzpozonokkal közös vonása, magán a transzpozonon kívül található. Ez egy pár rövid, direkt ismétlődő szekvencia a DNS-ben közvetlenül a transzpozon mellett. Ezek a szekvenciák a transzpozon beépülése előtt nem léteznek, vagyis az inszerció következményei, és arra utalnak, hogy a transzpozáz a cél-DNS két szálát lépcsőzetesen vágja el, nem pedig egymással szemben. A 12.3. ábra jól szemlélteti, miként vezet a cél-DNS két fonának lépcsőzetes hasítása az inszerciós helyen a direkt ismétlődések automatikus kialakulásához. A direkt ismétlődések hossza a két hasítási pont távolságától függ a cél-DNS-ben. Ezt a távolságot pedig a beépült inszerciós szekvencia természete befolyásolja. Az IS1 transzpozáza kilenc bázispár távolságban hasít, így kilenc bázispár hosszú direkt ismétlődő szakaszokat hoz létre.

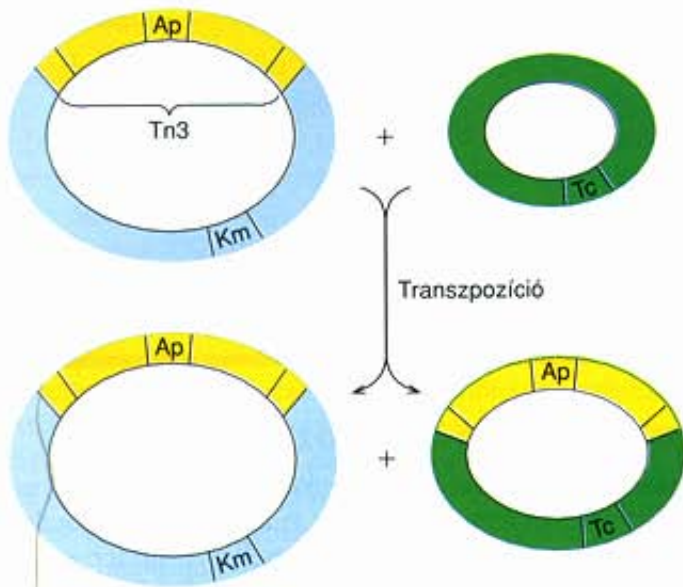
Az inszerciós szekvenciák a legegyszerűbb transzpozonok, csak a saját áthelyeződésükhöz szükséges elemeket tartalmazzák. Végeiken rövid, inverz ismétlődő szekvenciák vannak, belsejükben legalább két gén kódolja az áthelyeződéshez szükséges transzpozáz nevű enzimet. Az áthelyeződés egy rövid szakasz megkettőződését okozza a cél-DNS-ben. Az áthelyeződés után a beépült szekvencia mindkét oldalát ennek a rövid szekvenciának egy kópiája határolja.

ÖSSZETETT TRANSZPOZONOK

Az inszerciós szekvenciákat helyenként „önző” DNS-nek nevezik. Ezt ne értelmezzük úgy, hogy az IS-elemek meggondolják, amit tesznek, természetesen nem képesek erre. Inkább azt jelenti, hogy az IS-elem a baktérium rovására kettőződik meg, és cserébe nem nyújt érte semmi ellenszolgáltatást. Más transzpozono-



12.3. ábra. Direkt ismétlődések kialakulása a gazda-DNS-ben egy transzpozon beépülése következtében. (a) A nyilak azt a pontot jelzik, ahol a gazda-DNS két szála egymástól kilenc bázispárnyi távolságra, lépcsőzetesen hasításra kerül. (b) Hasítás után. (c) A transzpozon (sárga) mindkét végével a gazda-DNS egyik fonalához kapcsolódik, és így két, kilenc bázispárnyi hézag keletkezik. (d) A rések a transzpozon mindkét végénél kiegészülve a gazda-DNS kilenc bázispár hosszú ismétlődő egységei lesznek (piros kazetták)



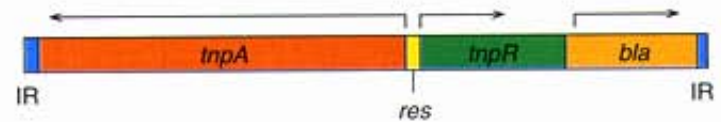
12.4. ábra. Az áthelyeződés nyomon követése antibiotikum-rezisztenciámarkerekkel. Két plazmidból indulunk ki: a nagyobbik (kék) a kanamicinrezisztenciát (Km) kódolja, és tartalmazza a Tn3 transzpozont (sárga), belsejében az ampicillinrezisztencia génjével (Ap); a kisebb (zöld) a tetraciklinrezisztenciát (Tc) kódolja. A Tn3 áthelyeződése után a kisebb plazmid mind a Tc, mind pedig az Ap gént hordozza

nok hordozhatnak a gazdasejtek számára értékes géneket, legismertebbek közülük az antibiotikumrezisztenciáért felelős gének. Ezek nem csak a baktériumok számára hasznosak, hanem a kutatóknak is, mert így sokkal könnyebb a transzpozonok nyomon követése.

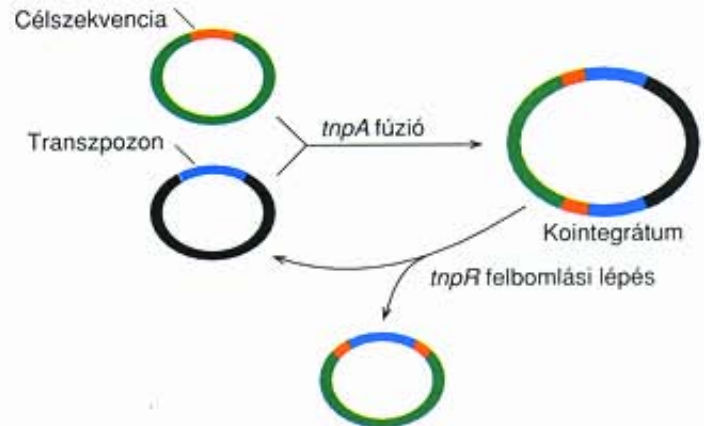
Vegyük például a 12.4. ábrán látható helyzetet! Induljunk ki a kanamicin-rezisztenciát (Km) hordozó donor plazmidból, amelyben a Tn3 transzpozon is megtalálható, belsejében az ampicillinrezisztencia (Ap) génnel! Ezenkívül van egy tetraciklinrezisztencia (Tc) gént hordozó célplazmidunk is. A transzpozíció után a Tn3 replikálódott, és egy kópiája átkerült a célplazmidba. Így a célplazmid mind tetraciklinre, mind pedig ampicillinre rezisztens lesz. Mindezt könnyen ellenőrizhetjük, ha antibiotikumokra érzékeny baktériumokat transzformálunk a célplazmiddal, majd a baktériumokat mindkét antibiotikumot tartalmazó táptalajon növesztjük. Ha a baktériumok túlélnek ezt, akkor mindkét antibiotikumrezisztencia génnel rendelkeznek, vagyis a Tn3 biztosan beépült a célplazmidba.

AZ ÁTHELYEZŐDÉS MECHANIZMUSAI

A transzpozonokat, mivel áthelyeződhetnek a genom egyik helyéről a másikra, néha „ugráló géneknek” is nevezik. Ez azonban kicsit félrevezető, mert azt sugallja, hogy a DNS minden esetben egyszerűen elhagyja az egyik helyet, és átugrik a másikra. Ilyen áthelyeződési mód létezik is, és **konzervatív transzpozíciónak** nevezik, mert az eredeti DNS mindkét szála változatlan marad, mivel együtt kerülnek át az egyik helyről a másikra. A transzpozíció azonban gyakran a DNS replikációjához kapcsolódik, és ilyenkor a transzpozon egyik kópiája az eredeti helyén marad, és csak a másik épül be az új helyre. Ez a **replikatív transzpozí-**



12.5. ábra. A Tn3 transzpozon szerkezete. A *tnpA* és a *tnpR* gének az áthelyeződéshez szükségesek. A *res* annak a rekombinációnak a helye, amely az áthelyeződés ún. feloldási lépése (resolution) során játszódik le. A *bla* gén kódolja a β -laktamáz, amely az ampicillin-rezisztenciáért felelős. Ezt a gént gyakran Ap vagy *Amp^r* néven is említik. A Tn3 mindkét végén inverz ismétlődő szakaszok (IR) találhatóak. A nyílak a gének átírásának irányát jelzik

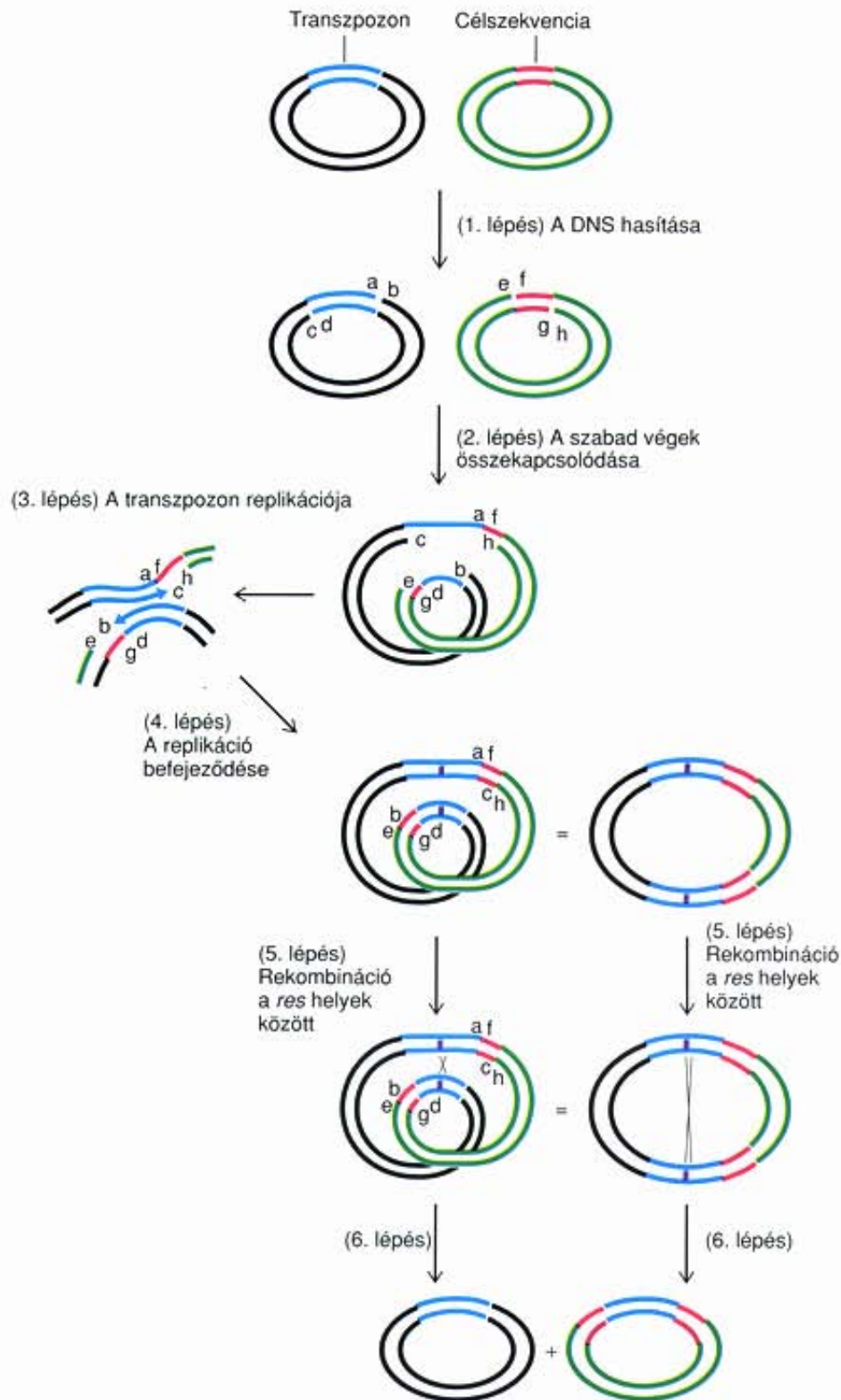


12.6. ábra. A Tn3 kétlépéses áthelyeződésének egyszerűsített vázlata. Az első lépésben, amelyet a *tnpA* gén terméke katalizál, a transzpozont (kék) tartalmazó plazmid (fekete) fuzionál a célplazmid (zöld) meghatározott szekvenciájú helyével (piros), és kointegrátum jön létre. A kointegrátum kialakulása során a transzpozon replikálódik. A *tnpR* gén terméke által katalizált második lépésben, a kointegrátum a beékelődött transzpozont hordozó célplazmidra és az eredeti transzpozont tartalmazó plazmidra bomlik

ció, mert miközben a transzpozon áthelyeződik, meg is kettőződik. Nézzük meg, hogyan megy végbe a kétféle áthelyeződés!

A Tn3 replikatív transzpozíciója

A Tn3 áthelyeződése a transzpozíció egyik legalaposabban tanulmányozott mechanizmusa (12.5. ábra). A *bla* gén mellett, amely az ampicillint inaktiváló β -laktamáz gént kódolja, a Tn3 még két olyan gént tartalmaz, amelyeknek jelentős szerepük van az áthelyeződésben. A Tn3 kétlépéses folyamatban helyeződik át, a lépésekhez a Tn3 egy-egy génterméke szükséges. Az események leegyszerűsített vázlatát a 12.6. ábra mutatja be. Két plazmidból indulunk ki, a Tn3-at hordozó donorból és a célplazmidból. Az első lépésben a Tn3 megkettőződésével a két plazmid fuzionál, és egy közös egység, **kointegrátum** alakul ki, amelyben a plazmidokat egy Tn3 kópiapár kapcsolja össze. Ehhez a lépéshez a két plazmid közötti rekombináció szükséges, amelyet a Tn3 transzpozáz génjének, a *tnpA*-nak a terméke katalizál. A 12.7. ábra részletesen szemlélteti, miként lép kölcsönhatásba egymással a transzpozícióban szereplő 4 DNS szál a kointegrátum kialakításához.



12.7. ábra. A Tn3 áthelyeződésének részletes leírása. 1. lépés: A két plazmidon hasításával szabad végek (a–h) keletkeznek. 2. lépés: Az a és f, valamint a g és d végek összekapcsolódnak, és így a b, c, e és h végek szabadon maradnak. 3. lépés: A szabadon maradt végek közül kettő (b és c) primerként szolgálnak a DNS-replikációhoz. A replikálódó régió kinagyítva az ábra bal oldalán látható. 4. lépés: A replikáció addig folytatódik, amíg a b vég eléri az e véget, illetve a c a h-t. A végek összekapcsolódnak, és kialakul a kointegrátum. Figyeljük meg, hogy a teljes transzpozon (kék) replikálódott! A párosodott res helyeket (lila) először itt mutatjuk be, bár egy már szerepelt az előző lépésben is. A kointegrátumot egy hurokkal a belsejében ábrázoltuk, így kialakulása az előző állapotból könnyebben nyomon követhető. Ha a hurok felnyílna, akkor a kointegrátum éppen olyan lenne, mint a 12.6. ábra jobb oldalán látható. 5. és 6. lépés: A transzpozon két kópiájában crossing over jön létre a két res hely között, és két független plazmid keletkezik a transzpozon egy-egy kópiájával. Ez a lépés a kointegrátum két azonos értékű formájával szerepel az ábra bal, illetve jobb oldali részén

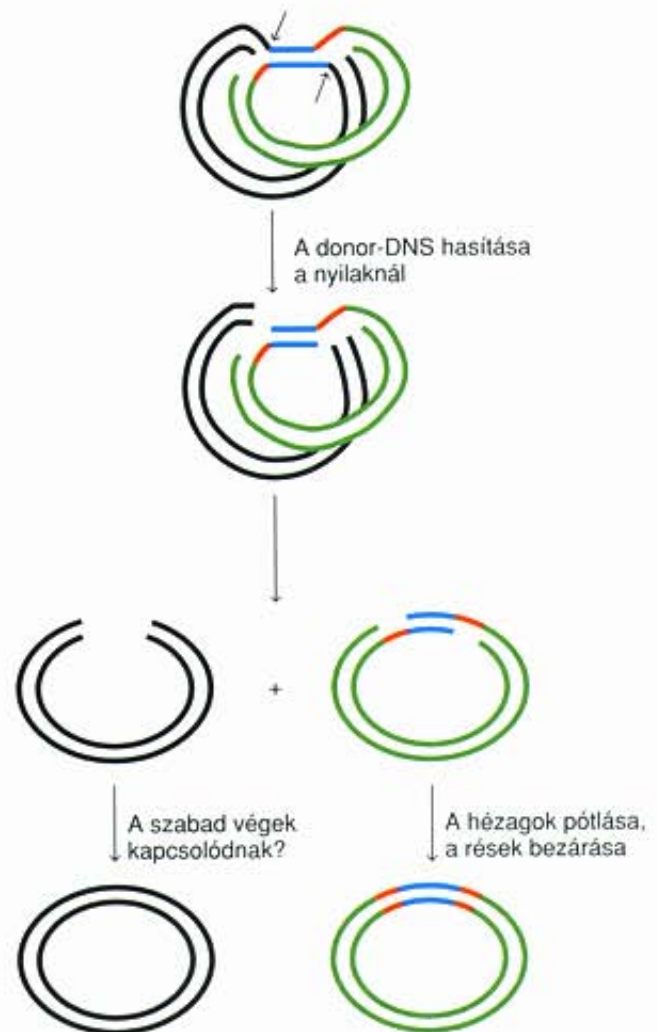
Az eddig ismertek rekombinációs folyamatok legtöbbször (4., 5. és 7. fejezet) feltétel volt a két rekombinálandó DNS homológiája. Ezzel szemben a Tn3 transzpozáz által katalizált rekombinációhoz csak kismértékű homológia szükséges a donor- és a cél-DNS között, ha egyáltalán szükséges. Ez azt jelenti, hogy a transzpozíció viszonylag független a DNS szekvenciájától, és így a Tn3 sokféle helyre áthelyeződhet. Az **illegitim rekombinációnak** ez a típusa, amely kevésbé függ a DNS szekvenciájától, a transzpozonok közös tulajdonsága. A 12.6. és 12.7. ábrán két plazmid közötti áthelyeződés látható, de a donor- és cél-DNS más DNS is lehet, beleértve a fág-DNS-eket és magát a baktériumkromoszómát is.

A Tn3 transzpozíciójának második lépése a **kointegrátum felbomlása**, amelynek során a kointegrátumból két független plazmid lesz, a Tn3 egy-egy kópiájával. Ebben a lépésben a Tn3 két homológ helye, az ún. *res* helyek között jön létre rekombináció, a folyamatot a *tupR* **rezolváz** gén terméke katalizálja. Egy sor bizonyíték szól amellett, hogy a Tn3 áthelyeződése kétlépéses folyamat. Először is, a *tupR* génben fellépő mutációk miatt nem bomlanak fel a kointegrátumok, hanem a transzpozíció végtermékei. Ez azt igazolja, hogy a kointegrátum normális körülmények között a folyamat egyik köztes terméke. Másodszor, a kointegrátumok akkor is megszüntethetők, ha a *tupR* gén defektes, mégpedig egy másik DNS-molekulából – pl. a gazdasejt kromoszómájából vagy másik plazmidból – származó működőképes *tupR* génnel.

Konzervatív áthelyeződés

A 12.6. és 12.7. ábrák a replikatív transzpozíciót szemléltetik, de tudnunk kell, hogy a transzpozíció nem mindig így zajlik. Néha a transzpozon konzervatív módon, mint érintetlen egység helyeződik át, elhagyja a donor-DNS-t és a cél-DNS-ben jelenik meg. Hogyan történik ez? Lehetséges, hogy a folyamat ugyanúgy indul, mint a replikatív transzpozíció, vagyis a donor- és a cél-DNS-fonalak felnyílásával és összekapcsolódásával, de ezután másképpen folytatódik (12.8. ábra). A transzpozon nem kettőződik meg, hanem mindkét oldalán új rések (nick) keletkeznek a donor DNS-ben. Ez felszabadítja a donor-DNS-t, de a transzpozon kötve marad a cél-DNS-hez. A megmaradó rések gyorsan bezáródnak, és keletkezik egy transzpozonját elvesztett donor-DNS, valamint egy olyan cél-DNS, amelybe átkerült a transzpozon.

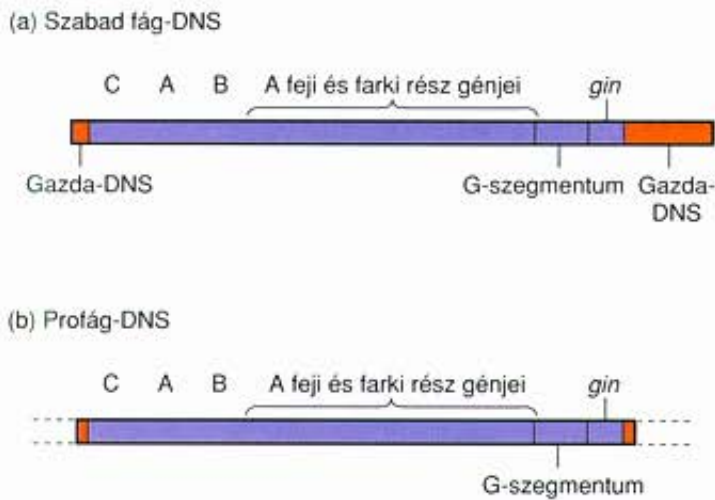
Sok transzpozon az áthelyeződéséhez szükséges gének mellett más géneket is tartalmaz, általában antibiotikum-rezisztencia géneket. A Tn3 például az ampicillinnel szembeni rezisztencia génjét hordozza. A Tn3 és származékai kétlépéses folyamattal, replikatív transzpozícióval helyeződnek át. Ennek során a transzpozon először megkettőződik, és a donor valamint a cél-DNS fúziójából kialakul egy ún. kointegrátum. A második lépésben a kointegrátum két cirkuláris DNS-sé válik szét, amelyekben megtalálható a transzpozon egy-egy kópiája. Egy másik mechanizmus a konzervatív transzpozíció, amelynek során a transzpozon nem kettőződik meg.



12.8. ábra. A konzervatív áthelyeződés. Az első két lépés azonos a replikatív transzpozíció lépéseivel, az ábra felső része megegyezik a 12.7. ábra 2. és 3. lépése közötti állapottal. A következő lépésben azonban új rések keletkeznek a nyilakkal jelölt helyeken. Ezért a donorplazmid megszabadul a transzpozontól, ami a cél-DNS-hez kapcsolódik. A rések kitöltésével és a hasítási pontok bezárásával a célplazmid kiegészül az új transzpozonnal. A donorplazmid szabad végei vagy összekapcsolódnak, vagy nem, de transzpozonja mindkét esetben elvész.

A TRANSZPOZONOK MINT MUTAGÉNEK

A **Mu** bakteriofág, amely az *E. coli*t fertőzi meg, szintén transzpozonként viselkedik, és replikációja valóban az áthelyeződéstől függ. A Mu fág genomja egy 37 kb hosszú, lineáris DNS, amely vagy litikusan vagy lizogén úton (8. fejezet) kettőződik meg (12.9. ábra). A lizogén fázisban a Mu genomja beépül a gazda kromoszómájába, és egy fág-represszor megakadályozza legtöbb génjének működését, hasonlóan a lizogén lambda-fághoz. A Mu litikus fázisa azonban nagyon eltér a lambda-fágtól. A fág-DNS nem marad szabadon, hanem beépül a gazda kromoszómájába. Még meglepőbb, hogy a fág-DNS az egész litikus fázis alatt integrált állapotban van, és transzpozícióval replikálódik. A Mu profág két formában létezik. Az egyikben a gazda-DNS direkt ismétlődései határolják, mintha egy transzpozon lenne áthelye-



12.9. ábra. A Mu fág genetikai térképe. (a) A fág részecskék DNS-e lineáris és különböző hosszúságú gazda-DNS-t tartalmaz (piros), amely a fág-DNS mindkét végéhez (lila) kapcsolódik. (b) A profág DNS-ének hasonló lineáris térképe van, és végeinél a gazda-DNS 5 bázispárnyi direkt ismétlődései találhatóak (piros). A szabad fág DNS-ében megtalálható gazda-DNS a beépülés során elvész

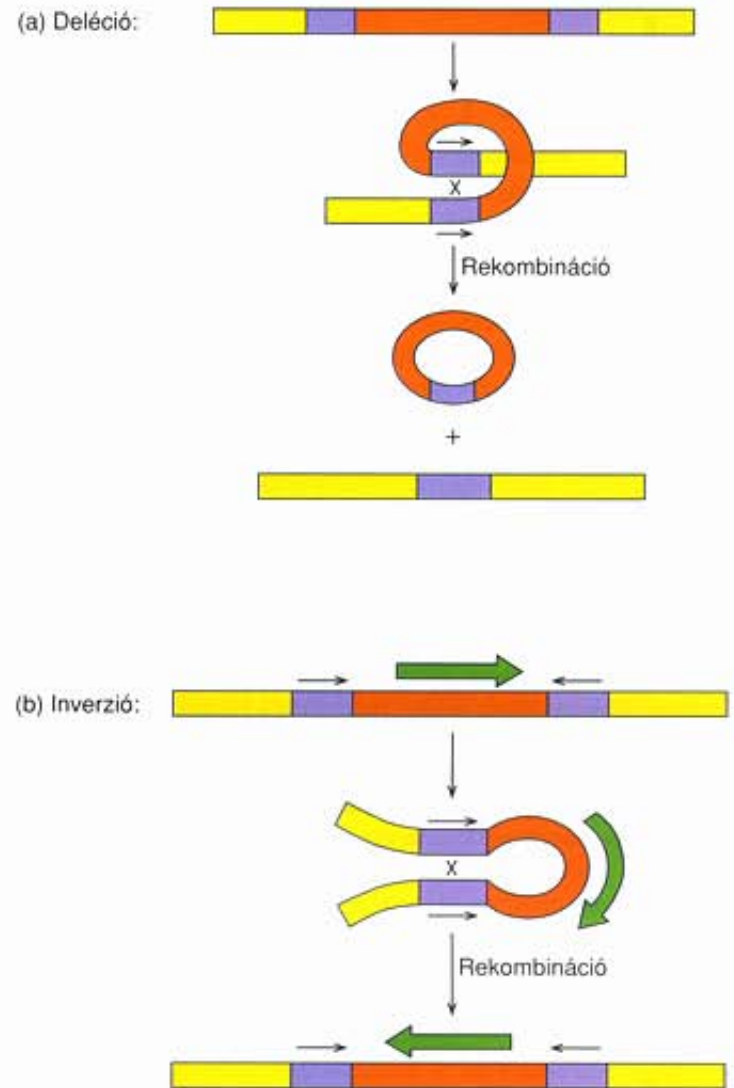
ződés után. A másikban, amely a litikus fázisban jelenik meg, egy kointegrátumban fordul elő, hasonlóan az áthelyeződés egy közbeeső szakaszában lévő Tn3-hoz. A Mu fág transzpozíciós mechanizmusa még nem tisztázott.

A Mu fagot Austin Taylor fedezte fel, annak alapján, hogy áthelyeződésekor mutációkat okozott. A *Mu* a mutátor szó rövidítése. A fág egy génben egyszerűen azzal is okozhat mutációt, hogy beépül, és ezzel működését megszakítja. Taylor azt is megfigyelte, hogy a Mu fág az egyszerű inszerciókön kívül másféle mutációt is okozhat, inverziókat, deléciókat, transzlokációkat és független DNS-molekulák egyesülését. Már láttuk, hogy más transzpozonok irányíthatnak DNS-fűzít (kointegráció) és transzlokációt (transzpozíció). A 12.10. ábra azt mutatja be, hogy a Mu és más transzpozonok hogyan biztosítanak helyet homológ rekombinációhoz. Ez a két transzpozon orientációjától függően deléciókat vagy inverziókat eredményezhet.

A Mu bakteriofág transzpozabilis elemként viselkedhet. A gazdaszervezet genomjának bármely részébe beépülhet, és a gazda-DNS rövid ismétlődéseihez kapcsolódva, vagy kointegrátumként található meg. A Mu fág azzal, hogy a genom egyik helyéről a másikra ugrál, és egyszerűen csak homológ helyeket hoz létre a rekombinációhoz, a gazda-DNS átrendeződését okozhatja, mégpedig replikon fűzít, transzlokációt, deléciót és inverziót. Más transzpozonok is kiválthatnak ilyen mutációkat a gazda-DNS-ben.

BAKTÉRIUMOK HELYSPECIFIKUS REKOMBINÁCIÓJA

1922-ben F. W. Andrewes felfedezte, hogy a *Salmonella typhimurium* bélbaktérium spontán képes megváltoztatni az ostorában, fla-



12.10. ábra. A transzpozonok hatására bekövetkező deléció és inverzió. (a) Amikor két különálló transzpozon (lila) azonos irányban helyezkedik el (nyilak) egy kromoszómán, akkor az ábra közepén látható módon párba állhatnak. Az X-szel jelölt helyen bekövetkező rekombináció kiszabadítja a két transzpozon között lévő DNS-t (piros) és az egyik transzpozont (lila). Így az eredeti DNS-en csak egy transzpozon és egy deléció marad. (b) Amikor a két transzpozon ellenkező irányú, akkor a középső ábrán látható módon állhatnak párba. A fellépő rekombináció következtében (X) a transzpozonok közötti DNS-szakasz megfordul (zöld nyíl)

gellumában lévő fehérjét. Egy olyan baktériumtelepet tenyésztett ki, amelynek minden egyede egy sejtől származott és ugyanazt az ostorfehérjét, **flagellint** tartalmazta. Amikor ez a telep elég nagyra növekedett, Andrewes izolálta azokat a sejteket, amelyekből új kolóniák nőttek. Legtöbbjükön az eredeti, néhányban pedig új típusú flagellin volt. Vagyis egyes baktériumokban az ostorfehérjét egy másik váltotta fel. Ez a jelenség a **fázisvariáció** (12.11. ábra). Az új típusú flagellinnel rendelkező új **fázisú** telepből olyan szubkolóniák fejlődhetnek, amelyekben az eredeti flagellin van, vagyis eredeti fázisúak. Fáziseltolódás átlagosan ezer sejtosztódás közül egyszer fordul elő.

12.1. A transzpozíció jelenségének közegészségügyi következményei

A Tn3-nál és rokonainál is bonyolultabbak az **összetett transzpozonok**, amelyek két részből állnak, egy központi régióból és két karból. A központi régióban található a transzpozíció génei és egy-két antibiotikumrezisztencia gén. A karok inszerciós szekvenciák vagy azokhoz hasonló elemek. A **Tn9** az összetett transzpozonok egyik képviselője. Középső régiójában egy klóramfenikolrezisztencia gén található két inszerciós szekvencia (IS) között. Az IS-ek részt vehetnek a teljes Tn9 áthelyeződésében, vagy saját maguk transzpozíciójában.

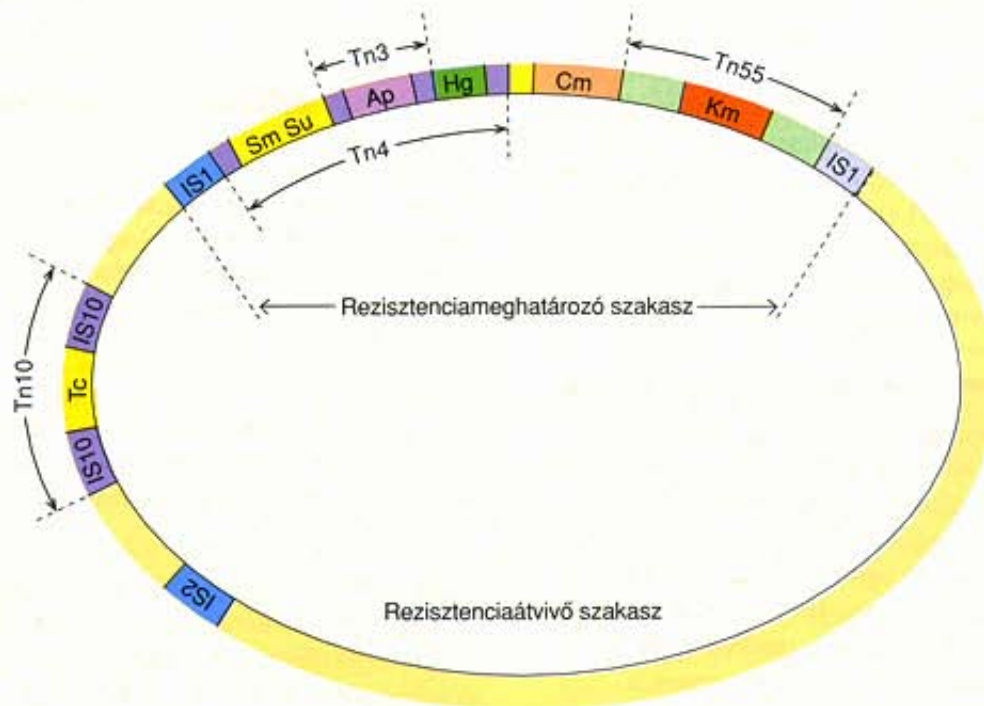
Az M12.1. ábrán egy antibiotikumrezisztenciát hordozó plazmid látható, amely célszekvenciája lehet számos különböző transzpozonnak, köztük a **Tn10** összetett transzpozonnak. Egy olyan plazmid, amelyben többféle antibiotikumrezisztencia gén is található, nyilvánvalóan előnyt jelent annak a baktériumnak, amelyik hordozza, mindaddig, amíg az antibiotikumot elterjedten használják. Emellett ezek a plazmidok segíthetik annak kiderítését, hogyan válhatnak egyes fertőző baktériumok rezisztenssé az elpusztításukra bevetett antibiotikumokkal szemben. Több ilyen plazmid összeszerkesztődhet, ráadásul más baktériumokkal is társulhatnak, így sokszoros antibiotikumrezisztencia alakulhat ki.

Az antibiotikumrezisztencia kérdésének komolyságát jól példázza egy megtörtént eset. 1985-ben Illinoisban (Egyesült Államok) egy hatalmas és modern tejüzem elfertőződött

Salmonella typhimuriummal. Ennek következtében hat államban több mint 14 000 ember szenvedett szalmonellózisban, más néven szalmonellamérgezésben. Ezt a súlyos betegséget szédülés, hastáji fájdalmak, hányás, hasmenés, láz jellemzi, és a kiszáradás miatt könnyen életveszélyes állapot alakulhat ki. Az említett esetben öt ember halt meg. A járványt okozó baktérium szerencsére nem volt antibiotikumrezisztens, ellenkező esetben sokkal több halálos áldozatot követelt volna.

Egy másik *Salmonella* járvány két évvel korábban a Közép-Nyugaton tört ki és főként Minnesota államot érintette. Kiterjedésében sokkal korlátozottabb volt – csak tizenhét betegedett meg –, de potenciálisan sokkal veszélyesebbnek bizonyult, mert a kórokozó *Salmonella newport* antibiotikumrezisztens volt. Honnan származtak ezek a baktériumok? A rejtélyt Scott A. Holmberg, az atlantai járványügyi központ munkatársa oldotta meg.

Holmberg abból indult ki, hogy a *Salmonella newport* az északi államokban meglehetősen ritka, és a fertőzöttek nagy része rövid idővel megbetegedése előtt antibiotikumot szedett. Mindez azt valószínűsítette, hogy az antibiotikum szennyezett lehetett. Holmberg azonban elvetette ezt a lehetőséget, amikor kiderült, hogy a betegek különböző antibiotikumokat szedtek, ráadásul néhány páciens nem is szedett gyógyszert. A kérdés akkor oldódott meg, amikor Holmberg tudomására jutott, hogy valamivel korábban, négy esetben már



M12.1. ábra. Hipotetikus antibiotikumrezisztens plazmid. Több különböző, saját rezisztenciamarkert hordozó transzpozon szerkesztődött egyetlen plazmiddá. A Tn4, amely magában foglalja a Tn3-at, a sztreptomycin- (Sm), a szulfonamid- (Su), az ampicillin- (Ap) és a higany- (Hg) rezisztencia géneket tartalmazza. A Tn55 hordozza a kanamicin- (Km), a Tn10 pedig a tetraciklin- (Tc) rezisztencia génjét. Az utolsót kivéve a többi transzpozon egy ún. rezisztenciát meghatározó szakaszban tömörülve helyezkedik el, amelyet két IS1 elem fog közre és tartalmazza a klóramfenikol- (Cm) rezisztencia gént is. A két IS1 elem lehetővé teszi a rezisztenciát meghatározó szakasz független áthelyeződését, ami azzal jár, hogy magával viszi az összes benne lévő rezisztenciagént is

Forrás: Cohen, Stanley N. és Shapiro, James A.: *Transposable Genetic Elements*. © Scientific American, 1980

12.1. (folytatás)

Dél-Dakotában is előfordult az antibiotikumrezisztens szalmonellózis. A betegek közül hárman rokonok voltak, egyikük pedig marhatenyésztéssel foglalkozott.

A farmer elmondta Holmbergnek, hogy gulyájában több hónappal azelőtt valamilyen járványos hasmenés pusztított, amelyben több borjú is elpusztult. Azt is megemlítette, hogy *Salmonella*-ra gyanakodott. Vajon ugyanaz a törzs volt-e, amelyik az emberek megbetegedését is okozta? Ennek tisztázására az elpusztult borjak és a minnesotai betegek *Salmonella*-plazmidjait elektroforetikus vizsgálták. A borjakból származó minta tizenegy beteg közül tíznek az anyagával egyezett meg, és biztosan eltért kilencvenegy másik *Salmonella newport*-mintától, amelyek nem voltak kapcsolatban az esettel.

Mindez egyértelműen arra utalt, hogy kapcsolat volt a dél-dakotai fertőzött gulya és az antibiotikumrezisztens szalmonellózis esetei között. Sikerült nyomon követni a gulya állataiból származó hús útját egy nebraskai húsfeldolgozóhoz, ahonnan előrecsomagolt hús adtak el két minnesotai és iowai kereskedőnek. A kereskedők

Minneapolis és St. Paul szupermarketjeiben értékesítették az árut, ahonnan a minnesotai betegek is vásároltak.

Mi a szerepük az antibiotikumoknak ezekben az esetekben? Az antibiotikumok elpusztítják a szervezet természetes baktériumflórájának jelentős részét, így az adott szerre rezisztens törzsek konkurencia hiányában gyorsan elszaporodhatnak. Még fontosabb azonban, hogyan alakulhatott ki az antibiotikumrezisztens *Salmonella*-törzs? A kép itt ellentmondásosabb, de a legtöbb járványügyi szakember úgy gondolja, hogy az állati takarmányokhoz kevert kis mennyiségű antibiotikum nem más, mint a rezisztens baktériumokra végrehajtott szelekció. A dél-dakotai farmer több mint harmincéves múltra visszatekintő gyakorlatot követve, a betegségek megelőzésére és a gyorsabb fejlődés érdekében, tetraciklint kevert az állatok takarmányába. Ennek következtében a marhákban kialakult egy olyan *Salmonella*-törzs, amelyik nemcsak a tetraciklinre, hanem a penicillinre és annak származékára, az amoxicillinre is rezisztens volt. A többszörös rezisztenciához valószínűleg egy rezisztens plazmid szükséges, de valószínűleg egyszerűbb, mint amilyen az M12.1. ábrán látható.



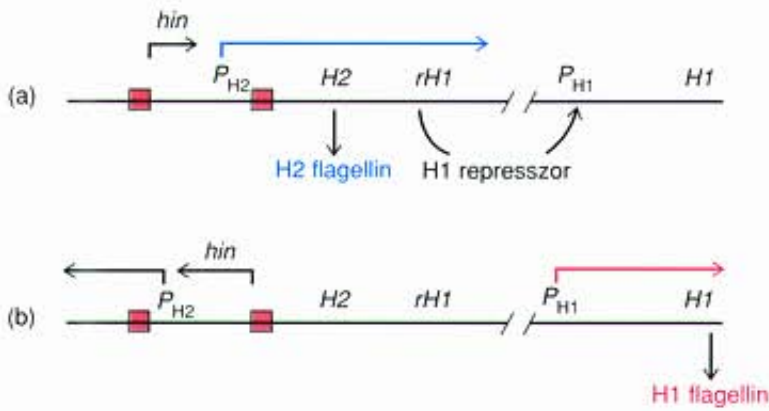
12.11. ábra. A *Salmonella* fázisváltásának kimutatása. (a) Ugyanolyan fázisú baktériumtelepekből indulunk ki. (b) Kiemelünk egy telepet, amelynek sejtjei egyetlen sejtből származnak, ezért genetikailag azonosnak kell lenniük. (c) A sejteket felszaporítjuk a kémcsőben lévő táptalajon. (d) A sejteket új lemezre szélesztjük. (e) A kifejlődő telepek egy része eltérő fázisban van (kék). (f) Kiemelünk közülük egyet, majd (g) kémcsőben szaporítjuk. (h) A tenyészetet ismét lemezre szélesztjük. (i) Néhány telep ismét az eredeti fázist mutatja

1953-ban Joshua Lederberg és P. R. Edwards kimutatták, hogy a *Salmonella* két fázisát két jól elkülönült gén, a **H1** és a **H2** okozza, amelyek két flagellin típust kódolnak. Amikor a **H2** aktív, a **H1** represszált, és a baktériumok a 2. fázis fenotípusát mutatják. Amikor a **H2** inaktív, a **H1** megnyilvánul, és a baktériumok az 1. fázis fenotípusába tartoznak. A **H2** transzkripciója fontos ebben a bekapcsolásban, mert a **H2** kapcsolt az **rh1** génnel, amelynek terméke viszont elnyomja a **H1** gént. A **H2** és az **rh1** ugyanazon az mRNS-en íródnak át, ha egyikük működik, akkor másikuk is. Amikor **H2** és **rh1** géneket tartalmazó DNS-t juttattak egy működő **H1**-et tartalmazó sejtbe, akkor a **H2** és az **rh1** bekapcsolva maradt, a **H1**-et pedig elnyomták. Ezt végrehajtották tiszta DNS-sel is, ami azt jelenti, hogy magában az aktív **H2** DNS-ben kell keresni a megoldást, és nem valamilyen fehérjefaktorban, ami bekapcsolja a gént.

Később azt is kimutatták, hogy a **H2** gén aktív állapotból inaktívba történő átkapcsolódásáért egy, a kódoló régiótól felfelé (upstream) lévő, 995 bp hosszú inverzió, a **H-szegmentum** felelős (12.12. ábra). Ha ez a DNS az egyik orientációban van, akkor a promotor szomszédos a **H2** kódoló régiójával, és ilyenkor a **H2** és az **rh1** transzkripciója megtörténhet. Amikor a szegmentum átfor-

dul, a promoter több száz bázispárral felfelé (upstream) mozdul el, invertálódik, és így rossz irányba mutat. Ezért a **H2** és az **rh1** gének transzkripciója lehetetlenné válik. Mivel ilyenkor nincs represszorszintézis, a **H1** transzkripciója lejátszódhat, és fázisváltás következik be. A génaktivitás váltásában tehát egy represszor közreműködik, de az elsődleges váltás egy mutáció és egy inverzió függvénye.

Hogyan kapcsolódik mindez a transzpozonokhoz? Kiderült, hogy a DNS inverziója a **H2** génnel határos régiókban csak olyan sejtekben megy végbe, amelyekből az általános rekombinációhoz szükséges aktív gének hiányoznak. Ez pedig arra enged következtetni, hogy a fázisváltáskor a rekombináció egy másik típusa működik. Emellett a H-szegmentumot két olyan inverz ismétlődés határolja, amelyen a rekombinációban szereplő törési helyek is megtalálhatók. Továbbá, a H-szegmentum kódolja a rekombinációban részt vevő rekombinázt, a **Hin**-t (H-inverzió). Mindezek a jellegzetességek a transzpozonokra emlékeztetnek, de a H-szegmentum nyilvánvalóan nem transzpozon. Egyrészt azért, mert nem helyeződik át, csupán megfordul. Másrészt azért, mert bár kódolja a megforduláshoz szükséges fehérjét, de függ egy gazdafunkciótól is. Ezt mutatják azok a tisztított DNS-sel és rekombinázzal végzett *in vitro* kísérletek, ame-

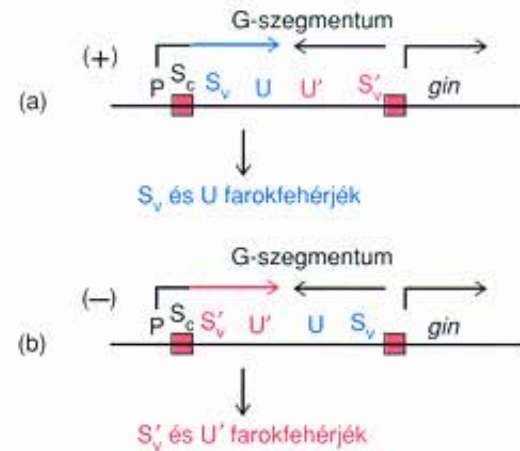


12.12. ábra. A fázisváltás molekuláris alapja. (a) A *hin* és a *H2* promoter (P_{H2}) jobb oldali orientációjú, a *H2* és az *rH1* működik (kék nyíl). A *H2* gén terméke a *H2* flagellin (kék). Az *rH1* terméke egy represszor, amely a *H1* promoterének (P_{H1}) közelében kapcsolódik, ezzel megakadályozza a *H1* gén működését. (b) A *hin*-*H2* promoter szakasz inverziójával a *H2* és az *rH1* nem működik, így *H2* flagellin és *H1* represszor sem termelődik. Represszor hiányában, a *H1* gén aktív (piros nyíl), és *H1* flagellin képződik (piros). A piros négyzetek a megfordulásra képes szakasz határain lévő inverz ismétlődő szekvenciák

lyekben az inverziót a rekombináz hiányos sejtek nyers kivonata nagymértékben elősegítette. Ezeknek a kivonatoknak tartalmazniuk kellett a szükséges gazdafunkció(k)at is. A H-szegmentum megfordulása valójában a **helyspecifikus rekombináció** egyik példája.

A génműködés ellenőrzése egy DNS-szakasz helyspecifikus rekombinációjával történő megfordulásával nem csak a *Salmonella* fázisváltására jellemző. A Mu fágban van egy G-szegmentum, amelyben a fág farki rostjainak géneiből két készlet található (12.13. ábra). Ha ezek a szegmentumok azonos orientációjúak, akkor az egyik génkészlet egy promoter mellé kerül, éppen a megforduló szakaszon kívülre, és így működik. Ha a szegmentum megfordul, a másik génkészlet kerül a promoter mellé, és így az nyilvánul meg. Mivel a farki rostoknak fontos szerepük van abban, hogy milyen baktériumtörzset fertőzhet meg a fág, ez az inverzió megváltoztatja a fág gazdaszerepességét. Hasonló rendszere van a P1 és a P7 fágoknak is. Az ismertetett inverziós mechanizmusok erősen emlékeztetnek egymásra. A rekombinázok egymást helyettesíthetik, és a inverz ismétlődő szekvenciák is hasonlóak.

A *Salmonella typhimurium* az ostorában található fehérje szerkezete alapján két fázisban létezhet. A kétféle fehérje két gén, a *H1* és a *H2* terméke. A *H2* gén aktivitását egy, a géntől felfelé (upstream) elhelyezkedő, 995 bp hosszú DNS-szakaszban (H-szegmentum) helyspecifikus rekombinációval létrejött inverzió szabályozza. Ha ez a DNS ugyanabban az orientációban van, akkor a gén aktív. Továbbá, ha a *H1* gén represszorát kódoló *rH1* kísérő gén szintén aktív, akkor a *H1* nem működik. A H-szegmentum inverziójakor a *H2* és az *rH1* gének kikapcsolnak, tehát a *H1* gén működhet. A Mu, a P1 és a P7 fágok farkrost fehérjeinek típusváltása hasonló inverziós mechanizmussal történik.



12.13. ábra. A G-szegmentum inverziójának modellje a Mu fágban. A G-szegmentum transzkripciója a promotornél (P) kezdődik a bal oldalon. (a) A G-szegmentum $G(+)$ irányú esetén az S_v és az U gének (kék) a promoter szomszédságában vannak, balról jobbra haladó irányultságúak, és így átíródnak (kék nyíl). A termelődő S_v és U farkfehérjék lehetővé teszik, hogy a fág megfertőzze az *E. coli* K12 törzset, de a C törzsrre hatástalan. (b) Amikor a G-szegmentum $G(-)$ orientációjú, az S'_v és az U' gének (piros) kerülnek a promoter szomszédságába, és mivel balról jobbra olvashatók, működnek (piros nyíl). Az S'_v és az U' farkfehérjék termelődnek (piros), tehát a fág az *E. coli* C törzset képes megfertőzni, a K12-t pedig nem. Az S_c egy olyan állandó szakaszt jelöl, amely a megfordulásra képes régió orientációjától függetlenül mindig azonos módon íródik át. A piros négyzetek az inverzióra képes szakasz határainál lévő inverz ismétlődések

AZ EUKARIÓTÁK MOZGÓ GENETIKAI ELEMEI

Meglepő lenne, ha csak a prokariótáknál fordulnának elő áthelyeződésre képes genetikai elemek, különösen azért, mert hatékony szelektív erők állnak az oldalukon. Egyrészt, sok transzpozon hordoz a gazdasejt számára is hasznos géneket. Így gazdáik előnyre tesznek szert a velük versengő szervezetekkel szemben, és saját DNS-ükkel együtt a transzpozonokat is szaporítják. Másrészt, a transzpozonok „önző módon” még akkor is replikálódnak a gazdasejtben, ha nem jelentenek semmilyen előnyt befogadójuk számára. Áthelyeződő elemek vannak az eukariótákban is, sőt először eukarióta szervezetben azonosították őket.

A MOZGÓ GENETIKAI ELEMEK ELSŐ PÉLDÁI

Az első mozgó genetikai elemeket az 1940-es évek végén kukoricával végzett kísérletei során Barbara McClintock fedezte fel. Akkor egy ideje már tudták, hogy az ún. indián kukorica szemtermésének színváltozatait egy instabil mutáció okozza. A 12.14.(a) ábrán egy színes kukoricaszem látható. A szint a kukorica C lokuszán kódolt faktor alakítja ki. Ha a C-gén mutációval átalakul, akkor nem termelődik bíborszínű pigment, és a szem majdnem teljesen fehér (12.14.(b) ábra). A kukoricaszem néhány sejtjében reverzió történhet, melynek eredményeként foltos lesz (12.14.(c) ábra). A revertálódott sejtek pigmentet termelnek, így a



(a)



(b)



(c)

12.14. ábra. Mutációk és reverziók hatása a kukoricaszem színére. (a) A vad típusú kukoricaszemben van egy aktív *C* lokusz, amely bíborszínű pigmentet termel. (b) A *C* lokusz mutációja miatt a pigment szintézise gátolt, a kukoricaszem fehér. (c) A foltok azoknak a sejtszoportoknak felelnek meg, amelyek *C* lokusza revertálódott, így a sejtek újra termelik a pigmentet

Forrás: Fedoroff, Nina V.: *Transposable Genetic Elements in Maize*. © Scientific American, Inc. 1986. Fotó F. W. Goro

kukoricaszemen sötét foltok jelennek meg. Feltűnő, milyen sok folt található ezeken a szemeken. A nagymértékű foltosság azt jelzi, hogy a mutáció nem stabil, hiszen sokkal nagyobb gyakorisággal revertálódik egy átlagos mutációnál.

McClintock felfedezte, hogy ebben az esetben az eredeti mutációt egy ún. *Ds* transzpozon inszerciója okozza a *C*-génbe (12.15.(a) és (b) ábra). Egy másik mozgó genetikai elem, az *Ac* (activator) működése következtében a *Ds* elem kiléphet a *C* lokuszról, és így reverziót okoz (12.15.(c)). Más szóval a *Ds* elem csak az *Ac* segítségével helyeződhet át. Másrészt az *Ac* egy független transzpozon. Önállóan is áthelyeződhet, és más elemek segítségével is inaktíválhat géneket.

Napjainkban a molekuláris genetika korszerű eszközeivel már izolálhatjuk és jellemezhetjük ezeket az elemeket, több évtizeddel azután, hogy McClintock megtalálta őket. Nina Fedoroff és munkatársai meghatározták az *Ac* és a *Ds* elem három különböző formájának szerkezetét. Az *Ac* a már megismert bakteriális transzpozonokra emlékeztet (12.16. ábra). Körülbelül 4500 bázispár hosszú, és rövid,

hiányos (imperfect) inverz ismétlődő szakaszok határolják, és tartalmaz egy transzpozáz gént is. A *Ds* különböző formái az *Ac*-ből keletkeznek, delécióval. A *Ds-a* nagyon hasonló az *Ac*-hez, leszámítva, hogy a transzpozáz gén egy darabjára deléció, ezért nem képes önálló áthelyeződésre. A *Ds-b* elem még jobban lerövidült, és a transzpozáz géneknek csak egy kicsi darabja maradt meg benne. A *Ds-c* elemben pedig csak az *Ac*-vel egyező inverz ismétlődések maradtak meg. Ezek szükségesek ahhoz, hogy a *Ds-c* az *Ac* által irányított transzpozíció célpontja lehessen.

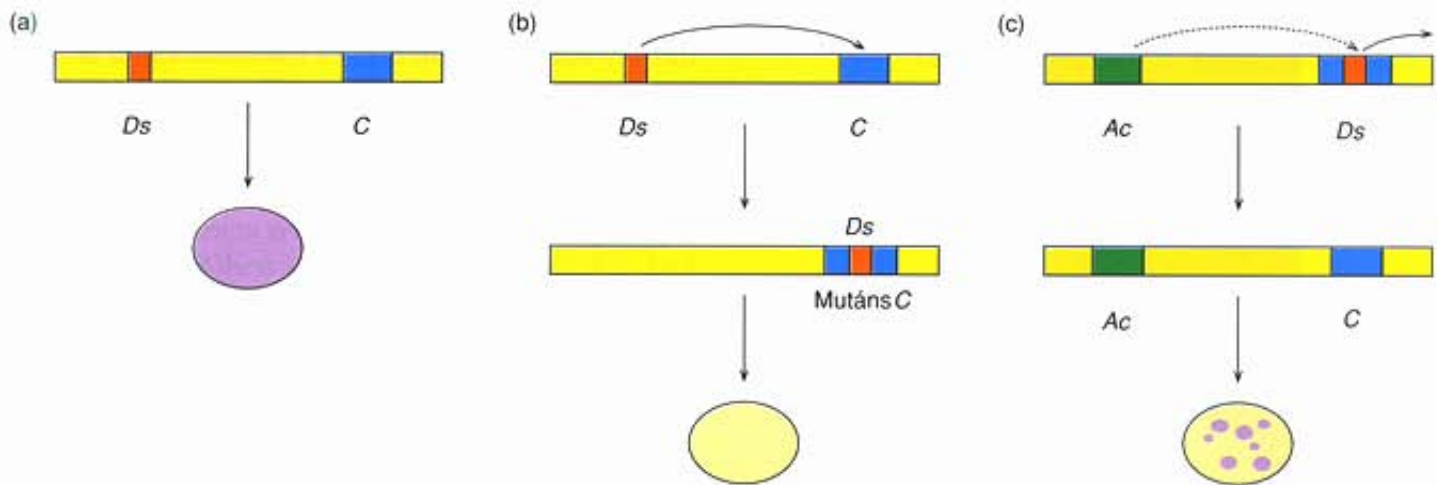
Érdekes, hogy az első borsógén (*R* vagy *r*), amelyet maga Mendel írt le (2. fejezet), és amely a gömbölyű vagy szögletes magforma kialakulását szabályozza, valószínűleg szintén tartalmaz áthelyeződő elemet. Ma már ismert, hogy az *r* lokusz egy olyan enzimet kódol, amely a keményítő-anyagcserében vesz részt, és a keményítőlánc elágazásáért felelős. A szögletes fenotípust hibás génműködés okozza, a mutációt pedig feltehetően az *Ac/Ds* családhoz tartozó 800 bázispárnyi DNS-darab inszerciója váltja ki.

A kukoricaszemek változatos színét a *C* lokuszban egy instabil, többször visszaalakuló mutációja okozza. A mutációt és reverzióját egy *Ds* elem hozza létre úgy, hogy beépül a *C*-génbe, megváltoztatja azt, majd onnan ismét áthelyeződik, és ezzel visszaállítja a vad fenotípust. A *Ds* nem képes önálló transzpozícióra, szüksége van egy autonóm transzpozonra, az *Ac*-re, amely a transzpozázot biztosítja. A *Ds* egy olyan *Ac* elem, amelynek közepéről kisebb-nagyobb rész hiányzik. Minden *Ds* elem áthelyeződéséhez szükség van egy pár inverz terminális ismétlődésre, amelyet az *Ac* transzpozáz felismerhet.

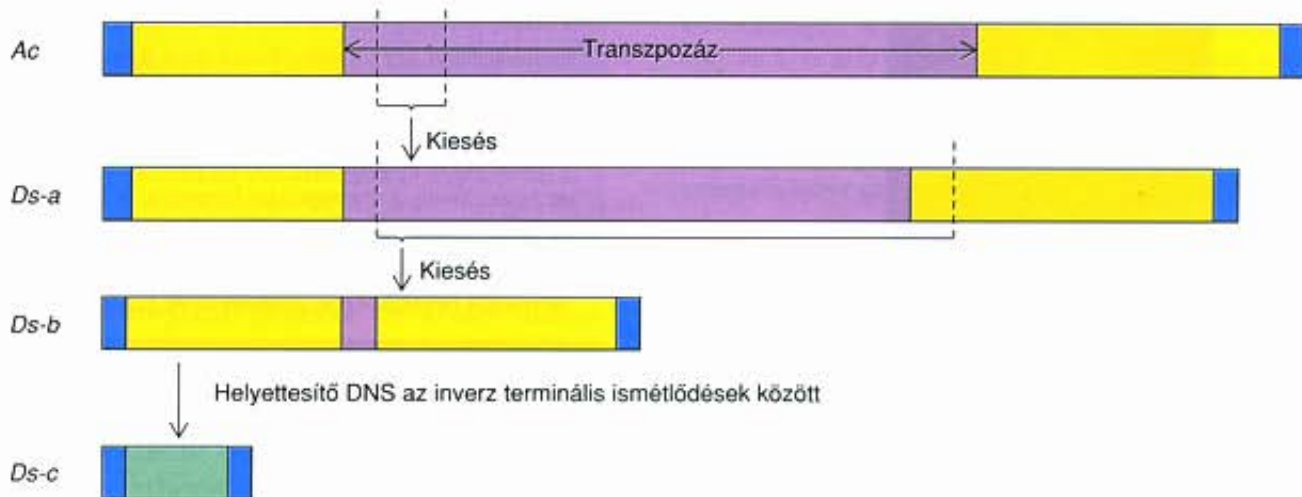
ÉLESZTŐ ÉS *DROSOPHILA* TRANSZPOZONOK

Annak ellenére, hogy a kukorica áthelyeződő elemeit fedezték fel először, mégis az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) és az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) mozgó genetikai elemeit tanulmányozták a legtöbbször. A *Drosophila* transzpozon prototípusa a **kópia**, mert igen sok példányban van jelen. A **kópia** és a vele rokon transzpozonok, a **kópiához hasonló elemek** ténylegesen az ecetmuslica teljes genomjának mintegy 1%-át teszik ki. Hasonló mozgó elemek az élesztőben a **Ty** elemek („transposon yeast”).

Az élesztő és az ecetmuslica transzpozonjainak fizikai szerkezete valamennyire rokon a bakteriális transzpozonokéval. Rendelkeznek az áthelyeződéshez szükséges génekkel, valamint duplikációt okoznak a gazda-DNS valamelyik végén. A Ty például egy olyan 6300 bázispárnyi elem, amelyet a gazda-DNS 5 bázispár hosszú ismétlődései határolnak. Vannak azonban fontosabb különbségek is: a Ty 330 bázispárból álló direkt terminális ismétlődéseket tartalmaz, amelyeket **delta-ismétlődéseknek** nevezünk. Még ennél is fontosabb, hogy a Ty a bakteriális transzpozonoktól erősen eltérő módon helyeződik át. A folyamatban van egy RNS köztes termék, és az egész nagyon emlékeztet az eukarióta vírusok, a **retrovírusok** replikációs sémájához. Egyes retrovírusok rákot okoznak, a HIV (human immunodeficiency vírus) pedig az AIDS-et.



12.15. ábra. Az áthelyeződő genetikai elemek mutációkat és reverziókat okoznak a kukoricában. (a) A vad típusú kukoricaszem C lokusza (kék) aktív, ép, ezért a biborszínű pigment termelődik. (b) Egy Ds elem (piros) ékelődött be a C-génbe, inaktíválta azt, és ezzel megakadályozta a pigment termelődését. A kukoricaszem fehér. (c) Az Ac (zöld) és a Ds elemek egyaránt jelen vannak. Ez számos sejtben lehetővé teszi a Ds elem áthelyeződését a C lokuszról, és ezzel a pigmenttermelő sejtcsoportok kialakulását. A kukoricaszem biborszínű foltjai jelzik a sejtcsoportok jelenlétét



12.16. ábra. Az Ac és a Ds elemek szerkezete. Az Ac a transzpozáz génjét (lila) és két hiányos inverz terminális ismétlődést (kék) tartalmaz. A Ds-a esetében a transzpozáz génből (szaggatott vonalak határolják) hiányzik egy 194 bp méretű régió, de ettől eltekintve szerkezete majdnem azonos az Ac elemével. A Ds-b esetében sokkal nagyobb Ac szakasz hiányzik. A Ds-c csak az inverz terminális ismétlődésekben hasonlít az Ac-re

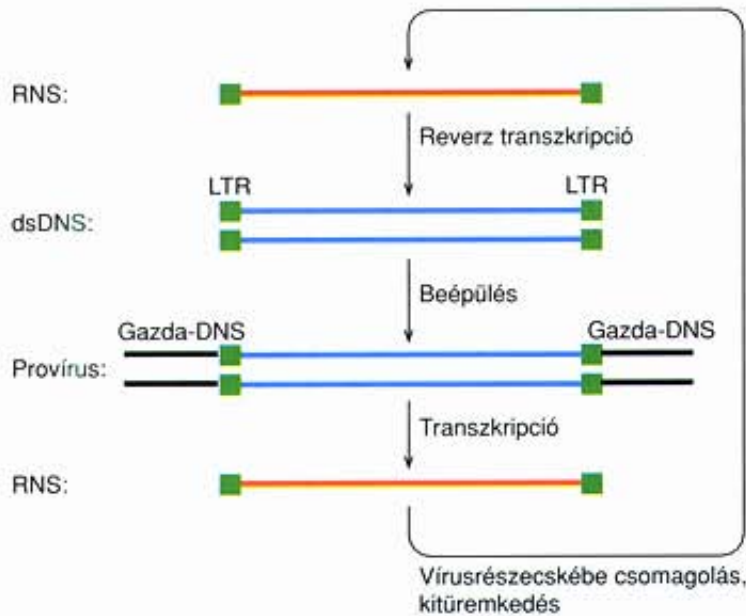
RETROVÍRUSOK

A Ty áthelyeződésének megértéséhez először meg kell ismerkednünk a retrovírusokkal, mert a folyamat nagyon hasonlít a vírusok ezen osztályának replikációjához. Valójában a retrovírusokat transzpozonoknak tekinthetjük annyiban, hogy genomjuk (még pontosabban: genomjuk DNS-kópiái) a gazda-DNS-be véletlenszerűen beépülve található. A 17. fejezetben még részletesebben megvizsgáljuk ezeket az érdekes vírusokat, itt csak áttekintjük replikációs ciklusukat.

Egy retrovírus legszembetűnőbb tulajdonsága – a csoport neve is erre utal –, hogy képes RNS-genomjáról DNS-másolatot készíteni. Ez az RNS → DNS reakció a transzkripció fordítottja, ezért **reverz transzkripciónak** nevezzük. 1970-ben Howard Temin és David Baltimore egyszerre győzte meg az addig szkeptikus tudományos világot, hogy ez a folyamat valóban lejátszódik.

Bizonyítékuk egy vírusrészecskében felfedezett enzim volt, amely a reverz transzkripciót katalizálta, ezért a **reverztranszkriptáz** nevet kapta. Elterjedten használják pontosabb megnevezését is: **RNS-függő DNS-polimeráz**.

A 12.17. ábra a retrovírus replikációs ciklusát mutatja be, és egy sejtet fertőző vírustól indul ki. A vírusban az RNS-genom két kópiája található, amelyeket az 5'-végükönél bázispárok kapcsolnak össze. Amint a vírus behatol a sejtbe, a reverztranszkriptáz a vírus RNS-ről kétfonális DNS-kópiát készít, amelynek mindkét végén ún. **hosszú, terminális ismétlődések**, röviden **LTR** (long terminal repeats) találhatók. Ez a DNS rekombinálódik a gazdasejt genomjával, és létrehozza a vírusgenom integrálódott formáját, a **provírust**. A vírusreplikáció befejezéséhez a gazdasejt RNS-polimeráz II enzime vírus mRNS-eket szintetizál, amelyekről azután transzlációval a vírusfehérjék készülnek. A po-



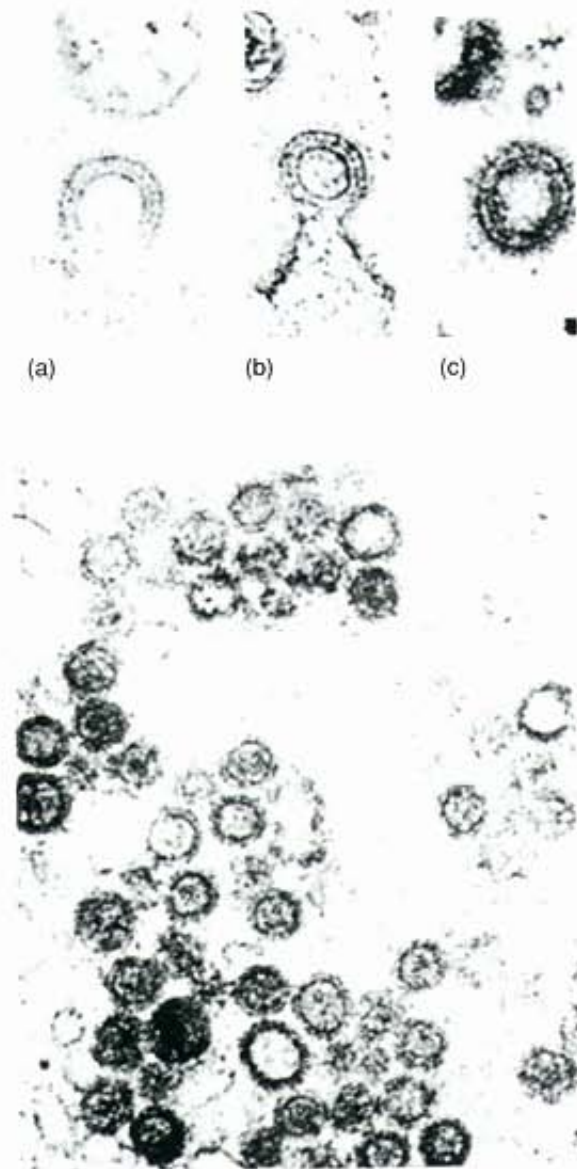
12.17. ábra. A retrovírus replikációs ciklusa. A vírus genomja RNS, hosszú terminális ismétlődésekkel (LTR) (zöld). Az RNS-ről a reverztranszkriptáz egy lineáris, kétszálú DNS-másolatot készít, amely beépül a gazdasejt DNS-ébe (fekete), kialakítva a provírus formát. A gazdasejt RNS-polimeráz II enzime átírja a provírust, és genomális RNS-t készít róla. Ez az RNS vírusrészcskébe csomagolódik, amelyek bimbózásszerű folyamattal kitüremkednek a sejtől, és újabb sejteket fertőznek meg. A szaporodási ciklus előlről kezdődik

limeráz II a provírus teljes hosszúságú RNS másolatait is elkészíti, ezek az új vírusgenomok. Ezek a kromoszomális RNS-ek vírusrészcskébe csomagolódnak (12.18. ábra), amelyek kiszabadulnak a fertőzött sejtől, és új sejteket fertőznek meg.

A Ty retrovírushoz hasonló áthelyeződése

Több bizonyíték is arra utal, hogy a Ty áthelyeződése egy retrovírus replikációjára hasonlít:

1. A Ty egy reverztranszkriptázt kódol. Ez valószínű, mert a Ty *tyb* génje egy olyan fehérjét határoz meg, amelynek aminosavsorrendje hasonló a retrovírusok *pol* génje által kódolt reverztranszkriptázhoz. Ha a Ty valóban egy reverztranszkriptázt kódol, akkor az enzimnek meg kell jelennie, amikor a Ty áthelyeződik. Ezenfelül a *tyb* lokusz mutációi megakadályozzák a reverztranszkriptáz megjelenését. Azok a kísérletek, amelyeket Gerald Fink és munkatársai végeztek, mindkét feltételezést igazolták.
2. A teljes hosszúságú Ty RNS és a reverztranszkriptáz aktivitása olyan részecskével hozható összefüggésbe, amelyek nagyon hasonlítanak a retrovírusokra (12.19. ábra). Ezek a részecskék csak azokban az élesztősejtben jelennek meg, amelyek indukáltak a Ty transzpozíciójára.
3. Végül, Fink a Ty elembe egy intront épített, és egy nagyon elmés kísérletben újra megvizsgálta az elemet a transzpozíció után. Az intron eltűnt! Ez az eredmény



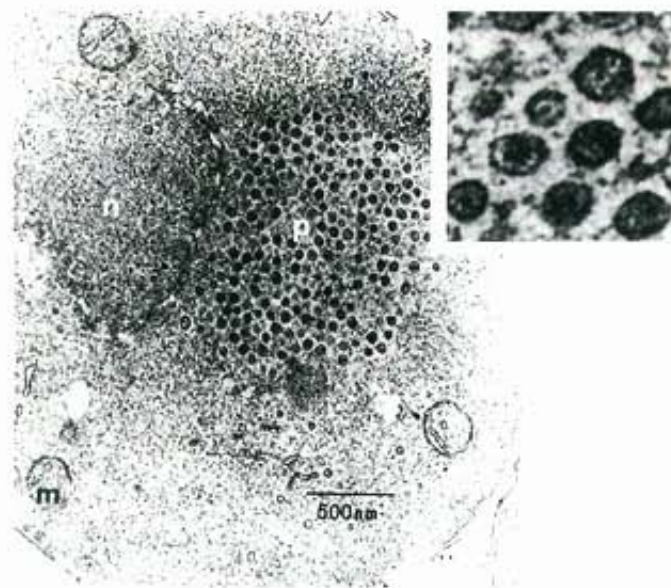
(d)

12.18. ábra. Retrovírusok. (a) B-típusú retrovírus türemkedik ki egy egér emlőráksejtéből. (b) A kitüremkedés későbbi stádiuma. (c) Kiszabadult, de még éretlen B-típusú retrovírus. (d) Sejten belüli, A-típusú retrovírus-részecskék egér emlőráksejtjében

Forrás: Maugh, T. H.: RNA Virus: The Age of Innocence Ends. Science, 183:1181-85, 1974. © AAAS

összeegyeztethetetlen azzal a transzpozíciós úttal, amely a prokariótákra jellemző, amikor is az áthelyeződő DNS éppen olyan, mint az eredeti. A következő mechanizmusnak viszont megfelel (12.20. ábra): A Ty elem először az intronnal együtt átíródik; ezután az RNS-ből kivágódik az intron; végül pedig az RNS egy víruszerű részecskében reverz transzkripcióra kerül, és a keletkező DNS egy új helyre épül be az élesztő genomjába.

A Ty transzpozíció vázolt mechanizmusa és a retrovírus replikációja közötti hasonlóság vezetett a **retrotranszpozon** vagy **retropozon** elnevezésre, amely a Ty és a hozzá hasonló áthe-

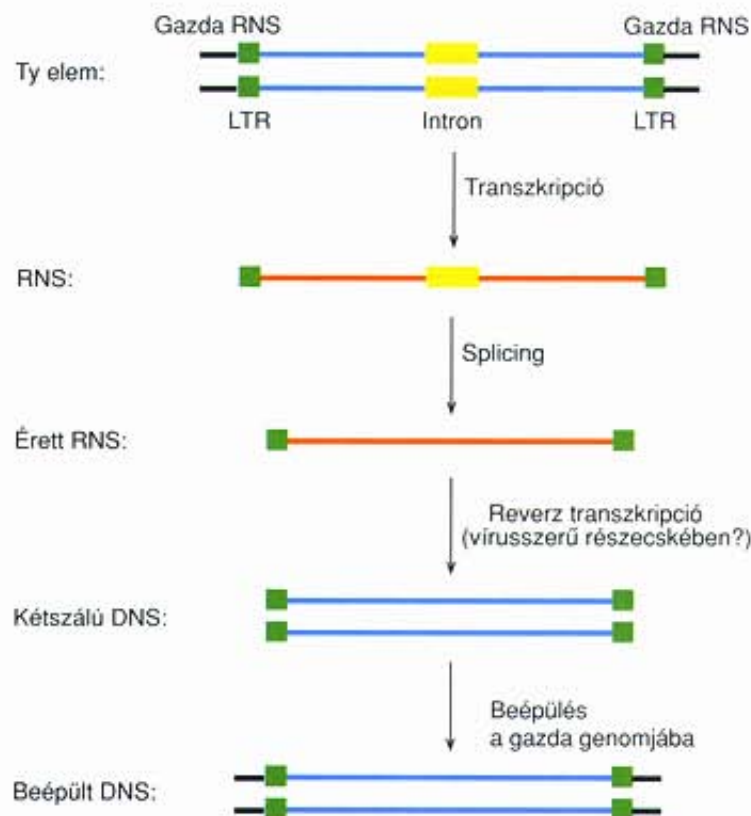


12.19. ábra. Retrovíruszerű részecskék egy Ty transzpozícióra indukált élesztősejtben. Az elektronmikroszkópos felvételen p-vel jelölt részecskék a jobb felső sarokban nagyobb nagyítással is láthatók. A sejtmagot n, a mitokondriumot m jelöli

Forrás: Garfinkle és Boeke: *Retrovirus-like Particles in a Yeast Cell Induced for Ty Transposition*. Cell:42:513, 1985, © Cell Press

lyeződő elemek csoportját jelöli. A kópia és a vele rokon elemek, számos, a Ty-ra jellemző tulajdonsággal rendelkeznek, ezért szintén retrotranszpozonok. A gerinceseknek ugyancsak vannak olyan elemek, amelyek feltehetően retrotranszpozonok. Ezeket azonban a Ty-tól és a kópiától eltérően, nem transzpozíciójuk kapcsán fedezték fel, hanem a retrovírusokhoz hasonló megjelenésük és viselkedésük miatt, leszámítva, hogy nem fertőzőek. Ezek az ún. **A-típusú részecskék**, provirusaik a gerinces genomok 0,3%-át is alkothatják. Esetenként áthelyeződnek és megszakítják a gerincesek géneit. A retrotranszpozonok és a retrovírusok hasonlósága, amelyet a 17. fejezetben bővebben tárgyalunk, arra utal, hogy ezek a genetikai elemek azonos evolúciós eredetűek. Vajon ez azt is jelenti-e, hogy a vírusokhoz hasonló retrotranszpozonok fertőzőek is? Bizonyára nem, mert egy kísérletben sem sikerült más sejteket megfertőzni velük.

Egy retrovírus replikációja során az RNS-genomról reverz transzkripcióval kétszálú DNS készül, ami beépül a gazdasejt genomjába. Ezt követően a gazdasejt RNS-polimeráz II enzimének közreműködésével új RNS-genomok képződnek, amelyek vírusrészecskébe csomagolódnak. Több eukarióta transzpozon, közöttük az élesztő Ty, a *Drosophila* kópia elemei és valószínűleg a gerincesek A-típusú részecskéinek provirusai is, hasonló módon helyeződnek át. Először a gazda genomjában levő DNS-ről RNS-kópia készül, majd erről reverz transzkripcióval – feltehetőleg egy vírushoz hasonló részecskében – DNS szintetizálódik, amely beépül egy új helyre.



12.20. ábra. A Ty áthelyeződésének modellje. A Ty elembe kísérletesen intront építettek be (sárga). A Ty átírása során olyan RNS képződik, amelyben megtalálható az intron. A transzkriptum splicing révén átalakul, majd az érett RNS reverz transzkripcióra kerül, valószínűleg egy víruszerű részecskében. A képződött kétfonális DNS újra beépül az élesztő genomjába (LTR = hosszú terminális ismétlődés)

A reverz transzkripció és az eukarióta genomok evolúciója

Úgy tűnik, hogy a reverz transzkripció fontos szerepet játszott az eukarióta genomok kialakításában. Tény, hogy a transzpozíciónak ez a fajtája árulkodó nyomokat hagyott maga után a genomban, nevezetesen az ún. **érett pszeudogéneket**. A **pszeudogének** általában a normális génekhez hasonló DNS-szekvenciák, de valamilyen okból működésképtelenek. Előfordul, hogy belső translációs stopjeleik vannak; splicing jeleik néha inaktívak vagy hiányoznak; esetleg promotereik működésképtelenek. Rendszerint ezeknek a problémáknak valamilyen kombinációja akadályozza meg expressziójukat. Génduplikációval keletkezhetnek, majd ezután mutációkat halmoztak fel. Ennek nincs káros hatása a gazdaszervezetre, mert az eredeti gén működőképes marad.

Az érett pszeudogének is génduplikációval keletkeznek, de reverz transzkripcióval. Erősen gyanítható, hogy az RNS csak egy köztes termék az érett pszeudogének kialakulásának, mert (1) ezeknek a pszeudogéneknek gyakran rövid poli(dA)-farkuk van, amely az mRNS-ek poli(A)-végéből származtatható; (2) az érett pszeudogénekből hiányoznak az eredeti génben rendszerint meglévő intronok. Úgy tűnik, hogy egyes érett pszeudogének nem az mRNS-ek másolatai. Legismertebb példái ennek a

nagyfokú ismétlődést mutató emberi DNS-szekvenciák, az **Alu szekvenciák**. Nevük arra utal, hogy rendszerint AGCT szekvenciát tartalmaznak, amelyet az *AluI* restrikciós enzim ismer fel. Az ismétlődő DNS-szekvenciák hasonló csoportjai megtalálhatók az egér, a hörsög és más emlősök genomjában is, bár ezek nem feltétlenül tartalmaznak *AluI* hasító helyeket. Az Alu szekvenciák mintegy háromszáz bázispár hosszúságúak, és az emberi genomban körülbelül 300 000-szer ismétlődnek. Nem egy mRNS-sel, hanem egy 7S RNS-nek nevezett kis RNS-sel rokonok. Az Alu szekvenciák gyakorisága azt jelzi, hogy az ember és az egér genomjának legalább 5%-a reverz transzkripcióval keletkezett.

A reverz transzkripció aktívan közreműködött a genomok evolúciójában. Ennek bizonyítékai az érett pszeudogének, amelyekből hiányoznak az intronok, de rövid poli(A)-farkuk van. A nagyfokú ismétlődést mutatót emberi Alu szekvenciák szintén reverz transzkripcióval keletkezettek, és úgy tűnik, hogy nem egy mRNS-ből, hanem egy kis (7S) RNS-ből származnak.

A TRANSZPOZONOK ÉS A KROMOSZÓMÁK MUTABILITÁSA

A *Mu* bakteriofág ismertetésekor kihangsúlyoztuk, hogy a *Mu* fág és más prokarióta transzpozonok a gazda genomjának átrendeződését okozhatják. Az ilyen mutációk magának a transzpozíciónak a melléktermékei, vagy egyszerűen azért jelennek meg, mert a transzpozonok többszörös homológ helyeket hoznak létre a genomban, amelyek azután a homológ rekombináció célpontjai lehetnek. A bakteriális kromoszóma távoli pontjai között fellépő homológ rekombináció zavart okozhat a genomban. Eukariótákban egyenlőtlen crossing over elősegítheti a genom átrendeződését (5. fejezet). Továbbá, ahogy azt a McClintock által felfedezett kukorica transzpozonok is mutatják, a transzpozíció maga is mutációra vezethet az eukarióta génekben.

A *Drosophila* hibrid diszgenézise transzpozon aktivitásának következménye

A **hibrid diszgenézis** jelensége jó példa egy eukarióta transzpozon mutációt indukáló hatására. A hibrid diszgenézis két *Drosophila*-törzs keresztezésekor lép fel, amikor a hibrid utódnemzedék egyedeiben olyan súlyos kromoszómális károsodások vannak, amelyek következtében a hibridek diszgenikusak, más szóval sterilek. A hibrid diszgenézis kialakulása a két szülői vonal kölcsönhatásának eredménye. Az egyik ilyen rendszerben, az ún. **P–M rendszerben** például az apának mindenképpen a **P** (apai – **paternális**) törzshöz, az anyának pedig az **M** (anyai – **maternális**) törzshöz kell tartoznia. M törzsbeli apával és P törzsbeli anyával végzett fordított keresztezés normális utódokat ad, ugyanúgy mint a törzseken belüli keresztezések (P × P vagy M × M).

Miből gondoljuk, hogy transzpozon szerepel a jelenség hátterében? Először is, bármely P hímről származó kromoszóma okozhat diszgenézist egy M nőténnyel végzett keresztezésben. Ezenkívül a részben P hímekből, részben pedig M hímekből származó rekombináns kromoszómák általában diszgenézist okoznak, ami azt jelzi, hogy a P jelleget a kromoszómák sok helyen hordozzák. Margaret Kidwell és munkatársai olyan **P elemeket** vizsgáltak, amelyek a diszgenikus muslicák *white* lokuszába épültek be. Azt találták, hogy ezeknek az elemeknek a bázissorrendje nagyon hasonló, de jelentős eltérések vannak méretükben (mintegy 500 bázispártól 2900-ig). Ezen felül direkt terminális ismétlődő szekvenciájuk volt, és a gazda-DNS rövid direkt ismétlődései határolták őket – mindkét jellegzetesség a transzpozonok sajátja. Végül a *white* mutációk a P elem elvesztésével nagy gyakorisággal visszaalakultak – ami szintén egy transzpozon jellemzője.

Ha a P elemek transzpozonhoz hasonlóan működnek, miért csak a hibridekben helyeződnek át és váltanak ki diszgenézist? A mechanizmus még nem világos, de az M nőtény citoplazmája biztosan hozzájárul valamilyen tényezővel, ami szükséges a P elem áthelyeződéséhez. A P × P keresztezések inaktív, áthelyeződésre nem képes P elemeket hordozó kromoszómákat eredményeznek; az M × M keresztezések utódnemzedéke pedig rendelkezik a P elemek transzpozíciójának képességével, de nincsenek P elemek. Csak akkor jöhet létre a transzpozíció és következhet be a diszgenézis, ha a két tényező, a hímekből a P elem és a nőtényekből az M citoplazma, összekerül.

A hibrid diszgenézisnek fontos következményei lehetnek a speciációban, azaz az új, egymással nem kereszteződő fajok megjelenésében. Ennek oka, hogy ugyanakkor a fajnak két olyan törzse (mint a P és az M), amely gyakran ad steril utódnemzedéket, genetikailag izolálódik, génjeik többé nem keverednek olyan mértékben, és végül annyira eltérőekké válnak, hogy már egyáltalán nem kereszteződhetnek. Amikor ez bekövetkezik, akkor önálló fajokká válnak.

A P elemeket gyakran alkalmazzák mint mutagén ágenseket a *Drosophilával* végzett genetikai kísérletekben. Ennek a megközelítésnek az az egyik előnye, hogy a mutáció helye könnyen azonosítható, mert csak a P elemet kell megkeresni, ami elvezet a megszakított génhez.

A transzpozonok mind az eukarióta, mind a prokarióta kromoszómák mutációra való hajlamát fokozzák. Így például a *Drosophila* hibrid diszgenézisének P–M rendszerét a két tényező együttese okozza: (1) a hímek részéről egy áthelyeződő elem (P), míg (2) a nőtényektől az M citoplazma, amely lehetővé teszi a P áthelyeződését. A P hímek és az M nőtények hibrid utódaiban ezért a P elem sokszoros transzpozíciója történik. Ez káros kromoszómamutációkat okoz, amely a hibrideket sterilé teszi.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Vizsgáljuk meg a *Salmonella* fázisváltási jelenségét. Azonosítsuk a flagellinféleségeket azokban a mutánsokban, amelyekben mutáció miatt a következő gének vagy promoterek inaktíválódtak, és a P_{H2} promotorjuk jobbra néz, mint a 12.12.(a) ábrán: (a) a $H2$ gén; (b) a $H1$ gén; (c) az $rH1$ gén; (d) a P_{H2} promotor; (e) a P_{H1} promotor.

MEGOLDÁS

(a) Ha a $H2$ inaktív, de a transzkripció még folytatódik az $rH1$ -re, akkor a $H1$ sem működhet, és így semmilyen flagellin sem termelődik. (b) Ha a $H1$ inaktív, akkor nem működhet. (Semmiképp nem működhet, mert az $rH1$ terméke represszálja.) Ezért csak $H2$ flagellin keletkezhet. (c) Ha az $rH1$ inaktív, nincs represszor, ami leállítja a $H1$ -et, ezért mindkét flagellin termelődhet. (d) Ha a P_{H2} inaktív, a $H2$ nem nyilvánul meg, és nem termelődik $H2$ flagellin. Ugyanakkor az $rH1$ szintén nem működik a P_{H2} nélkül, tehát a $H1$ megnyilvánul, $H1$ flagellin termelődik. (e) Ha a P_{H1} inaktív, a $H1$ nem működik (semmiképp sem működhet az $rH1$ termékének jelenlétében). Ezért csak a $H2$ flagellin termelődik.

ÖSSZEFOGLALÁS

A mozgó genetikai elemek, más néven transzpozonok, olyan DNS-darabok, amelyek egyik helyről a másikra vándorolhatnak a genomban. Egyes transzpozonok replikálódnak, és egyik kópiájuk az eredeti helyen marad, a másik pedig új helyre kerül. Mások konzervatív módon helyeződnek át, végleg elhagyják az eredeti helyet. A bakteriális transzpozonok a következő típusokba sorolhatók: (1) inszerciós szekvenciák, mint az IS1, amelyek csak az áthelyeződésükhöz szükséges géneket hordozzák két inverz terminális ismétlődés között; (2) a Tn3-mal rokon transzpozonok, amelyek az inszerciós szekvenciákhoz hasonlóak, de legalább egy extra gént, általában antibiotikumrezisztenciát kódoló gént tartalmaznak; (3) az összetett transzpozonok, mint pl. a Tn9, amelynek mindkét végén bonyolult inszerciós szekvenciák vannak; (4) a Mu bakteriofág, amely profág formájában helyeződhet át.

Az eukarióta transzpozonok példái: (1) a kukorica Ds és Ac elemei; (2) az élesztő Ty eleme; (3) a *Drosophila* kópia elemei; és (4) a retrovírusok. Az utóbbi három típus a prokarióta transzpozonoktól nagyon eltérő módon helyeződik át: a gazdasejt RNS-polimeráz II enzime írja át a transzpozont; ez az RNS ezután reverz transzkripcióval kétfonális DNS-sé íródik vissza, valószínűleg egy víruszerű részecskében, végül beépül a gazda genomjának egy új helyére. Valószínűleg hasonló folyamat felelős az érett pszeudogének kialakulásáért – ezek szabályos gének másolatai, amelyekben nincs intron, és gyakran rövid, oligo(dA)-végük is van.

A transzpozonok fokozzák mind a prokarióta, mind pedig az eukarióta genomok mutációra való hajlamát. Közvetlenül károsítják a géneket, amelybe áthelyeződéskor beleékelődnek, kromoszómátörést, transzlokációt és inverziót idézhetnek elő a transzpozíció során. Ezenkívül transzpozíció nélkül is homológ helyeket

biztosíthatnak a homológ rekombinációhoz. Az ilyen rekombináció az egyenlőtlen crossing over miatt komoly kromoszóma-átrendeződésekhez vezethet.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- (a) Minimálisan milyen tulajdonságokkal kell egy transzpozonnak rendelkeznie?
(b) Milyen alkotókat kell feltétlenül hordoznia egy áthelyeződő elemnek ahhoz, hogy olyan sejtbe kerülhessen, amely már egy másik teljes transzpozont tartalmaz?
- Az IS1 transzpozáz génjének mutációi mozgásképtelenné teszik a transzpozont. Mire következtethetünk ebből a megfigyelésből?
- Miért félrevezető elnevezés az „ugráló gén” egyes transzpozonokra?
- (a) Egy bizonyos transzpozon transzpozáz génje lépcsőzetes hasításokat alakít ki a gazdasejt DNS-én öt bázispáryi távolságban. Milyen következményekkel jár ez a gazda DNS-ére, amely körülveszi a beépült transzpozont?
(b) Váolja fel a diagramját, hogyan hat a gazda DNS-ére a lépcsőzetes hasítás?
- Meg szeretnénk határozni a Tn3 transzpozon áthelyeződési rátáját egy antibiotikumrezisztencia génnel nem rendelkező plazmidból egy másikba, amelyik a klóramfenikolrezisztencia génjét tartalmazza. (A Tn3 maga az ampicillinrezisztencia génjét hordozza.) Váolja fel egy kísérletet az áthelyeződés vizsgálatára!
- Képes lehet-e egy, a cél-DNS-ével homológ rekombinációt igénylő transzpozon egynél több vagy kevesebb helyre áthelyeződni annál, mint illegitim rekombinációkor? Miért?
- (a) Melyik a Tn3 transzpozíció két lépése?
(b) Mi a köztes termék neve?
- Azonosítsa a mutáns Tn3 transzpozonok abortív áthelyeződésének végtermékeit a következő génekben:
(a) transzpozáz; (b) resolváz!
- A lizogén Mu fág replikációja éppúgy litikus vagy lizogén, mint a lambda-fágé. Két fontos különbség van a Mu és a lambda-fág litikus replikációjában. Melyek ezek?
- Milyen közegészségügyi jelentősége lehet a bakteriális transzpozonoknak?
- Az A plazmid TnT transzpozonja áthelyeződött a B plazmidba. Hány TnT kópia van a kointegrátumban? A két plazmidot figyelembe véve, ezek hol helyezkednek el?
- Ha a kukorica Ds eleme is a Tn3 mechanizmusával helyeződne át, akkor is ugyanilyen nagy gyakorisággal találnánk foltos kukoricaszemeket? Indokolja a választ!
- Tegyük fel, van két sejtmentes transzpozíciós rendszerünk, amely minden enzimet tartalmaz a Tn3, illetve a Ty

áthelyeződéséhez! Milyen hatással lennének a következő inhibitorok ezekre a rendszerekre, és miért:

- (a) a kétfonális DNS replikációjának inhibitorai;
(b) transzkripció inhibitorok; (c) a reverz transzkripció inhibitorai; (d) a transláció inhibitorai?
14. Tegyük fel, hogy a Ty a Tn3-mal analóg mechanizmussal helyeződik át! (Természetesen nem így történik.) Azt is feltételezzük, hogy egy intront

épített be a Ty elembe. Milyen lenne az elem az áthelyeződés után?

15. Azonosított egy új áthelyeződő elemet, és azt Rovernek nevezte el, mert gyanítja, hogy Rover a retrovirusok replikációjával analóg módon helyeződik át. Sikerült beleépítenie egy intront. Mi lehet az intron sorsa a transzpozíció alatt?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

13.

F E J E Z E T

A baktériumok és fágok genetikája

Tanulási program

- 1 Egy baktérium egy másik baktériumsejtnek konjugációval géneket adhat át.
- 2 A konjugáció az átadott gének térképezésére használható.
- 3 A fágok géneket szállítanak a baktériumok között, ami segít a gazdasejtek genetikájának megértésében.
- 4 A fágok génjeinek térképezése.
- 5 A finomtérképezés átfedő géneket mutatott ki a fágokban.

*Je cherche à comprendre.
(Próbálom megérteni.)*

Jacques Monod Nobel-díjas
francia genetikus utolsó szavai
1976. május 31-én

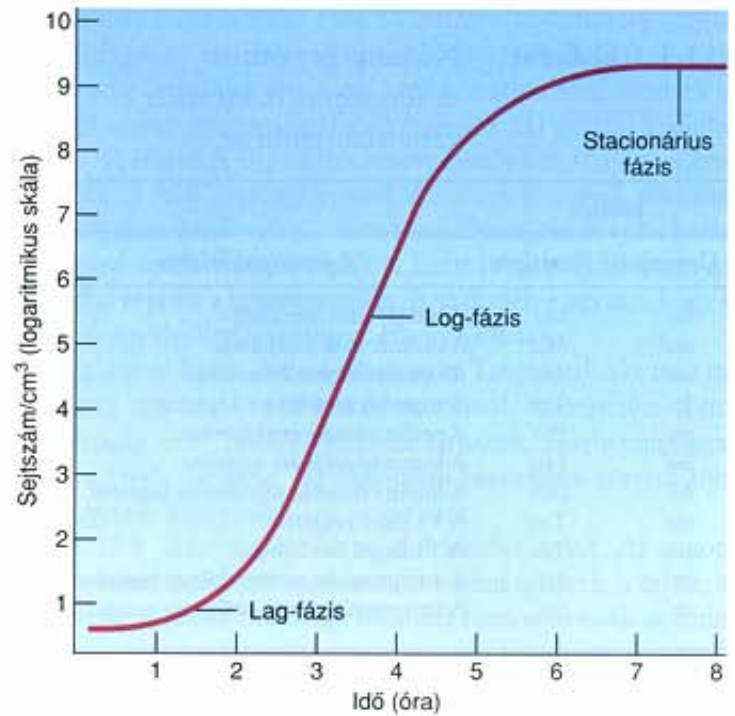
A baktériumoknak és vírusaiknak, a fágoknak a genetikáját csak az 1940-es években kezdték el tanulmányozni, de ennek ellenére nagyon sok ismeret gyűlt össze róluk, melyek magukban foglalják mindannak a lényegét, amit molekuláris genetikának nevezünk. Már eddig is nagyon sokszor hivatkoztunk az *Escherichia coli*-ra, a bakteriális genetikára kedvelt modelljére. Miért válhatott ez az egyszerű bélbaktérium ilyen fontos eszközzé a genetikai vizsgálatokban? Ennek egyik oka éppen egyszerűsége. Génjeinek száma mindössze háromezer körül van, szemben az ember mintegy száz-ezer génjével! Ráadásul az emberi DNS nagy részét nem-kódoló szekvenciák alkotják. Még egyértelműbb a helyzet, ha összehasonlítjuk az *E. coli*-sejtek $4,2 \times 10^6$ bázispáryi genomját az ember sejtjeinek majdnem ezerszeres, 3×10^9 bázispáryi genomjával. Az *E. coli* másik előnyös vonása, hogy teljes életeciklusa során haploid, ezért azok a mutációk, amelyeket a diploid sejtekben elfedhet egy másik allél, a baktériumokban tisztán megjelennek. Ezért gyakran úgy valósítható meg a kívánt fenotípus gyors szelektálása, hogy egyszerűen olyan körülményeket teremtünk, amikor minden más sejt elpusztul. Különösen fontos a genetikai vizsgálatokban az is, hogy a baktériumok rendkívül gyorsan szaporodnak.

Ideális növekedési feltételek mellett az *E. coli*-sejtek húszpercenként osztódnak. 30 g induló tömegű, ilyen növekedési ütemű baktériumtenyészet nem egészen másfél nap alatt elérné, sőt meghaladná a Föld tömegét! A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy egyetlen *E. coli*-sejt egy éjszaka alatt – még viszonylag kedvező körülmények között is – látható teleppé növekszik, amelyben sejtek milliói vannak. Ezért az *E. coli*-al végzett genetikai kísérletek rendszerint egy-két napig tartanak, míg például a kukoricával akár hónapokig is. Nem csoda hát, hogy az *E. coli* genetikájáról annyival többet tudunk, mint a kukoricáról, annak ellenére, hogy az utóbbit sokkal régebben kezdték vizsgálni.

Tény, hogy a baktériumokon és a bakteriofágokon végzett genetikai kutatások alakították ki a génekről és azok működéséről szerzett fogalmainkat. Mivel minden élő szervezetben – a baktériumoktól egészen az emberig – DNS az örökítőanyag, a prokarióták körében szerzett tudás és tapasztalat sokszor kiterjeszhető a magasabb rendű szervezetekre is, de legalábbis alapot jelent azok tanulmányozásához. Az elméleti keretek megteremtése mellett a baktériumok adtak lehetőséget a rekombináns DNS-technológia eszközeinek kifejlesztéséhez is, amelyek kulcsfontosságúak minden élő szervezet genetikájának kutatásában.

A BAKTÉRIUMOKKAL VÉGZETT KÍSÉRLETI MUNKA ALAPJAI

A baktériumokat kétféle módon tenyészthetjük: szuszpenziós kultúrában vagy szilárd táptalaj felszínén. A munka általában szuszpenziós tenyészetrel kezdődik, egy olyan tenyésztedényben, leggyakrabban lombikban, amelyben a folyékony táptalaj mindazokat az anyagokat tartalmazza, amelyekre a baktériumsejteknek szükségük van a növekedésükhöz. A táptalajt beoltjuk a



13.1. ábra. Szuszpenziós baktériumtenyészet szaporodási görbéje. A milliliterenkénti sejtszám a szuszpenzió turbiditásából becsülhető



13.2. ábra. Agaros táptalajon növekvő *E. coli*-telepek

© Dr. Jeremy Burgess/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.

baktériumokkal, azaz néhány baktériumsejtet viszünk a táptalajba, majd az edényt megfelelő hőmérsékleten rázógépen mozgatjuk, olyan intenzitással, hogy a lombikban a folyadék keveredése révén elegendő levegő kerüljön a táptalajba (aerob baktériumok esetében). A szuszpenziós tenyészetekben a baktériumok három növekedési fázison mennek keresztül (13.1. ábra). Az első stádium az ún. **lag-fázis**, a lassú növekedési szakasz, ekkor a baktériumok alkalmazkodnak az új közeghez. Ezután következik a **log-fázis**, ekkor a sejtek exponenciálisan szaporodnak. Végül, az ún. **stacionárius fázisban** a táptalaj készleteinek kimerülése miatt a növekedés leáll.

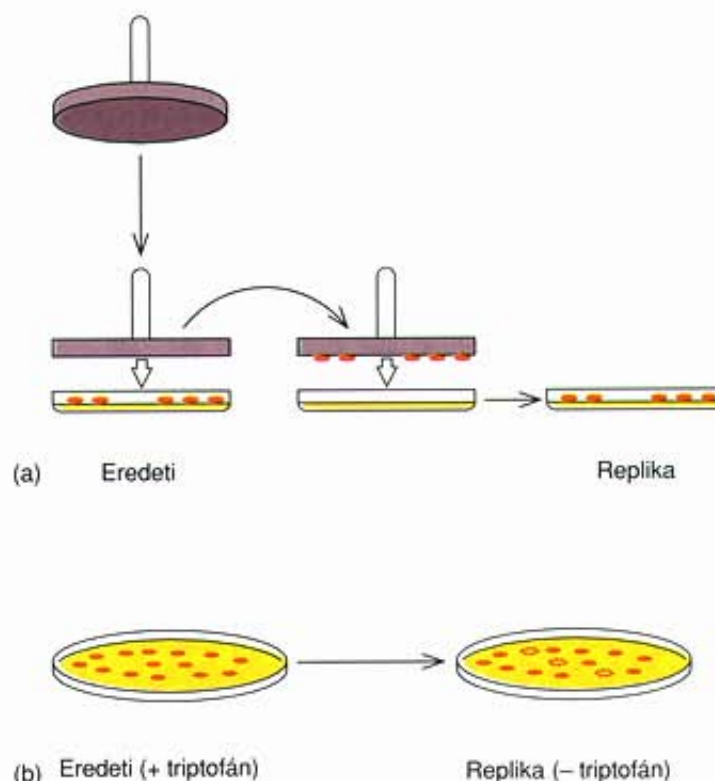
13.1. táblázat. Néhány genotípus és fenotípus bakteriális genetikai jelölése

Jelölés		
Genotípus	Fenotípus	A fenotípus leírása
<i>lac⁻</i>	Lac ⁻	A laktózt nem hasznosítja.
<i>mal⁻</i>	Mal ⁻	A maltózt nem hasznosítja.
<i>ara⁻</i>	Ara ⁻	Az arabinózt nem hasznosítja.
<i>trp⁻</i>	Trp ⁻	A triptofán szintézisére képtelen.
<i>pro⁻</i>	Pro ⁻	A prolin szintézisére képtelen.
<i>leu⁻</i>	Leu ⁻	A leucin szintézisére képtelen.
<i>bio⁻</i>	Bio ⁻	A biotin (vitamin) szintézisére képtelen.
<i>ton⁺</i>	Ton ⁺	A T1 fāgra rezisztens.
<i>ton⁻</i>	Ton ⁻	A T1 fāggal fertőzhető.
<i>str^r</i>	Str ^r	A sztreptomycin antibiotikumra rezisztens.
<i>str^s</i>	Str ^s	A sztreptomycin antibiotikumra szenzitív.

A baktériumok szilárd táptalaj felületén is képesek szaporodni. A többnyire **agartartalmú** tápközeget Petri-csészében készítik elő. (Az edény neve Julius R. Petri német bakteriológus emlékére.) Az agar tengeri algából kinyert poliszacharid, amely a táptalaj sterilizálásakor alkalmazott magas hőmérsékleten folyékony, de a tenyésztési hőmérsékleten gellé dermed. A baktériumokat a gél felszínére szélesztjük vagy csikozzuk (csikokban felkenjük). A körülményektől függően egy baktériumsejtből 14–16 óra alatt a sorozatos osztódások eredményeként telep fejlődik (13.2. ábra).

A vad típusú baktériumok **minimál táptalajon** növeszthetők. A minimál táptalaj csak sókat és glükózt tartalmaz, a vad típusú baktériumok az összes aminosavat és vitaminokat képesek előállítani. Az ilyen szervezeteket **prototrófoknak** nevezik (11. fejezet). Azok a mutánsok, amelyek nem képesek egy vagy több tápanyag előállítására, az **auxotrófok**. Genetikai jelölésekben egyértelműen megkülönböztetik a prototróf, más szóval vad típusú szervezeteket az auxotrófoktól. A gének vagy operonok nevét *dőlt kisbetűvel* írják (pl. *ara* operon). Amikor egy baktériumsejt genotípusát adják meg, + jellel látják el a vad típust, – jellel a mutáns. Például a leucin operonjában mutáns baktérium a *leu⁻*, míg a *lac* operonján vad típus a *lac⁺*. A baktériumok fenotípusát nagybetűvel jelölik: Leu⁺, illetve Lac⁺, ami arra utal, hogy az első törzs sejtjei nem tudnak leucint szintetizálni, míg a másodikba tartozók képesek felhasználni a laktózt. A 13.1. táblázatban néhány gyakori bakteriális fenotípus felsorolása található.

Az előzőekben már említettük, hogy a baktériumok haploidok, ezért jól szelektálhatók az adott fenotípusra. A tenyésztési feltételek megszabásával biztosíthatjuk, hogy csak a kívánt fenotípus növekedjen, míg az attól eltérőek ne. Szelektálhatunk olyan sejtekre, amelyek képesek előállítani bizonyos anyagokat, például valamilyen aminosavat. Szelektálhatunk például a *trp⁺* sejtekre, ha a sejtek keverékét olyan táptalajon növesztjük, amelyben nincsen triptofán. A *trp⁺* sejtek képesek növekedni, osztódni, telepeket képezni, a *trp⁻* sejtek azonban nem. Hasonlóan, sztreptomycinrezisztens *str^r* sejtekre szelektálhatunk sztreptomycin tartalmazó táptalajon, amelyen csak a *str^r* képes növekedni. Mindez felveti a szelekció és a szűrés (screen) közötti különbséget. **Szelekciót** végzünk, ha olyan körülmények kö-



13.3. ábra. Baktériumok replikatesztje. (a) A bársonnyal borított replikatuskót a baktériumtelepeket tartalmazó első táptalaj felszínéhez érintjük. Mindegyik telepből sejtek tapadnak a bársony felszínére, és így eredeti pozíciójuknak megfelelően átvihetők a másolatot adó új táptalajra. (b) *trp⁻* sejtek keresése: az eredeti lemez triptofánt tartalmaz, ezért minden telep növekedhet rajta. A replika táptalajában viszont nincs triptofán, ezért a szaggatott körökkel jelzett *trp⁻* telepek nem képesek növekedni. Az auxotróf telepeket az eredeti táptalajról kiválaszthatjuk

zött tenyésztjük a sejteket, amelyek csak a kívánt genotípusú sejtek növekedését teszik lehetővé. Azaz *str^r* sejtekre szelektálunk, ha sztreptomycin tartalmazó táptalajon növesztjük a sejteket. Ezzel szemben szűrés (screen) végzünk, amikor egyes sejteket (vagy telepeket) sorozatos tesztekkel ellenőrizzük, hogy az-e a fenotípusuk, amit kívánunk. Erre gyakran szükség lehet, amikor egy auxotrófot, pl. egy *trp⁻* vonalat szeretnénk izolálni. Az egyes kolóniákat két különböző táptalajon vizsgáljuk, az egyikben jelen van, a másikkól hiányzik a triptofán. A módszerrel kiszűrhetjük azokat a kolóniákat, amelyek növekednek az aminosavat tartalmazó táptalajon, de nem növekednek aminosav hiányában. Ehhez hasonló esetekben egy másik technikát is alkalmazhatunk, az ún. replikamódszert (13.3. ábra). A replikázó tuskót finom, bolyhos bársonnyal vonjuk be, és óvatosan annak a tenyészetnek a felszínéhez érintjük, amelyiken az összes sejt növekedett, mert a táptalaj triptofánt tartalmazott. Hozzáérintjük a bársony felszínét egy olyan Petri-csészéhez, amelyben triptofánt nem tartalmazó táptalaj van. Ezzel az első táptalajon növekedő telepekről a bársonyra rátapadó sejteket átvihetjük a másodikra, mégpedig pontosan ugyanolyan elrendezésben, ahogyan azok az első tenyészetben nőttek. Majd megkeressük azokat a telepeket, amelyek a második lemezen nem növekedtek, vagyis auxotrófok. A további munkához ezeket az eredeti táptalajról olthatjuk le. A leírtakból látszik, hogy a szűrés (screen) hosszabb és munkaigényesebb a szelekciónál, és ezért ha lehetséges, szelekciós rendszereket alkalmazunk.

A baktériumokat folyékony vagy szilárd táptalajon tenyészthetjük. A prototrófok növekednek a minimál táptalajon, az auxotrófoknak azonban kiegészítésként olyan anyagokra van szükségük, amelyeket nem képesek önállóan előállítani. A tenyésztési feltételek meghatározásával a kiválasztott genotípusra szelektálhatunk egy baktériumkeverékből úgy, hogy a nem kívánt genotípusok növekedését lehetetlenné tesszük. Amikor a közvetlen szelekció nem megoldható, az egyes telepek szűrésével (screen) kereshető ki a kívánt típus.

A BAKTERIÁLIS KONJUGÁCIÓ

A baktériumok minden előnyös vonásuk ellenére használhatatlanok lennének genetikai eszközként, ha nem tudnánk velük genetikai kísérleteket végezni. Más szóval, valamilyen módon tudnunk kell keresztezni őket. Joshua Lederberg és E. L. Tatum 1946-ban kidolgoztak erre egy módszert. Lederberg abból indult ki, hogyha a baktériumok valóban kicserélik DNS-üket, akkor az kimutatható, vagyis két különböző mutáns törzs összekeverése után azonosítani lehet a vad típusú rekombinánsokat.

BAKTERIÁLIS DNS-ÁTADÁS

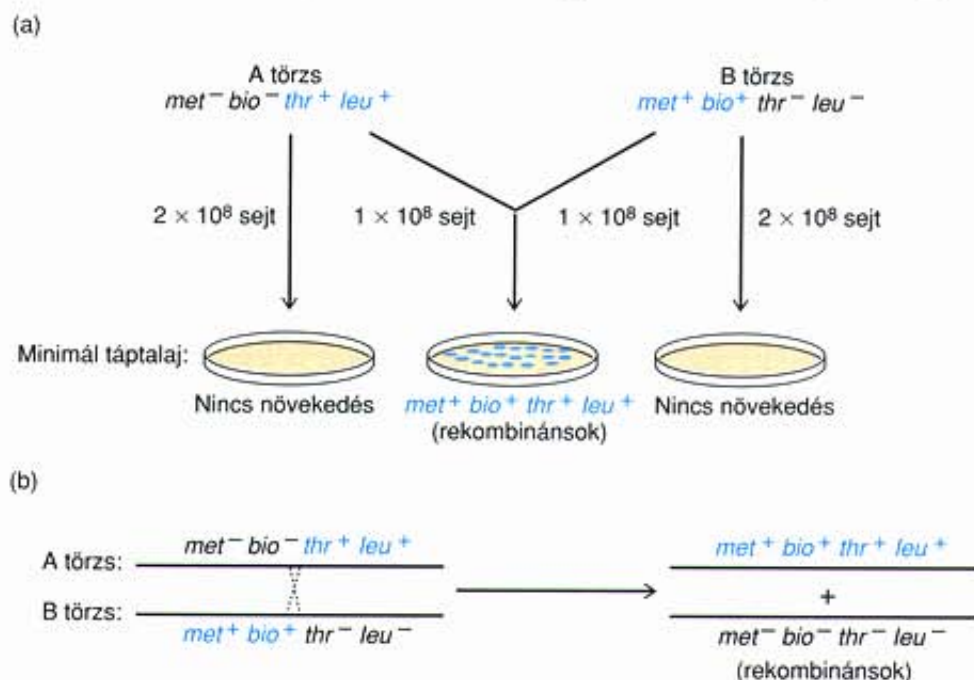
Annak eldöntésére, hogy a baktériumok képesek-e genetikai információjuk kicserélésére, Lederberg két auxotrófot kívánt keresztezni egymással, majd a vad típusú rekombinánsokat azonosítani. De előre látta, milyen nehézséget jelent egyetlen mutáns gént hordozó

auxotrófokkal kísérletezni. Ezek a mutánsok ugyanis elég nagy valószínűséggel revertálnak vad típusú (egy a millióhoz), a revertánsokat pedig össze lehet tévesztetni a rekombinánsokkal, amelyek körülbelül azonos gyakorisággal fordulnak elő. Ha például Lederberg két (A^+B^- , illetve A^-B^+) törzset keresztezett volna, majd megkereste volna az A^+B^+ rekombinánsokat, az egyes törzsek revertánsai ugyanolyanok lettek volna, mint a rekombinánsok, és ezzel értékelhetetlenné tették volna az analízist. Ezért Lederberg kétszeres mutánsokkal végezte a keresztezéseket. Annak esélye ugyanis, hogy két mutáció egyidejűleg revertáljon, elhanyagolható.

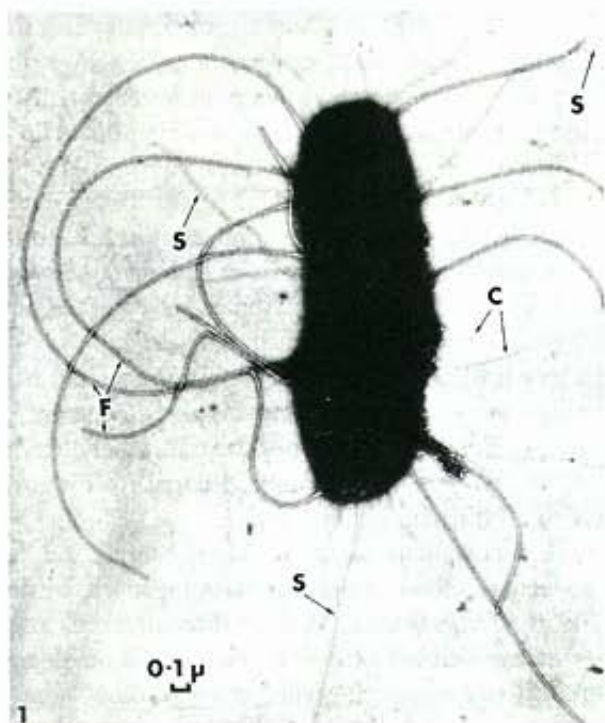
Ez a terv hozta össze Lederberg-et Tatummal, aki már rendelkezett egy sor *E. coli*-kettős mutánsal. Szerencsére Tatum baktériumai az *E. coli* K12 törzsébe tartoztak, amely ténylegesen képes a DNS cseréjére. Az akkoriban használatos törzsek többsége ugyanis alkalmatlan lett volna erre.

A 13.4. ábra mutatja be az első kísérlet tervét. Az auxotróf törzsek közül az A törzs metionint és biotint igényelt, a másik, a B törzs pedig treonint és leucint. Mindkét törzs növekszik az aminosavakat és vitaminokat tartalmazó komplett táptalajon, de nem fejlődik minimál táptalajon. Ha pedig az egyik törzs képes átadni DNS-ét a másiknak, feltehetően kialakulnak olyan rekombinánsok, amelyekben összekerülnek a thr^+ és leu^+ vad típusú gének az A törzsből, valamint a met^+ és bio^+ gének a B törzsből. Az ilyen prototróf rekombinánsok pedig minimál táptalajon is növekednek. Lederberg és Tatum pontosan ezt tapasztalta. A két auxotróf keverékében tízmillió sejtől egy lett prototróf. Ha pedig a két auxotróf törzset külön-külön nevelték, nem keletkeztek prototrófok.

Ez a kísérlet igazolta, hogy a két auxotróf mutáns DNS-e keveredett és rekombinánsodott, de nem bizonyította egyértelműen, hogy a DNS közvetlenül jut-e át egyik sejtől a másikba. Előfor-



13.4. ábra. Klasszikus bakteriális konjugációs kísérlet: (a) Két auxotróf törzset (A és B) keverték össze. Az A törzs genotípusa $met^- bio^- thr^+ leu^+$, a B törzsé pedig $met^+ bio^+ thr^- leu^-$ volt. Minimál táptalajon egyik törzs sem tudott szaporodni, amikor azonban összekeverték őket, prototróf rekombinánsok jelentek meg ($met^+ bio^+ thr^+ leu^+$), amelyek a minimál táptalajon is növekedtek. Ezek alkotják az ábra középső Petri-csészéjében a telepeket. (b) Rekombinációs esemény, amely prototrófok kialakulásához vezet. Crossing over következett be a *bio* és *thr* gének között, így az egyik kromoszómára kerültek a vad típusú, a másikra a mutáns allélok

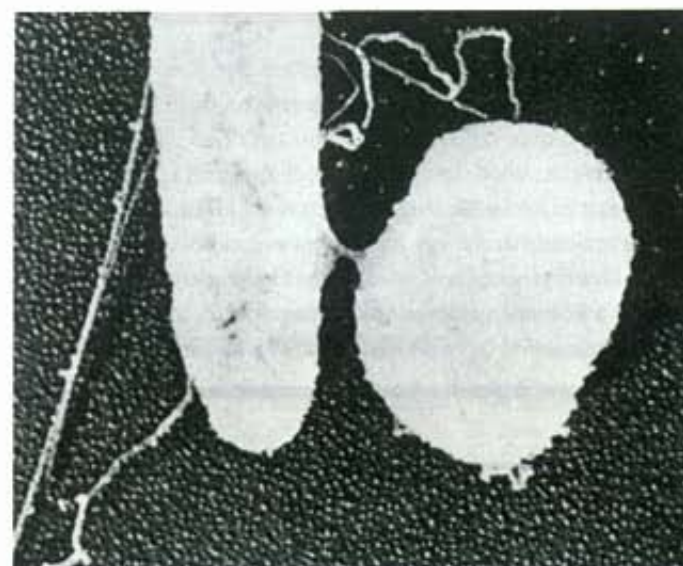


13.5. ábra. *E. coli*-sejt szexpilusokkal. A sejt felszínéről háromféle fonalas szerkezet nyúlik ki: a közönséges pilusok (C), a flagellumok (ostorok, F) és a szexpilusok (S)

Forrás: Meynell, E., Meynell, G. és Datta, N.: *Bacteriological Reviews*, 32:58, 1968 © American Society of Microbiology

dulhatott volna az is, hogy az egyik auxotróf sejtje felhasadt és annak DNS-e transzformálta a másikat, ahogyan azt Griffith és Avery kísérleteiben a *Streptococcus pneumoniae* esetében láttuk (6. fejezet). Hogy ezt kizárhassák, Lederberg és Tatum az egyik törzset lizálta, majd szűrte, hogy az épen maradt sejteket eltávolítsa. Ezt a sejtmentes, DNS-tartalmú szűrletet használták arra, hogy megállapítsák, transzformálja-e a másik törzset, de nem tapasztaltak transzformációt. Ebből arra következtettek, hogy az eredeti kísérletben a két baktériumtörzs egyedei közvetlen érintkezéssel cseréltek DNS-t.

A baktériumok közvetlen érintkezése a **konjugáció**, amit az egyik baktérium felszínén kialakuló csöves szerkezet, az ún. szexpilus tesz lehetővé (13.5. ábra). A szexpilust újabban **F pilusnak** is nevezik (F^- fertilitás, termékenység). Az eredeti kísérletben az A törzs sejtjein volt az F pilus, és genomjában feltehetőleg valamilyen fertilitási faktor is lehetett, így F^+ jelölést kapott. A B törzsen nem volt F pilus, fertilitási faktora hiányzott, ezért az F^- jelzést kapta. A 13.6. ábra két konjugációban lévő baktériumot mutat be, az F pilussal összekapcsolódva. A pilus belül üreges, és elvben lehetővé teszi a DNS átjutását. A konjugáció során azonban megrövidül, ezért úgy tűnik, nem a DNS közvetlen átvezetésére szolgál, hanem mint összehúzóásra képes elem, közelíti egymáshoz a két sejtet, így a DNS valamilyen más úton átjuthat a membránokon.



13.6. ábra. Konjugáló *E. coli*-sejtek. A bal oldali, hosszúkás alakú donorsejtet konjugációs csatorna köti össze a kerek recipienssel

Forrás: Wollman, E. L. Jacob, F., Hayes, W.: *Symposia on Quantitative Biology*, 21:153, 1956, Cold Spring Harbor

Konjugáció alatt a DNS átadása egyirányú

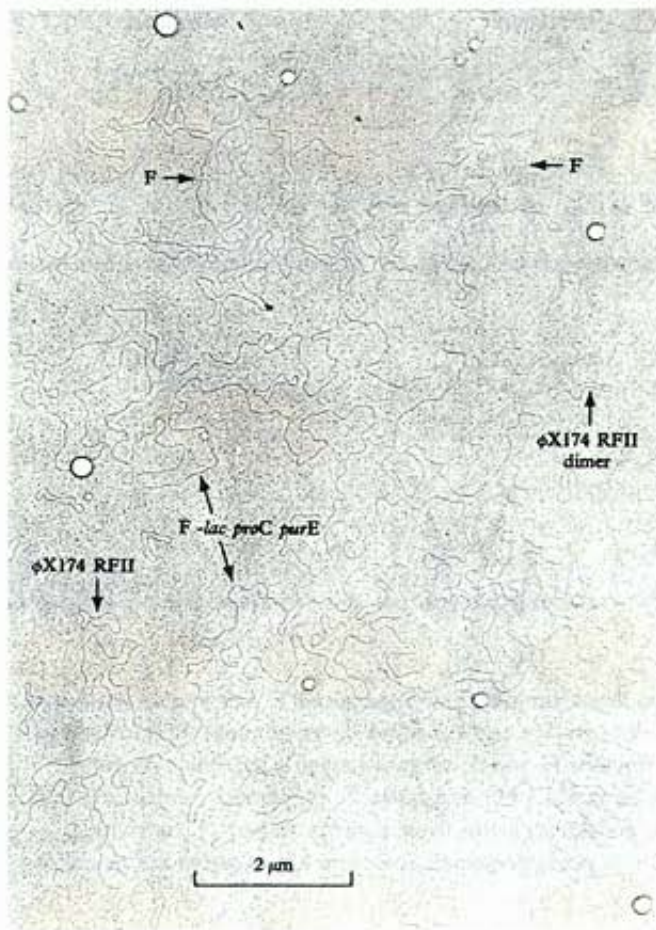
Lederberg és Tatum kísérleteiket a klasszikus keresztezésekre alkalmazott kifejezésekkel magyarázták, és feltételezték, hogy a rekombináns prototrófok igazi diploidok. De William Hayes és mások bizonyították, hogy ez nem lehetséges. Először kimutatták, hogy az F^+ partnert el lehet pusztítani sztreptomocinnal, és a konjugáció mégis végbemegy. Ha azonban az F^- partnert kezelték, konjugáció nem következett be. Ez arra enged következtetni, hogy az F^+ partner a donor, és még a sztreptomocin kezelés, a sejt pusztulása után is fennmaradt ez a működés. Ezzel szemben az elpusztított F^- recipiens nem vehette át a géneket. Ráadásul, ha az F^+ donor genomja több lokuszon is különbözött az F^- recipiens genomjától, a rekombinánsokban a recipiens alléljai voltak nagy többségben. Ez pedig azt jelezte, hogy a donor rendszerint genomjának csak egy részét adja át a recipiensnek.

Ezért úgy tűnik, hogy ezek a szervezetek ritkán viszik át teljes genomjukat, és lesznek valóban diploidok. Rendszerint részleges diploidokat, ún. **merodiploidokat** vagy **merozigótákat** képeznek. Ugyanakkor a konjugáció a baktériumoknál hasonló előnyökkel jár, mint az ivaros szaporodás a magasabb rendűeknél. Lehetővé teszi új allélkombinációkat hordozó, a szülőktől eltérő rekombináns szervezetek kialakulását. Ezek az új kombinációk pedig alkalmasabban tehetik a rekombinánsokat a túlélésre és a szaporodásra.

Az F faktor egy plazmid

Hayes arra is felfigyelt, hogy egy F^+ sejt nagyon hatékonyan tud egy F^- sejtet F^+ -vá alakítani, körülbelül tízből egyet. Más gének átvitelének gyakorisága ezzel szemben egy a tízmillióhoz! Eszerint az F faktor nagyon könnyen átkerül, valószínűleg másféle mechanizmussal, mint az egyéb gének. Honnan tudjuk, hogy az

Két mutáns (auxotróf) baktériumtörzs sejtjei közvetlen érintkezés útján átadhatják DNS-üket, és vad típusú (prototróf) rekombinánsokat hozhatnak létre. Ez a folyamat a konjugáció.



13.7. ábra. Az F plazmid. Az elektronmikroszkópos felvételen két cirkuláris F plazmid látható más, eltérő méretű, gyűrű alakú DNS-molekulák között

Dr. Richard Deonier

F faktor génekből áll? Egy kísérletben F^+ *E. coli*-sejteket egy olyan másik baktériumfaj (*Serratia marcescens*) sejtjeivel keverték el, amelyek eltérő sűrűségű DNS-t tartalmazott. Konjugáció után újfajta DNS jelent meg a recipiens sejtben, aminek sűrűsége az *E. coli* DNS-ének, és nem a recipiensének felelt meg. Ennek az új DNS-nek az F faktornak kellett lennie, hiszen a konjugáció során az adódik át könnyen. Látjuk majd, nem igazi konjugáció ez, mert csak egy csekély DNS-mennyiség, az F faktor adódott át a donor *E. coli*tól a recipiens *S. marcescens*nek. További kísérletek mutatták ki azt, hogy az F faktor **plazmid**, vagyis a gazdasejt kromoszómájától függetlenül replikálódó, cirkuláris alakú extrakromoszomális DNS (13.7. ábra). Mérete mintegy 2%-a a gazdasejt kromoszómájának, 94 500 bázispár (94,5 kb). Most, hogy tisztáztuk, mi is valójában az F faktor, **F plazmidnak** nevezzük, és a fertilitás átadását egyszerűen úgy tekintjük, mint az F plazmid átadását az F^+ sejtől egy F^- sejtbe.

Az F^+ *E. coli* fertilitása a 94,5 kb méretű F plazmid jelenlétének következménye. A plazmid nagy gyakorisággal átmehet az F^- baktériumokba.

HFR TÖRZSEK

Az 1950-es években több kutató is felfedezett egy új *E. coli* típust a már ismert F^+ és F^- sejtek mellett. Az új típus a **Hfr** nevet kapta („high-frequency recombinant”, azaz „nagy gyakorisággal rekombinálandó”). A Hfr baktériumok olyan mutáns F^+ törzsek, amelyek elveszítették a fertilitás gyakori átadásának képességét, ehelyett a gazda kromoszomális géneit viszik át nagy gyakorisággal.

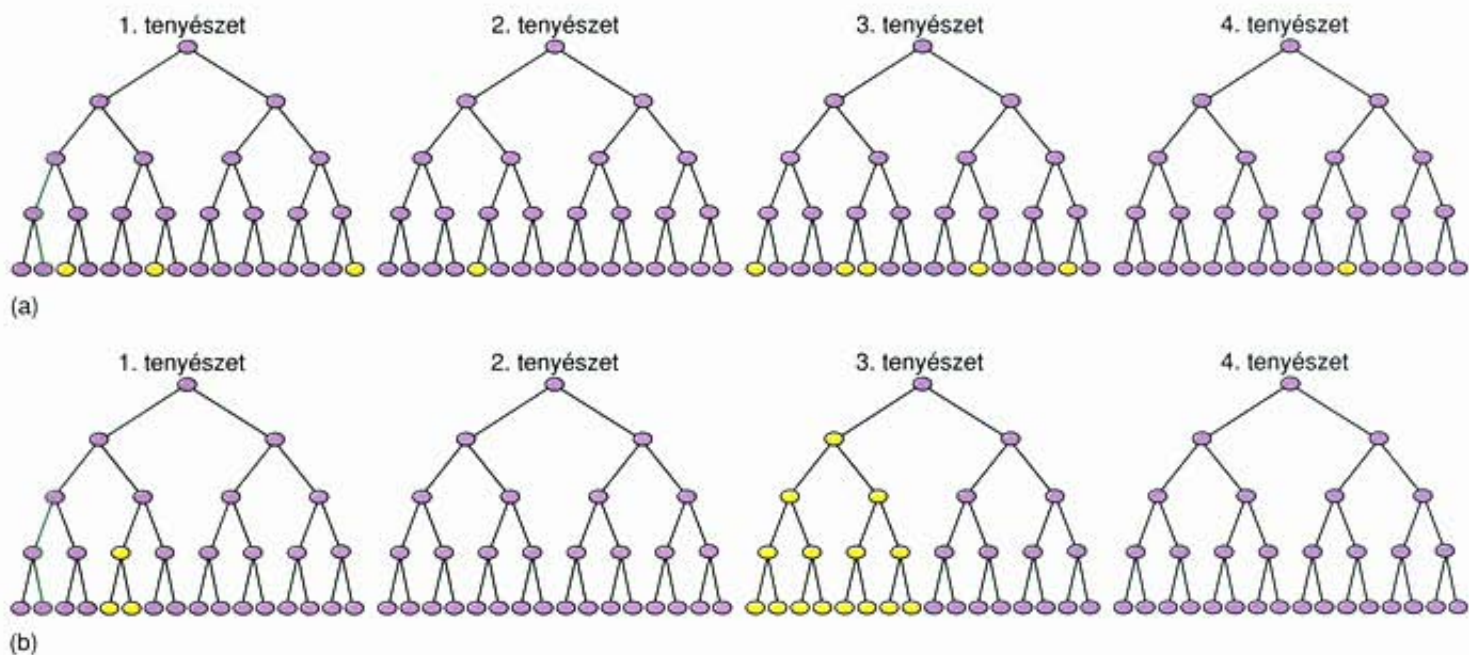
Vegyük például a Hayes által 1953-ban izolált Hfr törzset. Amikor ezt a törzset auxotróf recipienssel konjugáltatta, ezerszeres mennyiségben kapott prototróf rekombinánsokat az eredeti F^+ sejtekhez viszonyítva. Hayes azt is megfigyelte, hogy a donor géneinek átadása két vonatkozásban is nagyon hasonlított az F^+ sejteknél tapasztalhoz: a donort sztreptomocin kezeléssel nem lehetett gátni, és a rekombináns genotípusa főként a recipiensének felelt meg, nem a donorénak. Látjuk majd, hogy egy F^+ sejt akkor alakul át Hfr-ré, amikor F plazmidja beépül a gazda kromoszómájába.

A gazdasejt géneinek átvitele Hfr sejtrel

Az a tény, hogy az F^+ törzsek csak néhány Hfr sejtet tartalmaznak, kétféleképpen magyarázható. Az első az, hogy az F^+ és a Hfr sejtek között egyensúlyi állapot van, ezért minden F^+ sejt életciklusának kis részében Hfr. A második magyarázat szerint az F^+ sejt néha mutáns Hfr sejté válik. A különbség az, hogy a mutáció állandó (ha a ritka reverziót elhanyagoljuk). Az 1950-es évek közepére Elie Wollman és François Jacob tisztázták ezt a kérdést, a Max Delbrück és Salvador Luria által kidolgozott **fluktuációs teszt** alkalmazásával. A teszt lényege a következő volt. Nagyon híg F^+ -tenyészetet készítettek (csupán 250 sejt/ml), amit megfelezték, majd az első felét ötven egyenlő részre osztották. A másik felét nem osztották szét. Ezután hagyták, hogy az így kapott tenyészetekben a baktériumok az eredeti koncentráció milliósorosára szaporodjanak, majd mindegyik tenyészetet ellenőrizték, képes-e a gazda géneinek átvitelére, vagyis rekombináns prototrófok kialakítására.

Amennyiben az egyensúlyi hipotézis a helyes, akkor mindegyik F^+ sejt kicsi, de egyforma valószínűséggel alakul át Hfr-ré, és viszi át a gazda géneit. Tehát az ötven kialakított tenyészet mindegyike várhatóan azonos mértékben képes erre. Másrészt, ha a mutációs hipotézis a helytálló, és az F^+ populációban lévő Hfr sejtek képesek csak a génátvitelre, akkor az ötven tenyészetnek ez a képessége nagymértékben különbözik. Ennek oka, hogy az eredeti, igen híg tenyészetek olyan kevés sejtet tartalmaztak, hogy a legtöbbjükbe Hfr sejt nem is jutott. Természetesen a sejtek szaporodásával jó esély nyílik arra, hogy mutáció révén Hfr sejtek jelenjenek meg, és ha egy Hfr már megjelent, akkor annak utódsejtjei az osztódások során elszaporodjon. Tehát az a tenyészet mutatja majd a legtöbb génátvitelre képes sejtet, amelyben az $F^+ \rightarrow$ Hfr konverzió a korai növekedési szakaszban következett be. Ezt szemlélteti a 13.8.(b) ábra. A 3. tenyészetben egy $F^+ \rightarrow$ Hfr konverzió történt a 2. generációban, ezért négy generáció múlva már nyolc Hfr sejtrel rendelkezik. A 4-es tenyészetben viszont nem történt $F^+ \rightarrow$ Hfr konverzió, ezért nincs is benne Hfr sejt.

A kísérlet elvégzésekor nagy változatosságot tapasztaltak a kis tenyészetekben – egyikben egyetlenegy, míg egy másikban 116



13.8. ábra. A fluktuációs teszt. Az ábra két lehetőséget szemléltet: (a) Mindegyik tenyészetben ugyanannyi F^+ sejt van, és mindegyik sejtnak azonos, de kismértékű esélye van a konjugáció során a gazdasejt génjeinek átvitelére (ezek a sejtek sárga színűek). Ezért mindegyik tenyészet nagyjából ugyanazt a génátviteli gyakoriságot adja. (b) Csak Hfr sejtek (mutáns F^+ sejtek, sárga) képesek a gazdasejt génjeinek átvitelére. Ezért az a tenyészet, amelyikben a tenyésztés során korán következik be az $F^+ \rightarrow Hfr$ átalakulás (3. tenyészet) rendelkezik sok kompetens sejtrel. Amelyik tenyészetben csak később következik be az $F^+ \rightarrow Hfr$ átalakulás, kevés ilyen sejtet tartalmaz (1. tenyészet). Míg az, amelyikben nem fordult elő ilyen átalakulás (2. és 4. tenyészet), egyet sem. A gazda génjeinek átvitelére képes sejtek száma nagyon változó, más szóval fluktuál. Ez utóbbit mutatta ki Wollman és Jacob

prototróf rekombináns sejt volt. Kontroll gyanánt a tenyészetnek azt a felét, amelyet nem osztottak el a sejtek osztódása előtt, a vizsgálat végén ugyancsak ötven egyenlő részre osztották, és az előzőekhez hasonlóan megvizsgálták. Ezek a tenyészetek sokkal kisebb változatosságot mutattak: a prototróf rekombinánsok száma 10 és 23 között változott. Összegezve, ezek az eredmények igazolták, hogy egy genetikai változás, ami a teljes F^+ populációnak csak kis hányadát érinti, teszi képtessé a sejteket gének átvitelére az auxotróf F^- sejtekbe, aminek következtében azok prototróf sejtté alakulnak. Ez a kis létszámú szubpopuláció Hfr sejtekből áll.

Az F plazmid beépülése a gazdasejt kromoszómájába

Hogyan tudják a Hfr sejtek ilyen hatékonyan átvinni a gazdasejt génjeit? A megoldás kulcsát az F plazmid és a gazda génjeinek átvitele közötti hasonlóság adta. Mindkettőt maga az F plazmid idézi elő. Egy F^+ sejt akkor válik Hfr -ré, amikor a plazmid megszűnik önállóan létezni a sejtben belül, és beépül a gazda kromoszómájába. Amikor ez bekövetkezik, az F plazmid elveszíti azt a képességét, hogy közvetlenül áthelyezze magát a recipiens sejtbe, de ezt a képességet átadja a gazda kromoszómájának. Ez vezetett az $F^+ \rightarrow Hfr$ átalakulás hipotézis megfogalmazásához (13.9. ábra). Az F plazmid a gazda kromoszómájával számos helyen rekombinálódhat. Ez mobilizálja a kromoszómát, amely feltehetőleg az F plazmid területén hasad fel, és gördülő gyűrű mechanizmussal (rolling circle) kezd megkettőződni (7. fejezet). A replikáció során a beépült F plazmid egy része szinte mozdonyként működik, és átvezeti az újonnan képződött kromoszómális DNS-t az F^- sejtbe.

A két sejt között az F pilus által kialakított híd sérülékeny, és rendszerint elszakad, mielőtt a DNS átadása teljessé válna. A recipiens sejtbe átjutott Hfr kromoszómadarab ezután rekombinálódik az F^- kromoszómával, és megváltoztatja genotípusát. Néha, a híd elszakadása előtt az egész Hfr kromoszóma átjuthat. Ha ez bekövetkezik, a recipiens sejt Hfr -ré alakul, mert az egész integrálódott F plazmid is átadódik. Egyik része átvezeti a kromoszómát az összekötő híd, fennmaradó része pedig utoljára, mint egy utánfutó jut át.

Alalomadtán az F plazmid rekombinálódik a gazda kromoszómájával, és Hfr -ré alakítja a sejtet. Ilyenkor mobilizálja a Hfr sejt kromoszómáját a recipiens sejtbe történő átadásra, valószínűleg ugyanazzal a mechanizmussal, mint ahogyan a független F plazmid adódik át. A mechanizmusra vonatkozó leginkább elfogadott hipotézis szerint a Hfr kromoszóma gördülő gyűrű mechanizmussal replikálódik, és az egyik utód-DNS jut át a recipiens sejtbe, ahol rekombinációval megváltoztatja annak genotípusát.

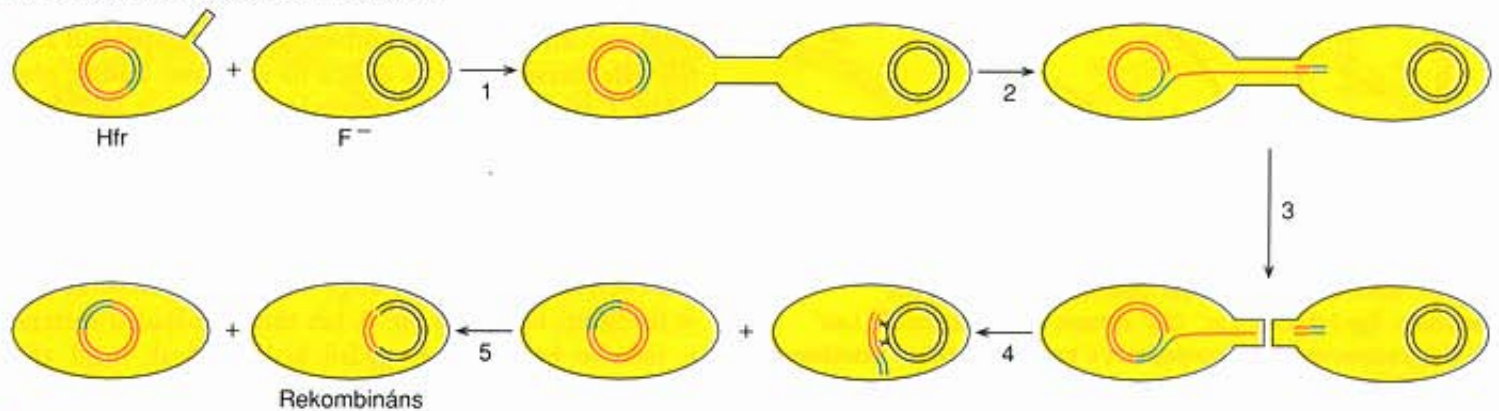
TÉRKÉPEZÉS MEGSZAKÍTOTT KONJUGÁCIÓVAL

A konjugációt természetes körülmények között a konjugációs partnerek véletlenszerű mozgása szakítja meg, mert elszakítja sérülékeny kapcsolódásukat. Elie Wollman és François Jacob rájöttek, hogy a konjugációt egy adott időpontban leállíthatják, egyszerűen

(a) F-plazmid átadása:

(b) $F^+ \rightarrow$ Hfr átalakulás:

(c) A gazda génjeinek átvitele Hfr sejtben:



13.9. ábra. Az $F^+ \rightarrow$ Hfr konverzió modellje. (a) Az F plazmid (kék) szabályos esetben sejtől sejtbe megy át, és egy kópiája a donor sejtben marad. A folyamathoz vélhetően a plazmid gördülő gyűrű mechanizmussal történő replikációja szükséges, amit az ábra is jelez. Az F plazmid és a gazdasejt kromoszómája az ábrán nem méretarányos, mert az utóbbi valójában mintegy ötvenszerese a plazmidénak. (b) Az $F^+ \rightarrow$ Hfr átalakulás során a plazmid (kék) rekombinálódik a sejt kromoszómájával (piros), és így mobilizálja az egész kromoszómát. (c) A gazda génjeinek átvitele a Hfr sejtben: 1. Az F pilus kialakítja a kapcsolatot a két sejt között. 2. A Hfr kromoszóma replikálódni kezd, és az egyik leánymolekula elindul az összekötő hidon át a recipiens sejtbe. 3. Az összekötő hid konjugáció közben elszakad, így a donor kromoszómájának csak egy része jut át a recipiensbe. 4. A donor DNS rekombinálódik a recipiens kromoszómájával. 5. A recipiens sejt a replikáció után rekombináns DNS-t hordoz, ennek egy része a donortól (piros), egy része pedig a recipienstől (fekete) származik

a baktériumtenyészet erőteljes rázatásával. Az élénk mozgás biztosan elválasztja az összes konjugáló partnert. Wollman és Jacob genetikai térképek készítésére használták fel ezt a lehetőséget.

Az alábbi stratégiával dolgoztak: két auxotrófot meghatározott ideig konjugáltattak egy Waring-keverőben, majd félbeszakították a konjugációt, és ellenőrizték, hogy egy adott gén átjutott-e. Vegyünk például egy $F^- \text{Leu}^- \text{Lac}^- \text{Gal}^- \text{Str}^+$ auxotrófot (F^- sejt, nem nő olyan táptalajon, amely nem tartalmaz leucint, illetve tápanyagforrásként csak laktóz vagy galaktóz van benne és sztreptomycinrezisztens). Konjugáltassuk két percig a Hfr $\text{Leu}^+ \text{Lac}^+ \text{Gal}^+ \text{Str}^+$ (sztreptomycin-szenzitív) prototróffal. Majd szelektáljuk a $\text{Leu}^+ \text{Str}^+$ rekombinánsokra, olyan táptalajon, amelyből hiányzik a leucin és tartalmaz sztreptomicint. Két perces konjugáció alatt nem képződnek ilyen sejtek. Ebből arra következtethetünk, hogy két perc alatt a sztreptomycinre érzékeny Hfr sejtekből nem történt meg a *leu* gén átadása a sztreptomycinrezisztens F^- sejtbe. Ha a konjugációt négy percig engedjük, jelentős számban keletkeznek ilyen rekombinánsok.

Vagyis a *leu* gén átadása a konjugáció kezdetét követően körülbelül négy perc múlva kezdődik el.

Egy lépéssel tovább menve, ha a konjugáció tíz percig tart, néhány $\text{Leu}^+ \text{Lac}^+ \text{Str}^+$ rekombináns is megjelenik. Ez azt jelenti, hogy a Hfr sejt a *lac* génjét a konjugáció kezdete után tíz perccel kezdi átadni. Ha a konjugációt tizenkilenc percig tesszük lehetővé, már megjelenik néhány $\text{Leu}^+ \text{Lac}^+ \text{Gal}^+ \text{Str}^+$ rekombináns is, azaz a *gal* gén átadása ekkor kezdődik el. A 13.10. ábra egy ilyen kísérlet idealizált eredményeit mutatja be. Mivel a Hfr donor $\rightarrow F^-$ recipiens irányba követjük a génátadást, fontos, hogy a konjugáció után csak a recipiens sejtekre szelektáljunk. Ezt a Hfr sejtek sztreptomycinérzékenysége teszi lehetővé, hiszen a donorsejteket sztreptomocinnal előlhetjük, és így csak az antibiotikumrezisztens recipiens sejtek maradnak életben.

Az időpontok nagyon fontos tényeket közölnek az *E. coli* genetikai térképéről. Ha feltételezzük, hogy az átadás sebessége az egész baktériumkromoszóma mentén állandó, akkor egy adott génpár átadása közötti időkülönbség a két gén távolságával

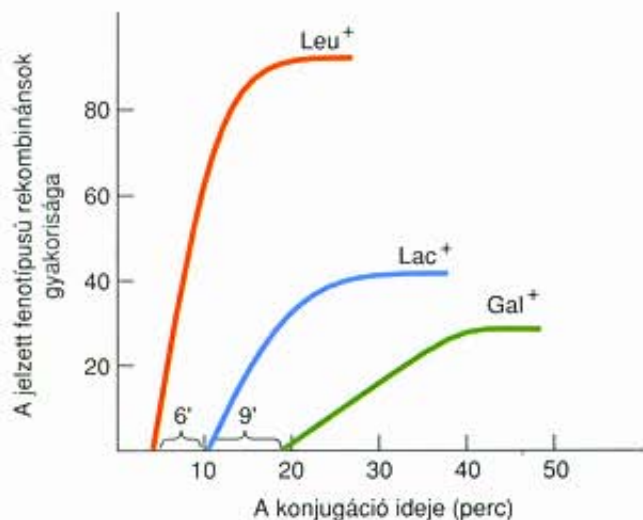
arányos a genetikai térképen. A *leu* és a *lac* gén átadási ideje közötti különbség például 10 – 4, vagyis 6 perc; ezért azt mondjuk, 6 perc távolságra van egymástól a *lac* és a *leu* gén a genetikai térképen. Hasonlóképpen, a *gal* és a *lac* gén között 19 – 10, vagyis 9 perc az átadási idő eltérése, tehát a két lokusz távolsága 9 perc. A *leu* és a *gal* lokuszok pedig 9 + 6, azaz 15 percre vannak egymástól. Éppen 100 perc szükséges a teljes *E. coli*-kromoszóma átadásához, beleértve az F fennmaradó részét is. Ezért az *E. coli* térképe 100 percnyi.

A Nobel-díj átvételekor tartott előadásában François Jacob a következő tréfás megjegyzést tette erről a hosszú konjugációs időről: „Csodálatos szervezet, a konjugációs gyönyöre közel háromszorosa lehet az egyed élettartamának.” Ugyanakkor Jacob elfelejtette megjegyezni, hogy ez a konjugáció csaknem mindig megszakad.

Az *E. coli* cirkuláris genetikai térképe

Nem minden Hfr törzs a *leu* géneket adja át elsőként, mind-egyiküknek jellegzetes kezdőpontja van. Ráadásul, néhány törzs éppen az ellenkező irányban adja át a géneket, mint amit leírtunk. Tehát a *gal* a *lac* előtt adódik át és a *leu* a legutolsó. A 13.2. táblázat a gazdasejt géneinek átadási sorrendjét mutatja tizenegy különböző Hfr törzsből. A változó sorrend ellenére is látható, hogy mindegyik azonos, ha nem egy nyílt végű sorban, hanem zárt körben nézzük. Így például a Hayes-féle Hfr törzsnél a *thr* az első, a *thi* az utolsó átadott gén, míg a Hfr 1 ezeket a géneket egymás után adja át (előbb a *thr*-t, utána a *thi*-t). Mindössze gyűrűvé kell zárni az átadási sorokat, hogy sorrendjük azonos legyen. Az egyetlen eltérés az O, a replikációs kezdőpont helyében van, ami meghatározza, hogy melyik gén adódik át először. Nézzük most a Hfr 5 törzs átadási sorrendjét. Látható, hogy a két gén átjutásának sorrendje fordított: *thi*, utána *thr*. A két törzs génátadási sorrendje itt is fedésbe hozható egy gyűrű kialakításával, majd az egyik megfordításával, mint amikor egy érmét a másik oldalára fordítunk.

Mit jelent mindez fizikai értelemben? Először is elárulja, hogy az *E. coli* kromoszómája cirkuláris, és az F plazmid a különböző Hfr törzsekben más-más helyre épül be. Ez megmagyarázza azt a tényt, hogy az átadás sorrendje azonos a különböző törzseknél, de a kezdőpont változik, és azt az F plazmid beépülési helye szabja meg. Másodszor, az F plazmid mindkét orientációba beépülhet, és ezzel megfordulhat az átadás sorrendje.



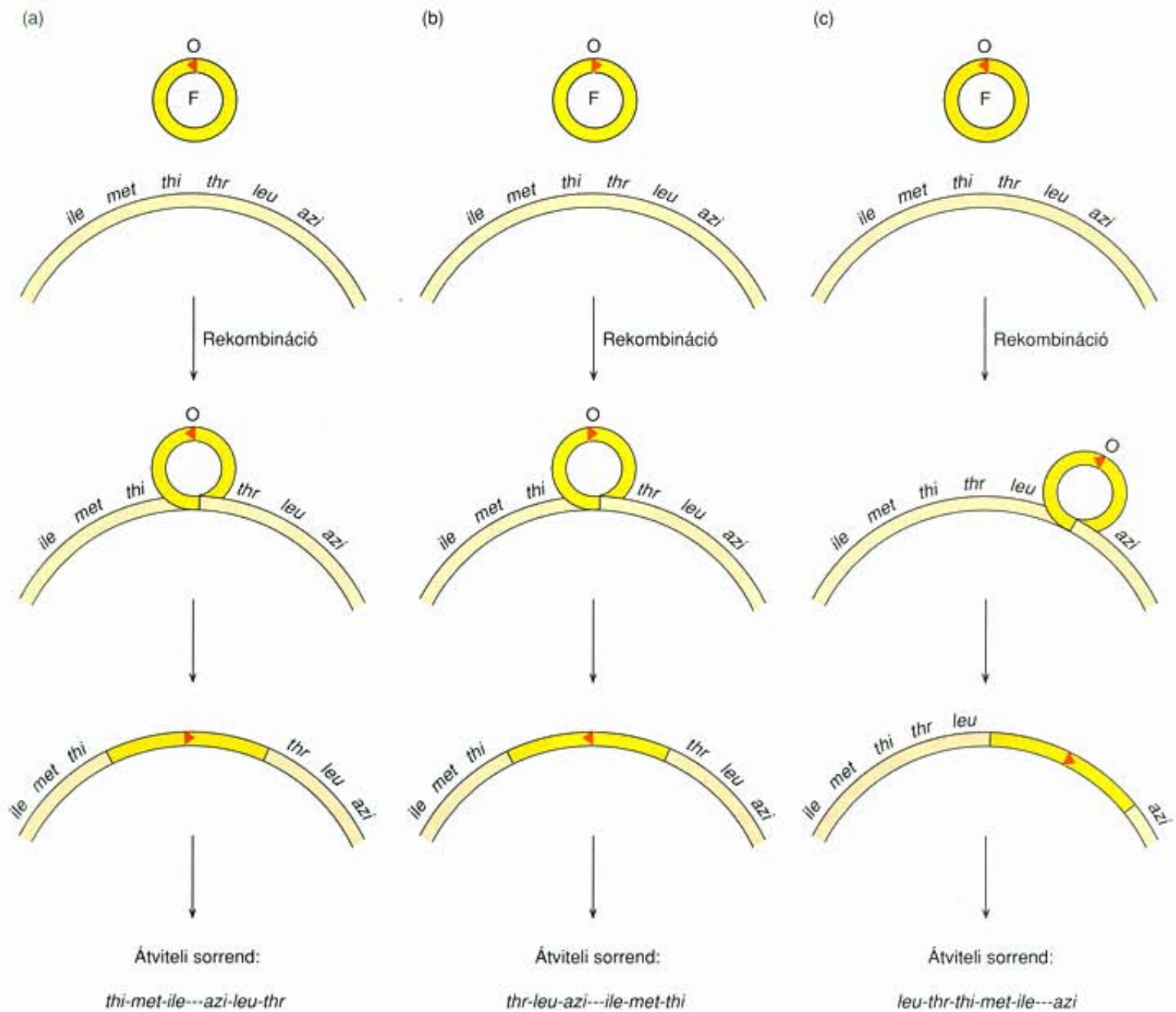
13.10. ábra. A génátvitel időzítése egy konjugációs kísérletben. Egy Hfr *Leu*⁺ *Lac*⁺ *Gal*⁺ törzset konjugáltattak F⁻ *Leu*⁻ *Lac*⁻ *Gal*⁻ recipiensekkel és a konjugációt a tenyészet erélyes rázatásával különböző időpontokban megszakították. A recipiensek fenotípusát ezután a leucint nem, illetve tápanyagforrásként glükóz helyett laktózt vagy galaktózt tartalmazó táptalajon ellenőrizték. Néhány *Leu*⁺ rekombináns (piros görbe) már 4 perccel a konjugáció kezdete után megjelent, a *Lac*⁺ és a *Gal*⁺ rekombinánsok pedig 10, illetve 19 perc elteltével voltak kimutathatók (kék és zöld görbék). Ez azt jelenti, hogy a *leu*⁺ és a *lac*⁺ gének átadása között 6 perc, a *lac*⁺ és a *gal*⁺ átadása között 9 perc telt el. Ebből következtetni lehet a gének egymáshoz viszonyított helyzetére és távolságára. A görbék egyre kisebb telítési maximuma a növekvő számú, véletlenül megszakadt konjugáció következménye

13.2. táblázat. Különböző Hfr törzsek génátviteli sorrendje konjugáció során

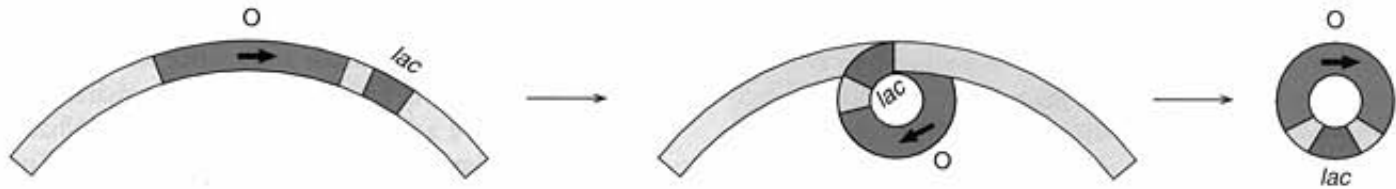
Hfr törzs	Az átvitel sorrendje:
Hayes	O-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile-met-thi
Hfr 1	O-leu-thr-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi
Hfr 2	O-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac
Hfr 3	O-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal
Hfr 4	O-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr
Hfr 5	O-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl-ile
Hfr 6	O-ile-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly-str-mal-xyl-mtl
Hfr 7	O-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro
AB311	O-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile-mdl-xyl-mal-str-gly
AB312	O-str-mal-xyl-mtl-ile-met-thi-thr-leu-azi-ton-pro-lac-pur-gal-trp-his-gly
AB313	O-mdl-xyl-mal-str-gly-his-trp-gal-pur-lac-pro-ton-azi-leu-thr-thi-met-ile

Ezeket a jelenségeket szemlélteti a 13.11. ábra. Az 1960-as években John Cairns elektronmikroszkóppal kimutatta, hogy az *E. coli* DNS-e gyűrű alakú (7. fejezet), ezért ma már természetesnek tűnik a kör alakú genetikai térkép elfogadása. Amikor azonban Jacob és Wollman 1957-ben felvetették az elképzelést, ugyancsak radikálisnak tűnt. A 13.12. ábra az *E. coli* részleges, kör alakú térképét mutatja be.

Egy Hfr donor és egy F⁻ recipiens közötti konjugáció megszakításával meghatározhatjuk mennyi idő szükséges egy adott gén átadásához. A különböző gének átjutási ideje közötti eltérésekből következtetni lehet a gének egymáshoz viszonyított helyzetére az *E. coli* kör alakú genetikai térképén.



13.11. ábra. Egy Hfr sejt kromoszómájának F plazmid része határozza meg a gazdagének átadásának irányát és sorrendjét. (a) Az F plazmid (sárga kör, a piros nyílhegy az orientációt jelzi) a *thi* és a *thr* gének közé épül be, jobb oldali irányultsággal, ezért a gazdasejt génjeit a *thi-met-ile- -azi-leu-thr* sorrendben viszi át (a szaggatott vonal a Hfr baktérium kromoszómájának középső, az ábrán nem szereplő részét jelzi). Az utolsó gének csak azokban a ritka esetekben kerülnek át, amikor a konjugáció az ehhez szükséges 100 percen át zavartalan. (b) Az F plazmid a *thi* és a *thr* gének közé épül be, de balra irányulva, így a gének a *thr-leu-azi- -ile-met-thi* sorrendben kerülhetnek át. (c) Az F plazmid a *leu* és az *azi* közé épül, jobbra irányulva, az átadás sorrendje ezért *leu-thr-thi-met-ile- -azi*.



13.14. ábra. Az F-lac képződése. A Hfr kromoszómába beépült F plazmid (piros) kihalad egy darab, a közeli *lac* operont (kék) is tartalmazó gazda-DNS-sel együtt. A rekombinációs F-lac molekula egyik része az F plazmid, másik része pedig a *lac* operont is tartalmazó gazda-DNS egy darabja

nek térképezéséhez túl durva. A finomtérképezéshez sokkal érzékenyebb genetikai eljárásokat fejlesztettek ki. Vizsgáljuk meg ezek közül a legfontosabbat.

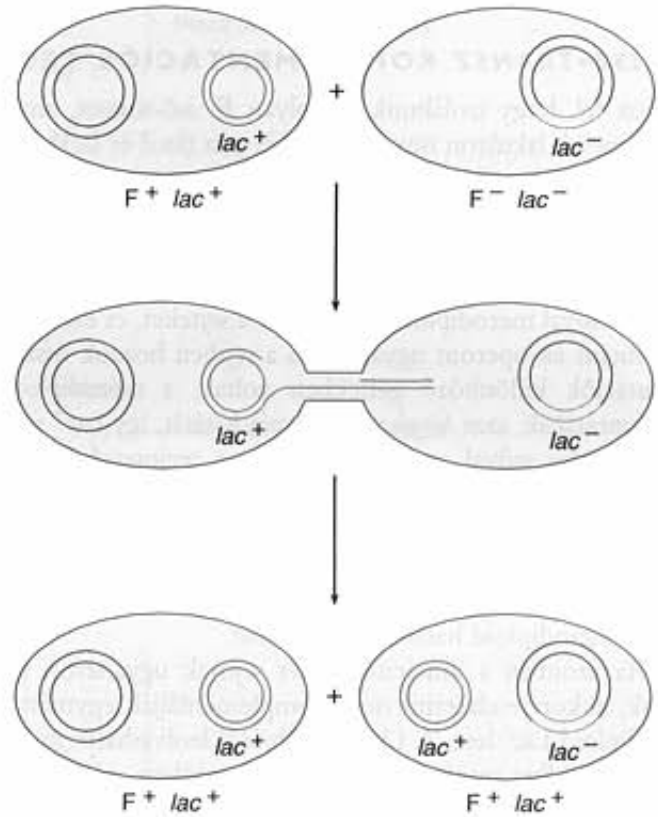
F' PLAZMIDOK

1959-ben E. H. Adelberg felfedezte, hogy egyik Hfr törzse egy F^+ revertánsal szennyezett. Először csupán kisebb technikai hibának tűnt a dolog, de később kiderült, hogy az F^+ revertáns nagyon érdekes tulajdonságokkal rendelkezik. Ebben az esetben egy bosszantó dolog nagyon hasznossá vált.

Adelberg F^+ revertánsa nem viselkedett szabályosan. Amíg egy F plazmid többnyire csaknem véletlenszerűen épül be az új Hfr keletkezésekor a gazda kromoszómájába, ennek a revertánsnak az F plazmidja mindig ugyanahhoz a lokuszhoz épült vissza, ahol az eredeti Hfr-ben volt, és sokkal nagyobb gyakorisággal képzett Hfr sejteket a normál plazmidnál. Adelberg felismerte, hogy a revertáns F faktora genetikai változást szenvedett, és ezért új jelölést adott neki: F' . Feltételezte, hogy az F' plazmid magával vitt egy darabot a gazda kromoszómájából, amíg a Hfr sejtben tartózkodott (13.14. ábra). Ezzel a DNS-szakasszal függ össze az F' plazmid „memóriája” a beépülés helyére, hiszen homológ szekvenciákat jelent a gazda kromoszómáján és a plazmidban. Ezek pedig a homológ rekombináció helyeül szolgálhatnak. Mindez biztosítja, hogy az F' plazmid és a gazda kromoszóma rekombinációja gyors legyen, és mindig ugyanazon a lokuszon történjen.

Elméleti érdekességén túl, az F' plazmid hasznos genetikai eszköz is. Felhasználható arra, hogy az *E. coli* genomjának egy meghatározott, kicsi darabját nagyon hatékonyan bejuttassa az F' sejtbe. Ez a folyamat, amit néha **F-dukció** vagy **szexdukció** néven említenek, azért olyan hatékony, mert a gazda DNS egy darabja az F plazmid része lett, így ugyanolyan nagy gyakorisággal adódik át, mint maga az F plazmid. Tehát egy F' sejt és egy F^- közötti konjugáció merodiploidot szolgáltat a genetikai analízishez.

Vegyünk például az **F-lac** elnevezésű F' -t, amelyik a *lac* operont hordozza. Amikor egy F-lac-ot tartalmazó F' sejt konjugál egy F^- Lac^- sejtrel, a recipiens F^+ Lac^- -vá alakul (13.15. ábra). Így, annak ellenére, hogy a recipiens mutáns *lac* gént hordoz kromoszómáján, az F-lac plazmidon lévő vad típusú allél pótolja a hiányzó enzimet. Meg kell jegyezni, hogy rekombináció nem szükséges, hiszen az F-lac plazmid a gazdasejttel együtt reprodukálódik. Ebből a keresztezésből kiderül, hogy a vad típusú lac^+ gén domináns az F^- kromoszómán lévő lac^- gén felett. A merodiploidok természetesen lehetségessé tesznek más, sokkal bonyolultabb genetikai kísérleteket is, amelyekkel később még



13.15. ábra. Az F-lac transzfere egy F^- lac^- sejtbe. Az F-lac plazmid (kék, a benne lévő lac^+ gének pirosak) az F' -hoz hasonlóan átjut a konjugációs csatornán. Az F^- lac^- recipiens F^+ lac^+ sejté alakul. A gazdasejt kromoszómája fekete, benne a lac^- gén szürke. A méretarányok nem tükrözik a valóságot

foglalkozunk. Ezeket a kísérleteket jelentősen segítette a szinte az egész *E. coli*-genomot lefedő F' plazmid gyűjtemény.

Láttuk, hogy a plazmidok hatékonyan vihetnek át géneket egyik sejtől a másikba. Ezért nem meglepő, hogy az F plazmid mellett sok egyéb plazmid is szerepel a bakteriális genetikában. Két példát már ismertettünk is. A 8. fejezetben szó volt a *colE1* plazmidról, mint az egyirányú DNS-replikáció egyik példájáról. A plazmid lehetővé teszi, hogy a gazdasejt elpusztítsa a vele kompetícióban álló baktériumokat. A 12. fejezetben említettük az antibiotikumrezisztencia-plazmidokat, amelyek révén a baktériumok elkerülik az antibiotikumok pusztító hatását. A 15. fejezetben látjuk majd, hogy ezek a plazmidok miként manipulálhatók abból a célból, hogy alkalmasak legyenek idegen gének baktériumokba juttatására.

A Hfr kromoszómában bekövetkező rekombináció során esetenként kihal az F plazmid a gazda kromoszómájának egy darabjával együtt. A folyamat terméke az ún. F' plazmid, ami tartalmazza a gazda-DNS egy darabját is. Így a gazda génei egy igen mozgékony elem részévé válnak, amely képes áthelyezni magát egy másik sejtbe. Genetikai kísérletekben ezt a jelenséget kisméretű DNS-szakaszok átvitelére használják.

A CISZ-TRANSZ KOMPLEMENTÁCIÓS TESZT

Tegyük fel, hogy izoláltunk két olyan *E. coli*-törzset, amelyek nem képesek laktózon növekedni. Két gén (*lacZ* és *lacY*) kódolja azt a két enzimet, amelyek szükségesek ennek a cukornak a feldolgozásához. Ezért fontos tudnunk a két Lac⁻ mutánsról, hogy mindkettőnek ugyanaz a génje mutáns-e, vagy pedig különböző géneik érintettek. A kérdést megválaszolhatjuk, ha konjugációval merodiploiddá alakítjuk a sejteket, és ezzel mindkét mutáns *lac* operont ugyanabban a sejtben hozzuk össze. Ha a mutációk különböző génekben voltak, a merodiploidban komplementálják, azaz kiegészítik egymás hatását, így Lac⁺ sejt keletkezik. Más szóval, a donor biztosítja a recipiensből hiányzó génterméket, és fordítva. A 13.16.(a) ábrán szemléltetett esetben a donorsejt (F-*lac*) vad típusú *lacZ* és mutáns *lacY* géneket hordozott. Ezért a donor vad típusú *lacZ* génjének és a recipiens (F) vad típusú *lacY* génjének a terméke együttesen lehetővé teszik, hogy a merodiploid hasznosítsa a laktózt.

Ha azonban a mutációk a két sejtnek ugyanazon génjét érintik, akkor rendszerint nem komplementálják egymást, és a merodiploid Lac⁻ lesz. A 13.16.(b) ábráról leolvasható, mi történik, ha mindkét mutáció ugyanabban a génben, például a *lacY* génben van. Mind a donorplazmid, mind a recipiens kromoszóma vad típusú *lacZ* terméket állít elő, de a *lacY* terméke mutáns. Ezért nem komplementálhatják egymást, hiszen egyikük sem kódol működőképes *lacY* terméket. Vegyük észre, hogy a hangsúly itt a géntermékeken van! A komplementáció feltétele, hogy a géntermékek képesek legyenek **diffúzióra**, vagyis arra, hogy mozogjanak a sejten belül, és így együttműködjenek.

A komplementációs koncepció megértéséhez tekintsük át a következő analógiát: ugyanabban a városban két gyár ugyanazt az autót gyártja. Mindkettőnek két összeszerelősora van, egyik a motor, másik a karosszéria készítésére. Egyik nap elromlik a motorszerelő sor az egyik gyárban és a karosszériát szerelő a másikban. De a két gyár együttműködve folytathatja az autógyártást – a második gyárból származó motorokat az első gyárból származó karosszériákkal egybeépítve, a munkások összeszerelhetik az autókat. Ez a komplementáció – és azonnal látható, mennyire függ attól, hogy a termékek mozgathatók-e. Természetesen, ha mindkét gyárban a motorszerelő sorok romlanak el egyszerre, a két üzem nem egészítheti ki egymás működését, és mindkét helyen leáll az autógyártás.

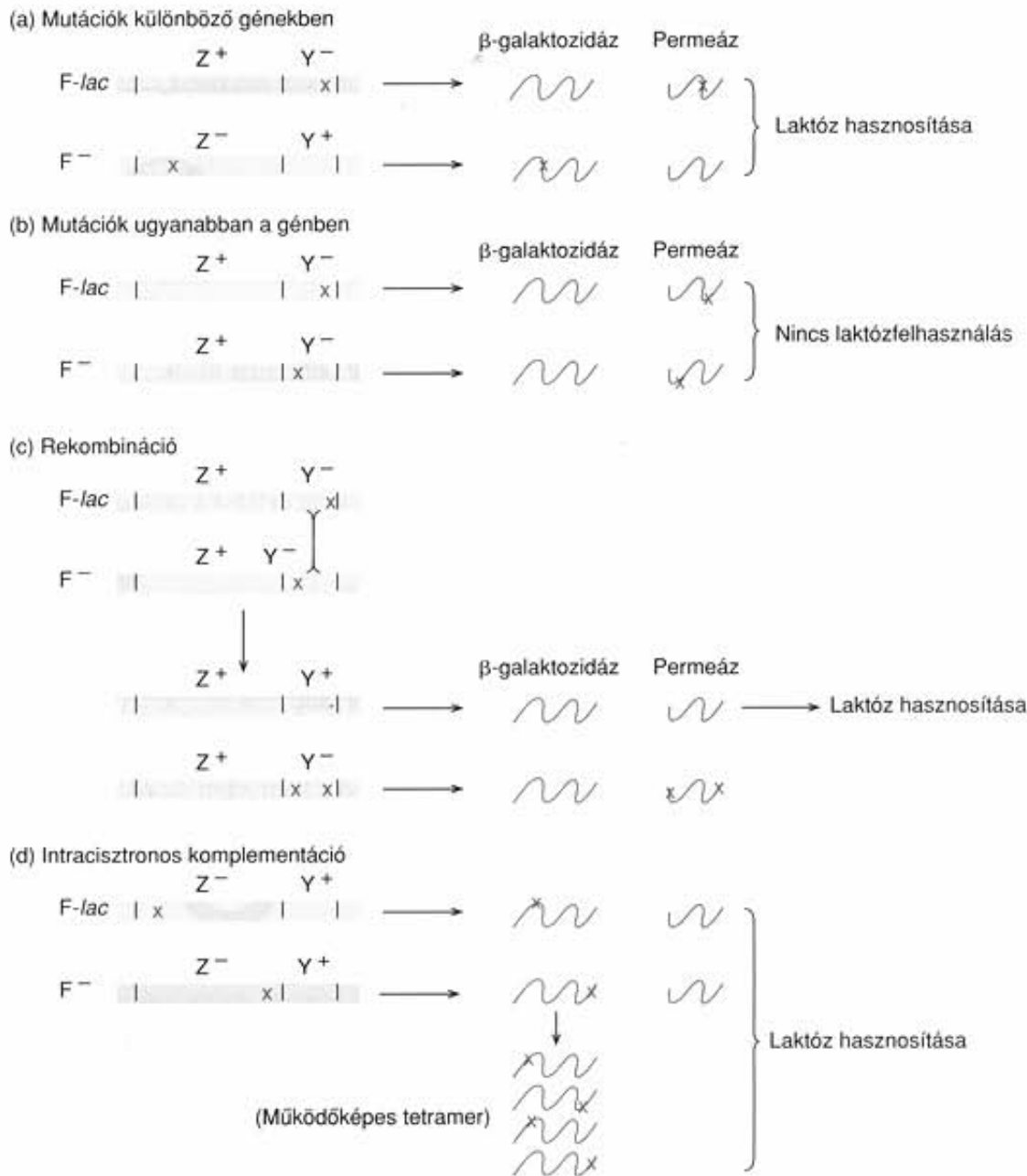
A komplementációs teszttel kapcsolatban több követelményt állíthatunk fel. Nézzük ezeket az előző példa alapján. Idézzük fel, hogy ha a mutációk azonos génben vannak, akkor

a merodiploid Lac⁻ lesz. De honnan tudjuk egy sejtéről, hogy az valóban merodiploid-e, hiszen az auxotróf fenotípus oka a konjugáció elmaradása is lehet. Annak kimutatására, hogy az F' plazmid átjutott-e a sejtbe, szükséges egy szelektálható marker. Például az F' plazmidba beépíthetünk egy vad *leuA*⁺ gént, recipiensként pedig *leuA*⁻ sejtet használunk. Ugyancsak érdemes *str*^r donort és a *str*^s recipienst választani. A konjugáció után szelektálunk a *leuA*⁺ és egyben *str*^s sejtekre, ha a táptalajba nem tesszünk leucint, de sztreptomocint igen. Ezen a táptalajon a donorsejtek *str*^r, a recipiens sejtek pedig *leuA*⁻ genotípusuk miatt nem képesek növekedni. Csak azok a sejtek fognak osztódni, amelyekbe átjutott az F' plazmid. Ha azok Lac⁻ fenotípusúak, akkor a két törzsben a mutációk azonos génben voltak.

Másodszor, a komplementációs tesztet olyan körülmények között lehet elvégezni, amikor rekombináció nem túl gyakori. Ha ugyanis a rekombináció gyakori, akkor bekövetkezhet a két homológ mutáns gén között is, és eredménye egy mutációtól mentes, valamint egy két mutációt is hordozó gén (13.16.(c) ábra). Ekkor pedig úgy tűnhet, mintha a két mutáció komplementálta volna egymást, és két különböző gént feltételezhetünk, pedig eredetileg a két kromoszóma homológ géneik voltak. Ezt a problémát kiküszöbölhetjük egy RecA⁻ recipiens alkalmazásával, amelyben nincs homológ rekombináció.

Másféle probléma jelentkezhet, ha az egyik mutáció több más gén működését is befolyásolja. Az ilyen **pleiotróp** mutációk úgy viselkednek, mintha több génben következett volna be változás, nem pedig egyben. A komplementációs tesztben ez bonyodalmakat okozhat. A végső probléma az, hogy a két különböző kromoszóma homológ géneinek mutációi esetleg szintén komplementálhatják egymást. Ez akkor következhet be, amikor a géntermék olyan polipeptid, amelyik egy vagy több azonos polipeptiddel közösen alakítja ki az **oligomer** szerkezetű fehérjét. Jó példa erre a β-galaktozidáz, amely **tetramer**, azaz négy azonos monomerből, vagyis polipeptidből áll. A 13.16.(c) ábrán egyik *lacZ* gén sem működik szabályosan, mindegyik esetben inaktív tetramer alakul ki a négy hibás β-galaktozidáz polipeptidből. Ha azonban két különböző *lacZ* gén van jelen a sejtben, és azok kétféle hibás polipeptidet kódolnak, amelyek együttesen esetleg aktív tetramert alkothatnak. Ilyenkor a két *lacZ* mutáns komplementálhatja egymást, és ezért jobb híján azt mondhatnánk, hogy különböző géneken találhatók. Holott azonos génen vagy **cisztronon** vannak, a jelenség pedig az **intracisztronos komplementáció**.

Meg kell jegyezni, hogy ez a cisztronon belüli komplementáció nagymértékben különbözik a cisztronok közötti komplementációtól, vagyis a különböző gének termékeinek komplementációjától. Az autógyárak analógiája jól példázza az utóbbit, mert könnyen elképzelhető, hogy a motor és a karosszéria „géntermékek”, amelyek kiegészíthetik egymást. Ez az analógia azonban nem használható a cisztronon belüli komplementáció szemléltetésére, mert ahhoz olyan autót kellene elképzelni, amit két (vagy több) együttműködő, azonos szerkezetű motorral gyártanak. Sőt olyan autót, amelyet két, más-más hibájú motorral készítettek, és mindkettő kompenzálni képes valamilyen módon a



13.16. ábra. A *cis-transz* komplementációs teszt. (a) A mutációk (kis piros x-ekkel jelölve) különböző génekben, a *lacZ*-ben, illetve a *lacY*-ban találhatóak. Ezért termékeik kiegészítik, komplementálják egymást, a sejt *lac*⁺ lesz. (b) A mutációk azonos génben találhatóak (*lacY*). Így mindkét kromoszóma aktív *lacZ* terméket kódol, de a *lacY* termékeik inaktívak, tehát a sejt *lac*⁻ lesz. A (c) és (d) esetekben bonyolultabb a helyzet, amit figyelembe kell vennünk, ha *cis-transz* tesztet végzünk. (c) A homológ kromoszómákon az azonos génekben lévő markerek között néha rekombináció történik. Ennek eredménye egy vad típusú és egy kettős mutáns gén. A sejt *lac*⁺ lesz, és úgy tűnik, mintha a két mutáció különböző génekben volna. (d) Előfordulhat, hogy két különböző mutációt hordozó homológ gén (két eltérő *lacZ* mutáns a példában) együttesen aktív, több alegységből álló fehérjét szolgáltat, ez esetben aktív β-galaktozidázt. Ilyenkor is úgy tűnik, mintha a két mutáció különböző génekben lett volna

másik hibáját, így az autó működőképes lenne. Autók esetében ez lehetetlen, de néha előfordulhat a fehérjékben.

A fenti komplementációs példákat alkalmazhatjuk néhány fontos genetikai fogalom szemléltetésére is. Az említett esetekben a mutáns gének *transz* helyzetben voltak – vagyis külön kromoszómákon (latin: *trans* = át, keresztül). De lehetnek a mutáns gének *cis* helyzetben is, azaz ugyanazon a kromoszómán (latin: *cis* = itt). A mutáns géneknek ez a két lehetséges konfigu-

rációja – *cis* és *transz* – adta a komplementációs teszt másik elnevezését: ***cis-transz* teszt**. Majd ez vezetett a cisztron fogalmához, amit Seymour Benzer annak a genetikai egységnek a leírására alkalmazott, amelyik a *cis-transz* teszt segítségével elkülöníthető egy másik genetikai egységtől. Ez természetesen egy működési egység – olyan kromoszómaszakasz, ami egy fehérje- vagy RNS-terméket eredményez. Mint ilyen, jelenlegi értelmezésünk szerint a gén kifejezés szinonimája.

A *cisz* és *transz* kifejezéseket két lokusz kölcsönhatásának leírására is használjuk. A promoterek, az RNS-polimerázok kötődési helyei (8. és 9. fejezet), ***cisz-helyzetben ható elemek***, vagyis ugyanazon a DNS-molekulán kell lenniük, mint a kérdéses génnek, ahhoz, hogy kifejthessék hatásukat a gén aktivitására. Visszatérve az autógyár példájára, olyanok mint egy főkapcsoló. Ha elromlanak, a gyár nem működhet, és a hibát nem kompenzálhatja a másik gyár egyik terméke. Ezzel ellentétben, a fehérjéket kódoló gének ***transz-helyzetben ható elemek***. Mindegyikük kölcsönhatásba léphet más génekkel, illetve azok termékeivel. Mozgékonyaságuk lehetővé teszi, hogy egymástól távoli helyeken is hassanak.

Két, ugyanarra a működésre ható, de különböző mutációról *cisz-transz* teszttel, másként komplementációs teszttel eldönthető, hogy a változás ugyanabban vagy pedig különböző génekben történt-e. A testben a két mutáns gént ugyanabban a sejtben, de *transz* elrendezésben (különböző kromoszómákon) hozzák össze. Amikor a mutációk komplementálják egymást, és ellátják a vad típusra jellemző funkciót, valószínűleg külön génen találhatók. Ha nem egészítik ki egymás működését, akkor ugyanabban a génben vannak.

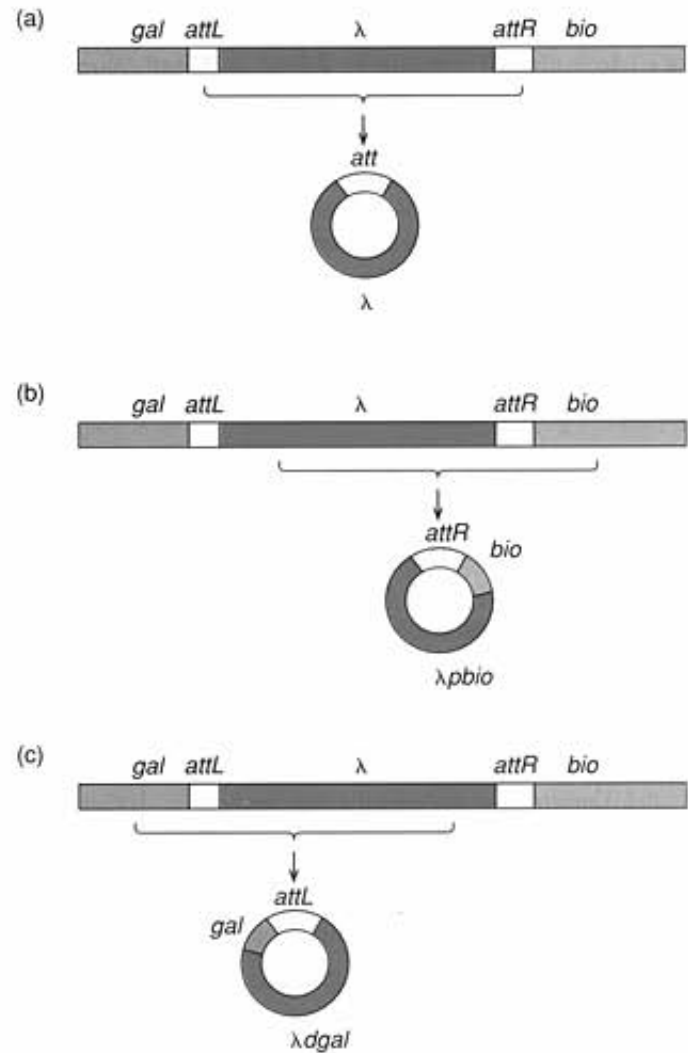
TRANSZDUKCIÓ

A **transzdukció** kifejezés arra utal, hogy a fágok felhasználhatók bakteriális gének új gazdasejtbe juttatására. Két transzdukciós mechanizmus terjedt el széles körben: (1) a **specializált transzdukció**, amely során a λ - vagy egy hasonló temperált fág DNS-e viszi át a bakteriális géneket; (2) az **általános transzdukció**, amikor pedig a **P1** vagy valamilyen más fág feje bakteriális géneket tartalmaz a fágének helyett.

A lambda-fág mint a gazda génjeinek hordozója

A lambda- (λ) fág olyan temperált fág, amely az *E. coli* sejtjeit fertőzi meg. A temperált fágok, a T2, a T4 és más virulens fágoktól eltérően, nem szükségszerűen pusztítják el gazdasejtjeiket. Ehelyett, ahogyan azt a 8. fejezetben láttuk, a λ -DNS beépítheti magát a gazda genomjába. Az eredmény lizogénfertőzés, amikor a fág-DNS a gazda DNS-ével együtt replikálódik, és annak részeként viselkedik. A λ -fág litikus fertőzést is okozhat, ez esetben DNS-e a gazda kromoszómájától független marad. Ilyen körülmények között a gazdasejt hamarosan megtelek az utód fágokkal, és végül szétesik, vagyis lizál. A lizis során az utód fágok kiszabadulnak, és újabb sejteket fertőznek meg. Az egyre terjedő fertőzés egyetlen faggal indult, amelyik litikusan szaporodott, és a baktériumpázsiton egy tiszta foltot, ún. tarfoltot vagy plakot képez, amelyben nincsenek élő baktériumsejtek.

A lizogénfertőzés során a λ -DNS az *att B* helyen épül be az *E. coli* DNS-be, amely a *gal* és a *bio* gének között található. Láttuk azt is, hogy a λ litikus ciklusát mutagének indukálhatják,



13.17. ábra. Transzdukáló λ -fág képződése. (a) A λ szabályos excíziója: a fág DNS-e szabályosan hasad ki a gazdasejt genomjából (bal oldalán lila, jobb oldalán zöld), mindkét végén az *att* helyekkel (sárga). (b) A hasítás a fág beépülési helyének jobb oldalától távolabb történik, ezért a keletkező fág részecske tartalmazza a gazda *bio* operonját (zöld), de elveszti bal oldali végét. A keletkező fág replikálódik, és transzdukálja a beépült *bio* gént, neve λ_{pbio} . (c) A hasítás a bal oldaltól távolabb történik, és a gazda *gal* génje (lila) jut a fágba, amelynek ezért a jobb vége hiányzik. Ez a rész elengedhetetlen a fág replikációjához. A keletkező transzdukáló fág a λ_{dgal}

és előidézhetik a fág-DNS kiválását a gazda kromoszómájából. A λ -DNS rendszerint pontosan hasad ki, de néha előfordul, hogy magával viszi a gazda DNS-ének egy darabját is.

Mint ahogy a λ rendszerint a gazda *gal* és *bio* génjei közé ékeződik, ezek azok a gének, amelyeket magával vihet a szabálytalan kihasadáskor (13.17. ábra). Mivel a λ -fág fejeének térfogata korlátozott, a fő DNS csak mintegy 10%-a lehet a λ -DNS-ének, vagyis 5 kb körüli mennyiség. A gyakorlatban ennél rendszerint több DNS szerepel, ami azt jelenti, hogy valamennyi fág DNS-nek ki kell maradnia. Ha például a λ -DNS felveszi az *E. coli* *bio* lokuszát az egyik végére, akkor elveszíti regulátor régiójának egy darabját a másik végétől. Az eredmény egy **transzdukáló fág**, egy olyan fág részecske, amelyik rekombináns DNS-t hordoz: egy rész

λ -DNS-t és egy darab *E. coli bio* gént. A λ részről hiányzik egy, a lizogéniához szükséges szabályozó régió, ami azonban nem szükséges a litikus ciklushoz. Ezért a keletkező transzdukáló fág litikusan szaporodhat, plakkokat képezhet. Neve λ_{pbio} , ahol a *p* a plakkképző sajátságára utal.

Másrészt viszont, ha a λ a *gal* lokuszt viszi magával az egyik végén, akkor olyan géneket veszít a másik végéről, amelyek a litikus ciklushoz nélkülözhetetlenek. Az így keletkező transzdukáló fág tehát defektív, jele: λ_{dgal} . A *d* természetesen a „defektív” jelölése. Az ilyen defektív transzdukáló fágoknak szüksége van egy ép, segítő, ún. **helper fágra**, amelyik biztosítja a replikációjához szükséges funkciókat.

Hol alkalmazhatjuk a specializált transzdukciót? Használhatjuk merodiploidok kialakítására komplementációs tesztekhez a konjugáció helyett. Valamivel korlátozottabban alkalmazható a konjugációnál, mivel rendszerint csupán a *gal* vagy a *bio* gének vesznek részt benne. Ugyanakkor, a λ -DNS néha más helyekre is beépülhet a gazdasejt genomjába, ezért egy sor gént kiemelhet és továbbvihet. Ily módon a specializált transzdukció sokkal változatosabban alkalmazható, mint ahogyan az az első pillanatban látszik.

Jelentősen különbözik az F-dukcióval és a specializált transzdukcióval keletkező merodiploidokban a két gén fizikai viszonya. Az F-dukció után a két komplementáló gén különböző DNS-molekulákon található: az egyik a gazda kromoszómáján, a másik az F' plazmidon. A specializált transzdukció után mindkét komplementáló gén a gazda kromoszómájának része, mert a λ -DNS a hozzákapcsolódott DNS-darabbal együtt beépül a recipiens genomjába. Ugyanakkor a két folyamatban a komplementáció egyformán jól működhet, mert mindegyik esetben mindkét gén aktív.

Amikor a λ DNS-e egy lizogénfertőzés után kiválik a gazda kromoszómájából, néha magával visz egy darabkát a gazda DNS-éből. Az ilyen rekombináns DNS-t hordozó fág transzdukáló fág, mert felhasználható a gazda DNS-darabjának új sejtbe való átvitelére, merodiploid kialakítására. Ezek a merodiploidok komplementációs tesztekre használhatók. A λ általi végzett transzdukció az ún. specializált transzdukció, mert rendszerint csak a *gal* vagy a *bio* géneket viszi át, amelyek a λ beépülésének helyét határolják.

Általános transzdukció a P1 fág közvetítésével

A specializált transzdukcióban egy temperált fág, mint a λ is, a gazdasejt géneit saját genomjában „szerzeményként” hordozza. Az általános transzdukcióban igen kevés fág-DNS szerepel, ha szerepel benne egyáltalán. Ehelyett a fág feje egy darab gazda-DNS körül alakul ki, egy olyan transzdukáló részecskét képezve, amelyik átviheti ezt a DNS-t egy új gazdasejtbe. Az ilyen fertőzés során természetesen nem keletkezhetnek új fágok a fág géneinek hiánya miatt, de a kapott gazda-DNS rekombinálandó a recipiens kromoszómájával, és megváltoztathatja genotípusát. A rekombináció valóban szükséges a generalizált transzdukció sikeréhez ugyanúgy, mint a Hfr és az F' törzsek közötti konjugációhoz. Mindkét esetben lineá-

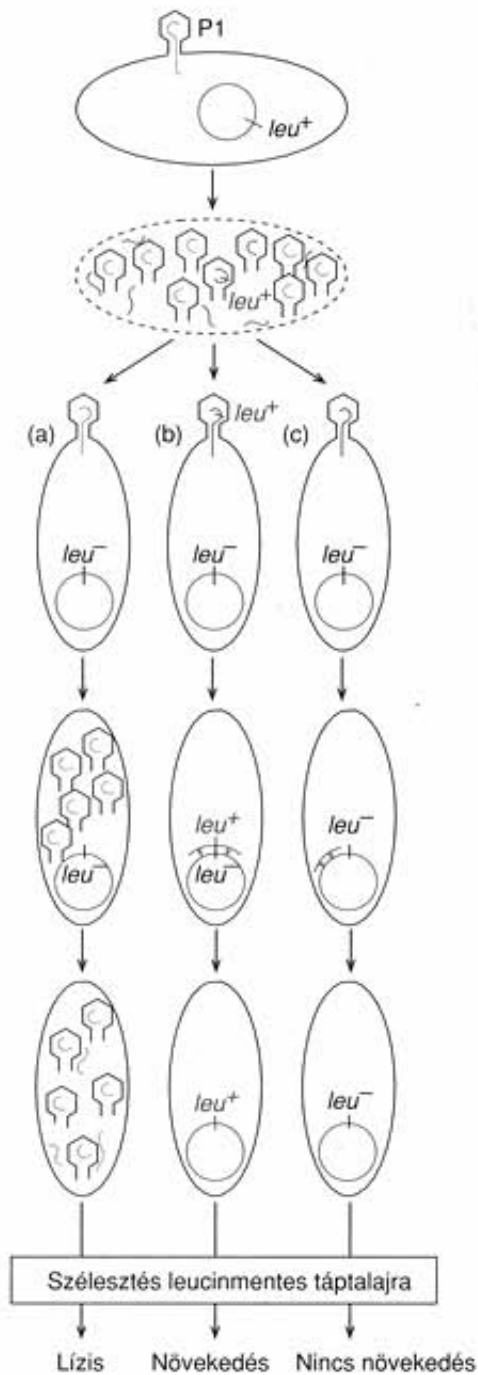
ris DNS-darabok lépnek be az új gazdasejtbe, és rekombinálandóknak kell a gazda kromoszómájával, különben elvesznek.

Az általános transzdukció közkedvelt eszköze a P1 fág, melynek genomja rendszeren 91,5 kb DNS. Ez azt jelenti, hogy a fág fejébe 91,5 kb donor-DNS fér el, ha egyáltalán nem kell helyet adnia fág-DNS-nek. Ez a mennyiség a teljes *E. coli*-genom mintegy 2,4%-a, és körülbelül 75 átlagos méretű gének felel meg – sokkal többnek, mint amennyit specializált transzdukcióval át lehet vinni.

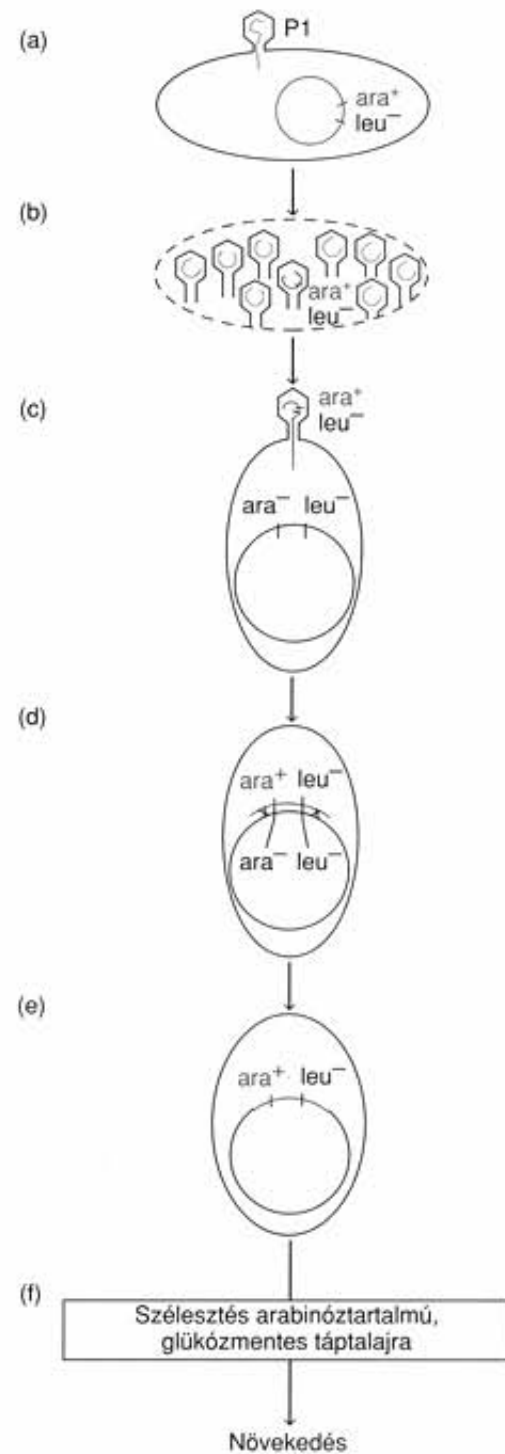
Egy adott P1 fertőzésben a fágoknak körülbelül 0,3%-a transzdukáló fág, a többi normál fág. Mivel egy adott transzdukáló fág maximum 2,4%-át hordozza a gazda genomjának, többé-kevésbé véletlenszerűen pakolja a DNS-t, annak az esélye, hogy egy meghatározott gazda eredetű gént egy fág részecskében megtaláljunk, legfeljebb $0,024 \times 0,003$, vagyis $7,2 \times 10^{-5}$. Ez kisebb, mint egy a tízezerhez; a gyakorlatban inkább egy a százezerhez, és így a kísérletezőnek hatékony szelekciót kell végeznie, hogy megtalálja ezt a „tűt a szénakazalban”.

Vegyünk egy kísérletet, ahol át akarjuk vinni a *leu*⁺ gént egy *leu*⁻ recipiens sejtbe (13.18. ábra). Ez viszonylag könnyen kivitelezhető. Megfertőzzük a *leu*⁺ donort a P1-gyel, összegyűjtjük az utód fágokat, közöttük a transzdukáló fágokat is, majd megfertőzzük velük a *leu*⁻ recipienst. A sejteket kiszélesztjük a leucint nem tartalmazó táptalajra. A normál P1-gyel megfertőzött sejtek lizálnak vagy egyáltalán nem növekednek, és nem replikálják a fágokat a leucin hiánya miatt. Azok a sejtek, amelyeket a *leu*-tól eltérő gént hordozó transzdukáló fágok fertőztek meg, illetve azok, amelyek nem fertőzöttek, szintén nem növekednek leucin hiányában. Csak azok a ritkán előforduló sejtek képesek a túlélésre, amelyeket a *leu*⁺ gént tartalmazó transzdukáló fágok fertőztek meg. Ezek átlátszatlan telepek formájában könnyűszerrel megtalálhatók a Petri-csészékben, körülveve a növekedésképtelen sejtek átlátszó régiójától. Ez egy másik példája a **szelekciónak**. A fenti esetben az összes nemkívánatos sejt eltávolítható azzal, hogy szaporodásukat megakadályozzuk, ezzel csak a számunkra szükséges sejtek (esetünkben a *leu*⁺) növekednek.

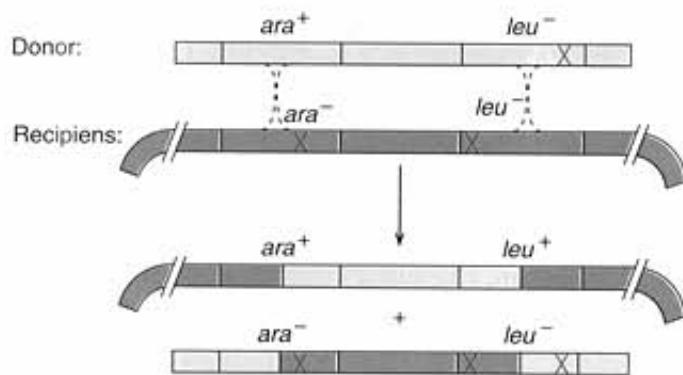
Tegyük fel, hogy DNS-t szeretnénk átvinni egy *leu*⁻ (1. allél) sejtbe egy *leu*⁻ (2. allél) recipiensbe. (Hamarosan bemutatjuk az ilyen kísérletek hasznosságát.) Ha a két allélban levő mutációk a *leu* operonnak ugyanazt a génjét érintik, az a következő problémát veti fel: nem szelektálhatunk a *Leu*⁻ fenotípusra a leucinnak a táptalajból való elhagyásával, hiszen a *Leu*⁻ sejtek ilyen feltételek mellett nem növekednek. Ehelyett egy szelektálható markert kell választanunk a nem szelektálható közelében. A 13.19. ábra bemutatja, hogyan működik a rendszer *leu*⁻ esetében. Mivel a *leu* lokusz nagyon közel található az *ara* lokuszhoz, vagyis az arabinóz felhasználását lehetővé tevő enzimeket kódoló lokuszhoz, esély van arra, hogy a *leu*-t hordozó transzdukáló fág tartalmazza az *ara*-t is. Ezért egy *Ara*⁺ *Leu*⁻ donor törzset fertőzünk meg P1-gyel, összegyűjtjük a transzdukáló fágokat, és *Ara*⁻ *Leu*⁻ recipienst fertőzünk meg velük. Ezután az *Ara*⁺ transzdukáns sejtekre szelektálunk glükózt nem tartalmazó arabinóztartalmú táptalajra szélesztve. Egyes *Ara*⁺ transzdukált sejtek a donor *leu*⁻ génjét is hordozzák majd, hiszen az *ara* és a *leu* lokuszok szorosan kapcsolódtak. Ez a folyamat, a **kotranszdukció**, amely jelentősen leszűkíti az elvégzendő kereső munkát.



13.18. ábra. Az általános transzdukció. Egy *leu⁺* baktériumot P1 faggal fertőzve, háromféle részecske keletkezik: (a) Szabályos P1 fág, amelyikben csak a fág DNS-e (szürke) található meg. (b) A gazda-DNS-t (piros), azon a *leu* operont (kék) tartalmazó transzdukáló részecske. (c) Transzdukáló részecskék, amelyekben a gazda-DNS *leu*-t nem tartalmazó szakaszai vannak (piros). Ha ezzel a három típusal *leu⁻* gazdasejteket fertőzünk, és azokat leucint nem tartalmazó táptalajra szélesztjük, megállapíthatjuk a fág-részecskék típusát. A szabályos P1 fágok (balra) megfertőzik és lizálják a sejteket. A *leu* gént hordozó transzdukáló fágok (középen) a gazdasejtet *leu⁻*-vá alakítják, és azok már növekedhetnek leucinmentes táptalajon. A *leu* gént nem tartalmazó transzdukáló fágok (jobbra) nem alakíthatják ki a *leu⁺* genotípust, ezért a gazdasejtek nem növekednek leucinmentes közegben



13.19. ábra. Kotranszdukciós tesztelés (screen). A cél a nem szelektálható *leu⁻* lokusz transzdukciója. Ezért kiválasztjuk a közelében található *ara* lokuszt, ami az arabinóz hasznosításának enzimeit kódolja. (a) *Ara⁺ Leu⁻* fenotípusú sejteket P1 faggal fertőzünk. (b) A fertőzésből származó néhány részecske transzdukáló fág lesz, amelyek a gazdasejt DNS-ének (piros) *ara⁺* (kék) és *leu⁻* lokuszait tartalmazzák. (c) Ezekkel a részecskékkel fertőzzük az *Ara⁻ Leu⁻* gazdasejteket. A legtöbb fág-részecske szabályos P1 fág lesz, vagy a célnak nem megfelelő bakteriális géneket hordozó transzdukáló fág. Csak néhányuk hordozza a gazda *ara* és *leu* géneit. (d) Rekombináció történik a transzdukált DNS és az új gazdasejt kromoszómája között. (e) Az eredmény egy *Ara⁺ Leu⁻* sejt, ami képes az energiaforrásként arabinózt tartalmazó táptalajon szaporodni. (f) Azok a sejtek, amelyekbe *ara* gének jutottak a transzdukáló fágokból, valószínűleg megkapták a *leu* géneket is, mert a két lokusz szorosan kapcsolt



13.20. ábra. Két mutáció közötti crossing over. A donor transzdukáló DNS-e az *ara*⁺ és a *leu*⁻ allélokot tartalmazza, a recipiens sejt kromoszómája (lila) pedig az *ara*⁻ és *leu*⁻ allélokat. (A két *leu*⁻ mutáció nem azonos!) A két DNS közötti rekombináció (szaggatott vonal) *Ara*⁺ *Leu*⁺ sejteket eredményez. A sejt *Leu*⁺ lesz, mert a rekombinációs crossing over a két mutáció (piros) közötti ponton következett be a két *leu* génben. A mutációk arra a rövid, lineáris DNS-szakaszra (*alul*) kerültek át, amely a folyamat során elvesz. A kromoszomális DNS így mind az *ara*, mind a *leu* géneknél mentes a mutációktól

A P1 fág általános transzdukcióra képes – a fág-DNS helyére a gazdasejt DNS-ét csomagolva. Az így keletkező részecskék maximum 91,5 kb nagyságú gazda-DNS-szakaszt szállíthatnak át az új sejtbe, lehetővé téve a rekombinációt a donor-DNS és a recipiens kromoszómája között. Minthogy egy P1 fertőzés fágjai közül csak kis töredék hordozza majd a kérdéses gént, ezért szelektálni kell a kívánt transzdukált baktériumra. Ez a legkönnyebben akkor végezhető el, ha a transzdukció során prototróf rekombinánsok képződnek.

Mutációk térképezése

Térjünk vissza ahhoz a kérdéshez, miért akarunk átvinni egy *leu*⁻ sejtbe DNS-t egy másik *leu*⁻ sejtbe! Indokolhatja például, ha tudni akarjuk, hogy két *leu*⁻ mutáció (1. és 2. allél), azonos nukleotidoknál következett-e be, és ha nem, akkor milyen távol vannak egymástól. Más szavakkal, a cél a mutációk térképezése. Ezt elvégezhetjük úgy is, hogy sok *ara*⁺ kotranszdukáns leucinmentes táptalajon próbálunk növeszteni. Ha ezek közül mindegyik *leu*⁻ maradt, esély van arra, hogy a *leu* mutációk (1. és 2. allélok) a donor- és a recipiens sejtekben is ugyanazon a helyen vannak. Ez azonban nem valószínű, sokkal nagyobb az esélye annak, hogy egyes *ara*⁺ transzdukánsok egyben *leu*⁺-ak is. Ez pedig azt jelenti, hogy a két *leu* mutáció között rekombináció történt (13.20. ábra).

Az 5. fejezetben már foglalkoztunk azzal, hogy minél távolabb található egymástól két gén, annál nagyobb az esélye a közöttük lejátszódó rekombinációnak. Ez vonatkozik a 13.20. ábra két *leu* mutációjára is. Az ábra alapján a mutációk nagyon messze helyezkednek el egymástól, így a közöttük fellépő crossing over gyakorisága viszonylag nagy. A folyamat eredménye pedig egy *leu*⁺ rekombináns. Az általános transzdukció viszonylag kényelmessé teszi az ilyen típusú finomtérképezést egy génen belül. Két

vagy több különböző gén kapcsoltágát ugyanilyen rekombinációs analízissel vizsgálhatjuk, kihasználva azt, hogy a rekombinációs gyakoriság a gének közötti távolsággal arányos.

A kotranszdukción alapuló közvetlen térképezés

Láttuk, hogy a kotranszdukció használható módszer, ha a vizsgálni kívánt gént egy másik szelektálható génnel együtt akarjuk a rendszerbe juttatni. A kotranszdukció emellett egy másféle térképezési eljárást is lehetővé tesz. Először is, ha két gén együtt transzdukálódik, akkor tudhatjuk, hogy távolságuk nem nagyobb, mint 91,5 kb, és elég szorosan kapcsolatosak. Továbbá, minél szorosabb a kapcsoltság, annál nagyobb a kotranszdukció valószínűsége. Vegyük észre, hogy ez pontosan ellentettje a rekombinációs tesztnek, ahol minél szorosabb a kapcsoltság, annál kisebb a rekombináció valószínűsége. A térképezési vizsgálatokban gyakran hivatkozunk a génekre, mint **markerekre**, mivel az út mentén sorakozó kilométerkövekhez hasonlóan, megjelölik a genom egyes helyeit. T. T. Wu kidolgozott egy képletet két marker kotranszdukciós gyakoriságának (x) kiszámítására:

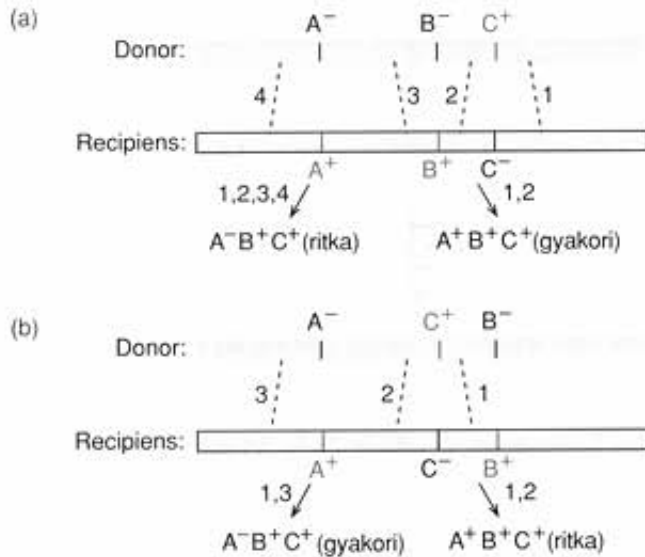
$$x = (1 - d/L)^3,$$

ahol *d* a két marker közötti távolság, *L* pedig annak a DNS-szakasznak a hossza, amelyet a transzdukáló fágészecske felvehet. Az egyenlet felhasználásával azt kapjuk, hogy az egymástól 60 kb, 30 kb, illetve 10 kb távolságra lévő markerek 4%, 30%, illetve 70% eséllyel kerülnek kotranszdukcióra. Egy átlagos bakteriális gén mindössze 1 kb nagyságú, ami pedig azt jelenti, hogy az azonos génben lévő markerpontok 96%-nál nagyobb valószínűséggel transzdukálódnak együtt.

Alkalmazhatjuk a transzdukciót a génsorrend meghatározására is. Vegyünk például három gént *A*, *B* és *C* jelöléssel. Előzetesen végzett kísérletekből tudjuk, hogy *B* és *C* gének szorosan egymás mellett vannak, az *A* pedig távolabb. A kérdés az, hogy a gének pontos sorrendje *ABC* vagy pedig *ACB*? A választ a 13.21. ábrán szemléltetett hárompontos keresztezés elvégzése adhatja meg.

Induljunk ki egy *A*⁺*B*⁺*C*⁻ fenotípusú recipiens sejtbe, amibe transzdukáljuk egy *A*⁻*B*⁻*C*⁺ fenotípusú sejt DNS-ét. Keressük meg ezután a *B*⁺*C*⁺ transzdukánsokat. Ennek a fenotípusnak a megjelenéséhez legalább az 1. és a 2. crossing overnek kell megtörténnie. Majd ezeken a *B*⁺*C*⁺ transzdukánsokon azonosítjuk az *A* allélokat. Vizsgáljuk meg, hány *A*⁺*B*⁺*C*⁺, illetve hány *A*⁻*B*⁺*C*⁺ típusú transzdukáns van. A 13.21.(a) ábra az *ABC* génsorrend esetén várható eredményt szemlélteti. Ha csak az 1. és a 2. crossing over történt meg, akkor az *A*⁺*B*⁺*C*⁺ jelenik meg, míg más crossing overek (3. és 4.) esetén össze kell kerülniük az *A*⁻, *B*⁺ és *C*⁺ alléloknak is. Mivel két crossing over együttes előfordulásának a valószínűsége sokkal nagyobb, mint négyé, ezért az *ABC* génsorrend esetén jóval több *A*⁺*B*⁺*C*⁺ transzdukáns várható, mint *A*⁻*B*⁺*C*⁺.

Az *ACB* génsorrend esetén várható eredmény a 13.21.(b) ábrán látható. Ebben az esetben az 1. és 2. crossing over vagy az 1. és 3. crossing over a *B*⁺*C*⁺ fenotípust adja, amit először vizsgálunk. A különbség az, hogy az 1. és 2. crossing overrel *A*⁺*B*⁺*C*⁺ fenotípust, az 1. és 3. crossing overrel pedig *A*⁻*B*⁺*C*⁺-t kapunk. A 3. crossing over valószínűsége sokkal nagyobb, mint a 2-esé, mert sokkal több hely van mindkét DNS-szakasz bal oldalán (az ábrán ez nem teljesen lát-



13.21. ábra. Hárompontos keresztezés, az A, B és C gének sorrendjének meghatározására. Tudjuk, hogy a B és a C gének közelebb vannak egymáshoz, mint bármelyikük az A génhez. Szeretnénk megtudni, hogy pontos sorrendjük ABC, mint az (a) ábrán, illetve ABC, mint az (b) ábrán látható. (b) Transzdukciót végzünk egy A⁻B⁻C⁺ donorral és egy A⁺B⁺C⁻ recipiensevel, és kinyerjük a B⁻C⁺ transzdukánsokat. Ezután megvizsgáljuk, hogy ezek között az A⁺ vagy az A⁻ fenotípusúak vannak-e többségben. Az (a) esetben tudjuk, hogy az 1. és 2. ponton fellépő crossing overek révén kerülnek a B⁺ és C⁺ allélok együtt a recipiens kromoszómára. Ha csak ezek a crossing overek következnek be, akkor a transzdukáns A⁺ lesz. Ha a 3. és 4. crossing over is bekövetkezik, a transzdukáns A⁻ lesz. Két crossing over együttes bekövetkezésének valószínűsége azonban sokkal nagyobb, mint négyé, ezért az A⁺ sokkal nagyobb gyakorisággal várható, ha a sorrend az (a) állapotnak felel meg. A (b) esetben tudjuk, hogy az 1. és 2. vagy az 1. és 3. crossing overrel kerül egy szárra a B⁺ és a C⁺ allél. De az 1. és 3. közötti rekombináció valószínűsége nagyobb, mint az 1. és 2. közötti, mert a 3. részére sokkal nagyobb hely van a bal oldalon (a teljes szakasz nincs ábrázolva), mint a 2.-nak, hiszen annak az A és C lokuszok között kell lejártszódnia. Az 1. és 3. eredménye A⁻ típus, míg az 1. és 2.-nak pedig A⁺. Tehát, ha a (b) elrendezés a helyes, akkor az A⁻ várható nagyobb gyakorisággal

szik), mint az A és C gének között. Ezért, ha a génsorrend ACB, akkor több A⁺B⁺C⁺ transzdukáns várható, mint A⁻B⁺C⁺-t. Ez pont az ellenkezője annak, amit az ABC génsorrend esetén várunk.

A transzdukció többféle térképezési eljárást tesz lehetővé. Transzdukálhatunk két gént, vagy ugyanannak a génnek két lokuszát, és megfigyelhetjük közöttük a rekombinációs gyakoriságot. Minél közelebb vannak egymáshoz, annál kisebb közöttük a rekombináció valószínűsége. Meghatározhatjuk két marker kotranszdukciós gyakoriságát is. Minél közelebb vannak egymáshoz a markerek, annál nagyobb a kotranszdukciós gyakoriságuk. Hárompontos keresztezésekkel a markerek sorrendjét is megállapíthatjuk a genomban, ilyenkor három markert transzdukálunk.

A T-PÁROS FÁGOK GENETIKÁJA

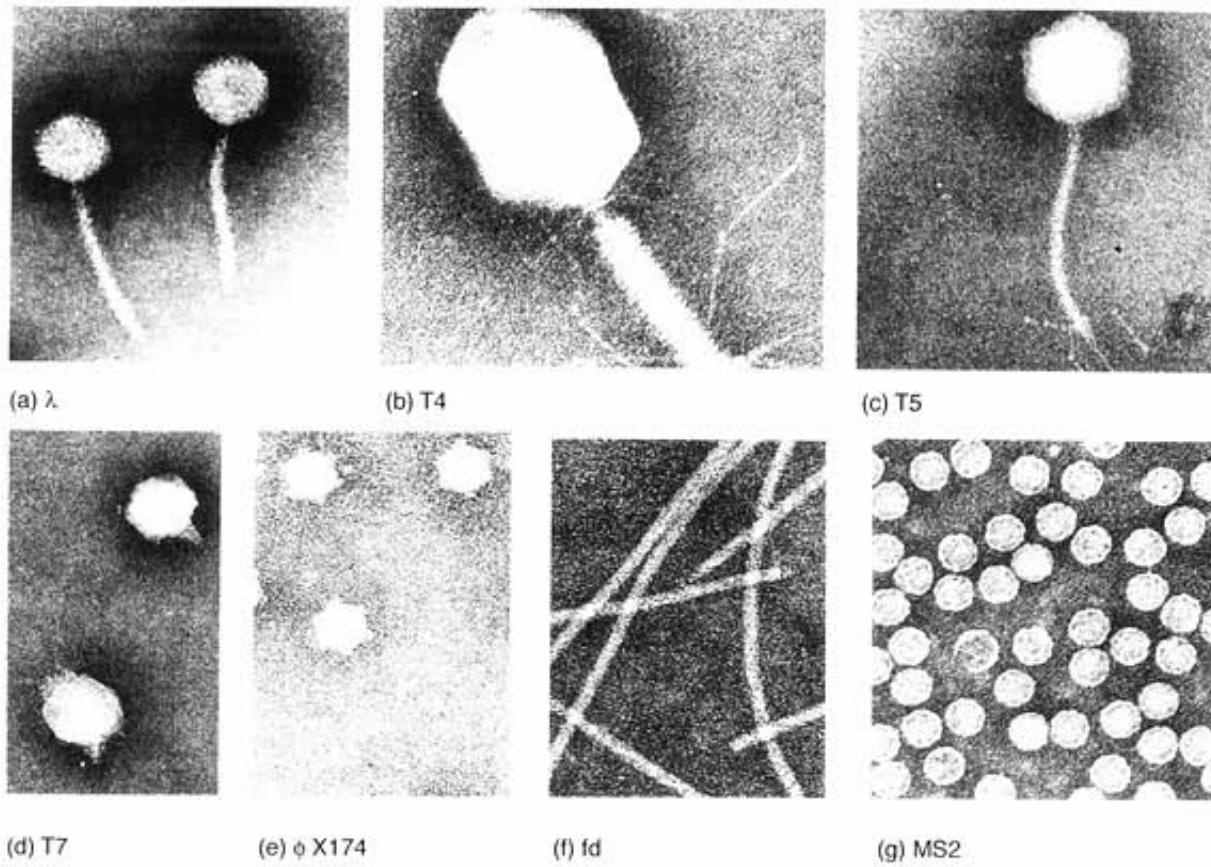
A bakteriális vírusokkal folytatott kísérletek 1915-ben kezdődtek, amikor F. W. Twort beszámolt arról, hogy nagyon kicsi, láthatatlan ágensek pusztítják baktériumtenyésztéseit. Felvetette, hogy ezek az ágensek vírusok, amelyek a baktériumok parazitái lehetnek. Twort munkája, sok más, már általunk is említett felfedezéshez hasonlóan, elkerülte a kutatók figyelmét. Így fordulhatott elő, hogy két évvel később F. d'Herelle újra felfedezte a jelenséget. A fertőző ágensnek a **bakteriofág** nevet adta (görög: *phagein* = felfalni). Az antibiotikumok felfedezése előtt úgy tűnt, hogy a fágok fontosak lehetnek a bakteriális fertőzések elleni küzdelemben. A fágkutatás új korszakát Delbrück és munkatársai indították 1938-ban, amikor vizsgálataik középpontjába a fágok egy kis csoportját, az ún. **T1-T7** fágokat állították. (A T a típus szó rövidítése.) Ennek elsősorban az volt a jelentősége, hogy ráirányította a figyelmet a közeli rokon **T-páros** fágokra (T2, T4 és T6). Ily módon az új eredmények összevethetőkké váltak, körvonalazódtak az összefüggések, így már nem csupán információ-töredékek álltak rendelkezésre az egyébként nagyon változatos fágokról. A 13.22. ábrán az *E. coli* fágjainak néhány változata látható.

A T-PÁROS FÁGOK FELÉPÍTÉSE ÉS SZAPORODÁSA

A 13.23. ábrán az egyik T-páros fág, a T4 bakteriofág vázlatos szerkezete látható. A fág legfeltűnőbb jellegzetességei közé tartozik a sokszögletű **fej**, amelynek belsejében, szorosan feltekeredve található a mintegy 175 kb méretű kétszálú DNS genom. A **farok** szerepe a DNS befecskendezése a gazdasejtbe, az *E. coli*-ba. A fág a **farokrostok** és az **alaplemez** segítségével kapcsolódik a gazdasejt felszínéhez. A 13.24. ábra hatásosan szemlélteti, mennyire szorosan tekeredhet fel a fejben a fág DNS-e, hiszen ha ozmotikus sokk hatására a fehérjeburok felreped, a DNS minden irányban szétterjed. Valóban hihetetlennek tűnik, hogy az összes DNS belefért a fejbe, egészen addig, amíg végig nem gondoljuk, hogy a DNS-t vastag fémgözzel árnyékkolták, hogy látható legyen. A valóságban sokkal vékonyabb, mint amilyennek látszik.

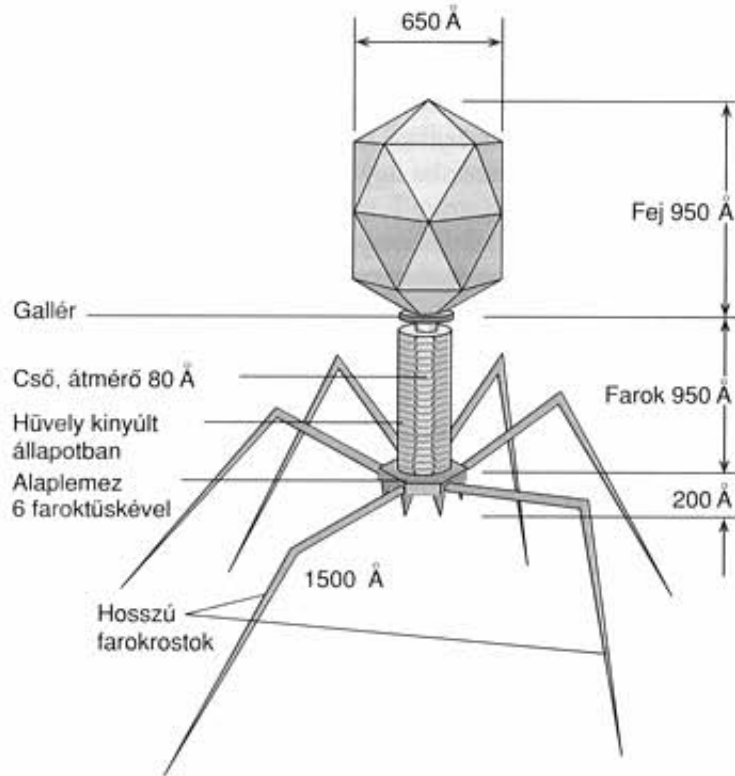
A fágok csak elektronmikroszkóppal láthatók, de a gazdasejtre gyakorolt hatásuk alapján könnyen számlálhatók. Ebben a **plakkvizsgálatnak** nevezett eljárásban a fágreszecskéket baktériumsejtekkel keverik össze, a keveréket kis térfogatú, a baktériumok növekedéséhez szükséges tápanyagokat tartalmazó olvasztott agarban szuszpendálják, majd Petri-csészében levő szilárd táptalajra szélesztik. A felületen szétterült agar gyorsan megszilárdul, és a szaporodásnak induló baktériumok egy éjszaka alatt egyenletes, átlátszatlan „pázsitot” képeznek. De amint az a 13.25. ábrán is látható, a fágok tudatják jelenlétüket, mert átlátszó **tarfoltokat**, más néven **plakkokat** alakítanak ki a baktériumpázsiton.

A plakk-képzés mechanizmusa a következő: mindegyik, az eredeti keverékben baktériumot fertőző fág átveszi a gazdasejt DNS-, RNS- és fehérjeszintetizáló gépezetének irányítását, arra

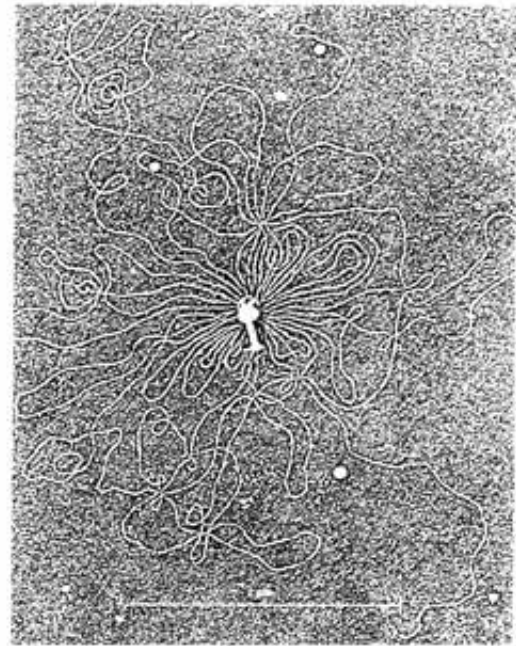


13.22. ábra. (a–g) Az *E. coli* néhány fágjának felépítése. Mindegyikük hozzávetőlegesen azonos nagyítással látható

Forrás: Williams, Robley C. és Fisher Harold W.: *An Electron Micrographic Atlas of Viruses*. 1974. Charles C. Thomas, Publ. Springfield, Illinois engedélyvel

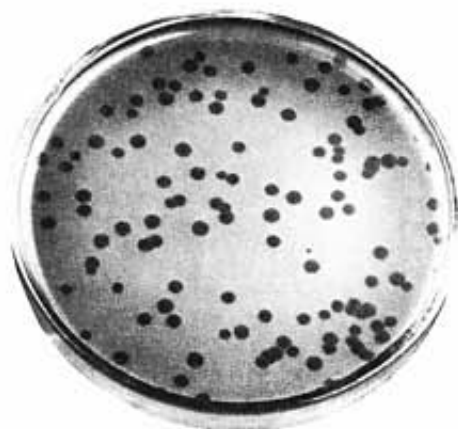


13.23. ábra. Egy T-páros fág részecske vázlatos rajza



13.24. ábra. Lizált T4 fág. Középen a fág burka látható, körülötte a kiszabadult DNS

Forrás: Kleinschmidt, A. K. és mások: *Darstellung und Längenmessungen des gesamten Desoxyribonucleinsäure-Inhaltes von T2-Bacteriophagen*. *Biochemica et Biophysica Acta*. 61:857–64, 1962. © Elsevier Science, NL, Sara



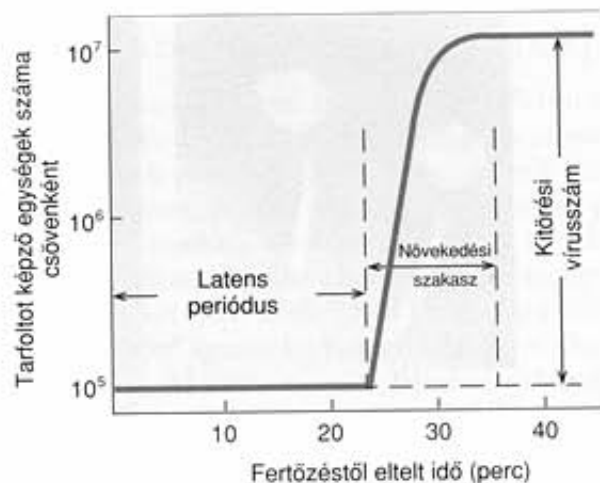
13.25. ábra. T2 fág tarfoltjainak vizsgálata. A fágokat *E. coli*-sejtekhez keverték, majd ezután a keveréket Petri-csészében agaros táplemezre szélesztették. A baktériumpázsiton minden egyes tiszta folt, azaz tarfolt, egyetlen olyan baktériumsejtből indul ki, amelyet egy fág fertőzött meg. A fertőzés a környező sejtekre is áterjed, ezért tarfolt képződik

Forrás: Stent, Gunther S.: *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. 1963, © W. H. Freeman and Co.

kényszerítik a sejtet, hogy saját alkotóik helyett fágokat állítsanak elő. Végül, a fág-DNS és a fehérjék ép utódfágokká szerelődnek össze, és körülbelül a fertőzés kezdetétől számított huszonötödik percben a sejt szétesik, lizál, és több száz utódfág szabadul ki belőle. Ekkorra azonban az agar már megszilárdult, így a kiszabadult fágok nem tudnak szétterjedni, csak a szomszédos sejteket fertőzhetik meg. A folyamat többször ismétlődik mindaddig, amíg a fágok egyik sejtet a másik után lizálva egy kitisztult foltot, plakkot nem hoznak létre a baktériumpázsiton.

Az eredeti szuszpenzió minden egyes fertőzőképes fágja elvben egy plakkot hoz létre. Tehát a plakkokat megszámlálva megállapíthatjuk a fertőző fágok, más szóval **plakk-képző egységek** számát egy adott térfogatban. Tegyük fel, hogy egy fág-suszpenziót 1:100 000 arányban hígítunk (10^5 -szeres hígítás), majd $\frac{1}{2}$ ml-ét baktériumpázsitra szélesztjük. Ha ezután száz plakkot kapunk, ez azt jelenti, hogy $100 \times 10^5 \times \frac{1}{2} = 4 \times 10^7$ plakk-képző egység, vagyis fertőzőképes fág volt az eredeti szuszpenzió 1 ml-ében. Miért hígítottuk a szuszpenziót? Azért, mert tömény szuszpenzió szélesztése esetén, a képződő nagyszámú plakk összefolyt volna, ami lehetetlenné teszi a számlálást. A gyakorlatban több különböző hígítást készítünk, így minden kísérletben kapunk néhány olyan lemezt, amely elfogadható számú plakkot tartalmaz.

A fág replikációja nem folytonos, hanem szakaszos. A fág megfertőz egy sejtet, és csak egy bizonyos idő után, ami alatt nem jelennek meg új fág-részecskék, következik az utódfágok százainak robbanásszerű kiáramlása. Ez az elképzelés Delbrück és Ellis ún. egy lépéses növekedési kísérletén alapszik, amit fággenetikai kutatásaik kezdetén végeztek. *E. coli*-sejteket fertőztek T4 fágokkal, majd különböző időpontokban megmérték a milliliterenkénti fág-számot. A 13.26. ábráról leolvasható, hogy csaknem huszonöt percen át a fágok koncentrációja nem növekedett. Ez a **latens periódus** (vagy **lag-periódus**). Ezután nagyon gyorsan emelkedett a koncentráció a 10^5 /ml értékről egészen a



13.26. ábra. Egy lépéses növekedési folyamat. A fertőzés óta eltelt idő függvényében ábrázolja a tarfoltot képző egységek számát. Közel 25 percig nem történt változás (latens periódus). Az időszak végén a fágok száma gyorsan emelkedni kezd (növekedési szakasz). A fágok számának különbsége a növekedési szakasz eleje és vége között a kitorési vírusszám (burst size)

10^7 /ml fölé, ami több mint százszoros érték. Ez a **növekedési periódus**. A kezdeti és a végkoncentráció különbsége adja a **kitörési vírusszámot** (burst size).

A valóságban a fertőző részecskék tényleges produkciója a gazdasejtben fokozatosabb, mint amit a növekedési periódus görbéje mutat, de a plakkvizsgálat során minden fertőzött sejtet csak egy plakk-képző egységnek számláljuk a lízisig. Másképpen fogalmazva, a növekedési periódus valójában a **lízist** tükrözi (a sejtek szétesését; görög: *lysis* = feloldás), ami lehetővé teszi, hogy minden utódfág önállóan fertőzzön. A lízis előtt mindegyik fertőző részecske egyetlen sejtben található, ezért a sejt és minden benne lévő fertőző részecske úgy viselkedik, mint egyetlen fertőző egység.

A T-páros fágok feje sokszögletű és mintegy 175 kb méretű kétszálú DNS-genomot tartalmaz. A DNS befecskendezése a farokrészen keresztül történik a gazdasejtbe, az *E. coli*-ba. A fágok átveszik a sejt DNS-, RNS- és fehérjeszintézisének irányítását, reprodukálják magukat, lizálják a gazdasejtet, majd újabb sejteket fertőznek meg. Mivel a T-páros fágok lizálják gazdasejtjeiket, egyszerűen megszámlálhatók a plakkok számának meghatározásával, vagyis a baktériumpázsiton kialakult élő sejteket nem tartalmazó tarfoltok számlálásával.

FÁGFENOTÍPUSOK, FÁGGENETIKA

Mivel a fágokat az általuk képzett plakkokkal mutatjuk ki, talán nem meglepő, hogy a T-páros fágok első mutánsait rendellenes plakk-képzésüknek köszönhetően fedezték fel. Ezek között volt az *r* mutáns, amelyik még ma sem teljesen tisztázott okok miatt külö-

13.1. A fágok nem pártolják a szakmai féltékenységet

Számos anekdota kering tudományos körökben, amelyek között kitalált és megtörtént esetek egyaránt vannak. Közreadjuk az egyiket, amelyből kiderül, hogyan kerekedhet a furfang az önzés fölé. A történet valószínűleg igaz, de neveket nem említünk.

A biológusok körében hagyomány, hogy kísérleti anyagaikat egymás rendelkezésére bocsátják. Ha hírt kap valaki egy más által izolált vagy szerkesztett új mutánsról, plazmidról, vírusról, mindössze annyit kell tennie, hogy kér egy mintát, amit hamarosan el is küldenek neki.

Ennek a rendszernek nyilvánvalóak az előnyei, hiszen növeli a kutatások hatékonyságát, egyszerűen azzal, hogy sok kézbe jutnak el az új anyagok, és nem egyetlen laboratóriumban dolgoznak velük. Bár manapság ezek a biológiai eredetű anyagok, különösen a jól használható eukarióta géneket hordozó baktériumklónok, kereskedelmi szempontból is értékessé váltak, ami természetesen csökkenti az anyagok önzetlen átadását.

Történetünk a genetikai mérnökösödés elterjedése előtt történt, ezért minden bizonnyal nem játszott szerepet benne

az anyagi érdekeltség. Egyszerűen csak a kutatók közötti erős versengés állhat a háttérben.

Egy fágokkal foglalkozó genetikus, nevezzük „A”-nak, felfedezett egy új fágot. Egyik kollégája, „B”, hamarosan meghallotta a hírt, és írt egy levelet „A”-nak, amelyben mintát kért az új fágból. „A” válaszolt is a levélre, de visszautasította az együttműködést, mondván, hogy saját céljaira kívánja felhasználni a fágot, nem szeretné, hogy más is hozzájusson.

De akarata ellenére mégis létrejött az együttműködés, egyszerűen azzal, hogy válaszeveletet írt „B”-nek, akinek ugyanis nagyszerű ötlete támadt. Darabokra vágta a kollégájától kapott levelet, és a papírszeleteket egy *E. coli*-tenyészetbe tette.

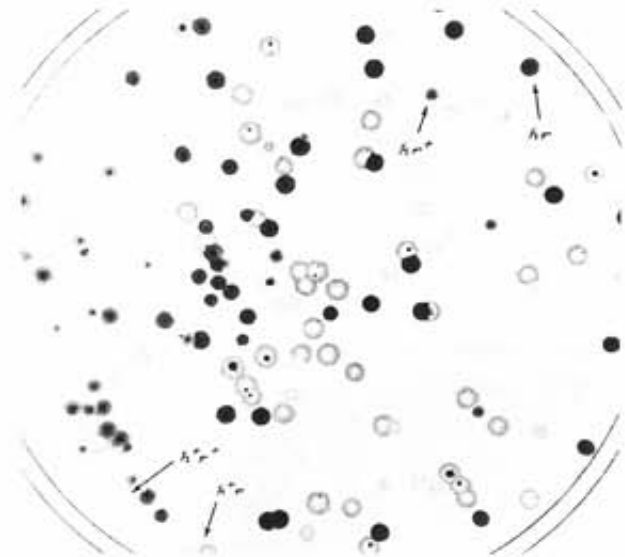
A baktériumok hamarosan megfertőződtek, és termelték a hön óhajtott fágokat. De miként lett a levél fertőző?

„A” laboratóriumának levegőjében nagyszámú fágreszecske volt, és közülük néhány rákerült a „B”-nek küldött levélre is. Annak ellenére tehát, hogy szándékában állt volna, „A” elküldte a fágot „B”-nek.

nösen nagy tarfoltokat alakít ki. A. D. Hershey (ugyanaz, aki később az egyik kidolgozója volt a 6. fejezetben bemutatott híres Hershey–Chase-kísérletnek) 1946-ban találta ezt a mutáns, és r -nek nevezte el, utalva arra, hogy a plakkok valószínűleg a gazdas sejtek gyors lízise (*rapid* – gyors) következtében növekednek az átlagosnál nagyobbra. Az r gén vad alléja az r^+ . Hershey azt is kimutatta, hogy az r fenotípus egy génmutáció következménye, mert az r mutáns plakkokból származó fágok csak r mutáns plakkokat képeznek, vad típusúakat nem. Azaz, az r fenotípus öröklődik.

Egy másik korán felfedezett T-páros mutáns, a szintén 1946-ban leírt T2h volt, a h a **gazdaspecificitást** (host-range) jelenti. Ez egy olyan T2 fág, amely képes megfertőzni azokat az *E. coli*-sejteket (Tto⁺), amiket a vad típusú T2 fágok nem. A Tto a T2 genetikai jelölése, a Tto⁺ a T2 rezisztenciára utal. (Hasonlóképpen, a Ton⁺ a T1 rezisztenciát jelenti.) Minthogy a vad típusú T2(h^+) fágok a Tto⁺ sejteket nem képesek megfertőzni, plakkokat sem alakíthatnak ki az ilyen baktériumok pázsitján. Ha azonban Tto⁺ és Tto⁺ sejtek keverékére szélesztjük őket, elérhetjük, hogy plakkokat képezzenek. A T2 fágok megfertőzik a Tto⁺ sejteket, ezért a baktériumpázsiton nem lizált, Tto⁺ sejteket tartalmazó, turbid plakkok alakulnak ki.

Ez a két különböző T2 mutáns lehetővé tette a fágok keresztezését és rekombinánsok előállítását. Tto⁺ és Tto⁺ sejtek keverékét a két fág – T2h r^+ és T2h⁺ r^- – nagy töménységű szuszpenziójának keverékével fertőzték. A magas koncentráció következtében nagy volt a fágok aránya a baktériumokhoz viszonyítva, azaz nagy volt a fertőzés **multiplicitása** (az egy baktériumsejtre jutó fertőző fágok száma – multiplicity of infection, röviden **m.o.i.**), ami biztosította, hogy a baktériumsejteket egyszerre több fág is megfertőzze. A kétféle faggal fertőzött sejtekben pedig mód nyílt a két fág

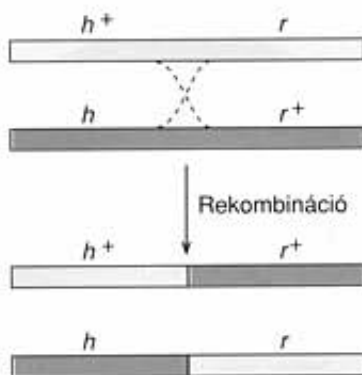


13.27. ábra. A T2 fág négy fenotípusának elkülönítése. A fágokat Tto⁺ és Tto⁺ *E. coli*-sejtek keverékére szélesztették. A képen négy különböző típusú tarfolt látható, amelyek a h^+r^+ , a h^+r^- , a h^-r^+ és a h^-r^- genotípusú fágokhoz tartoznak. A h^+r^+ plakkja kicsi, halvány, rosszul látható. A h^+r^- plakk nem annyira nagy, mint más r plakkok

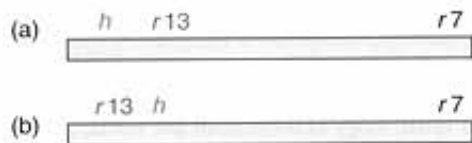
Forrás: Stent, Gunther S.: *Molecular Biology of Bacterial Viruses*. 1963, © W. H. Freeman and Co.

DNS-ének rekombinációjára, és a szülőitől eltérő, T2h⁺ r^+ , illetve T2h⁺ r^- genotípusú utód-fágok keletkezésére.

A Tto⁺ és a Tto⁺ sejtek kevert pázsitján az utód-fágok négy lehetséges kombinációja egyszerűen elkülöníthető (13.27. ábra). A T2h⁺ r^+ fágok kicsi, turbid plakkokat adnak (kicsiket az r^+ gén és zavarosakat a h^+ gén miatt). A T2h⁺ r^- fágok tarfoltja nagy és zavaros, a T2h⁺ r^+ fágoké kicsi és tiszta, míg a T2h⁺ r^- fágoké nagy és tisz-



13.28. ábra. A T2 fág *h* és *r* génjei közötti rekombináció. A baktériumokat h^+r és hr^+ genotípusú fágokkal egyszerre fertőzték. A két marker közötti rekombináció miatt h^+r^+ és hr utód fágok is kialakulnak



13.29. ábra. (a és b) A *h*, az *r13* és az *r7* markerek két lehetséges sorrendje

ta. A kísérletben sikerült megfigyelni mind a négy kombinációt. Bizonyítja mindez a rekombináció tényét? Igen, mivel a rekombináns fágok a továbbiakban is a szülőitől eltérő típusokat eredményeztek. Tehát a megváltozott morfológia öröklődött, vagyis rekombináció, nem pedig komplementáció történt (13.28. ábra).

Két különböző T-páros fág közötti rekombináció, a bakteriális géneknél alkalmazott módszerhez hasonlóan, lehetővé teszi a fágok genomjának térképezését. Hershey és munkatársai a T2 fág többféle *r* mutánsát izolálták (*r1*, *r2* stb.), majd megvizsgálták mindegyikük rekombinációs gyakoriságát egy adott *h* mutánssal. Vegyük például az *r7* és az *r13* mutánsokat, amelyek *h*-val való rekombinációs gyakorisága jelentősen különbözött. Az *r7* és az adott *h* mutáció közötti rekombináció eredményeként 12,3%-os gyakorisággal jelentek meg rekombinánsok az utódok között, míg az *r13* és ugyanezen *h* rekombináns típusainak gyakorisága csak 1,7% volt. Ez azt jelenti, hogy az *r13* és a *h* mutáció sokkal közelebb helyezkednek el a T2 genetikai térképén, mint az *r7* és a *h*. Ez a helyzet kétféle elrendezés esetén is kialakulhat, ahogyan azt a 13.29. ábra szemlélteti.

Annak eldöntésére, hogy a két lehetőség közül melyik felel meg a valóságnak, meg kell határozni az *r13* és az *r7* közötti rekombinációs gyakoriságot. Kisebb vagy nagyobb-e, mint a *h* és az *r7* közötti érték? Ha nagyobb, akkor az *r13* és az *r7* távolabb vannak egymástól, mint a *h* és az *r7*, vagyis a 13.29.(b) ábra sorrendje a helyes. Ha kisebb, akkor az *r13* és az *r7* közelebb vannak, mint a *h* és az *r7*, vagyis a 13.29.(a) ábra sorrendje a valós. A vizsgálatok az (a) esetet igazolták. Azt gondolnánk, hogy ez előrelátható volt, hiszen a két *r* mutáció valószínűleg ugyanazt a gént érinti, és nem valószínű, hogy a gént egy másik gén, a *h*, kettéosztaná. Kiderült azonban, hogy az *r7* és az *r13* mutációk különböző génekben találhatóak, de mindkét gén mutációja ugyanolyan mutáns fenotípust eredményez. Ennek ismeretében az eredmény mégsem olyan nyilvánvaló.

A T-páros fágok keresztezhetők, ha a gazdasejteket egyszerre fertőzzük meg két eltérő genotípusú, két különböző lokuszra mutáns fággal. A rekombináció eredményeként a szülőitől eltérő genotípusok is kialakulnak. A rekombinációs gyakoriságból meghatározhatjuk a fágének sorrendjét és kapcsoltágát.

A FINOMSZERKEZET TÉRKÉPEZÉSE

Az eddigiekben a T-páros fágok *r* mutánsainak néhány térképezési módját ismertettük. A továbbiakban a T4 *r* mutánsok egyik csoportjával foglalkozunk, amelyek mutációit Hershey az általa **rII**-nek nevezett lokuszba térképezte. Ezek az **rII** mutánsok azért voltak különösen figyelemre méltóak, mert az *r* mutánsok jellegzetes tarfoltján kívül még egy érdekes fenotípusos sajátosságuk is volt. Az *E. coli* B törzsen növekedtek, de a $K(\lambda)$ törzsen nem. Ez utóbbi kromoszómájában jelen van a λ -fág DNS-e. Tehát az **rII** mutánsok a kondicionális letalítás egy fajtáját mutatták, letalításuk a gazdasejt típusától függött. Benzer ezt a sajátosságot használta fel az **rII** lokusz részletes vizsgálatához, a nagyszámú, igen szorosan kapcsolt **rII** mutáns térképezéséhez.

A Benzer-féle rII térképezés

Ennek a részletes térképezési eljárásnak, a **finomszerkezet térképezésének** előfeltétele volt, hogy Benzer egyetlen lokuszon nagyon sok mutánsot izoláljon, és azokat egymáshoz viszonyítva térképezze. Nyilvánvaló, hogy az egy génben levő mutációk viszonylag közel esnek egymáshoz. Tény, hogy némelyik között csak egy vagy néhány bázisnyi a távolság, ezért igen kis gyakorisággal rekombinálódnak. Benzer szülői típusú (T4**rII**) fágok ezreit vizsgálta át, mire egyetlen rekombinánsot talált. Ez az a pont, ahol az **rII** mutánsok feltételes letalítása jól kihasználható. A szülői típusú fágok ugyanis nem képesek az *E. coli* $K(\lambda)$ törzsen növekedni, csak a ritkán előforduló rekombináns, vad típusú (T4**r**) fágok. Ez a tény jelentősen leegyszerűsíti a keresési folyamatot. Sokkal könnyebb ugyanis a vad típusú plakkokat észrevenni a sima baktériumpázsiton, mint felfigyelni egyre a tengernyi mutáns plakk között.

Benzer kondicionális letalításon alapuló szűrési módszere olyan hatékony volt, hogy akár 10^{-6} rekombinációs gyakoriságot is kimutathatott volna. Az **r** rekombinánsok legkisebb megfigyelt rekombinációs gyakorisága egy tizedred, vagyis 0,01% volt. Ugy tűnik, ez az a legkisebb távolság, amelyen belül a két mutáció még rekombinálódhat.

Milyen közel van egymáshoz az a két mutáció, amely 0,01% gyakorisággal ad **r** rekombinánsot? Erre a következő becslést végezhetjük. Ha az **r** rekombinánsok 0,01% gyakorisággal jelennek meg, akkor a nem kimutatott kettős mutáns rekombinánsok gyakorisága ugyancsak 0,01%. Ezért a rekombináció gyakorisága a valóságban 0,02%. Egy másik térképezési adatból tudjuk, hogy a gyűrű alakú fágterkép körülbelül 1500 **térkép-egységből** áll, ahol egy térképesség az 1% gyakorisággal rekombináló lokuszok közötti távolságnak felel meg (5. fejezet). Tehát a 0,02% gyakorisággal rekombináló lokuszokat a teljes fággenom 0,02/1500, azaz $1,3 \times 10^{-5}$ része választja el egy-

mástól, feltételezve, hogy a rekombinációs gyakoriság a genom minden pontján egyforma. Mivel a T4 fág genomja mintegy $1,75 \times 10^5$ bázispár nagyságú, a rekombinálódásra képes helyek távolsága két bázispárnak felel meg.

A már ismertett rekombinációs mechanizmusok alapján (7. fejezet) két szomszédos nukleotidot érintő mutáció között is végbemehet rekombináció. Benzer kísérletei nem voltak elég pontosak ennek bizonyítására, de későbbi vizsgálatok igazolták, hogy valóban történik rekombináció két szomszédos nukleotidot érintő mutációk között is.

Nagyon fontos volt az a felfedezés, hogy a rekombináció egy génen belül is bekövetkezhet. Ezzel megdőlt az a klasszikus elképzelés, hogy a gén oszthatatlan egység. A rekombináció valódi oszthatatlan egysége nem maga a gén, hanem egy szubgénikus egység, amit Benzer *recomak* nevezett el. Az elkövetkező években azonban világossá vált, hogy a recon valójában egy bázispár, ezért a Benzer-féle meghatározás kiszorult a használatból.

Deléciós térképezés

Az eddigiekben úgy tettünk, mintha Benzer csak pontmutációkkal dolgozott volna. Ha valóban ez lett volna a helyzet, akkor sokkal nehezebb dolga lett volna. A pontmutációk térképezéséhez ugyanis az szükséges, hogy minden mutánst keresztezzünk minden más mutánssal. Ez pedig több ezer mutáns esetén keresztezések millióit jelenti, ami nem túl biztató.

Benzer okosan, egy másik, nagyon hatékony módszert alkalmazott a mutánsok kezdeti szűrésére. Mutánsait, attól függően, hogy a mutációk az *rII* lokuszon belül hol helyezkedtek el, negyvenhét alcsoportba osztotta. Ha egy mutánst egyszer már besorolt a csoportok valamelyikébe, akkor azt már csak ugyanannak a csoportnak a tagjaival keresztezte, hogy meghatározza a mutáció pontos helyét.

Ez a kezdeti szűrési módszer a **deléciós térképezés**, ami **deléciós mutánsokkal** végezhető el. A pontmutáció egy vagy kisszámú szomszédos bázispár megváltozását jelenti. Ezzel szemben a deléció a gén nagyobb részének, esetleg az egész génnek, sőt néha több génnek az elvesztésével jár. Nézzünk egy egyszerű esetet, amikor egy génen belül már azonosítottunk két különböző deléciót (1. és 2. deléció; 13.30. ábra). A két deléciót felhasználhatjuk a gén három régiójának meghatározására. A pontmutánsokat keresztezzük az 1-es és 2-es deléciós mutánsokkal, majd megszámláljuk a vad típusú rekombinánsokat. Amennyiben egy pontmutáns vad típusú rekombinánsot ad a 2-es delécióval, míg az 1-essel nem, az arra utal, hogy a hibás bázispár az „a” régióban található. Hasonlóan, a „b” vagy a „c” szakaszon hibás DNS nem adhat vad típusú rekombinánsot a 2-es deléciós mutánssal. Másrészt, ha egy pontmutáns vad típusú rekombinánsot eredményez az 1-es delécióval, de a 2-essel nem, a mutációnak a „c” régióban kell lennie. Ugyanilyen okoskodással, ha a pontmutáns nem ad vad típusú rekombinánsot sem az 1-es, sem a 2-es deléciós mutánssal, akkor biztos, hogy a mutáció a két deléció átfedő régiójában, azaz a „b”-ben van.

A deléciós térképezésnek ezzel a fajtájával azonosította Benzer az *rII* lokusz negyvenhét különböző régióját, mindegyik régió végpontját egy sor deléció határozta meg. A régiók és az azokat meghatározó deléciók a 13.31. ábrán láthatók. Benzer a következőképpen térképezett. Az ismeretlen pontmutánst először keresztezte az ábra felső részén ábrázolt hét deléciós mutáns mindegyikével (1272–638). Ez lehetővé tette a mutáció helyének durva meghatá-



13.30. ábra. Deléciós térképezés. Két deléciós mutánst (1. és 2.) kereszteznek különböző pontmutánsokkal. A hiányzó DNS-szakaszokat zárójelbe tett kék vonalak jelölik. A 2-es deléciós mutáns csak azokkal a pontmutánsokkal adhat vad típusú rekombinánsokat, amelyekben a mutáció az a régióban található. Az 1-es deléciós mutáns pedig azokkal, amelyekben a pontmutáció a „c” régiót érinti. Egyikük sem adhat vad típusú rekombinánsot a „b” régiójukban mutánsokkal

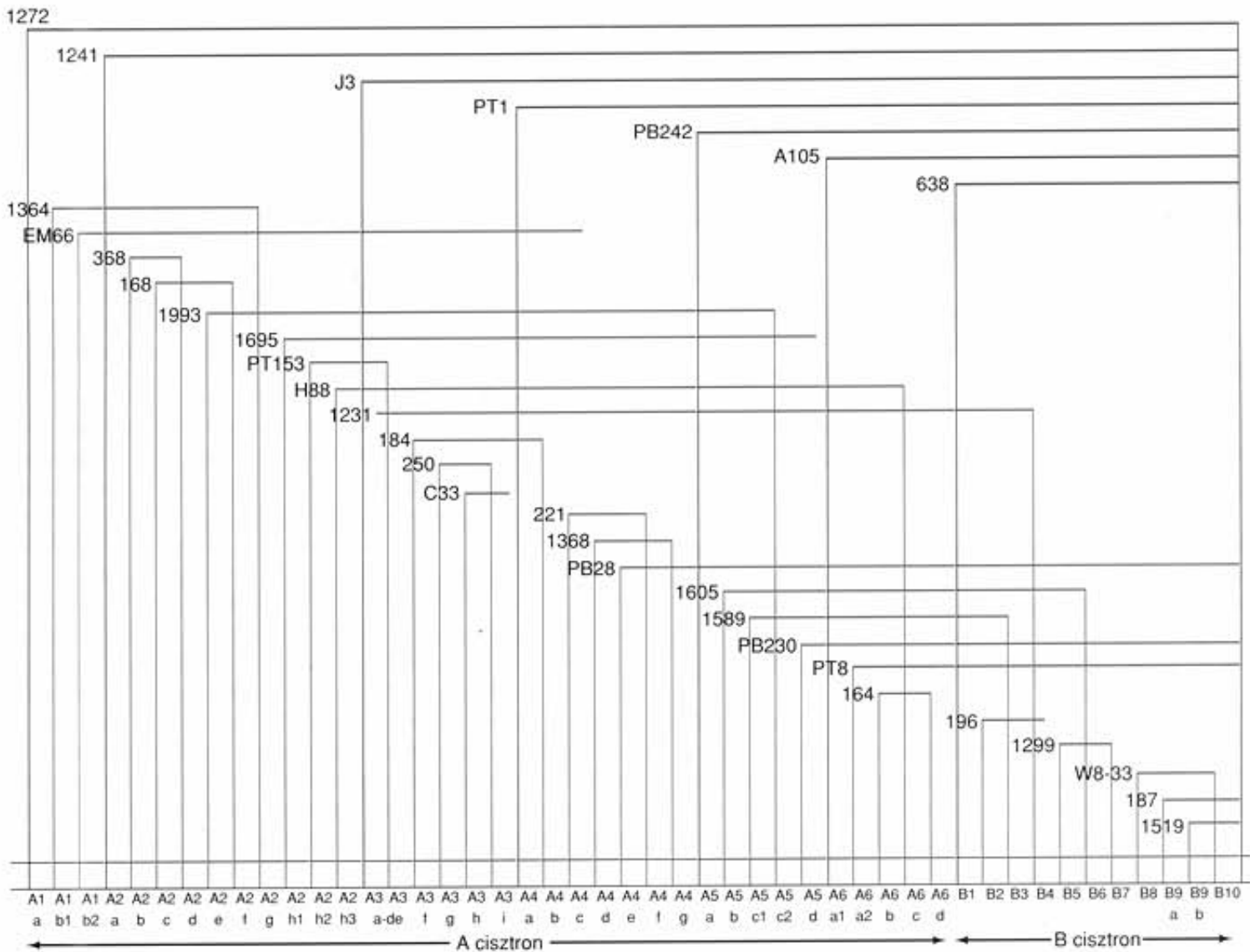
rozását. Ha például a mutáns vad típusú rekombinánsot adott az 1241-es delécióval, de az 1272-essel nem, ez azt jelezte, hogy a mutáció az *rII* lokusz bal szélén, az A1a, A1b1 vagy az A1b2 régióban lehet. Benzer ezután keresztezte a mutánst az 1364-es és az EM66-os deléciókkal. Ezzel megállapította, hogy a három al régió közül melyikben van a mutáció. Ha a mutáns az EM66-ossal rekombinánsot adott, de az 1364-essel nem, akkor a mutáció az A1b1 szakaszban volt. Benzer a finomtérképezést azzal fejezte be, hogy az ismeretlen mutánst már csak olyan pontmutánsokkal keresztezte, amelyek mutációi az *rII* lokusznak ebben a kis régiójában voltak. Nyilvánvaló, hogy mindez jelentősen egyszerűsítette munkáját.

Benzer spontán mutációk százainak helyét térképezte az *rII* régióban, és azt találta, hogy a mutációk nem egyenletesen oszlanak el ezen a szakaszon. Egyes helyeken egyáltalán nem talált mutációt, míg másokon ismétlődtek a mutációk. Az 1612 megvizsgált mutációból több mint ötszáz egy kis szakaszra esett! Benzer az ilyen, gyakori mutációra hajlamos helyeket **mutációs forró pontoknak** nevezte el. Hasonló jelenséget figyeltek meg a mutagénekkel kiváltott, indukált mutációk esetén is.

Seymour Benzer az *rII* régiójukban mutáns T4 fágok ezreit gyűjtötte össze, és részletesen térképezte a mutációk helyét. Kísérletei, valamint mások által végzett finomtérképezési vizsgálatok kiderítették, hogy az egy bázispárryira levő mutációk között is bekövetkezhet rekombináció. Benzer kimutatta azt is, hogy a mutációk nem egyenletesen oszlanak el az *rII* régióban, többségük mutációs forró pontokban csoportosul.

A CIS-TRANS TESZT ALKALMAZÁSA AZ *rII* RÉGIÓBAN

A bakteriális genetika tárgyalásakor már megismertük, milyen jól használható a *cis-transz* komplementációs teszt annak eldöntésére, hogy két mutáció ugyanabban a génen vagy különböző génekben történt-e. A teszt lényege, hogy a két mutáns genomot egy szervezetben egyesítjük, és megvizsgáljuk, kialakul-e vad fenotípus. Ha igen, akkor a két mutáns genom kiegészíti, komplementálja egymást, jelezve, hogy a mutációk különböző génekben találhatók. Amennyiben nem komplementálják egymást, akkor ugyanazon génjükben van a mutáció. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy ez lé-



13.31. ábra. Az *rII* régió delécióinak térképe, aminek alapján a lokusz negyvenhét szakaszra osztható. A két gént (*rIIA* és *rIIB*) negyvenhét szakaszra (A1a-tól B10-ig) osztották a vastagon húzott vízszintes vonalakkal jelölt deléciók végeinek megfelelően. A deléciós mutánsok azonosítója a vonalak bal oldalán olvasható. Egyes végződés nem határoznak meg szakaszokat, ezekhez nem kapcsolódik függőleges vonal. A hét nagyobb csoportot piros vonalak, az azokon belüli kisebb szegmentumokat kék vonalak jelölik

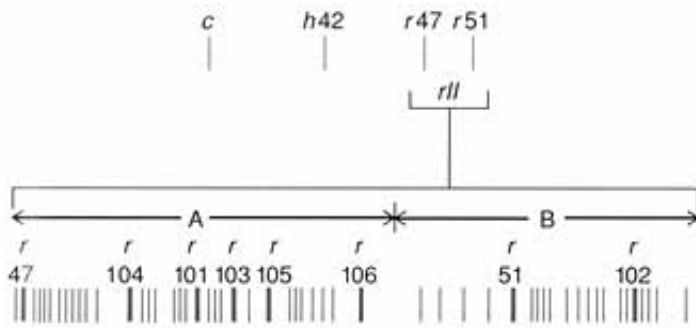
nyegében nem más, mint amikor a kutatók két mutáns eukarióta szervezetet kereszteznek. A két mutáns genomot ugyanabban az utódban hozzák össze, és megfigyelik az utódok fenotípusát.

A fággenetikában 1955-ben Benzer alkalmazta ezt a módszert – nevezetesen a T4 fág *rII* régiójában. Korábban már láttuk, hogy egyes *rII* mutánsok között igen gyakori a rekombináció, ami arra utal, hogy a mutáns lokuszok viszonylag távol esnek egymástól. Ez pedig arra enged következtetni, hogy az *rII* fenotípus kialakításában egynél több gén vesz részt. Benzer mindezt az alábbi módszerrel bizonyította. Különböző *rII* mutánsokkal más-más párosításban egyidejűleg fertőzött baktériumokat. Magas fág/baktérium arányt alkalmazott, ezzel biztosította, hogy a gazdasejtek mindegyikébe bejusson mindkét mutáns fág genomja. (Vegyünk észre, hogy ez megfelel annak, amikor keresztezéssel diploid baktériumokat vagy magasabb rendű szervezeteket hoznak létre!) A kérdés az volt, komplementálhatja-e egymást két *rII* mutáns? A tapasztalatok szerint sokuk igen. Ez pedig egynél több gént valószínűsít, de hányat?

Benzer azt találta, hogy az összes általa vizsgált *rII* mutáns, csak két komplementációs csoportba, vagyis két cisztronba sorolható. Az egyik csoportba tartozók komplementálják a másik csoport tagjait, de saját csoportjuk képviselőit nem. Ez a két cisztron az *rII* régió két génjét jelenti, Benzer jelölésével az *rIIA* és *rIIB* géneket.

A 13.32. ábra a két gén elhelyezkedését és néhány mutációját szemlélteti. Abban az időben, amikor Benzer kísérleteit végezte, inkább a *cisztron* kifejezést használták a *gén* helyett, mert az utóbbihoz erősen kötődött a már idejét múltá oszthatatlan egység fogalma. Napjainkban azonban ismét a gén megjelölést használják.

Benzer a T4 fág *rII* régiójára alkalmazta a *cisz-transz* tesztet, és két komplementációs csoportot, másként cisztront azonosított. A két cisztron felelős az *rII* mutáns fenotípus kialakításáért. Tehát az *rII* régió két génből áll.



103 $X^+Y^-Z^-$
 315 $X^+Y^+Z^-$
 57 $X^+Y^+Z^+$
 0 $X^-Y^-Z^+$

13.32. ábra. Az *rII* lokusz két cisztronja. Az *rIIA* és az *rIIB* gének, valamint néhány mutációjuk helyzete

Forrás: Benzer, S.: *Fine Structure of a Genetic Region in Bacteriophage*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41:344, 1955

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Elemezzünk egy olyan kísérletet, amikor semmit nem tudunk három gén sorrendjéről. Azt azonban tudjuk, hogy az X, Y és Z gének elég közel vannak egymáshoz, hogy együtt transzdukálódnak. Egy $X^+Y^+Z^+$ donort és egy $X^-Y^-Z^-$ recipienst használunk. Az X^+ transzdukánsokra szelektálunk, és a következő transzdukciós gyakoriságokat figyeljük meg:

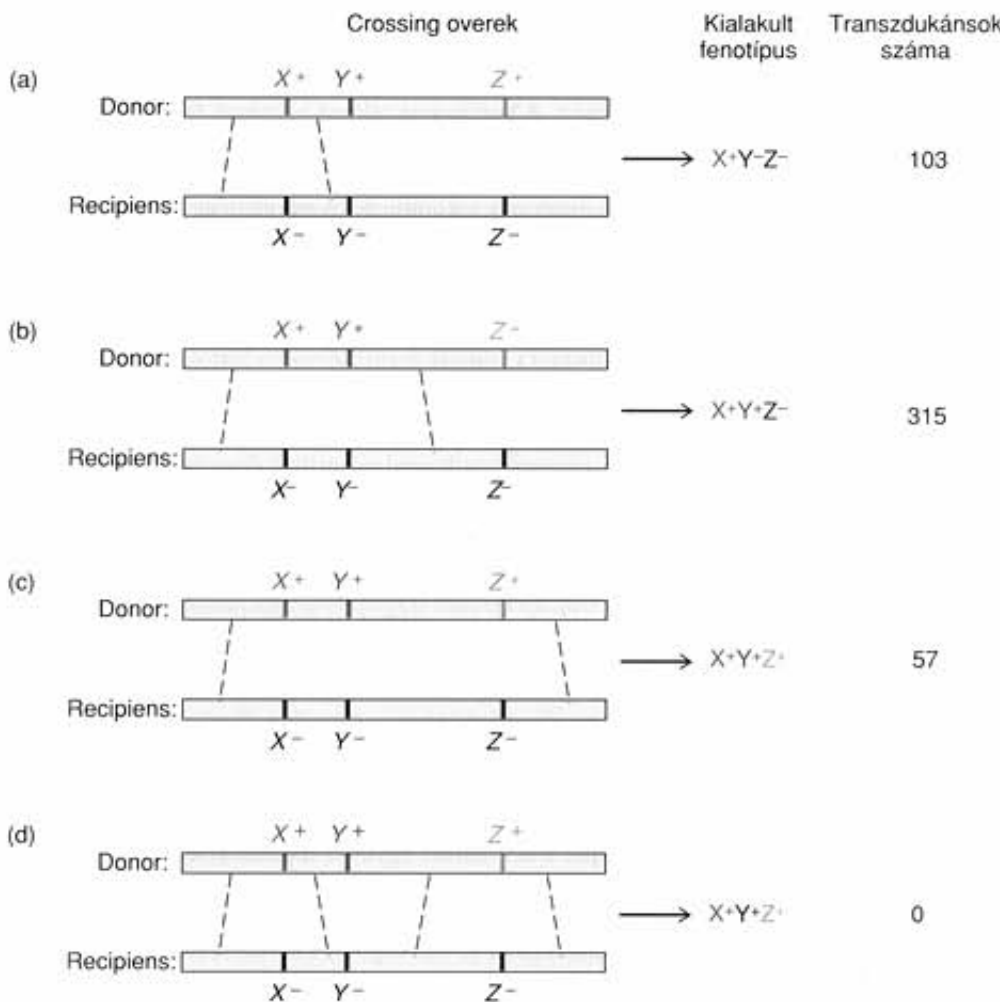
A következő kérdéseket tehetjük fel:

1. Mi a három marker sorrendje?
2. Mekkora az X és Y gének, illetve az X és Z gének kotranszdukciós gyakorisága?
3. Mekkora a DNS-távolság X és Y, illetve X és Z között?

MEGOLDÁS

Nézzük először a markerek sorrendjét! Látjuk, hogy a donor és a recipiens DNS-e között lejátszódó két crossing overrel egyetlen kivétellel minden kombináció kialakulhat. A negyedik csak négy crossing overrel jöhet létre, ezért ez a legritkább. Ez lesz az $X^+Y^-Z^+$, ami nem is jelent meg a transzdukánsok között. Hogyan eredményezheti a donor és a recipiens között négy crossing over ezt a kombinációt? Csak egyféleképpen, ahogyan az az alábbi ábrán is látható, vagyis ha Y a középső. Tehát a markerek sorrendje: XYZ.

Egy másik megközelítéssel: ha négy crossing over történik, akkor a három marker mindegyike előtt és után is van egy-egy. Ezzel a donorból automatikusan a transzdukánsba kerül a két szélső marker, a recipiensből pedig a középső állél. Így igen gyorsan megtalálhatjuk a legritkább kombinációt ($X^+Y^-Z^+$ ebben az esetben), és



Hárompontos keresztezés a génsorrend és a kotranszdukció gyakoriságának meghatározására. Legalább két crossing overnek kell bekövetkeznie ahhoz, hogy az X^+ marker átkerüljön a donor-DNS-ből a recipiensbe. Két crossing over áthelyezheti az X-et (a), az $X^+Y^+Z^-$ -t (b) vagy az $X^+Y^+Z^+$ -t (c). Ahhoz, hogy a két szélső donor marker (X^+ és Y^+) átjusson, és a középső recipiens marker, az Y^- az eredeti helyén maradjon, négy crossing overnek szükséges (d). Mivel négy átkereszteződés sokkal ritkábban következik be, mint kettő, a legritkább transzdukáns, vagyis az $X^+Y^-Z^+$ tartalmazza a recipiens középső markerét. Ebből megállapíthatjuk a sorrendet: XYZ vagy ZYX (a kísérlet alapján a kettő nem különíthető el). A kotranszdukciós gyakoriságot kiszámíthatjuk, ha összeadjuk a két donor marker átadásainak számát (pl. $315 + 57 = 372$ az X^+ -ra és Y^+ -ra), majd az összeget elosztjuk az összes transzdukánsok számával ($103 + 315 + 57 = 475$).

meghatározhatjuk, hogy a három lokusz közül, melyik lesz a recipiens fenotípusa (itt Y). Ezért Y van közepén.

Mennyi a kotranszdukciós gyakoriság? X-re és Y-ra: $(315 + 57)/475 = 0,78$; X-re és Z-re: $57/475 = 0,12$. Az ábra szemlélteti mindazokat a crossing overeket, amelyekkel a négy kombináció előállhat. Ismét felhívjuk a figyelmet arra, hogy az első háromhoz csak két crossing over szükséges, míg a negyedikhez négy. Azt is megjegyezzük, hogy az X előtti crossing over mindegyik esetben szükséges, mert csak az X⁺ transzdukánsokra szelektáltunk.

Végül, mekkora a DNS-távolság a markerek között? A kotranszdukciós gyakoriságra vonatkozó egyenlet $x = (1 - d/L)^2$ rendezésével:

$$d = L(1 - \sqrt{x})$$

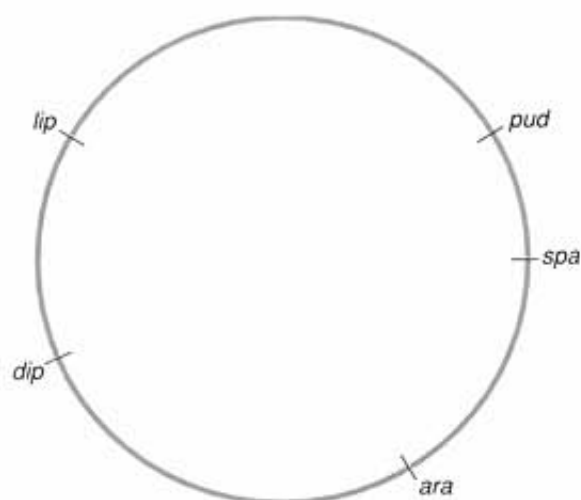
Amiből adott a hosszúság (L): 91,5 kb és az X és Y kotranszdukciós gyakorisága: 0,78. Ebből X és Y távolsága: 91,5 kb $(1 - \sqrt{0,78})$, vagyis 7,3 kb. Hasonló módon számolva az X és Z távolság: 91,5 kb $(1 - \sqrt{0,12})$ vagyis 46,7 kb.

2. FELADAT

Egy egzotikus baktérium konjugációja 60 percig tart. Konjugációs kísérletet végez ezzel a baktériummal, és azt tapasztalja, hogy a felsorolt markerek a következő időpontokban adódnak át: *pud* 10. perc, *spa* 15. perc, *ara* 25. perc, *dip* 40. perc, *lip* 50. perc. Rajzolja fel a baktérium genetikai térképét, feltételezve, hogy a konjugáció alatt a DNS átadása egyenletes sebességgel folyik, és a konjugáció kezdetén nincs lag-periódus.

MEGOLDÁS

Tekintettel arra, hogy a teljes konjugációs idő 60 perc, a baktérium térképe egy óra számlapjához hasonló. Mindegyik gént az átadás percének megfelelő értéknél tüntethetjük fel. Például a *pud* átadásához 10 perc szükséges, ezért helyét az óra 10 perces pozíciójánál (2 óra) tüntethetjük fel. Hasonlóan, a *spa* átutása 15 percet igényel, így a 15 perces pozícióba (3 óra) került és így tovább. Ha a konjugációs idő nem 60 perc, akkor az ábrázolás nem ilyen egyszerű, de az alapelv változatlan. Például, ha a konjugációs idő 150 perc, és egy gén átadása 50 percet igényel, akkor az arány 50/150, a teljes kör 1/3-ad része. A térképhely tehát megfelel a 20 perces órapozíciónak (4 óra).



3. FELADAT

Meg kell határozni a fűguszuspenzió titerét (pke = plakk-képző egységek száma milliliterenként). A szuszpenziót 10⁷-szeresére hígítja és kiszéleszt belőle 0,2 ml-t. Az inkubálás után 120 plakkot kap. Mekkora az eredeti fűguszuspenzió titere?

MEGOLDÁS

Egyszerűen meg kell szorozni a megfigyelt plakkok számát a hígítás mértékével, majd ezt elosztani a kiszélesztett milliliterek mennyiségével:

$$\frac{120 \text{ pke} \times 10^7}{0,2 \text{ ml}} = 6 \times 10^9 \text{ pke/ml}$$

ÖSSZEFOGLALÁS

Két mutáns (auxotróf) baktériumtörzs közvetlen érintkezéssel átadhatja DNS-ét, és vad típusú (prototróf) rekombinánsokat hozhat létre. Ez a folyamat a konjugáció, amelyet az F⁺ *E. coli*-ban egy 94,5 kb nagyságú F plazmid közvetít, ami nagy gyakorisággal kerülhet át az F⁻ baktériumokba. Esetenként az F plazmid rekombinálódik a gazdasejt kromozómájával, és Hfr-ré alakítja a sejtet. Ilyenkor mobilizálja a Hfr sejt kromozómáját a recipiens sejtbe történő átadásra. A Hfr donor és egy F recipiens konjugációjának megszakításával meghatározható egy adott gén átadásához szükséges idő. Az átutási idők közötti különbségből következtetni lehet a gének egymáshoz viszonyított helyzetére az *E. coli* gyűrű alakú genetikai térképén. A konjugáció teljessé válásának feltétele, hogy az átadott Hfr kromozómadarab és az F kromozóma között rekombináció történjen.

Előfordul, hogy egy rekombinációs esemény egy darabka gazda-DNS-t és egy F plazmidot kapcsol össze, és kialakul az ún. F['] plazmid. A gazdasejt génei így egy igen mozgékony elem részévé válnak, ami átviheti őket egy másik sejtbe. Genetikai kísérletekben ezt a hatékony transzfert kisméretű DNS-szakaszok átvitelére használjuk. Két különböző, de ugyanazt a funkciót érintő mutációt *cis-transz* teszttel, más néven komplementációs teszttel vizsgálhatunk. A mutációk rendszerint különböző génekben lokalizálhatók, amennyiben komplementálják egymást és ezzel helyreáll a vad típusú működés.

Fágok is használhatók a baktériumok közötti DNS-átvitelre, a transzdukcióra. A λ-fág által közvetített transzdukció az ún. specializált transzdukció, mert rendszerint csak a *gal* vagy a *bio* gént érinti, amelyek a λ-fág inszerciós helyét fogják közre. A P1 fág általános transzdukcióban vesz részt, a fág feji részébe, a fág-DNS helyére 91,5 kb gazda-DNS fér el. A transzdukció különböző genetikai térképezési eljárásokat tesz lehetővé. Átvihetünk két gént vagy egy génen belül két markert, és megfigyelhetjük közöttük a rekombinációs gyakoriságot. Minél közelebb találhatók egymáshoz a markerek, annál kisebb a rekombinációs gyakoriságuk. Ugyanakkor meghatározhatjuk a két marker együttes transzdukciójának (kotranszdukció) gyakoriságát is. Minél közelebb van egymáshoz a két marker, annál nagyobb kotranszdukciós gyakoriságuk. Három marker transzdukciójával és hárompontos keresztezésekkel, meghatározhatjuk a markerek sorrendjét a genomban.

A T-páros fágokat keresztezni tudjuk, ha a gazdasejteket egyidejűleg fertőzzük két különböző genotípusú, két lokuszban eltérést mutató fágokkal. A rekombináció eredményeként a szülőitől eltérő típusok is kialakulnak. A rekombinációs gyakoriságokból meghatározhatjuk a fágének sorrendjét és kapcsoltágát. A létfontosságú génekben a kondicionális letális mutációkat arra használják, hogy a fág életképessége ne sérüljön.

A T4 fág *rII* régiójának finomterképezésével kiderült, hogy akár egyetlen bázispárryi távolságra levő mutációk között is lehetséges rekombináció, és a mutációk ún. forró pontokba tömörülnek. A *disz-transz* teszt két komplementációs csoportot, vagyis két cisztront azonosított az *rII* régióban, amelyek az *rII* fenotípusért felelősek. Tehát az *rII* régió két génből áll.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- A szokásos bakteriális genetikai jelölésekkel írja fel az alábbi jellegzetességekkel bíró baktériumtörzsek genotípusát és fenotípusát. Zárójelben megadtuk az egyes lokuszok nevének hárombetűs rövidítését.
 - Laktóz felhasználására képtelen (lac).
 - Képes a leucin szintézisére (leu).
 - A tiamin előállítására képtelen (thi).
 - Sztreptomycinre rezisztens (str).
 - Puromicinre szenzitív (pur).
 - A biotin szintézisére képtelen (bio).
- Az 1. feladatban szereplő törzsek közül melyek a prototrófok és melyek az auxotrófok? Feltételezzük, hogy a törzs a jelzett génen kívül minden egyéb génjére vad típusú!
- Lederberg és Tatum első kísérletében egymilliomod reverziós arányt és egy tízmilliomod rekombinációs gyakoriságot tapasztalt. Megerősítette-e ez Lederberget abban, hogy kettős mutánsokat használjon? Válaszát indokolja!
- Miért ritkák egy bakteriális konjugációs kísérletben a valódi zigóták a prototróf rekombinánsok között? Hogyan nevezzük az ilyen sejteket?
- Bizonyos *E. coli*-sejtek rezisztensek a T1 fág fertőzésével szemben (*ton^r*). Szeretnénk megtudni, hogy ez a sajátság a bakteriális genom egy mutációjának a következménye, vagy pedig a sejt adaptációja a fág jelenlétéhez. A kérdés megválaszolásához fluktuációs tesztet végzünk, és azt találjuk, hogy húsz különböző tenyészetben nagyon változó a T1-gyel szembeni rezisztencia: 0-tól egészen 107 *ton^r* telep/tenyészet értékig. Mutáció vagy adaptáció okozza a tulajdonságot? Miért?
- Milyen folyamat következtében alakul át egy F⁺ sejt Hfr-ré? Mi ennek a következménye?
- A konjugációs kísérletekben egy Hfr sejt teljes genomja csak ritkán kerül átadásra. Miért?
- Az Arrakis bolygón élő óriás homokféregben él egy bélbaktérium (*Xenobacterium giganti*), amely konjugációra képes. Mint minden más ezen a férgen, a baktérium gyűrű alakú kromoszómája is óriási, konjugációjához 200 perc szükséges. Egy konjugációs kísérletben a felsorolt markerek átviteléhez az alábbi idők szükségesek: *ple* 25 perc; *bar* 75 perc; *gap* 100 perc; *zap* 150 perc; *chr* 200 perc. Váolja fel a baktérium genetikai térképét, feltételezve, hogy a gének átjutása a konjugáció során egyenletes, és a kezdeti lag-periódus elhanyagolható!
- A 8. feladat kísérletében azt tapasztalta, hogy a *ple* marker átadása sokkal hatékonyabb, mint a *chr* markeré. Mi a jelenség valószínű magyarázata?
- Milyen eltérést vár az átviteli időben *chr* és *ple* között, ha a 8. feladat kísérletét egy olyan Hfr törzssel végzi, amelyik a génátvitelt közvetlenül a *zap* gén után kezdi el?
- A *X. giganti* egy másik Hfr törzsében a fertilitási plazmid a *gap* és a *zap* közé épül be, de ellentétes orientációban, mint ahogy az a 8. feladatban szerepel. Milyen lesz ebben a Hfr törzsben a markerek átadási sorrendje?
- Egy *X. giganti* törzsben F⁺ plazmid található. Az F-*zap* a két génből (*zapA* és *zapB*) álló *zap* operont tartalmazza. Van két Zap⁻ mutánsa, és meg akarja határozni, hogy a mutációk ugyanazt vagy pedig különböző géneket érintenek-e. Tegyük fel, hogy (a) az egyik mutáns gén könnyen bevitelhető az F-*zap* plazmidba, és (b) az F-*zap* plazmid hordoz egy szelektálható *hisB^r* markert (hisztidint szintetizál), valamint (c) az *X. giganti* sejtek érzékenyek vagy rezisztensek a letalmicin nevű antibiotikumra. Váolja fel egy olyan kísérletet, amellyel megválaszolható a kérdés!
- Elvégzi a 12. feladathoz szükséges kísérletet (megoldását l. a könyv végén), és csak néhány Zap⁺ telepet kap. Melyik az a két lehetőség, amelyekkel megmagyarázható a Zap⁺ sejtek kialakulása, ha feltételezzük, hogy nincs backmutáció?
- Miért nem várható, hogy egy λ transzdukáló fág együtt tartalmazza a *bio* és a *gal* géneket?
- E. coli*ban a *thr* és *leu* markereket a bakteriális genomnak körülbelül 2%-a választja el egymástól. Várható-e, hogy a két gén együtt transzdukálódjon a P1 fágban? Indokolja a választ! Ha igen, milyen gyakorisággal?
- A *zip* és a *zap* gének kevesebb mint 10 kb távolságra vannak egymástól az *X. giganti* genomjában. A baktériumot az általánosan transzdukáló Q2 fág fertőzi meg. Izolált két különböző *zip* mutáns (*zip₁*, *zip₂*), és szeretné tudni a mutációk *zip* génen belüli elhelyezkedését. Készítsen erre kísérleti tervet!
- Ismeretes, hogy a *bop* gén mind a *zip*, mind a *zap* génnel szorosan kapcsolt az *X. giganti* genomban, és könnyen kotranszdukálódik a Q2 fágban. Tisztázni akarja, hogy a génsorrend *zip-bop-zap* vagy pedig *zip-zap-bop*. Ezért transzdukcióval hárompontos keresztezést végez: a Zip⁺ Zap⁻ Bop⁺ donorból viszi át a DNS-t a Zip⁻ Zap⁺ Bop⁻ recipiensbe, és szelekciót hajt végre a Bop⁺ transzdukánsokra. A legkisebb gyakorisággal megjelenő fenotípus a Zip⁺ Zap⁺ Bop⁺ volt. Mi a három gén sorrendje? Milyen eredményt várna, ha a másik

génsorrend lenne a helyes? (A két lehetséges diagram ábrázolása segít a kérdés megválaszolásában!)

18. Hárompontos keresztezést végez, amelyben Q2 fággal transzdukálja az Awk^+ , Kat^+ és Nrd^+ markereket hordozó DNS-t egy $Awk^- Kat^- Nrd^-$ recipiensbe. Az Awk^+ transzdukánsokra szelektál, és a következő eloszlást kapja:

$Awk^+ Kat^- Nrd^-$:	638
$Awk^+ Kat^+ Nrd^-$:	309
$Awk^+ Kat^+ Nrd^+$:	115
$Awk^+ Kat^- Nrd^+$:	1

Mi a markerek sorrendje? Mekkora a kotranszdukciós gyakoriság az *awk* és a *kat*, valamint az *awk* és az *nrd* markerek között?

19. Szeretné meghatározni egy fáguszuspenzió titerét (a milliliterenkénti plakk-képző egységek számát). 10^6 -szorosra hígítja

a szuszpenziót, és kiszéleszt belőle 0,05 ml-t. Inkubálás után 250 plakkot figyel meg. Mekkora volt az eredeti szuszpenzió titere?

20. T2 fágot szaporít. Nem várja meg, hogy a fág lizálja a gazdasejteket, hanem a fertőzéstől számítva különböző időpontokban feltöri a sejteket és meghatározza a plakk-képző egységek számát. Miben tér el az így szerkesztett növekedési görbe a szabályos egy lépéses növekedési görbétől? Miért?
21. *X. giganteus* sejteket különböző Q2 fágokkal fertőz, és a következő rekombinációs gyakoriságokat kapja a *K*, *L* és *M* markerekre: *K* – *L* között: 18%; *K* – *M* között: 2,4%; *L* – *M* között: 15%. Mi a három marker sorrendje?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

14.

F E J E Z E T

Fejlődésgenetika

Tanulási program

- 1 A génműködés és a sejt differenciálódás kapcsolata.
- 2 Az eukarióta génműködés szabályozása.
- 3 A sejt differenciáció és a determináció különbségei.
- 4 A determinációt magyarázó elméletek.
- 5 Az ecetmuslica egyedfejlődését egy hierarchikus szerveződésű géncsoport összehangolt működése szabályozza.
- 6 Az egyedfejlődés alatt maguk a gének is változhatnak.

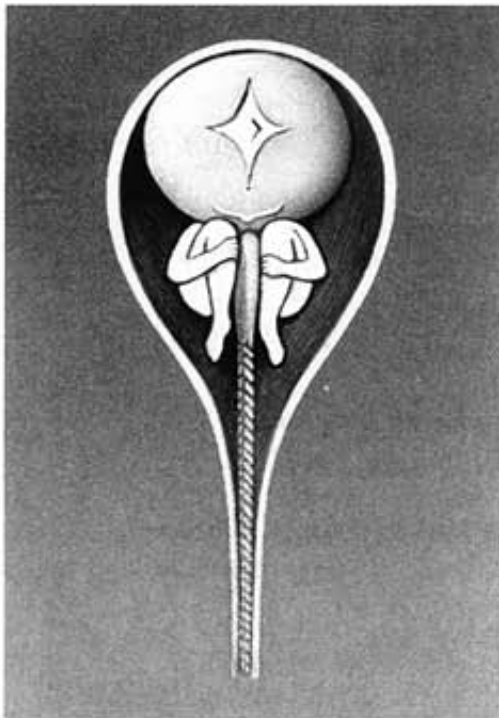
*Én nem akarok légy lenni!
Én kukac akarok lenni!*

Charlotte Perkins Stetson Gilman
angol költőnő

A modern biológia, ha nem is központi, de egyik legnagyobb rejtélye, hogyan fejlődik emberi lényé egy megtermékenyített petesejt? A kérdést emberközpontúan foglaltuk meg, hiszen a legnagyobb érdeklődést saját magunk iránt tanúsítjuk, de ugyanilyen homály fedi bármely más magasabb rendű élőlény fejlődését. Az idők során a tudósok egyre bonyolultabb magyarázatokat adtak a kérdésre, de még mindig nagyon távol vagyunk a rejtély megfejtésétől.

A XVII. században a tudósok úgy vélték, hogy megformált piciny emberke, *homunculus* rejtőzik minden egyes spermiumban (14.1. ábra). Feltételezték, hogy a homunculus egyszerűen addig nőtt a megtermékenyített petesejtben, míg el nem érte egy újszülött méretét. Ezzel az elmélettel szemben természetesen komoly problémák merültek fel. Az egyik például az volt, hogy magának a homunculusnak ugyancsak miniatűr spermiumokat kell tartalmaznia, amelyekben még kisebb homunculusoknak kell rejtőzniük – és így tovább –, vagyis magukban kell hordozniuk az összes elkövetkező generációt.

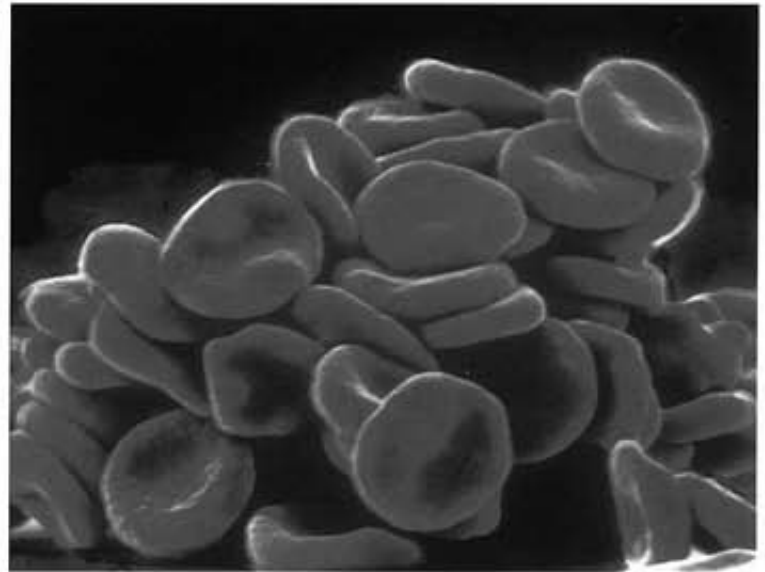
A csirkeembriológiával foglalkozó kutatók nem találtak bizonyítékot a homunculus-elméletre. A csirkék egyedfejlődésének tanulmányozásakor azt tapasztalták, hogy minél inkább visszafelé haladnak az időben, az embrió annál kisebb és egyszerűbb felépítésű. Ez a megfigyelés vezetett az **epigenezis** elméletéhez, amely szerint az embrió legkorábbi fejlődési fázisában még nincsenek szövetek, azok egyszerűbb struktúrákból alakulnak ki az egyedfejlődés során. Ebből pedig az következik, hogy egyetlen megtermékenyített petesejt fejlődik a sejtek milliárdjaiból álló felnőtt egyedé, a sejtek pedig több tucat különféle szervet hoznak létre, amelyek mindegyike különböző, speciális funkciót lát el.



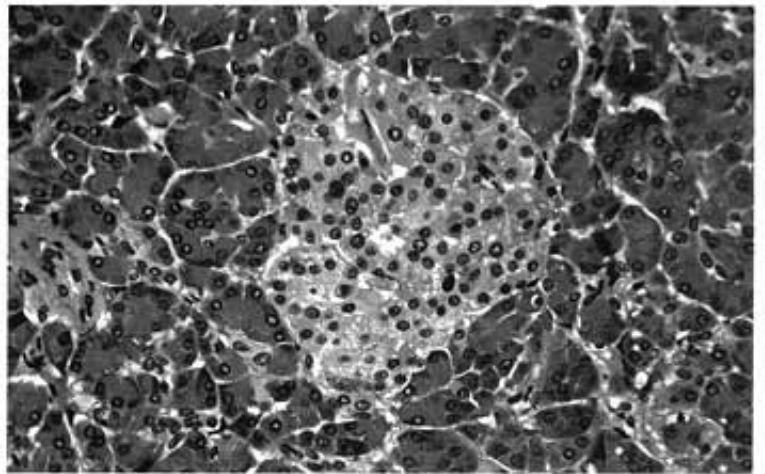
14.1. ábra. Homunculus

A SEJTDIFFERENCIÁCIÓ GENETIKAI ALAPJAI

Már tudjuk, hogy az eltérő sejtműködések háttérben a fehérjék állnak. A szerkezeti fehérjék szabják meg a sejtek alakját, az enzimek meghatározott kémiai reakciókat katalizálnak, a hormonok pedig mint kémiai jelek közvetítik az információt a sejtek között és így tovább. Vegyük például az emberi test két specializálódott sejtjét, a vörösvérsejteket és a hasnyálmirigy β -sejtjeit (14.2. ábra). A vörösvérsejtek szállítják a keringési rendszerben az oxigént, korong alakjuknak köszönhetően könnyedén mozognak a vékony kapillárisokban, és egyetlen fehérjét tartalmaznak igen nagy mennyiségben: a hemoglobint. Amikor a vér átáramlik a tüdőkön, a hemoglobin megkötöti az oxigént, és színe élénkpirosra változik. Később, a nagy vérköri kapillárisok területén leadja az oxigént a környező szöveteknek, biztosítva ezzel életüket.



(a)



(b)

14.2. ábra. Eltérő morfológiájú sejtek. (a) Érett vörösvérsejtek; (b) a Langerhans-féle szigetek inzulint termelő β -sejtjei (középső, világosan festődő sejtek)

Forrás: (a) © MEOLA/ARS-USDA/Science Source/Photo Researchers, Inc.

(b) © Edwin A. Reschke

Ezzel ellentétben a β -sejtek nem áramlanak a szervezetben, hanem kis sejtcsoportokat alkotnak egy meghatározott helyen: a hasnyálmirigy Langerhans-féle szigeteiben. Fő feladatuk az **inzulin** nevű hormon termelése. A sejtek a véráramba választják ki ezt a kis fehérjemolekulát, amely így a test távoli tájaira is eljut, és mint kémiai hírvívő szabályozza a többi sejt anyagcseréjét. Magas vércukorszint esetén az inzulin többek között serkenti a sejtek glükózfelvételét, gátolja a zsírszövetben a zsírok lebontását. Hatására ezért csökken a vér glükóztartalma.

Nyilvánvaló, hogy a vörösvérsejtek és a β -sejtek funkciója alapvetően különbözik. Ezeket a működésbeli eltéréseket híven tükrözik azok a fehérjék, amelyeket a két sejttípus termel. Az éretlen vörösvérsejtek hatalmas mennyiségű hemoglobint állítanak elő, és emellett csekély mennyiségben másféle fehérjék is képződnek bennük, de inzulin nem. A β -sejtek ugyanakkor sok inzulint szintetizálnak, hemoglobint viszont nem. Pedig mindkét sejt ugyanabból a megtermékenyített petesejtből származik. A korai fejlődési stádiumú embrió sok sejtből áll, ezek többékevésbé hasonlóak, és nem termelnek sem inzulint, sem hemoglobint. De a fejlődés egy pontján sejtei **differenciálódnak**, és megkezdik specializált termékeik előállítását. Egyes sejtekből hemoglobint szintetizáló vörösvérsejtek, míg másokból inzulint termelő β -sejtek lesznek. Mindegyik sejt, még akkor is, ha már megkezdte speciális termékeinek szintézisét, folytatja a sejtanyagcseréhez nélkülözhetetlen egyéb fehérjék termelését is. Mindegyikük előállít például RNS-polimerázt és riboszomális fehérjéket. Az ilyen alapvető fontosságú, létfenntartó funkciójú fehérjék génjeit néha **háztartási géneknek** (housekeeping) nevezik. Azokat a géneket pedig, amelyek olyan speciális termékeket kódolnak, mint amilyen a hemoglobin vagy az inzulin is, **luxusgéneknek** hívják. „Luxus”-gének, mert termékük nem feltétlenül szükséges az őket előállító sejtek túléléséhez, de működésük az egész szervezet szempontjából alapvető.

Röviden összefoglalva: a különböző módon specializálódott sejtek más-más fehérjéket termelnek, és ezek a fehérjék határozzák meg a sejtek működését. A fehérjék géntermékek. Ez azt jelenti, hogy a hemoglobint felépítő globin fehérje génjei az éretlen vörösvérsejtekben, az inzulin génjei pedig a hasnyálmirigy β -sejtjeiben kapcsolódnak be. A sejt differenciáció tehát az eltérő génműködés következménye, és aki meg akarja érteni a differenciációt, valamint az egyedfejlődést, annak fel kell tennie a kérdést: Mi teszi lehetővé bizonyos gének működését az egyik vagy a másik sejttípusban? Két olyan elméletet vizsgálunk meg, amelyek megkísérelnek választ adni erre a problémára.

MOZAIKOS FEJLŐDÉS ÉS REGULATÍV FEJLŐDÉS

A géndifferenciálódás egyik egyszerű magyarázata lenne, hogy egy differenciálódó sejt, az alapvető anyagcseréhez és a speciális funkciókhoz szükséges géneken kívül, valamennyi génjét elveszíti. Ez igazi genetikai változás lenne, hiszen maga a genetikai anyag módosulna, illetve veszne el. Wilhelm Roux publikálta annak az elméletnek az egyik változatát, amely szerint az embrionális sejtek már a kezdeti stádiumban kezdik elveszíteni genetikai potenciáljukat, úgy hogy a fejlődéssel együtt járó sejt-

osztódások során a genetikai anyag egyenlőtlenül oszlik meg a lánysejtek között. Ily módon olyan embrió keletkezne, amelynek genetikailag eltérő sejtei különböző darabokból álló mozaikra hasonlítanak. Innen származik a **mozaikos embrió** elnevezés is.

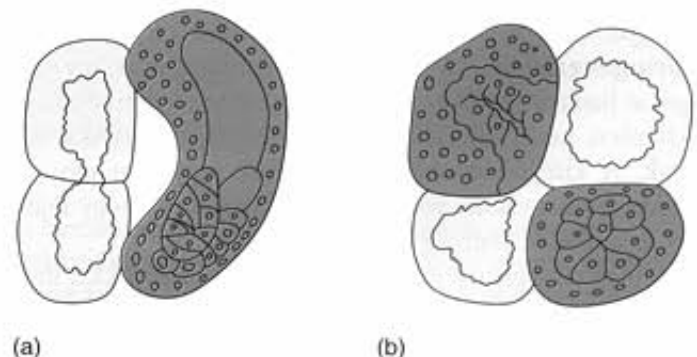
Mozaikos fejlődés

Roux mozaikosfejlődés-elméletét az a megfigyelés támasztotta alá, hogy sok gerinctelen állat embriója, már egészen korai stádiumban is, eltérő sejtekből áll. Úgy tűnik, hogy ezek a sejtek irreverzibilisen előre meghatározott fejlődési utakra programozódtak. A mozaikos embriók egyik sokat vizsgált példája a zsákállatok egyik osztályába (*Ascidia*) tartozó *Styela*. Ebben a szervezetben már kétszejtes állapotban eltér a két embrionális sejt (**blasztoméra**). E. G. Conklin 1905-ben végzett kísérlete igazolta, hogy az eltérések négysejtes állapotban is megmaradnak (14.3. ábra). Conklin pipettán préselte keresztül a négysejtes embriókat, hogy elröncsoljon néhány blasztomérát, majd vizsgálta a megmaradt sejtek sorsát.

A 14.3.(a) ábra bal oldalán lévő két sejt (anterior sejtek) ronccsolódott, de a két hátulsó (posterior sejtek) tovább differenciálódott a gerinchúr chordasejtjeivé és izomsejtekké, úgy mint ha ép embrióban lett volna. A 14.3.(b) ábrán a bal alsó (anterior – vegetatív) és jobb felső (posterior – animális) sejteket roncsoolták el, de a két megmaradó sejt ismét folytatta saját fejlődési programját. A bal felső sejt a velőlemez sejtjeit, a jobb alsó pedig izomsejteket hozott létre. Elvileg az is elképzelhető, hogy az embrió minden sejtosztódásánál felosztotta génjeit, például úgy, hogy a bal felső sejtbe kerültek a velőlemez létrehozásához szükséges gének, míg a jobb alsóba az izmok kialakításához szükségesek. Nincs bizonyíték a gének ilyen típusú megosztására az embrionális sejtek között, és egyre valószínűtlenebb, hogy valaha is találnak ilyet.

Regulatív fejlődés

Ha találunk is egyszer olyan élőlényt, amelynek génjei megoszlanak az embrionális sejtek között, az nem lehet általános jelen-



14.3. ábra. A mozaikos fejlődés. Négysejtes állapotú *Styela* embriókat pipettán préseltek át, hogy egyes blasztoméra sejteket roncsooljanak, majd biztosították az embrió továbbfejlődését. (a) Mindkét bal oldali sejt (sárga) elpusztult, a két megmaradó sejt (piros) tovább osztódott és differenciálódott. (b) A bal alsó és a jobb felső sejtek (sárga) roncsoolták, és a megmaradó sejtek (piros) ismét részleges embrióvá fejlődtek

ség. A magasabb rendű eukarióták – például kétélűek – embrióit egészen a nyolcsejtes állapotig egyedi sejtekre lehet különíteni, és az így kapott sejtek mindegyike **totipotens**, azaz potenciálisan bármilyen sejttypussá fejlődhet a szervezetben. Ezek az embriónális sejtek tehát nem vesztek genetikai potenciáljukból. Ismeretes, hogy az ember embriónális sejtjei legalább az első három sejtosztódás alatt megtartják összes génjüket, hiszen egypetéjű ötös ikrek is születtek már. Az ember és a békák azoknak a szervezeteknek a képviselői, amelyeknek **regulatív embrióik** vannak. Az ilyen embriók sejtjeinek sokkal hosszabb ideig hasonló a morfológiájuk és működésük, mint a mozaikos embriók sejtjeinek. Más szervezetek, mint például a tengeri sünök, a két szélső típus között találhatók. Néha igen nehéz eldönteni egy embrióról, hogy mozaikos vagy pedig regulatív-e.

Már láttuk, hogy a korai stádiumú regulatív embriók sejtjei totipotensek. De milyenek a differenciálódott sejtek? Még mindig totipotensek, vagy pedig elvesztették egyes génjeiket? Számos kísérlet azt mutatja, hogy esetenként totipotensek. A 14.4. ábrán John Gurdon klasszikusnak számító magtranszplantációs kísérlete látható. Gurdon az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) számos petéjében ultraibolya sugázzal előlte a sejtmagokat, és így sejtmag nélküli, ún. **enukleált petesejteket** hozott létre. Ezután kiemelte a *Xenopus* ebihalak bélhámsejtjeinek sejtmagjait, és mikroinjektálta azokat az enukleált petesejtbe.

A beültetett sejtmagok diploidok voltak, hasonlóan a megtermékenyített petesejt, a zigóta magjához. Sok ilyen pete a zigótához hasonlóan osztódni kezdett, és hólyagcsirává, **blasztulává** fejlődött. Gurdon kivette ezeknek a blasztuláknak a sejtmagjait is, és újabb sejtmag nélküli petékbe ültette be azokat. Néhány ilyen pete ebihalá fejlődött, sőt egyesek a kifejlett békaállapotig is eljutottak. Ezzel bizonyossá vált, hogy még egy differenciálódott bélhámsejt magja is megtartotta a kifejlett béka kialakulásának genetikai lehetőségét. Más szóval a sejtmag még totipotens volt, nem veszítette el azokat a géneket, amelyek nem szükségesek az alapvető és speciális funkciók ellátásához. Mivel a beültetett sejtmag minden sejttypust létrehozott a békában, ezért úgy tűnik, hogy egy gén sem vész el belőle.

A kísérlettel szemben olyan ellenvetés is elképzelhető, hogy az UV-sugárzás nem pusztította el az eredeti petesejt egész sejtmagját, és ezek adták a géneket az embrió fejlődéséhez, az **embriogenezishez**. Gurdon, hogy elkerülje a vitát, olyan sejtmagokat használt az átültetéshez, amelyek az eredeti sejtmagoktól eltérően, kettő helyett csupán egyetlen sejtmagvacskát tartalmaztak. A kifejlődött ebihalak és békák sejtjeiben ugyancsak egyetlen sejtmagvacska volt, ami azt bizonyította, hogy fejlődésüket az átültetett sejtmag irányította.

A magtranszplantációs kísérleteket más állatfajokkal meglehetősen nehéz megismételni. Még Gurdon *Xenopus*-al végzett kísérletei előtt, Robert Briggs és Thomas King kimutatták, hogy egy másik békafaj, a *Rana pipiens* sejtjei a bélcsíra (gasztrula) stádium után, amely az embriogenezisnek egy viszonylag korai fejlődési állapota, nem totipotensek. Ezzel szemben a kifejlett növényekben sok totipotens sejt van, amit először az 50-es évek elején F. C. Steward bizonyított be, amikor a sárgarépa egyetlen

gyökérsejtjéből teljes növényt regenerált. Azóta sok növényfajjal ismételték meg a kísérletet, többek között dohányt, petúniát és borsót sikerült így felnevelni. Az eljárás lehetőséget ad a **klónozásra**, vagyis több, genetikailag azonos egyed létrehozására. A klón kifejezés a görög *klon* szóból származik, ami hajtást, veszőt jelent, és a dugványozásra, az évszázadok óta ismert növény-szaporítási eljárásra utal.

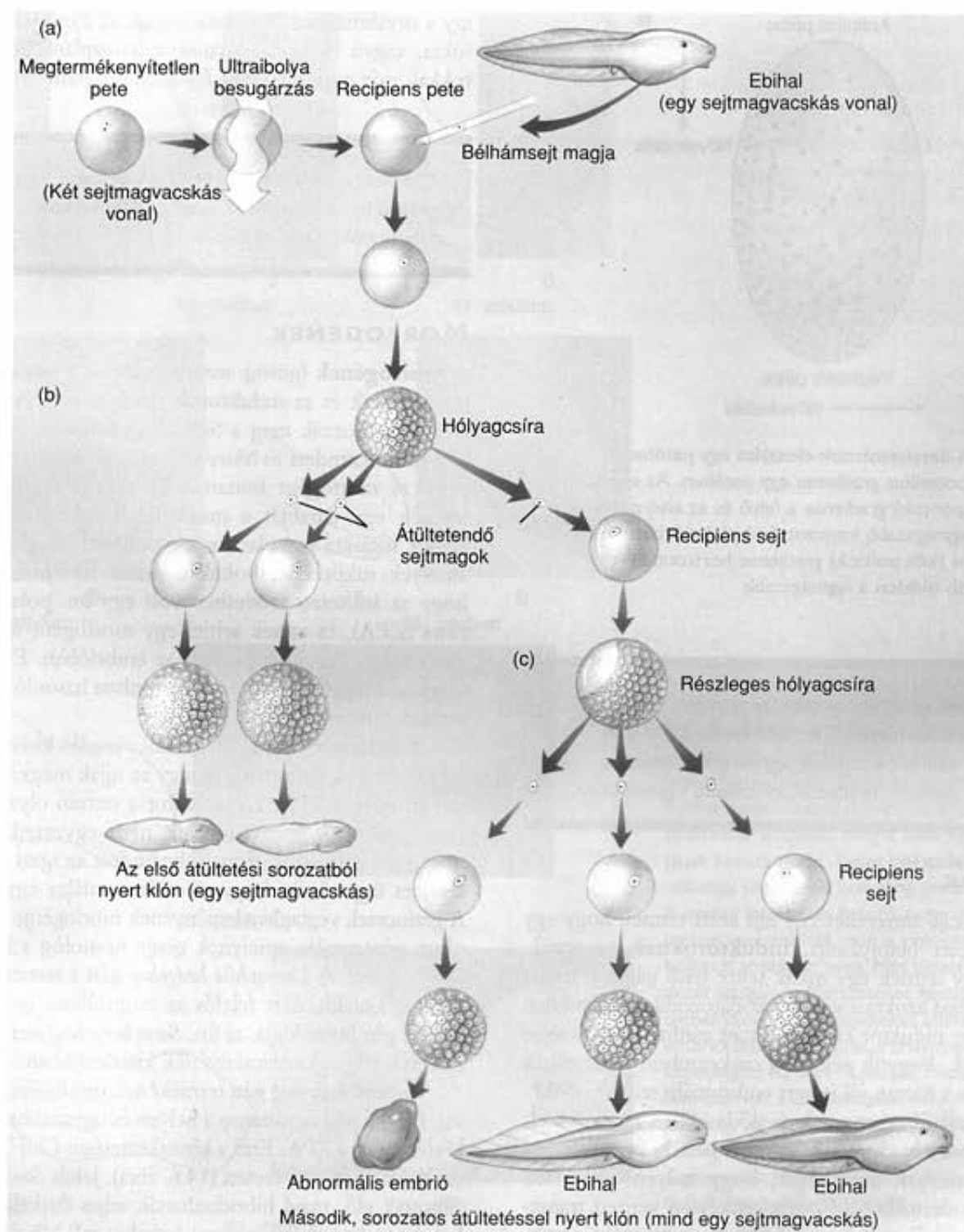
Arra a kissé ellentmondásos következtetésre jutottunk, hogy egyes állatok és növények totipotens differenciálódott sejteket tartalmaznak, míg mások, úgy tűnik, nem. Mindebből megállapíthatjuk, hogy a genetikai anyag elvesztése nem szükségszerű a sejt-differenciálódás során. A nem totipotens specializálódott sejtek genetikai változásokon mehetnek keresztül, ahogyan azt a fejezet későbbi részében még látjuk, de nagy mennyiségű gén elvesztésére nincs bizonyíték. Ehelyett úgy tűnik, hogy a legtöbb sejt-differenciálódási folyamatot **epigenetikus** változások okozzák. Ezek inkább a gén működésében, mint magában a génben létrejövő változások.

A specializálódott szövetekből álló soksejtű szervezetek egyetlen sejtől vagy zigótából fejlődnek ki az embriogenezis során. A folyamat alatt a sejtek differenciálódnak, meghatározott működésű szövetekké alakulnak. Úgy tűnik, a differenciálódáshoz nagyon csekély változás szükséges a sejt genetikai felépítésében, ha egyáltalán szükséges, hiszen egyes növényekből és állatokból vett differenciálódott sejtek vagy sejtmagok még totipotensek. Ehelyett a közös génkészlet expressziójában, működésében vannak eltérések a differenciálódott sejttypusok között.

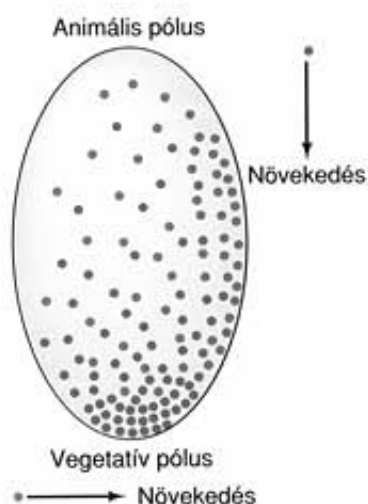
DETERMINÁNSOK

Egy sejt, mielőtt differenciálódna, és megkezdené speciális működését, a **determinációnak** nevezett folyamaton megy keresztül. Ez az az állapot, amikor a sejt túllép fejlődési programjának azon a pontján, ahonnan már nincs mód a folyamat visszafordítására. Morfológiájában és működésében még nem különbözik a szomszédos sejtetől, mivel még nem differenciálódott, de sorsa már visszafordíthatatlan. A determináció tehát a differenciáció előfeltétele. A determináció lehetséges mechanizmusaival a fejezet későbbi részében foglalkozunk részletesen. Most tekintsük át a determináció néhány olyan példáját, amelyek citoplazmás effektor anyagok, ún. **determinánsok** létezésére utalnak.

A mozaikos embriók, amelyekben egy blasztoméra helyzete egyértelműen meghatározza az adott sejt sorsát, arra engednek következtetni, hogy a determinánsok a petében vannak, és eloszlásuk nem egyenletes. A determinánsok egyenlőtlen eloszlásának legegyszerűbb formája a pete felső, **animális pólusa** és alsó, **vegetatív pólusa** között kialakuló gradiens lenne. A függőleges irányú gradiens mellett létezne egy oldalirányú is (14.5. ábra).



14.4. ábra. A regulatív fejlődés. (a) Két sejtmagvacskát tartalmazó vonalba tartozó, megtermékenyítetlen békapetek sejtmagját ultraibolya sugárzással roncsolták, és helyére olyan bélhámsejtől származó sejtmagot juttattak, amely egy sejtmagvacskájú vonalba tartozott. A mesterségesen megtermékenyített pete hólyagcsírává fejlődött. (b) Ennek a hólyagcsírának a sejtmagjait átültették a két sejtmagvacskájú vonal enukleált petéibe. Azok részleges embrióvá vagy ebihalá fejlődtek. (c) Egy részleges embrió (hólyagcsíra) sejtmagjait új enukleált petékbe vitték át, és némelyik közülük normál, egy sejtmagvacskájú ebihalá fejlődött. Az első átültetés csak ritkán eredményez normálisan fejlett ebihalakat, mivel a már differenciálódott sejtmagok nem képesek elég gyorsan osztódni a szabályos fejlődés fenntartásához. Úgy tűnik, hogy az első átültetés után a sejtmagok osztódási üteme felgyorsul



14.5. ábra. A determinánsok eloszlása egy petében. Két determináns hipotetikus gradiense egy petében. Az egyik determináns (piros pontok) gradiense a felső és az alsó pólus között alakul ki, a legmagasabb koncentráció alul mérhető. A másik determináns (kék pontok) gradiense horizontális, koncentrációja a jobb oldalon a legmagasabb

A determinánsok citoplazmás effektor anyagok, amelyek a sejtek determinációjáért felelősek, azaz visszafordíthatatlanul ráállítják a sejteket egy meghatározott fejlődési útra. A petében található, eloszlásuk egyenlő.

INDUKTOROK

Azokat az anyagokat, amelyeket egy sejt azért termel, hogy egy másik sejt fejlődését befolyásolja, **induktoroknak** nevezzük. Az induktorok egy sejtnél egy másik sejtre ható jelzései, míg a determinánsok hatása azokra a sejtekre korlátozódik, amelyekben megtalálhatók. Egy induktor különös hatást válthat ki, ha jelzése rossz címre érkezik. Vegyük például a csirkeembrió tollzatának fejlődését. A tollak a három jól ismert embrionális szövet egyikéből, az **ektodermából** származnak. Fejlődésükben az alattuk elhelyezkedő **mezoderma** induktív szerepet játszik, vagyis induktorokat termel, amelyek megszabják, hogy milyen típusú toll képződjön az ektodermából. Mindezt csirkékkel végzett transzplantációs kísérletekből tudjuk, amelyekben embrionális combból vett mezodermát ültettek át a fejlődő csirke szárnyába, és azt tapasztalták, hogy a szárnyon a combra jellemző tollak fejlődtek. A fordított kísérletben szárnytollak jelentek meg a combon.

Az indukció egy másik példája is segít a determináció megértésében. A gőte (*Tritonus sp.*) embrionális sejtjeit átültethetjük az embrió más helyére, és ott figyelemmel kísérhetjük sorsukat. Gasztrula állapotig az átültetett sejtek totipotensek, új helyükön a környező sejtekhez hasonlóan differenciálódnak, nem pedig úgy, mint az eredeti hely sejtjei. Az átültetett sejtek tehát reagálnak azokra az induktorokra, amelyekkel eredeti helyükön nem találkoztak volna. A bélcsíra kialakulása után azonban megváltozik a helyzet. Az átültetett sejtek eredeti helyükön determinálódtak,

így a továbbiakban nem válaszolnak az ilyen jellegű külső hatásokra, vagyis hiába találkoznak a transzplantáció után induktorokkal, már meghatározott fejlődési programjukat követik.

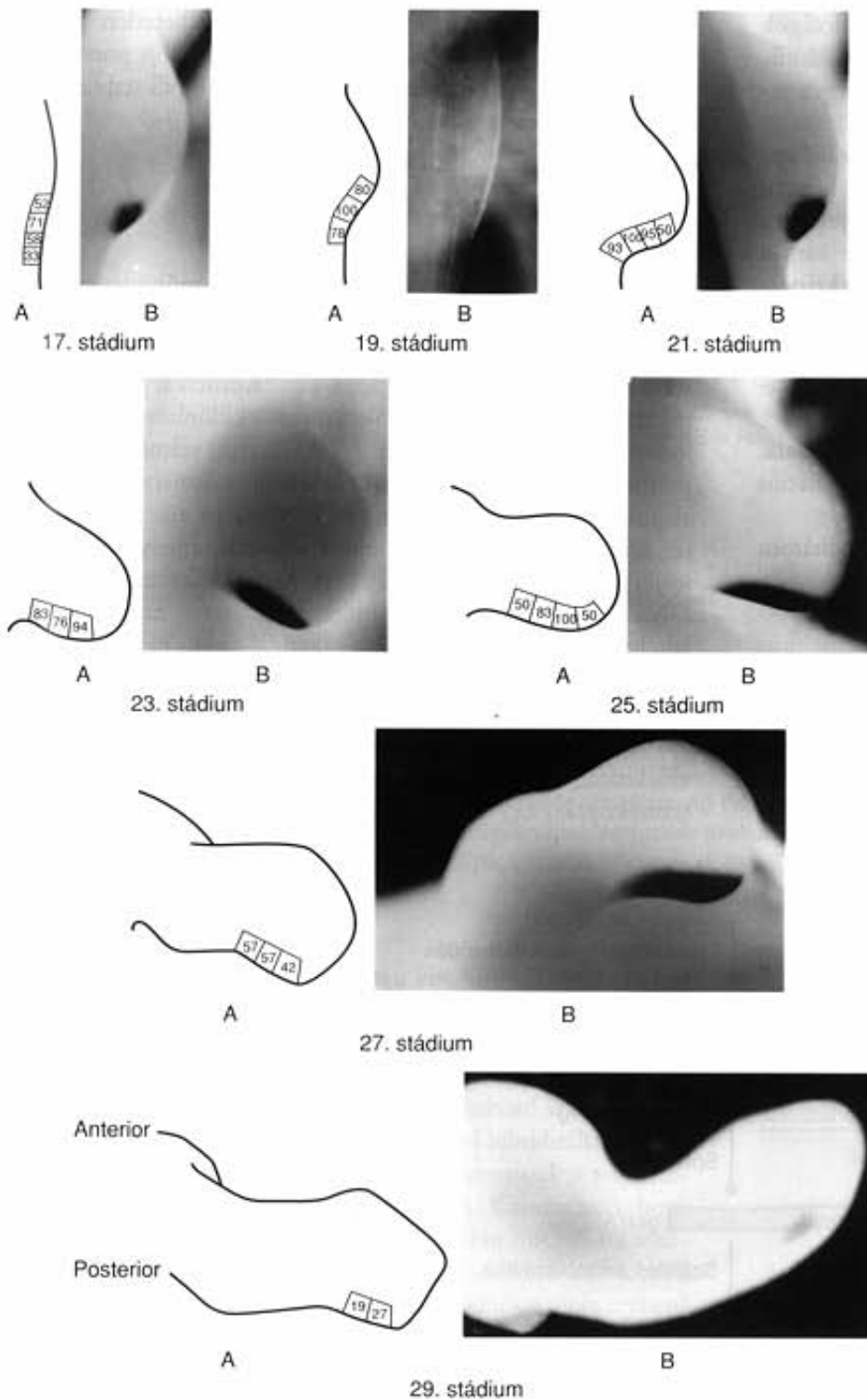
Az embrionális induktorok olyan anyagok, amelyek az embrió egyik pontjáról a másikra diffundálnak, és a célsejtek differenciálódását idézik elő.

MORFOGÉNEK

A **morfogének** (görög: *morphe* = forma + *genes* = eredet) a determinánsok és az induktorok egyik alosztályát alkotják, és az alakot határozzák meg a fejlődő embrióban. Egyik kísérletükben John Saunders és Mary Gasseling két évtizeddel ezelőtt egy gerinces morfogént mutattak ki. Csirke fejlődő lábkezdeményének egy darabját a másik láb kezdeményére ültették át. Ennek hatására a gazdaszövet számfeletti lábujjakat hozott létre, amelyek tükröképei voltak a másik lábfejnek. Ez arra utalt, hogy az átültetett szövetben volt egy ún. polarizáló aktivitású zóna (ZPA), és ennek sejtjei egy morfogént termeltek, amely morfológiai változást okozott az embrióban. Először úgy tűnt, hogy ez a morfogén egy A-vitaminhoz hasonló vegyület, nevezetesen a retininsav.

A retininsav morfogén hatását vizsgáló kísérletben a retininsavval átitatott gyöngy ugyanúgy az ujjak megkettőződését idézte elő, mint a ZPA. Ugyanakkor a retinin olyan sejtszintű változásokat is okozott, amelyek nem egyeztethetők össze egy morfogén hatásaival. Ezért folytatódott az igazi morfogén keresése, és úgy tűnik, hogy sikerült is találni egy ilyen anyagot. A gerincesek végtagkezdeményének morfogénje valószínűleg egy olyan géntermék, amelynek génje homológ a *Drosophila hedgehog* génjével. A *Drosophila hedgehog* gén a testszelvények polaritásának kialakításáért felelős az embrióban, így nem meglepő, hogy a gén homológja, az ún. *Sonic hedgehog*, szerepet játszik a gerincesek végtagkezdeményének kialakításában.

A *Sonic hedgehog* gén termékének morfogén voltát valószínűsíti, hogy a gén ugyanazon a helyen és ugyanabban az időben működik, mint a ZPA. Erre a következtetésre Cliff Tabin és munkatársainak kísérlete vezetett (14.6. ábra). Jelölt *Sonic hedgehog* próbát állítottak elő, majd hibridizáltatták teljes csirkelábkezdeményekkel, hogy kimutassák a *Sonic hedgehog* mRNS-termelődését. Azután összehasonlították az mRNS lokalizációját és a ZPA aktivitását az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban. Ha összevetjük a 14.6. ábra (a) és (b) részét, látható, hogy térben és időben egyaránt kapcsolat van a *Sonic hedgehog*-mRNS és a ZPA aktivitása között. Csak a nagyon korai, 17. stádiumban van időbeli eltérés közöttük. Ebben az időszakban a végtagkezdemény hátsó régiója ZPA-aktivitást mutat, de alig van *Sonic hedgehog*-mRNS. A korrelációhiány egyik lehetséges magyarázata, hogy a végtagkezdemény szövetei még nem mutatnak jelentős *Sonic hedgehog* génexpressziót, de már determinálódtak erre működésre. Amikor ezt a szövetet átültették a ZPA vizsgálatára, a *Sonic hedgehog* gén nagyobb mértékben kapcsolódott be, így a szövet erős ZPA-akti-



14.6. ábra. A *Sonic hedgehog* expresszió és a polarizáló aktivitású zóna (ZPA) kapcsolata a csirke lábkezdeményében. Tabin és munkatársai különböző fejlődési stádiumban (17–29 jelzéssel) lévő csirkeembriókat vizsgáltak meg a *Sonic hedgehog* expressziójának kimutatására. Teljes lábkezdeményeket hibridizáltak jelölt *Sonic hedgehog* próbával. Az ábra B jelzésű felvételein látható, hogy mindegyik stádiumban van aktivitás, amit a végtagkezdeményeken kialakult sötét folt jelez. Más kutatók a ZPA működését vizsgálták. Metszeteket készítettek a lábkezdeményből, majd a szeleteket átültették más embriókba, és vizsgálták a transzplantátum indukálóképességét. Az ábra A jelzésű részein a négyzetben levő számok a ZPA-aktivitás mértékét jelzik, vagyis azt, hogy az adott helyen milyen arányban képződtek számfeletti ujjak. A ZPA aktivitása és a *Sonic hedgehog* expressziója között térben és időben egyértelmű összefüggést sikerült igazolni

Forrás: Riddle és mások: *Sonic hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA*. *Cell*, 75:1401–1416, 1993. © Cell Press

vitást mutatott. Ezek és más hasonló adatok arra utalnak, hogy a *Sonic hedgehog* gén terméke valóban morfogén.

A morfogének a determinánsok és az induktorok egyik alosztálya, amelyek az alakot határozzák meg egy fejlődő embrióban. A gerincesek morfogénje nagy valószínűséggel a *Sonic hedgehog* gén terméke.

A GÉNműKÖDÉS SZABÁLYOZÁSÁNAK SZINTJEI

A prokarióták génműködésében és sejtaktivitásában a magasabb rendű szervezetek differenciálódására emlékeztető alapvető változások történnek. Ennek egyik kitűnő példája a baktériumok sporulációja (8. fejezet). Ebben az esetben az RNS-polimeráz σ -faktorainak cserélődése új promoterek felismerését teszi lehetővé, és a vegetatív gének helyett a sporuláció génjei íródnak át.

Erőteljes génszintű szabályozás figyelhető meg a bakteriofágok életciklusában is, ami komplex időbeli eltolódást okoz a génműködésben. A génextpresszió változásai a transzkripció szintjén jelentkeznek.

Tény, hogy a sejtek differenciálódása bizonyos gének bekapcsolásával történik. A differenciálódás legnagyobb kérdése, hogyan történik a génextpresszió szabályozása. A 8., 9. és 10. fejezetben láttuk, hogy a génműködésnek három alapvető szintje van: a transzkripció, a transláció és egy köztes, ún. **poszttranszkripciós** fázis, ami elsősorban az eukariótákra jellemző. Ez utóbbi szakaszban történik a transzkriptumok feldolgozása, érése (splicing, modifikáció stb.). Ezenfelül sok fehérje változatos poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül. Ez az összetettség számos lehetőséget kínál az eukarióta sejtek génműködésének szabályozására. A szabályozás transzkripciós, poszttranszkripciós vagy translációs szinten egyaránt történhet.

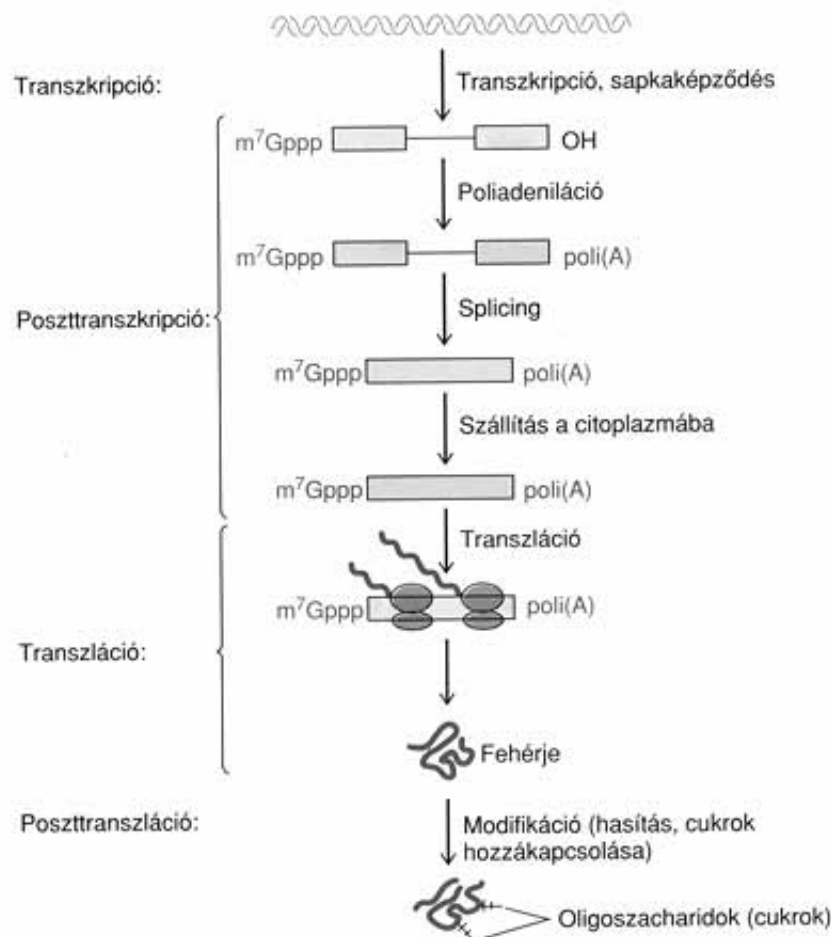
Az eukarióta génműködés szabályozásának mindhárom szintjére látunk majd példát (14.7. ábra), de úgy tűnik, hogy a következő általános szabályok érvényesek: (1) A specializálódott gének, azok, amelyek bizonyos sejtípusokban fokozottan működnek, elsődlegesen transzkripciós szabályozás alatt állnak. Ilyenek például az α - és β -globin gének, amelyek több ezerszer aktívabbak a vörösvérsejtekben, mint a gerincesek bármely más sejtjében. Ez abban nyilvánul meg, hogy a vörösvérsejtekben sokkal nagyobb arányú a globin-mRNS szintézise, mint más sej-

tekben; (2) A sejtek anyagcseréjéhez nélkülözhetetlen „háztartási” génekre (pl. RNS-polimeráz gének) inkább poszttranszkripciós szabályozás jellemző, és főként az mRNS stabilitásának ellenőrzésén keresztül valósul meg.

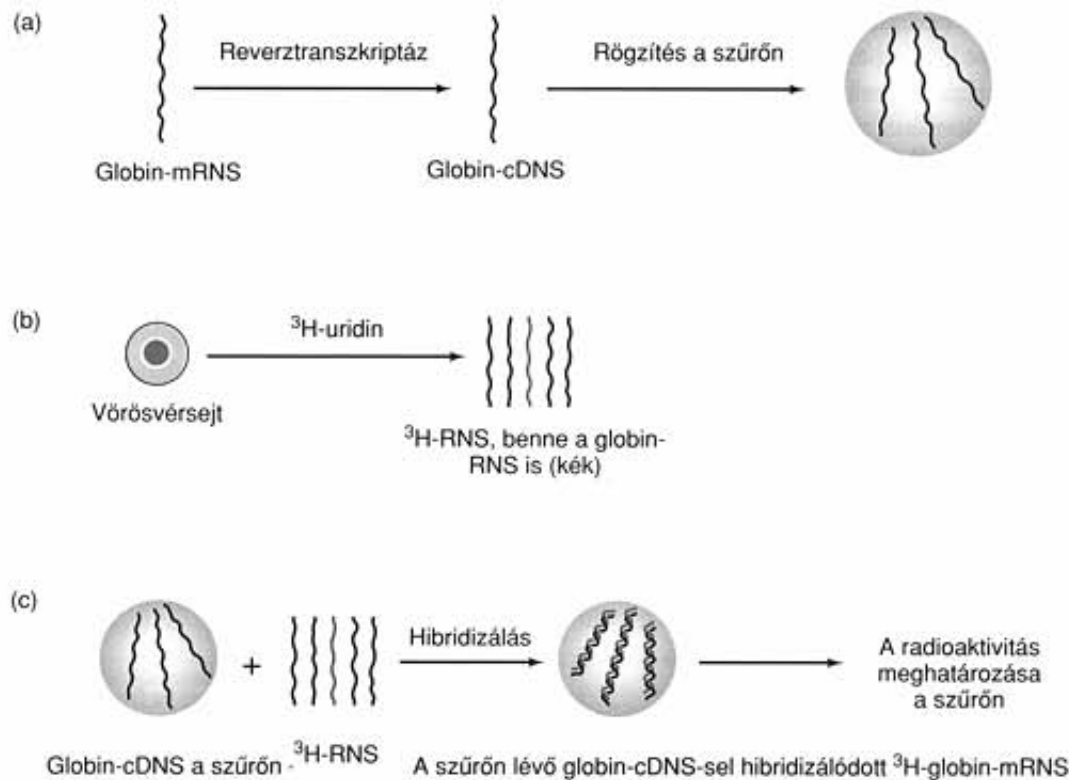
A TRANZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

Mi bizonyítja, hogy a specializálódott gének működésének szabályozása elsődlegesen a transzkripció szintjén valósul meg? A legjobb bizonyítékokat a differenciálódott sejtek transzkripciós termékeinek közvetlen vizsgálata adja. Kezdeti lépésként meghatározhatjuk az érett mRNS-szinteket a különböző differenciálódott sejtek citoplazmájában. Az RNS-szint számos módszerrel mérhető, de többségük a **hibridizáció** valamelyik változatán alapul. A 6. fejezetben láttuk, egy RNS-szál a vele komplementer DNS-szállal kétfonális hélixet alkothat, amely nagyon hasonlít a DNS-kettős hélixre. Ezért, ha rendelkezünk egy olyan DNS-szakasszal, amely komplementer azzal az mRNS-sel, amelynek koncentrációját mérni akarjuk, akkor hibridizáltathatjuk a radioaktívan jelölt mRNS-sel, és meghatározhatjuk a radioaktivitás mennyiségét az RNS-DNS hibridben (14.8. ábra).

A vizsgálni kívánt mRNS-sel komplementer DNS-szakasz előállításához jól használható a tumorvírusokból nyert reverz-transzkriptáz, egy olyan enzim, amely RNS-templárról DNS-



14.7. ábra. A génműködés szintjei az eukariótákban



14.8. ábra. Speciális transzkriptumok hibridizációs vizsgálata. (a) Reverztranszkriptázzal globin-cDNS-t készítenek a tisztított globin-mRNS-ről. A cDNS-t szűrőn rögzítik. (b) A vörösvérsejtek radioaktív prekurzorok jelenlétében jelölt RNS-t szintetizálnak, köztük a globin-mRNS-t (kék). (c) A radioaktív RNS-t hibridizálják a szűrőn rögzített globin-cDNS-sel. A globin-mRNS mennyisége egyenesen arányos a szűrőhöz kötődő radioaktivitással

kópiát készít (12. fejezet). Az enzim a vizsgálni kívánt RNS egy kis szakaszáról komplementer DNS-t, ún. kópia-DNS-t, röviden cDNS-t készít, a cDNS pedig klónozással nagy mennyiségben felszaporítható (részletesebben a 15. fejezetben).

Ha az α - vagy a β -globin cDNS-ét különböző sejtek, köztük vörösvérsejtek citoplazmájából vett mRNS-sel hibridizáltatjuk, akkor azt tapasztaljuk, hogy a cDNS eredményesen csak a vörösvérsejtekből származó mRNS-sel képez hibridet. Kimutatható, hogy egy vörösvérsejt átlagosan 50 000 α - és β -globin mRNS-molekulát tartalmaz, más sejtípusok viszont egy molekulánál kevesebbet. Ez azt jelenti, hogy a globin gének nem működnek a többi sejtben? Egyszerű lenne igennel felelni, de vannak más magyarázatok is. Egyik lehetőség, hogy a globin gén minden sejtípusban aktív, de a globin-mRNS-ek a vörösvérsejtek kivételével valamennyi sejtben lebomlanak, mielőtt még elérnék a citoplazmát.

Ennek igazolására az újonnan szintetizálódott RNS-t kell megvizsgálni, mielőtt annak esélye lenne a lebomlásra. Ehhez viszont a sejtmagot kell szemügyre venni, és nem a citoplazmát. Ezenkívül olyan rövid periódusait kell vizsgálni az RNS-szintézisnek, ami alatt nem történik számottevő degradáció. Más szóval, pulzusjelölést kell alkalmazni az RNS vizsgálatára (7. fejezet). Az ilyen kísérletek rendre a transzkripció szintű szabályozást igazolták. A baromfifélék vörösvérsejtjei például óriási mennyiségű hemoglobint termelnek – mintegy tízmillió α - és β -globin molekulát sejtenként –, ovalbumint (a tojásfehérje legfőbb proteinje) viszont nem. Ennek megfelelően sejtmagjaikban sok az α - és β -globin gének transzkriptuma,

14.1. táblázat. Az ovalbumin-mRNS szintézise különböző szövetekben¹

Sejtmag eredete	Ovalbumin-mRNS (az összes %-a)
Petevezeték + DES	0,238
Petevezeték – DES	0,002
Lép	<0,001
Máj	<0,001

¹ A kimutathatóság határa 0,001%.

Forrás: Swaneck és mások: *Proceedings of the National Academy of Science*, 76:1049, 1979

és gyakorlatilag nincs átírata az ovalbumin gének. Ezzel ellentétben a petevezeték sejtjei nagy mennyiségű ovalbumint szintetizálnak, hemoglobint nem. Sejtmagjaik bőségesen tartalmaznak ovalbumintranszkriptumokat, de jóformán nincs bennük globintranszkriptum.

A 14.1. táblázat azokat az adatokat összegzi, amelyek a fenti következtetésre vezettek. Bert O'Malley munkatársaival csirkék különböző sejtípusainak magját izolálták, majd hagyták, hogy a sejtmagok radioaktív RNS-prekurzorok jelenlétében néhány percig folytassák az RNS-szintézist. Az izolált magok rendszerint nem képesek új RNS-láncok elkezdésére, ezért feltételezhető, hogy a

bennük képződött RNS az *in vivo* megkezdett láncokat jelenti. A kutatók ezután a jelölt RNS-t klónozott ovalbumin gént hordozó filteren hibridizáltatták. Mivel csak az ovalbumin-mRNS hibridizálódása várható, ezért a filteren lévő radioaktivitásból következtetni lehet az izolált magok ovalbumin-mRNS-szintézisének mértékére, és így az ovalbumin gén *in vivo* aktivitására is. A 14.1. táblázatban látható, hogy a lép és a máj sejtmagjaiban nincs kimutatható ovalbumin-mRNS-szintézis. Ugyanakkor a dietil-stilbösztrol (DES) nevű hormon hatásának kitett állatok petevezetékének sejtmagjai tekintélyes mennyiségű ovalbumin-mRNS-t termelnek. Azoknak az állatoknak a sejteiben, amelyekből három napig megvonták a DES-t, az ovalbumin-mRNS termelése alig kimutatható szintre esett vissza. Ezek az eredmények egyértelműen nem egyeztethetők össze azzal a modellel, amely szerint minden gén azonos mértékben íródik át minden sejtben. Ellenkezőleg, a petevezeték sejteiben az ovalbumin gén átírásának intenzitását a DES legalább százszorosára fokozza. Más szóval, jelentős a transzkripció szabályozás.

Az eukarióták legtöbb specializálódott génje, legalábbis elsődlegesen, a transzkripció szintjén szabályozott. Jelentős aktivitásuk csak azokban a differenciálódott sejtekben tapasztalható, amelyekben fehérjetermékük szintetizálódik.

POSZTTANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

A sejtek génműködésének poszttanszkripció szabályozására elméletileg többféle lehetőség is van. Bizonyos mRNS-ekre például poli(A)-vég vagy sapka kerülhet, míg másokra nem. Egyes RNS-ek a citoplazmába juthatnak, mások pedig nem. Megint más mRNS-ek vagy prekurzorai szelektíven degradálódhatnak. A valóságban a sejtek nem használják ki a felsorolt lehetséges szabályozó mechanizmusokat: (1) A sapkaképződésből nem maradnak ki RNS-típusok. Ez esetben ugyanis, találnánk sapka nélküli mRNS-eket vagy prekurzorokat, de ismereteink szerint minden mRNS-prekurzor 5' végére nagyon korán, közvetlenül a transzkripció megkezdése után rákerül a sapka; (2) Csupán egyetlen kivétel ismert a poliadeniláció alól, a hiszton-mRNS-ek egy csoportja a magasabb rendű eukariótákban. Úgy tűnik, hogy ezek nem kapnak poli(A)-véget.

A poszttanszkripció szabályozás egyik tényleges módja az RNS-ek szelektív lebontása a citoplazmában. Jó példa erre a mechanizmusra az emlőmirigy sejteinek a prolaktin nevű hormonnal adott válasza. Amikor a szövettanilag fenntartott sejteket prolaktinnal stimulálják, a mirigysejtek válaszul kazein nevű fehérjét termelnek. Várható, hogy a kazein-mRNS koncentrációjának emelkedését kazein képződése követi, és ez így is van. A hormonkezelés után huszonnégy órával a kazein-mRNS-molekulák mennyisége mintegy hússzorosára növekszik. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a kazein-mRNS-szintézis is hússzorosára nő, a transzkripció csak 2-3-szorosára fokozódik. A kazein-mRNS-szint további növekedésének hátterében az áll, hogy a kazein-mRNS stabilizálása közel hússzorosára emelkedik.

Pulzusjelölés kísérletben meghatározták a kazein-mRNS felezési idejét, vagyis azt az időt, amely alatt az RNS-molekulák

14.2. táblázat. A prolaktin hatása a kazein-mRNS felezési idejére¹

Típus	RNS felezési ideje (óra)	
	Prolaktin hiányában	Prolaktin jelenlétében
rRNS	>90	>90
Poli(A) ⁺ RNS (rövid élettidejű)	3,3	12,8
Poli(A) ⁺ RNS (hosszú élettidejű)	29	39
Kazein-mRNS	1,1	28,5

¹A prolaktin hatása viszonylag csekély az rRNS-re és a teljes mRNS-re (poli(A)⁺RNS), de jelentősen növeli a kazein-mRNS felezési idejét.

Forrás: Guyette és mások: *Cell*, 17:1013, 1979

fele lebomlik. Emlőmirigysejtek tenyészetében a kazein-mRNS-t rövid ideig radioaktívan jelölték prolaktin jelenlétében vagy hiányában. Azaz pulzusszerűen radioaktív nukleotidokat adtak a sejtekhez, amelyek beépültek az mRNS-be. Ezután a sejteket radioaktív anyagot nem tartalmazó, ún. „hideg” táptalajra tették át. A radioaktivitás eltűnt az mRNS-ből, mivel a jelölt („forró”) RNS-ek lebomlanak, és helyükre az új, jelöletlen RNS-molekulák lépnek. Ezután különböző időpontokban megmérték a még jelölt kazein-mRNS-szintet, oly módon, hogy klónozott kazein génnel hibridizáltatták. Minél gyorsabban tűnt el a rendszerből a jelölt kazein-mRNS, annál rövidebb a felezési ideje. A kísérlet érdekes eredményt hozott: a kazein-mRNS felezési ideje prolaktin jelenlétében 1,1 órától 28,5 órára nőtt (14.2. táblázat). Ugyanebben az időpontban az összes poliadenilált mRNS felezési ideje a hormon jelenlétében csak 1,3-4-szeresére nőtt. Úgy tűnik, hogy a prolaktin szelektív stabilizálja a kazein-mRNS-t, vagyis a kazein gén növekvő expressziójáért jórészt a prolaktin felelős.

A poszttanszkripció szabályozás lehetséges mechanizmusai közül csak az mRNS stabilitásának megváltozására vannak meggyőző bizonyítékok. A differenciált sapkaképződés és a poliadeniláció úgy tűnik nem jelentős a génexpresszió kontrolljában.

A TRANZLÁCIÓS SZABÁLYOZÁS

A 10. fejezetben láttunk már néhány példát az eukarióta sejtek translációjának szabályozására. A translációs szabályozás az egyedfejlődésben is szerepet játszik. A transláció szintjén történő kontrollt jól szemléltetik a petékben található **anyai üzenetek**. Az anyai üzenetek mRNS-ek, amelyek a pete fejlődése, az **oogenezis** alatt keletkeznek nagy mennyiségben, majd fehérjékkel komplexet alkotva a petesejt citoplazmájában tárolódnak. A raktározott anyai mRNS elég nagy mennyiségű ahhoz, hogy az embrió korai fejlődését biztosítsa még a transzkripció hiánya esetén is. A tengeri sünök petéiben az anyai mRNS-ek translációja

a megtermékenyítésig jelentéktelen, utána viszont legalább 50-szeresére emelkedik. Tudjuk, hogy ennek oka az anyai mRNS-ek translációjának fokozódása, mert a növekedés az RNS-szintézis gátlása, sőt a sejtmag hiánya esetén is bekövetkezik.

A szabályozás kiterjedhet arra is, hol történjen az embrióban egy adott mRNS translációja. Ez úgy valósulhat meg, hogy az anyai mRNS lokalizációja az embrióban belül meghatározott. A *Drosophila* anyai *bicoid*-mRNS-e például az oocita elülső végénél halmozódik fel. Ennek következtében a *bicoid* fehérje koncentrációja a fejlődő embrió elülső végénél a legnagyobb, de mivel sokkal könnyebben diffundál, mint a *bicoid*-mRNS, lokalizációja nem annyira jellegzetes (14.9. ábra).

Egyes gének működése – legalábbis a korai embriogenezisben – a transláció szintjén szabályozódhat. Egy adott mRNS translációjának helyét az embrióban meghatározhatja az mRNS lokalizációja.

POSZTTRANSLÁCIÓS SZABÁLYOZÁS

A génműködés szabályozásának, legalábbis elméletileg, van még egy lehetséges szintje, a **poszttranszlációs szint**. A polipeptidnek a riboszómáról való leválás után sokféle módon módosulhatnak a sejtekben. Egyesek proteázokkal történő hasítás után nyerik el érett, működőképes formájukat, másokhoz cukrok, foszfátcsoportok vagy más összetevők kapcsolódhatnak.

A fehérjeszintézis alatt egyes fehérjékben jellegzetes hasítás történik. Egy körülbelül húsz aminosavból álló szakasz eltávolítására kerül sor a szabad aminosavot hordozó **aminoterminális**, röviden **N-terminális végről**, onnan, ahol a fehérjeszintézis



(a) Anyai mRNS:



(b) Fehérje:

14.9. ábra. A *bicoid*-mRNS és terméke, a *bicoid* fehérje eloszlása a *Drosophila* embrióban. (a) A *bicoid*-mRNS az embrió elülső pólusán halmozódik fel. (b) A *bicoid* fehérje sokkal könnyebben diffundál, ezért koncentrációgradiens alakul ki az embrió hátulsó pólusának irányában

elkezdődött. A polipeptidnek ez a része az ún. **szignálpeptid**, amely a képződő fehérjét poliszómájával együtt az **endoplazmatikus retikulum (ER)** membránjához rögzíti. A szignálpeptid révén a szintetizálódó polipeptidlánc az endoplazmatikus hálózat belső részébe kerül (14.10. ábra). A bejutás után a szignálpeptid leválik a fehérjéről, amely ezután az ER-n keresztül vándorol, majd membránnal határolt vezikulába kerül, és a **Golgi-készülékbe** jut, ahol elnyeri végső szerkezetét. Ez a fajta érési folyamat többek között a sejtből leadásra kerülő exportfehérjékre jellemző.

A **proteolitikus** feldolgozás jellemző példája az inzulin poszttranszlációs módosítása. A fehérjeszintézis terméke a **preproinzulin** nevű prekursor, amelyből a szignálpeptid leválása után **proinzulin** keletkezik. Ez utóbbiról egy enzim lehasítja a C-peptidnek nevezett részt, a visszamaradó két darab, az A- és a B-lánc alkotja az érett inzulint (14.11. ábra). Amennyiben ez a proteolitikus lépés nem történik meg, nem képződik aktív inzulin, az inzulin gén expressziója gátlás alá kerül, ugyanúgy, mintha át sem íródott volna. Az inzulin gén expressziójának szabályozása nem ezen a módon történik, de más géneké lehet, hogy így.

Számos polipeptid poszttranszlációs módosításon megy keresztül, például proteolitikus hasításra kerül, vagy cukrok kapcsolódnak hozzá. Ezeknél a lépéseknél is lehetőség van a génexpresszió szabályozására, mivel ezek a változások igen fontosak a működőképes fehérje kialakításában.

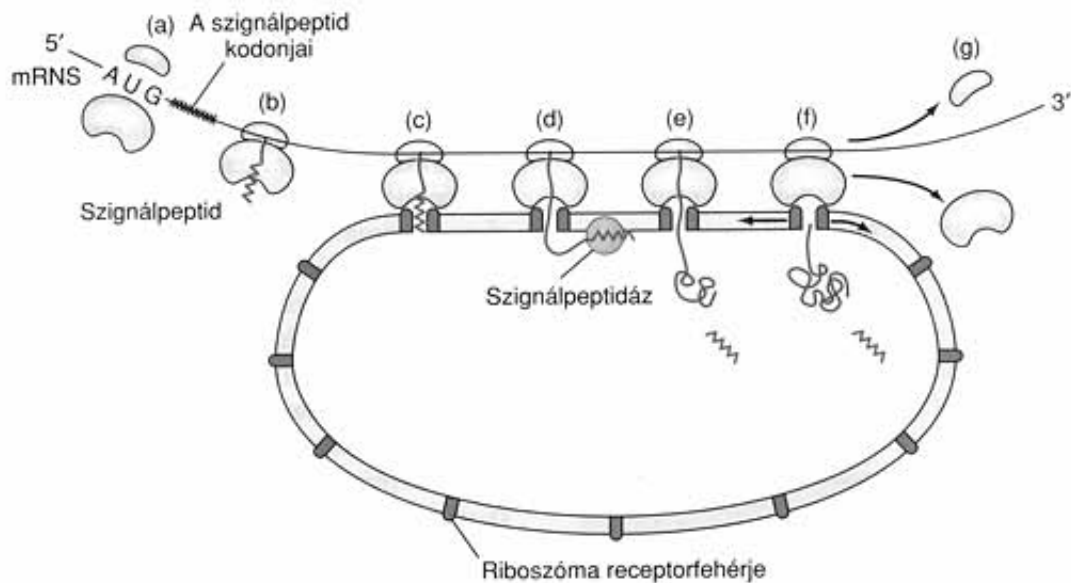
SZABÁLYOZÁSI MECHANIZMUSOK A TRANZKRIPCIÓ SZINTJÉN

Láttuk, hogy a legnagyobb aktivitású eukarióta gének, az ún. luxusgének regulációja elsődlegesen a transzkripció szintjén történik. Vizsgáljunk meg közelebbről néhány példát, de ne feledjük, hogy más szinteken is lehetséges a szabályozás.

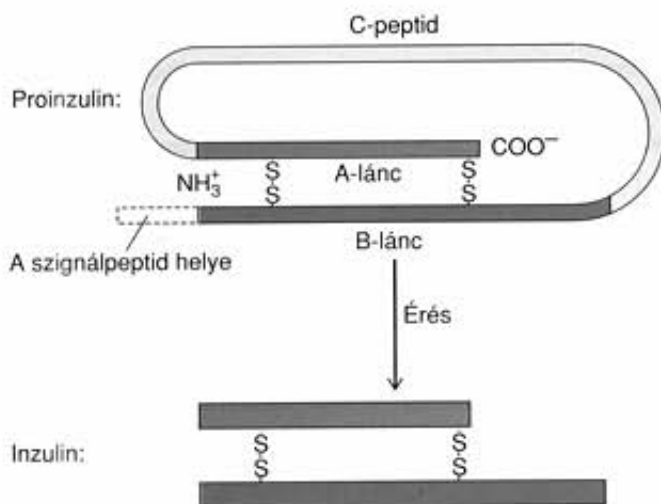
GÉNAKTIVÁLÁS HORMONOKKAL

A 9. fejezetben említést tettünk azokról a sejtmagban levő receptorokról, amelyek meghatározott ligandumokat, hormonokat kötnek meg, majd egy sor gént aktiválnak, mert kötődnek a hormonválaszban szerepet játszó közeli enhancer régiókhöz (HRE). Az egyik ilyen, az egyedfejlődésben fontos sejtmagi receptor a **retininsav receptora (RAR)**. Nézzük meg, milyen kölcsönhatás van a RAR és cél-DNS-e, a **RARE (retininsavra reagáló elem – retinoic acid response element)** között!

A 14.12. ábrán látható, hogy a RAR egy olyan fehérje, amelynek két cinkujja van (9. fejezet). Az első cinkujj tartalmaz egy ún. P-box régiót, amely biztosítja a DNS-en lévő RARE-hez való specifikus kötődést. Már láttuk, hogy a szteroidhormonok receptorai csak akkor kötődnek saját HRE szakaszukhoz, ha a hormon már kapcsolódott hozzájuk. Így



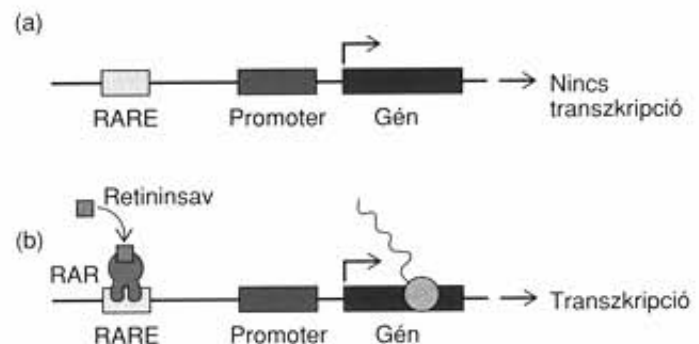
14.10. ábra. A szignálpeptid hipotézis. (a) A riboszóma (sárga) kapcsolódik az mRNS 5' végéhez. (b) A fehérje elsőként szintetizálódó szakasza a szignálpeptid (kék) a fehérje aminoterminális részén. (c) A szignálpeptid kötődik az endoplazmatikus retikulum (ER) külső felszínén lévő riboszóma receptorfehérjékhez (zöld), és behúzza a növekvő fehérjeláncot az ER belsejébe (nagy ovális rész). (d) A szignálpeptidet a szignálpeptidáz (narancssárga) hasítja le a fehérjéről az ER belsejében. (e) A fehérje (piros) tovább növekszik és hajtogatódik. (f) A kész fehérje bejut az ER belsejébe. (g) A riboszóma leválik az mRNS-ről



14.11. ábra. A proinzulin átalakulása inzulinná. A proinzulin a B-láncból (narancssárga), a C-peptidból (sárga) és az A-láncból (kék) áll. Az A- és a B-láncot két diszulfidhíd (-S-S-) köti össze. A szignálpeptid (szaggatott vonal) már lehasadt a láncról a proinzulin szintézise során. A proinzulin inzulinná alakulásakor a C-peptid eltávolítására kerül sor

tűnik, hogy a RAR másképpen működik, mivel önállóan is kötődhet a DNS-hez. Ezután a retininsav kötődése a RAR-RARE komplexhez stimulálja a szomszédos gént.

Milyen gének működését serkenti a retininsav? Az alábbiakban két olyan példát ismertetünk, amelyek igazolják a retininsav jelentőségét az egyedfejlődésben, emellett azt is be-



14.12. ábra. A RAR-RARE kölcsönhatás aktiválja a szomszédos gént. (a) A retininsavra válaszoló elem (RARE, sárga) még szabad, így nem közvetít serkentő jelet a gén (lila) felé, így az inaktív marad. (b) A retininsav receptor (RAR, piros) a retininsavval (kék) kapcsolódva a RARE-hoz (sárga) kötődik. Ennek eredményeként a gén aktiválódik, az RNS-polimeráz (narancssárga) kapcsolódhat a promoterhez (zöld), és átírhatja a gént

mutatjuk, miként működik együtt a retininsav más hormonokkal ezeknek a géneknek az aktiválásában. Az egyik ilyen gén az agyalapi mirigyben termelődő növekedési hormon génje, amelynek terméke serkenti a fejlődő állat növekedését a születés előtt és után. Ezt a gént a pajzsmirigyhormonok (tiroxin, trijód-tironin) is stimulálják. A RAR P-box szekvenciája nagyon hasonló a pajzsmirigyhormonok receptoráéhoz, ami arra utal, hogy a pajzsmirigyhormonok és a retininsav együttműködhetnek, oly módon, hogy receptoraikon keresz-

tül ugyanazzal az enhancer régióval kerülnek kölcsönhatásba. Úgy tűnik, hogy a pajzsmirigyhormonok receptora és a RAR dimert alkothatnak, és együtt kötődnek a növekedési hormon gén RARE szakaszához. Így a két hormon kölcsönösen segíti egymást a növekedési hormon génjének szabályozásában.

Az egyedfejlődés során együttműködő hormonok másik példája az osteocalcin gén, amelynek a terméke a fejlődő csontok kalciumfelvételéhez szükséges. A gént mind a retininsav, mind a D₃-vitamin stimulálja, és mindkettő receptorai útján kötődik ugyanahhoz az enhancerhez. A hormonok hatására az éretlen osteoblasztok érett csontsejteké differenciálódnak. A gén két másik, ellentétes hatású fehérjére is reagál, amelyek differenciálatlan, állandóan osztódó stádiumban tartják az osteoblasztokat. Ezek a fehérjék a *jum*, illetve a *fos* gének termékei, és a RAR-al, valamint a D₃-vitamin-receptorral (VDR) versengenek ugyanazért a DNS-kötőhelyért. Hatásukra az osteocalcin gén kikapcsolt állapotban marad, ami megakadályozza az osteoblasztok differenciálódását. A 17. fejezetben még visszatérünk arra, hogy a *jum* és a *fos*, valamint a hasonló génekben történő mutációk hatására, oly mértékben fokozódhat a sejtnövekedés, hogy a sejt rákos lesz.

Hangsúlyoznunk kell, hogy nem mindegyik sejt érzékeny ugyanazokra a hormonokra. Egy sejt érzékenységét az adott hormonra az határozza meg, hogy rendelkezik-e vagy sem annak specifikus hormonreceptorával. A legtöbb hormon olyan receptorokkal lép kölcsönhatásba, amelyek csak néhány sejttípusban található meg. A retininsav kivétel ez alól. A gerincekben ennek hormonnak legalább három különböző receptora van, és egyikük, a RAR, szinte minden sejttípusra jellemző. Ez valószínűleg azzal függ össze, hogy a retininsav mint morfogén alapvető fontosságú.

A különböző hormonok receptorai maguk is fehérjék, azaz géntermékek, és többségük a differenciálódó sejteknek csak kis hányadában képződik. Más szóval, a receptor maga is a sejtdifferenciálódás terméke. További differenciálódás új gének aktiválásával akkor következik be, amikor a sejt találkozik a hormonnal.

Egyes hormonok, mint például a szteroidok, a pajzsmirigyhormonok (tiroxin, trijód-tironin) és a retininsav, receptorfehérjékhez kötődve szabályozzák a gének működését. A receptorfehérjék kölcsönhatásba lépnek a hormon által szabályozott gének enhancer régióival. Egyes esetekben két vagy több fehérje között kooperatív, illetve kompetitív kölcsönhatás lehetséges ugyanazért a DNS-szakaszért. Máskor a gént különböző, egymástól független helyeken ható faktorok szabályozzák.

A NÖVÉNYI GÉNEK FÉNYINDUKCIÓJA

A sötétben növekedő csíranövények nem termelik a fotoszintézishez szükséges anyagokat. Ez gazdaságos, hiszen fény hiá-

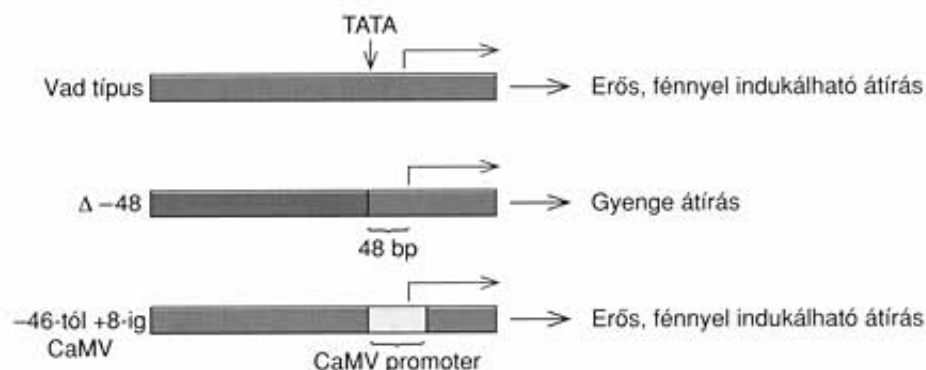
nyában energiavesztést jelentene a fotoszintetikus apparátus előállítására. A fotoszintézis egyik kulcsfontosságú vegyülete a zöld színanyag, a klorofill, ezért a fényhiány egyik nyilvánvaló következménye a csíranövények halványsárga színe. Fény hatására a csíranövények gyorsan megzöldülnek, ami gének aktiválására utal. A klorofill nem fehérje, ezért nem közvetlen terméke egy génnek. Kisméretű molekula, amelynek szintézisét enzimek, vagyis géntermékek katalizálják. Az enzimeket kódoló gének között nyilvánvalóan vannak olyanok, amelyek fény hatására aktiválódnak. Egy másik gén, amely ugyancsak fény hatására aktiválódik, a **ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz**, röviden **rubisco** nevű enzim kis alegységét kódolja.

Hogyan alakul a rubisco gén működésének szabályozása a fényre adott válaszban? Ennek kiderítésére Nam-Hai Chua és munkatársai klónozták a borsó rubisco génjét, és bejuttatták egy dohánynövénybe, vagyis ún. **transzgenikus** növényt állítottak elő. Azt tapasztalták, hogy a bejuttatott gén, a **transzgén** ugyanolyan intenzitással működött, mint a borsóban, és fényvel indukálható volt. Ráadásul, expressziója a dohányban – ugyanúgy, mint a borsónövényben – szövetspecifikus volt, a legnagyobb aktivitást a levelekben mutatta, gyengén működött a szárban, és lényegében inaktív volt a gyökerekben.

A transzgenikus növényekben jelentősen csökkentették a génexpressziót azok a deléciók, amelyek a bevitt gén –35 pozíciójától 5' irányban (upstream) lévő régiót érintették (14.13. ábra). Amikor ezt az 5' határoló régiót visszahelyezték, a génaktivitás helyreállt, és fényfüggő volt. A további vizsgálatok feltárták, hogy a –327 és a –48 közötti régiót meg lehet fordítani vagy el lehet mozdítani, és még mindig serkenti a transzkripciót. Ezért úgy tűnik, hogy ez a régió egy enhancert tartalmaz, amely stimulálja a rubisco gén átírását.

Vajon ez az enhancer szakasz csak a génátírást aktiválja, vagy a fényre is reagál? Ennek a kérdésnek a megválaszolására Chua eltávolította a –46 és +8 közötti szakaszt, amelyről előzőleg kimutatta, hogy fényfüggő, és helyére a karfiol mozaikvírus promotert építette be, amely viszont nem reagál a fényre. Tudta, ha a gén még ezután is reagál a fényre, akkor a –46 pozíciótól felfelé (upstream) levő régió a felelős a fényre adott válaszáért. A gén valóban reagált is a fényre. Valószínű, hogy ez az enhancer közreműködik a rubisco gén fényvel történő stimulálásában is. Tehát a növényekben, ugyanúgy, mint az állatokban, a gének 5' határoló régiói olyan *ász*-helyzetben ható DNS-elemeket tartalmaznak, amelyek szabályozzák a környező gének expresszióját.

A rubisco enzim kis alegységét kódoló gén fényfüggő. A fénystimulációt a gén 5' határoló régiójának egy szakasza, egy enhancer közvetíti, amely a géntől felfelé (upstream) helyezkedik el.



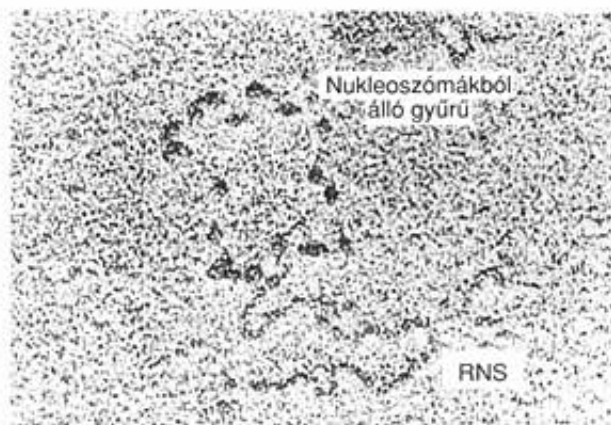
14.13. ábra. Chua és munkatársai klónozott rubisco gént juttattak dohánynövénybe (részletesen I. 16. fejezet). A vad típusú gén (felül) nagy aktivitású és fényel indukálható volt. Amikor az átírási kezdőpontjától 5' irányban (upstream) eltávolítottak egy 48 bázispárnyi szakaszt, akkor a gén gyenge aktivitást mutatott (középen). Amikor a -46 és a +8 pozíció közötti régiót a karfiol mozaikvírus (CaMV) fényre nem reagáló promotorával (lent, sárga) cserélték ki, erős, fényel indukálható átírást tapasztaltak. Tehát az upstream régió fényfüggő enhancert tartalmaz

A DETERMINÁCIÓ

A determináció, ahogyan azt az előzőekben már meghatároztuk, az a folyamat, amely során egy sejt irreverzibilisen egy bizonyos fejlődési útra lép. A folyamat nagyrészt még ismeretlen, de már kezd körvonalazódni, hogy a determináció a kromatin állapotában bekövetkező változásokkal függ össze. Ebben a fejezet-részben két olyan példát vizsgálunk meg, amelyben a gének aktiválódása az egyedfejlődés során a kromatin fizikai állapotának többé-kevésbé állandó változásával jár együtt. Úgy tűnik, hogy a kérdéses gének determinációját olyan faktorok idézik elő, amelyek meggátolják a gének szabályozó régióinak hisztonokkal való lefedését.

GÉNEK AKTIVÁLÓDÁSA AZ EGYEDFEJLŐDÉS SORÁN ÉS A DNÁZ-TÚLÉRZÉKENYSÉG

Gary Felsenfeld és munkatársai az érett β -globin gén (β^A) expresszióját tanulmányozták csirkeembrióban. Ahhoz, hogy munkájukat megértsük, előbb meg kell ismernünk a **DNáz-érzékenység** és a **DNáz-túlérzékenység** fogalmát. Az aktív gének az átlagos kromatinhoz képest mintegy tízszer érzékenyebbek a **DNáz I** enzimre. Ez az érzékenység az aktív gén körül rendszerint több száz vagy több ezer bázispárra terjed ki. Tudjuk, hogy a DNáz-érzékenységnek ezt a típusát nem a nukleoszómák hiánya okozza. Ezt az állítást számos bizonyíték támasztja alá. Egy másik DNáz, a *Micrococcus* nukleáz, lebontja azt a DNS-t, amely nem szerveződik nukleoszómába, nem bontja jobban az aktív, DNáz I-re érzékeny géneket, mint az inaktívakat. Ezenkívül az elektronmikroszkópos felvételek egyértelműen arról tanúskodnak, hogy az aktív kromatin nukleoszómákat tartalmaz (14.14. ábra). A bemutatott SV40 minikromoszóma átíródik, mert a képen megfigyelhető egy RNS-transzkriptum is. Az is világosan látható, hogy az egész cirkuláris kromoszóma nukleoszómákat tartalmaz. Ezek szerint az aktív génekben vannak nukleoszómák, és a DNáz-érzékenység valamilyen finomabb szerveződéssel kapcsolatos, nem egyszerűen ezeknek a struktúráknak a hiányával.

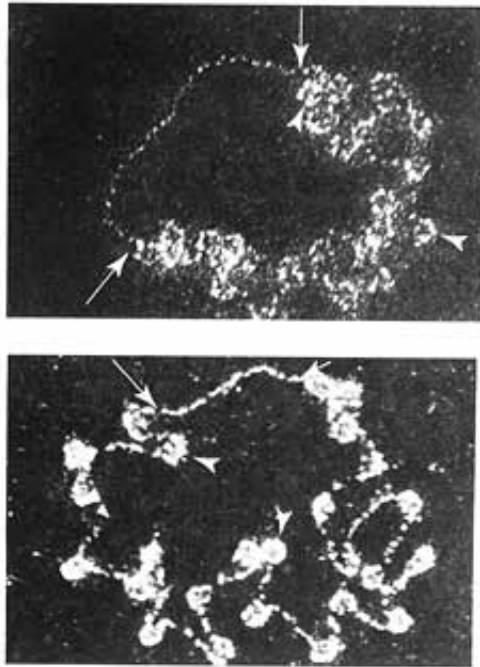


14.14. ábra. Az SV40 minikromoszóma transzkripciója. Az SV40 DNS hisztonokkal alkotott komplexe nukleoszómákból álló gyűrűt képez (középen). A transzkriptum erről a gyűrűről lóg le (lent)

Forrás: Chambon, Pierre: *Cell*, 20:67, 1980, © Cell Press

A DNáz-hiperszenzitivitás az előzőtől eltérő jelenség. Az aktív kromatin bizonyos helyei fokozottan, mintegy 100-szor érzékenyebbek a DNáz I enzimrel történő emésztésre az átlagos kromatinnál. Ezek az ún. **DNáz-túlérzékeny helyek** lehetővé teszik, hogy belepillanthassunk azokba a mechanizmusokba, amelyek az eukarióta géneket bekapcsolják. Az említett DNáz-érzékeny helyekkel ellentétben, a hiperszenzitiv szakaszokon nincsenek nukleoszómák. A 14.15. ábra a nukleoszómák elrendeződését mutatja az SV40 minikromoszómán a vírusfertőzés késői szakaszában. A nukleoszóma mintázatában egy 350 bázispárnyi rés látható, ami megfelel a DNáz-túlérzékeny szakasznak. De honnan tudjuk, hol van ez a rés, hiszen ez egy cirkuláris DNS-en található? Követhetjük a 7. fejezetben már bemutatott módszert, ahol úgy jelöltük meg a DNS egy pontját, hogy azon a helyen vágó restriktív enzimmel felhasítottuk a gyűrűt. Például, a DNáz-túlérzékeny régióban van egy hely, amelynél a *Bgl*I restriktív enzim hasítja a szálát, és ez a hely megtalálható a nukleoszómamentes részben is. Ez azt jelenti, hogy a DNáz-túlérzékeny régió és a nukleoszómamentes régió egybeesik.

Ez a kísérlet egy másik érdekességet is elárul a DNáz-hiperszenzitív régióról, azt, hogy az megegyezik a vírus késői és korai génjeinek 5' határoló régiójával, ahol a promoterek és az enhancer régió található. Ez általános vonása az RNS-polimeráz II által ártított géneknek. Az ilyen génekben a DNáz-hiperszenzitív



14.15. ábra. Az SV40 minikromoszómái a vírusfertőzés késői fázisában. A minikromoszómákon nyilakkal jelölt nukleoszómamentes szakaszok láthatók. A nukleoszómákat csak nyílhegyek mutatják

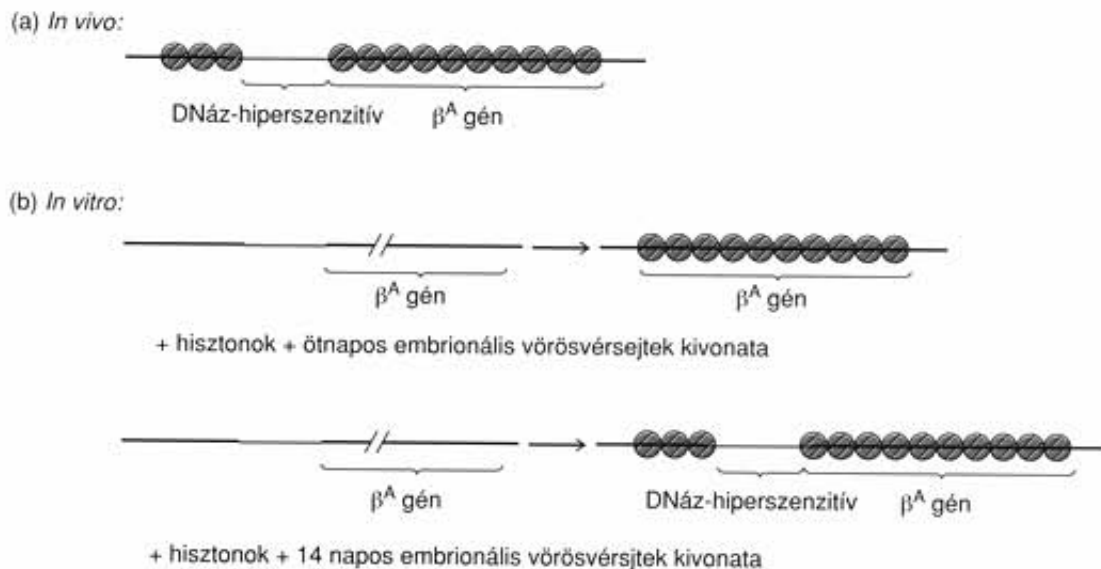
Forrás: Saragosti, S., Moyne, G. és Yaniv, M.: Cell, 20:67, 1980, © Cell Press

helyek az 5' határoló szakaszokban találhatóak, ott, ahol a szabályozó elemek vannak. Ebből nem következik, hogy az RNS-polimeráz II gének enhancerei és promoterei mindig az 5' határoló részekben vannak. Az enhancerek számos esetben az ilyen típusú géneken *belül* találhatóak.

De térjünk vissza Felsenfeld és munkatársainak kísérleteihez. Az ötnapos csirkeembrió vörösvérsejtjeiben a β^A gén még nincs bekapcsolva, de a kilencedik napon már működik. Felsenfeld csoportja azt találta, hogy a β^A gén a kilencedik napon vörösvérsejtjeinek kromatinjában DNáz-túlérzékeny, míg az ötnapos embrióban nem. A hiperszenzitív hely, mint legtöbbször, ebben az esetben is a gén 5' határoló szakaszában van. Mintegy 200 bázispár hosszú, és lefedi a transzkripció starthelyétől 5' irányban (upstream) levő 60 és 260 bp közötti régiót. A DNáz-hiperszenzitív régió nukleoszómamentes is (14.16.(a) ábra).

Mi okozza a DNáz-túlérzékenységet ebben a génben? Bármi legyen is, erősen gyanítható, hogy fontos szerepe van a gén bekapcsolásában is. Amennyiben a hormonhatás modellje igaz, várható, hogy a faktor egy fehérje, amely kötődik a gén 5' határoló régiójához. Felsenfeld ugyanerre az eredményre jutott: talált egy fehérjefaktort a tizennégy napon embrióban, amelyben a gén aktív, és ez teszi a globin gént DNáz-hiperszenzitívvé.

A faktort a következő módszerrel keresték (14.16.(b) ábra). A klónozott csirke β^A globin gént összekeverték békaooociták kivonatával, ezzel a nukleoszómákat alakították ki a csupasz, klónozott DNS-en. Ha egyéb anyagokat nem adnak a rendszerhez, akkor kialakulnak a nukleoszómák, és a globin gén nem lesz DNáz-hiperszenzitív. Ha olyan sejtek kivonatát adják a rendszerhez, amelyekben nem működik a globin gén (pete-



14.16. ábra. Csirke érett β -globin génjének aktiválása. (a) *In vivo* az aktív génen egy nukleoszómamentes, DNáz-hiperszenzitív régió (kék) található, a gén kódoló szekvenciája előtt (upstream). (b) Ha a gént *in vitro* hisztonokkal és korai (ötnapos) embrió vörösvérsejtjeinek kivonatával keverik össze, a nukleoszómák befedik a teljes lokuszt, így nincs DNáz-hiperszenzitív hely. Amikor azonban a kivonat tizennégy napon embrió vörösvérsejtjeiből készül, ahol az érett β -globin gén aktív, ugyanaz a DNáz-hiperszenzitív szakasz jelenik meg, mint *in vivo*. A DNáz-túlérzékenységet a fejlett embrióban már megtalálható, a fiatal embrióból még hiányzó faktorok alakíthatják ki. A (b) ábrarészen, a β^A gén bal oldali részén látható megszakítás olyan DNS-szakaszt jelent, amely nem szerepel az ábrán. A gén teljes hosszának feltüntetésével a bal oldali rész hatszorosa hosszúságú lenne. (A nukleoszómák kialakulása hatod-heted részére tömöríti a DNS-fonalat.)

vezető sejtjei vagy ötnapos embrió vörösvérsejtjei), ugyanerre az eredményre jutnak – nincs hiperszenzitivitás. Ha azonban a békaocita kivonata mellé tizennégy napos embrionális vörösvérsejt kivonatát is adják, akkor éppen a megfelelő helyen, a gén 5' határoló szakaszában megjelenik a hiperszenzitív régió. Ugyanez a kivonat hatástalan, ha a nukleoszómáknak már lehetőségük volt a kialakulásra. Mindez arról tanúskodik, hogy a faktor megakadályozza a nukleoszómák kialakulását, és megőrzi egy rövid, nukleoszómamentes, DNáz-túlérzékeny szakaszt a génben. Feltételezések szerint ez segít a gén aktiválásában, és ezért ezek a kísérletek egy új transzkripciósfaktort (vagy faktorokat) fedeztek fel.

Az érett β -globin gén (β^A) nem aktív az ötnapos csirkeembrió vörösvérsejtjeiben, és nem mutat DNáz-hiperszenzitivitást. Ugyanez a gén a kilencnapos vagy idősebb embriók vörösvérsejtjeiben már aktív és DNáz-túlérzékeny. A DNáz-hiperszenzitív régiót a gén 5' határoló régiójának egy nukleoszómamentes részében találták meg. A hiperszenzitivitást és feltehetőleg a gén aktivitását is, egy olyan fehérjefaktor váltja ki, amely csak azokban a sejtekben található meg, ahol az érett globin gén aktív. A faktor feltehetőleg úgy hat, hogy a transzkripció kezdőponttól 5' irányban (upstream) megakadályozza a nukleoszómák kialakulását.

AZ 5S rRNS-GÉNEK MŰKÖDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA *XENOPUS LAEVIS*BEN

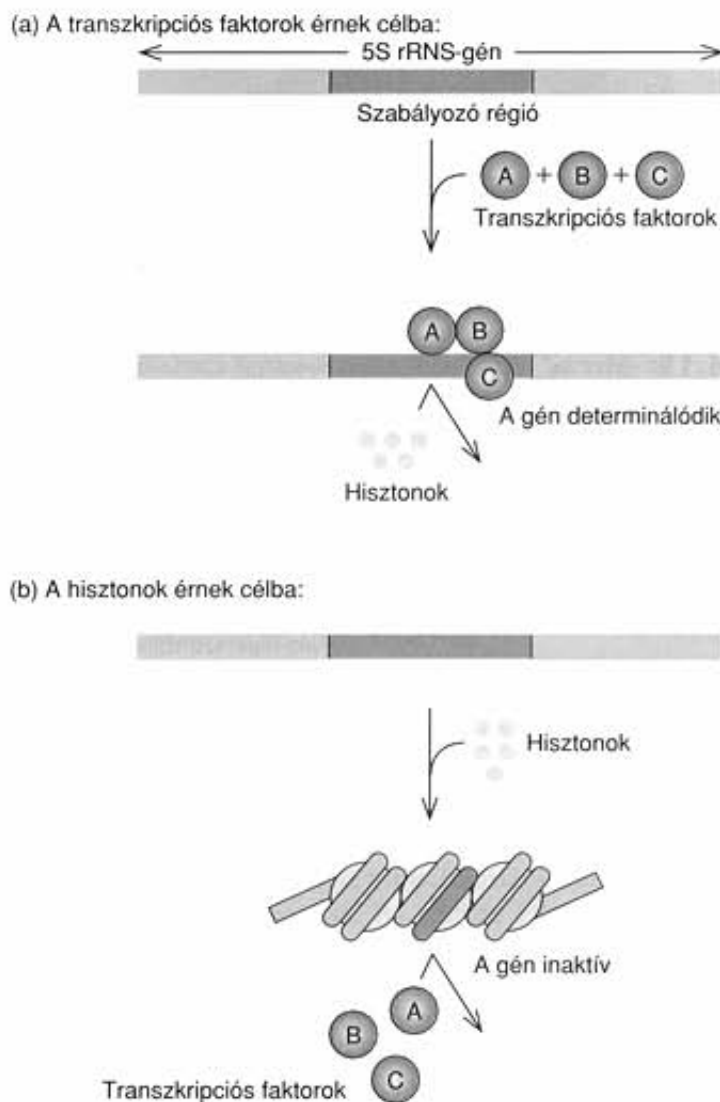
Donald Brown, Robert Roeder és munkatársaik részletesen tanulmányozták az afrikai karnosbéka (*Xenopus laevis*) 5S rRNS-génjeinek transzkripciószabályozását. Brown elképzelése szerint ez az egyszerű rendszer betekintést adhat a determináció általánosabb kérdéseibe. Először vizsgáljuk meg az 5S rRNS-gének szabályozásának részleteit, majd elemezzük Brown determinációs hipotézisét.

A 9. fejezetben már láttuk, hogy három fehérje, a TFIIIA, TFIIIB és a TFIIIC együttesen aktiválják az 5S rRNS-géneket, és így azokat átírhatja az RNS-polimeráz III. Az 5S rRNS-gének haploidszáma igen magas, kb. 20 000, és ezek a gének két különböző családba sorolhatók. Az első családba tartozik az összes gén mintegy 98%-a, és mivel csak az oocitákban íródnak át, **oocita 5S rRNS-géneknek** nevezik őket. A kisebb család mintegy négyszáz gént tartalmaz, és azok mind az oocitákban, mind pedig a szomatikus sejtekben átíródhatnak, így **szomatikus 5S rRNS-géneknek** nevezik őket. Ezek a megfigyelések egy igen fontos kérdést vetnek fel. Mi okozza, hogy az oocita gének működnek az oocitákban, de nem működnek a szomatikus sejtekben?

Ha a rendszer a csirke β -globin génjének modelljéhez hasonlóan működik, akkor a nukleoszómáknak szerepük lehet a gén inaktiválásában. Azt várnánk, hogy az oocita gén, vagy legalábbis annak belső szabályozó régiója, a szomatikus sejtekben komplexet alkot a nukleoszómákkal, és így nem működik. Ugyanakkor az oocitákban viszonylag mentes a nukleo-

szómáktól, tehát aktív. Brown csoportja arra a megállapításra jutott, hogy ez az igazság.

Állításukat az alábbi *in vitro* transzkripciósi kísérlet bizonyította. Brown tisztított 5S géneket kevert össze hisztonokkal, majd ezután transzkripciósfaktorokat és RNS-polimerázot adott a rendszerhez, de nem tapasztalt transzkripciót. Ugyanakkor, ha a faktorokat a hisztonok előtt juttatta a rendszerbe, akkor az RNS-polimeráz III igen jó aktivitással átírta a gént. Mindez egyfajta vetélkedésre engedett következtetni a faktorok és a hisztonok között (14.17. ábra). Ha a faktorok érik először a gént, akkor stabil komplexet képeznek vele, ami meggátolja a nukleoszómák kialakulását és a gén represszióját, tehát a gén átíródhat. Ha azonban a hisztonok nyerik a versenyt, akkor nukleoszómákat képeznek, amelyek erősen kötődnek a gén szabályozó régiójához, és így megakadályozzák a faktorok kapcsolódását és így a gén aktiválását. Ilyenkor a gén kikapcsolt állapotban marad.



14.17. ábra. A transzkripciósfaktorok és a hisztonok vetélkedése az 5S rRNS szabályozó régiójáért. (a) A transzkripciósfaktorok (kék, piros, zöld) nyerik a versenyt, kapcsolódnak a szabályozó szakaszhoz (lila), és meggátolják a hisztonok kötődését. A gén determinálódik. (b) A hisztonok (sárga) kapcsolódnak előbb a szabályozó régióhoz, és nukleoszómákba szervezik azt. Ezzel a gén elérhetetlenné válik a transzkripciósfaktorok számára, és inaktív marad.

Brown a mechanizmus kulcsfontosságú elemeként a H1 hisztont azonosította. Minden olyan eljárás, amely eltávolította az oocita kromatinjából a H1 hiszton, aktiválta a represszált gént. Minek köszönhető a H1 hiszton ilyen mértékű befolyása? A 9. fejezetben már ismertettük, hogy a H1 hiszton nem vesz részt a nukleoszómák magjának kialakításában, hanem keresztükötéssel összekapcsolja a nukleoszómákat a kromatinban. Ezek rögzítik a helyükre a nukleoszómákat, ezért a H1 hiszton nem tartalmazó nukleoszómák feltehetően szabadon csúszkálnak a DNS-fonal mentén. Ez azt jelenti, hogy az 5S rRNS-gének szabályozó régiója esetenként fedetlen marad, mivel a H1 hiszton nélküli nukleoszómák leválnak róla. A transzkripció faktorok ekkor kötődhetnek, és a gén aktiválódik.

Fejlődésgenetikai szempontból az igazi kérdés az, hogyan kerül el a szomatikus 5S rRNS-gének a repressziót, ami az oocita 5S rRNS-géneket ugyanabban a szomatikus sejtben leállítja? Brown szerint a szomatikus és az oocita 5S rRNS-gének között a lényegi eltérés az, hogy eltérő stabilitású komplexet alakítanak ki a transzkripció faktorokkal. A szomatikus gének sokkal stabilabb komplexeket alkotnak, ezért nem kerülnek represszállásra. Ezzel ellentétben az oocita gének komplexei viszonylag labilisak, ami lehetővé teszi a hisztonok bekötődését és a gének represszállását.

Az 5S rRNS-géneknek ez a sajátossága lehetőséget nyújt az általánosításra és egy hipotézis felállítására a determináció folyamatáról. A DNS-replikáció gépezete minden egyes sejtosztódáskor minden fehérjét – hisztonokat és transzkripció faktorokat egyaránt – eltávolít a DNS-ről, így azok vetélkedhetnek az újrakötődésért. Ha alacsony a transzkripció faktorok koncentrációja, vagy gyenge komplexet képeznek a DNS-sel, a hisztonok a nukleoszómákba csomagolják a gént, és az nem determinálódhat. Másrészt, ha sok transzkripció faktor van, vagy ha azok szorosan kötődnek a DNS-hez, akkor meggátolják, hogy a nukleoszómák becsomagolják a gén szabályozó régióját, és a gén determinálódik. Ezért egy sejt determinálódhat a transzkripció faktor koncentrációjának emelkedésével és replikációval. Ez a hipotézis a determinációs események többségét megmagyarázza, de úgy tűnik, hogy a represszállt gének néha a DNS replikáció nélkül is aktiválódhatnak, amit egyelőre nehéz értelmezni.

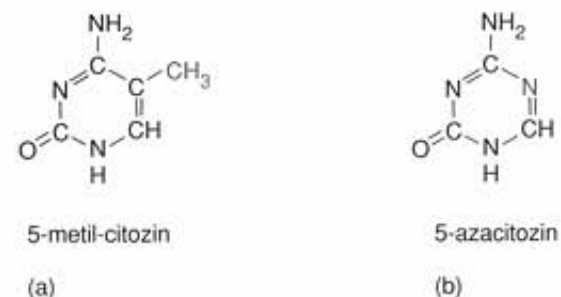
Az afrikai karmosbékában (*Xenopus laevis*) az 5S rRNS-géneknek két csoportja van, az oocita és a szomatikus 5S rRNS-gének. Az előbbieket csak az oocitákban működnek, az utóbbiak mind az oocitákban, mind a szomatikus sejtekben. A különbséget az okozza, hogy a szomatikus 5S rRNS-gének stabilabb komplexet képeznek a transzkripció faktorokkal, köztük a TFIIIA-val. A transzkripció faktorok valószínűleg úgy tartják aktív állapotban a szomatikus 5S rRNS-géneket, hogy megelőzik a nukleoszómák és a belső szabályozó régió közötti stabil komplex képződését. A stabil komplex kialakításában a H1 hiszton is részt vesz. A komplex létrejöttével a transzkripció faktorok kizáródnak, a gén represszállódik. Ezért a gének a transzkripció faktorok szoros megkötésével determinálódhatnak, és egy vagy több determinálódott gén determinálhatja a sejtet is.

A DNS-METILÁCIÓ SZEREPE

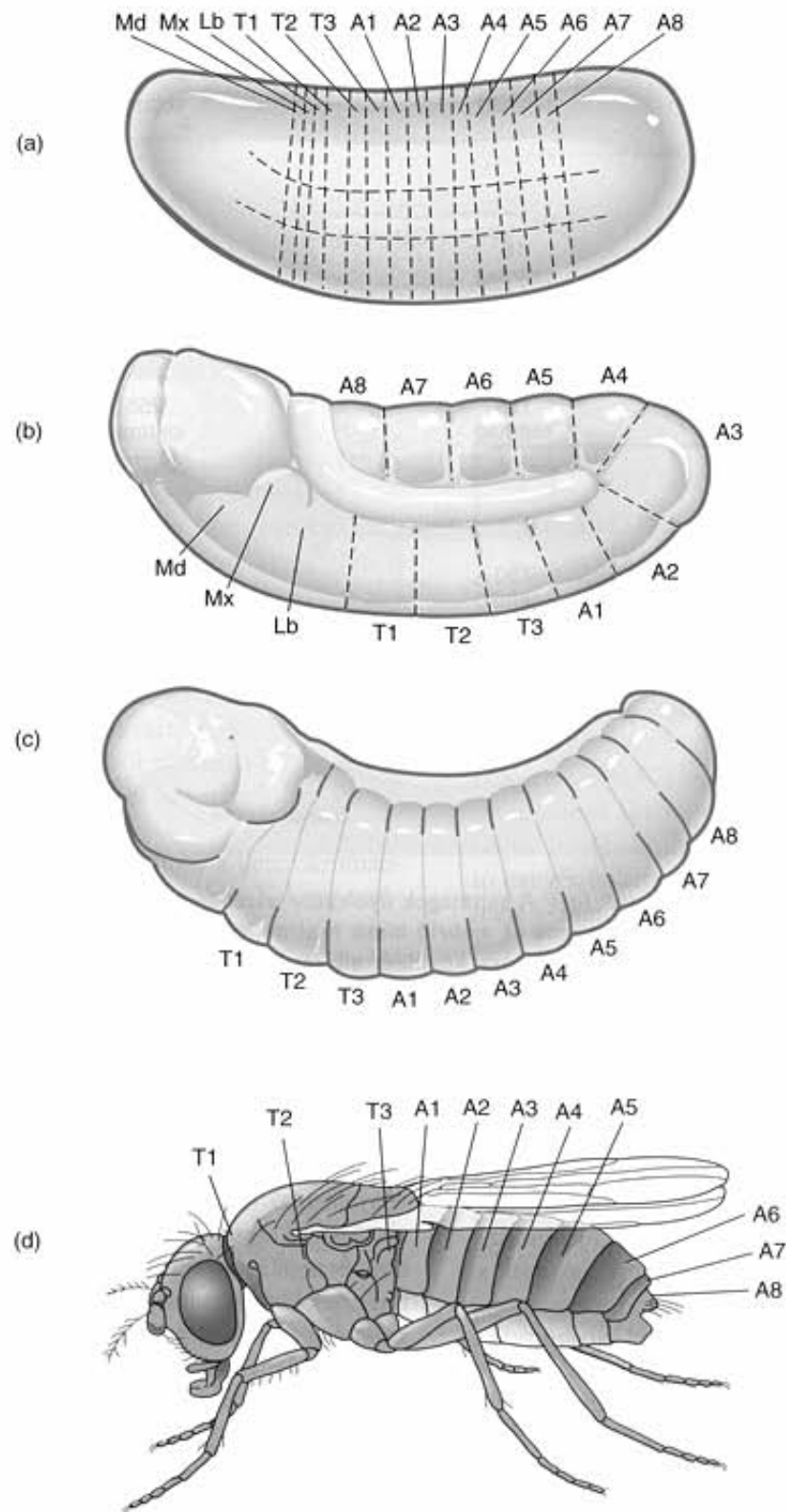
Először Rollin Hotchkiss fedezte fel a metilált DNS-t 1948-ban. Kimutatta, hogy egyes forrásokból származó DNS a szokásos négy bázison kívül tartalmaz egy ötödiket is, az 5-metil-citozint (14.18.(a) ábra). Watson és Crick a DNS-modell elkészítésekor nem vették figyelembe ezt a bázist, de szerencsére modelljük ennek ellenére érvényes, mert a metilcsoport nem módosítja a citozin bázispárképzését. A kutatók Hotchkiss felfedezése után csaknem harminc évvel találtak magyarázatot a DNS metilációjára, és megállapították, hogy az eukarióták egyedfejlődésében, differenciálódási folyamataiban van szerepe.

Az 1970-es évek közepén Harold Weintraub és munkatársai megfigyelték, hogy az aktív gének kevés metilcsoportot tartalmaznak, azaz **alulmetiláltak**. Valószínű, hogy a génaktivitás és az alulmetiláltság összefügg egymással, elképzelhető, hogy a metilezés segíti a gének represszállását. Ha a metiláltság a sejtosztódások során a kiindulási sejtekből átkerülne a leánysejtekbe, az lehetőséget adna a gének inaktív állapotának fenntartására. Kiderült, hogy a metiláció sejtről sejtre átadódik: mindegyik szülői DNS-fonál megtartja metilcsoportjait, és azok jelzésként szolgálnak a metiláló apparátus számára, hol kapcsoljon metilcsoportokat az újonnan szintetizálódó utódszálakra (14.19. ábra). A metilcsoportok az 5'-CG-3' dinukleotidok citozinjain vannak, vagyis a citozinokat guaninok követik a szálaban (11. fejezet). Ez általános szabály a magasabb rendű eukarióták metilációjában.

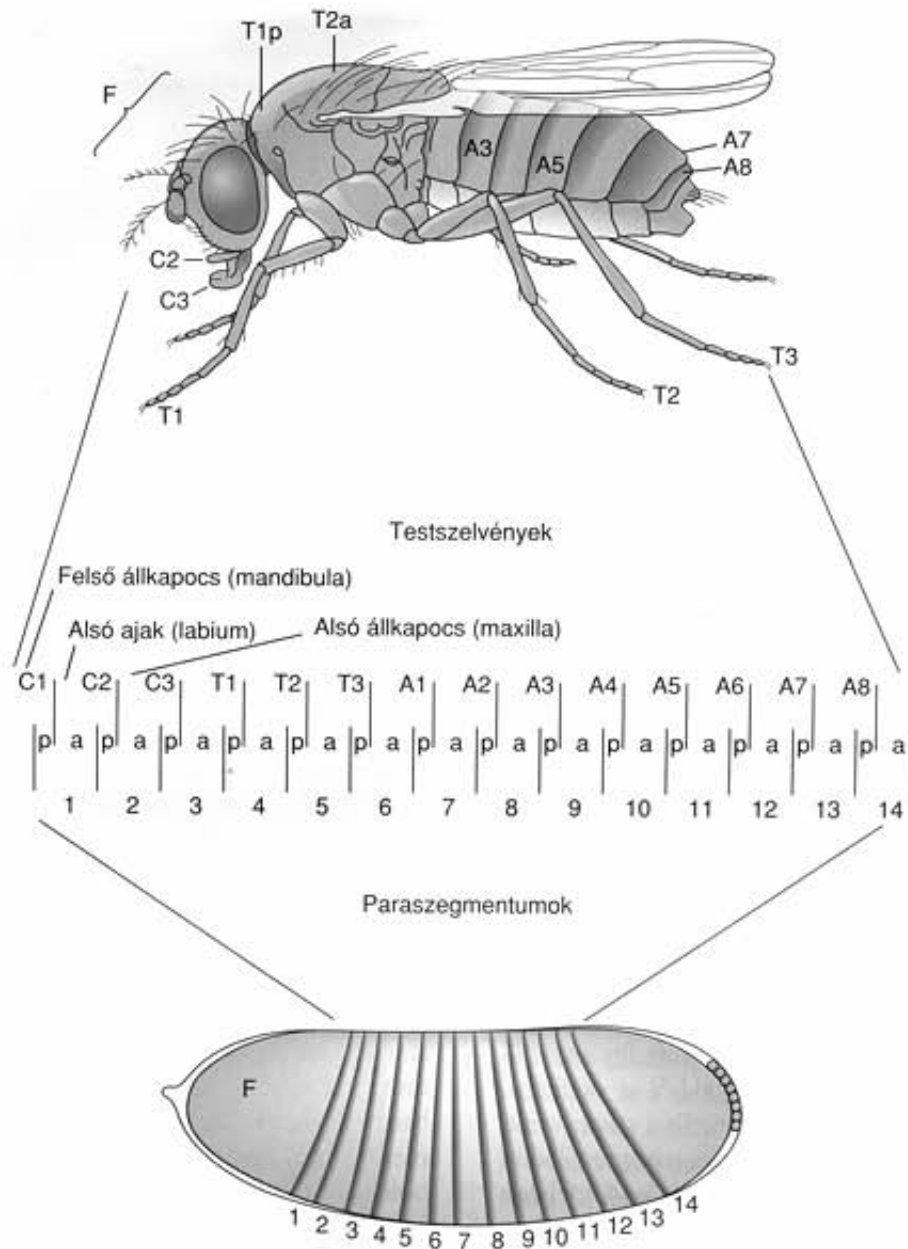
Összefoglalva, a metiláció a determináció két feltételét is teljesíti: (1) represszállja a gént; (2) állandó – ha egy gént a metiláció egyszer már kikapcsolt, az inaktív állapot fenn is marad. Hangsúlyozni kell, hogy a DNS megváltozik, mert metilcsoportok kapcsolódtak rá, de a metil-citozin a citozinhoz hasonlóan képez bázispárt, ezért a genetikai kód ugyanaz marad. Mindezek alapján a metiláció nem minősíthető valódi genetikai változásnak. A metiláció szerepére jó példa a nőstény emlősök X-kromoszómájának inaktivációja. A méhlepényes emlősök nőstényeinek minden sejtjében a két X-kromoszóma közül az egyik a fejlődés korai állapotában inaktiválódik. Az inaktív X-kromoszóma a mikroszkópban sötét foltként jelenik meg, ún. **Barr-testet** alkot. A folyamat során a kromoszóma heterokromatikus lesz (**Lyon-hipotézis** – Mary Lyon nyomán, aki először írta le a jelenséget egerekben). Az apai vagy az anyai eredetű X-kromoszóma egyaránt heterokromatinizálódhat, a szelekciós folyamat véletlenszerű. A X-kromoszómák random inaktiválódásának következménye például a nőstény kalikó macskák fekete és narancsvörös foltos szőrszíne.



14.18. ábra. (a) Az 5-metilcitozin és (b) az 5-azacitozin szerkezete



14.21. ábra. A *Drosophila* embriogenezisének késői szakasza. (a) Az embrió sorstérképe, amelyben a függőleges szaggatott vonalak azokat a régiókat jelölik, amelyekből a testszelvények fejlődnek. (b) Az embrió megnyúlt, önmagán visszahajlott, így hasi szelvényeinek (A4–A8) többsége a háti felszínre került. Az Md (mandibula), Mx (maxilla) és Lb (labium) jelzésű szelvényekből fejlődik ki a fej, a T1–T3 szelvényekből a tor (thorax), az A1–A8 szelvényekből pedig a potroh (abdomen). (c) Az embrió ismét megrövidül, és a szelvények élesebben elkülönülnek. (d) A szelvények végleges elrendeződése az imágóban



14.22. ábra. Az imágó testszelvényei és az embrionális paraszegmentumok közötti kapcsolat *Drosophilában*. Felül a kifejlett állat rajza látható, a szelvények jelölése megegyezik a 14.21. ábráéval. Alul a korai embrió 14 paraszegmentuma. A fej jele F. A testszelvények és a paraszegmentumok jelölése középen látható: három fejszelvény (C1–C3), három torsi szelvény (T1–T3) és nyolc potrohszelvény (A1–A8). Figyeljük meg, hogy mindegyik paraszegmentumhoz az egyik szelvény hátulso (p – posterior) és a következő szelvény elülső (a – anterior) része tartozik

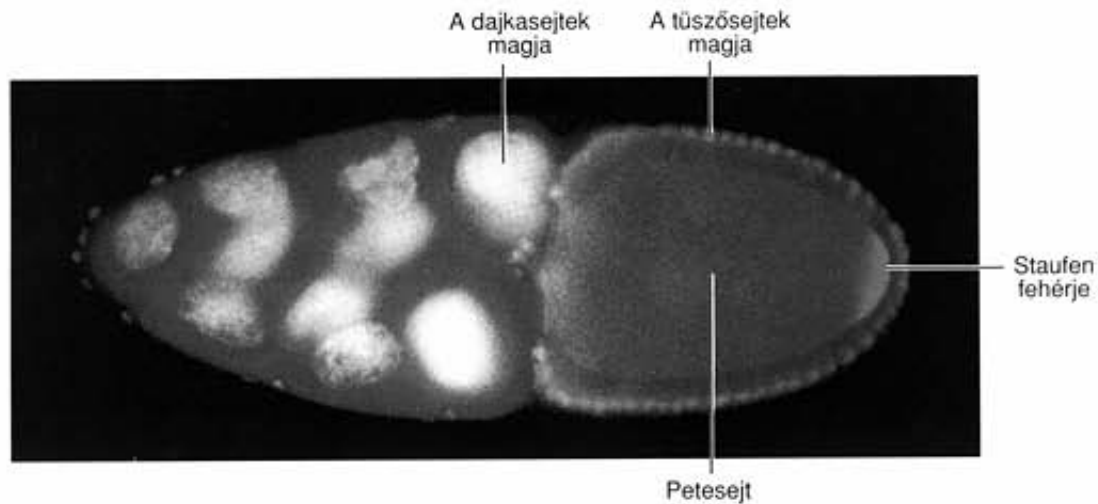
A GÉN AKTIVITÁS HIERARCHIÁJA

Az ecetmuslica testfelépítésének kialakításában szereplő gének olyan hierarchikus csoportokba rendezhetők, amelyek különböző időpontokban hatnak. Általában igaz, hogy egy korai szabályozó csoport génjei egy későbbi osztály génjeit ellenőrzik, majd ezek ismét egy következő működését irányítják. Ez így folytatódik egészen addig, amíg az utolsó csoport génjei is aktiválódnak. Más szóval, egy csoport génjei közül sok transzkripciós faktorokat hoz létre, amelyek aktiválnak (vagy repressálnak) más géneket. Az egymásra épülés azonban nem szigorú, vannak olyan gének, amelyek szabályozzák a velük egy csoportban levő géneket is, és olyanok is, amelyek a két vagy akár több

lépéssel később következőket. A sorozatos aktiválási folyamat egy másik fontos törvényszerűsége, hogy számos géntermékre koncentrációgadiens jellemző. Emellett a szabályozott gének aktiválása küszöbjelenség, ezért az aktiváció csak a gradiens meghatározott helyein következik be, ott, ahol a transzkripciós faktor koncentrációja éppen megfelelő, de nem túl magas. A továbbiakban részletesen megismerkedünk az egyes géncsoportokkal és a más csoportokra gyakorolt hatásaikkal.

Anyai hatású gének

Az **anyai hatású gének** (l. még 18. fejezet) csak a nőstények szervezetében működnek a peteérés, az oogenezis alatt. Vagyis az



14.23. ábra. Egy *Drosophila* tüsző felépítése. A képen látható 10. stádiumú tüszőben egy nagy petesejt (jobbra, lila) van, amit csaknem teljesen körbevesznek a kisméretű tüszősejtek. Ez utóbbiak, valamint a tüsző bal oldalán látható tápláló sejtek sejtmagját DAPI-val kékesfehér színűre festették. A staufen fehérje a fejlődő oocita hátulsó pólusánál, egészen a jobb szélén piros színnel tűnik elő

Forrás: Nüsslein-Volhard: *Cell*, 66(1), címlapkép, 1991. © Cell Press

embrió fenotípusa ezekre a génekre nézve kizárólag az anya genotípusától függ, az apától nem. Ez könnyen belátható, ha megvizsgáljuk, hogyan is működnek ezek a gének az oogenezis alatt. Nem az embrióban aktívak, sőt nem is a petesejtben, hanem az azt körülvevő **dajkasejt**ekben. Az anyai hatású gének termékeit a dajkasejtek juttatják be a fejlődő oocitába, mégpedig annak elülső végénél. A 14.23. ábrán egy *Drosophila* petecsővében fejlődő tüsző (folliculus) látható, a 10. fejlődési állapotban. A tüszőben a petesejt jobbról apró tüszősejtek, balról pedig dajkasejtek határolják. A dajka sejteket és az oocitát plazmahidak kötik össze, így az RNS és a fehérjék szabadon átjuthatnak a dajkasejtekből az oocitába. A képen látható tüszőben a dajkasejtek már átírták a *staufen* gént, amelynek mRNS terméke a petesejt hátsó pólusára transzportálódott (jobbra). A *staufen*-mRNS translációjával képződött *staufen* fehérje pirosra festetődött. A fent vázolt folyamat a nőstények testében zajlik az oogenezis alatt, az apai gének nem vesznek részt benne.

Az anyai hatású gének meghatározzák az embrió testének polaritását, hatásukra elkülönül az elülső és a hátulsó vég, valamint a háti és a hasi oldal. Az egyik legfontosabb anyai hatású gén, a ***bicoid*** gén. A dajkasejtek *bicoid*-mRNS-e az oocita elülső végében halmozódik fel. Amikor a *bicoid*-mRNS translációra kerül, koncentrációgradiens alakul ki a bicoid fehérjére nézve az embrió elülső és hátulsó vége között (14.24. ábra). A gradiens kulcsfontosságú az embrió elülső-hátulsó tengelyének kialakulásában. A *bicoid* gén mellett még három anyai hatású génnek van hasonló szerepe. A *nanos* gén az embrió hátulsó végét határozza meg, ami nélkülözhetetlen a potroh szabályos fejlődéséhez. A *torso* gén egy olyan fehérjét kódol, amely az embrió mindkét végén megtalálható, és a fej, valamint a farok kialakításában vesz részt. Végül a *Toll* gén terméke az embrió háti és hasi oldalának elkülönülésében fontos.

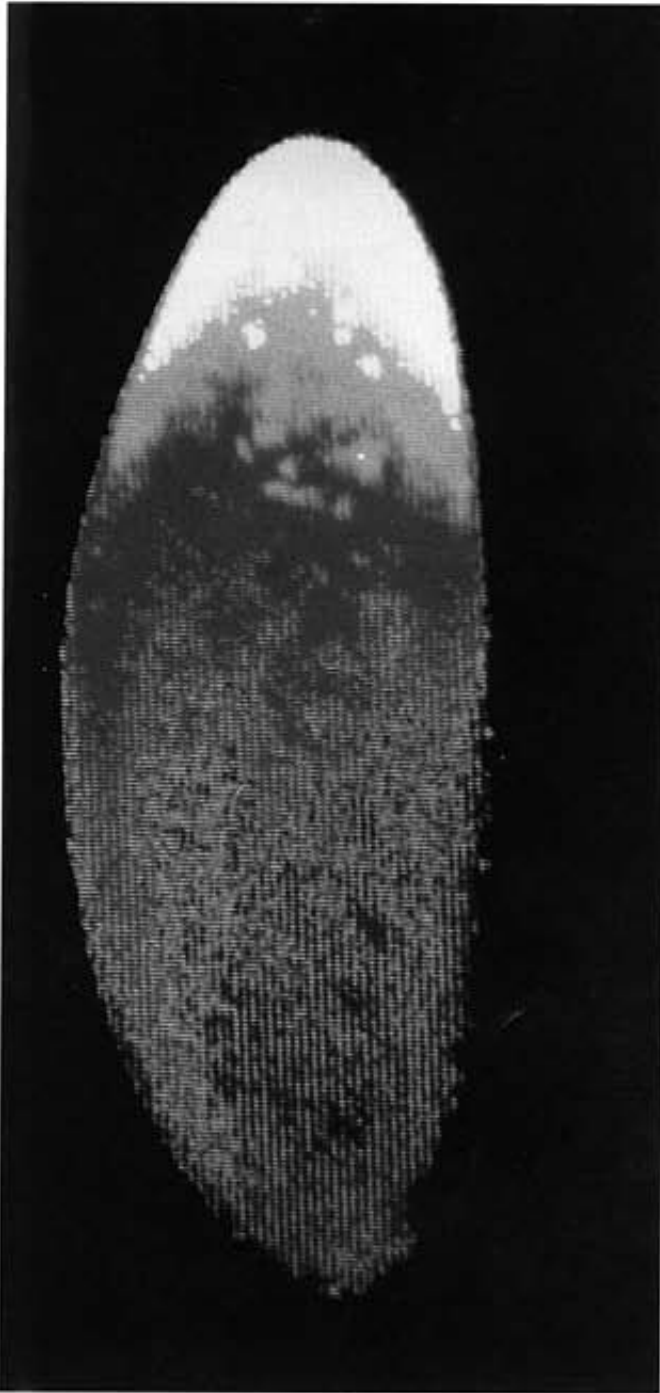
Ezt a négy anyai hatású gént másik harminchattal és még több tucat egyéb génnel együtt Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus és munkatársaik írták le 1980-ban. Hím *Drosophila*kat mutagenizáltak, majd nőstényekkel keresztezve előállí-

tották az F_1 nemzedéket. Mivel a legtöbb zigotikus mutáció recesszív volt, ezért az F_1 egyedeket egymás között keresztezték, és az F_2 nemzedéket elemezték (**F_2 screen**), és érdekes jelenségeket figyeltek meg. Az egyedfejlődés alapvető lépéseit meghatározó gének mutációi gyakran letálisak voltak, de az embriók eléggé kifejlődtek ahhoz, hogy vizsgálni lehessen az alakjukban mutatkozó eltéréseket. Ahhoz, hogy az anyai hatású géneket azonosítani lehessen, egy lépéssel tovább kell menni és az F_3 generációt is vizsgálni kell (F_3 screen). Ennek oka, hogy egy F_2 nőstény, amely homozigóta recesszív az anyai hatású mutáns allélra, nem mutatja a mutáns allél hatását, az csak utódaiban, az F_3 generációban jelentkezik! Az ilyen anyai hatású mutációk egyértelműen megkülönböztethetők a zigotikus mutációktól, mert nem különbözhetők ki azzal, ha homozigóta mutáns nőstényt vad típusú hímekkel keresztezünk. Az anyai hatású és a zigotikus mutációk azonosításában végzett úttörő jellegű munkásságukért Nüsslein-Volhard, Wieschaus és Ed Lewis 1995-ben Nobel-díjat kaptak.

Az anyai hatású gének a nőstények szervezetében, a petéképzés során működnek. A *Drosophila* embrió alapvető koordinátáit négy anyai hatású gén, a *bicoid*, a *nanos*, a *torso* és a *Toll* alakítják ki.

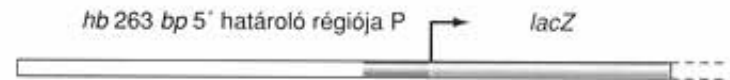
A gap gének

Az anyai hatású gének alapvető szerepet játszanak, de megnyilvánulásuk csupán az első lépés az embriogenezisben. Géntermékeiknek más génekkel vagy azok termékeivel kölcsönhatásban kell kialakítaniuk az embrió végső formáját. Az embrióban működő géneket **zigotikus géneknek** nevezzük. Az embrió elülső és hátulsó végének elkülönülésekor valamilyen módon értelmezni kell a *bicoid* fehérje koncentrációgradiensét, és meghatározott sorrendben működésbe kell hozni a zigotikus géne-



14.24. ábra. A *bicoid* fehérje eloszlása egy *Drosophila* embrióban. Nüsslein-Volhard és munkatársai olyan ellenanyaggal kezeltek egy korai embriót, amelyet a *bicoid* fehérje ellen termeltettek. Ezután a megkötött ellenanyagot fluoreszkáló festékkel láthatóvá tették, és egy képanalizáló program segítségével a *bicoid* fehérje koncentrációjának megfelelően megszínezték az embrió régióit. A sárga szín jelzi a legnagyobb koncentrációt, majd csökkenő sorrendben a narancssárga, a piros és a kék következik. Az embrió elülső végétől (*fent*) egyértelmű gradiens mutatható ki a hátulsó pólus irányába (*lent*). A fehérjekoncentráció még az embrió hátulsó pólusa előtt az alapértékre csökken

Forrás: Nüsslein-Volhard: *Cell*, 54(1), címlapkép, 1988. © Cell Press



14.25. ábra. A génkonstrukció a *lacZ* riporter génből, az eléje helyezett nem-specifikus promoterből (piros) és a *hunchback* gén 263 bp hosszú 5' határoló régiójából áll (sárga). A DNS-konstrukció bejuttatható egy embrióba, majd jelölt ellenanyagrendszer segítségével megfesthető a *lacZ* gén terméke, a β -galaktozidáz. Mindezek alapján megállapítható a *hunchback* gént helyettesítő *lacZ* expressziójának mértéke

ket az embrió elülső részétől a végéig. A folyamat kulcsfontosságú eleme a *hunchback* gén.

A *hunchback* gén a zigotikus gének egyik csoportjába, a **gap gének** közé tartozik. Ez utóbbiak elnevezése arra utal, hogy mutációik következtében olyan embriók fejlődnek, amelyek testéből nagy részek hiányoznak, és rések (*gap*) keletkeznek ott, ahol normálisan embrionális struktúrák lennének. (A *hunchback* gén az anyában is megnyilvánul, amire még később visszatérünk.) A *hunchback* gén értelmezni a *bicoid* fehérje gradiensét, és bekapcsolódik az embrió anterior régiója és az 55%-os petehosszúságnak nevezett pont között. (A *Drosophila* embrió hossz tengelye mentén bármely pontot megadhatunk annak alapján, hogy a pete teljes hosszának hány %-ánál helyezkedik el. Az elülső véget vesszük 100%-nak, a hátulsót pedig 0%-nak. Így az 55% petehosszúság a teljes embrióhossz 55%-a a hátulsó végtől mérve.) Hogyan értelmezi a *hunchback* gén a *bicoid* fehérje gradiensét? A *bicoid* fehérje egy olyan transzkripció faktor, amely kötődik a *hunchback* gén enhancer régiójához, és serkenti a *hunchback* gén átírását. A *hunchback* gén aktiválásához a *bicoid* fehérje meghatározott koncentrációja szükséges, ami az 55% petehosszúságnál a küszöbérték alá esik.

A *bicoid* fehérje a *Drosophila* egyik olyan transzkripció faktor a sok közül, amelyben a DNS-kötő domén az ún. **homeodomén** (9. fejezet). A homeodomént a **homeobox** kódolja, és hasonló szerkezetű ahhoz a hélix-fordulat-hélix doménhez, amely számos prokarióta DNS-kötő fehérjében megtalálható (8. fejezet). A homeodoménekre a fejezet későbbi részében még visszatérünk.

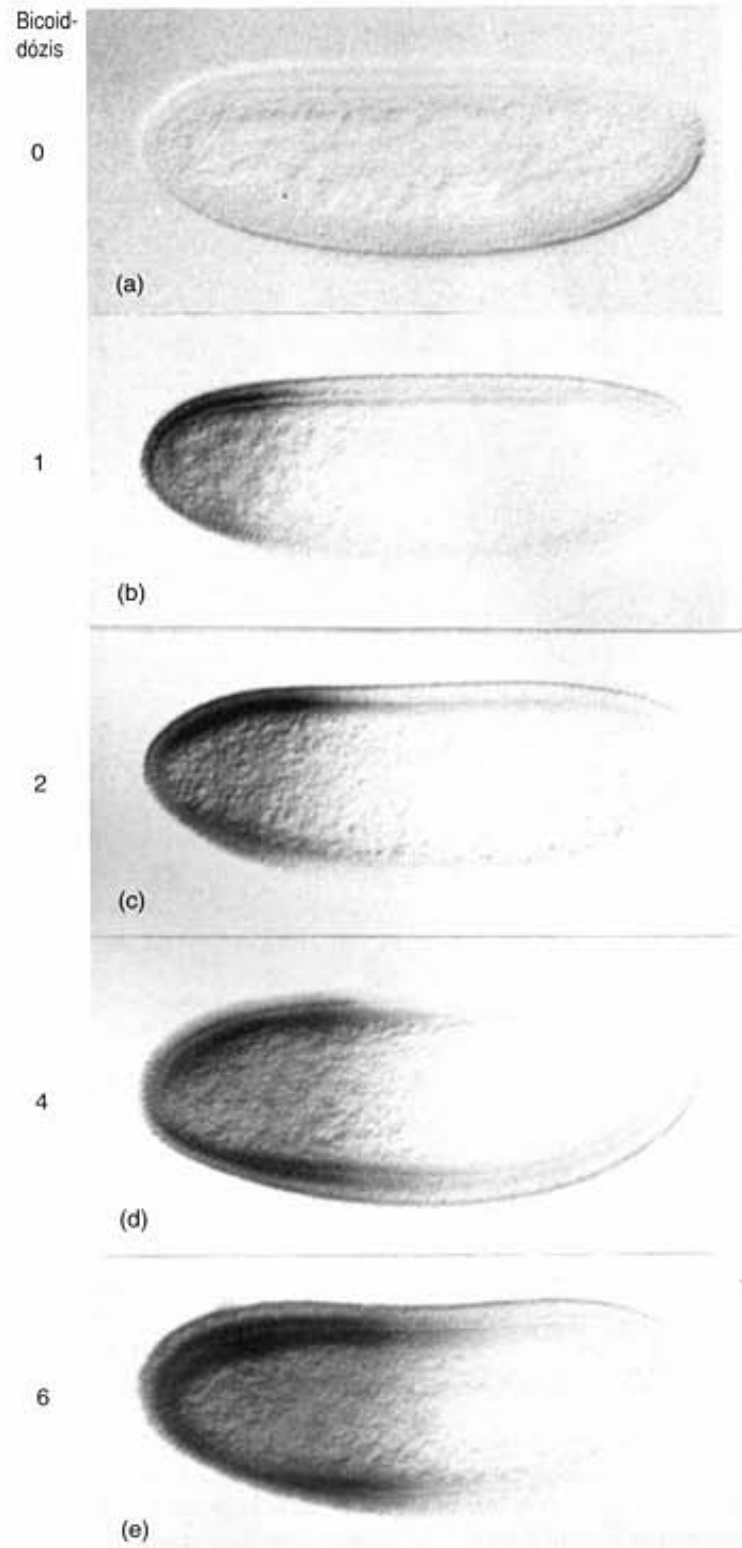
Honnan tudjuk, hogy a *bicoid* fehérje aktiválja a *hunchback* gént? Gary Struhl és munkatársai ezt úgy mutatták ki, hogy a *hunchback* gén 5' határoló régiójából 263 bázispárnyit egy nem-specifikus promoterhez kötöttek, amelyhez riporter génként az *E. coli lacZ* génjét kapcsolták (14.25. ábra), majd ezt a génkonstrukciót *Drosophila* embrióba juttatták. A 263 bp hosszú régió tartalmazza azt az enhancert, amely rendes körülmények között serkenti a *hunchback* gén átírását, míg ebben a mesterséges génkonstrukcióban a *lacZ* transzkripcióját. A *lacZ* termékét, a β -galaktozidázt Struhl és munkatársai úgy mutatták ki, hogy az embriókat először olyan egérintesttel kezelték, amely specifikusan kötődik a β -galaktozidázhoz, majd ezután egy nyúlból származó antitesttel, amely kötődik az egérintesthez. A nyúlból származó antitestet biotin nevű vitaminnal jelölték. Végül egy avidin nevű fehérjét adtak a rendszerhez, amelyet összekapcsoltak a torna peroxidáz enzimmel. Az avidin szorosán és specifikusan kötődik a biotinhoz, így a torna peroxidáz azokra a helyekre került, ahová az antitestek kötődtek. Végül az embriókat peroxidáz szubsztráttal

kezelték, amely a peroxidázzal való reakció helyén barna csapadékot ad. Így a barna szín tájékoztat arról, hol van a *bicoid*, és milyen mértékben aktiválja a riporter gént. Az ehhez hasonló kísérletekben a *lacZ* ún. riporter génként szerepel, mivel arról tudósít, mennyire aktív az átírás a hozzákapcsolt enhancer és promoter jelenlétében. Ebben az esetben a promoter nem specifikus, így nem reagál a *bicoid* fehérjére. Tehát, ha a *hunchback* 263 bp hosszú 5' határoló régiója érzékeny a *bicoid* fehérje koncentrációjára, akkor az embrió elülső végén várható a legnagyobb *lacZ* expresszió, ott, ahol a *bicoid* fehérje szintjei a legmagasabbak. A 14.26.(b) ábrán pontosan ez figyelhető meg. A *lacZ* gén expressziója tükrösképe a *hunchback* gén működésének. Ráadásul, ahogyan azt a 14.26.(c) ábra is szemlélteti, a *lacZ* expressziója erőteljesebb, ha a *bicoid* mennyisége az embrióban magasabb a normális szintnél, és ugyanez a hatás figyelhető meg a *hunchback* működésében is.

Azok a vizsgálatok, amelyekben a DNS-fehérje kötődését mérik, azt mutatják, hogy a *bicoid* fehérje egy enhancer régióhoz kapcsolódik a 263 bp szakaszon belül. A részletes analízis számos *bicoid*-kötőhelyet mutatott ki a *hunchback* gén enhancer régiójában. Ez megmagyarázza, miért képes a *hunchback* gén reagálni a *bicoid* fehérje koncentrációgradiensére: minél magasabb a koncentráció, annál több fehérjemolekula kapcsolódhat az enhancer régióhoz, így nagyobb aktivitással íródik át a *hunchback* gén.

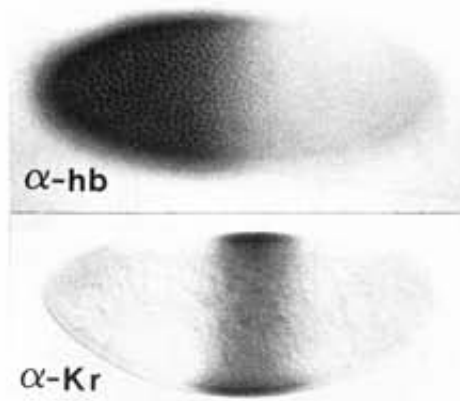
A következő részben látjuk majd, hogy a *gap* gének szabályozzák a hierarchiában utánuk következő géncsoportot, de egymás működését is befolyásolják. A *hunchback* gén például három másik *gap* gén, a *Krüppel*, a *knirps* és a *giant* szabályozásában is szerepet játszik. A felsorolt gének mindegyike „értelmezi” a *hunchback* fehérje gradiensét. A *Krüppel* gén például nem működik magas *hunchback* fehérjekoncentráció esetén, ami a 65% pethosszúság érték előtt található. Ettől a pozíciótól hátrafelé a *hunchback* fehérje koncentrációja olyan szintre csökken, amely már aktiválja a *Krüppel* gént. A következő küszöbszint 35% pethosszúságnál található, ahol a *hunchback* fehérje szintje már annyira alacsony, hogy nem elegendő a *Krüppel* aktiválásához. A két küszöbszint eredményeként a *Krüppel* gén a 65%–35% pethosszúság közötti sávban aktív (14.27. ábra).

Az alábbi genetikai analízis arra a következtetésre vezetett, hogy a *Krüppel* gént a *hunchback* gén aktiválja. Gary Struhl, Peter Lawrence és munkatársaik egy háromszoros mutáns teszteltek, amelyekben a *nanos* és a *torso* gének inaktívok voltak. A mutánsnak mindezek mellett csak anyai *hunchback* terméke volt, amely alacsonyabb koncentrációban volt jelen, mint a normális zigotikus *hunchback* termék. A *hunchback* fehérje koncentrációja az egész embrióban állandó és alacsony értéken mozgott, eltérően a normális gradienstől, amelyben a legnagyobb koncentráció az elülső végnél alakul ki (14.28.(a) ábra). Hogyan működik a *Krüppel* gén ebben a mutánsban? A gén az egész embrióban aktív, kivéve az elülső véget, ahol a *bicoid* fehérje látszólag represszált állapotban tartja (14.28.(b) ábra). Ez az eredmény azal magyarázható, hogy a *hunchback* fehérje alacsony anyai koncentrációja azon a határon belül van, amely aktiválhatja a *Krüppel* gént, és mivel ez az anyai *hunchback* fehérje mindenütt előfordul, ezért a *Krüppel* gén is mindenütt működik, kivéve az embrió elülső végéhez közeli részt.



14.26. ábra. A *hunchback* gén expressziója a *bicoid* mennyiségétől függ. Az embriókat megadott *bicoid*dózis mellett megfestették a *hunchback* fehérjével szemben létrehozott ellenanyaggal. Minél magasabb a *bicoid* mennyisége, annál tovább terjed a *hunchback* működése a hátulso pólus irányába

Forrás: Struhl és mások; Cell, 57:1262. © Cell Press

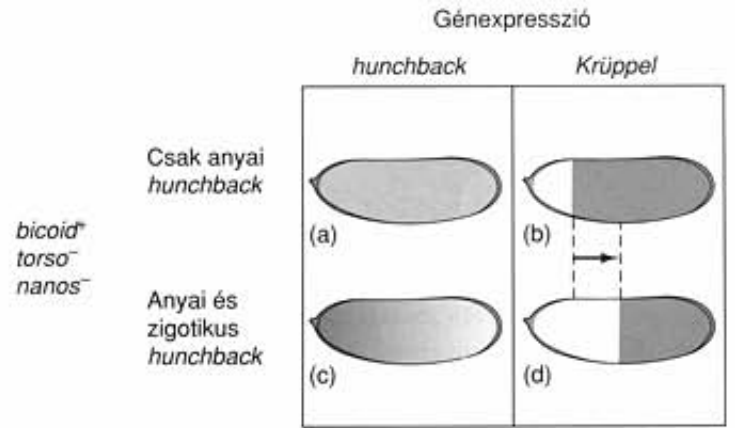


14.27. ábra. A *hunchback* és a *Krüppel* fehérjék koncentrációgradiensének összehasonlítása. (a) *Hunchback*. Struhl és Lawrence még a 13. nukleáris ciklus előtt a *hunchback* fehérje ellenanyagával (α -hb) kezelték egy embriót. A fehérje gradiense az elülső pólustól a 33% petehosszúságig terjedt. (b) *Krüppel*. Az embriót a 14. ciklus közepén a *Krüppel* fehérje ellenanyagával (α -Kr) festették. Látható, hogy a *Krüppel* gén aktivitásának sávja csökken attól a ponttól jobbra, ahol a *hunchback* fehérje gradiense meredeken zuhan. Ez azt jelzi, hogy a *Krüppel* gén a *hunchback* fehérje közepes koncentrációjánál működik, de annak magas, illetve alacsony koncentrációja gátolja

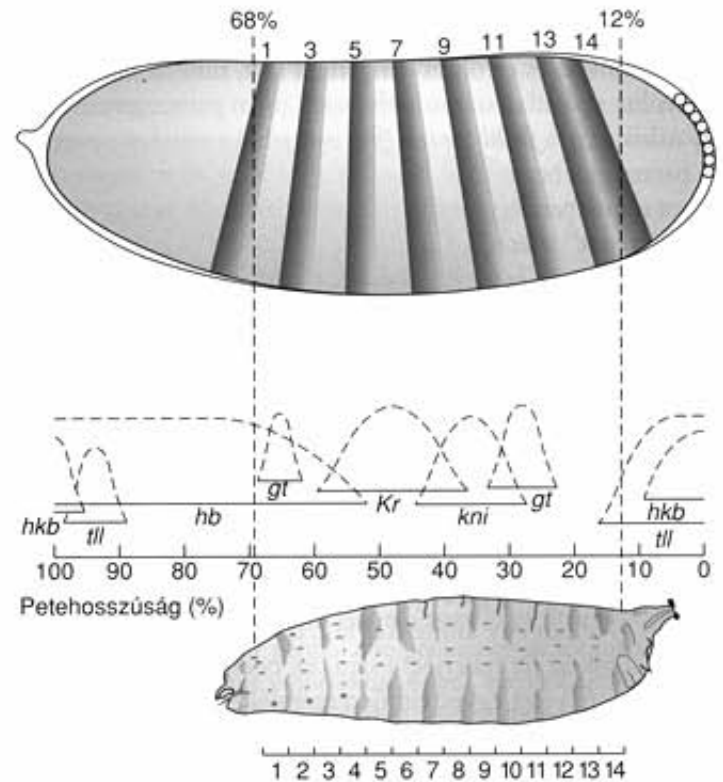
Forrás: Struhl és mások: Cell, 69:238, 1992. © Cell Press

Miért terjed ki a *hunchback* fehérje sávja a háromszoros mutáns hátulós pólusáig? Azért, mert a *nanos* gén inaktív, és rendes körülmények között a *nanos* fehérje gátolja az anyai *hunchback*-mRNS translációját. Miből tudjuk ezt? A bizonyítás ismét genetikai jellegű volt, és az alábbi érvelésen alapult: Ha a *nanos* fehérje egyetlen funkciója az anyai *hunchback*-mRNS translációjának gátlása, akkor nincs szükség a *nanos* gén működésére azokban a mutánsokban, amelyekben nincs anyai *hunchback*-mRNS. Ennek vizsgálatára Diethard Tautz, illetve Michael Akam kutatócsoportja egymástól függetlenül olyan mutáns nőstényeket vizsgáltak, amelyekben mind a *nanos*, mind pedig a *hunchback* gén inaktív volt. A mutáns nőstények petéit *nanos*⁻, *hunchback*⁺ hímekkel termékenyítették meg. A megtermékenyített petékben nem volt anyai *hunchback* fehérje, de volt zigotikus (az apai génből). A peték a *nanos* fehérje teljes hiánya ellenére szabályosan fejlődtek, tehát az anyai *hunchback* fehérje jelenléte nélkül felesleges a *nanos* fehérje.

Egy másik kísérletben Struhl, Lawrence és munkatársaik *nanos*⁻ *torso*⁻ kettős mutánst használtak, amelynek normális *hunchback* funkciója volt. A mutáns mind anyai, mind zigotikus *hunchback* funkcióval rendelkezett, ezért a *hunchback* fehérje koncentrációja az embrió elülső pólusánál sokkal magasabb volt, mint az előző mutánsban (14.28.(c) ábra). Befolyásolja-e mindez a *Krüppel*-aktivitás helyét? A várakozásoknak megfelelően a *Krüppel*-aktivitás helye az embrió hátulós vége felé tolódott el (14.28.(d) ábra). Úgy tűnik, hogy a *Krüppel* gén ott inaktív, ahol a *hunchback* fehérje szintje túl magas. A 14.28. ábrán összefoglalt genetikai eredmények mindenben megfelelnek annak a hipotézisnek, hogy a *Krüppel* gén a *hunchback* fehérje köztes szintjénél aktiválódik, de ha a fehérje koncentrációja túl magas vagy túl alacsony, akkor a *Krüppel* gén inaktív.



14.28. ábra. A *hunchback* fehérje koncentrációjának hatása a *Krüppel* gén expressziójára *torso*⁻ *nanos*⁻ embriókban. (a) A *hunchback* fehérje (rózsaszín) eloszlása, amikor csak az anyai *hunchback* termék van jelen. A koncentráció alacsony és a fehérje egyenletesen oszlik el az embrióban. (b) A *Krüppel* gén (kék) működése ugyanabban az (a) embrióban. A *Krüppel* fehérje az embrió elülső pólusának csúcsát kivéve egyenletes eloszlású. (c) A *hunchback* fehérje eloszlása, amikor mind az anyai, mind a zigotikus *hunchback* gének aktívak. Az anyai eredetű fehérje (rózsaszín) egyenletes eloszlású, míg a zigotikus (piros) kifejezett gradienst mutat az elülső pólusnál. (d) A *Krüppel* gén működése a (c) embrióban. A *Krüppel* expressziós sávja a hátulós pólus felé tolódik (nyíl), az elülső pólus magasabb *hunchback* fehérjekoncentrációja miatt



14.29. ábra. A *gap* gének expressziója az embrió blaszoderma stádiumában. Az embrió (fent) és a lárva (lent) paraszegmentumai számozottak. A harang alakú koncentrációgradiens értékeit a petehosszúság (középen) százalékában ábrázoltuk a *huckebein* (*hkb*), *tailless* (*tll*), *hunchback* (*hb*), *giant* (*gt*), *Krüppel* (*Kr*) és *knirps* (*kni*) génekre

A 14.29. ábra hat *gap* gén expressziójának mintázatát mutatja – a három előbb bemutatott gén mellett a *tailless*, a *huckebein* és a *giant* génekét. Látható, hogy ezeknek a géneknek a többségére harang alakú működési zóna jellemző, és némelyikük (*tailless*, *huckebein*, *giant*) két zónával is rendelkezik.

A *gap* gének az anyai hatású gének gradienseire reagálnak, és saját termékeik révén zónákat alakítanak ki. A termékek befolyásolhatják más *gap* gének, valamint a hierarchiában soron következő géncsoport, az ún. pair rule gének aktivitását.

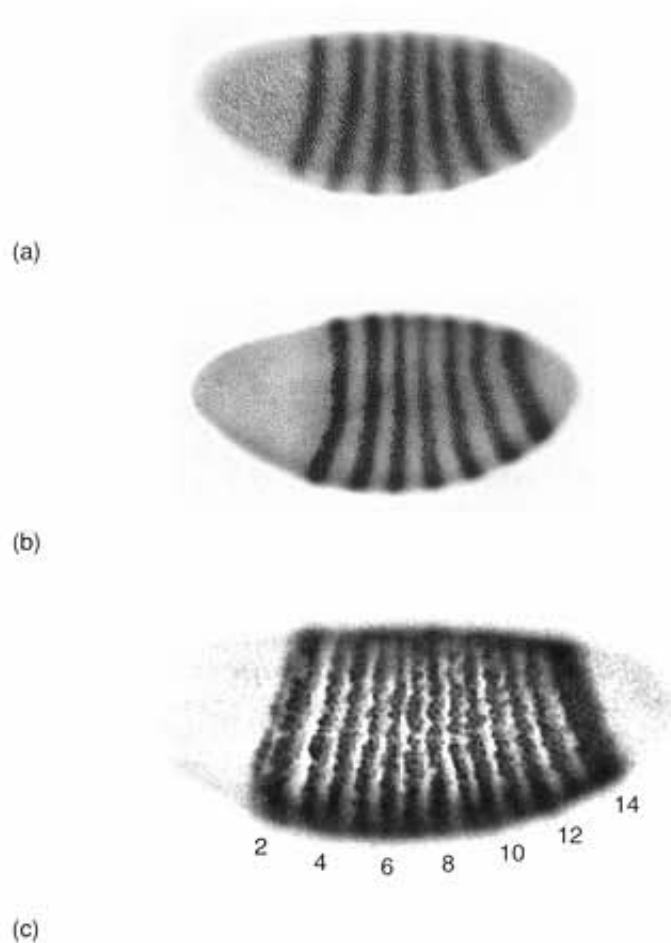
A pair rule gének

Az összes eddig ismert *gap* gén terméke transzkripciós faktor. Az említettek egyetlen kivétellel cinkujjas fehérjék. A kivétel a *giant*, ami egy bZIP fehérje (9. fejezet). Láttuk, hogy ezek a fehérjék más *gap* géneket aktiválnak, de emellett az ún. pair rule géneket is szabályozzák. A *gap* gének termékeinek harang alakú gradiense alakítja ki a pair rule (párszabály) gének övszerű expressziós zónáit. A pair rule gének általános jellemzője, hogy mutációjuk minden második testszelvény hiányát okozza.

A pair rule gének kijelölik a sejteket a paraszegmentumokhoz, vagyis megadják egy sejtnek paraszegmentuma „címét”. Az egyik ilyen gén például az *even-skipped* (*eve*), amely a páratlan számú paraszegmentumokat alakítja ki. Ezt onnan tudjuk, hogy bizonyos *eve* mutánsokban hiányoznak a páratlan számú paraszegmentumok, és ez olyan benyomást kelt, mintha kiestek (*skipped*) volna a páratlan számú szelvények (nem paraszegmentumok). Egy másik gén, a *fushi tarazu* (*ftz*) megjelöli a sejteket a páros számú paraszegmentumokba, és amint az várható, az *ftz* mutánsokban a páros számú paraszegmentumok hiányoznak. (A japán név „nincs elég szelvényt” jelent.)

Mivel az *eve* és az *ftz* gének a páratlan és a páros paraszegmentumokhoz irányítják a sejteket, azt várhatnánk, hogy ezek a gének minden második paraszegmentumban működnek: az *eve* a páratlan, az *ftz* pedig a páros számúakban. A kísérletek egyértelműen megerősítették ezeket a hipotéziseket. A 14.30.(a) ábra az *eve* működését mutatja a fejlődés különböző stádiumaiban. A képen egyértelműen kivehető hét sáv a páratlan paraszegmentumoknak felel meg. A 14.30.(b) ábra az *ftz* gén expressziójának hasonló mintázatát mutatja. Az expresszió hét sávban jelentkezik, amelyek a páros paraszegmentumoknak felelnek meg. A 14.30.(c) ábrán egy antitesttel festett embrió látható, amelyen a barna sávok az *ftz* fehérjét, a szürkék pedig az *eve* fehérjét mutatják. Ez a felvétel egyértelműen szemlélteti a két gén váltakozó aktivitását.

Miként szabályozzák a *gap* gének a pair rule géneket, hogy azok aktivitása ilyen sávszerűen jelentkezik? Vizsgáljuk meg például az *eve* működését a 2. régióban! Michael Levine és munkatársai az *eve* felső határoló régiójának egy 700 bázispárnyi fragmentumát a *lacZ* riportter génnel együtt egy nem-specifikus promoterhez kapcsolták, amely lehetővé tette a *lacZ* riportter gén expresszióját. Majd ezt a génkonstrukciót bejuttatták egy *Droso-*

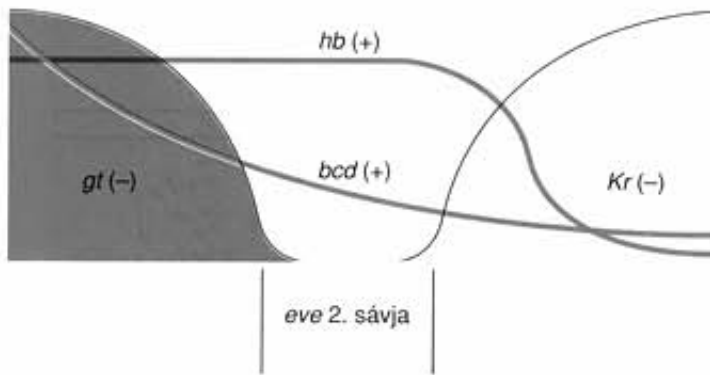


14.30. ábra. Az *eve* és az *ftz* működése a korai embrióban. (a) Az *eve* gén termékét hét sávban mutatták ki ellenanyagának felhasználásával. (b) Az *ftz* gén termékét hasonló módon anti-*ftz* ellenanyaggal detektálták. (c) Az *ftz* és az *eve* aktivitásának mintázata ugyanabban az embrióban. Peter Lawrence és Paul Johnston olyan ellenanyagokkal reagáltatták az embriót, amelyek az *ftz* fehérjét barnára, az *eve* fehérjét szürkére festették. Ennek eredményeként az embrió testében barna és szürke sávok váltakoznak. A páros számú paraszegmentumokat számok jelölik

Forrás: (a) és (b) Nipam H. Patel, (c) Peter Lawrence

phila embrióba. Az eredmény a *lacZ* expressziója volt a 2. régióban, ahol normálisan az *eve* van jelen. Ugyanezt a génkonstrukciót bejuttatták különböző *gap* génekre mutáns törzsekbe is, és közvetlenül mérték a hatást az *eve* gén működését helyettesítő expresszióra a 2. sávban. Miért választottak ilyen bonyolult megoldást a kutatók, miért nem azt vizsgálták, mi történik a mutánsok nem manipulált *eve* 2. sávjában? Ennek oka, hogy a mutáns embriók annyira torzak lehetnek, ami bizonytalanná teszi az *eve* 2. sávjának azonosítását. De a riportter génes kísérletekben csak egy sáv szerepel, ami könnyen meghatározható.

A 14.31. ábra a *lacZ* (az *eve*-t helyettesítő) aktivitását mutatja a 2. *eve* sávban a *bicoid*, a *hunchback* és a *Krüppel* gének termékeinek koncentrációgradienséhez és az elülső pólus *giant* aktivitásának maximumához viszonyítva. Minthogy a *hunchback* és a

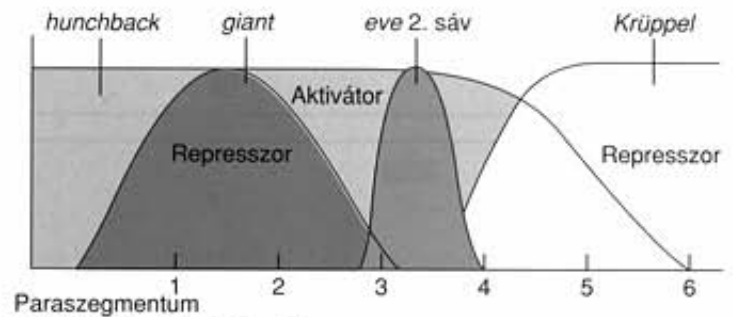


14.31. ábra. Az *eve 2.* sávját szabályozó gének expressziós zónái. Az ábrán négy gén termékének koncentrációgradiense szerepel: *hunchback* – zöld, *bicoid* – kék, *giant* (elülső zóna) – piros, *Krüppel* – sárga. A 2. sávot pozitívan szabályozó 2 gén +, a két represszáló gén – jelzést kaptak. Az *eve 2.* sávjának határait lent jeleztük

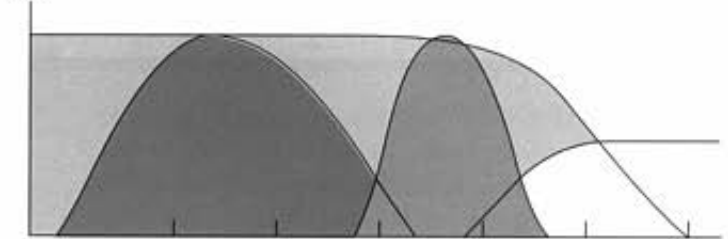
bicoid termékek koncentrációja magas, a többi géne pedig viszonylag alacsony az *eve 2.* sávjában, ésszerű az a hipotézis, hogy a *bicoid* és a *hunchback* stimulálja az *eve* expresszióját, a másik kettő pedig gátolja. Ez magyarázná azt is, miért helyezkedik el az *eve 2.* sávja annyira szabályosan a *giant* és a *Krüppel* géntermékek maximuma között.

A 14.32. ábrán összegzett kísérletek alátámasztják a hipotézist. A vad típusú muslicákban, ahol a *Krüppel* génnek két normális dózisa van, az *eve 2.* sávja keskeny (a). Ahol azonban csak egy dózis *Krüppel* gén van, az *eve 2.* sávja jelentősen kiszélesedik a hátulso pólus irányába (b). A *Krüppel* teljes hiányában az *eve 2.* sávja még jobban terjed hátrafelé (c). Ezek a megfigyelések egybevágóan azt, hogy a *Krüppel* gén, amelyik az *eve 2.* sávjának hátulso szélénél aktív, gátolja az *eve* expresszióját, és kialakítja a sáv hátsó határvonalát. Másrészt, amikor a *giant* hiányzik, az *eve 2.* sávja az embrió elülső vége felé szélesedik ki (d). Ebből látszik, hogy a 2. sáv elülső határát a *giant* alakítja ki.

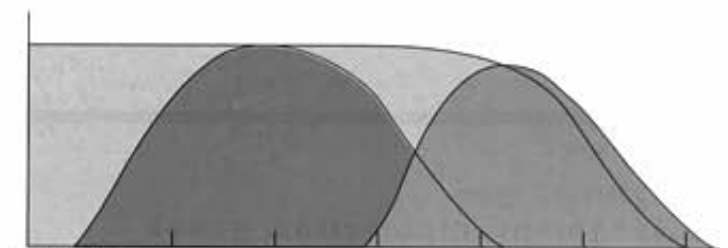
Ha a *bicoid*, a *hunchback*, a *Krüppel* és a *giant* termékei valóban szabályozzák az *eve 2.* sávjának kialakulását, akkor valószínűleg szabályozzák az *eve* gént is. Ez esetben a felsorolt gének termékeinek kötőhelyük van az *eve* szabályozó régiójában. Levine és munkatársai mind a négy gén termékének kötőhelyét megtalálták az *eve* 5' határoló régiójának 700 bázispár hosszú fragmentumában (14.33. ábra). Bár a *eve* nem tartozik a *gap* gének közé, a *bicoid* génnek mégis közvetlen hatása van az *eve* működésére. Figyeljük meg, hogy a serkentő és a gátló fehérjék kötőhelyei gyakran átfedik egymást! Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a *Krüppel* és a *giant* fehérjék gátolják a transzkripciót, miközben vetélkednek a *bicoid* és a *hunchback* proteinekkel ugyanahhoz a promoterhez való kötődésért. Minél magasabb a *Krüppel* és a *giant* fehérjék koncentrációja, annál eredményesebb a kompetíció, ami megakadályozza a *bicoid* és a *hunchback* stimuláló hatását az *eve* transzkripciójára.



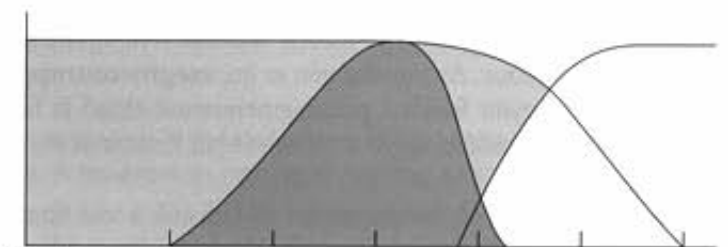
Vad típus, 2 dózis *Krüppel*⁺
(a)



Vad típus, 1 dózis *Krüppel*⁺
(b)

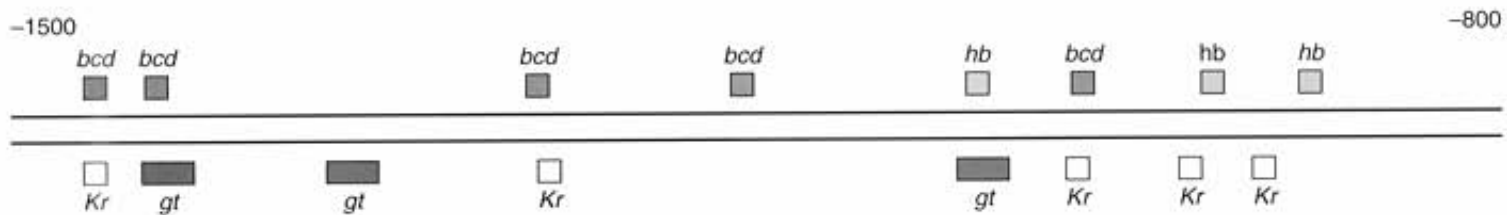


Krüppel⁻
(c)



Giant⁻
Petehossz (%) 68 64 60 56 52 48
(d)

14.32. ábra. A *Krüppel* és a *giant* hatásai az *eve 2.* sávjának kiterjedésére. A hatások felderítését célzó genetikai kísérletek összegzése. Az *eve* határoló régiójának 700 bázispárnyi szakaszából, egy nem-specifikus promoterből, valamint a *lacZ* riportter génből álló génkonstrukciót juttattak *giant* és *Krüppel* mutáns embriókba. A *lacZ* termék aktivitását β-galaktoszidáz kimutatására alkalmas (X-gal) indikátor segítségével mérték, a kék színreakció alapján. (a) Vad típus, 2 dózis *Krüppel*. Az *eve 2.* sávja (kék) viszonylag keskeny. A *hunchback* gradiense zöld, a *giant*é piros, a *Krüppel*é sárga. (b) Vad típus, egy dózis *Krüppel*. Az *eve 2.* sávja kiszélesedett a hátulso pólus irányában. (c) *Krüppel*⁻. Az *eve 2.* sávja még messzebb nyúlik a hátulso pólus felé. (d) *Giant*⁻. Az *eve 2.* sávja az elülső pólus felé terjed. A kísérletek igazolják, hogy a *Krüppel* az *eve 2.* sáv hátulso, a *giant* az elülső határát alakítja ki



14.33. ábra. Négy regulátor fehérje kötőhelye az *eve* gén 5' határoló régiójának 700 bázispárnyi régiójában. A régió a -800 és -1500 pozíciók közötti szakasz (800 és 1500 bázispárral a transzkripció start helye előtt). A stimuláló hatású *bicoid* (kék) és *hunchback* (zöld) fehérjék kötőhelyeit a DNS fölött, míg a gátló hatású *Krüppel* (sárga) és *giant* (piros) termékekét a DNS alatt ábrázoltuk

A pair rule gének az embrionális sejteket a 14 paraszegmentumhoz rendelik. Kettő közülük, az *even-skipped* és a *fushi tarazu* sávszerűen fejeződnek ki, minden második paraszegmentumban. A *gap* gének termékei transzkripciósfaktorok, amelyek a pair rule géneket szabályozzák. Ezeknek a transzkripciósfaktoroknak a koncentrációja harang alakú eloszlást mutat a szomszédos zónákban, ezért a pair rule gének expressziója a zónák közötti keskeny sávra korlátozódik.

Az *engrailed* gén és a szegmentumpolaritási gének

Amikor a pair rule gének kialakították az embrió paraszegmentumait, egy következő géncsoport lép működésbe, és meghatározza a paraszegmentumok további sajátosságait. Közülük az egyik legfontosabb az *engrailed* gén. A gént az *ftz* fehérje aktiválja, ami ugyancsak egy transzkripciósfaktor. Az *engrailed* gén az ún. **szegmentumpolaritási** génekkel együtt felelős a paraszegmentumok elülső és hátsó részeinek kialakításáért, vagyis a testszelvények határainak megjelenéséért.

A paraszegmentumok *kompartmentjei* jól láthatók a vad típusú *Drosophila* lárva ventrális (hasi) kutikuláján (14.34.(a) ábra). Mindegyik paraszegmentum elülső részét dentikulumok, az állat farki vége felé néző, nyílfejhez hasonló képletek borítják. A hátsó szelvényrészről pedig csaknem teljesen hiányoznak a **dentikulumok**, mindössze egyetlen sort alkotnak. A szegmentumpolaritási génekben, például a *wingless* génben bekövetkező mutációk hasonló fenotípust eredményeznek. A mutánsok hátsó kompartmentjét, csakúgy mint az elülsőt, dentikulumok borítják (14.34.(b) ábra). A dentikulumok polaritása kevésbé kifejezett, mint a vad típusnál, de látható, hogy az elülső és a hátsó szelvényrészben ellentétes.

A kompartmentek sejtjei determináltak, fejlődési útjuk már visszafordíthatatlanul eldőlt. Az embrió bármely részére átültethetünk például egy sejtet egy paraszegmentum hátsó részéből, az mindig megőrzi a hátsó kompartmentnek megfelelő jellegzetességeket.

Említettük, hogy az egyik szegmentumpolaritási gén, a *wingless*, amely az *engrailed* aktivitást mutató sejtek melletti sejt-sorban működik, pontosan a paraszegmentum határán. Így az *engrailed* és a *wingless* együtt határozzák meg a paraszegmentumok közti határt. A két gén működése erősíti egymást: a *wingless* mutánsokban az *ftz* gén a szokásos módon aktiválja az

engrailed gént, majd aktivitása megszűnik. Ehhez hasonlóan, az *engrailed* mutánsokban a *wingless* gén bekapcsolódik, de aktivitása nem marad fenn.

A szegmentumpolaritási gének az *engrailed* génnel együtt mindegyik paraszegmentumban megnyilvánulnak, és egy elülső, valamint egy hátsó részre különítik a paraszegmentumokat.

A szelektor gének

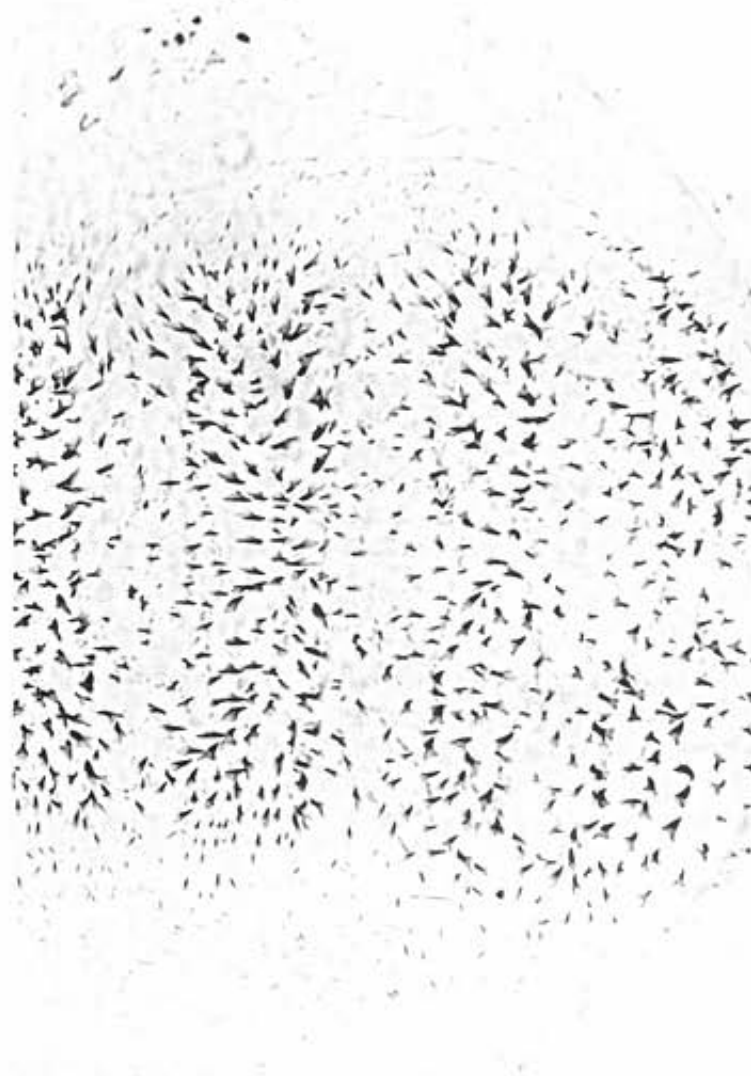
Ha egyszer a sejtek egy kompartment elemeivé válnak egy paraszegmentumban, determinálódnak, és egy meghatározott fejlődési útra lépnek, azaz lábakká, szárnyakká, billérré vagy a rovar más testrészévé alakulnak. Azt, hogy a paraszegmentumok kompartmentjeinek sejtjeiből milyen jellegzetes képletek fejlődnek, a **szelektor gének** határozzák meg. Bekapcsolódásuk meghatározott fejlődési útra tereli a sejteket, és folyamatos működésük pedig biztosítja, hogy meg is maradjanak a kijelölt úton. Az állandó aktivitás a szelektor gének ismertetőjele, és magyarázatot ad a sejtek determinációjára. Ebben az értelemben az *engrailed* gén szelektor gén: ha egyszer aktiválódott, akkor aktív is marad a fejlődés hátralévő részében, és szükséges a paraszegmentumok hátsó részének determinációjához.

A szelektor gének olyan transzkripciósfaktorokat kódolnak, amelyek DNS-kötő doménje sok esetben evolúciósan konzerválódott, 61 aminosavból álló, ún. homeodomén (9. fejezet). A homeodoméneket 183 bázispárnyi szekvenciák, homeoboxok kódolják. A homeodomén és a homeobox elnevezések a homeózis kifejezésből származnak. A terminológiát William Bateson alkalmazta először (1894) azoknak a *Drosophila* mutánsoknak a leírására, amelyeknek valamely testrészük olyan testtájra alakult ki, ahol normálisan nem fordul elő. Az **Antennapedia (Antp)** mutáns fején például a csápok helyett lábak fejlődnek (14.35. ábra). Tehát azok a sejtek, amelyek rendszeren a csápokat hozzák létre, úgy determinálódnak, hogy lábak képződnek belőlük.

Más homeotikus *Drosophila* mutánsokban előfordul, hogy a szemek helyén szárnyak, a szájszervek helyén lábak jelennek meg. Az ilyen drasztikus változásokhoz sok gén aktivitása szükséges, mégis mindegyik esetben csak egy génmutáció történt. Ez arra utal, hogy a megváltozott gén sok más gén működését szabályozza az embriogenezis során. A homeotikus gének transzkripciósfaktorokat kódolnak, ezért kulcsfontosságú sze-



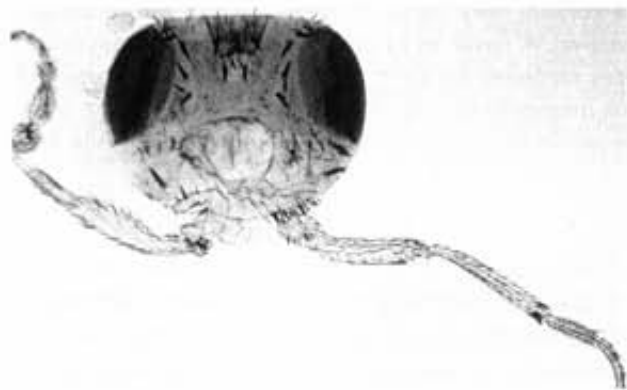
(a)



(b)

14.34. ábra. Vad típusú (a) és *wingless*⁻ (b) lárvák ventrális kutikulájának mintázata. A vad típusú lárva elülső kompartmentjein jól láthatók a dentikulumok, míg a kompartment hátulsó részén csupasz a kutikula. A mutánsokon nem figyelhető meg ez a sávozottság, mivel nincs rajtuk csupasz kutikulájú felület

Dr. Peter Lawrence engedélyével



14.35. ábra. Az *Antennapedia* fenotípus. A fejen lábak jelennek meg, ott, ahol szabályosan a csápok fejlődnek

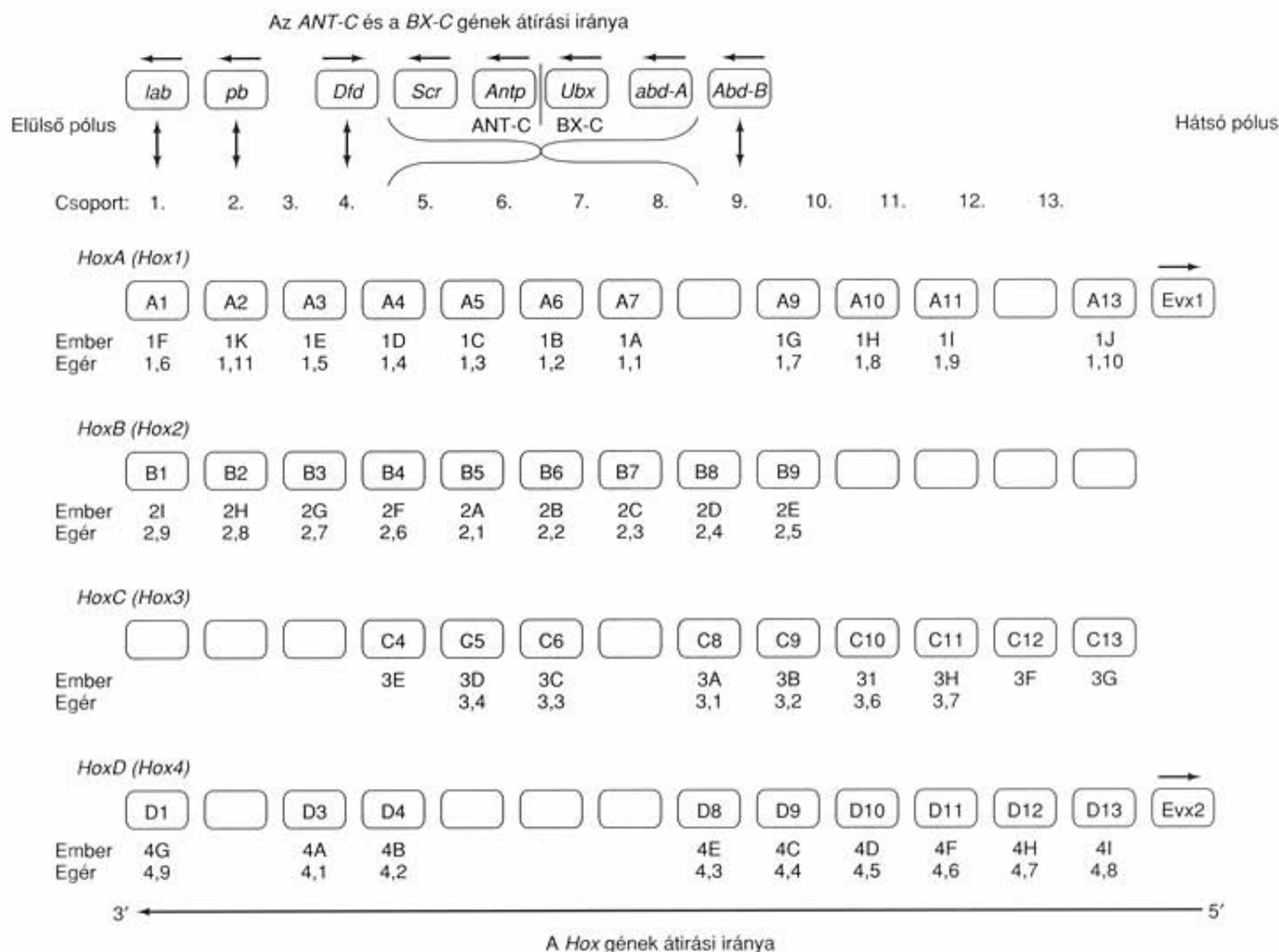
Walter J. Gehring engedélyével

repet játszanak a fejlődésben. Transzkripciósi faktoraik révén szabályozzák a fejlődési folyamatban alájuk rendelt gének működését, ily módon szabályozzák a determinációt. Erre

utal a „szelektor gén” elnevezés is. Mutációjuk módosítja a determinációs utat.

Nyolc alapvető fontosságú szelektor gént ismerünk, amelyeket két nagy csoportba sorolunk. Az egyik az *Antennapedia* komplex, röviden *ANT-C*, amely több mint 100 kb hosszú DNS, és az *Antp* gén mellett négy másik gént is tartalmaz. A másik csoport a *Bithorax komplex*, röviden *BX-C*, amelybe az *Ultrabithorax (Ubx)* és még két gén tartozik. A *BX-C* gének szerepének tisztázásához vizsgáljuk meg mind a három, az *Ubx*, az *abdominális A (abd-A)* és az *abdominális B (abd-B)* mutációinak hatásait.

Alapállapotban, amikor mindhárom gén mutációt szenvedett, csaknem minden szelvényen lábak vannak, és a szelvények hasonlóak a 2. torszelvényhez (T2). Az *Ubx* aktiválódása a T1–T3 szegmentumokhoz hasonló szelvényeket eredményez, amelyeket egy sor, az első abdominális szelvényhez (A1) hasonló szelvény követ. Az *Ubx* és az *abd-A* expressziója esetén szabályos T1–A3 szelvények fejlődnek, majd azokat követi egy sor A4 szelvény. Mindhárom gén működése mindezeket felül az A5–A8 szegmentumok kialakulásával jár. Vagyis, minél több

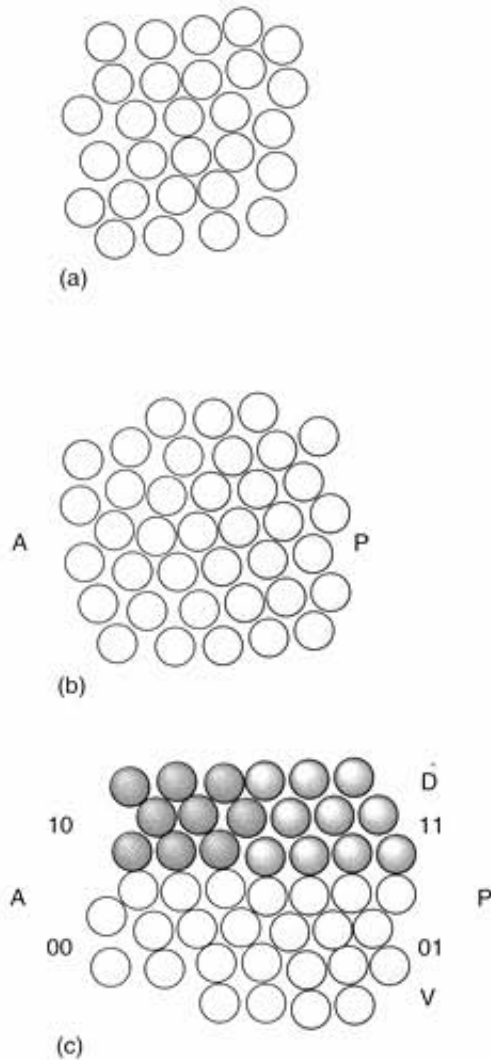


14.36. ábra. A rovarok és az emlősök homeotikus génjei közötti azonosság. Felül a *Drosophila* nyolc alapvető fontosságú szelektor génjének helyzete, a transzkripció irányát nyilak jelzik. Aktivitásuk sorrendjében az elülső pólustól a hátsó felé haladva: *labiális (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *deformed (Df)*, *sex combs reduced (Scr)*, *Antennapedia (Antp)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominális A (abd-A)* és *abdominális B (abd-B)*. Az első öt az *ANT-C* komplex tagja, az utolsó három a *BX-C* komplexé. A *Drosophila*-génnek alatti a négy emlős géncsoport látható, jelenlegi nevükön *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* és *HoxD* (zárójelben a korábbi név). Az egyes gének hivatalos neve ovális keretben szerepel, alatta az ember és az egér génjeinek leggyakoribb szinonimáival. A rovar és az emlős gének közötti kapcsolat a homeobox szekvenciák hasonlóságán alapul. A *Drosophila*-génnek alatti szögletes zárójelek azt a négy géncsoportot jelölik, amelyek valószínűleg kapcsolatban vannak az emlősök négy géncsoportjával, de a pontos megfeleltetés még nem ismert. Figyeljük meg, hogy nem minden emlős génnek van megfelelője a rovar gének között, és mindegyik emlős géncsoportból hiányzik néhány gén! Alul az emlősök génjeinek átírási iránya szerepel

ilyen szelektor gén lép működésbe, annál inkább a hátsó testrészek struktúrái fejlődnek ki.

Ez arra utal, hogy a szelektor géneknek olyan funkciójú doménjeik vannak, amelyek hatása az embrió elülső pólusától a hátsó felé terjed. Továbbá, az előrébb kifejeződő géneknek nagyobb a hatótávolságuk, mint a hátrébb levőkének. Az előzőekben láttuk, hogy az *Ubx* gén önmagában a T2 szelvényt T3-ra, és az összes abdominális szelvényt T2-ről A1-re változtathatja. Az *abd-A* és az *Ubx* a második, a harmadik és a negyedik abdominális szelvényt A1-ről A2–A4-re módosítja, a fennmaradó

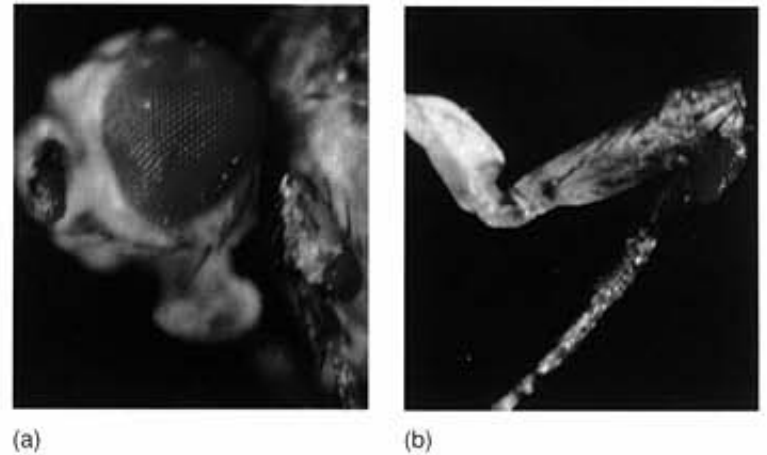
abdominális szelvényeket pedig A1-ről A4-re változtatja. Azaz a felsorolt gének mindegyike az elülső szelvények valamelyikében lép működésbe, és hatásuk minden esetben az embrió hátulsó pólusa felé terjed. Figyelemre méltó, hogy ezek a gének expressziós sorrendjüknek megfelelően helyezkednek el az anterior pólustól a posterior pólusig (14.36. ábra). Ez az elrendeződés sokkal kifejezettebb más eukarióta szervezetekben, köztük a fonálférgekben, a növényekben és az emlősökben, amelyeknek a rovarokéval homológ homeotikus génjei ugyanolyan sorrendben nyilvánulnak meg az elülső testvégtől a hátulsó felé, mint aho-



14.37. ábra. Két gén, amelyek a kétállású kapcsolókhoz hasonlóan működnek, négy alkompartmentet határozhatnak meg. (a) Alapállapotban egyik gén sem aktív (fehér). (b) Az egyik gén a posterior részben bekapcsolt állapotban van, így elkülönülnek a hátulsó (sárga) és az elülső (fehér) kompartmentek. (c) A második gén bekapcsolódott a háti oldalon, és négy alkompartmentet alakít ki: (1) elülső hasi oldali (fehér), ahol egyik gén sem aktív (a bináris állapot 00); (2) hátulsó hasi oldali (sárga), ahol az első gén aktív (bináris állapot 01); (3) elülső háti oldali (kék), ahol a második gén aktív (bináris állapot 10); (4) hátulsó háti oldali (zöld), ahol mindkét gén aktív (bináris állapot 11). Az A és P betűk az elülső és a hátulsó, míg a D és V betűk a háti (dorzális), illetve hasi (ventrális) sejtcsoportokat jelölik

gyan a kromoszómán követik egymást. Ez azt sugallja, hogy a gének sorrendje fontos, de ez nem felel meg a valóságnak, mivel a *BC-X* komplex kettéválasztása, majd a részek különböző kromoszómákra való áthelyezése nincs hatással a *Drosophila* egyedfejlődésére. Az egér és az ember genomjában négy homeotikus géncsoport található, a *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* és *HoxD*. Mindegyikük megnyilvánulási sorrendje az anterior pólustól a posterior pólus felé kolinearitást mutat a *Drosophila* szelektor géneivel (14.36. ábra).

Miként alakulnak ki a szelektor gének hatására a kompartmentek determinált sejtjei? A szelektor gének célpontjai gyak-



14.38. ábra. Az *eyeless* gén ektopikus expressziójának hatásai. Az (a) és a (b) ábrarész az *eyeless* működésének hatásait szemlélteti egy csáp, illetve egy láb imaginális korongjában

George Halder, Urs Kloter engedélyével

ran maguk is transzkripciósfaktorok, így potenciális befolyásuk van számos más gén működésére. A szelektor gének tehát egy olyan génműködési kaszkád csúcsán állnak, amely végső soron a különböző testrészek kialakulását eredményezi. Egy adott géncsoport aktiválódása a kompartmentet további részekre osztja, amelyek ezáltal képessé válnak a megfelelő testrész kialakítására. A kompartmentációt leíró egyszerű hipotézis szerint a gének bináris kapcsolók. Eszerint, két gén aktivitásának kombinációi négy különböző determinált állapotot határozhatnak meg, négy szubkompartmentben (14.37. ábra). A kompartmentek tagolódásának folyamata különböző specifikus géncsoportok bekapcsolódásával mindaddig folytatódhat, amíg a *Drosophila* szervezeté ki nem alakul.

Szelektor gének felelősek egy szövet térbeli tulajdonságainak kialakításáért. Az *Antp* gén például normálisan a torszelvevényekben fejeződik ki, amelyeken lábak fejlődnek. Az *Antp* mutánsokban a lábak helyén a fejre jellemző képletek alakulnak ki, mert ennek a génnek a hiányában a tor egy része a fejszelvevényekre jellemző speciális tulajdonságokkal rendelkezik. Tehát ezek a sejtcsoportok úgy fejlődnek, mint egy fejszelvevény, beleértve a szájszerveket is. De más szelektor gének, amelyek a hierarchiában lejjebb helyezkednek el, sokkal specifikusabb szerepet játszanak, és valóban csak egyetlen szerv kialakításáért felelősek. Ilyen például a *Drosophila eyeless* génje, amely a szem fejlődését irányítja.

Egy ideje tudott már, hogy az *eyeless* gén nélkülözhetetlen a szem kialakulásához, mert mutációi következtében a szem csökkenő vagy hiányzik. Walter Gehring kimutatta, hogy az *eyeless* ektopikus – nem a megfelelő helyen történő – expressziója rendellenes helyen alakítja ki a szemet. A 14.38.(a) ábrán egy olyan mutáns látható, amelyben az *eyeless* gén a csáp imaginális korongjánál volt aktív, ezért a szem a csáp végén fejlődött. Ehhez hasonló jelenséget szemléltet a 14.38.(b) ábra, ahol a láb imaginális korongjában fejeződött ki az *eyeless*, így a szem a lábon jelent meg. Az *eyeless* a szemfejlődés egyik fő szabályozó génje, mivel expressziója önmagában elegendő a szem kialakulásához. Valószínű-

leg még figyelemreméltóbb, hogy az egér homológ génje (*small eye*) hasonlóan működik, mint amikor a muslicában ektopikusan fejlődik ki az *eyeless*. Ahogy az egy fő szabályozó génnél várható, az *eyeless* és homológjai egyaránt olyan transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek DNS-kötő doménje homeodomén. Már láttuk, hogy a transzkripciós faktorok sok más, a fejlődési úton alájuk rendelt gén aktivitását befolyásolhatják, ezért irányító szerepük van.

A szelektor gének olyan transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek ugyancsak transzkripciós faktort kódoló géneket kapcsolnak be. Az eredmény specifikus géncsoportok aktiválása, amelyek termékei meghatározott fejlődési utakra terelik a sejteket – egyesek közülük például torszelvényre alakulnak, lábakat hoznak létre. Minél több és több szelektor gén kapcsolódik be, a szövet egyre inkább determinálódik. A fő szabályozó gének a különböző szervek fejlődését irányítják, az *eyeless* gén például a szemét. A szelektor gének, ha egyszer aktiválódtak, mindvégig meg is őrzik működőképességüket, és meghatározott fejlődési útra terelik, determinálják a sejteket.

A JELÁTVITEL

Az előzőekben láttuk, hogy a *Drosophila* egyedfejlődésének korai szakaszában génavivációs kaskádok működnek, az anyai hatású génektől kezdve, egészen a szelektor génekig. A kaskádban a korai gének (anyai hatású, *gap* és *pair rule* gének) olyan embrióban működnek, amelyben a pólussejteket leszámítva még nem alakultak ki a sejthártyák. Ezért a transzkripciós faktorok akadály nélkül diffundálhatnak egyik sejtmagtól a másikig, nem kell a sejtmembránokon áthatolniuk. A késői gének (szegmentum polaritási és szelektor gének), akkor lépnek működésbe, amikor a sejtmembránok már kialakultak. Ez azt jelenti, hogy a sejtek közötti kapcsolat kevésbé közvetlen, és a jelátadás függvénye. Vagyis egy gén aktivitása az egyik sejtben ki- vagy bekapcsolhatja egy másik sejt génjeit. Az ilyen típusú kapcsolatot **jelátvitelnek** nevezzük.

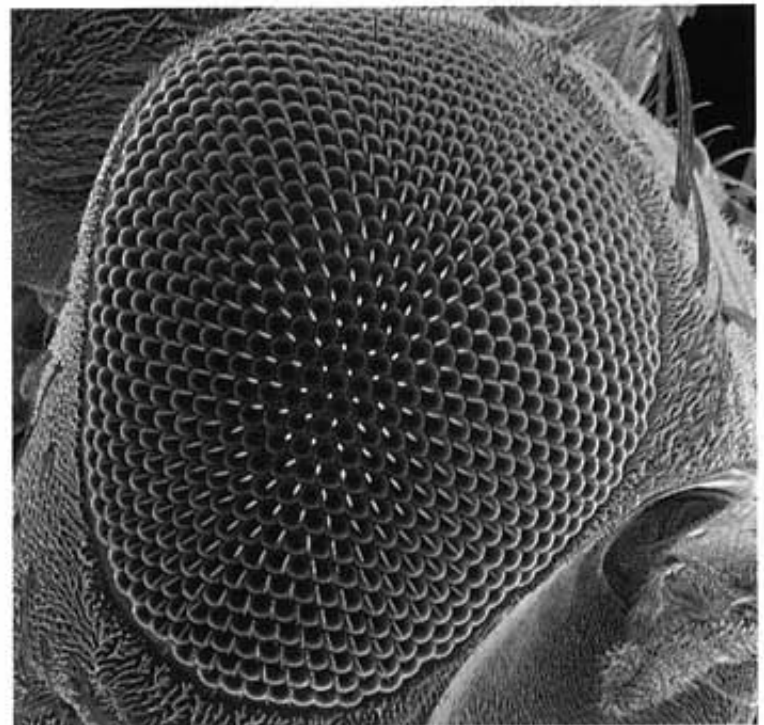
A *Drosophila* esetében az egyik legjobban tanulmányozott jelátviteli út a szem facettáiban található fotoreceptorok egyikének kialakulása. Az *ecetmuslica* összetett, facettás szeme mintegy 800 ismétlődő egységből, **ommatidiumból** (egyszerű szem) áll, amelyek mindegyike egy-egy miniatűr szemecske, fénytörő közegekkel és látó-, más néven retinulasejttekkel (14.39. ábra). Fényérzékeny része nyolc retinulasejtből áll (14.40.(a) ábra), amelyek fény hatására elektromos impulzusokat küldnek az agyba.

A szem két okból is kiváló objektuma a fejlődés-genetikai vizsgálatoknak. Először is, nem létfontosságú szerv, a szem nélküli mutánsok életképesek. Másodszor, lehetőség nyílik mozaikos mutánsok előállítására, hiszen a vad típus piros szemű, míg például az egyik színmutáns fehér (*white*) szemű. A mozaikos állatok szemében a mutáns, fehér sejtek könnyen azonosíthatók a piros színű normál sejtek között. A szem fejlődés-genetikai vizsgálata a következő lépésekre bontható: (1) Olyan mutációkat

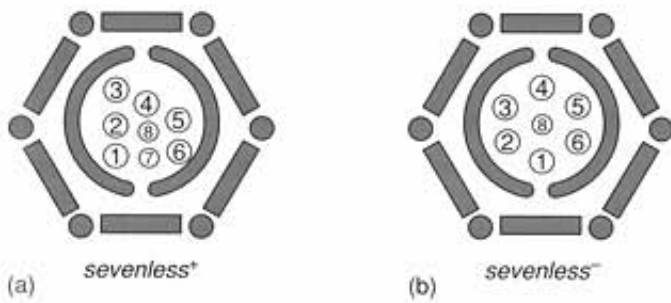
idéznek elő, amelyek megszakítják a szem fejlődését; ez azonosít egy alapvető fontosságú gént. (2) Mozaikos, mutáns sejtek klónjait tartalmazó szervezeteket hoznak létre, hogy megállapítsák a génhatás helyét és időpontját. (3) A gént klónozzák. (4) Vizsgálják a klónozott gén nem megfelelő helyen vagy időben történt expressziójának hatásait. A lépések közül kettőt, a mozaikos egyedek előállításának módját és a gének rossz helyen vagy időben történő expressziójának kiváltását a 14.1. melléklet ismerteti.

Vizsgáljuk meg, hogyan alkalmazható a fenti stratégia az ommatidiumban található 7-es retinulasejt (R7) kialakulásához vezető jelátviteli út feltárására! Sydney Brenner és munkatársai találtak egy olyan mutáns, amelyikben az R7 hiányzott, helyén ún. kúpsejt fejlődött. A mutáns a *sevenless* nevet kapta. A mozaikos embriók szemében, azokon a helyeken, ahol az R7 szabályosan fejlődött, a *sevenless* vad típusú volt. Ezzel ellentétben az R7 nem fejlődött ki, ha a *sevenless* mutáns volt (14.40.(c) ábra). Ez azt mutatja, hogy a *sevenless* **sejtautonóm** gén, csak az R7 sejtekben van rá szükség.

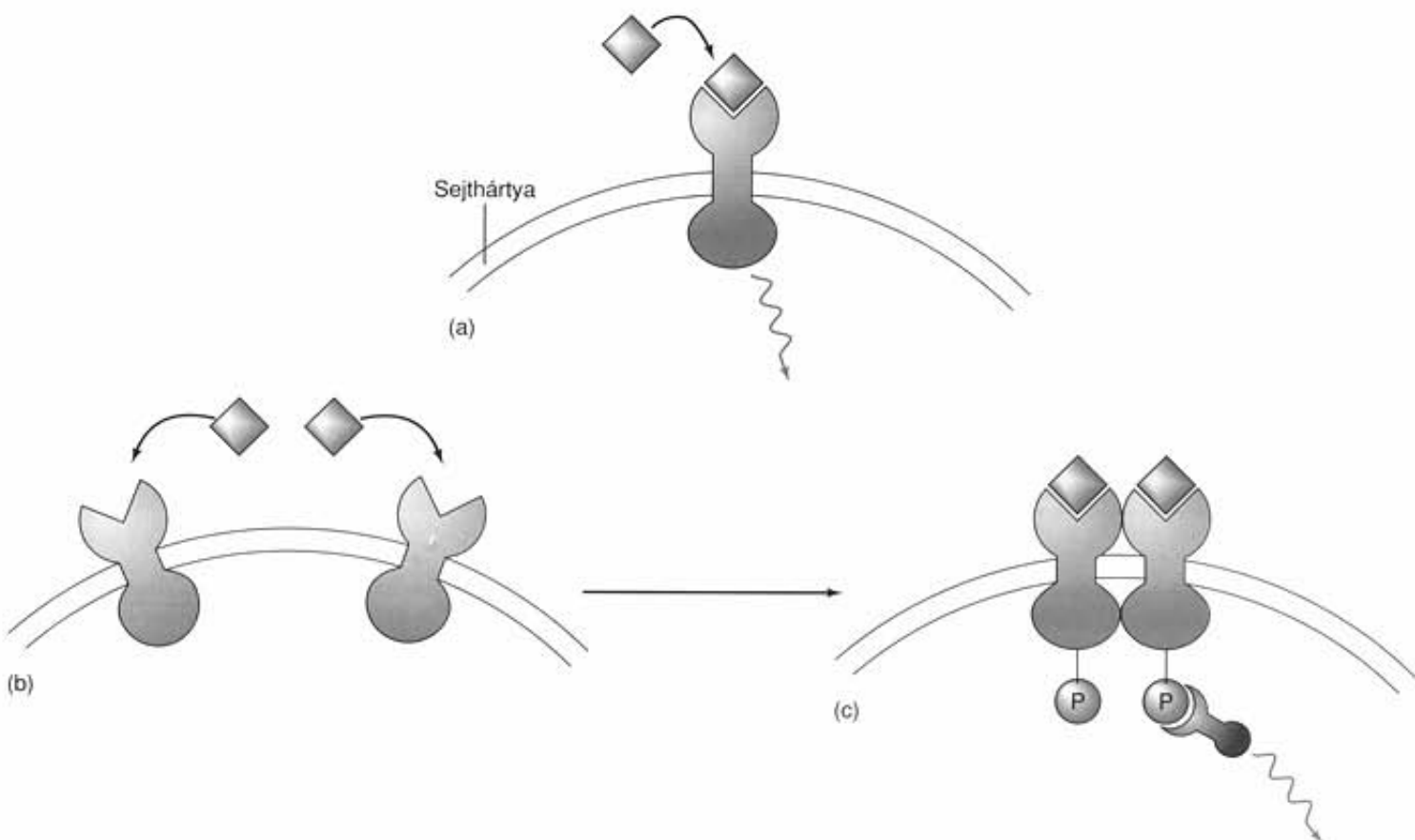
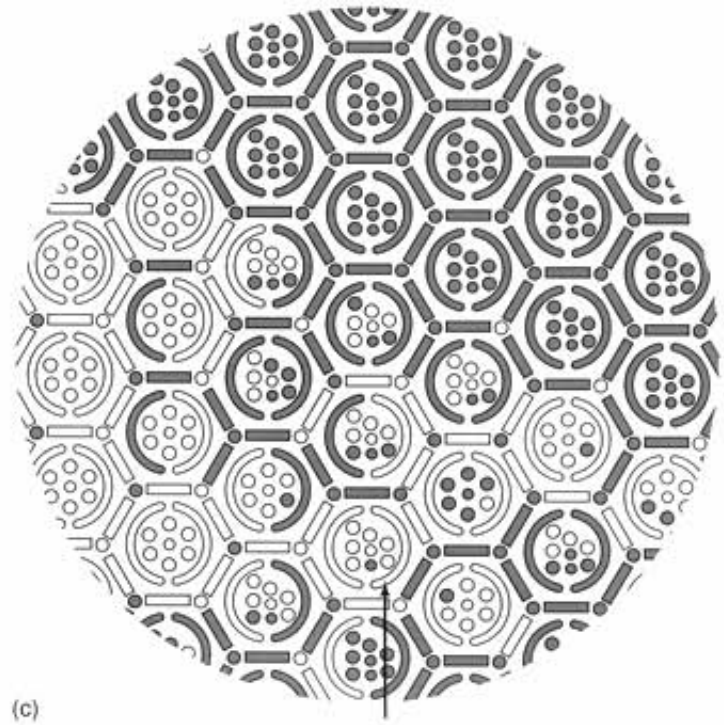
Napjainkra klónozták a gént, és meghatározták nukleotidszekvenciáját is. A szekvencia értelmezésekor kiderült, hogy a gén egy transzmembrán receptorfehérjét kódol, azaz a molekula átéri a sejtmembránt (14.41. ábra). A fehérje extracelluláris része látja el a receptorfunkciót, vagyis lép kölcsönhatásba más molekulákkal, ami jelzéseként szolgál, és aktiválja a fehérje intracelluláris részét. A sejt belseje felé néző molekuláris részlet tirozin-kináz, olyan enzim, amely foszfátcsoportot kapcsol bizonyos fehérjék tirozinjaihoz. Az enzim önmagát is képes foszfo-



14.39. ábra. A *Drosophila* összetett szeme. A pásztázó elektronmikroszkópos felvételen jól láthatók a vad típusú szem szabályosan rendeződő ommatidiumjai
© David Scharf



14.40. ábra. A *sevenless* gén sejtautonómiáját igazoló kísérlet. Tomlinson olyan mozaikos muslicát állított elő, amelyben a sejtek vagy *white⁻ sevenless⁻* vagy *white⁺ sevenless⁺* genotípusúak voltak. Az előző genotípus klónjai fehér színűek, az utóbbiaké piros színűek, így nagyon jól azonosíthatók. (a) A retinulasejtek (számozott) elrendeződése a *sevenless⁺* ommatidiumban. (b) A fotoreceptorok helyzete a *sevenless⁻* ommatidiumban, ami egyértelműen különbözik az előzőétől. (c) A kísérlet eredménye. A *sevenless⁺* (*white⁺*) genotípusú sejtek mindegyik ommatidiumban pirosak, míg a *sevenless⁻* (*white⁻*) sejtek fehérek. Figyeljük meg, hogy minden R7 sejt *sevenless⁺*, még a nyíllal jelzett ommatidiumban is, ahol az összes többi sejt *sevenless⁻*



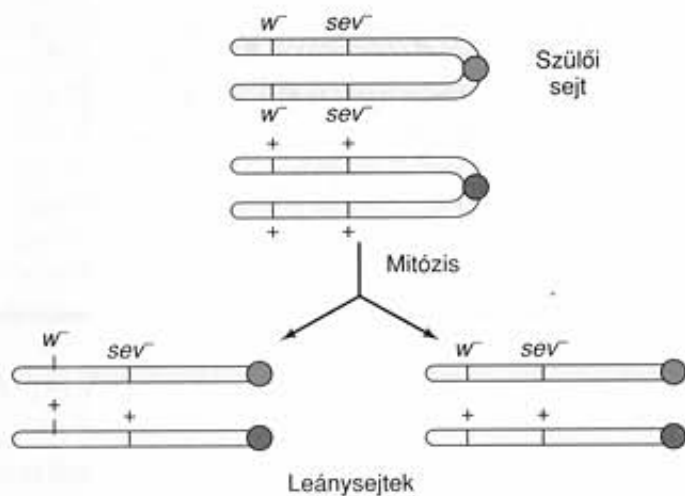
14.41. ábra. Transzmembrán receptorok. (a) Általános szerkezet. A ligandum (piros) kötődik a receptor extracelluláris doménjéhez (kék). Ennek hatására változás történik az intracelluláris doménben, ami jelzést (zöld) küld a sejt belseje felé. (b) A receptor tirozin-kináz működése. A ligandumok kötődnek a két receptor extracelluláris doménjéhez, ezért a receptorok egymás mellé kerülnek a membránban, és dimert képeznek. (c) Ezt követően a tirozin-kináz aktivitással bíró intracelluláris domének autofoszforylációt hajtanak végre, vagyis meghatározott tirozinegységeikre foszfátcsoportot (narancssárga) kapcsolnak. A foszfortirozinhoz egy adapter fehérje (lila) kötődik, és egy többlépéses folyamatban jelzést továbbít a sejt felé

14.1. Két módszer a *Drosophila* fejlődésgenetikai vizsgálatához

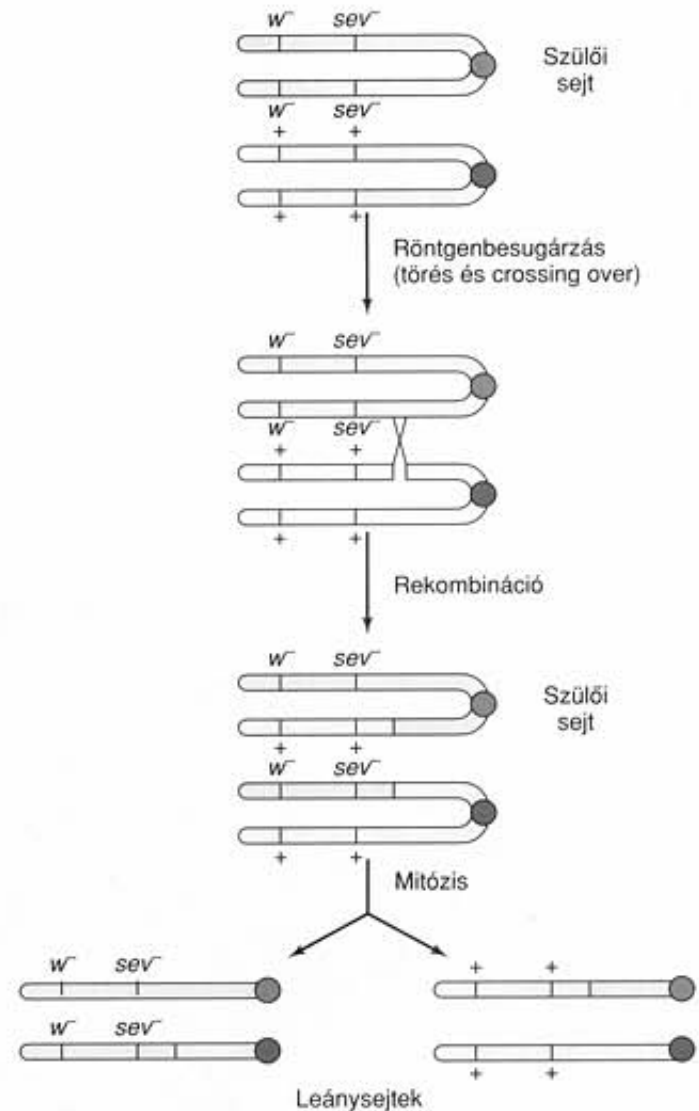
1. A MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓ

Mozaikos ecetmuslicák többféle eljárással is előállíthatók, de talán legjobb a mitotikus rekombináció alkalmazása. A mitózis során rendszerint nem történik rekombináció, de indukálható az embriók röntgen- vagy gamma-sugárzásával. Az ionizáló sugárzások kromozómatoréseket okoznak (11. fejezet). A szabad végek néha szabályosan összeforrnak, de esetenként rekombinációhoz vezetnek az apai és az anyai eredetű kromoszómák között (M14.1. ábra).

Ha a besugárzott embrió heterozigóta a *white* és a *sevenless* markerekre, valamint ha a kromozómatorés a *sevenless* lokusz és a centromera között következik be, akkor a mitotikus rekombináció eredményeként keletkező két leánysejt vagy vad típusú lesz (*white⁺ sevenless⁺*), vagy pedig homozigóta kettős mutáns (*white⁻ sevenless⁻*) (M14.1.(b) ábra).



(a) Normális mitózis



(b) Mitotikus rekombináció

M14.1. ábra. A mitotikus rekombináció mechanizmusa. (a) Szabályos mitózis. A kiindulási sejt heterozigóta a *white* és a *sevenless* lokuszokon. Mindkét kromoszóma replikálódott, felkészült a mitózisra. Az anyai kromoszóma (kék) hordozza a mutáns allélokot (w^- és sev^-), az apai kromoszóma (piros) pedig a vad típusú allélokot (+). A két leánysejt is heterozigóta mindkét lokuszra. (b) Mitotikus rekombináció. Röntgen- vagy gamma-sugárzás hatására törés keletkezik az apai kromoszómán a centromera és a *sevenless* lokusz között. Ez rekombinációs eseményt indukál az apai és az anyai kromoszómák között (X-szel jelölve). A folyamat eredménye két rekombináns kromoszóma. A mitózis két leánysejtet hoz létre, mindkettőben van egy rekombináns kromoszóma. A bal oldali leánysejt mindkét lokuszán homozigóta recesszív, a jobb oldali sejt pedig homozigóta vad típusú. A homozigóta mutáns sejt egy mutáns sejtnek hozhat létre

14.1. (folytatás)

Ha egy ilyen homozigóta mutáns sejt létrehoz egy klónt az embrionális szemben, akkor a sejtvonal tagjai fehér színűkkel könnyen azonosíthatók a vad típusú, piros ommatidiumok között. Amennyiben a mitotikus rekombináció az embrionális fejlődés korai szakaszában játszódik le, a mutáns sejtek klónja nagyméretű. A fejlődés késői szakaszában bekövetkező esemény kisebb klónt eredményez.

2. HŐSOKK PROMOTERREL SZABÁLYOZOTT GÉNEK TRANSZFORMÁCIÓJA P ELEM KÖZVETÍTÉSÉVEL

Egy klónozott gén nem megfelelő helyen vagy időben való expressziójához a klónozott, vad típusú gént egy *hsp-70* hősokk promoter mögé kapcsolják, majd az egész konstrukciót transzpozabilis P elemet hordozó vektorral bejuttatják az embrióba (12. fejezet). A hősokk gének általában inaktívak, de promotereik aktiválhatók, ha a hőmérsékletet 37 °C-ra emelik. Az egyedfejlődés különböző stádiumaiban felmelegítik az embriót, így aktiválják a hősokk promotert és a mögé épített

gént. Az expresszió az embrió egész testére kiterjed, legtöbbször nem az eredetinek megfelelő helyeken. A hatások, amelyek gyakran letálisak, fényt deríthetnek a gének normális funkciójára.

Egy ilyen kísérletben John Lis és munkatársai beépítették az *E. coli lacZ* génjét egy P elemet tartalmazó vektorba, a *hsp-70* promotere mögé. A vektor szelekciós markerként *rosy*⁺ gént is hordozott. A génkonstrukciót korai állapotú embriókba injektálták, majd a *rosy*⁺ muslicákra szelekciót hajtottak végre. Annak igazolására, hogy ezek az állatok hordozzák a *hsp-70* promoter által vezérelt *lacZ* gént, felmetszették az állatok potrohát, majd belső szerveiket X-gal-tartalmú oldatban szuszpendálták. Az X-gal kimutatja a *lacZ* termékének, a β -galaktozidáznak a jelenlétét. Az M14.2. ábrán látható, hogy a hősokknak kitett állatok potroha sötétkékre színeződött, ami a *lacZ* fokozott aktivitására utal. A hősokk nélkül nevelt állatokban a színreakció gyenge. A *lacZ* gén expressziója nem okozott eltérést a hősokknak kitett állatok fejlődésében, de egy *Drosophila*-gén ektopikus működése már jelentős zavarokat okozhat.



(a)



(b)



(c)

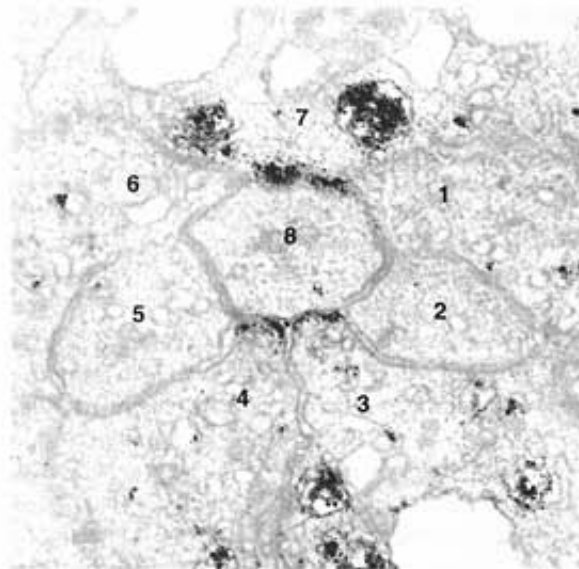
M14.2. ábra. A *hsp-70* promoter által vezérelt gén expressziójának vizsgálata transzformált ecetmuslicákban. Lis és munkatársai P elemet tartalmazó vektor segítségével beépítették a *Drosophila* embriókba a *hsp-70* promoter mögé helyezett *lacZ* gént, majd hagyták az embriókat kifejlődni. Ezt követően X-gal-tartalmú oldatba helyezték az állatokat, hogy a kék színreakció segítségével kimutassák a *lacZ* gén működését. Az állatok potrohát felmetszették, hogy az oldat a belső szervekkel is érintkezhesen.

(a) Hősokk alkalmazása nélkül nevelt transzformált állat. A gyenge elszíneződés minimális *lacZ*-aktivitást jelez. (b) Hősokknak kitett transzformált állat. Az erőteljes kék színreakció a *lacZ* intenzív működésére utal. (c) Negatív kontroll, azaz hősokknak kitett, nem transzformált állat

Forrás: Lis, J. T., Simon, J. A. és Sutton, C. A.: New Heat Shock Puffs and β -Galactosidase Activity Resulting from Transformation of *Drosophila* with an HSP-*lacZ* Hybrid gene. *Cell*, 35:407, 1983. © Cell Press

rilálni! Tehát a *sevenless* terméke egy ún. **receptor tirozin-kináz**. Az ilyen fehérjék többségénél a jelátvitel kezdete az autofoszforiláció, aminek hatására egy *adapter fehérje* kapcsolódik a foszfortirozinhoz. Az adapter fehérje ezután továbbítja a jelet, mégpedig rendszerint a sejtmagba, és hatására megváltozik a génextpresszió.

A klónozott gént megjelölhetjük, és próbaként használhatjuk a *sevenless* expressziós helyének felderítésére. A 14.42. ábrán látható, hogy a *sevenless* az R7 és az R8 sejtek határán fejeződik ki. (Az R3 és az R4 sejtekben is hasonló módon nyilvánul meg a *sevenless*, de ez úgy tűnik, lényegtelen, mivel a gén mutációinak nincs észlelhető hatása erre a két sejtre.) Mivel a *sevenless* gén



14.42. ábra. A *sevenless* fehérje immuncitokémiai kimutatása retinulasejtben. Tomlinson jelölt *anti-sevenless* fehérjével (antitest) reagáltatta az ommatidium retinulasejtjeiből készült vékony metszetet, majd a festődés alapján azonosította a *sevenless* fehérje helyét. A festődés az R7, R3 és R4 retinulasejt R8 sejtekkel szomszédos részén jelent meg. Ez arra utal, hogy az R8 terméke egy ligandum, amely kötődik a *sevenless* fehérjéhez

Dr. Andrew Tomlinson engedélyével

az R8 sejtek közelében működik, ezért feltehetően az R8 sejtek termelik azt a molekulát (ligandumot), amely aktiválja a *sevenless* fehérjét. Sikertelenül is azonosítani egy ligandumként szóba jöhető sejtfelszíni fehérjét, ami az R8 sejtben a *boss* (*bride of sevenless*) gén terméke. A *boss* aktivitása nem szükséges az R8 kialakulásához, de az R7-éhez igen: a *boss* mutánsokban az R7 nem fejlődik. A mozaikos kísérletek azt mutatják, hogy az R7 fejlődése szabályos, feltéve, ha ugyanazon ommatidium R8 sejtjében a *boss* gén vad típusú. A környező ommatidiumok *boss* génjének állapota lényegtelen.

Hasonló genetikai kísérletek vezettek a 14.43. ábrán vázolt hipotetikus jelátviteli út kidolgozásához. A *boss* fehérje aktiválja *sevenless* fehérjét és ez egy olyan foszforilációs kaszkádot indít el, amelynek csúcsát két transzkripció szabályozó fehérje, a *pointed* és a *yan* gének termékeinek foszforilálása jelenti. A foszforiláció aktiválja a transzkripciót fokozó *pointed* fehérjét, és inaktiválja a transzkripció represszorként működő *yan* fehérjét. Ezt követően egy sor olyan gén aktiválódik, amelyek működését ez a két fehérje szabályozza. Közéjük tartozik például az *Rh4*, egy fényérzékeny fehérjét, a rodopszin *Rh4*-et kódoló gén. A rodopszin *Rh4* biztosítja az R7 sejtek fényérzékenységét.

A 17. fejezetben még foglalkozunk azzal, hogy az ilyen jelátviteli utak fontos szerepet játszanak az emberi sejtek osztódásának szabályozásában, és emiatt a rákos folyamatokban. Ha a jelátviteli út egy vagy több eleme meghibásodik, az érintett sejt rákos sejté alakulhat. Ennek a jelátviteli útnak egyik kulcsfontosságú eleme a *ras* gén, amelynek mutációi rákot okozhatnak, ezért a *ras* gén az onkogének közé tartozik.

Egyes gének termékei más sejtek génjeit aktiválják egy jelátviteli mechanizmus segítségével. A jelátviteli folyamatok alapja a fehérjék foszforilációja. A *sevenless* jelátviteli útnan az R8 fotoreceptor felszínén a *boss* fehérje kapcsolódik a *sevenless* fehérjéhez, és aktiválja azt. Ezzel kezdetét veszi az a fehérje foszforilációs kaszkád, amelynek eredményeként aktiválódnak az R7 receptor fejlődéséhez szükséges gének.

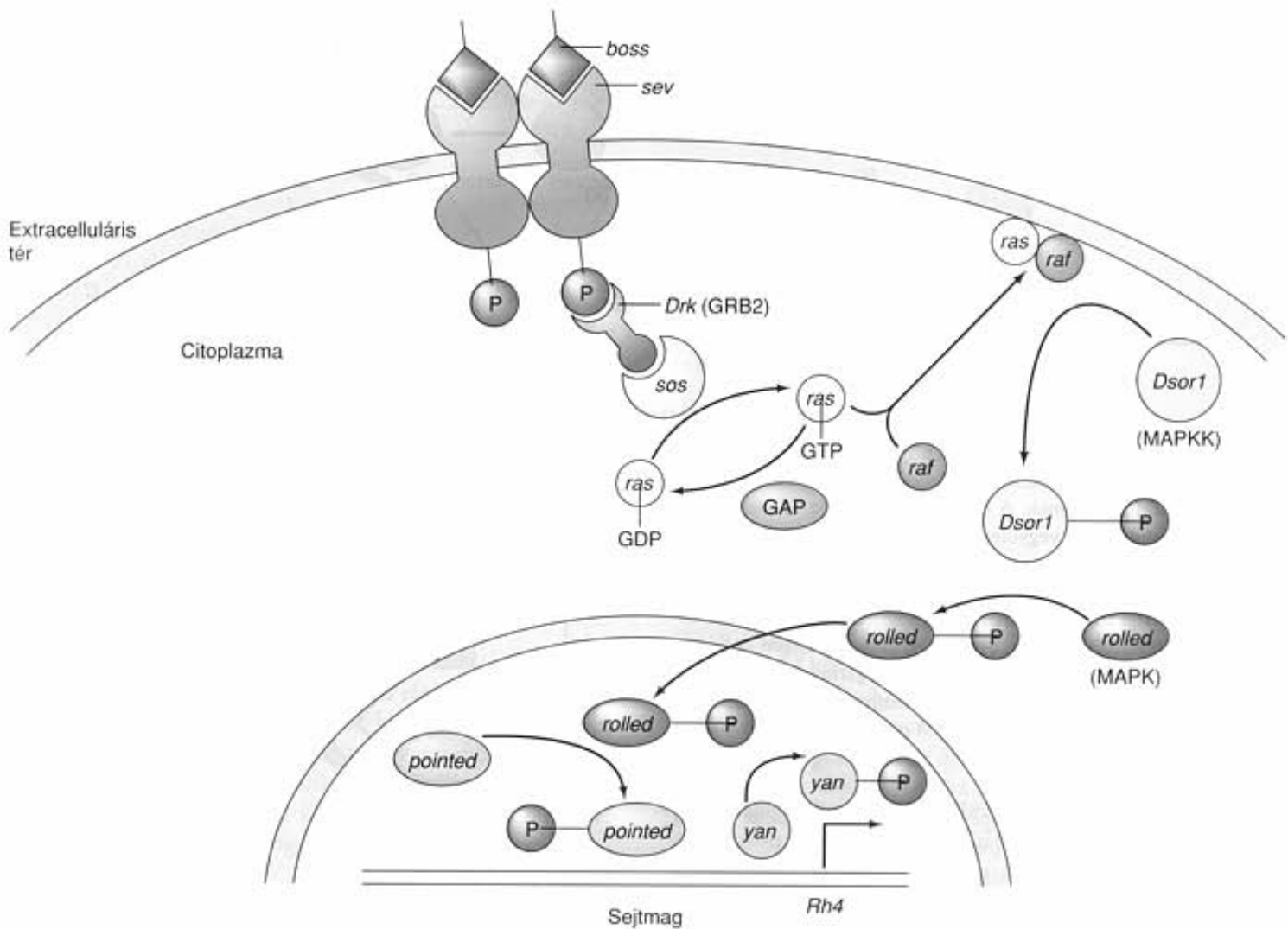
AZ EPISZTÁZIS ÉS A FEJLŐDÉS

Ebben a fejezetben a fejlődési utak több példáját mutattuk be. Néhány esetben közvetlen a kölcsönhatás a gének között, az egyik gén által kódolt transzkripció faktor közvetlenül befolyásolja egy másik gén működését. Mások az irányítás közvetlen, jelátviteli utakon keresztül valósul meg. Az **episztázis** jelensége jól használható annak tisztázására, hogy két vagy több gén ugyanannak vagy egy másik fejlődési útnak a részese-e.

Az episztázis lényege, hogy egy gén mutáns alléja megváltoztatja vagy elfedi egy másik gén mutáns alléja által meghatározott fenotípust (2. fejezet). A fejlődésgenetikában a jelenség módját annak felderítésére, hogy két gén ugyanannak a folyamatsornak a szereplője-e vagy sem, illetve kellő körültekintéssel az is eldönthető, melyik gén található downstream és melyik upstream irányban.

Példaként vizsgáljunk meg egy hipotetikus reakciót, amelynek során bíborszínű virágpigment képződik (14.44.(a) ábra). A festékanyag képződését két enzim katalizálja, amelyek az *A*, illetve a *B* gének termékei. Az *A* gén terméke egy színtelen (vagy fehér) vegyületet piros pigmentté alakít. A *B* gén terméke pedig a piros színyt bíborlilára változtatja. A *B* mutáció tehát piros virágszín eredményez, mert működőképes *B* enzim hiányában a piros pigment nem alakulhat át bíborlilává (14.44.(b) ábra). De egy *A*⁻*B* ketős mutáns (14.44.(c) ábra) fehér virágszínű, mert aktív *A* enzim hiányában a színtelen kiindulási anyag nem alakul piros pigmentté. Ha nem képződik piros pigment, akkor a *B* enzim jelenléte vagy hiánya közömbös. Így a *B* gén mutációja nem lényeges, hiszen elfedi az *A* gén mutációja. Más szóval, az *A* gén episztatikus *B* felett. Ebben az esetben az episztatikus gén a reakcióút elején (upstream) van.

De a fejlődésgenetikai folyamatokban gyakori, hogy az episztatikus gén a folyamat végén (downstream) szerepel. Ez sokféleképpen bekövetkezhet, amire a jelátviteli utak is számos példát szolgáltatnak. Vizsgáljuk meg a 14.45.(a) ábrán feltüntetett hipotetikus utat! A fejlődési folyamatban szereplő három gén (*A*, *B*, *C*) mindegyike egy-egy fehérjét (*A*, *B*, *C*) kódol. Az *A* fehérje egy ligandum (hormon vagy növekedési faktor), amely *B* receptorhoz kötődik. A kötődés hatására *B* kapcsolódik *C*-vel és foszforilálja azt. A foszforilált fehérje továbbítja a jelzést a fejlődési folyamat többi szereplőjének, ami végső soron ahhoz vezet, hogy az ezeket a géneket tartalmazó sejtből neuron lesz. A 14.45.(b) ábrán az *A* gén mutációja miatt az *A* fehérje nem működőképes, ezért nem lép kölcsönhatásba *B*-vel, így *B* nem aktiválódik, és nem foszforilálja *C*-t. Ennek következtében a sejt neuron helyett epidermális sejté differenciálódik. A (c) ábrarész-

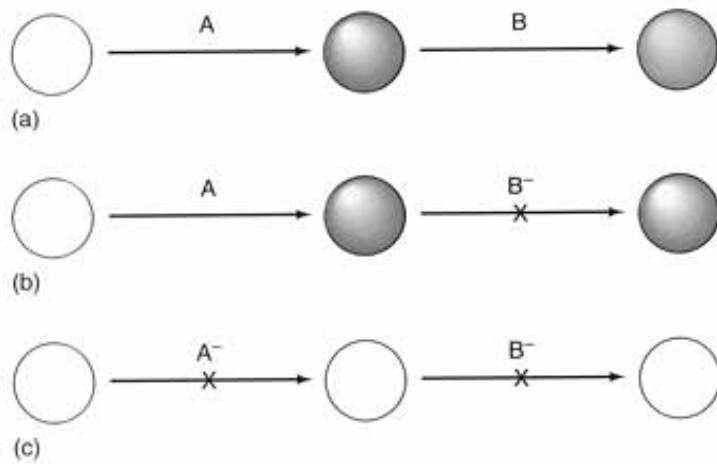


14.43. ábra. A sevenless jelátviteli út. A sevenless (*sev*) fehérje kölcsönhatásba lép ligandumával, a *boss* fehérjével. (A fehérjéket génjeik nevével jelöltük.) Ennek hatására a *sev* fehérje dimerizálódik, és autofoszforilálódik intracelluláris tirozin-kináz doménjének közreműködésével. A foszforilált tirozinra egy adapter molekula, a *Drk* gén terméke kötődik, majd ez kapcsolódik a *Sos* (*Son of sevenless*) fehérjével. Ennek következtében a *ras* fehérjén a GTP GDP-vé alakul, és a *ras* aktiválódik. Az aktív *ras* fehérje a sejthártya belső felszínéhez szállítja a *raf* fehérjét, ahol az aktiválódik és foszforilálja a *Dsor1* fehérjét, ami foszforilálja a *rolled* proteint. (A *rolled* másik neve MAPK – mitogén aktivált protein-kináz.) A *rolled* bejut a sejtmagba, ahol két transzkripciósfaktor, a *pointed* és a *yan* aktiválásában vesz részt. Az előbbi transzkripciósfaktor, foszforilációja fokozza célgénjeinek átírását, többek között az *Rh4* génét, amely a rodopszin 4 nevű látófehérjét kódolja. A *yan* represszor fehérje, foszforilációja megszünteti az *Rh4* transzkripciójának gátlását. Tehát a *rolled* mindkét hatása serkenti az *Rh4* átírását, és elősegíti az R7 fotoreceptor kialakulását.

let kettős mutánsa ugyanolyan hibás *A* gént tartalmaz, mint a (b), de emellett van egy konstitutív *B* génje is, amely állandóan bekapcsolt állapotban lévő *B* receptorfehérjét kódol. Így a *B* fehérje, annak ellenére, hogy nem lép kölcsönhatásba az *A* fehérjével, foszforilálja *C*-t. *C* foszforilációja következtében a sejt neuronná fejlődik, mégpedig az *A* gén mutációjának ellenére. Így az *A* gén mutációja a továbbiakban már nem játszik szerepet, mert a *B* mutációja elfedi. Ebben az esetben *B* episztatikus *A* felett. Végül a (d) ábrarészlet egy hármast mutat be, melynek *A* génje az előző példához hasonlóan működésképtelen fehérjét kódol, és *B* génje is konstitutív. *C* génje mutáció következtében olyan terméket kódol, amelyet *B* nem képes

foszforilálni. Így a jel nem fut végig, még akkor sem, ha *A* független *B*-től. Mindezek következtében a sejt epidermális sejté alakul. Ez esetben a *C* gén episztatikus *B* felett. Az ehhez hasonló jelátviteli utakon a folyamat végén lévő gén – amely a legközelebb áll a végeredményhez – határozza meg a folyamat kimenetelét vagy a fenotípust. Ezekben az esetekben a downstream irányú gén episztatikus a többi felett.

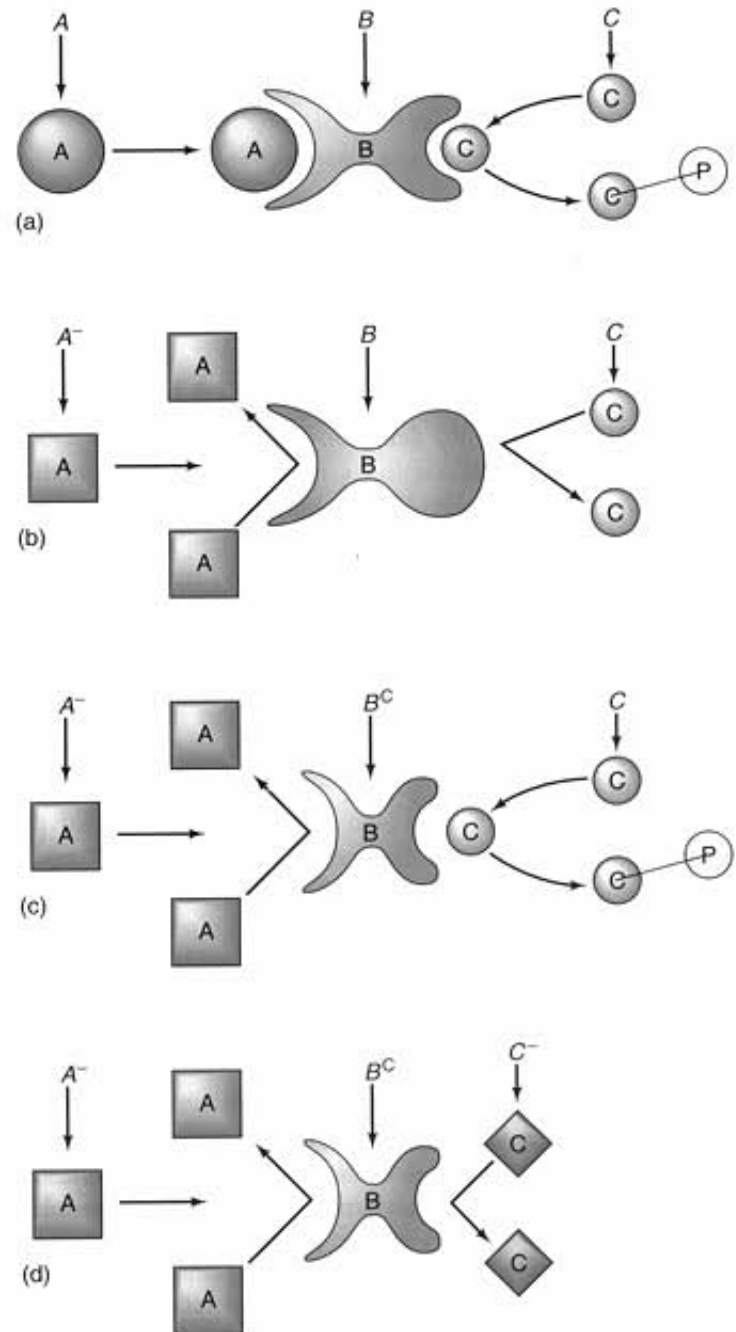
Az itt vázolt hipotetikus út genetikai kapcsolóként is értelmezhető. Ha a *C* fehérje foszforilálódik, akkor a kapcsoló az egyik irányba mozdul el, és a sejt neuronná differenciálódik. Amennyiben a *C* foszforilációja elmarad, a kapcsoló a másik útra vált, és a sejtből epidermális sejt lesz. Egy másik példa a gene-



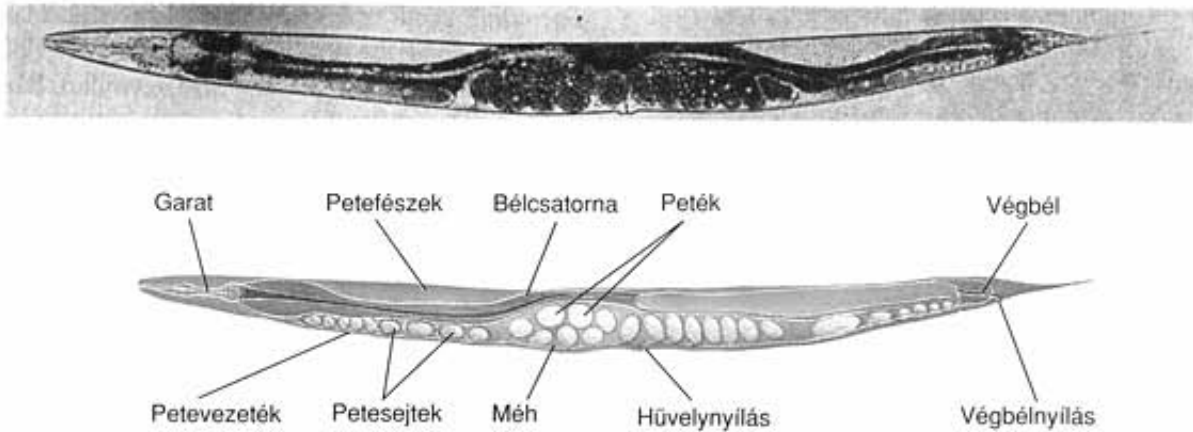
14.44. ábra. Episztázis a bíborlila pigment bioszintézisében. (a) A vad típusra jellemző reakcióút. A folyamat két lépését az A és a B gén által kódolt enzimek, A és B katalizálják. Az 1. reakcióban az A enzim egy fehér színű vegyületet piros színűvé alakít át. A 2. lépésben B enzim a piros termékből bíborlila pigmentet hoz létre, ez adja a virág színét. (b) B mutáns. B enzim működésképtelen, ezért nem alakíthatja tovább a piros színanyagot, a virág piros színű lesz. (c) Az A és B kettős mutáns. Sem az A, sem a B enzim nem működőképes, a virág színe fehér. De fehér virágszínt eredményez az is, ha az A mutáns és a B működőképes enzimet kódol, hiszen ez esetben B szubsztrátja nincs jelen. Tehát A gén episztatikus B felett

tikai kapcsoló mechanizmus működésére a *Drosophila gurken* (*grk*) és *K10* génjei. Ezek az anyai hatású gének az embrió dorzoventrális tengelyének kialakításában játszanak szerepet, hasonlóan a *bicoid* génhez, amely az anterior–posterior tengelyt hozza létre. A *gurken* aktivitása szükséges ahhoz, hogy a sejtek a háti oldal sejtjeivé fejlődjenek. A *grk*⁻ genotípusú embriókban ezek a sejtek a ventrális oldal sejtjeivé alakulnak. A *K10* mutánsokban éppen ellenkező a hatás, a sejtek dorzális sejtékké alakulnak. De mi a helyzet a *grk*/*K10* kettős mutánsokban? Ezekben a sejtek ventrális sejtékké fejlődnek, ami azt jelzi, hogy a *grk* episztatikus a *K10* felett. Így valószínű, hogy ez a két gén ugyanannak a fejlődési útnak a tagja. De melyik gén szerepel a folyamat elején (upstream)? Ha a folyamat olyan lenne, mint amit a virágszín kialakulásánál látunk, akkor az episztatikus *grk* gén állna előrébb. De a valóságban a *grk* gén a *K10* géntől downstream irányban található. A folyamat lényege a következő: A *K10* termékének hatására a *grk*-mRNS az embrió anterior–dorzális sarkához kötődik. A *grk*⁻ embriókban nincs *grk*-mRNS, ezért a *K10* terméknek nincs hatóhelye. Ezért a *K10* mutációi hatástalanok a *grk* mutánsokban.

Ha egy gén episztatikus egy másik felett, akkor ez nagy valószínűséggel azt jelenti, hogy a két gén ugyanabban a fejlődési útnak vesz részt. De annak megállapításához, hogy melyik gén van upstream irányban a másikhoz képest, független információ szükséges a folyamatról. Sok fejlődési út esetében a downstream gének episztatikusak az upstream gének felett.



14.45. ábra. Episztázis egy jelátviteli úton. (a) A vad típusra jellemző út. Az A, B és C gének három, egymással kölcsönhatásba lépő fehérjét (A, B és C) kódolnak. Az A (piros) kötődik a B receptorhoz (kék), ami kapcsolódik C-hez (zöld) és foszforilálja azt. (b) A mutációja. A mutáns allél terméke egy hibás fehérje (A, narancssárga), amely nem kötődik B-hez. Emiatt B nem foszforilálja C-t. (c) A és B mutációja. A enzim nem kötődik B-hez, de a B gén konstitutív mutáns, az általa kódolt fehérje még akkor is foszforilálja C-t, ha előzőleg nem kapcsolódott A-val. Ekkor B episztatikus A fölött, mert mutációja elfedi A mutációjának hatását. (d) Háromszoros mutáns. A hibás, így nem kapcsolódik B-hez, a konstitutív B foszforilálná a normál C-t, de a hibás C fehérjét (kékeszöld) nem. A C mutációja elfedi B mutációjának hatását, tehát C episztatikus B felett



14.46. ábra. Öntermékenyítő, himnős *Caenorhabditis elegans*. A here nem látszik az ábrán

Fotó Sulston, J. E. és Horvitz, H. R., *Developmental Biology*, 56:111. © 1977 Academic Press

DETERMINÁCIÓ A FONÁLFÉRGEK BEN

A fonálféreg közé tartozó *Caenorhabditis elegans* több okból is nagyszerű alanya a fejlődési folyamatok kutatásának. Először is, bár a kifejlett férgeknek jól körülhatárolt szervrendszereik vannak, testük mindössze 959 szomatikus sejtből áll, amelyek egyharmada idegsejt. Ez a sejtszám kb. négyzetgyöke a *Drosophila* sejtszámának (10^6), ami pedig ugyancsak négyzetgyöke egy ember sejtszámának (több billió – 10^{12}). Nyilvánvaló, hogy sokkal könnyebb nyomon követni a fejlődést ezernél kevesebb sejtben, mint sejtek billióin. Tovább egyszerűsíti a helyzetet, hogy a *C. elegans* teste áttetsző (14.46. ábra), így az ép állat sejtjei is jól láthatók. Ráadásul a *C. elegans* himnős (hermafrodita). (A görög mitológiában Hermafroditosz Hermész és Aphrodité fia volt, akinek teste egy nap fürdés közben összeolvadt egy nimfáéval.) A hermafrodita élőlények szervezetében a hím és a női ivarszervek egyaránt megtalálhatók. Megkönnyíti a genetikai kísérleteket az is, hogy a mutáns hermafrodita férgek öntermékenyíthetők, akár egy borsónövény. Mindezek ellenére a *C. elegans* sejtjeinek feltérképezése óriási feladatot jelentett, amivel több kutatócsoport is foglalkozott éveken át (a vezető szerepet Sydney Brenner csoportja játszotta). Munkájuk eredményeként ma már ismerjük az állat minden egyes sejtjének sorsát mindegyik fejlődési stádiumban. A kifejlett állat mind a 959 sejtjének fejlődését vissza tudjuk vezetni a kiindulási sejtig, a zigótáig. Több száz olyan mutációt ismerünk, amelyek a *C. elegans* egyedfejlődését érintik.

A *C. elegans* vizsgálatával foglalkozó kutatások egyik érdekes eredménye a homeotikus gének azonosítása volt. Ezek egyikeként, a *lin-12*-nek a mutációi megakadályozzák a hüvelynyílás (vulva) kifejlődését a fereg hermafrodita formájában. Robert Horvitz és munkatársai szerint a rendellenességet egy gonadális sejt hiánya okozza, amely normális körülmények között indukálja a vulva fejlődését. A *C. elegans* fejlődési sorstérképét vizsgálva látható, hogy milyen hiba történt. A Z1.ppp sejt normálisan a vulva kialakulását indukáló gonadális sejtjé fejlődik, míg

egy másik, a Z1.aaa a méh prekurzor sejtje lesz. De a *lin-12* mutánsokban mindkét sejt vagy két gonadális sejtjé vagy két méh prekurzor sejtjé fejlődik.

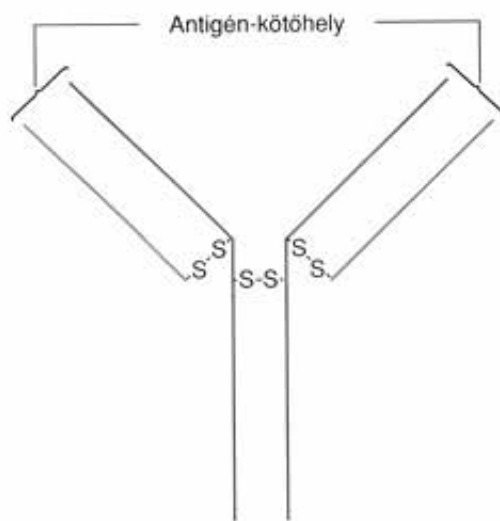
A *lin-12* gén hiperaktivitását okozó mutációk két méh prekurzor sejtet, a *lin-12* aktivitását csökkentő mutációk pedig két gonadális sejtet eredményeznek. Ez arra utal, hogy a *lin-12* gén a genetikai kapcsolók egy újabb példája. Ha a gén bekapcsolt állapotban van, akkor a sejt az egyik utat követi, míg kikapcsolt állapotban a másikat. Ennek alapján megjósolható, hogy a determináció idején a *lin-12* expressziója erőteljes a méh prekurzor sejtjében, és gyenge a gonadális sejtjében. Ezenkívül a *lin-12* olyan sejt párok fejlődését is befolyásolja, amelyek sorsa egészen más, mint a tárgyalt sejté. Így a *lin-12*, mint genetikai kapcsoló aktivitása nem egyetlen elágazási pontra korlátozódik, hanem sokkal általánosabb hatású.

Ez a rövid vázlat a *C. elegans* fejlődésgenetikájáról csak felületes képet ad. Sok olyan jelenség, amelyről a *Drosophilával* kapcsolatban már szó esett, a *C. elegansra* is vonatkoztatható, de ezeket hely hiányában nem tudjuk részletesen ismertetni.

A *C. elegans* teljes sorstérképe tisztázódott, így a kifejlett állat minden egyes szomatikus sejtjének származási vonala ismert. Fény derült olyan homeotikus gének létezésére is, mint amilyen a *lin-12* gén, amelynek hibás működése egy sejt sorsát egy másikéra változtathatja.

GÉNÁTRENDEZŐDÉS A FEJLŐDÉS SORÁN

Eddig feltételeztük, hogy egy szervezet genomja változatlan a fejlődés során, és a gének expressziója változik. Ez általában igaz, de vannak érdekes kivételek is.



14.47. ábra. Az antitest molekulája két könnyű láncból (kék) és két nehéz láncból (piros) áll. A láncokat diszulfidhidak kapcsolják össze. Az antigén-kötőhelyek a fehérjeláncok végén, a variábilis régiók területén találhatóak

AZ IMMUNOGLOBULIN GÉNEK ÁTRENDEZŐDÉSE

Az átrendeződés egyik példáját azok az emlős gének jelentik, amelyek a fertőzések elleni védekezésben szereplő **antitesteket**, más néven **immunoglobulinokat** termelik. Ahogyan azt a 7. fejezetben említettük, egy antitest 4 polipeptidláncból áll, két nehéz és két könnyű láncból (14.47. ábra). Az antigénkapcsolódási helyét jelentő, antitesttípusonként eltérő szerkezetű **változó régiók** adják a fehérjék specifikusságát. A molekulák fennmaradó része, a **konstans régió** egy antitest osztályon belül azonos, de a kisszámú antitest osztály között eltérő. Egy limfocita csak egyféle, specifikus antitestet termel. Meg kell azonban jegyezni, hogy az ember immunrendszerének sejtjei bármilyen idegen anyaggal szemben képesek ellenanyagot termelni, amellyel a szervezet találkozott. Ez azt jelenti, hogy szervezetünk különböző antitestek millióit, esetleg milliárdjait állíthatja elő.

Ez egyben azt is jelenti, hogy több millió vagy akár több milliárd különböző antitest génünk van? Ez a hipotézis tarthatatlan, hiszen elviselhetetlen terhet jelentene genomunkra az összes szükséges gén jelenléte. De akkor mi a megoldás az antitestek sokféleségének problémájára? Bármilyen valószínűtlennek tűnik is, az antitesttermelő sejtek átrendezik genomjukat, összekapcsolják antitestgénjeik különálló részeit. Az a mechanizmus, amely összeszereli a gént, véletlenszerűen válogatja ki a darabokat a részek heterogén csoportjaiból, hasonlóan egy kínai étlapról történő rendeléshez. (Válassz egy fogást az A, egy fogást pedig a B oszlopból!) Ez az elrendeződés nagymértékben növeli a gének változatoságát. Ha például az „A” oszlopban 200, a „B” oszlopban pedig 5 választási lehetőség van, akkor az A + B kombinációinak száma összesen 200×5 , vagyis 1000. Tehát 205 génrészletből 1000 gént állíthatunk össze, és ez az antitest poli-

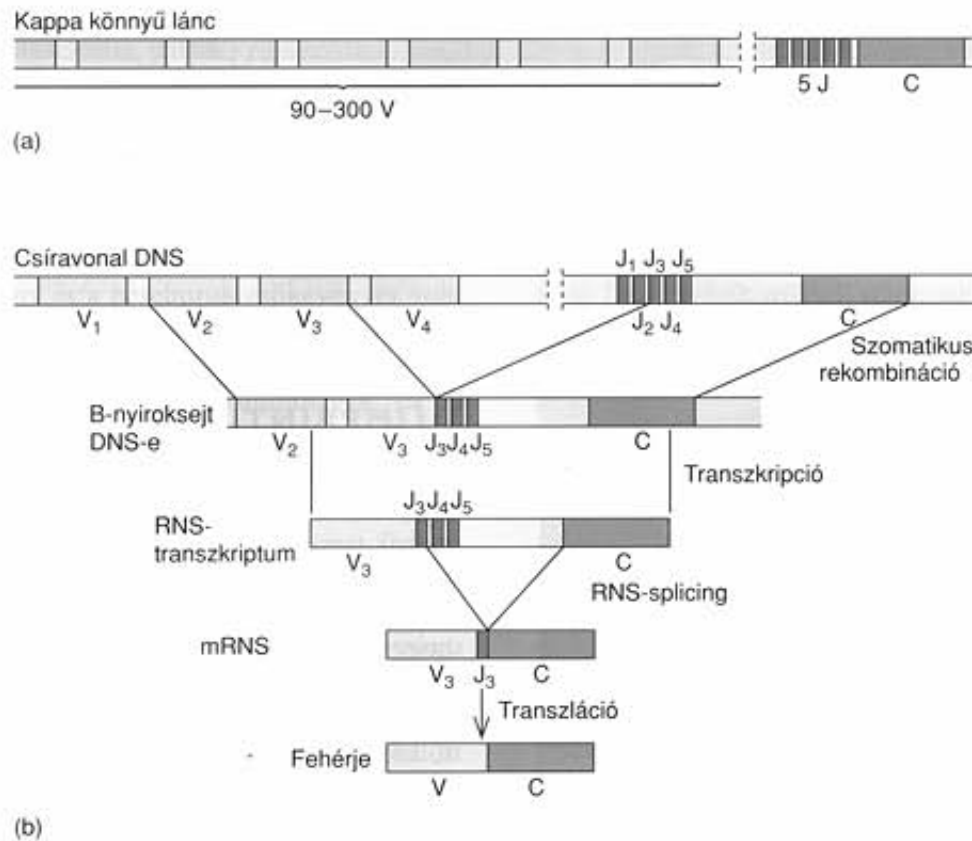
peptidjei közül csak az egyikre vonatkozik. Ha a helyzet a másik polipeptidlánc esetén is ehhez hasonló, akkor az antitestek száma összesen 1000×1000 , azaz egymillió. Bár ez a leírás alapjaiban helyes, túlzott leegyszerűsítést jelent az antitestgének esetében. Amint azt a későbbiekben látjuk majd, valamivel összetettebb mechanizmus alakítja ki a sokféleséget, így a lehetséges antitest termékek száma még nagyobb.

Az antitestgéneket legalaposabban egerekben tanulmányozták, mert az egérmyelomák nagyon alkalmasak erre a célra. A myelomát rákos B-limfociták (plazmasejtek) egy klonja hozza létre, a daganatsejtek egyféle antitestet termelnek. A myelomasejtek által termelt antitestek vizsgálatából kiderült, hogy az egérantitest könnyű láncai két családba sorolhatók: kapa (κ) és lambda (λ). A kapa-láncot kódoló gén elrendeződését a 14.48. (a) ábra szemlélteti. A „kínai menü” A oszlopa 90–300 variábilis régiót tartalmaz (V), B oszlopa pedig 5 **kapcsoló régiót** (J). A J szegmentumok a variábilis régió utolsó tizenhárom aminosavat kódolják, de messze vannak a V régió többi részétől, és közel az egyetlen konstans régióhoz (C). Ez az állapot figyelhető meg az állat embrionális sejtjeiben, az antitesttermelő sejtek differenciálódása és az átrendeződés előtt, ami összekapcsolja a két egymástól távol eső régiót. A gént-átrendeződés és az expresszió eseményeinek (14.48. (b) ábra) felderítésén számos kutatócsoport dolgozott, többek között Susumo Tonegawa, Philip Leder és Leroy Hood vezetésével.

Először egy rekombinációs esemény során az egyik V régió összekapcsolódik az egyik J régióval. Ebben az esetben a V_3 és a J_3 régiók fuzionálnak, de ugyanilyen egyszerűen kapcsolódhatott volna a V_1 és a J_4 régió is; a szelekció véletlenszerű. A gén két részének összekapcsolása után megindul a transzkripció a V_3 elejétől kezdve egészen a C végéig. Ezután a splicing során a transzkriptum J_3 része a C-hez kapcsolódik, miközben a felesleges J régiók, valamint a J és a C régiók közötti szekvenciák eltávolításra kerülnek. Hangsúlyozni kell, hogy a gént-átrendeződés a DNS szintjén, a splicing pedig az RNS szintjén történik, a 9. fejezetben már tárgyalt mechanizmussal. Az érett mRNS ezután a citoplazmába kerül, és translációja során kialakul az antitest könnyű lánc, amely egy változó szakaszból (V és J gének kódolják) és egy állandó szakaszból (C gén kódolja) áll.

Miért kezdődik a transzkripció a V_3 régió elején, és nem az előtt (upstream)? A válasz valószínűleg az, hogy egy enhancer, amely a J és C régió közötti intronban van, aktiválja a hozzá legközelebbi promotert, ebben az esetben a V_3 promotert. Ez megfelelő mód a gén átrendeződés utáni aktiválására; csak ezután kerül az enhancer elég közelre ahhoz, hogy bekapcsolja a promotert.

A nehéz lánc génjének átrendeződése még összetettebb, mert a V és a J régiók között génrészletek egész sora található. Ezek a gént-átrendeződés, amelyeket D-vel (diverzitás) jelölnek, a „kínai étlap” harmadik oszlopát jelentik. A 14.49. ábrán látható, hogy a nehéz láncok összeállítása 100–200 V régióból, megközelítőleg 20 D régióból és 4 J régióból történik. Csak ennek alapján $200 \times 20 \times 4$, vagyis 16 000 különböző nehéz lánc gén kapcsolható össze. Továbbá, a 16 000 nehéz lánc és az



14.48. ábra. Egy antitest könnyű láncát kódoló gén átrendeződése. (a) A kappa könnyű láncot 90–300 variábilis génrészlet (V; világoszöld), 5 kapcsoló régió (J; piros) és egy állandó, konstans régió (C; kék) kódolja. (b) Az antitesttermelő érése során egy DNS-szakasz kiesésével egymás mellé kerül egy V (itt a V₃) és egy J szakasz (itt a J₃). Ezután a gén átíródhat egy mRNS prekursorra, amely tartalmazza a fölösleges J szakaszokat és a köztes szekvenciákat. A J₃ és a C közötti szakasz splicing révén kikerül, és kialakul az érett mRNS, amiről a transzláció során elkészül az antitest. Az mRNS J szakasza kódolja az antitest variábilis régióját

1000 könnyű lánc kombinációja több mint tízmillió különböző antitestet eredményez.

De még ennél is több forrása van a sokféleségnek! Az első abból a tényből adódik, hogy a V, D és J szegmentumokat összekapcsoló mechanizmus pontatlan. Kihagyhat néhány bázist a kapcsolódási hely valamelyik oldalán, vagy hozzátehet olyan bázisokat, amelyek az eredeti szegmentumokban nem voltak jelen. Mindez további eltérésekhez vezet az antitestek aminosavsorrendjében.

Az antitestek változatosságának másik forrása a szomatikus mutáció, a szervezet testi sejteiben (nem ivarsejtekben) bekövetkező mutáció. Ebben az esetben a mutációk az antitest génekben történnek, valószínűleg akkor, amikor az antitesttermelő sejtek egy klónja gyorsan osztódik, hogy felvegye a küzdelmet egy behatolóval szemben. Ez még nagyobb változatossághoz és hatékonyabb immunválaszhoz vezet. Tételezzük fel, hogy a pontatlan kapcsolódásból és a szomatikus mutációkból adódó újabb változatosság kb. 100-szoros, ami a teljes diverzitást százszor tízmillióra, azaz kb. egymilliárdra növeli. Ez már biztosan elegendő különböző szerkezetű ellenanyagot jelent ahhoz, hogy bármely antigénnel létrejöjjön a kapcsolat.

Agerincesek immunrendszere különböző antitestek millióit, ha nem milliárdjait, képes előállítani, és ez biztosan elegendő gyakorlatilag minden antigénnel való reakcióhoz. Ezt a rendkívüli változatosságot az immunrendszer három alapvető mechanizmussal hozza létre: (1) az antitestek könnyű és nehéz láncának génei két vagy három komponensből állnak össze, és mindegyik komponens egy heterogén készletből kerül kiválasztásra; (2) a génrészleteket összekapcsoló mechanizmus pontatlan, bázisok kiesésével vagy hozzáadásával a gén megváltozhat; (3) a plazmasejtek klónjának gyors osztódása valószínűleg megnöveli a szomatikus mutációs rátát, ami kissé eltérő géneket eredményez.

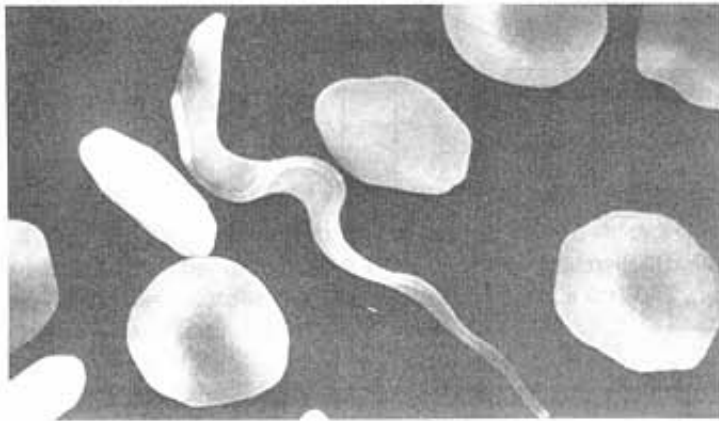
A TRYPANOSOMA BUROKFEHÉRJEGÉNEK ÁTRENDEZŐDÉSE

Általánosan érvényesek-e a fejlődésre azok a mechanizmusok, amelyek az immunrendszer kialakulásakor megfigyelhető változatosságot okozzák? Feltehetően nem. A legtöbb esetben az embrionális sejtek-



14.49. ábra. Egy antitest nehéz lánc génjének szerkezete. A nehéz láncot 100–200 variábilis szakasz (V; világoszöld), 20 diverzitási szakasz (D; lila), négy kapcsoló szakasz (J; piros) és egy állandó, konstans szakasz (C; kék) kódolja

Tonegawa, Susumu: *The Molecules of the Immune System*. 1985. © Scientific American



14.50. ábra. *Trypanosoma* a vörösvérsejtek között. A pásztázó elektronmikroszkópos felvétel nagyítása 5500-szoros. A *Trypanosoma* hullámosságát az ostor okozza, amely a sejt egyik oldalán fut végig

Forrás: Donelson, John E., Turner, Mervyn J.: *How the Trypanosome Changes Its Coat*. *Scientific American*, 45, 1985

ben egy gén ugyanolyan, mint a kifejlett szervezet szomatikus sejtjeiben. De nem csak az antitesteket kódoló gének változhatnak egy állat élete során. Egy másik jól ismert példa a sejt felszíni fehérjéket kódoló gének átrendeződése a *Trypanosoma* nevű állati egysejtűekben, az afrikai álomkór kórokozójában (14.50. ábra). Ezeknek a parazitáknak a fehérjeburka mint antigén, könnyen azonosítható, de ennek ellenére képesek kitérni az ember és más emlősök immunrendszerének védekezése elől úgy, hogy megváltoztatják burokfelhérjék természetét. A változást egy új burokfelhérjégen bekapcsolása okozza, ami azonban nem a hagyományos módon történik. A genom homológ rekombinációval periodikusan átrendeződik, és ezzel új burokfelhérjégek kerülnek a kromoszómavégeken lévő **expressziós helyekre**, ahol hatékonyan átíródhatnak. Ez a folyamat leginkább ahhoz hasonlítható, amikor a meghibásodott foglalatból kicsavarunk egy villanykörtét, és áttesszük egy működőbe.

A *Trypanosomák* képesek megváltoztatni sejt felszíni fehérjéiket, és ezzel kikerülni az emlősök immunrendszerének védekezését. Ezt úgy érik el, hogy genomjuk átrendeződik, és burokfelhérje géneik egymást követik az aktív expressziós helyen.

GENOMIKUS BEVÉSÖDÉS (IMPRINTING)

A transzmissziós mendeli genetika tárgyalásakor feltételeztük, hogy nincs jelentősége annak, hogy az utód egy allélpárjának melyik tagja anyai és melyik apai eredetű. Így homozigóta zöld magvú és homozigóta sárga magvú borsók keresztezéséből származó F_1 nemzedék egyöntetűen sárga magvú, függetlenül attól, hogy melyik szülő gamétája tartalmazta a sárga színt kialakító allélt. Ez a megállapítás sokszor helytálló, de van néhány fontos kivétel is, amelyek három kategóriába sorolhatók, közülük kettő könnyen értelmezhető. Először is, a 3. és a 4. fejezetben már említettük, hogy néhány gén ivarhoz kapcsolódik. A fehér szemű és piros szemű *Drosophilák* keresztezésének eredménye attól függ, hogy melyik szülő volt a fehér szemű. A szemszín génje ugyanis az X ivari kromoszómán található, és mivel a nőstényeknek XX, a hímeknek pedig XY ivari kromoszómáik vannak, az eredmények még illeszkednek a mendeli elvekhez. A második kategóriába tartoznak azok a bélyegek, amelyeknek a génei nem a sejtben találhatók, hanem valamelyik sejtorganelumban, a mitokondriumban vagy a kloroplasztiszokban. Egy emberi neuromuscularis betegséget, az encephalomyopathiát okozó gén a mitokondriális genomban van. Mivel az utódok mitokondriumukat a petesejt citoplazmájából kapják, ez a betegség csak anyai ágon öröklődik. Az ivarhoz kapcsolódó öröklődéshez hasonlóan ez a kivétel is könnyen értelmezhető.

A kivételek harmadik kategóriája már nem magyarázható ilyen egyszerűen. Ebben az esetben a gének nem feltétlenül kapcsolódnak az ivarhoz, és a sejtben találhatók, nem citoplazmatikus sejtalkotókban, pl. mitokondriumokban. Mégis a tulajdonságokat meghatározó génekre nem-mendeli öröklődés jellemző, mivel számít, hogy a kérdéses allél az apától vagy az anyától származik-e.

A jelenség létezésére frissen megtermékenyített egérpetesejtben figyeltek fel, abban az állapotban, amikor a petesejt és a spermium sejtjei még nem fuzionáltak. Ebben az állapotban az anyai sejt még eltávolítható és helyettesíthető egy másik apai eredetű sejtrel. Ugyanígy, az apai sejt is eltávolítható és pótolható egy másik anyai eredetű sejtrel. Bármelyik esetet vizsgáljuk, az embrióban csak az egyik szülő kromoszómái lesznek. Ennek elvileg nem kellett volna jelentős különbséget okoznia, mert az egérszülők egy olyan beltenyésztett törzsből származtak, amelynek minden

egyede genetikailag azonos (kivéve a hímek és a nőstények közötti különbséget az XY és az XX ivari kromoszómákban). De a valóságban ez óriási különbséget jelent. Az embriók mindegyike elpusztult a fejlődés során, legtöbbjük még nagyon korai stádiumban. A fejlődésben legtovább eljutott egyedek között érdekes különbség volt, attól függően, hogy anyai vagy apai géneket tartalmaztak-e. A csak anyai génekkel rendelkező embriók viszonylag kevés rendellenességet mutattak, de a méhlepény és a peteburok csökevényes volt. A csak apai géneket tartalmazó embriók kicsik és gyengén fejlettek voltak, lényegében szabályos méhlepénnyel és peteburokkal. Hogyan lehetségesek ezek a különbségek, ha az anyai és apai eredetű gének azonosak? A jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a gének bázisszekvenciája azonos, de valahogy módosultak, vagy különbözően vésődtek be a hímekben és a nőstényekben.

Bruce Cattanach fuzionált egérekromoszómákon végzett kísérletei még több bizonyítékot szolgáltatottak a genetikai bevésődés jelenségére. Például néhány egérben a 11-es kromoszóma fuzionált, és így nem tudott szétválni a mitózis során. Ez azt jelenti, hogy az ilyen egerek néhány gamétájában a 11-es kromoszómából két kópia van, míg másokban egy sem. Ezekkel az egerekkel Cattanachnak lehetősége nyílt olyan utódok létrehozására, amelyekben mindkét 11-es kromoszóma az apától, vagy mindkettő az anyától származott (az első esetben két 11-es kromoszómát hordozó spermiumot és 11-es kromoszóma nélküli petesejtet használt, a másodikban pedig a spermiumban nem volt, a petesejtben pedig két 11-es kromoszóma volt). Ha az öröklődés szigorúan mendeli, akkor nem lényeges, hogy melyik szülő adja a 11-es kromoszómát mindaddig, amíg az embrióba két kópia nem kerül. De ebben az esetben nem volt mindegy. Amikor mind a két 11-es kromoszóma az anyától származott, az utódok abnormálisan kicsik voltak, amikor pedig az apától, akkor óriásiak.

Ezek a kísérletek azt is kimutatták, hogy a bevésődés minden nemzedékben kitörölődik. Vagyis egy törpe hím egérnek, amelynek csak anyai 11-es kromoszómái vannak, általában normális méretű utódai lesznek. A hím gaméták képződése során az anyai bevésődés törlődött.

A genetikai bevésődés embernél is létezik, és következményei néha nagyon súlyosak. Ha a 15-ös kromoszómák például csak az anyától származnak, akkor Prader-Willi-szindróma alakul ki, amelyre súlyos szellemi visszamaradottság, alacsony, kövér termet, továbbá kicsi kéz és láb jellemző. Ha mindkét 15-ös kromoszóma apai eredetű, akkor Angelman-szindróma lép fel, amelynek tünetei közé tartozik a nagy száj, a feltűnően vörös orcák, a szellemi visszamaradottság, a rendellenes nevetés és a darabos mozgás.

Mi a genetikai imprinting mechanizmusa? Hogyan módosulhat a DNS reverzibilisen, hogy az imprinting eltűnik? A bizonyítékok szerint a legvalószínűbb, hogy metilációval. Kezdjük azzal, hogy a kísérletek szerint a hímekből és a nőstényekből származó gének metilációja eltérő, és reverzibilis! Sok genetikus

próbálkozott azzal, hogy idegen gént ültetett fejlődő egerekbe, és megfigyelte a kifejlődő transzgenikus hím és nőstény egerek viselkedésében a különbségeket. Ezekből a kísérletekből általában azt lehetett megállapítani, hogy az anyától örökölt transzgeneknek metiláltak, az apától örökölték viszont nem. Az egyik törzsben az apától örökölt transzgen gyengén metilált volt és aktívan működött, míg ugyanaz a transzgen, ha az anya örökölte metilált volt és inaktív. Tehát egy gén metiláltsága valóban függhet attól, hogy melyik szülőtől származik, és a metiláltság meghatározza, hogy egy gén aktív-e vagy sem.

De mi a helyzet az imprinting eltűnésével? Philip Leder és munkatársai egy transzgen metiláltsági állapotát követték nyomon transzgenikus egerekben a gametogenezis (a spermiumok és a petesejtek képződése) alatt és a fejlődő embrióban. Ezek a kísérletek kiderítették, hogy a transzgenen lévő metilcsoportok a gametogenezis korai fázisában mind a hímekben, mind pedig a nőstényekben eltűnnek. Ezután a fejlődő petesejtben, még a teljes érettség előtt létrejön az anyai metilációs mintázat. A hímeknél is történik metiláció a spermiumképződés alatt, de ez a metilációs mintázat még módosul a fejlődő embrióban. A fentiek alapján a metiláció mutatja mindazokat a jellegzetességeket, ami a bevésődési mechanizmustól várható: eltérést mutat a hím és a női ivarsejtekben; összefügg a génaktivitással; minden generáció után kitörölődik.

Származik-e valamilyen előny az imprintingből, vagy az csak egy másik oka a genetikai rendellenességeknek? David Haig úgy véli, bizonyos imprinting-mintázatok a környezeti igények miatt alakultak ki. Kedvelt példája erre az egér inzulin-szerű növekedési faktora (IGF) és annak receptora. A növekedési faktor hatására a fejlődő egér nagyobb méretű lesz, de ennek feltétele, hogy a faktor (1. típusú IGF receptor) kölcsönhatásba kerüljön receptorával. Bonyolítja a helyzetet, hogy az egerekben van egy másik receptor (2. típusú IGF receptor), amely megköti ugyan az IGF-et, de nem továbbít növekedést serkentő jelzést. Tehát az IGF gén expressziója a fejlődő egérben nagyobb utódot hoz létre, de a 2. típusú IGF receptor expressziója elszívja az IGF-et az 1. típusú receptor elől, és az utód kisebb lesz.

Haig rámutat arra az emlősök körében fennálló örökletes biológiai ellentétre is, amely egy újszülött anyjának és apjának érdekei között húzódik. Ha a szülők szempontjából a biológiai előnyt egyszerűen abban látjuk, hogy továbbadják saját genomjukat utódaikba, akkor az apa szempontjából a nagyobb, míg az anya szempontjából a kisebb termetű utód előnyös. A nagyobb termetű utód túlélése valószínűbb, ami előnyben részesíti az apai géneket. Másrészt, egy nagyobb utód legyengíti az anyát, így annak kevesebb energiája marad többi utódjára, amelyek egyrészt származhatnak más apától, másrészt fenntarthatják az anya saját génjeit is. Ez a biológiai önzés szemlélete, ami az egyik fajtája az evolúciónak. Ebből a nézőpontból figyelemre méltó, hogy az egér hím és nő ivarsejtjeinek bevésődése az anyai IGF gént elnémítja, az apai viszont aktív marad. Ugyanakkor az apai 2. típusú IGF re-

ceptor kikapcsolódik, míg az anyai aktív marad. Mindkét jelenség egybevágg azzal a feltételezéssel, hogy az apa szempontjából a nagyobb, az anyáéból a kisebb utód előnyösebb. Úgy tűnik, hogy a nemek harca molekuláris szinten is folyik, de egyikük sem győzi le a másikat, mert a két fél stratégiája semlegesíti egymást!

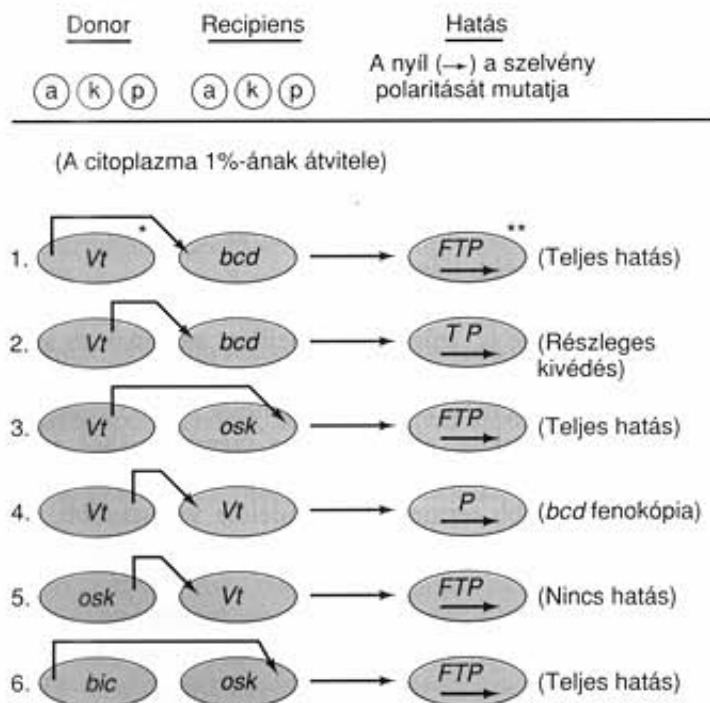
KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

A *Drosophila melanogaster* testszerveit kialakító gének közül jó néhány anyai hatású. Öt ilyen lokuszra mutáns allélok az alábbi eltéréseket okozzák a normális szegmentációtól:

- bcd* (*bicoid*), *exu* (*exuperantia*) és *swa* (*swallow*) – mindhárom mutációja a fej és a tor hiányát eredményezi.
- bic* (*bicaudal*) – az embrió mindkét végén potroh alakul ki. A két potroh ellentétes polaritású.
- osk* (*oskar*) – meggátolja a potroh kialakulását. A fej és a tor normális polaritású.

A *bcd*⁺ allél egy regulátor fehérjét kódol, amely diffúzióval gradienst hoz létre az anterior régiótól, ahova az *exu*⁺ és a *swa*⁺ gének működése az anyai *bcd*⁺ mRNS-t lokalizálják. A következő kísérletekben korai embrió citoplazmájának és sejtjeinek kb. 1%-át vitték át recipiens embrióba a donor anterior (a), középső (k) és posterior (p) részéből, a recipiens (a) vagy (p) régiójába. Az átvitel eredménye a következő volt:



* *Vt* = vad típus

** F = fej, T = tor, P = potroh

Magyarázza meg, hogy ezek a kísérleti eredmények, mit árulnak el a *Drosophila* szabályos szegmentációs mintázatának kialakulásáról!

M E G O L D Á S

A citoplazmának és sejtjeinek átvitele a donorokból a recipiensekbe a hat átültetésnél az alábbiakról tanúskodik:

1. *Vt* → *bcd*. Az elülső szegmentumokból származó anyai információ, amely a *bcd* nőstények petéiben hibás, egy citoplazmatikus, a pete anterior pólusán lokalizált komponens. Az elülső régiótól viszonylag távol is működőképes, mert a *bcd* muslicákban a potrohot torrá változtatja az embrió közepén.
2. *Vt* → *bcd*. Csak részleges védelmet jelent, ha a donor embrió citoplazmájának középső és nem az elülső részét viszik át. Ez azt jelzi, hogy az anyai információ anterior → posterior gradiens mentén oszlik el.
3. *Vt* → *osk*. A vad típusú embrió posterior pólusáról származó citoplazmával kivédhető az *osk*, ami azt jelzi, hogy a hátsó szegmentumok determinációjához anyai meghatározású, *osk*-függő aktivitás szükséges.
4. *Vt* → *Vt*. A *bcd* fenokópia azt jelzi, hogy egy citoplazmatikus faktor az embrió posterior pólusánál gátolja a *bcd* lokusz által az elülső pólusnál meghatározott aktivitást.
5. *osk* → *Vt*. A 4. kísérlet eredménye alapján nem tudjuk meghatározni a gátlás okát. Annyit állapíthatunk meg, hogy a gátlás függ az *osk* gén termékétől vagy valami mástól, amit szabályoz.
6. *bic* → *osk*. Az előző kísérletek eredményei alapján a *bic* fenotípust az *osk* aktivitásának ektopikus expressziójával magyarázhatjuk az anterior pólusnál. Ezt a hipotézist a kísérlet azon megfigyelései támasztják alá, hogy a *bic* embriók anterior pólusánál *osk*-kivédő aktivitás van.

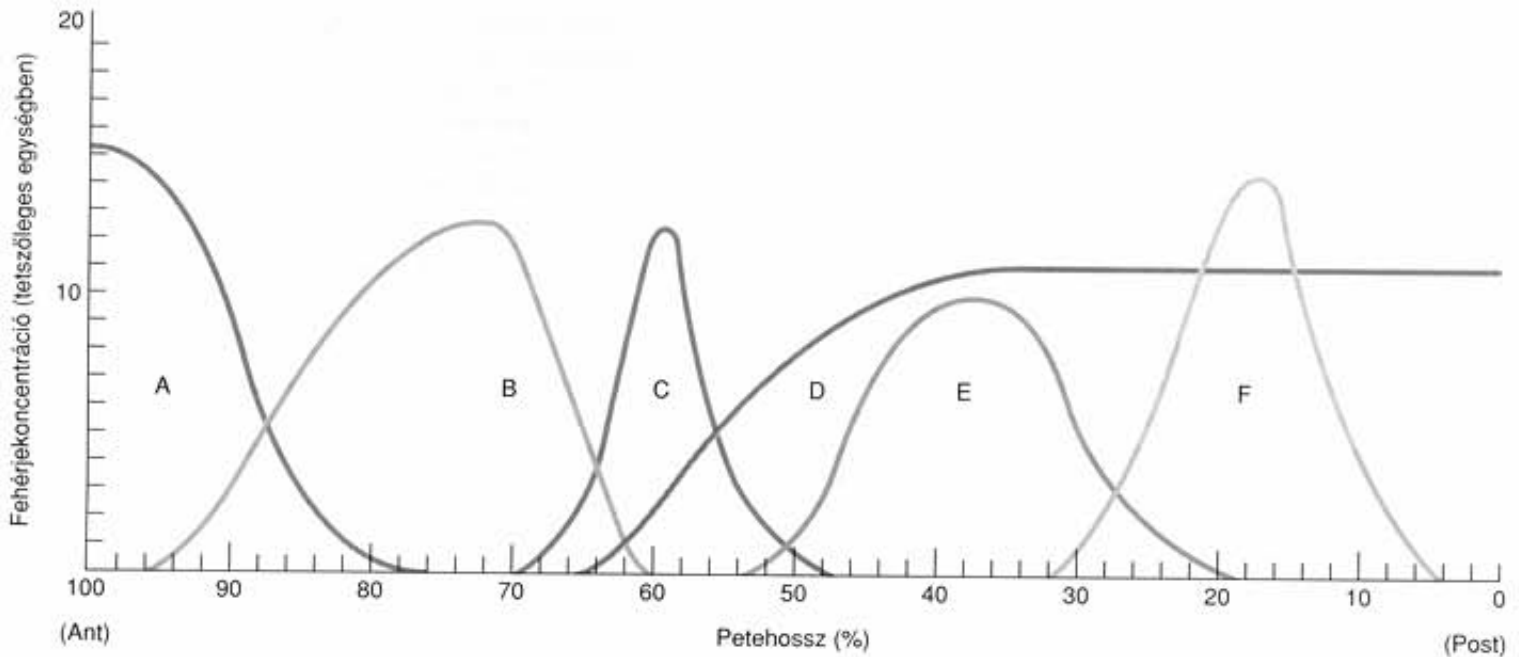
2. FELADAT

A 413. oldal tetején található ábra hat hipotetikus fehérje koncentrációját mutatja tetszés szerinti egységekben, egy hipotetikus embrióban. Az anterior pólus az ábra bal (Ant), a posterior (Post) pedig az ábra jobb oldalán található. Az információk felhasználásával válaszoljon a következő kérdésekre:

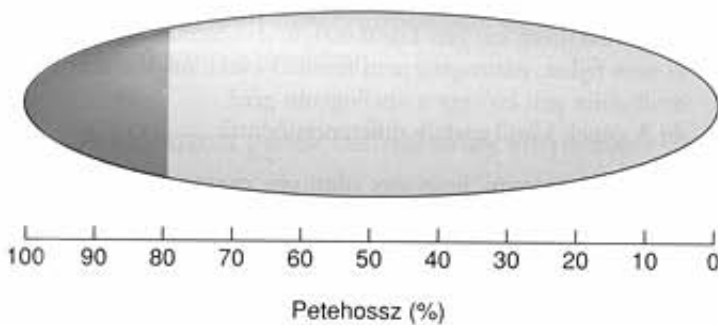
- (a) Ha az *erdberen* (*erdb*) gén az A koncentrációk 40–0,5 egységei között aktív, akkor hol jelenne meg – petehosszban kifejezve – az *erdb* fehérje?
- (b) Ha a *pickle* (*pk1*) gén az A koncentrációk 1–9 egységnyi tartományában aktív, és a 8 egységnél nagyobb B koncentrációk gátolják, akkor hol jelenhet meg (petehosszban kifejezve) a *pickle* fehérje?

M E G O L D Á S

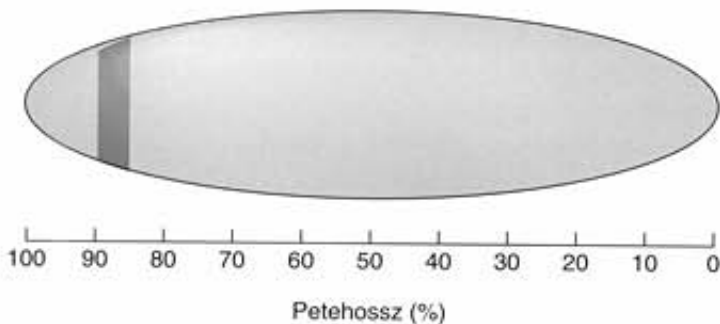
- (a) Az A koncentrációja sehol sem éri el a 40 egységet, így az *erdb* gén az embrió legszélső anterior részénél (100% petehossz) lesz aktív, ahol az A koncentrációja 15 egység.



Az A koncentrációja 80% petehossznál 0,5 egységre csökken, ezért az *erdb* gén a 100% és a 80% petehossznak megfelelő régiók között mindenütt aktív, és az *erdb* fehérje ebben a régióban egy sávot képez:



(b) Az A koncentrációja 90% petehossznál 9 egységnyire, 82%-nál pedig 1 egységnyire csökken. Így, ha csak A lenne az egyetlen közreműködő faktor, akkor a *pkl* gén a 82–90% petehossz között, sávszerű aktivitást mutatna. De 84% petehossznál a B értéke 8 egységre nő, és ez az a küszöbérték, amely felett B már gátolja a *pkl* gén aktivitását. Ezért a *pkl* fehérje a 84–90% petehossz közötti sávban jelenik meg:



ÖSSZEFOGLALÁS

A szövetszerű szerveződésű, soksejtű szervezetek az embriogenezis során egyetlen sejtől, a zigótától fejlődnek ki. Az embriogenezis folyamatában a sejtek speciális szövetszerű sejtekké differenciálódnak. A differenciáció csak kevés változást okoz egy sejt genetikai összetételében, ha egyáltalán okoz változást, amit az is alátámaszt, hogy egyes növények és állatok differenciálódott sejtjei vagy sejtmagjai totipotensek. Ehelyett egy közös génkészlet expressziós mintázata változik meg az egyik differenciálódott sejttypusról a másikra. Az egyedfejlődés során a géneket hormonok és különböző embriónális faktorok aktiválják, amelyek kölcsönhatásba lépnek a gének közelében lévő enhancer régiókkal. Differenciálódásuk előtt a sejtek determinálódnak, vagyis visszafordíthatatlanul rálepnek egy adott fejlődési útra.

A sejtek determinációja egy vagy több gén determinációjától függ. Brown-gén determinációs modelljében szövetspecifikus transzkripciós faktorok szerepelnek, amelyek kapcsolódnak egy gén szabályozó régiójához, és nukleoszómáktól mentes állapotban tartják azt. Ez lehetővé teszi az RNS-polimeráz és más effektor molekulák, például hormonok és receptoraik kötődését, a gén átírását, ezzel teljessé téve a differenciálódási folyamatot. Emlősöknél a CG szekvenciák citozinjainak metilálása általában az inaktív génekre jellemző, és a folyamat egy másik módja lehet a determináció szabályozásának, legalábbis emlősökben.

A *Drosophila* embriogenezise a zigóta sejtmagjának sorozatos osztódásával kezdődik, amit azonban nem követ az utódsejtek elkülönülése. A sejtthártyák csak a gasztruláció kezdete előtt alakulnak ki. Később az embrió barázdák jelennek meg, amely a szegmentációt jelzi. De az embrió belsejében nem a szelvények a fontos fejlődési egységek, hanem a szomszédos szelvények átfedő részei, a paraszegmentumok. A génexpresszió változása a *Drosophila* egyedfejlődése során kaszkádszerű, a gének egyik osztálya aktiválja vagy gátolja a következőt. A gének expressziójának sorrendje a kaszkádban rendszerint a következő: anyai hatású gének, *gap* gének, pair rule gének, szegmentumpolaritási gének és szelektor gének.

Az anyai hatású gének az oogenezis során működnek az anyában. A *Drosophila* embrió alapvető koordinátáit négy anyai gén alakítja ki: a *bicoid*, a *nanos*, a *torso* és a *Toll*. A *gap* gének az anyai hatású gének által kialakított gradiensekre válaszolnak, saját termékeik zónákat hoznak létre, amelyek más *gap* gének és a következő géncsoport, a pair rule gének expresszióját szabályozó transzkripciós faktorok. Ezeknek a transzkripciós faktoroknak a koncentrációja a szomszédos zónákban harang alakú eloszlást mutat, ami lehetővé teszi, hogy a pair rule gének működése csak a zónák közötti keskeny sávokra korlátozódjon.

A pair rule gének az embrionális sejteket a 14 paraszegmentumhoz rendelik. Közülük kettő, a *fushi tarazu* és az *even-skipped* gének sávokban fejeződnek ki, minden második paraszegmentumban. A szegmentumpolaritási gének az *engrailed* génnel együtt minden paraszegmentumban működnek, és mindegyik paraszegmentumot egy elülső és egy hátsó kompartmentre osztják. A szelektor gének által kódolt transzkripciós faktorok olyan génsorozatokat kapcsolnak be, amelyek közül sok szintén transzkripciós faktorokat határoz meg. A specifikus géncsoportok aktiválásának eredményeként a sejtek meghatározott fejlődési útra lépnek, például torszelvényt alakítanak ki, beleértve a lábakat is. Ahogyan egyre több és több szelektor gén kapcsolódik be, a szövet determinációja is egyre specifikusabbá válik. Egyes fő szabályozó gének meghatározott szervek fejlődését irányítják, az *eyeless* gén például a szemét. A szelektor gének bekapcsolódásuk után végig aktívak maradnak, egy fejlődési úton tartják, ezzel determinálják a sejteket.

Egyes géntermékek jelátviteli úton aktiválják más sejtek génjeit. A jelátviteli utak egyik visszatérő eleme a fehérjék foszforilálása. A *sevenless* úton például az R8 fotoreceptor felszínén lévő *boss* fehérje kötődik az R7 felszínén található *sevenless* fehérjéhez, és aktiválja azt. Ez a jel egy foszforilációs reakciósorozatot indít el, amelynek eredményeként az R7 fejlődéséhez szükséges gének aktiválódnak.

Amikor egy gén episztatikus egy másik génnel szemben, akkor ez nagy valószínűséggel arra utal, hogy a két gén ugyanannak a fejlődési útnak a tagja. Ahhoz azonban, hogy meghatározzuk, melyik gén áll a másikhoz képest a fejlődési folyamat elején, független információra van szükségünk az út sajátosságaira vonatkozóan. Számos fejlődési vonalon a jelátviteli út végén álló gének episztatikusak a sorozat elején állók felett.

A gerincesek immunrendszere milliárdnyi, ha nem milliárdnyi különböző antitestet termelhet, amelyek így lényegében bármilyen antigénnel kapcsolódhatnak. Ezt a hatalmas diverzitást az immunrendszer három alapvető mechanizmussal alakítja ki: (1) az antitestek könnyű és nehéz láncainak génjeit két vagy három alkotóelemből állítja össze, mindegyik részt egy-egy heterogén készletből kiválasztva; (2) a génrészeket összekapcsoló mechanizmus pontatlan, bázisok kiesésével vagy beépülésével jár, ami a gént megváltoztatja; (3) a B-nyiroksejtek egy-egy klónjának osztódásakor magas a szomatikus mutációs ráta, ami kissé eltérő géneket eredményez.

- A következő példákban a csirke ovalbumin génje determinálódott, differenciálódott, vagy pedig mindkettőn átesett-e? (a) A fiatal állat petevezetékének sejtei ösztrogén hatására képesek ovalbumint termelni, de ösztrogén még nem képződik az állatban. (b) A csirke ivaréretté vált és ösztrogént, valamint ovalbumint kezd termelni.
- Miért bizonyítja az egypetéjű ötös ikrék létezése, hogy az emberi embrionális sejtek totipotensek maradnak legalább három sejtosztódáson keresztül?
- Az 5S rRNS-génnel végzett kísérletek eredményei alapján mi várható a génaktivitás és DNáz-túlérzékenység terén, ha a csirke β^A génjét először hisztonokkal, majd pedig tizennégy napos embriókból készült kivonattal keverik össze?
- A 14.13. ábrán vázolt kísérlet a fényérzékeny rubisco gén szabályozó régiójának elhelyezkedését vizsgálta. Hogyan egyszerűsítene le nagymértékben ezt a kísérletet egy klónozott gén?
- Miért volt fontos a 14.13. ábrán vázolt kísérletben, hogy a mutáns rubisco gént új fajba, dohányba juttassák, semmint visszahelyezzék egy borsónövénybe?
- Ha a *Xenopus* klónozott 5S rRNS-génjét H2A, H2B, H3 és H4 hisztonokkal keverjük, majd végül transzkripciós faktorokkal, aktív lesz-e a gén, vagy sem? Miért?
- Miért fontos egy korai stádiumú embrió számára, hogy elegendő 5S rRNS álljon rendelkezésére?
- (a) A következő két gén közül melyik determinált egy, még ki nem fejlett, ösztrogént nem termelő csirke májában: az ovalbumin gén és/vagy a vitellogenin gén? (b) A gének közül melyik differenciálódott?
- Szeretné kimutatni, hogy egy adott gén expressziójának szabályozása a transzkripció szintjén történik-e. Miért nem elegendő ehhez a citoplazma mRNS-szintjének elemzése a génműködés kezdete előtt és után?
- Hogyan vizsgálná egy mRNS stabilitását?
- Egy fehérje mRNS-ében az AUG lánckezdő kodont húsz egyéb kodon követi, majd ezután található az első glutamin kodon. Ennek ellenére a glutamin az első aminosav az mRNS érett termékében. Mivel magyarázható a jelenség?
- Hogyan árulják el a homeotikus gének és más homeobox gének mutációi, hogy ezek a lokuszok fontosak az egyedfejlődésben?

A megoldások a könyv végén találhatóak.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Milyen értelemben tekinthető a gerincesek hemoglobingénje „luxus”-génnek a vörösvérsejtek, és miért nem az a szervezet szempontjából?

15.

F E J E Z E T

Génklónozás és génmanipuláció

Tanulási program

- 1 Klónozott gének előállítása szinte korlátlan mennyiségben baktériumokban vagy magasabb rendű szervezetekben.
- 2 A klónozott gének termékeinek kinyerése.
- 3 A klónozott gének próbaként való alkalmazása a gének szerkezetének és működésének természetes környezetben való vizsgálatára.
- 4 A klónozott gének bázissorrendjének meghatározása.

*A sötétkamrában álltunk,
néztük a gélben szabályosan elrendeződött,
narancsszínnel fluoreszkáló molekulákat, és
tudtuk, hogy láncreakciószerűen gyorsul fel
a biológia és az orvostudomány fejlődése.*

Herb Boyer
amerikai genetikus

Képzelse el, hogy 1972-t írunk, és Ön genetikus! Molekuláris szinten szeretné elemezni az eukarióta gének működését. Különösen érdeklődik az ember β -globin génjeinek molekuláris felépítése és működése iránt: Milyen lehet a bázissorrendjük és a promoterük? Hogyan lép ezekkel a génekkel kölcsönhatásba az RNS-polimeráz? Milyen változások történnek bennük, amelyek olyan betegségekhez vezetnek, mint például a talasszémia, amelynek súlyos formájában a hemoglobin egyik polipeptidlánca egyáltalán nem termelődik?

Ezekre a kérdésekre nem tud válaszolni, hacsak nem tudja eleget, mondjuk milligrammnyi mennyiségben tisztán kinyerni a vizsgálandó gént. Ez a milligramm nem tűnik soknak, de tekintélyes mennyiség, ha a teljes emberi genomból kell kivonni! Egy globin gén DNS-e ugyanis kisebb az emberi genom 1 milliomod részénél! Ez pedig azt jelenti, hogy több kilogramm emberi DNS-ből kellene kiindulni, ami nagyon lehangoló kilátás. S ha még össze is tudna szedni valahogyan ennyi anyagot, nem tudná elválasztani a kívánt gént a többi DNS-től. Röviden, elakadna a munkában.

A génklónozás elegáns megoldást kínál a felvetett problémákra. Az eukarióta géneket kisméretű bakteriális vagy fág-DNS-hez kapcsolják, majd a rekombináns molekulákat megfelelő gazdasejtekbe juttatják, amelyek nagy mennyiségben állítják elő a kívánt géneket. Ebben a fejezetben áttekintjük, hogyan klónozzhatunk géneket baktériumokban és eukariótákban. Megismerjük azokat az alapvető technikákat, amelyekkel a molekuláris genetikusok vizsgálják a klónozott géneket.

GÉNKLÓNOZÁS

Bármilyen klónozási eljárás célja, hogy egy ún. **klónt**, azaz tökéletesen egyforma szervezetek csoportját állítsa elő. A 14. fejezetben láttuk, hogy néhány növény egyszerűen, dugványozással klónozzható (görög: *klon* = gally), míg más növényfajokat klónozzhatunk az egyed elkülönített sejtjeiből is. Még a gerincesek is klónozzhatók: John Gurdon békaklont állított elő azzal, hogy a sejtmagjuktól megfosztott petékbe ugyanabból a békaembrióból származó sejtmagokat ültetett (14. fejezet). Azóta már emlősöket is klónoztak, lényegében hasonló módszerekkel. Az egy-egy ikrek is klónok.

A génklónozási kísérletekben rendszerint baktériumsejtbe viszik be az idegen gént, majd a módosított baktériumok szaporításával klónt állítanak elő. A klónozott sejtek mindegyike tartalmazza a bevitt idegen gént, és amíg biztosított a gén replikációja, a gazdasejt klónozásával klónozzuk a gént is. Az első klónozási kísérletet Stanley Cohen, Herbert Boyer és munkatársaik végezték 1973-ban.

A RESTRIKCIÓS ENDONUKLEÁZOK SZEREPE

Cohen és Boyer kísérletét a felbecsülhetetlen jelentőségű enzimek, a **restriktív endonukleázok** tették lehetővé. Stewart Linn és

Werner Arber fedezték fel ezeket az enzimeket *E. coli*-ban az 1960-as évek végén. Nevüket arról kapták, hogy megakadályozzák az idegen DNS, például a baktériumot fertőző vírus DNS-ének invázióját, a molekula feldarabolásával (*restrict* = korlátozni). Az endonukleáz megjelölés pedig arra utal, hogy az idegen DNS-t a molekula belsejében levő helyeken hasítják el, és nem a végén kezdik lebontani (görög: *endo* = belső). Linn és Arber azt remélték, hogy ezek az enzimek a DNS-t speciális pontokon hasítják, és így, mint egy igen finoman élezett „molekuláris késsel” fel tudják darabolni a DNS-t. Az általuk felfedezett enzimek azonban nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket.

De a *Haemophilus influenzae* R_4 törzsében Hamilton Smith felfedezett egy specifikusan hasító enzimet, a *Hind*II-t. Minden restriktív enzim nevének első három betűje annak a mikroorganizmusnak a latin nevéből származik, amelyik előállítja. Az első betű a genus nevének első betűje, a következő kettő pedig a fajnév első két betűje. (Így adja a *Haemophilus influenzae* a „*Hin*” elnevezést.) Ezen kívül a törzs jelzése is fontos, a fenti esetben az R_4 -ből a „d” szerepel a névben. Végül, a római számok a mikroorganizmus által szintetizált különböző restriktív enzimek számára utalnak (I, II, III stb.).

A *Hind*II a következő szekvenciát ismeri fel:



és a nyíllal jelzett helyen, a purin (Pu) és a pirimidin (Py) között hasít. A pirimidin lehet T vagy C, a purin pedig A vagy G. Ott, ahol ez a szekvencia előfordul, és *csak* ott, hasít a *Hind*II. A molekuláris biológusok nagy öröme a *Hind*II csak egy a több száz restriktív enzim közül, amelyek mindegyikének jellemző specifikus hasítási helye van. A 15.1. táblázat néhány gyakran alkalmazott restriktív enzim felismerési szekvenciáját és hasítási helyét tartalmazza. Meg kell jegyezni, hogy a hatbázisnyi szakaszokat felismerő enzimek mellett vannak négybázisnyi szekvenciákat felismerők is. Ez utóbbiak hasítási helyeinek száma várhatóan jóval nagyobb. Hiszen egy adott, négy tagból álló bázissorrend valószínűleg egyszer előfordul minden $4^4 = 256$ bázisnyi szekvenciában, míg egy hat bázisból álló csoport várhatóan csak $4^6 = 4096$ bázisnyiban. Néhány restriktív enzim, mint például a *Not*I, nyolc bázispárból álló szekvenciát ismer fel, ezért sokkal ritkábban, átlagosan minden $4^8 \approx 65\,000$ bázisnyi szekvenciában hasít egyszer. Éppen ezért az ilyen enzimeket ritkán hasító enzimeknek is nevezik. A valóságban a *Not*I még ritkábban hasítja az emlős-DNS-t, mint ahogyan az várható, mert felismerő helyében két kópiában szerepel a viszonylag ritka CG dinukleotid (11. fejezet). A *Sma*I és a *Xma*I felismerési szekvenciája megegyezik, de hasítási helyük eltérő. Az ilyen, azonos szekvenciákat felismerő enzimek, az **izoskizomerek** (görög: *iso* = azonos, *schizo* = hasít).

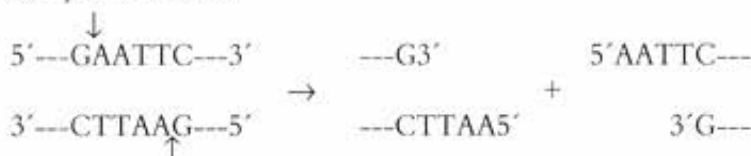
A restriktív endonukleázok legfőbb előnye, hogy reprodukálhatóan, mindig ugyanott vágják el a DNS-t. Ezen a tulajdonságon alapul sok, a gének szerkezetét és működését vizsgáló módszer. Az előző fejezetekben már láttunk erre néhány példát,

15.1. táblázat. Néhány restriktív endonukleáz felismerési szekvenciája és hasítóhelye*

Enzim	Restriktív hely
<i>AluI</i>	A G↓C T
<i>BamHI</i>	G↓G A T C C
<i>EglII</i>	A↓G A T C T
<i>Clal</i>	A T↓C G A T
<i>EcoRI</i>	G↓A A T T C
<i>HaeIII</i>	G G↓C C
<i>HindII</i>	G T Py↓Pu A C
<i>HindIII</i>	A↓A G C T T
<i>HpaII</i>	C↓C G G
<i>KpnI</i>	G G T A C↓C
<i>MboI</i>	↓G A T C
<i>PstI</i>	C T G C A↓G
<i>PvuI</i>	C G A T↓C G
<i>SalI</i>	G↓T C G A C
<i>SmaI</i>	C C C↓G G G
<i>XmaI</i>	C↓C C G G G
<i>NorI</i>	G C↓G G C C G C

* Csak az egyik DNS-szálat tüntettük fel, balról jobbra, 5' → 3' irányban haladva, de valójában a restriktív enzimek kétfonális DNS-t hasítanak. A hasítási helyeket a nyilak jelzik.

és ebben a részben még többet látunk majd. De nem ez az egyetlen előnyük a restriktív endonukleázoknak. Sokuk nem pontosan szemben vágja el a DNS két szálát, hanem kissé eltolódva, tehát egyfonalas túlnyúló szálakat, ún. **ragadós végeket** képez, amelyek könnyen összekapcsolódhatnak egymással (15.1. táblázat). Vizsgáljuk meg például az *EcoRI* által képzett végek komplementaritását:



Figyeljük meg, hogy az *EcoRI* 4 bázisból álló túlnyúló végeket képez a fragmentumok 5' végén. A *PstI* a 3' végnél hasítja el felismerési szekvenciáját, ezért a 3' túlnyúló vég lesz egyfonalas. A *SmaI* felismerő régiójának közepén, szemben hasítja a szálakat, ezért nem ragadós, hanem ún. **tompa végeket** képez.

A restriktív enzimek azért alakíthatnak ki túlnyúló végeket, mert az általuk felismert szekvenciák rendszerint szimmetrikusak, azaz visszafelé olvasva is azonosak. Tehát az *EcoRI* a felső szálon a G és az A között hasít (bal oldalon), és az alsó szálon is a G és az A között (jobb oldalon), a nyilakkal jelölt helyeken.

Az ilyen szimmetrikus szekvenciákat **palindromoknak** is nevezik. A nyelvészetben a palindroma tükrömondatot jelent, azaz olyan mondatot, ami oda-vissza olvasva is ugyanazt jelenti, például: Géza kék az ég. A DNS-palindromok szintén megegyeznek oda-vissza olvasva, de az azonos (5' → 3') irányt mindkét esetben figyelembe kell venni: a felső szálat balról jobbra, az alsó szálat jobbról balra kell olvasni.

Cohen és Boyer a ragadós végek keletkezését használták ki klónozási kísérletükben (15.1. ábra). Két különböző eredetű DNS-t ugyanazzal az enzimmel, az *EcoRI*-gyel hasítottak. Mindkét DNS plazmid-DNS volt: az egyik a tetraciklinrezisztencia gént hordozó pSC101 plazmid, a másik pedig a sztreptomycin- és a szulfonamidrezisztencia géneket tartalmazó RSF1010 plazmid. Mindkét plazmidon csak egyetlen *EcoRI* **restriktív hasítóhely** volt, ezért az enzim a gyűrűs DNS-molekulákat lineárisá alakította, és mindkettőn ugyanolyan ragadós végek képződtek. A komplementer ragadós végek a megfelelő bázisok között kialakuló hidrogénhidakkal lazán összekapcsolódnak, majd a DNS-ligáz kovalens kötéssel köti össze a két DNS-t.

Az eredmény egy **rekombináns DNS**, két, előzetesen különálló DNS-darab összekapcsolódásával. Az új rekombináns plazmid kimutatása egyszerű volt, hiszen baktériumsejtbe juttatva mind a pSC101 sajátosságát, a tetraciklinrezisztenciát, mind pedig az RSF1010 tulajdonságait, a sztreptomycin- és szulfonamidrezisztenciát is mutatta. Láttunk már példákat eddig is rekombináns DNS-re, de ez minőségileg más, mert nem természetes úton, egy sejtben alakult ki, hanem kémcsőben rakták össze a kutatók.

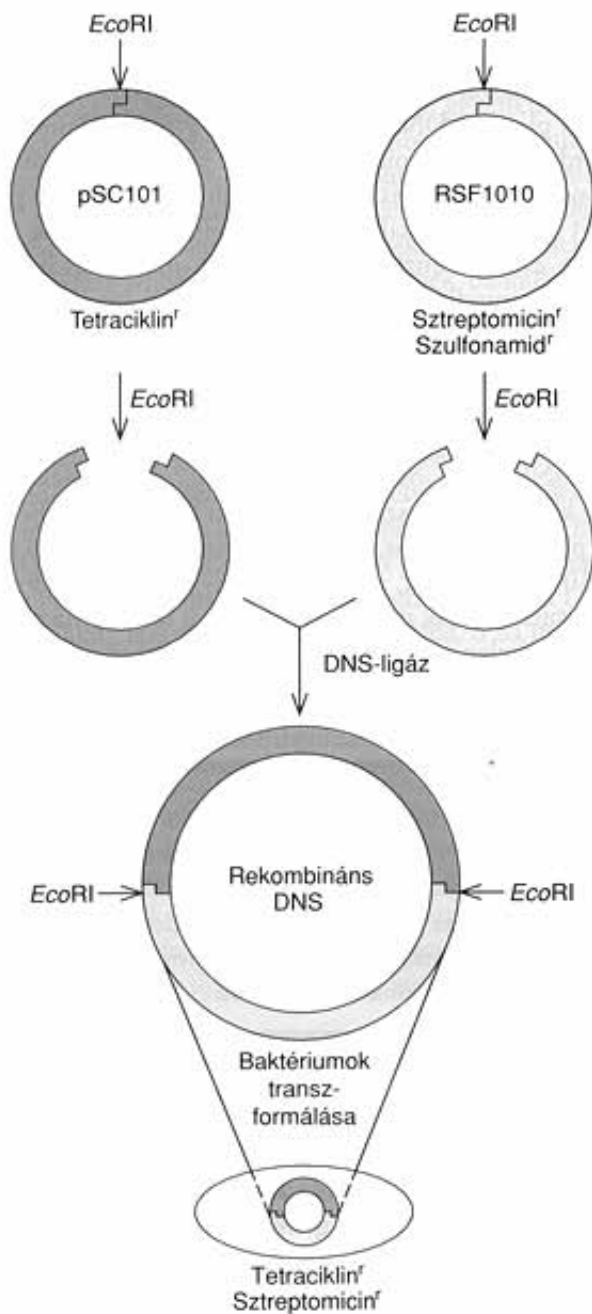
A restriktív endonukleázok meghatározott szekvenciákat ismernek fel a DNS-molekulákban, és mindkét szálát elvágják. A folyamat a DNS specifikus feldarabolását teszi lehetővé. A hasítás a két szálon gyakran lépcsőzetes, és így ragadós végek keletkeznek, ami megkönnyíti két DNS *in vitro* összekapcsolását rekombináns DNS-sé.

VEKTOROK

Cohen és Boyer kísérletében mindkét plazmid képes volt az *E. coli*-ban replikálódni. Ezért mindkettő lehet rekombináns DNS-ek hordozója. Minden génklónozási kísérletben szükséges egy ilyen hordozó ún. **vektor**. A legtöbb eljárásban csak egy vektor szerepel és egy idegen DNS-darab, aminek replikációja a vektortól függ. Az 1970-es évek közepe óta számos vektort fejlesztettek ki. Két nagy csoportjukat különböztetjük meg: a plazmid és a fág vektorokat.

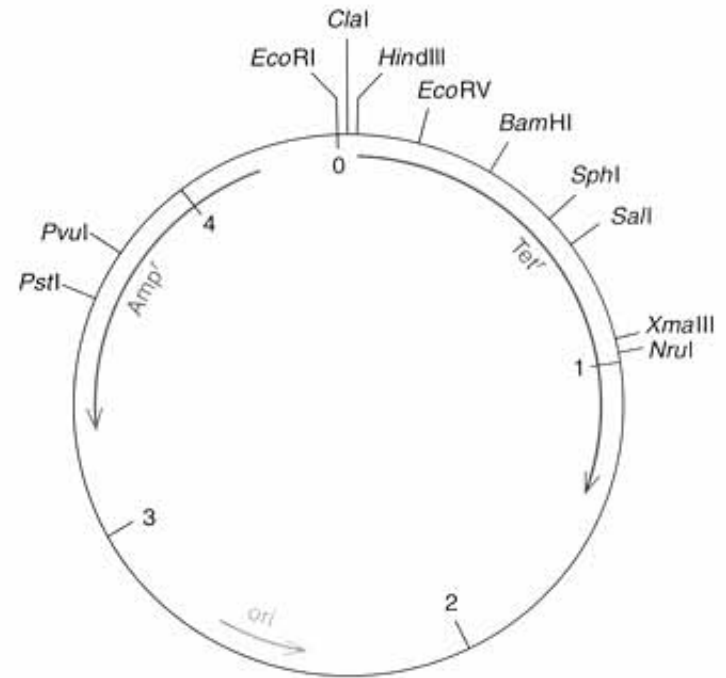
A plazmid vektorok

A klónozási eljárások hőskorában Boyer és munkatársai egy sor nagyon népszerű vektort fejlesztettek ki, az ún. pBR plazmid családot. Ezeket ma már ritkán használják, és csak azért ismertetjük őket, mivel könnyen érthető példájukat adják a klónozási módszereknek. Az egyik ilyen plazmid, a **pBR322** (15.2. ábra) két antibiotikumrezisztencia gént hordoz, az ampicillinét és a tetraciklinét. E között a két gén között található a replikációs origó. A plazmidot úgy tervezték meg, hogy a gyakran használt restriktív enzimeknek – többek között az *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII* és *SalI* – csak egy-egy hasítási helyük legyen rajta. Ez azért előnyös, mert mindegyik enzim használható idegen DNS beépítésére anélkül, hogy közben a plazmid egy része elveszne.



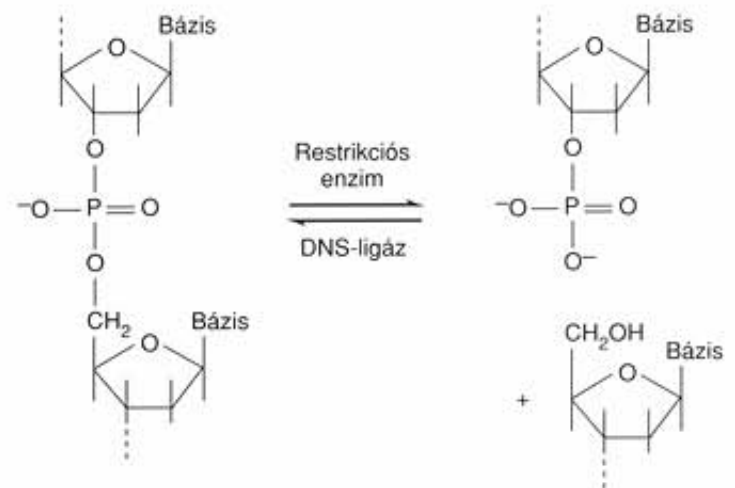
15.1. ábra. Az első génklónozási kísérlet, amelyben *in vitro* összeállított rekombináns DNS szerepelt. Boyer és Cohen két plazmidot, a pSC101-et és az RSF1010-et, ugyanazzal a restrikciós endonukleázzal, az *EcoRI*-gyel hasították. Az így kapott két lineáris DNS-en ugyanolyan ragadós végek keletkeztek, és ezeket *in vitro* kapcsolták össze DNS-ligázzal. A rekombináns DNS-sel *E. coli*-sejteket transzformáltak, és a klónokat megvizsgálták, melyik rezisztens tetraciklinre és sztreptomycinre is. Ezek a klónok hordozták a rekombináns plazmidot

Nézzük például, egy idegen DNS-darab klónozását a pBR322 plazmid *PstI* helyére (15.3. ábra)! Először fel kell hasítanunk a vektort a *PstI* enzimmel, és kialakítani az enzimre jellemző ragadós végét. Példánkban az idegen DNS-t is ezzel az enzimmal daraboljuk, így a fragmentumokon is *PstI* ragadós vég képződik. A következő lépésben összekeverjük a felnyitott vektort és az idegen DNS-t, majd a keveréket DNS-ligázzal inkubáljuk. Amint az idegen DNS és a vektor ragadós végei között kialakulnak a laza hidrogénköté-

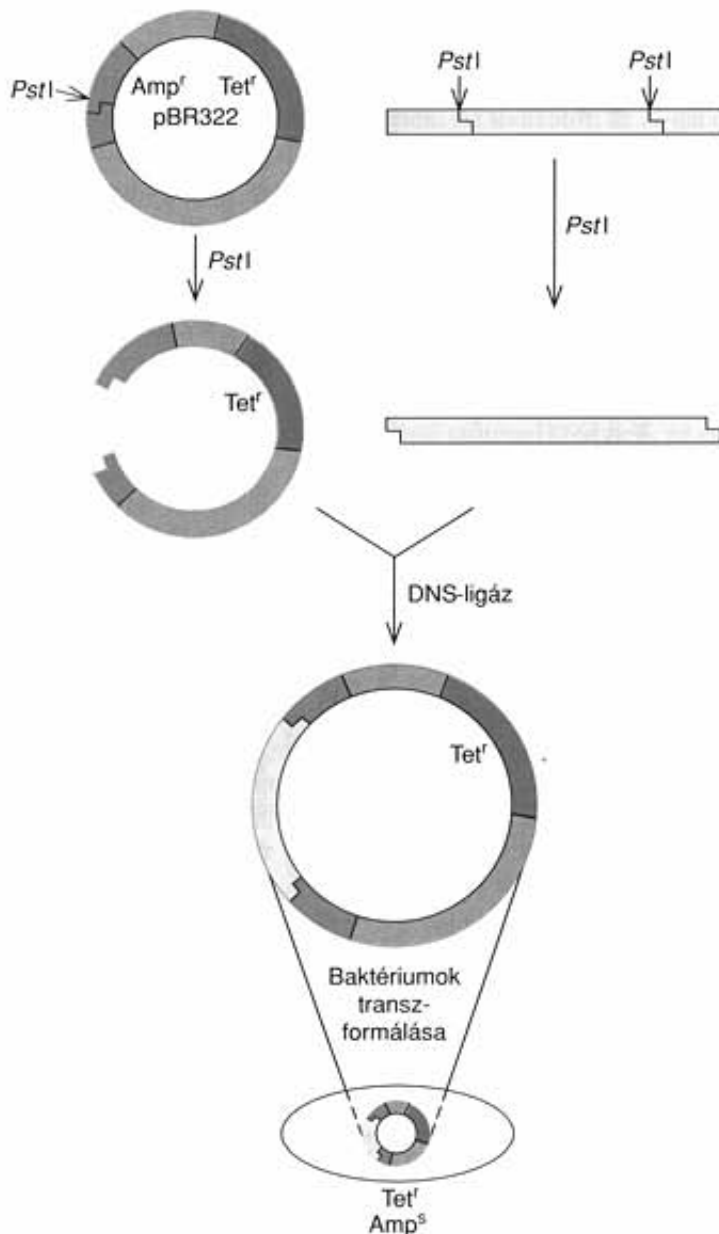


15.2. ábra. A pBR322 plazmid a tizenegy különböző restrikciós hasítási hellyel, amelyek idegen DNS beépítésére használhatók. Az ábrán szerepel az ampicillin-(Amp^r) és a tetraciklinrezisztencia gén (Tet^r) helyzete, valamint a replikációs origó (ori). A számok az *EcoRI* hasítási helyétől kilobázispárban (kb) mért távolságot jelentik

sek, a ligáz befoltozza a rést (nick), azaz kovalensen összekapcsolja a két DNS-t. Ezután nem válhatnak el egymástól, hacsak *PstI* enzimmel nem emésztyük újra. Ismét felhívjuk a figyelmet, hogy a „nick” egy elhasított foszfodiészter-kötés, amit a restrikciós enzimek, köztük a *PstI* elvágnak, míg a DNS-ligáz újra kialakítja a kötést:



A következő lépésben transzformáljuk az *E. coli*-t a DNS-keverékkel úgy, hogy a sejteket jégen tömény kalcium-sóoldattal kezeljük, aminek hatására membránjuk átteresztőképessége megnő, majd ezeket a permeábilis, „kompetens” sejteket keverjük a DNS-sel. Nagyon jó lenne, ha a hasított DNS-ek mindegyike kapcsolódna a plazmid-DNS-sel, és rekombináns DNS képződne, de ez sohasem következik be. Ehelyett a rekombináns molekulák keverednek az újra kapcsolódott plazmidokkal és az újra kapcsolódott



15.3. ábra. Idegen DNS klónozása a pBR322 plazmid *Pst*I helyének felhasználásával. Mind a plazmidot, mind pedig a beépítendő DNS-t (sárga) *Pst*I-gyel emésztik, majd ragadós végeiket DNS-ligázzal kapcsolják össze. A rekombináns DNS-sel baktériumokat transzformálnak és kiválogatják a tetraciklinre rezisztens, de ampicillinre érzékeny sejteket. A rekombináns plazmid már nem rezisztens ampicillinre, mert a beépített DNS megszakítja a rezisztenciáért felelős gént (kék)

beépítendő molekulákkal. Hogyan válogathatjuk ki a rekombináns molekulákat? Ebben a folyamatban játszanak szerepet a vektor antibiotikumrezisztencia génjei. Először a sejteket tetraciklin jelenlétében növesztjük, így szelektálunk azokra a sejtekre, amelyek a vektort, illetve a beépített, ún. inszerciós DNS-t vagy inszertet tartalmazó vektort vették fel. Azok a sejtek, amelyekbe csak az inszert került, illetve egyáltalán nem vettek fel DNS-t, nem rezisztensek a tetraciklinre, ezért nem növekednek.

A következő lépésben meg kell találnunk azt a klónt, amely a rekombináns DNS-t vette fel. Vagyis azokat a sejteket keressük, amelyek tetraciklinre rezisztensek és ampicillinre érzékenyek. A 15.3. ábrán látható, hogy a *Pst*I restrikciós helye, aho-



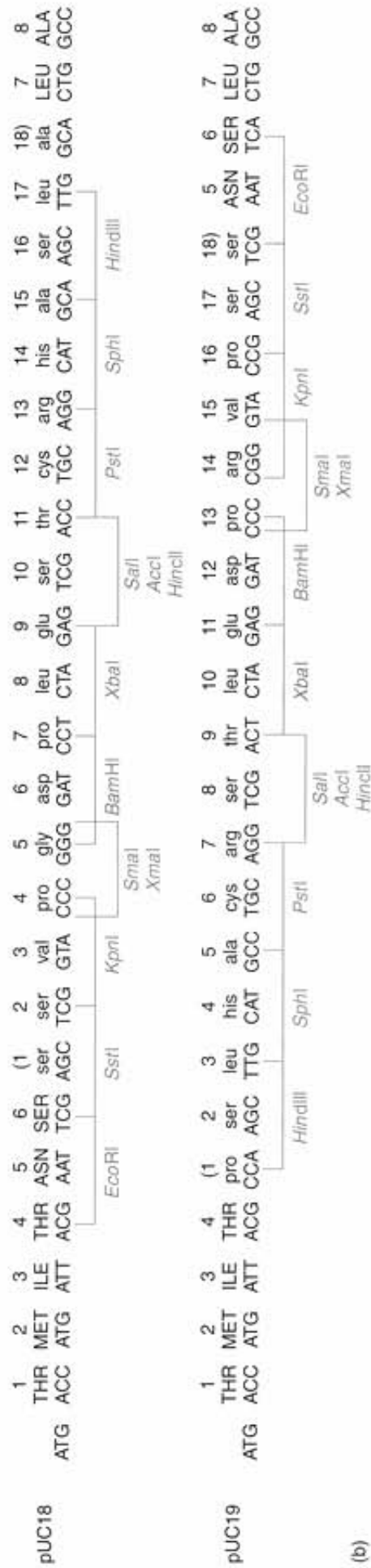
15.4. ábra. A pBR322 plazmid ampicillinrezisztencia génjébe épült inszerciós DNS szűrése. A telepekről a 13. fejezetben leírt módon replikát készítünk, vagy az eredeti lemeznek megfelelő pontokra átoltjuk a sejteket. A kiindulási táptalaj tetraciklint tartalmaz, ezért minden pBR322-vel rendelkező sejt növekedik rajta. A replika táptalajban ampicillin van, így az ampicillinrezisztencia génjünkben inszerciós DNS-t hordozó pBR322 plazmiddal bíró sejtek nem fejlődnek rajta (ezeket a kolóniákat üres körök jelzik). A megfelelő telepek az eredeti lemezről olthatók le

vá az idegen DNS beépül, az ampicillinrezisztencia génben van. Ezért az idegen DNS beépülése inaktíválja ezt a gént, a gazdasajt ampicillinérzékeny lesz.

Hogyan végezhetjük el a szűrést (screen)? Egyik lehetőség, ha az eredeti tetraciklines lemez klónjairól másolatot készítünk egy ampicillines táptalajra. Ezt a 15.4. ábrán bemutatott módon, bársonnyal bevont replikatuskóval végezhetjük el. A replika-(másolat) készítő eszközt finoman a tetraciklines lemez felszínéhez érintjük, hogy az azon növekvő minden telepből sejtek ragadjanak rá. Ezután megérintjük vele egy friss ampicillines táptalaj felszínét. Így arra is rákerülnek sejtek a klónokból, mégpedig az eredeti lemezzel egyező pozícióban. A tetraciklines lemezen kiválasztjuk azokat a telepeket, amelyek *nem* növekszenek az ampicillines táptalajon. Ezután az egyik „legkifinomultabb” kutatóeszközzel – egy steril fogpiszkálóval – ezekből a pozitív klónokból friss táptalajra oltjuk a sejteket, ahol növeszthetjük őket, illetve felhasználhatjuk további vizsgálatokhoz. Meg kell jegyezni, hogy ezt az eljárást nem nevezzük szelekciónak, hiszen nem távolítjuk el automatikusan a számunkra szükségtelen klónokat. Ez a módszer, a szűrés (screen) sokkal munkáigényesebb, hiszen egyenként vizsgálunk meg minden egyes klónt (13. fejezet).

Ma már sok klónozó plazmid vektor közül válogathatunk a pBR plazmidok mellett. Az egyik jól használható, bár kissé idejét múlt csoport a pUC sorozat (15.5. ábra). Ezek is a pBR322-ből származnak, kialakításuk során a DNS mintegy 40%-át, beleértve a tetraciklinrezisztencia gént is, eltávolították. Ezenkívül a pUC vektorok klónozóhelyei egy kis szakaszra koncentrálnak, az ún. **sokszoros klónozóhelyre** (multiple cloning site – MCS). A pUC vektorok tartalmazzák a pBR322 ampicillinrezisztencia génjét, ami lehetővé teszi a vektorral transzformált baktériumokra történő szelekciót. A másik antibiotikumrezisztencia gén hiányát kompenzálják olyan genetikai elemek, amelyek segítségével a rekombináns DNS-t hordozó klónok könnyen kiszűrhetők.

A 15.5.(b) ábrán a pUC18 és pUC19 sokszoros klónozóhelyei láthatók. Figyeljük meg, hogy az MCS a β -galaktozidáz enzim N-terminális részét kódoló génben van (*lacZ'*-vel jelölve). A pUC vektorokhoz használt gazdasajt tartalmazza a β -galaktozidáz C-terminálisát kódoló DNS-t. Önmagukban a két géndarab termékei, a β -galaktozidáz részei nem aktívak, de intracisztronos komplementációval kiegészítik egymást (13. fejezet). Vagyis a két részleges géntermék együttesen aktív enzimet képez. Tehát, ha a pUC18 önmagában transzformál egy olyan baktériumsejtet,



(b)

15.5. ábra A pUC plazmidokban megtartották a pBR322 ampicillinrezisztencia gént és a replikációs origót. Ezenkívül egy ún. sokszoros klónozóhelyet (MCS) tartalmaznak a β -galaktozidáz N-terminális végét kódoló génbe (*lacZ'*) építve. (a) A pUC18 és a pUC19 sokszoros klónozóhelyei. A pUC18-ban az MCS 13 restrikciós helyet tartalmaz, amelyet a *lacZ'* gén hatodik kodonja után építettek be. A pUC19-ben az MCS a negyedik kodon után következik és fordított helyzetű. Amellett, hogy restrikciós helyeket tartalmaz, a sokszoros klónozóhely megtartja a *lacZ'* gén leolvasási keretét, így azok a plazmidok, amelyek nem tartalmaznak inszertet, működőképes formában hordozzák a gént. Ezért az ilyen plazmidot tartalmazó baktériumtelepek kék színűek lesznek, ha a táptalajukban megtalálható a β -galaktozidáz mesterséges szubsztátja, az X-gal. Az X-gal-t a termelőző enzim hidrolizálja, és két színű termék képződik. Az inszertet hordozó vektorokkal rendelkező baktériumok telepei fehérek maradnak.

amely hordozza a részleges β -galaktozidáz gént, akkor aktív β -galaktozidáz keletkezik. Ha az ilyen sejtek klónjait a β -galaktozidáz indikátorát tartalmazó táptalajra szélesztik, a pUC plazmidot tartalmazó sejtek telepei színesek lesznek. Az indikátor, az X-gal egy szintelen, mesterséges galaktozid, amit a β -galaktozidáz galaktózra, valamint a baktériumtelepet kékre színező indigófestékre bont.

Másrészt, ha a plazmid részleges β -galaktozidáz génjét az MCS-be beépített inszerttel megszakítjuk, a gén általában inaktívulódik, és a továbbiakban nem képződhet olyan termék, amely komplementálja a gazdasejt β -galaktozidáz fragmentumát, ezért az X-gal szintelen marad. Így egyszerűen kiválaszthatók az inszertet is tartalmazó fehér telepek a kék színűek között. Figyeljük meg, hogy a pBR322-vel történő szűréssel szemben, ez egy lépéses eljárás. Egyszerre keressük azokat a telepeket, amelyek (1) növekszenek ampicillin és (2) fehérek X-gal jelenlétében. A sokszoros klónozóhelyet körültekintően úgy tervezték meg, hogy megmaradjon a β -galaktozidáz leolvasási kerete. Ezért, bár 18 kodon (zárójelben, alattuk a megfelelő aminosavak betűjele) megszakítja, mégis működőképes fehérje keletkezik. További nagyobb DNS-darabok beépülése, főként azok, amelyek eltolják a leolvasási keretet, általában működésképtelenné teszik a gént.

A sokszoros klónozóhely biztosítja, hogy a vektor két különböző enzimmel is hasítható legyen (pl. *EcoRI* és *BamHI*), ami lehetővé teszi olyan DNS-darab beépítését, aminek egyik végét *EcoRI*-gyel, a másikat pedig *BamHI*-gyel hasították el. Ez a folyamat az **irányított klónozás**, mert az idegen DNS csak egyféle orientációban épülhet be a vektorba. (Az inszert *EcoRI* és *BamHI* végei kapcsolódhatnak a vektoron levő megfelelőikkel.) Egy inszert beépülésének iránya fontos lehet, amivel a későbbiekben még foglalkozunk. Az irányított klónozás másik előnye, hogy megakadályozza a vektor egyszerű visszazáródását, hiszen két különböző restrikciós helye nem kompatibilis.

A pUC18 sokszoros klónozóhelye pontosan a fordítottja a pUC19-ének, mivel restrikciós helyei ellentétes sorrendűek. Ez azt jelenti, hogy a kívánt fragmentum bármelyik orientációban klónozható, egyszerűen át kell váltani az egyik pUC plazmidról a másikra. Ma már vannak ezeknél egyszerűbben kezelhető vektorok is, némelyikre a későbbiekben még visszatérünk.

A klónozó plazmid vektorok első két generációját a pBR322 és a pUC plazmidok jelentették. Az elsőben két antibiotikumrezisztencia gén és egy sor egyedi restrikciós hely van, ahová az idegen DNS bejuttatható. A legtöbb ilyen hely megszakít egy antibiotikumrezisztencia gént, ami a szelekcióra is lehetőséget biztosít. Még könnyebb a szelekció a pUC plazmidok esetében, amelyek egy ampicillinrezisztencia gént és egy ún. sokszoros klónozóhelyet tartalmaznak. Az utóbbi megszakítja a β -galaktozidáz N-terminális végét kódoló gént. Azokra az ampicillinrezisztens klónokra szelektálunk, amelyek nem képesek aktív β -galaktozidáz termelésére, így nem alakítják át az X-gal indikátort kék színű terméké. A sokszoros klónozóhely lehetővé teszi az irányított klónozást is két restrikciós hely felhasználásával.

A fág vektorok

Már tárgyaltuk, hogy a fágok természetes vektorok lehetnek a bakteriális DNS transzdukciója során (13. fejezet). Ezek után már természetesnek tűnik, hogy úgy alakították át a fágokat, hogy a folyamat bármilyen DNS-sel kivitelezhető lehessen.

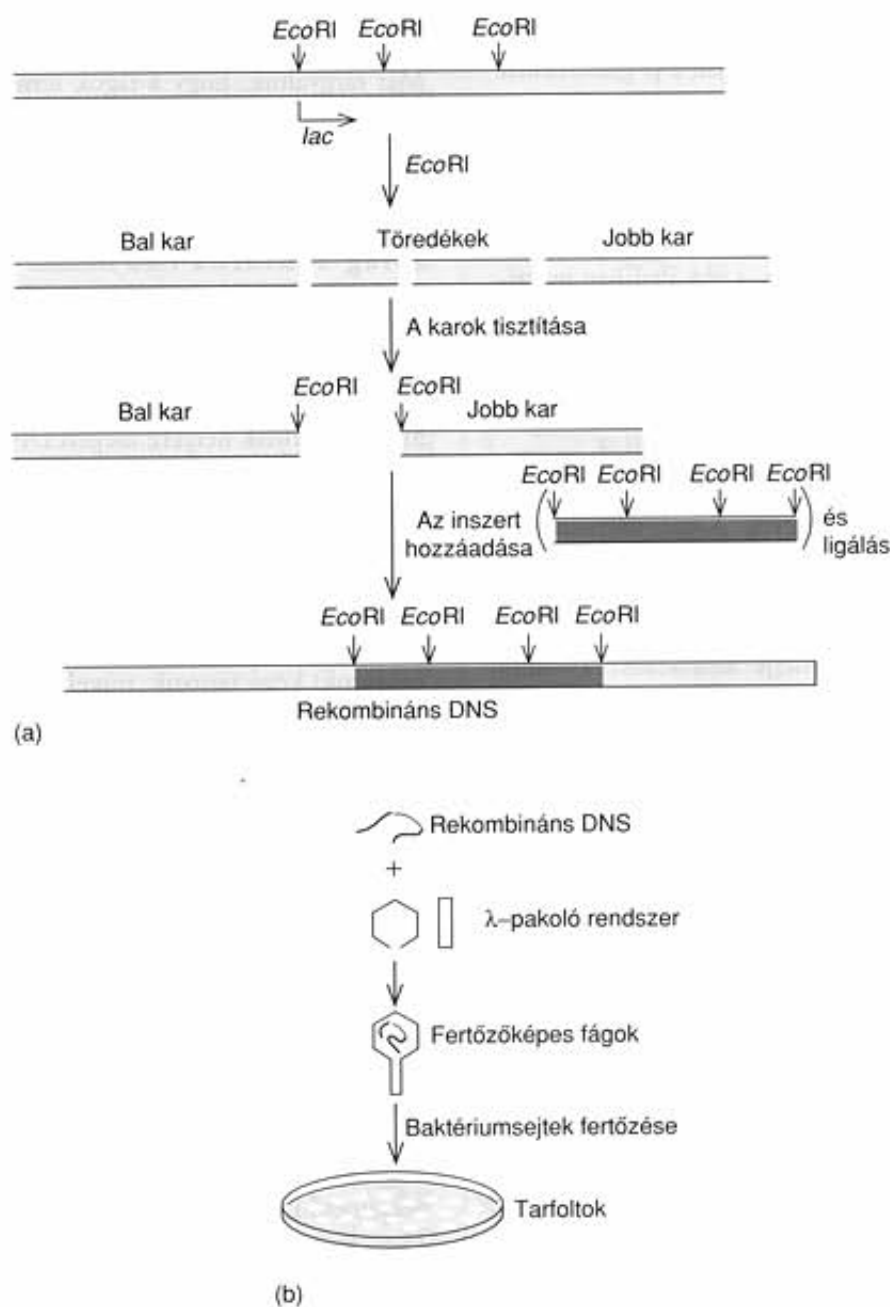
λ -fág vektorok Fred Blattner és munkatársai szerkesztették az első λ -fág vektort a jól ismert fág módosításával. A fág DNS-éből kivágták a lizogéniához szükséges fehérjéket kódoló, középső részt, és megtartották a litikus fertőzéshez szükséges géneket. A módosított fágok nem képesek lizogén fertőzésre, de hiányzó géneik helyére idegen DNS-t lehet beépíteni. Blattner ezeket a vektorokat **Charon-fágoknak** nevezte el a mitológiai Kharón, a Styx folyó révésze után. (Mint ahogy Kharón vitte át a halottak lelkét a túlvilágra, úgy szállítják a Charon-fágok az idegen DNS-t a baktériumsejtekbe. A fág nevét általában „saron”-nak ejtik.) A λ -vektoroknak ez a típusa, mint például a Charon 4 vektor (lásd később) a **helyettesítéses vektorok** (replacement vektorok) közé tartozik, mivel az idegen DNS saját, eltávolított DNS-ük helyére épül be.

A plazmidokkal szemben a λ -vektorok óriási előnye, hogy sokkal több idegen DNS-t képesek befogadni – a Charon 4 például, mintegy 20 kilobázisnyit. A határt a fágfej mérete szabja meg. Mikor szükséges ilyen nagy kapacitás? A Charon-fágokat leggyakrabban **génkönyvtárak** készítésekor alkalmazzák. Tegyük fel, hogy a teljes humán genomot szeretnénk klónozni, ami nyilvánvalóan igen sok klónból fog összeállni. Minél nagyobb az egy klónba beépített DNS, annál kevesebb klón szükséges. Amikor elkészítették az emberi genom és még sok más élőlény génkönyvtárát, jórészt λ helyettesítéses vektorokat használtak.

Nagy befogadóképességük mellett egyes vektoroknak van még egy előnyös tulajdonságuk, nevezetesen az, hogy esetükben a beépíthető DNS-nek alsó mérethatára is van. Ennek magyarázata a 15.6. ábrán látható. Az inszert beépítésekor a Charon 4 vektort *EcoRI*-gyel emésztjük. Az enzim három helyen hasít a fág-DNS középső részének közelében, így két „kar” és két kisebb töredék keletkezik. A következő lépésben ultracentrifugálással elválasztják egymástól a karokat és a töredékeket, az utóbbiakra már nincs szükség a továbbiakban. Végül a karokat összekapcsolják a beépítendő DNS-sel, amelyek tehát a kivágott töredékek helyére kerültek.

Első pillantásra úgy tűnik, hogy a két kar egyszerűen, az idegen DNS beépülése nélkül összekapcsolódhat. Ez valóban megtörténhet, de nem vezet klónképződéshez, mivel a két kar túlságosan kevés DNS-t tartalmaz ahhoz, hogy becsomagolódjon a fágfejbe. A pakolást *in vitro* végzik, a ligált karokat és az inszerteket egyszerűen elegyítik azokkal a komponensekkel, amelyek szükségesek a fágészecske kialakulásához. Klónozó kitekben megvásárolhatók a tisztított karok, valamint a csomagoláshoz szükséges kivonat. Az *in vitro* pakoló elegyek szigorúan meghatározzák az inszert méretét: a karokat leszámítva a teljes klónozásra kerülő DNS legalább 12, legfeljebb 20 kilobázis lehet.

Mivel biztosak lehetünk abban, hogy génkönyvtárunkban minden klón legalább 12 kb-nyi, tudjuk, hogy nem vesztegetünk el helyet a nem megfelelő méretű klónokkal. Ez fontos



15.6. ábra. Klónozás Charon 4 vektorral. (a) A rekombináns DNS kialakítása. A vektort (sárga) *EcoRI*-gyel emésztik, hogy eltávolítsák belőle a köztes, kicserélhető szakaszokat, az ép karok megtartása mellett. A következő lépésben a részlegesen emésztett, beépítendő DNS-t (piros) a karokhoz kapcsolják. (b) Csomagolás és a rekombináns DNS klónozása. Az (a) folyamatban kialakított rekombináns DNS-t összekeverik az *in vitro* pakoló kivonattal, ami tartalmazza a λ -fág feji és farki részeinek alkotóelemeit, valamint azokat a faktorokat, amelyek szükségesek ahhoz, hogy a rekombináns DNS működőképes fág részecskékké kerüljön. Végül az így előállított fág részecskéket *E. coli*-pázsitra szélesztik, és a képződő plakkokat összegyűjtik

szempont, mert még a 12–20 kb-nyi klónméretek mellett is mintegy félmillió klónra van szükség ahhoz, hogy minden emberi gén legalább egy példányban biztosan szerepeljen a könyvtárban. Sokkal bonyolultabb lenne az emberi génykönyvtárt pBR322 vagy pUC vektorokkal készíteni, hiszen a baktériumok szelektíven veszik fel és reprodukálják a kisméretű plazmidokat. Ezért a klónok többsége csak néhány ezer vagy néhány száz bázispárnyi inszertet hordozna. Egy ilyen könyvtárnak klónok millióiból kellene állnia, hogy teljes legyen.

Az *EcoRI* átlagosan 4 kb-nyi fragmentumokra darabolja fel a DNS-t, és mivel a vektor 12 kb-nál kisebb inszertet nem vesz

fel, ezért az *EcoRI*-gyel nem szabad teljesen emésztetni a DNS-t. Továbbá, az *EcoRI*, illetve sok más restriktív enzim legtöbbször hasít az eukarióta gének belsejében is – egy vagy akár több ponton –, ezért a teljes emésztés után a legtöbb gén csak fragmentumokban lenne. Mindezek a problémák elkerülhetők, ha csak részleges emésztés történik az *EcoRI*-gyel. Ha minden negyedik-ötödik felismerő helynél teszik lehetővé a hasítást, a keletkező fragmentumok átlagos mérete 16–20 kb körül mozog, ami éppen akkora, amekkorát a vektor befogad. Emellett elég nagy ahhoz, hogy magában foglaljon egy teljes eukarióta gént, intronjaival együtt.

Kozmidok A vektorok másik, kifejezetten a nagyobb DNS-fragmentumok klónozására kifejlesztett csoportját a kozmidok (cosmidok) alkotják, amelyeknek a plazmidokra, illetve a fágokra jellemző tulajdonságaik is vannak. Tartalmazzák a λ -fág cos-helyeit vagy kohezív végeit, amelyek lehetővé teszik a fág fejébe való becsomagolódást. Emellett megtalálható bennük egy plazmid replikációs origója, ezért a baktériumokban plazmidként replikálódhatnak.

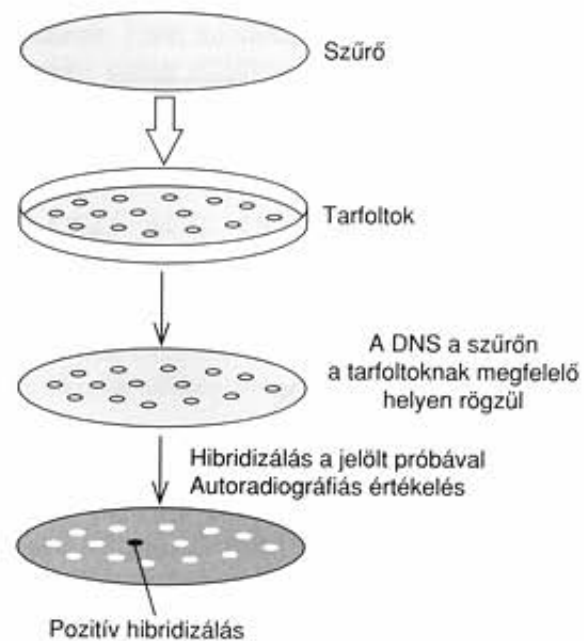
Mivel a kozmidok kialakítása során a λ -cos-helyek kivételével a fág genomja csaknem teljesen eltávolításra kerül, nagyon nagy inszert számára van hely (40–50 kb). Amikor ezek az inszertek a helyükre kerültek, a rekombináns kozmidok becsomagolódnak a fág részecskébe. Ezek a részecskék azonban nem képesek fágként replikálni, hiszen alig tartalmaznak fág-DNS-t. Ugyanakkor fertőzőképesek, így hatékonyan juttatják be a rekombináns DNS-t a baktériumsejtekbe. A sejt belsejében viszont a plazmidokhoz hasonlóan sokszorozódnak.

Egy génykönyvtár nagyon jól használható, ha sikerült elkészíteni, hiszen tetszés szerint bármelyik gén megkereshető benne. A baj csak az, hogy ebben a könyvtárban nincs katalógus, ezért ún. próbákra van szükség annak kiderítésére, hogy melyik klónban van a keresett gén. Az ideális próba olyan jelölt nukleinsav lenne, amelynek bázissorrendje komplementere a keresett géneknek. Ebben az esetben alkalmazható az ún. **plakkhibridizációs eljárás**, amikor a könyvtár fágjainak ezreiből származó DNS-t hibridizáltatnak radioaktívan jelölt próbával. Az lesz a keresett klón, amelyik hibridizálódik a jelölt DNS-sel.

Néhány fejezettel korábban már foglalkoztunk a hibridizálással, és a későbbiekben még visszatérünk rá. A plakkhibridizálás menetét a 15.7. ábra vázolja. Petri-csészékben lévő tenyészeteken plakkok ezreit növesztik (az egyszerűség kedvéért csak néhány szerepel a rajzon). Majd DNS megkötésére képes anyagból, például **nitrocellulózból** készült szűrőt érintenek a tenyészet felszínéhez. Ekkor minden plakkból tapad fág-DNS a szűrőre. Ezután lúggal denaturálják a DNS-t, majd radioaktívan jelölt próbával hibridizáltatják. Ha a próba találkozik a keresett komplementer DNS-sel, akkor kapcsolódik hozzá, és így megjelöli azt a DNS-foltot. A radioaktív folt röntgenfilmmel kimutatható. A feketedés helye a filmen megmutatja, hol keressék az eredeti Petri-csészében a kívánt gént tartalmazó plakkot. A gyakorlatban az eredeti tenyészet sokszor olyan sűrű, hogy képtelenség csak a kívánt plakkot elkülöníteni. Ezért több szomszédos plakkot kiemelnek, majd nagyobb hígítással, kisebb fágkoncentrációval újraszélesztik és hibridizáltatják a pozitív klón pontos kikereséséhez.

M13 fág vektorok Egy másik gyakran használt klónozó vektor a fonalas M13 fág. Joachim Messing és munkatársai ugyanazt a β -galaktozidáz génszakaszt és sokszoros klónozóhelyet építették be a fág DNS-ébe, mint amilyen a pUC vektorokra is jellemző. Valójában, először az M13 vektort szerkesztették meg, és csak ezután vitték át a jól használható klónozóhelyeket a pUC plazmidokba.

Mi az M13 vektorok előnye? A legfontosabb, hogy ennek a fágnek a genomja egyszálú DNS, ezért a benne klónozott fragmentumok is kinyerhetők egyfonalas formában.

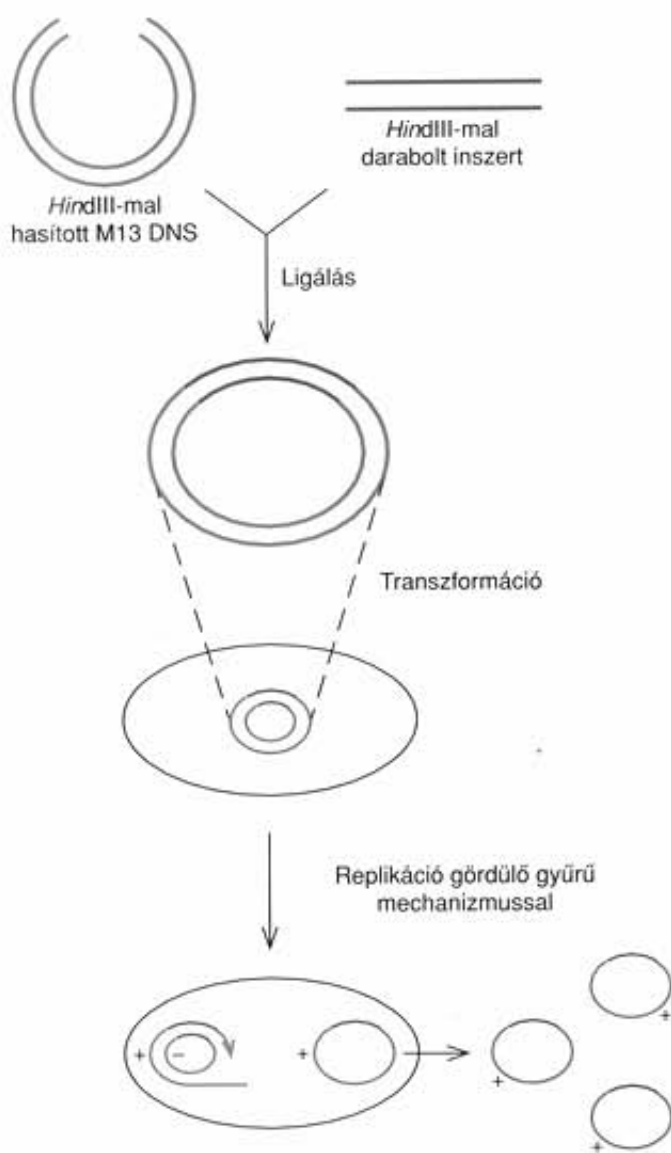


15.7. ábra. A pozitív genomikus klónok kiválogatása plakkhibridizálással. Nitrocellulózt vagy hasonló szűrőt érintenek a Charon 4 tarfoltokat tartalmazó lemez felszínéhez (kialakulásuk menete a 15.6. ábrán). A tarfoltok természetes úton kiszabadult fág-DNS-e rátapad a szűrőre. A következő lépésben lúggal denaturálják a DNS-t, majd a szűrőn hibridizáltatják a vizsgált gén radioaktív próbájával. Ezután a szűrőt röntgenfilmre helyezve előtűnnek a jelölt területek. Az ábrán a szűrő középső részének közelében lévő egyik tarfolt DNS-e hibridizált, amit sötét folt jelez a filmen

A későbbiekben látjuk majd, hogy az egyfonalas DNS felhasználható az ún. helyspecifikus mutagenézisben, amivel speciális, előre megtervezett változásokat hajthatunk végre egy génben. Emellett megkönnyíti a DNS szekvenciájának meghatározását is.

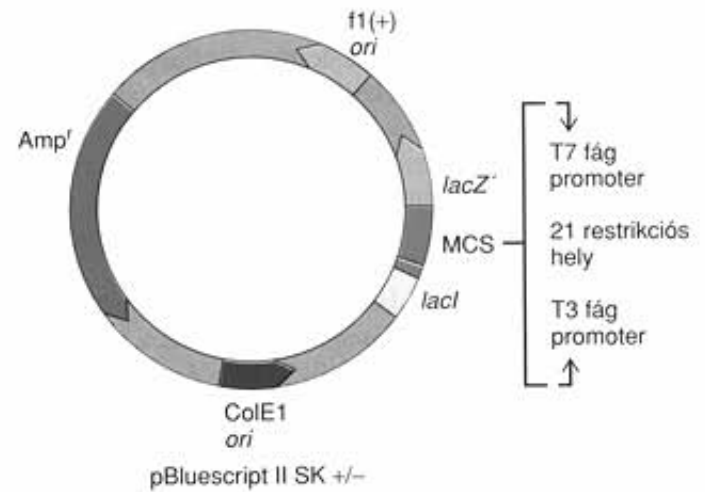
A 15.8. ábrán látható, hogyan klónozható kétszálú DNS-darab az M13-ban, és miként nyerhető ki az egyszálú termék. A DNS magában a fág részecskében egyszálú, de miután megfertőz egy *E. coli*-sejtet, átalakul kétszálú, ún. replikatív formává (RF). A fág-DNS-nek ez a replikatív formája használható a klónozáshoz. Egy vagy két restriktív enzimmel hasítják a fág sokszoros klónozóhelyét, majd beillesztik a komplementer végű idegen DNS-t. A rekombináns DNS-sel transzformálják a gazdaséjteket, amelyben kialakulnak az egyszálú rekombináns DNS-t tartalmazó utód fágok. A fág-DNS a fág részecskével együtt kijut a transzformált sejtekből, és a táptalajból kinyerhető.

Fágmidok A közelmúltban egy másik egyszálú vektorcsaládot is kifejlesztettek. Ezek annyiban hasonlítanak a kozmidokra, hogy fág- és plazmidjellegzetességeik is vannak, erre utal a nevük is. Egyik népszerű változatuk „pBluescript” (pBS) néven kapható a kereskedelemben (15.9. ábra). A *lacZ'* génbe illesztett sokszoros klónozóhelye révén, a pUC vektorokhoz hasonlóan, az inszertet tartalmazó klónok az X-gal-t tartalmazó táptalajon fehér színük alapján elkülöníthetők a kék színt adóktól.



15.8. ábra. Egyszálú DNS előállítás M13 fágban történő klónozással. A *Hind*III-mal feldarabolt idegen DNS-t (piros) a kétszálú fág DNS *Hind*III helyére építik be. A kialakuló rekombináns DNS-sel *E. coli*-sejteket transzformálnak, amelyekben a DNS gördülő gyűrű mechanizmussal replikálódik, és sok egyszálú DNS-termék képződik. Ezeket a szálatok megegyezés szerint pozitív (+) szálatoknak nevezik, a templát szálat pedig negatív (-) szálatnak

A vektor tartalmazza az M13-mal rokon, egyfonalas f1 fág replikációs origóját is. Ez azt jelenti, hogy a rekombináns fágmidot tartalmazó sejt az f1 helperfággal fertőzve, egyfonalas fágmid-DNS-t hordozó utód-fágokat termel. Másik hasznos tulajdonságuk ezeknek a vektoroknak, hogy sokszoros klónozóhelyüket két különböző fág-RNS-polimeráz promotere határolja. A pBluescript esetében például az egyik oldalon a T3, a másikon a T7 promotere található. Ez lehetővé teszi a kétfonalas fágmid-DNS izolálását és *in vitro* átírását valamelyik fág-RNS-polimerázzal. A folyamat eredménye bármelyik szál tiszta RNS-transzkriptuma. Ezzel a módszerrel állították elő például a self-splicingra képes *Tetrahymena* rRNS prekurzorait az *in vitro* splicing kísérletekhez (9. fejezet).



15.9. ábra. A pBluescript vektor felépítése. A vektor alapja a pBR322 plazmid. Tartalmazza annak ampicillinrezisztencia génjét (zöld) és replikációs origóját (lila). Ezenkívül megtalálható benne az f1 fág replikációs origója is (narancssárga). Ezért egyszálú DNS-ként is kinyerhető, ha a vektort hordozó sejtet f1 helperfággal fertőzik, amely biztosítja ehhez a replikációs gépezetet. Sokszoros klónozóhelye (piros) 21 egyedi restriktációs helyet tartalmaz, mégpedig két fág, a T7 és a T3 promotere közé építve. Így *in vitro* bármelyik beépített DNS mindkét szála átírható RNS-re, attól függően, hogy melyik fág RNS-polimerázát adtuk a rendszerhez. A vektor sokszoros klónozóhelye az *E. coli* *lacZ'* génjébe (kék) ágyazódik, ezért az ép plazmid termeli a β -galaktozidáz N-terminális fragmentumát, ha a rendszerbe induktort, például IPTG-t juttatnak, ami hatástalanítja a *lacI* gén (sárga) represszorát. Vagyis az ép vektort tartalmazó baktériumklónok az X-gal indikátor jelenlétében kék színűek. Ezzel ellentétben, a rekombináns plazmidokat hordozó klónok inszertje megszakítja a *lacZ'* gént, és működőképes β -galaktozidáz hiányában a klónok fehér színűek

A legnépszerűbb klónozó vektorokat a fágok két típusából fejlesztették ki. Az egyik a λ -fág, amelyből eltávolítottak bizonyos, nem alapvető fontosságú géneket, hogy helyet biztosítsanak az inszerteknek. Az így kialakított fágok némelyikébe 20 kb-nyi DNS-t is be lehet építeni, ami igen hasznos a génkönyvtárak készítésekor. Ez esetben ugyanis fontos, hogy a klónok a genomikus DNS-t nagyobb fragmentumokban tartalmazzák. A kozmidok még nagyobb, akár 50 kb-nyi darabokat is felvehetnek, ezért szintén a génkönyvtárak készítésének eszközei. A fág vektorok másik nagy csoportja az M13 fágokból készült. Jól használható sokszoros klónozóhelyük mellett további előnyük, hogy egyszálú rekombináns DNS-t termelnek, ami alkalmassá teszi őket a DNS szekvenálására és a helyspecifikus mutagenézisre. A fágmidok helperfágaik jelenlétében ugyancsak egyfonalas DNS-t termelnek.

Eukarióta vektorok

Több, nagyon jól felhasználható vektort fejlesztettek ki, hogy eukarióta sejtekben is klónozhassanak géneket. A fejezet későbbi részében szót ejtünk majd néhány olyan vektorról, amelyeket úgy készítettek el, hogy közreműködésükkel eukarióta sejtekben állít-

hassák elő a bevitt gének fehérjetermékeit. A 16. fejezetben tárgyaljuk a **mesterséges élesztőkromoszómákat (YAC)**, melyeket arra terveztek, hogy hatalmas, több százezer bázispárnyi DNS-fragmentumokat klónozhassanak az élesztősejtekben. Megismerjük majd az *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidjából kifejlesztett vektorokat is, amelyekkel növényi sejtekbe lehet géneket juttatni.

SPECIFIKUS KLÓN AZONOSÍTÁSA SPECIFIKUS PRÓBÁVAL

Említettük már, hogy mindig szükségünk van egy próbára ahhoz, hogy azonosíthassuk az általunk keresett klónt több ezer más, számunkra érdektelen klón között. Milyen próbát alkalmazhatunk? Két alapvető típust használnak széles körben: a polinukleotidokat (vagy oligonukleotidokat), illetve az ellenanyagokat. Mindkét fajta molekula nagyon specifikusan kötődik más molekulákhoz. Először a polinukleotidokat mutatjuk be, majd a fejezet későbbi részében az ellenanyagpróbákat.

Polinukleotid próbák

A keresett gén próbájaként használható egy másik szervezetből származó homológ gén, ha valakinek már sikerült klónoznia azt. Például, ha az emberi inzulin génjét keresik, és tudják, hogy egy másik kutatócsoport már klónozte a patkány inzulin génjét, elkérhetik tőlük a klónt, hogy próbaként használják. Tehetik ezt annak a reményében, hogy a két gén eléggé hasonlít egymáshoz, így a patkány génje hibridizálhat az emberi génnel. A hibridizálás a várakozásoknak megfelelően általában bekövetkezik, de feltételeit kevésbé szigorúan kell megszabni. Ilyenkor megengedhető, hogy a hibridizációs reakció során a rendszerben legyen néhány nem párosodó bázis, mismatch is a próba és a klón-DNS bázisszekvenciája között.

A hibridizálás szigorúságát a kutatók többféleképpen szabályozhatják. A magas hőmérséklet, a szerves oldószerek nagy koncentrációja és az alacsony sókoncentráció egyaránt elősegíti a DNS-kettős hélix két szálának szétválását. A paraméterek változtatásával elérhető, hogy csak a tökéletesen komplementer DNS-szálak képezzenek duplexet. Ez a nagy szigorúságú (high stringency) hibridizálás. A feltételek módosításával, például a hőmérséklet csökkentésével, enyhíthetik a szigorúságot, néhány hibás bázispár is lehet a hibrid molekulában.

Mit lehet tenni, ha nem áll rendelkezésre homológ DNS? Megoldást jelenthet, ha legalább részlegesen ismert a gén fehérjetermékének aminosavsorrendje. Pontosan ilyen problémával találtuk szemben mi is magunkat laboratóriumunkban, amikor egy növényi toxin, a ricin génjét akartuk klónozni. Szerencsénkre a ricin mindkét polipeptidjének teljes aminosavsorrendjét ismertük, így a genetikai kód birtokában következtethettünk a polipeptideket kódoló nukleotidszekvenciákra. A nukleotidszekvenciát kémiai úton szintetizáltuk, és az így nyert szintetikus próbát használtuk a ricin gén keresésére. Ez így nagyon egyszerűnek tűnik, de van egy komoly nehézség. A genetikai kód degenerált, és a legtöbb aminosav esetében több lehetséges nukleotidsorrendet is figyelembe kellett volna vennünk.

Szerencsére, a ricin egyik polipeptidjében van egy jellegzetes szekvencia: Trp-Met-Phe-Lys-Asn-Glu, amelyben az első két aminosavnak csak egy-egy kodonja van, a következő háromnak pedig csak kettő-kettő. A hatodiknál módunk volt két

bázist meghatározni, mert a degeneráltság csak a harmadik bázisban jelentkezik. Ezért mindössze nyolc különböző, 17 tagú oligonukleotidot kellett előállítanunk, hogy biztosan közöttük legyen a hattagú oligopeptidet kódoló szekvencia is. A degenerált szekvencia a következőképpen írható fel:

			U	G	U	
UGG	AUG	UUC	AAA	AAC	GA	
Trp	Met	Phe	Lys	Asn	Glu	

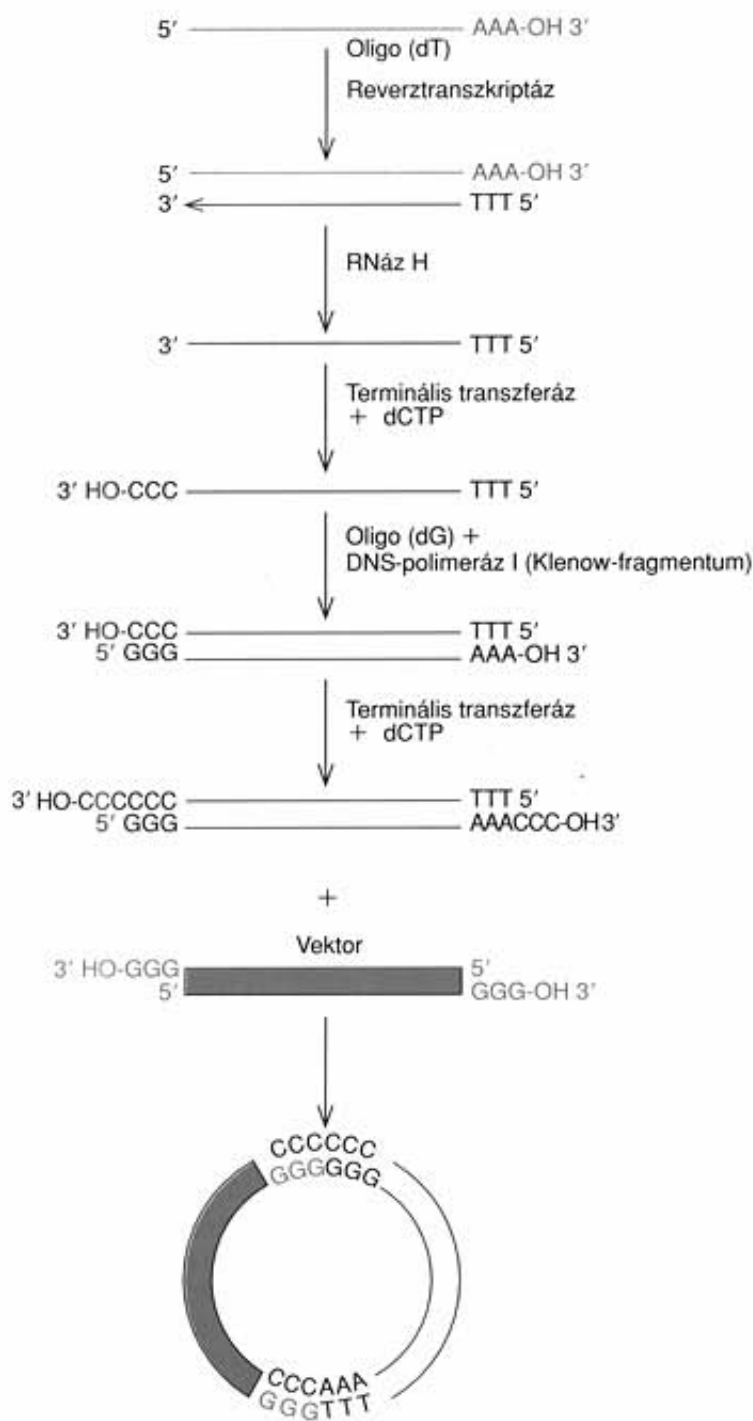
A nyolc 17 tagú oligonukleotid keverékét (UGGAUGUU-CAAAAACGA, UGGAUGUUUAAAAACGA stb.) próbaként használva sikerült néhány ricinspecifikus klónt azonosítanunk.

A specifikus klónok olyan polinukleotid próbákkal azonosíthatók, amelyek magához a génhez kapcsolódnak. Egy géntermék aminosavsorrendjének ismeretében megtervezhető a polipeptidlánc egy darabját kódoló oligonukleotid. Ez utóbbi egy adott klón azonosításának egyik leggyorsabb és legpontosabb módszere.

cDNS KLÓNOZÁSA

A molekuláris genetikusok számos módszert használnak cDNS-ek klónozására. Mi egy igen egyszerű, de hatékony eljárást mutatunk be a 15.10. ábrán. Bármilyen cDNS klónozási technika központi része a cDNS szintézise az mRNS templátról **reverztranszkriptáz** segítségével. A reverztranszkriptáz, hasonlóan a többi DNS-szintetáz enzimhez, nem képes elkezdni a szintézist primer nélkül. Ezt a problémát megoldja, hogy a legtöbb mRNS-en poli(A)-farok található, és így egy oligo(dT)-szakasz használható primerként. Az oligo(dT) a poli(A) komplementerre, ezért kötődik az mRNS 3' végén a poli(A)-hoz. Ezzel megkezdődhet a DNS-szintézis az mRNS templátról.

Az mRNS-ről készült másolat egyszálú DNS (ún. „első szál”), amiről lúggal vagy **ribonukleáz H**-val (RNáz H) távolítható el az RNS. Az enzim az RNS-DNS hibrid RNS-részt emészt, vagyis a cDNS első száláról eltávolítja az RNS-t. Ezután az első szálát templátként használva, el kell készíteni a második DNS-szálát. A folyamathoz ismét primer szükséges, csak hogy itt már nincs kényelmesen felhasználható poli(A)-vég, amihez a primert hibridizálni lehetne. Ehelyett az első szál 3' végére egy oligo(dC)-véget szintetizálnak a **terminális transzferáz** enzimmel és dCTP hozzáadásával. Az enzim egyenként kapcsolja a dC-egységeket az első szál 3' végére. Ehhez a farokhoz már hibridizálható egy rövid oligo(dG)-szakasz, mint a második szál szintézisének primere. A második szálát ugyancsak reverztranszkriptázzal, esetleg DNS-polimerázzal szintetizálják. Tulajdonképpen a leghatékonyabb enzim erre a célra a DNS-polimeráz egy része, az ún. **Klenow-fragmentum**. Az enzimmészletet az *E. coli* DNS-polimeráz I enzimének részleges proteolízisével állítják elő. A Klenow-fragmentum megtartja a DNS-polimeráz I-re általánosan jellemző DNS-polimeráz és 3' → 5' exonukleáz aktivitást, de elveszti az 5' → 3' exonukleáz aktivitást. Az utóbbi ez esetben nem kívánatos, mert lebontaná a DNS-t az 5' végtől, és a károsodást a DNS-polimeráz nem tudná kijavítani.



15.10. ábra. cDNS klónozása. Olyan eukarióta mRNS-ből (piros) indulnak ki, amelyen megtalálható a 3'-poli(A)-farok. Primerként oligo(dT)-szakaszt hibridizálnak a poli(A)-végehez, majd reverztranszkriptázzal elkészítik az első cDNS-szálat. Ezután RNáz H-val eltávolítják az mRNS templátot, majd terminális transzferáz segítségével oligo(dC)-véget kapcsolnak a cDNS első szálának 3' végéhez. Az oligo(dC)-végehez oligo(dG)-t hibridizálnak primerként, és a második szálat a DNS-polimeráz I Klenow-fragmentumával szintetizáltatják. A kétfonális cDNS 3'végeire terminális transzferázzal oligo(dC)-t szintetizálnak, majd ezeket egy alkalmas vektor (kék) komplementer oligo(dG)-végeihez kapcsolják. A rekombináns DNS-sel baktériumsejtet transzformálnak

Az elkészült kétfonális cDNS-t ezután egy vektorhoz kell kapcsolni. Ez a genomikus DNS-szakaszok esetében, a ragadós végeknek köszönhetően, könnyen elvégezhető. A cDNS-en ugyan nincsenek ragadós végek, de könnyen kialakíthatók. A molekula két végére terminális transzferázzal dCTP jelenlétében például oligo(dC)-szakaszt kapcsolnak, míg a vektorra ugyanilyen módszerrel oligo(dG)-szakaszt. Az így kialakított végek hidrogénkötést létesítenek, ezzel a vektor és a cDNS rekombináns DNS-molekulát képeznek, ami már közvetlenül alkalmas a transzformációra. Az oligonukleotid-végek elég erősen kötődnek egymáshoz, így nem szükséges ligálás a transzformáció előtt. A transzformált sejtben található DNS-ligáz később elvégzi ezt a műveletet.

Milyen vektor használható az eljárás során? Több választási lehetőség is adódik, attól függően, milyen módszerrel akarják később a pozitív (cDNS-t hordozó) klónokat kimutatni. Alkalmazhatnak valamilyen plazmid vagy fágmid vektort, például a pUC-t vagy pBS-t. Ez esetben a pozitív klónokat a **telephibridizálás** módszerével, radioaktív DNS-próbával azonosítják. Az eljárás megfelel a korábban bemutatott plakkhibridizálásnak. Használhatnak λ -fágot is vektorként, például a λ gt11 vektort. Ebben a vektorban a klónozott cDNS a *lacZ* promotérének szabályozása alá kerül, így a klónozott gén átíródik és transzlálódik. Ezután megfelelő ellenanyag segítségével közvetlenül kimutatható a gén fehérjeterméke (lásd később).

A cDNS-nek egy időben csak egy szála szintetizálható. Az első szál templátja az mRNS, a másodiké pedig az első szál. A kétfonális cDNS-t olyan oligonukleotid-végekkel látják el, amelyek kapcsolódhatnak a klónozó vektor komplementer végeihez, majd az így összeállított rekombináns DNS-sel baktériumokat transzformálnak. A pozitív klónokat radioaktív DNS-próbákkal telephibridizálás során azonosítják, vagy pedig ellenanyagokkal, ha expressziós vektort, például λ gt11-et használnak.

MÓDSZEREK A KLÓNOZOTT GÉNEK MŰKÖDTETÉSÉRE

Mi a célja egy gén klónozásának? Az egyik nyilvánvaló ok, mint ahogy azt már az előbb is említettük, az eukarióta vagy a prokarióta gének tisztán, nagy mennyiségben való előállítása a részletes vizsgálatokhoz. Ezenkívül a korábbi fejezetekben több olyan kísérletet mutattunk be, amelyek során klónozott géneket alkalmaztak. Klónozott gének megváltoztatásával fedezték fel a borsó rubisco génjének és a béka 5S rRNS génjeinek fontos szabályozó régióit (14. fejezet). A *Tetrahymena* rRNS prekursor génjének intront tartalmazó régióját klónozták, majd átírták, hogy szubsztarátként használják a self-splicing reakcióhoz (9. fejezet). Tehát, a gén önmagában is értékes terméke lehet a klónozásnak. Másik lehetséges célja az eljárásnak a gén termékének előállítása nagy mennyiségben, kutatási vagy kereskedelmi célokra (16. fejezet).

EXPRESSZIÓS VEKTOROK

Eddig főként azokat a vektorokat vizsgáltuk, amelyeket a klónozás első stádiumában használnak, amikor először idegen DNS-t juttatnak be egy baktériumba, hogy az ott replikálódjon. A vektorok mindent figyelembe véve alkalmasak erre a célra, gyorsan sokszorozódnak az *E. coli*-ban, és nagy mennyiségben állítják elő a rekombináns DNS-t. Közülük néhány **expressziós vektor** is, ami azt jelenti, hogy biztosítják a klónozott gének fehérjetermékeinek szintézisét. A pUC és a pBS vektorokban például a beépített DNS a sokszoros klónozóhely előtt található *lac* promotor vezérlése alá kerül. Ha pedig a beépített DNS és az általa megszakított *lacZ'* gén ugyanabba a leolvasási keretbe esik, akkor **fúziós fehérje** keletkezik, amelynek N-terminális végén részleges β -galaktozidáz szekvencia, C-terminális végén pedig a beépített DNS által kódolt szekvencia található (15.11. ábra).

Amennyiben nagy mennyiségben szeretnénk hozzájutni a klónozott gén termékéhez, akkor speciális expressziós vektorokat célszerű alkalmazni. Ezeknek két jellemző elemük van, amelyek elengedhetetlenek az aktív génműködéshez: egy erős promotor és egy riboszóma kötőhely Shine–Dalgarno-szekvenciával a kezdő ATG kodon közelében.

Erős promotert tartalmazó expressziós vektorok

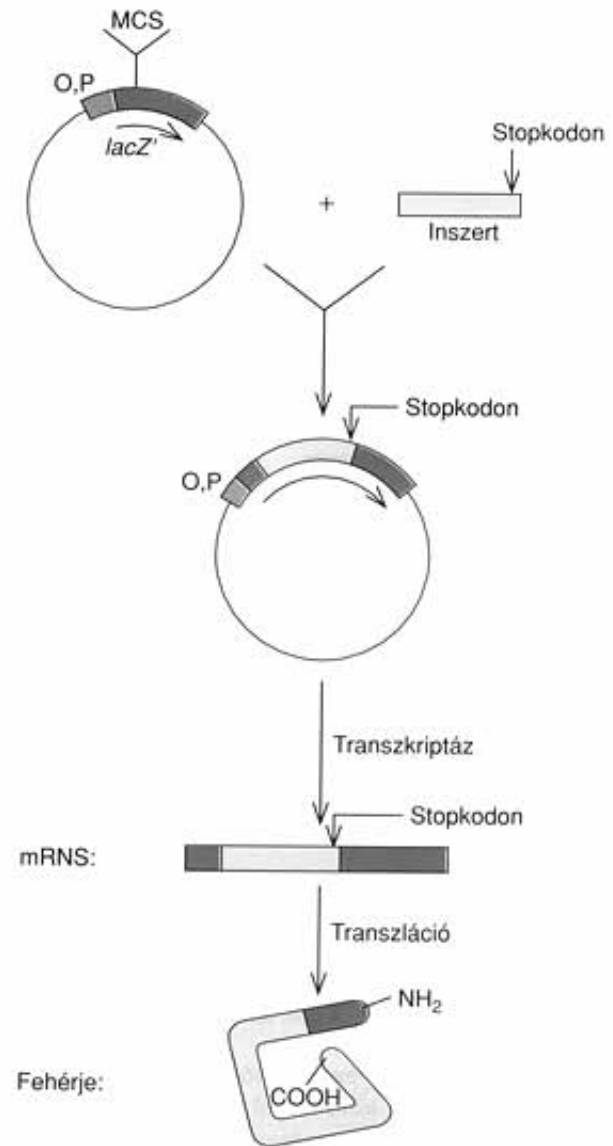
Egy expressziós vektor fő funkciója egy géntermék minél hatékonyabb előállítására. Ezért az ilyen vektorokat nagyon erős promoterekkel látják el, feltételezve azt, hogy ha sok mRNS képződik, akkor több lesz a fehérjetermék is.

Ilyen erős promotor a *trp* (triptofán operon) promotere, amely több expressziós vektor alapját képezi, köztük a *ptpL1*-ét. A vektor működését a 15.12. ábra vázolja. Megtalálható benne a *trp* promotor/operátor régió, amit a Shine–Dalgarno-szekvencia követ. Közvetlenül használható expressziós vektorként, az idegen DNS-t a *Clal* helyre építve. Alternatív megoldásként a *trp* szabályozó régiót a *Clal* és a *HindIII* segítségével ki lehet emelni, és beépíteni egy másik vektorba a működtetni kívánt gén elé.

Indukálható expressziós vektorok

Rendszerint előnyös, ha egy klónozott gén kikapcsolt állapotban van, és csak akkor működik, amikor mi akarjuk. Ennek egyik oka, hogy az eukarióta fehérjék nagy mennyiségben toxikusak lehetnek a baktériumokra. Az is előfordulhat, hogy nem mérgezőek, de olyan nagy mennyiségben termelődnek, ami már zavarja a baktérium növekedését. Mindkét esetben az állandóan működő klónozott gén miatt a baktérium nem érne el olyan koncentrációt, hogy megfelelő mennyiségű fehérjét termeljen. A megoldás, ha a klónozott gén egy ki-bekapcsolható indukálható promotor mögött helyezkedik el.

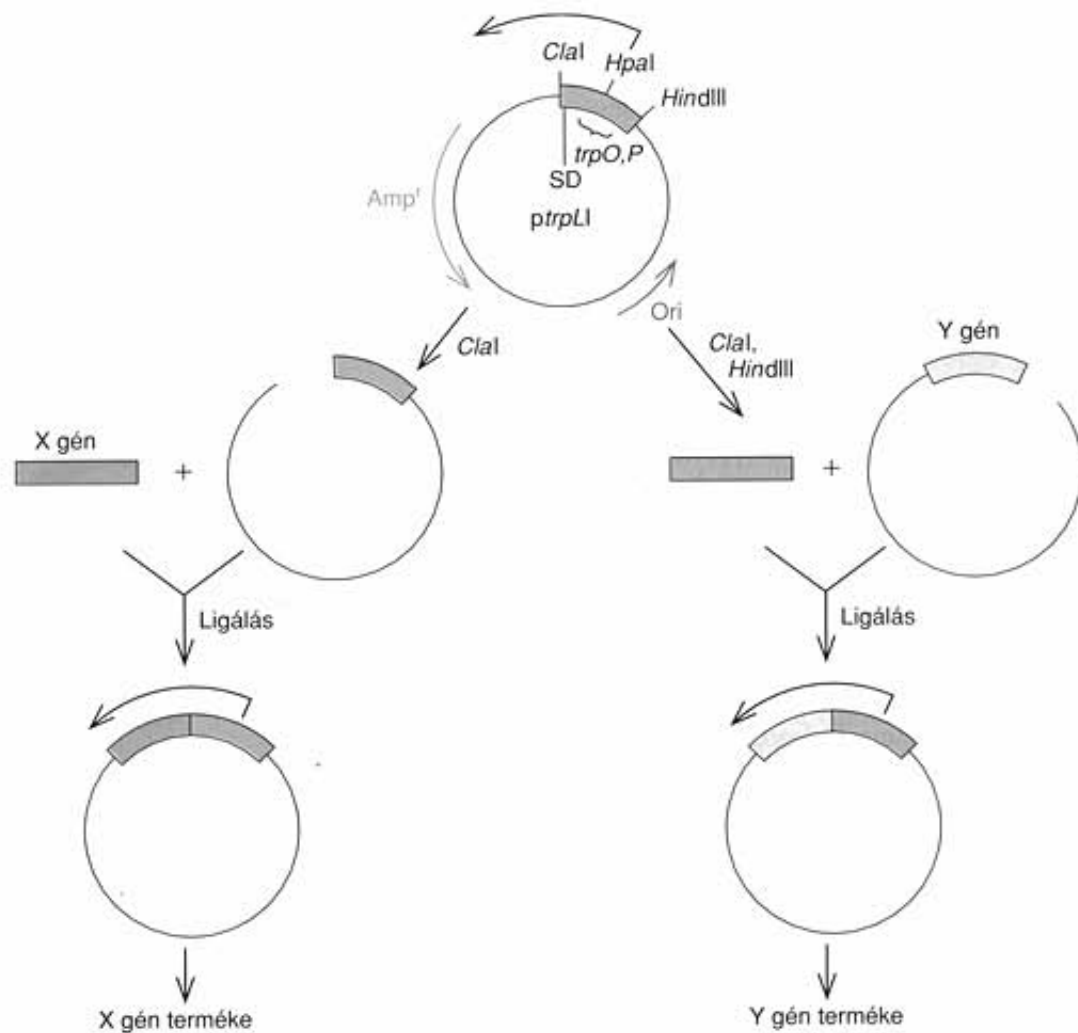
A *lac* promotor bizonyos mértékig indukálható, és mindaddig kikapcsolt állapotban van, amíg induktora, az allolaktóz vagy annak szintetikus analógja, az IPTG nem serkenti. A *lac* represszor gátlása azonban nem tökéletes, és a klónozott gén kis-



15.11. ábra. Fúziós fehérje képződése pUC plazmidban való klónozással. Az idegen DNS-t (sárga) a sokszoros klónozó helyre (MCS) építik be. A *lac* promotertől (lila) induló transzkripció hibrid mRNS-t eredményez, ami néhány *lacZ* kodonnal kezdődik, majd átvált a beépített szekvenciára, végül ismét a *lacZ*-re (piros). A hibrid mRNS transzlációja során fúziós fehérje képződik, ennek N-terminálisán néhány β -galaktozidáz aminosav van, és ezeket követik az inszert aminosavak. Mivel a beépített szekvencia transzlációs stopjelet tartalmaz, a hátralévő *lacZ* kodonok nem transzlálódnak.

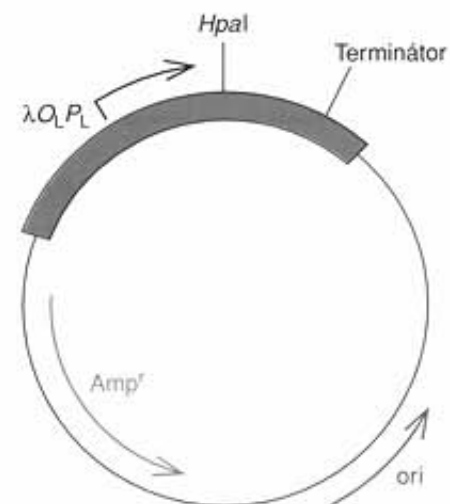
mértékben még induktor hiányában is működik. A probléma kiküszöbölhető, ha olyan plazmidban vagy fágmidban működtetik a gént, amelynek saját *lacI* génje van, mint például a pBS-nek (15.9. ábra). Az ilyen vektor által termelt fölös mennyiségű represszor kikapcsolt állapotban tartja a gént, amíg IPTG-vel nem indukálják.

A másik lehetőség, ha nagyon szigorúan szabályozott promotert, például a λ -fág P_L promotorát használják. Az ezzel a promotor/operátor rendszerrel szerkesztett expressziós vektorokat olyan gazdasejtekben klónozzák, amelyek hőérzékeny



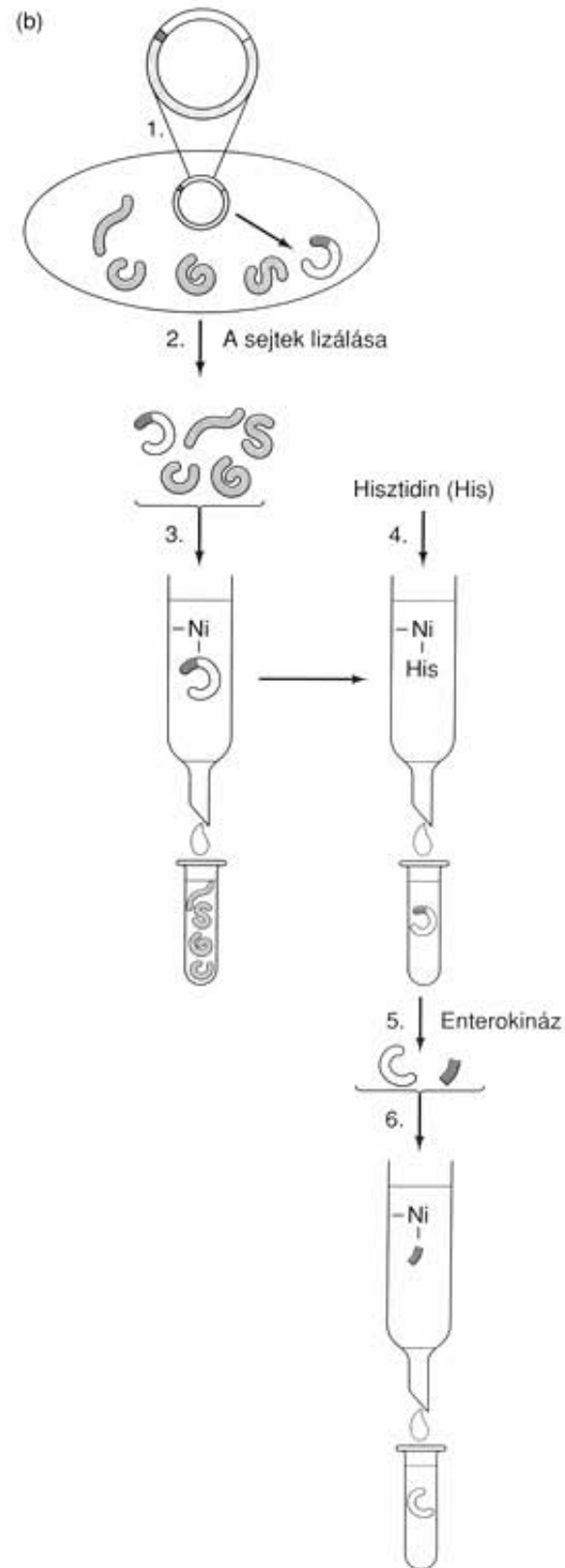
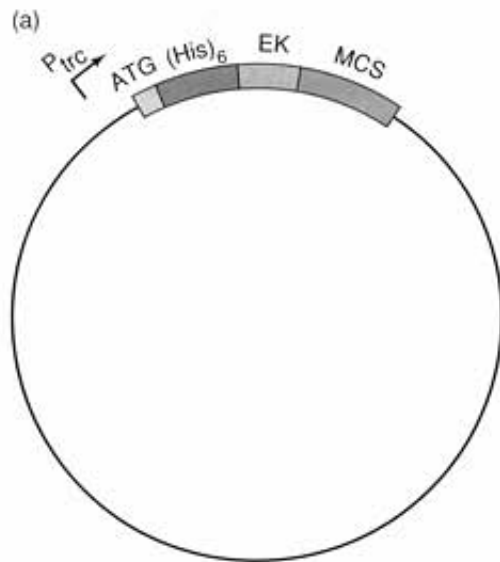
15.12. ábra. A *ptrpL1* expressziós vektor két felhasználási lehetősége. A vektor tartalmaz egy *Clal* restriktációs helyet, előtte egy Shine–Dalgarno riboszóma kötőhellyel (SD) és a *trp* operátor/promoter régiójával (*trpO,P*). A transzkripció iránya az óramutató járásával ellentétes (nyíl). A vektor hagyományos expressziós vektorként használható (balra), az idegen DNS-t (X, zöld) a *Clal* helyre építik be. Másik alkalmazási lehetősége (jobbra), hogy a *trp* szabályozó régiót (lila) *Clal*-gyel és *HindIII*-mal kivágják, majd átépítik egy másik plazmidba, az abban levő kódoló régió (Y, sárga) működtetésére

λ -represszor gént (*cI857*) tartalmaznak. Amíg a hőmérsékletet viszonylag alacsony értéken (32 °C) tartják, a represszor működik, és ezért nincs expresszió. Amikor a hőmérséklet eléri a kritikus értéket (nem-permisszív szint, 42 °C) a hőérzékeny represszor működésképtelenné válik, a klónozott gén indukálódik. A mechanizmust a pKC30 expressziós vektorral a 15.13. ábra szemlélteti.



15.13. ábra. A pKC30 indukálható expressziós vektor. A működtetni kívánt gént a *Hpal* helyre építik be, a $\lambda O_L P_L$ operátor/promoter régiója mögé (downstream). A gazdasejt lizogén, hőérzékeny represszor génnel (*cI857*). A klónozott gén működésének indukálásához a hőmérsékletet 32 °C-ról 42 °C-ra kell emelni. Ez inaktiválja a hőérzékeny represszor molekulát, ami leválik az O_L régióról, és elkezdődhet a transzkripció

Az expressziós vektorokat úgy szerkesztik meg, hogy a lehető legnagyobb mennyiségben képződjön a klónozott gén fehérjeterméke. A működés optimalizálására a vektorokba erős bakteriális promotereket és bakteriális riboszómakötő helyeket építenek, ezek ugyanis hiányozhatnak a klónozott eukarióta génekből. A legtöbb klónozó vektor indukálható, így elkerülhető az idegen géntermék idő előtti túltermelése, ami toxikus lehet a baktériumsejtre.



15.14. ábra. Oligohisztidin expressziós vektor alkalmazása. (a) Az oligohisztidin vektor általános térképe. Az ATG startjel (zöld) után egy olyan régió (piros) van, amely sorban egymás után hat hisztidint kódol [(His)₆]. Ezt követi egy proteolitikus enzim, az enterokináz (EK) felismerő helyét kódoló szakasz (narancssárga). Végül a vektornak van egy sokszoros klónozóhelye (MCS, kék). A vektort általában három MCS változattal szállítják, a három lehetséges leolvasási keretnek megfelelően. Így kiválasztható az a vektor, amelybe a gén az oligohisztidinhez képest a helyes leolvasási keretbe illeszthető. (b) A vektor alkalmazása. 1. A gént (sárga) az oligohisztidint kódoló régióval (piros) azonos leolvasási kerettel építik be, majd a rekombináns vektorral baktériumsejteket transzformálnak. A sejtek fúziós fehérjét (piros és sárga) is termelnek a bakteriális fehérjék mellett (zöld). 2. A sejtek kiszabadítják belőlük a fehérjekeveréket. 3. A lizátumot átfolyatják Ni-affinitáskromatográfiás használt oszlopon, ahol a fúziós fehérje megkötődik, de a többi nem. 4. A fúziós fehérjét a nikkellez erősebben kötődő hisztidinnel vagy hisztidinanalóggal leoldják az oszlopról. 5. A fúziós fehérjét enterokinázzal emésztve, eltávolítják róla az oligohisztidinből álló részt. 6. Az emésztett fehérjét még egyszer átengedik a Ni-oszlopon, ezzel az oligohisztidint elválasztják a fehérjeterméktől.

Fúziós fehérjéket termelő expressziós vektorok

A legtöbb expressziós vektor alkalmazásakor fúziós fehérjék termelődnek. Első pillantásra ez előnytelennek tűnik, mert a klónozott génnek nem a természetes fehérjeterméke képződik. De a fúziós fehérjék a baktériumsejtekben sokkal stabilabbak lehetnek, mint a szabályos eukarióta fehérjék, és a fúziós fehérje N-terminálisán levő extra aminosavak megkönnyíthetik a fehérjetermék tisztítását.

Ilyen megfontolások alapján alkalmazzák az oligohisztidin expressziós vektorokat, köztük a pTrcHis vektort (15.14. ábra). Ebben a vektorban, közvetlenül a sokszoros klónozóhely előtt található egy rövid, hat hisztidint kódoló régió. A beépített inszertorról így olyan fúziós fehérje termelődik, amelynek N-terminálisán hat hisztidin sorakozik. Milyen előnye van ennek? Az oligohisztidin régiók nagy affinitást mutatnak a fémekhez, például a nikkellez, ezért ezek a fehérjék Ni-affinitáskromatográfiával könnyen tisztíthatók. A módszer szépsége egyszerűségében és gyorsaságában rejlik. Amint a baktériumokban megtermelődött a fúziós fehérje, a sejteket lizálják, a kivonatot átengedik a Ni-affinitáskromatográfiás oszlopon, majd a tiszta fehérjét egyetlen lépésben leoldják. Mindez azért lehetséges, mert nagyon ke-

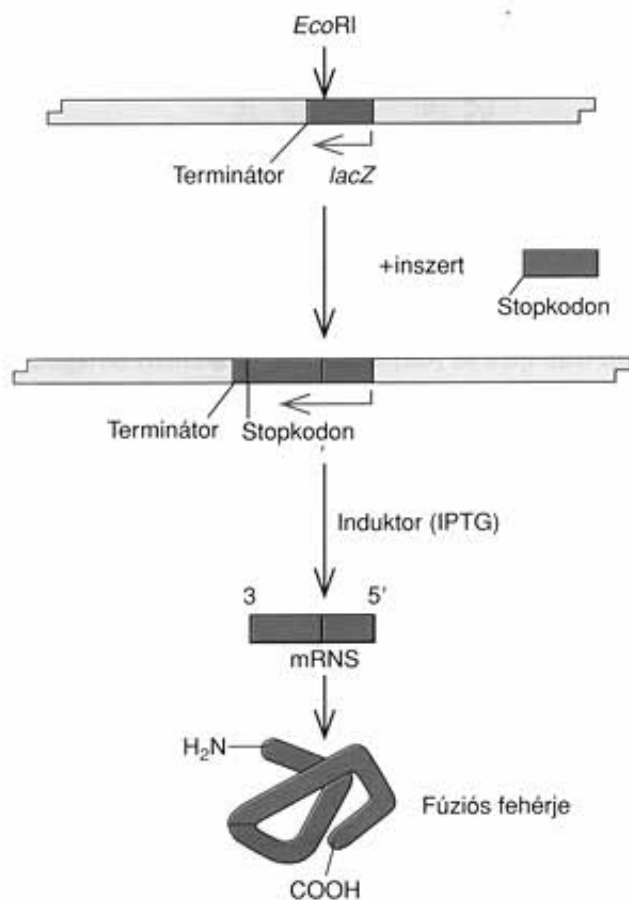
dál a nikkellez, ezért ezek a fehérjék Ni-affinitáskromatográfiával könnyen tisztíthatók. A módszer szépsége egyszerűségében és gyorsaságában rejlik. Amint a baktériumokban megtermelődött a fúziós fehérje, a sejteket lizálják, a kivonatot átengedik a Ni-affinitáskromatográfiás oszlopon, majd a tiszta fehérjét egyetlen lépésben leoldják. Mindez azért lehetséges, mert nagyon ke-

vés természetes fehérjében van oligohisztidin régió, így lényegében csak a fúziós fehérje kötődik meg az oszlopon.

Miként választható le az oligohisztidin a fehérjetermékéről? A vektorok tervezői erről is gondoskodtak. A sokszoros klónozóhely előtt található egy olyan aminosavszekvenciát kódoló régió ami egy proteolitikus enterokináz felismerőhelye. Ezzel az enzimmel a fúziós fehérje két részre hasítható, az oligohisztidinre és a fehérjetermékre. Az enterokináz hasítóhelye nagyon ritkán fordul elő a fehérjékben, ezért elhanyagolható annak az esélye, hogy az enzim a fehérjetermék is bontsa. Az emésztés után az affinitáskromatográfiához használt oszlopon még egyszer átengedik a keveréket, és az oligohisztidint elválasztják a kívánt terméktől.

A λ -fág alapú vektorok között is vannak speciális expressziós vektorok, ilyen például a λ gt11. Ez a fág (15.15. ábra) tartalmazza a *lac* szabályozó régiót, amit a *lacZ* gén követ. A klónozóhelyek a *lacZ* génben vannak, ezért a vektorba épített gén terméke olyan fúziós fehérje, amelynek vezetőszekvenciája a β -galaktozidáz.

A λ gt11 expressziós vektor igen népszerű eszköze a cDNS könyvtárak készítésének és tesztelésének. A korábban bemutatott

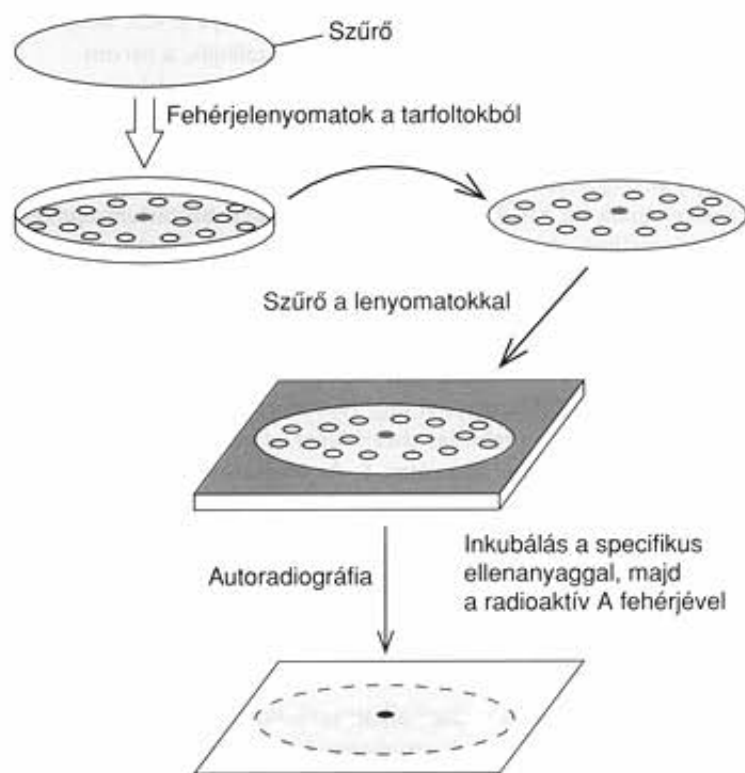


15.15. ábra. Fúziós fehérje képződése a λ gt11 alkalmazásával. A működtetni szándékozott gént (zöld) az *EcoRI* helyre építik be, közel a *lacZ*-t kódoló régió (piros) végéhez, éppen a transzkripciót leállító terminátor elé. Ezért a *lacZ* IPTG-val való indukciójakor fúziós mRNS termelődik, amelyben a β -galaktozidáz kódoló rész után következnek a beépített kódoló régió. Az mRNS transzlációjával fúziós fehérje képződik a gazdasejtben

keresési eljárásokban a megfelelő DNS-szekvenciát jelölt oligonukleotiddal vagy polinukleotiddal vizsgálták. Ezzel ellentétben a λ gt11 közvetlen lehetőséget kínál a megfelelő fehérjét előállító klónok kikeresésére. Az eljáráshoz feltétlenül szükséges a λ gt11-ben lévő cDNS könyvtár és a kérdéses fehérje ellenanyaga.

A folyamatot a 15.16. ábra vázolja. A különböző cDNS inszerteket hordozó λ -fágokat szélesztik, és a klónok által kibocsátott fehérjéket valamilyen hordozóra, például nitrocellulózra rögzítik. A λ -alapú klónok kedvező tulajdonsága ebből a szempontból, hogy a gazdasejteket tarfoltok képződése közben lizálják, melynek során a termelődött fehérjék is kiszabadulnak. Így a fehérjék egyidejűleg klónok ezreiből rögzíthetők, mindössze a nitrocellulóz szűrőt kell a Petri-csésze felszínéhez érinteni.

Ha minden egyes plakkból átjutottak a fehérjék a nitrocellulózra, próbát végeznek az antisérummal. Ezután a *Staphylococcus aureus* radioaktívan jelölt A-fehérjéjével kikeresik azokat a fehérjéket, amelyekhez az ellenanyagok kötődtek. Ennek a fehérjének speciális tulajdonsága, hogy erősen kötődik az antitestekhez, így megjelöli azokat a foltokat, amelyekhez kapcsolódik



15.16. ábra. Pozitív λ gt11 klónok kimutatása a génműködés vizsgálatával. Egy szűrővel lenyomatot készítenek a Petri-csészén levő tarfoltok fehérjéiről. Az egyik klón (piros) fúziós fehérjét tartalmaz, ez a β -galaktozidáz mellett a kívánt fehérje egy részéből épül fel. A fehérjelenyomatokat tartalmazó szűrőt a keresett fehérjére specifikus ellenanyaggal inkubálják, majd radioaktívan jelölt *Staphylococcus* A fehérjével. Ez utóbbi specifikusan kötődik az antitestekhez, ezért csak a pozitív klónok helyének megfelelő antitest-antigen komplexekhez kötődik. A pozitív klón pontos helyét sötét folt jelzi az autoradiogramon

a nitrocellulózon. A radioaktivitás autoradiográfiás lokalizálása után (l. a fejezet elején) az eredeti lemezről kiválasztható a megfelelő plakk. Ne tévesszük szem elől, hogy ilyenkor a fúziós fehérjét mutatják ki, és nem magát a klónozott fehérjét. Az sem számít, hogy klónozták-e a teljes cDNS-t, vagy sem. Az antiszérum általában több ellenanyag keveréke, ezek a keresett fehérje különböző részeivel reagálnak, ezért akár részleges génterméket is kimutatnak, ha annak kódoló régióját a vezető β -galaktozidáz gén irányának és leolvasási keretének megfelelően klónozták.

Az expressziós vektorokkal gyakran fúziós fehérjéket állítanak elő, amelyek N-terminálisát a vektorban lévő kódoló szekvenciák, C-terminálisát pedig a klónozott gén határozza meg. A fúziós fehérjéknek előnyeik is vannak: a prokarióta sejtekben stabilabbak, mint az eredeti eukarióta fehérjék, és izolálásuk is egyszerűbb lehet. A λ gt11 vektorral előállított fúziós fehérjék specifikus antiszérummal mutathatók ki a plakkokban.

Eukarióta expressziós rendszerek

Az eukarióta gének sokszor nem „érzik otthon magukat” a prokarióta sejtekben, még akkor sem, ha prokarióta vektorok szabályozása alatt működnek. Ennek egyik oka, hogy az *E. coli*-sejtek a klónozott eukarióta gének fehérjéit gyakran idegenként azonosítják, és lebontják. A másik ok, hogy a prokariótákban nincs olyan poszttranszlációs módosító rendszer, mint az eukariótákban. Így például egy olyan fehérje, amely az eukarióta sejtekben rendszeren cukrok-kal kapcsolódik, baktériumsejtekben klónozva csak aminosavakból álló, egyszerű fehérjeként szintetizálódik. Ez pedig befolyásolja a fehérje aktivitását, stabilitását vagy antitestekkel való kapcsolódását. Sokkal súlyosabb probléma, hogy a baktériumsejtekben nem biztosítottak a fehérjék hajtogatódásához (protein folding) szükséges azon feltételek, amelyek az eukarióta sejtekre jellemzőek. Ezért a klónozott gének termékei gyakran hibás térszerkezetűek, inaktívak. Esetenként elképesztően nagy mennyiségben termelődik a klónozott gén által kódolt fehérje a baktériumban, de oldhatatlan, inaktív szemcsék, ún. inklúziós testek formájában. Ezek nem használhatók, csak ha fehérjéik feloldódnak, és visszanyerik aktivitásukat. Hozzá kell tenni, hogy az inklúziós testek proteinje gyakran renaturálható, és ezekben az esetekben az inklúziós testek még hasznosak is, hiszen egyszerű centrifugálással elválaszthatók a többi fehérjétől.

A klónozott gén és a prokarióta gazdasejt összeférhetetlenségét elkerülendő, a gént eukarióta sejtben működtetik. Ilyen esetekben a klónozást általában *E. coli*-ban végzik egy olyan **ingázó vektor** segítségével, amelyik baktérium- és eukarióta sejtekben is képes replikálódni. Ezután a rekombináns DNS-t valamilyen módon, transzformációval juttatják be az eukarióta sejtbe. Az egyik, e célra alkalmas eukarióta szervezet az élesztő, ez a baktériumokhoz hasonlóan gyors növekedésű és könnyen tenyészthető. Ugyanakkor elvégzi a fehérje megfelelő hajtogatását és glikozilálását (cuk-

rok hozzákapcsolása). Emellett még az is megoldható, hogy a termék kiválasztódjon a tápközegbe. A klónozott gént ahhoz a régióhoz kell kapcsolni, amely az élesztő egyik exportfehérjéjének szignálpeptidjét kódolja. A fehérje tisztításánál ez óriási előnyt jelent, hiszen az élesztősejteket centrifugában ülepítik, és a viszonylag tiszta fehérjeterméket kinyerik a felülúszóból.

Az élesztőnél használatos vektorok alapja egy plazmid, az ún. *2 mikronos plazmid*, ami normálisan megtalálható az élesztősejtekben. Ez biztosítja a replikációs origót, amellyel minden, az élesztőben működő vektornak rendelkeznie kell. Az élesztőbaktérium ingázó vektorokban megtalálható még a pBR322 replikációs origója is, így ezek *E. coli*-ban is sokszorozódhatnak. Emellett az élesztő expressziós vektoroknak tartalmazniuk kell egy erős élesztő promotert is.

Említésre méltóan sikeres eukarióta vektor egy baculovírusból, a nukleáris polihedrozis vírusból (NPV) származtatott vektor is. A vírus a lucernaaraszólyó hernyóját fertőzi. Ennek a víruscsoportnak meglehetősen nagyméretű, mintegy 130 kb-nyi cirkuláris DNS alkotja a genomját. Legfontosabb struktúrfehérjéjük, a polihedrin elképesztően nagy mennyiségben termelődik a fertőzött sejtekben. Becslések szerint a baculovírus okozta fertőzésben elpusztult hernyók szárazanyagának akár 10%-át is kiteheti ez a fehérje. Ez arra utal, hogy a polihedrin génje nagyon aktív, amit valószínűleg erős promotérének köszönhet. Max Summers és Lois Miller munkatársakkal – egymástól függetlenül – 1983-ban, illetve 1984-ben elsőként fejlesztettek ki polihedrin promoterral működő vektorokat. Azóta sok más baculovíruson alapuló vektort konstruáltak ennek és más vírus promotereknek a felhasználásával. A leghatékonyabb baculovírus vektorokkal fél gramm/liternyi fehérje is termeltethető a klónozott génről – ami valóban óriási mennyiség.

MŰVELETEK KLÓNOZOTT GÉNEKEL

A fehérjetermékek egyszerű előállításán kívül, a klónozott gének sokféleképpen hasznosíthatók, amit a következő három példával támaszthatunk alá: (1) Nem kell megelégednünk csupán a gén természetes termékével! Ha már klónoztuk, céltudatosan meg is változtathatjuk a gént, és előállíthatjuk a terveink szerint módosított géntermékeket is; (2) Radioaktív atomokkal vagy egyéb jelölésekkel láthatjuk el a klónozott géneket, és sokféle célra próbaként használhatjuk. Segítségükkel megállapíthatjuk például, hogy hány hasonló gén van egy szervezet genomjában, vagy milyen aktívan íródik át a gén az élő sejtekben; (3) Meghatározhatjuk a klónozott gén pontos bázissorrendjét.

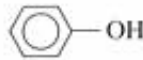
FEHÉRJEMÉRNÖKSÉG KLÓNOZOTT GÉNEKEL (PROTEIN ENGINEERING)

Hagyományosan, a fehérje-biokémiával foglalkozó kutatók kémiai módszerekkel változtatták meg a vizsgált fehérje bizonyos aminosavait, hogy megfigyeljék a változások hatását a fehérje aktivitására. De a vegyszerek túlságosan durva eszközök a fehérjék módosítására, nem lehet biztosan tudni, hogy csak egy vagy több aminosav

változik-e meg, sőt azt sem, hogy melyik aminosavakat érinti a változás. Az ilyen vizsgálatok sokkal pontosabban végezhetőek el klónozott génekkel, ezek, „mikrosebészeti” beavatkozásokat tesznek lehetővé a fehérjéken. Egy gén meghatározott bázisainak kicserélésével a fehérje kiválasztott pontjain módosíthatók az aminosavak, és megfigyelhetők a fehérje működésében bekövetkező változások.

Hogyan végezhető el az ilyen **irányított helyspecifikus mutagenezis**? Elsőként szükséges egy ismert bázisszekvenciájú klónozott gén. (A DNS-szekvenálási módszereket a fejezet későbbi részében ismertetjük. Itt tegyük fel, hogy már meghatároztuk annak a génnek a nukleotidszekvenciáját, amelyet manipulálni akarunk.) A génnek egyszálú DNS-ként kell rendelkezésre állnia. Ez elérhető, ha M13 fággal klónozzák a gént, és az egyszálú utódfágok DNS-ét (pozitív szálak) összegyűjtik (15.8. ábra). Ezzel analóg módszer a fágmidok alkalmazása (15.9. ábra).

A következő feladat egyetlen kodon megváltoztatása ebben a génben. Tegyük fel, hogy a génben megtalálható a 15.17. ábrán látható bázisszekvencia, és a kódolt aminosavak között szerepel egy tirozin is. A tirozinnek van egy 4-hidroxi-fenilcsoportja:



A 4-hidroxi-fenilcsoport szerepének felderítésére változtassuk meg a tirozin kodonját fenilalanin kodonra. A fenilalanin hasonló a tirozinhoz, de a 4-hidroxi-fenilcsoport helyett csak fenilcsoportot tartalmaz:



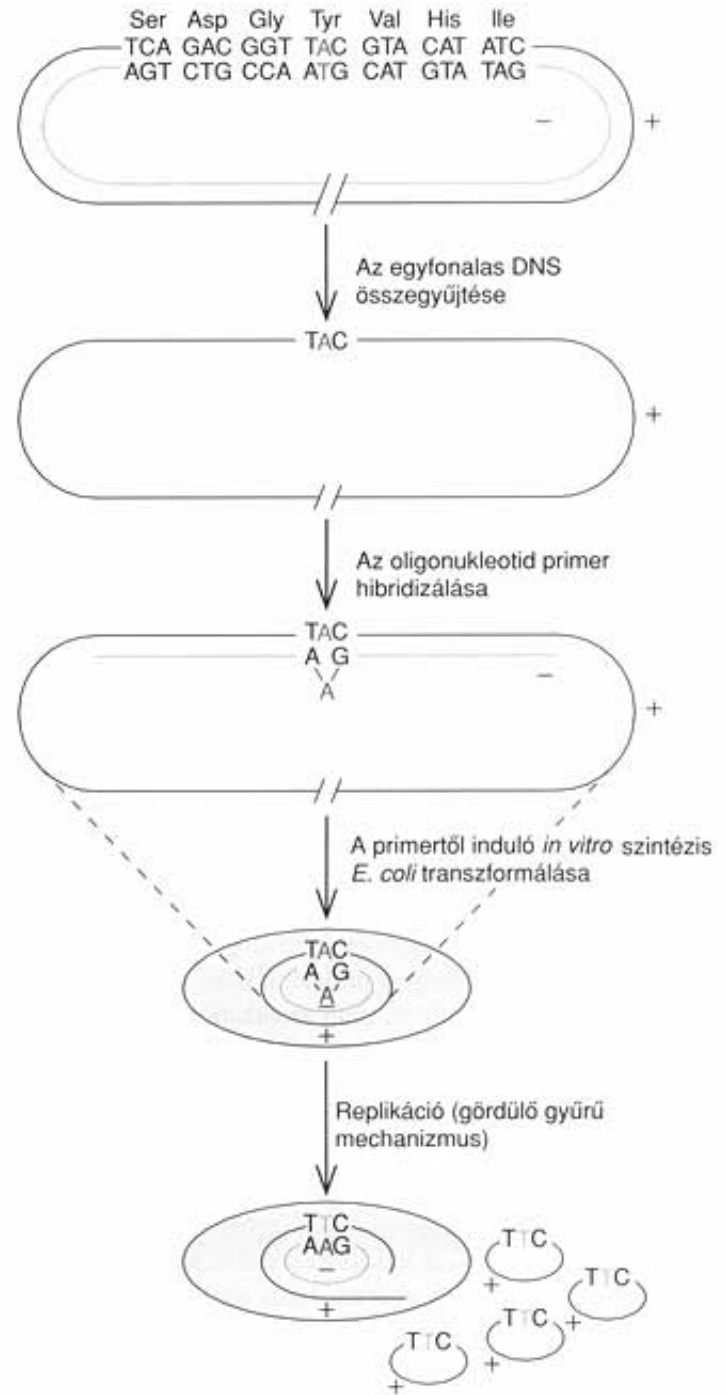
Ha a tirozin 4-hidroxi-fenilcsoportja fontos a fehérje működéséhez, akkor a fenilalanin fenilcsoportja csökkenti az aktivitást.

A TAC (Tyr) tripletet TTC (Phe) tripletre kell változtatni! A legegyszerűbb út, ha DNS-szintetizátorral egy mesterséges, 25 tagú oligonukleotidot gyártanak, a következő szekvenciával:



Ugyanez a szekvencia található az eredeti negatív szál megfelelő részén, csak a középső triplet változott meg ATG-ről AAG-re. Az M13 fágból izolált pozitív szál ezzel az oligonukleotiddal hibridizál, kivéve egy megváltozott bázist, ahol hibás A-A bázispár alakul ki. A hibrid oligonukleotidja szolgál primerként a DNS-polimeráz számára a negatív szál *in vitro* szintéziséhez. Az így képződött, hibás bázispárt tartalmazó kétfonalas replikatív formával (RF) *E. coli*-sejteket transzformálnak.

A baktériumsejtben az RF gördülő gyűrű mechanizmussal replikálódik, a mutáns negatív szálát használva templátként. A folyamat során nagyszámú pozitív szál képződik, amelyek már a TTC fenilalanin tripletet tartalmazzák a TAC tirozin triplet helyett. A mutáns pozitív szálak bepakolódnak a fágreszecskekbe (a 15.17. ábrán nem szerepel), amelyekkel újabb baktériumsejtek fertőzhetőek. A folyamat utolsó lépésében a sejtek által termelt



15.17. ábra. Helyspecifikus mutagenezis oligonukleotid felhasználásával. A megváltoztatni kívánt gént kétfonalas M13 fág DNS-ébe klónozzák. A cél, hogy a késsel jelölt TAC tirozin triplet TTC a fenilalanin tripletre cserélődjön. A rekombináns fág-DNS-sel *E. coli*-sejteket transzformálnak, és összegyűjtik az utódfágok egyszálú DNS-molekuláit (+ szálak). Az egyszálú pozitív szálra olyan mesterséges primert kapcsolnak, amelyik a kiválasztott régió komplementere, egyetlen báziseltéréssel, egy A (piros) helyett T. Ez hibás A-A bázispárt okoz (piros-kék). A primertől kiindulva *in vitro* szintetizáltatják a negatív szálát, és ezzel a kettős szálú DNS-sel *E. coli*-sejteket transzformálnak. Az egyetlen báziscserét tartalmazó negatív szál a templát, amelyről a sejtben a pozitív szál számos másolata készül, mindegyikük az eredeti TAC tirozin triplet helyett TTC fenilalanin tripletet tartalmaz

mutáns RF molekulákat összegyűjtik, restriktív enzimmel kivágják a mutáns gént, és megfelelő expressziós vektorba klónozzák. A klónozott gén fehérjeterméke megegyezik a vad típusával, kivéve a tirozin → fenilalanin cserét.

Figyelemre méltó ennek a módszernek a pontossága, szemben a hagyományos kémiai mutagenézissel, amikor sokszor letális dózisu mutagénnel kezelik a szervezeteket, hogy megfigyeljék az utódok mutáns jellegét. A DNS-szekvenálási módszerek kidolgozása előtt egy ilyen mutáció molekuláris természetéről csak a nagyon munkaigényes fehérjeszekvenálás szolgáltatott információt. A korszerű DNS-szekvenálási technikák birtokában is meg kell határozni a mutáns gén teljes szekvenciáját ahhoz, hogy biztosan megtudjuk, milyen specifikus sérülést okozott a kémiai mutagén.

Ezzel szemben az irányított helyspecifikus mutagenézis lehetővé teszi, hogy előre eldöntsük, a fehérje melyik részét kívánjuk megváltoztatni, és a mutáns pontosan annak megfelelően alakíthatjuk ki. Pontatlansága ellenére, még mindig fontos szerepe van a hagyományos mutagenézisnek, hiszen a módszerrel gyorsan és könnyen nagyszámú, változatos mutáns állítható elő, köztük olyanok is, amelyenre sohasem gondoltunk volna, vagy pedig nem állt volna szándékunkban irányított mutagenézissel előállítani.

A klónozott gének alkalmazásával bármilyen változás megvalósítható a fehérjetermék aminosavsorrendjében. Ez legegyszerűbben bakteriofág vagy fágmid vektorokba klónozott egyszálú DNS-sel és a megtervezett báziscserét tartalmazó szintetikus oligonukleotid primerekkel végezhető el.

A KLÓNOZOTT GÉNEK MINT PRÓBÁK

A hibridizálás jelensége – az egyszálú nukleinsavaknak az a képessége, hogy egy másik, velük komplementer egyszálú nukleinsavval kettős hélixet képeznek – a modern molekuláris genetika egyik alappillére. A hibridizálást oly sok módszer alkalmazza, hogy jelentőségét nem lehet túlbecsülni. A fejezetben már ismertettük a plakk- és a telephibridizálást, a következőkben pedig két újabb hibridizációs technikát mutatunk be.

DNS-próbák alkalmazása a gének számának meghatározására

Sok eukarióta gén nem csak egyetlen kópiában fordul elő a genomban, hanem közeli rokon géncsaládok tagjaként. Tegyük fel, hogy meg akarjuk tudni, hány példány található egy bizonyos géntípusból egy adott szervezetben. Ha birtokunkban van a géncsalád egy klónozott tagja, akár csak egy darabja is, mint cDNS, megbecsülhetjük a számukat.

Az eljárás során az adott szervezetből izolált genomikus DNS-t restriktív endonukleázzal emésztik (15.18. ábra). Legjobb, ha 6 bázispárnyi felismerő hellyel rendelkező restriktív enzimet használnak, mint amilyen az *EcoRI* és a *HindIII*. Ezek

az enzimek a genomikus DNS-t több ezer, átlagosan 4000 bázispárnyi fragmentumra darabolják. A következő lépésben a fragmentumokat méretük szerint agaróz gélelektroforézissel elválasztják egymástól. Ha az elektroforézis után megfestik a gél, csak egy elmosódott, több ezer sávból álló csíkot látnak, mert a fragmentumok nem különülnek el határozottan egymástól. Végső soron jelölt próbát akarnak hibridizálni a sávokhoz, hogy kiderítsék, hány tartalmazza közülük a kérdéses gén szekvenciáját. Ehhez előbb át kell vinni a DNS-fragmentumokat egy olyan közegre, amelyen a hibridizáció kényelmesen elvégezhető.

A módszer első kidolgozója, Edward Southern a DNS-fragmentumokat az agaróz gélből nitrocellulózra szívatta át („blottolta”) diffúzióval (15.18. ábra). Erre utal a módszer elnevezése: **Southern-blot**. Ma már a blotolás legtöbbször a DNS-sávok elektroforézisével történik a gélből a szűrőre (15.18. ábra). Az átszívás előtt a DNS-t lúggal denaturálják, hogy a keletkező egyszálú DNS kötődhessen a nitrocellulózhoz, és kialakuljon a Southern-blot. Napjainkban a nitrocellulóznál alkalmasabb anyagok is léteznek, például nejlonalapú fóliák, találó kereskedelmi nevekkkel, mint például „Gene Screen” (Génkereső). A következő lépésben radioaktívan jelölt DNS-prekursorok jelenlétében DNS-polimerázt adnak a klón-DNS-hez, hogy megjelöljék a próbát. A jelölt próbát ezután denaturálják, és hibridizáltatják a Southern-blothoz. Ahol a próba komplementer szekvenciát talál, kötődik, és így radioaktív jelölést kap a kérdéses gént tartalmazó fragmentum. Végül pedig autoradiográfiával láthatóvá tehető a jelölt DNS-fragmentumok.

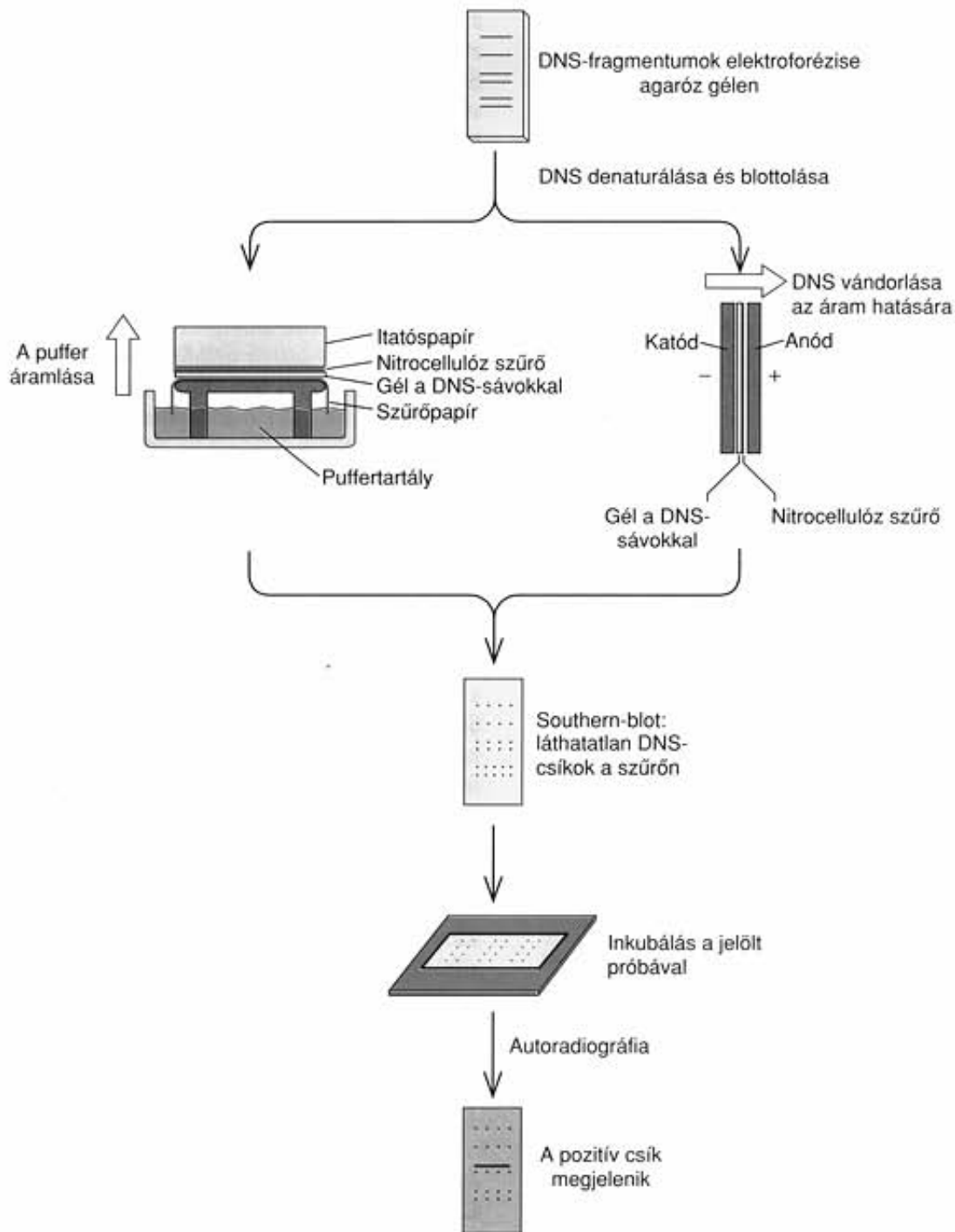
Ha csak egy ilyen sávot találnak, a magyarázat viszonylag egyszerű, valószínűleg csak egyetlen, a cDNS-sel megegyező gén van a genomban. Több csík esetén minden bizonnyal több példány is van, de nehéz megmondani, pontosan hány. Egy gén is adhat egynél több jelölt csíkot, ha az alkalmazott restriktív enzim egynél több fragmentumra vágja. Ennek a hibának a lehetőségét minimálisra csökkenti, ha rövid próbát, a cDNS 100–200 bázispárnyi restriktív fragmentumát használják. Így esély van arra, hogy ilyen rövid DNS-en belül ne vágjon az a restriktív enzim, amelyik csak átlagosan 4000 bázispáronként hasítja a DNS-t.

A génaktivitás meghatározása DNS-próbával

Tegyük fel, hogy van egy klónozott cDNS-ünk, és szeretnénk megtudni, milyen aktivitással íródik át a megfelelő gén (X) egy élőlény (Y) különböző szöveteiben. A kérdést többféleképpen is megválaszolhatjuk, de az itt leírt módszerrel a gén által kódolt mRNS méretét is meghatározhatjuk.

Először az adott szervezet különböző szöveteiből RNS-t preparálnak. Majd az RNS-eket agaróz gélelektroforézissel elválasztják, és egy alkalmas hordozóra blotolják. Mivel a hasonló DNS-blot a Southern-blot nevet kapta, az RNS-blot neve **Northern-blot**. (Ennek megfelelően a fehérjeblotot Western-blotnak nevezik.)

Ezután a Northern-blotot radioaktív cDNS-próbával hibridizáltatják. Ahol komplementer mRNS van a bloton, ott a próba hibridizál, és a jelölődött sáv autoradiográfiával kimutatható.



15.18. ábra. Southern-blot készítése. Először elektroforézissel agaróz gélen elválasztják a DNS-fragmentumokat. Ezután lúgos denaturálás következik, majd az egyfonalassá vált DNS-t a gélből (sárga) nitrocellulóz lapra (piros) vagy más alkalmas szűrőre viszik át. Az átvitel kétféle módszerrel történhet: diffúzióval (*balra*), amikor a gélen átáramló puffer viszi magával a DNS-fragmentumokat, vagy elektroforézissel (*jobbra*). A lenyomatot ezután radioaktívan jelölt próbával hibridizáltatják, és a jelölt sávokat autoradiográfiával azonosítják

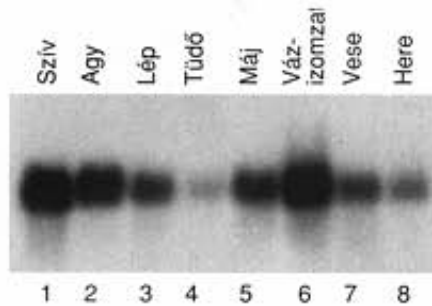
Ismert méretű RNS-ek párhuzamos elválasztásával a kérdéses mRNS mérete is megállapítható.

A Northern-blot arról is tájékoztat, milyen aktívan íródik át az X gén. Minél több RNS van ugyanis a csíkban, annál több próbát köt meg, annál sötétebb lesz a csík a filmen. A sötétedés mértéke az abszorbeált fénymennyiség alapján denzitométerrel meghatározható. A 15.19. ábrán egy Northern-blot látható,

amelyen a patkány nyolc különböző szövetéből származó RNS-t hibridizáltattak a szénhidrát anyagcserében részt vevő glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzim (G3PDH) jelzett próbájával. A mérés alapján ez a gén legintenzívebben a szív- és a vázizomzatban, leggyengébben a tüdőben működik.

A Southern- és a Northern-blot vizsgálatokban hagyományosan radioaktívan jelölt próbákat használnak. A jelzett DNS-be

radioaktív nukleotidokat építenek be, így alakítják ki a jelölést. A lenyomathoz hibridizálva ezek adják az autoradiográfiával kimutatható radioaktív csíkokat. A módszer még mindig elterjedt, de mivel a radioaktív anyagokkal végzett munka veszélyes és speciális képzést igényel, valamint gondoskodni kell a radioaktív



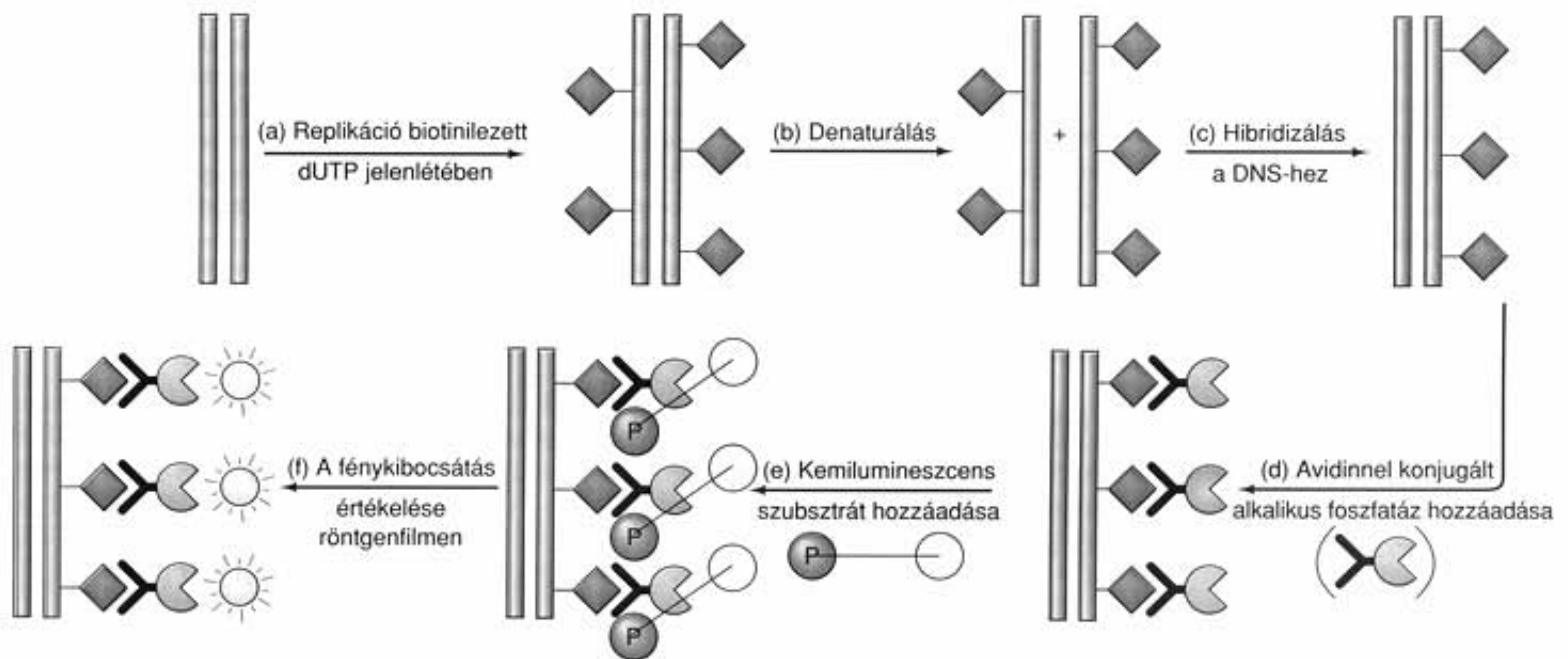
15.19. ábra. Northern-blot. Patkány különböző szöveteiből poli(A)⁺ RNS-eket izoláltak, majd azonos mennyiségeiket elektroforézissel elválasztották, és Northern-blotot állítottak elő. A lenyomatot hibridizáltatták a patkány gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (G3PDH) génjének radioaktív próbájával, majd autoradiogramot készítettek. A sávok a G3PDH mRNS helyén jelennek meg, és intenzitásuk jelzi az mRNS mennyiségét az egyes szövetekben
Clontech

hulladék kezeléséről is, egyre inkább növekszik a nem-radioaktív jelölések népszerűsége.

A 15.20. ábra a nem-radioaktívan jelölt próbák készítésének egyik módját, a biotin-sztreptavidin-AP indirekt detektálási eljárást vázolja. Először a DNS-t biotinnal konjugált nukleotidok jelenlétében DNS-polimerázzal *in vitro* replikáltatják, így biotinilezett DNS-t állítanak elő. A következő lépésben a jelölt DNS-t inkubálják a blottal, ahol az egy vagy több sávval hibridizál. Ezután a blotot egy komplexszel reagáltatják, amely alkalikus foszfatázhoz (AP) kapcsolt sztreptavidint tartalmaz. A sztreptavidin specifikusan és erősen kötődik a biotinhoz. A biotinilezett próba és az AP-konjugált sztreptavidin kölcsönhatásával tulajdonképpen egy AP-jelket kötnek a blot reagáló csíkjaihoz. A következőkben AP szubsztrátot, például AMPPD-t adnak a rendszerhez. Amikor az alkalikus foszfatáz egy foszfát-csoportot eltávolít erről a molekuláról, az kemilumineszcenciává válik. A kemilumineszcenciás jel is kimutatható röntgenfilmmel. A film megfeketedik a blot reagáló csíkjainál, pontosan úgy, mint az autoradiogramon.

Gének lokalizálása a kromoszómákon DNS-próbák segítségével

Az 5. fejezetben már bemutattunk néhány olyan módszert, amelyekkel megállapítható, hogy melyik kromoszómán van egy adott



15.20. ábra. Nukleinsavak kimutatása nem-radioaktív próbával. Ez a módszer általában indirekt eljárás. A keresett nukleinsavat jelölt próbával reagáltatják, aminek kötődését annak alapján mutatják ki, hogy valamilyen színes vagy fényt kibocsátó vegyületet termel. Az ábrán vázolt eljárás lényege a következő: (a) A DNS-próbát biotinnal konjugált dUTP jelenlétében replikáltatják, így biotinnal jelölt DNS-próbát állítanak elő. (b) A próbát denaturálják, (c) majd hibridizáltatják a kimutatni kívánt DNS-sel (piros). (d) A hibridhez avidinnel konjugált alkalikus foszfatázt adnak (zöld). Az avidin szorosan és specifikusan kötődik a próba biotinjához. (e) A rendszerhez az alkalikus foszfatáz olyan foszforilált szubsztrátját adják, amelyik kemilumineszcenciává válik, amikor az enzim hidrolizálja foszfát-csoportját. (f) A kemilumineszcencia helyét röntgenfilmmel azonosítják

emberi gén. A vizsgálathoz radioaktívan vagy más módon jelölt DNS-próbák is használhatók. A próbát a kromoszómákhoz hibridizáltatják, és így keresik meg, melyik kromoszómán van az adott gén. Az ilyen *in situ* hibridizáció lényege a következő: az emberi sejtből származó kromoszómákat szétterítik, majd részlegesen denaturálják a DNS-t, hogy egyfonalas régiók alakuljanak ki, amelyekkel hibridizálhat a jelölt próba. Ha a próba radioaktív vagy biotinilezett, akkor autoradiográfiával mutatják ki a jelölést a preparátumon a kromoszómák megfestése és hibridizálása után. A festéssel a kromoszómákat tesszük láthatóvá és azonosíthatóvá, az autoradiogram pedig a gén helyét mutatja meg.

Más módszerek is léteznek a próbák jelölésére. A 15.21. ábrán az izom glikogén foszforiláz génjének helye látható az emberi 11-es kromoszómán. Az eljárás során dinitro-fenollal jelölt DNS-próbát használtak, a kötődött dinitro-fenolos próbát specifikus ellenanyaggal reagáltatták, majd az ellenanyagot egy másik, ellene termeltetett, fluoreszcens jelölést (fluoreszcein-izotiocianát – FITC) hordozó antitesttel mutatták ki. A kromoszómákat propidium-jodiddal festették, ezért azok vörös színnel fluoreszkálnak. A vörös háttéren jól látszik a sárgán fluoreszkáló FITC-hez kapcsolódott ellenanyag helye a 11-es kromoszómán. Az ismertett eljárás neve **fluoreszcens in situ hibridizáció**, röviden **FISH**.



15.21. ábra. Egy gén helyének azonosítása a kromoszómán *in situ* hibridizációval. Az emberi vázizom glikogén foszforiláz enzimének génjére specifikus DNS-próbát dinitro-fenolhoz (DNP) kapcsolnak. A szétterített kromoszómákat részlegesen denaturálják, hogy egyfonalas régiók alakuljanak ki rajtuk, amelyek hibridizálhatnak a próbával. A DNP-vel jelölt próbával reagáló helyeket indirekt eljárással mutatták ki: nyúlban termeltetett anti-DNP antitestet reagáltattak a próbához kapcsolt DNP-vel. Ezután kecskében termeltetett, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) kapcsolt anti-nyúl antitestet reagáltattak a DNP-hez kötődött nyúl antitesttel. A FITC jellegzetes sárga színnel fluoreszkál. Ezért a kromoszómákon azok a helyek, ahová a próba hibridizálódott, élénksárga pontként jelennek meg. A háttérrel a propidium-jodiddal festett, piros színnel világító kromoszómák adják. A vizsgálat a 11-es kromoszómán mutatta ki a glikogén foszforiláz enzim génjét

Forrás: P. Lichter: High Resolution Mapping of Human Chromosome 11 by *in Situ* Hybridization with Cosmid Clones, *Science*, 247:64, 1990. jan. © 1990 AAAS

A klónozott DNS-ek kitűnő próbák, mert ugyanolyan vagy nagyon hasonló szekvenciájú DNS-hez és RNS-hez hibridizálhatók. Megjelölhetők radioaktív izotóppal, de nem-radioaktív jelölés is köthető rájuk. A jelölt próbát Southern-bloton DNS-sel hibridizálva meghatározható a hasonló szekvenciájú DNS-fragmentumok mérete. A Northern-blot a komplementer RNS-ek méretének és mennyiségének megállapítására szolgál. A próbák teljes kromoszómákhoz is hibridizálhatók, ha a cél a gének helyének azonosítása.

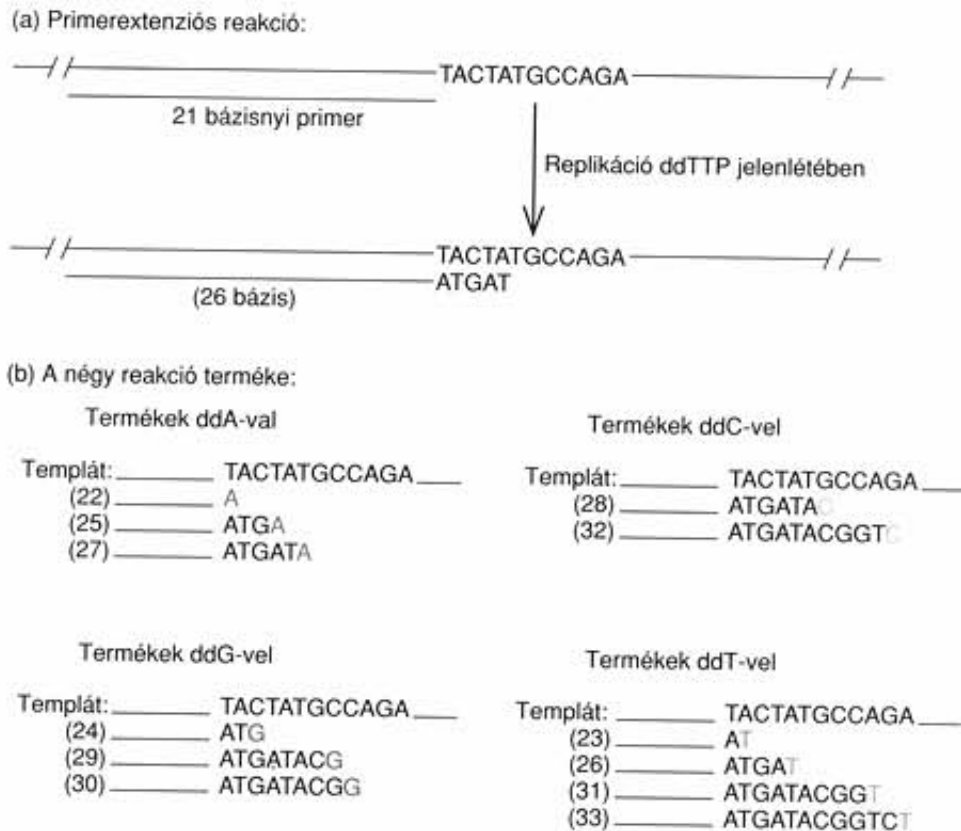
A GÉNEK BÁZISSORRENDJÉNEK MEGHATÁROZÁSA

Alan Maxam és Walter Gilbert, valamint Frederick Sanger és munkatársaik 1975-ben két módszert dolgoztak ki a DNS-láncok pontos bázissorrendjének meghatározására. Ez óriási áttörést jelentett a molekuláris biológiában. Sokkal gyorsabbá vált egy gén finomszerkezetének kiderítése, mint bármilyen más eljárással.

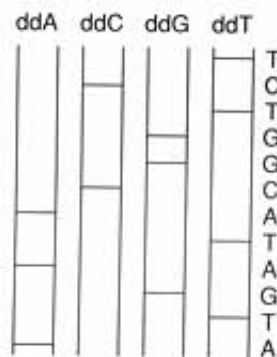
Vizsgáljuk meg a Sanger-módszer széles körben használt, továbbfejlesztett változatát. A DNS bázissorrendjének meghatározásakor a kiindulás ugyanaz, mint a helyspecifikus mutagenézisnél (15.22. ábra). A DNS-t vektorba klónozzák, például az M13 fágba vagy egy fágmidba, hogy egyszálú DNS-hez jussanak. Az egyszálú DNS-hez egy körülbelül 20 bázisnyi oligonukleotid primert hibridizáltatnak. A primert úgy tervezték meg, hogy éppen a vektor sokszoros klónozóhelye mellett kötődjön, és 3' vége a klónozóhelyre beépített DNS felé nézzen.

A primertől kiindulva a Klenow-fragmentummal szintetizáltatják (primer extenzió) az inszerttel komplementer DNS-szálat. A Sanger-módszer lényege, hogy a DNS-szintézist négy külön kémcsőben végzik, és mindegyikbe más DNS-szintézist leállító terminátort tesznek. A terminátor egy **didezoxi-ribonukleotid**, például a **didezoxi-ATP (ddATP)**. Ezekben a vegyületekben a szabályos DNS-prekursoroktól eltérően a pentóz 3' C-atomjáról is hiányzik az oxigén. A nukleotid ezért nem képes foszfodiészter-kötés kialakítására, tehát ahol beépül a láncba, ott megszakad a DNS-szál növekedése (lánc-termináció).

Ha csak didezoxi-ribonukleotidokat adnának a rendszerhez, egyáltalán nem szintetizálna DNS. Ezért a rendszerbe főlegesen kell tenni a szabályos dezoxiribonukleotidokat, és annyi didezoxi-ribonukleotidot, hogy a lánc szintézise csak időnként álljon le. Mindegyik kémcsőhöz másféle didezoxi-ribonukleotidot adnak. Az elsőbe ddATP-t, így a szintézis az



(c) A termékek elektroforézise:



15.22. ábra. Sanger didezoxi láncterminációs DNS-szekvenáló módszere. (a) Primertől induló DNS-szintézis (primer extenzió). A szekvenálandó egyszálú DNS-hez primert hibridizáltaknak, jelen esetben 21 bázisnyit, majd dNTP keverék és DNS-polimeráz I Klenow-fragmentum hozzáadásával megkezdik a replikációt. Egyféle didezoxi-ribonukleotidot is adnak a rendszerhez, hogy az beépülve néhány nukleotid után megszakítsa a láncc növekedését. A bemutatott példában ddTTP szerepel, ami a második pozícióban, ahol dTTP-re lett volna szükség, állította le a replikációt. (b) A négyféle reakció termékei. Mindegyik esetben a felső sorban látható a templát szál, alatta a lehetséges termékek. Mindegyik termék 21 tagú primerrel kezdődik és annak 3' végéhez kapcsolódó, különböző hosszúságú nukleotidsorból áll. Az utolsó bázis mindig az adott didezoxi-ribonukleotid (színes), ami leállítja a növekedést. A fragmentumok elején zárójelben a nukleotidegységek száma olvasható. Az ábrázolt fragmentumok 22–33 nukleotidból állnak. (c) A termékek elektroforézise. A négy reakcióban keletkezett keverékeket párhuzamosan egymás mellett elhelyezett, nagy feloldású poliakrilamid géltre viszik fel, és méretük szerint elválasztják a fragmentumokat. A gél alján található a legrövidebb, 22 bázisnyi fragmentum, az A sávban; a következő 23 bázisnyi a T sávban stb. Hasonló módszerrel továbbhaladva a DNS bázissorrendje leolvasható a sávokról. Természetesen a nukleotidsorrend komplementere a templáténak

adeninoknál áll le. A másodikba ddCTP-t, ami a citozinoknál állíthatja le a polimerizációt és így tovább. Ezenkívül mindegyik kémcsőbe radioaktívan jelölt dATP-t tesznek, hogy a DNS jelölődjön is.

A reakció eredményeként mindegyik kémcsőben különböző hosszúságú fragmentumok sorozata képződik. Az első kémcsőben mindegyik A-ra, a másodikban C-re, a harmadikban G-re, a negyedikben T-re végződik. Ezután a négy keverék fragmentumait párhuzamos mintahelyeken, nagy feloldású poliakrilamid gélen elektroforézissel szétválasztják, majd autoradiográfiával láthatóvá teszik a fragmentumokat, amelyek a röntgenfilmen vízszintes csíkok formájában jelennek meg.

A 15.22. (c) ábrán egy szekvenáló film sémája látható. A szekvencia leolvasását alulról felfelé végzik, tehát megkeresik a legalsó csíkot. Ebben az esetben ez a csík az A mintahelyen található, tehát a rövid fragmentum A-ra végződik. A következő, egy bázissal hosszabb fragmentum egy csíkkal feljebb található, mivel az elektroforézis feloldóképessége olyan jó, hogy egyetlen nukleotidnyi eltérést is kimutat a fragmentumok között. A második fragmentum tehát egy bázissal hosszabb az elsőnél és a T sávban van, vagyis T-re végződik. Eddig tehát AT a szekvencia. A leolvasást addig folytatják felfelé, amíg elkülöníthető csíkok a filmen. A szekvenciát az ábra jobb oldalán tüntették fel. Először természetesen az a szekvencia jelenik meg, amelyik a vektor sokszoros klónozóhelyének darabkájára jellemző. De egy nem túlságosan hosszú rész után a szintetizált DNS-lánc már az ismert mindeddig ismeretlen szekvenciájának felel meg. A szekvenálásban jártas szakemberek néhány száz bázisnyi szekvenciát tudnak leolvasni egy filmről.

A 15.23. ábrán egy jellegzetes szekvenáló film látható. A legrovidebb fragmentum csíkja (*lent*) a C mintahelyen van. Ezután hat csík követi egymást az A mintahelyen, tehát a szekvencia eleje: CAAAAAA. Erről a filmről még sok bázis olvasható le.

Ez az ún. „kézi” szekvenálási eljárás pontos, de lassú. Ha valóban nagy DNS-mennyiséget kell szekvenálni, mint például az emberi genom 3 milliárd bázispárja, akkor gyors, automatizálható módszer szükséges. Éppen ezért ma már automata szekvenálók is működnek. A 15.24.(a) ábra az egyik ilyen technikát szemlélteti. Ennek is a Sanger-féle láncterminációs módszer az alapja, a négy reakcióelegy a már említett négy ddNTP-t (ddA, ddC, ddG, ddT) tartalmazza, de mindegyikhez más-más fluoreszcens molekulát is kapcsolnak. Ezért gerjesztés hatására különböző színekben fluoreszkálnak. A láncterminációs reakció és a lánctermináció után összekeverik a négy reakcióelegyet, és ugyanazon a gélen választják szét a fragmentumokat elektroforézissel (15.24.(b) ábra). A gél aljának közelében egy analizátor lézersugárral gerjeszti az elhaladó fluoreszcens nukleotidokat, és a kibocsátott fény hullámhossza alapján egy detektor azonosítja azokat. Az információt számítógép értékeli, bázisazonosítóként használva a színeket. Ha például kék színt érzékel a detektor, ez jelentheti a didezoxi-citozint, amiből következik, hogy a kérdéses fragmentum C-ra végződik. A zöld jelezheti az A-t, a narancssárga a G-t, a vörös pedig a T-t.

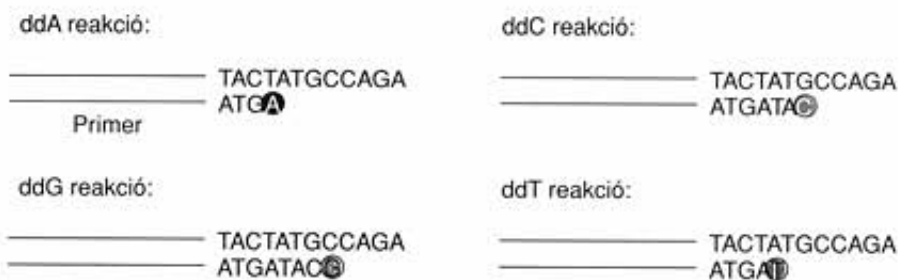


15.23. ábra. Jellegzetes DNS-szekvenáló film. A szekvencia kezdete: CAAAAACGG. Hogyan folytatódik? Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD engedélyével

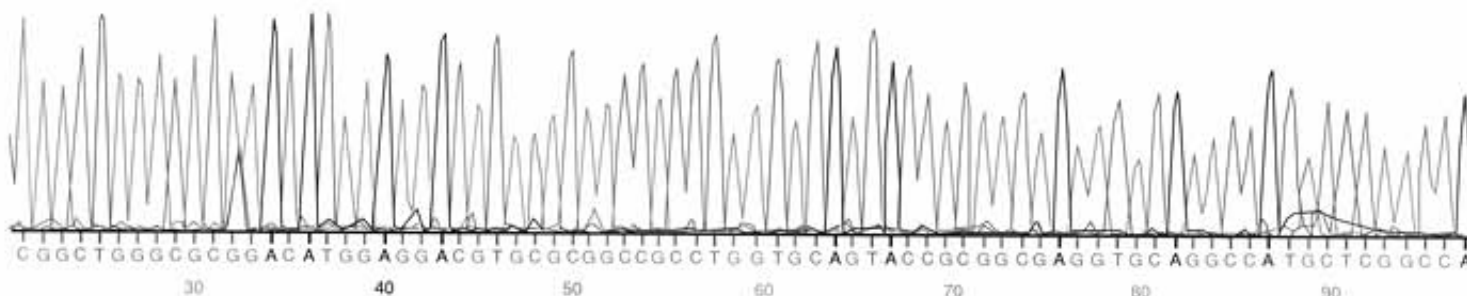
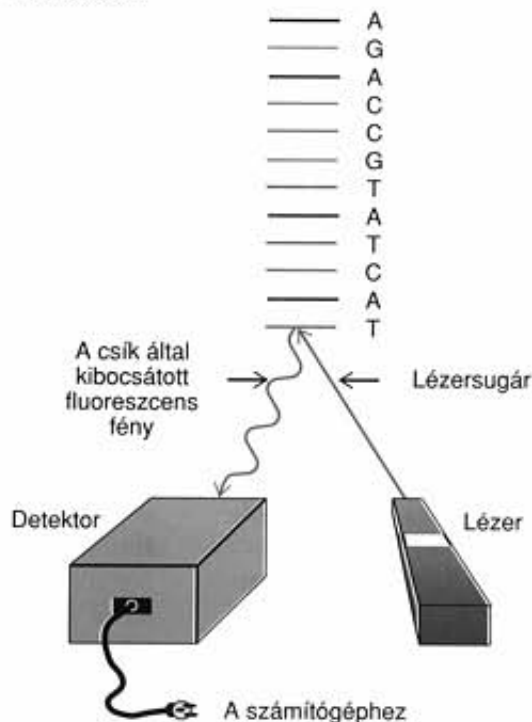
A számítógép kinyomtatja mindegyik, a detektor előtt áthaladó fluoreszcens csík denzitométeres profilját, összeveti a bázisok színekódjaival (15.24.(c) ábra), és memóriájában tárolja a bázis-szekvenciát.

A klónozott gének olyan homogén DNS-molekula populációkat biztosítanak, amelyekből lehetővé válik a nukleotidszekvencia meghatározása. A Sanger-módszer didezoxi-ribonukleotidokat használ a DNS-szintézis véletlenszerű megszakítására. A keletkező fragmentumok méretük alapján elektroforézissel választhatók szét egymástól. A fragmentumok utolsó bázisa ismert, mert tudják, melyik didezoxi-ribonukleotid állította meg a replikációt. A fragmentumokat méretük szerint sorba rendezik – mindegyik fragmentum egy (ismert) nukleotiddal hosszabb az előzőnél –, és megkapják a DNS bázissorrendjét.

(a) Primerextenziós reakciók:



(b) Elektroforézis:



(c) **15.24. ábra.** Automatizált DNS-szekvenáló eljárás. (a) A primerextenziót ugyanúgy végzik, mint a kézi eljárásnál, annyi eltéréssel, hogy a reakcióelegyekbe más-más, eltérő szint kibocsátó, fluoreszcens molekulával jelölt dideoxi-ribonukleotidot adnak. Az ábrán mindegyik elegyre csak egy lehetséges terméket tüntettünk fel, de természetesen az összes többi is kialakul, hasonlóan a kézi eljáráshoz. (b) Elektroforézis és a csíkok azonosítása. A reakciótermékeket méretük szerint gélelektroforézissel választják szét. A megjelenő csíkoknak szinkódjuk van aszerint, hogy melyik terminációs reakcióban képződtek (jelen esetben fekete színűek azok az oligonukleotidok, amelyeknek szintézisét ddA zárta le, kékek, amelyeket ddC stb.). Lézerfényvel gerjesztik a gél alján áthaladó oligonukleotidok fluoreszkáló jelzőmolekuláját, a detektor pedig elemzi az egyes csíkok által kibocsátott fény színét. Az információt számítógép dolgozza fel, és alakítja át bázissorrenddé. (c) Az automata DNS-szekvenáló műszer által kinyomatott információ. Mindegyik színes csúcs egy-egy, a lézersugáron áthaladó DNS-fragmentum fluoreszcenciájának intenzitását jelzi. (A csúcsok színe, illetve az (a) és (b) ábrarészen szereplő színeket a láthatóság érdekében választottuk, és nem biztos, hogy megegyeznek a kísérletekben alkalmazott színekkel.)

A DNS-SZEKVENÁLÁS A GÉNTÉRKÉPEZÉS VÉGÁLLOMÁSA

Többször említettük már a hagyományos géntérképezési eljárásokat. A genetikai térképezés végső célja azonban a gének pontos bázissorrendjének felderítése, ami már sok ezer gén esetében sikerült is. Ugyanígy egy vírus vagy valamilyen más szervezet esetében is a géntérképek készítésekor a cél a teljes genom bázisszekvenciájának meghatározása. Ez több vírus, közöttük fágok, két baktériumfaj és az élesztő esetében már megvalósult. (1999 nyarán közölték a *Caenorhabditis elegans* genomjának nukleotidszekvenciáját is).

Az első bakteriofág, amelynek teljes bázissorrendjét felderítették, a ϕ X174 volt. Frederick Sanger 1977-ben határozta meg a fág 5375 nukleotidból álló egyszálú, cirkuláris DNS-ének szekvenciáját.

Milyen információkra tehetünk szert egy szekvenciából? Először is, pontosan meg tudjuk határozni a gének kódoló régióit. Ennek alapján megismerjük a gének egymáshoz való térbeli viszonyát, távolságát (nukleotidokban), még hozzá a rekombinációs gyakoriságokból származó becslések bizonytalansága nélkül. Hogyan ismerhető fel a kódoló régió? **Nyitott leolvasási keret** (open reading frame – ORF) tartalmaz, olyan nukleotidsorrendet, ami ha ugyanabban a keretben íródik át, viszonylag hosszan nem tartalmaz translációs stopjelet, tehát már kódolhat egy fágfehérjét. Ezenfelül a translációs startjelnek (AUG, néha GUG) megfelelő ATG (néha GTG) triplettel kezdődik. Más szóval, a nyitott leolvasási keret megfelel a gén kódoló régiójának.

A fág-DNS bázissorrendjének ismeretében megállapíthatjuk a fág fehérjéinek aminosavsorrendjét is. Csak a genetikai kódot kell alkalmazni, és lefordítani a nyitott leolvasási kerete-

ket aminosavsorrendekre. Így leírva nagyon fáradtságosnak tűnik, de ma már a számítógépes programok mindezt pillanatok alatt elvégzik.

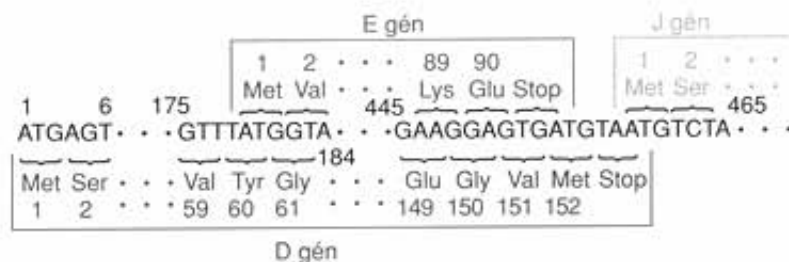
A ϕ X174 DNS-ét elemezve, Sanger nagyon meglepő és érdekes dolgot derített ki: néhány fág gén átfedi egymást! A 15.25.(a) ábráról leolvasható, hogy a B gén kódoló régiója az A génen belül van, az E géné pedig a D szekvenciáján belül. A D és a J gén is átfed, igaz, csak egy bázispár erejéig. Hogyan lehet azonos helyen két gén, és hogy kódolhat mégis különböző fehérjéket? A válasz az, hogy leolvasási keretük eltérő (15.25.(b) ábra). Minthogy két keretbe téve teljesen más jelentésű kodonok követik egymást, a két fehérje is gyökeresen eltérő lesz.

Ez nagyon érdekes felfedezés volt, és rögtön felvetette azt a kérdést, hogy mennyire általános ez a jelenség. Eddig a vírusok körében találtak nagyobb átfedésekkel bíró géneket, ami nem meglepő, hiszen ezeknek az egyszerű genetikai rendszereknek kicsi a genomjuk, és így hatékonyabban használhatják ki a genetikai anyagot. Rendkívül hatékony replikációjuk miatt a vírusok mögött olyan elképesztően nagyszámú generáció áll, ami alatt az evolúció már csaknem tökéletesre csiszolhatta a genomjukat.

Az automata szekvenálás bevezetésével már sokkal nagyobb genomok szekvenciája is meghatározhatóvá vált. 1995-ben Craig Venter és Hamilton Smith munkatársaikkal két baktérium, a *Haemophilus influenzae* és a *Mycoplasma genitalium* genomjának bázissorrendjét határozták meg. A *Haemophilus influenzae* R₄ törzsének genomja 1 830 137 bázispár, és ez volt az első olyan szabadon élő szervezet, amelynek genomja ismertté vált. 1996 áprilisában jelentette be az erre a célra létrehozott nemzetközi laboratóriumi konzorcium a következő mérföldkövet: szekvenálták az első eukarióta szervezet, a *Saccharomyces cerevisiae* 12 millió bázispáros genomját. Mire ezt a fejezetet olvassa, már az *Escherichia*



(a)



(b)

15.25. ábra. (a) A ϕ X174 fág genetikai térképe. A betűk a fág egy-egy génjét jelölik. (b) A ϕ X174 fág gének átfedő leolvasási keretei. A D gén (piros) az ábra 1-gyel jelzett bázisánál kezdődik és a 459. bázisig tart. Ez megfelel az 1–152 aminosavaknak és a TAA stopjelnek. A pontozás a fel nem tüntetett bázisokra, illetve aminosavakra utal. Csak a néma szálát ábrázoltuk. Az E gén (kék) a 179. nukleotidnál kezdődik és a 454. nukleotidig terjed, 90 aminosav kódját és a TGA stopjelet tartalmazza. A D gén leolvasási keretéhez viszonyítva az E gén kerete egy hellyel jobbra tolódott el. A J gén (szürke) a 459. bázisnál indul, és leolvasási kerete a D généhez viszonyítva egy bázisnyit balra tolódott

coli 4,2 millió bázispáros genomja is minden bizonnyal ismert lesz. Igaz ugyan, hogy genomjának mérete csak egyharmada az élesztő genomjának, de az *E. coli* olyan fontos modellszervezet a genetikában, hogy ezt is mérföldkönek tekinthetjük.

A ϕ X174 fág DNS-ének bázissorrendje alapján kimutatták, hogy génjeinek mindegyike kódoló régió, illetve nyitott leolvasási keret. Az is kiderült, hogy a fág gének közül kettő egy másik génen belül helyezkedik el. Ezek különböző fehérjéket kódolnak, mert transzlációjuk más leolvasási keretben történik. Két baktérium- és egy élesztőfaj teljes genomjának nukleotidszekvenciáját is felderítették.

FIZIKAI TÉRKÉPEZÉS

Mielőtt egy nagyméretű DNS szekvenálását elkezdenék, előzetes térképezési vizsgálatokat végeznek, útjelzőket keresnek, hogy azonosítani tudják, melyik részét is vizsgálják a DNS-molekulának. A markerek nem gének, hanem a DNS kis régiói – rendszerint restrikciós enzimek hasítási helyei. Az ilyen jellemzők alapján készített térkép, a **fizikai térkép**, de ha a markerek között csak restrikciós helyek szerepelnek, akkor **restrikciós térkép**.

A fizikai térképezés elvének megértéséhez először nézzük meg a 15.26. ábrán vázolt egyszerű példát. Induljunk ki egy 1,6 kb (1600 bp) nagyságú *Hind*III fragmentumból (15.26.(a) ábra). A molekulát egy másik restrikciós enzimmal (*Bam*HI) két darabra, egy 1,2 illetve egy 0,4 kb nagyságúra hasítjuk. Elektroforézissel meghatározzuk a méretüket (6. fejezet, 15.26.(a) ábra). Ez azt jelenti, hogy a *Bam*HI az 1,6 kb-nyi *Hind*III fragmentumot az egyik végétől 0,4 kb-nyira, a másiktól pedig 1,2 kb-nyira hasítja el.

Ezután tételezzük fel, hogy az 1,6 kb-nyi *Hind*III fragmentumot egy hipotetikus plazmid vektor *Hind*III helyére klónozzuk (15.26.(b) ábra). Ha a klónozás nem irányított, a fragmentum mindkét orientációban beépülhet a vektorba, a *Bam*HI-gyel a jobb (ábrán balra) vagy a bal (ábrán jobbra) oldalán. Miként állapítható meg egy adott klónban az inszert orientációja? Azonosítani kell a vektorban egy másik, aszimmetrikusan elhelyezkedő restrikciós helyet. A konkrét példában egy *Eco*RI felismerőhely található 0,3 kb-nyira a *Hind*III-tól. Ez azt jelenti, hogyha az ábra bal oldalán feltüntetett klónt *Bam*HI-gyel és *Eco*RI-gyel emésztjük, két, összesen 3,6 kb-nyi és egy 0,7 kb-nyi fragmentumot kapunk. Ha pedig az ábra jobb oldalán szereplő változatot emésztjük ugyanezzel a két enzimmal, akkor is két fragmentumot kapunk, de ezek mérete 2,8 kb és 1,5 kb. Elektroforézissel pedig megállapítható, hogy az adott klón esetében melyik igaz a két lehetőség közül (15.26.(b) ábra). Általában több klónból preparált DNS-t kezelnek két azonos enzimmal, a fragmentumokat pedig egymás mellett választják el, ismert nagyságú DNS-fragmentumok mellett. Rendszerint a klónok fele az egyik, a fele pedig a másik orientációjú. Hasonló gondolatmenettel oldjuk meg a következő térképezési feladatot!

KIDOLGOZOTT FELADAT

1. FELADAT

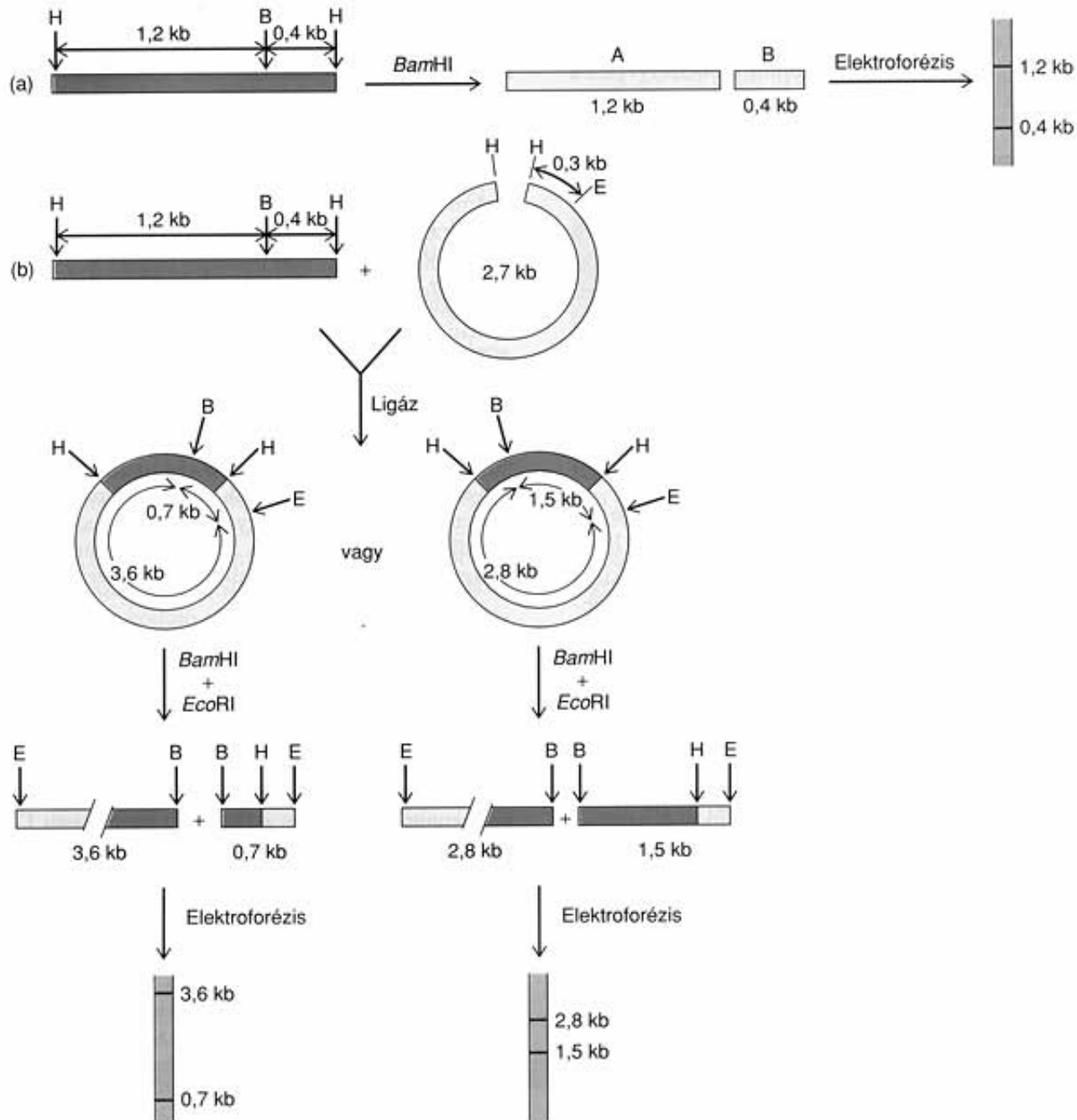
Ön egy 17 kb nagyságú, kétszálú, gyűrűs DNS-t térképez. A 15.27.(a) ábrán látható módon a *Hind*III ezt a DNS-t két helyen, két fragmentumra vágja, amelyek 11 kb (*Hind*III-A) és 6 kb (*Hind*III-B) méretűek. A *Pst*I szintén két helyen hasítja a gyűrűt, a kapott fragmentumok 12 kb (*Pst*I-A) és 5 kb (*Pst*I-B) nagyságúak. A 15.27.(b) ábrán látható a négy fragmentum hasítási mintázata, ha egy másik restrikciós enzimmal vágjuk. A *Hind*III-A darabot például a *Pst*I-gyel emésztve 7 és 4 kb-nyi fragmentumokat kapunk.

Állapítsa meg a négy hasítóhely elhelyezkedését a gyűrű alakú DNS-molekulán! Az egyszerűség kedvéért kezdje azzal, hogy a *Hind*III-B fragmentumot a kör jobb felső negyedébe helyezze el úgy, hogy az egyik *Hind*III restrikciós hely a kör tetején (12 óra irányába) legyen, a másik *Hind*III hely pedig, mondjuk 4 óránál legyen. A *Pst*I restrikciós helye pedig ezen a fragmentumon a 4 órás véghez legyen közelebb.

MEGOLDÁS

Csak kétféleképpen lehet elhelyezni a *Hind*III fragmentumokat egy körön, már csak azt kell eldönteni, hogy melyik a helyes. A felvázolt sémával a kisebbet (*Hind*III-B) már önkényesen a kör jobb felső részére helyeztük, a *Pst*I helyével a 4 órás végéhez közelebb. A megválaszolendő kérdés a *Hind*III-A fragmentum irányultsága: a *Hind*III-B fragmentum 12 órás vagy 4 órás végéhez van-e közelebb a *Hind*III-A *Pst*I restrikciós helye? A válaszhoz csak azt kell végiggondolni, melyik esetben mekkora *Pst*I fragmentumok keletkezhetnek. Először képzeljük a *Hind*III-A fragmentumon lévő *Pst*I helyet a 12 óra felőli végéhez közelebb, ahogyan a 15.28.(a) ábrán vázoltuk. Mivel ez a pont a *Hind*III helytől 4 kb-nyira van, és a *Hind*III-B-ben lévő *Pst*I hely ettől további 5 kb-ra, a *Pst*I-es emésztéssel 9 kb-os fragmentum keletkezne. Az egész plazmid 17 kb lévén, a másik *Pst*I fragmentum mérete ezért 8 kb-nyi lenne. Mi viszont nem ezt kaptuk! Valószínű, hogy a másik lehetőség a helyes. Ha a 15.28.(b) ábrának megfelelő elrendezéssel, a *Hind*III-A fragmentumon lévő *Pst*I hely a 4 órás véghez van közelebb, akkor a plazmidot a *Pst*I-gyel hasítva egy 5 kb-nyi (4 + 1) és egy 12 kb-nyi (7 + 5) fragmentumot várhatunk. Ezt is tapasztaltuk, tehát ez az utóbbi elrendezés a helyes.

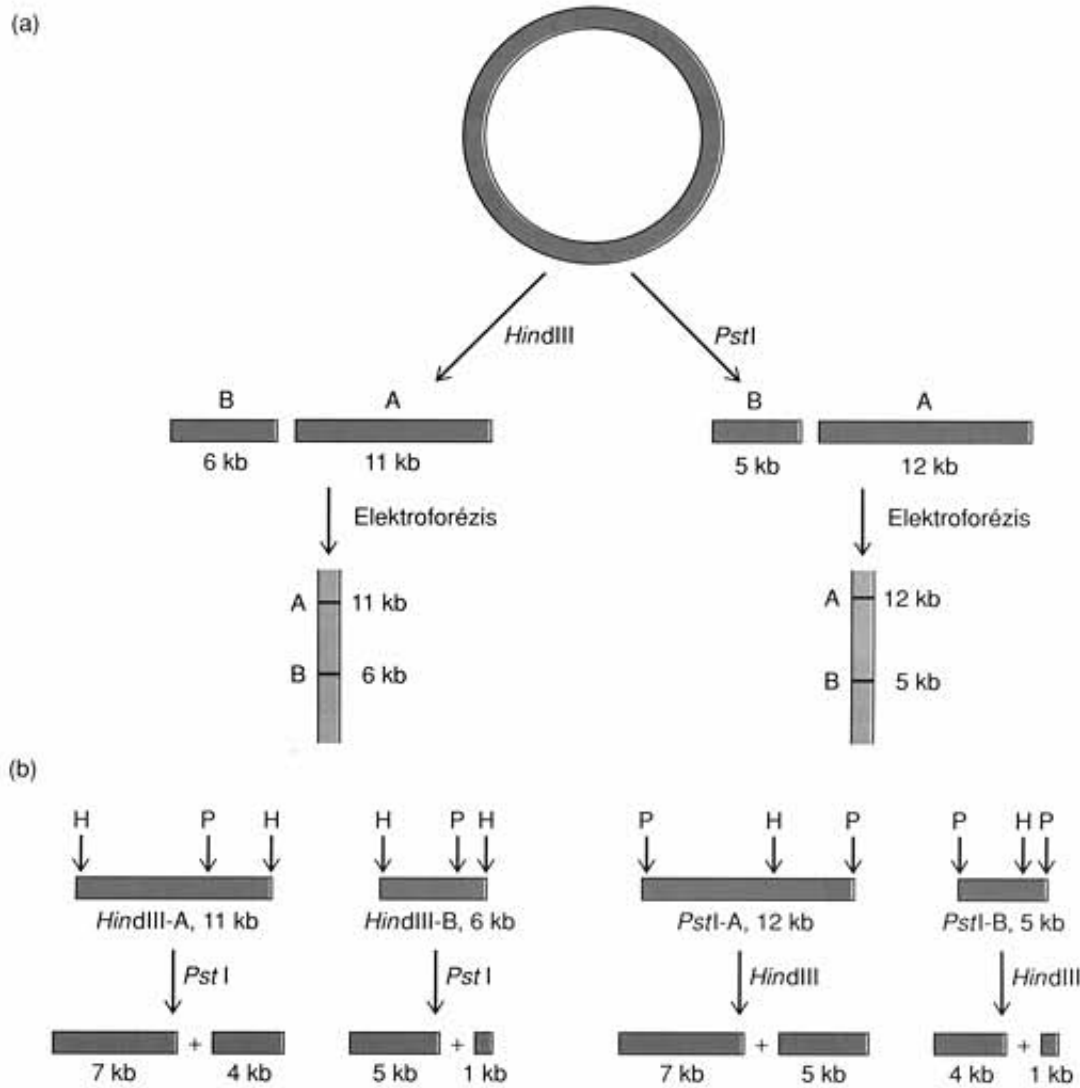
A fenti feladatok viszonylag egyszerűek, de ugyanezzel a logikával sokkal bonyolultabb térképezési problémák is megoldhatók. Néha egy restrikciós fragmentum jelölése (izotóppal vagy másképp) és hibridizáltatása egy másik enzimmal készített fragmentumok Southern-blotjához, segíthet elrendezni a fragmentumok közötti kapcsolatokat. Vizsgáljuk meg például a 15.29. ábrán látható lineáris DNS-t! A restrikciós helyek sorrendjére hibridizáció alkalmazása nélkül is következtethetünk, de ez nem egyszerű. Nézzük, hogyan segíthet itt a hibridizá-



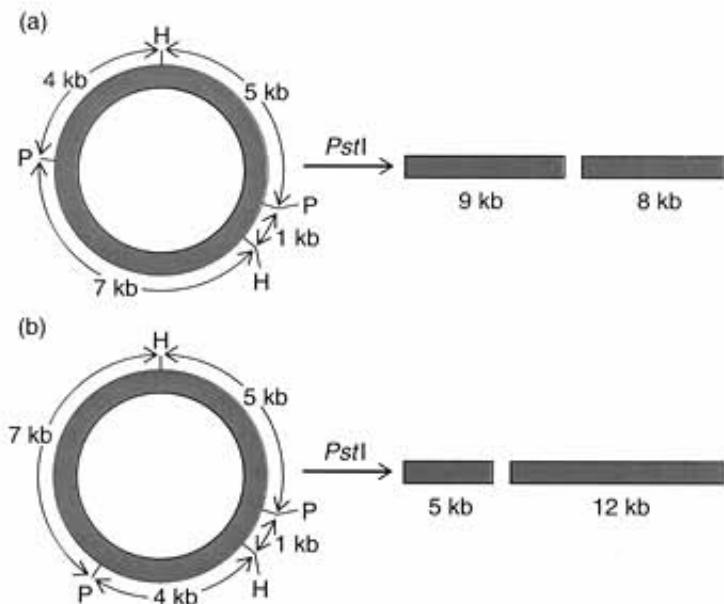
15.26. ábra. Egy egyszerű fizikai térképezési kísérlet. (a) A *Bam*HI restrikciós helyének meghatározása. Egy *Hind*III-mal előállított 1,6 kb méretű DNS-t a *Bam*HI enzim két részre hasítja. Ezek mérete az elektroforézis alapján 1,2 kb és 0,4 kb. Ez azt jelzi, hogy a *Bam*HI az eredeti *Hind*III fragmentumot egyetlen helyen vágta el, az egyik végétől 1,2 kb-nyi távolságra, a másik végétől pedig 0,4 kb-nyira. (b) A *Hind*III fragmentum irányultságának megállapítása egy klónozó vektorban. Ha az 1,6 kb-nyi *Hind*III fragmentumot egy vektor *Hind*III helyére klónozzuk, akkor az mindkét orientációban beépülhet: (1) a *Bam*HI hely a vektor *Eco*RI helyéhez közelebb vagy (2) attól távolabb lehet. Ezután el kell dönteni, hogy melyik a helyes. A DNS-t mindkét enzimmel, a *Bam*HI-gyel és az *Eco*RI-gyel is emésztjük, és a keletkező fragmentumok méretét elektroforézissel meghatározzák. Ha rövid, 0,7 kb méretű DNS jelenik meg, az azt jelenti, hogy a két kérdéses hasítóhely (*Bam*HI és *Eco*RI) egymáshoz közelebb található (balra). Ezzel szemben egy hosszú, 1,5 kb-nyi fragmentum megjelenése esetén a két restrikciós hely távolabb van egymástól (jobbra)

lás. Ha az *Eco*RI fragmentumokról Southern-blotot készítünk és hibridizáltatjuk jelölt *Bam*HI-A fragmentummal, akkor az *Eco*RI-A és az *Eco*RI-C fragmentumok jelölődnek. Ebből tehát megtudjuk, hogy a *Bam*HI-A átfedésben van a két *Eco*RI fragmentummal. Ha jelzett *Bam*HI-B-vel hibridizáltatjuk a blotot, akkor az *Eco*RI-A és *Eco*RI-D jelölődnek, tehát a

*Bam*HI-B fedésben van ezekkel. Végül azt kell kiderítenünk, hogy csak a *Bam*HI-A és a *Bam*HI-B hibridizálódik az *Eco*RI-A-val, tehát a *Bam*HI-A és a *Bam*HI-B az *Eco*RI-A fragmentumon szomszédosak. Ezt a megközelítési módot tovább alkalmazva darabonként összerakhatjuk az egész 30 kb-nyi DNS fizikai térképét.

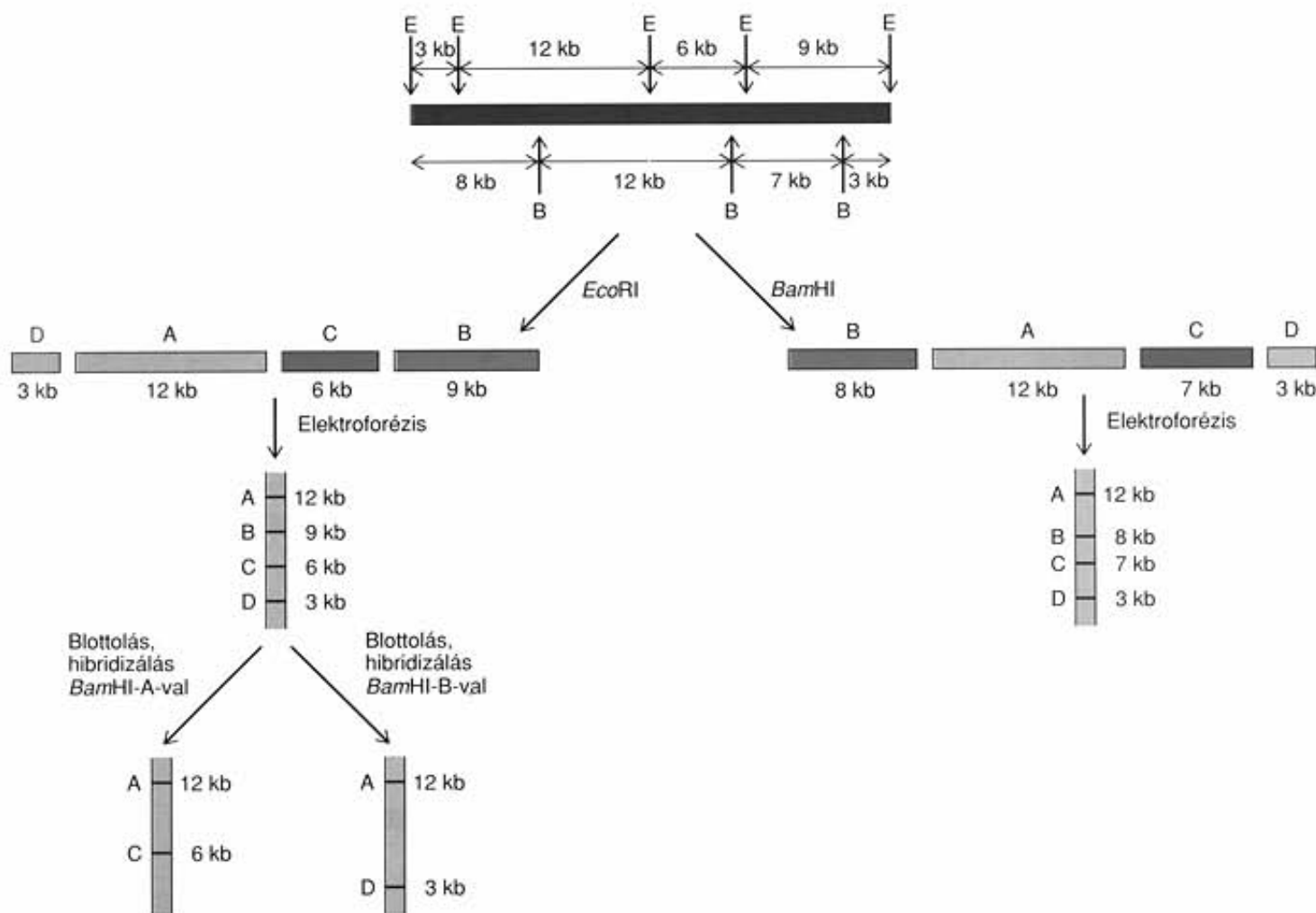


15.27. ábra. Ismeretlen DNS fizikai térképezése. H = *HindIII* hely; P = *PstI* hely



15.28. ábra. Ismeretlen DNS két lehetséges fizikai térképe. H = *HindIII* hely; P = *PstI* hely

A fizikai térkép megmutatja a különböző fizikai markerek, például a restrikciós helyek térbeli elrendeződését a DNS-molekulán. A restrikciós helyek térképezésénél a kérdéses DNS-t két vagy több restrikciós enzimmel, egymástól elkülönített reakciókban hasítják, a kapott fragmentumokat elválasztják egymástól és meghatározzák méretüket. Ezt követően a fragmentumokat egy másik restrikciós enzimmel darabolják, és megállapítják a szubfragmentumok méretét. A méretek segítségével megadható legalább néhány enzim felismerőhelyének egymáshoz viszonyított elhelyezkedése. Finomítja az eljárást, ha elkészítik néhány restrikciós enzimmel végzett hasítás Southern-blotját, majd a bloton levő fragmentumokat egy másik restrikciós enzimmel előállított, jelölt fragmentumokkal hibridizáltatják. Ezzel kimutatható az egyes fragmentumok közötti átfedés.



15.29. ábra. Southern-blotok alkalmazása fizikai térképezésnél. 30 kb méretű fragmentumot térképeznek, amelyet mind az *EcoRI* (E), mind a *BamHI* (B) három helyen hasít. A térképezéshez először az *EcoRI*-gyel hasítanak, és a keletkező négy fragmentumot elektroforézissel elválasztják egymástól (*EcoRI*-A, -B, -C és -D). Ezután Southern-blotot készítenek a fragmentumokról és hibridizálják a radioaktívan jelölt, klónozott *BamHI*-A és -B fragmentumokkal. Az eredmény az ábra bal alsó részén látható. A *BamHI*-A ezek szerint átfed az *EcoRI*-A és -C szakaszokkal, a *BamHI*-B pedig az *EcoRI*-A és -D szakaszokkal. Ezzel együtt elvégzik az *EcoRI* fragmentumok emésztését a *BamHI*-gyel, illetve fordítva. Így módon elkészítik a teljes restriktions térképet

KIDOLGOZOTT FELADAT

2. FELADAT

Egy hipotetikus fehérjerészlet – amelynek génjét klónozni szeretnénk – aminosavsorrendje a következő:

Arg-Leu-Met-Glu-Trp-Ile-Cys-Pro-Met-Leu

(a) Melyik öt aminosavból álló részlet adja azt a 17 tagú oligonukleotid próbát (beleértve a következő aminosav kodonjának első két bázisát is), amelyek a legkisebb mértékben degeneráltak?

(b) Hány különböző 17 tagú oligonukleotidot kellene szintetizálni, hogy bizonyosak lehessünk abban, hogy az elkészített próba tökéletes komplementere a klónozott gén adott szekvenciájának?

(c) Hány különböző 17 tagú oligonukleotidra lenne szükség akkor, ha a próba az optimális helytől (az [a] feladatrészen kiválasztottól) két kodonnal jobbra kezdődik?

MEGOLDÁS

(a) A genetikai kódszótár alapján határozzuk meg a felsorolt aminosav kódjainak degeneráltságát! Az eredmény:

6 6 1 2 1 3 2 4 1 6
Arg-Leu-Met-Glu-Trp-Ile-Cys-Pro-Met-Leu

az aminosavak fölötti számok a degeneráltság mértékét jelzik, vagyis az argininnek és a leucinnak 6-6, a metioninnak 1 kodonja van és így tovább. A következő lépés, hogy megtaláljuk az egymás után elhelyezkedő öt legkisebb degeneráltságú kodont. Gyors áttekintés után ez a szekvencia a Met-Glu-Trp-Ile-Cys.

(b) Hogy megállapítsuk, hány különböző 17 tagú oligomert kell készítenünk, szorozzuk össze az egyes pozíciókban szereplő lehetőségek számát. A kiválasztott öt aminosav esetén ez $1 \times 2 \times 1 \times 3 \times 2 = 12$. A következő aminosav, a prolin kodonjából csak a 16. és 17. tagja kerül ki az oligomernek, és 4 kodonja csak a harmadik bázisban különbözik (CCU, CCA, CCC, CCG). Ezzel megkaptuk, hogy öt kiválasztott aminosav alapján 12-féle 17 bázisból álló próbát kell készítenünk.

(c) Ha két aminosavval jobbra, a triptofánnal, kezdtük volna, a degeneráltság $1 \times 3 \times 2 \times 4 \times 1 = 24$ lenne, ezért 12 helyett ennyi próbát kellene szintetizálni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Ahhoz, hogy klónozhassanak egy gént, vektorba kell építeni és a vektorral együtt egy olyan gazdasejtbe juttatni, amelyben replikálódhat. A beépítéshez a vektort és a beépítendő DNS-t (inszert) ugyanazzal a restriktív endonukleázzal emésztik, hogy komplementer, ún. ragadós végeket alakítsanak ki. A baktériumokban használható klónozó vektorok: plazmidok és fágok.

A plazmidalapú vektorok közé tartoznak a pBR322 és a pUC plazmidok. A pBR322-n két antibiotikumrezisztencia gén található és egy sor egyszeres restriktív hely, ahová az inszert beépíthető. A legtöbb ilyen restriktív hely megszakítja az egyik antibiotikumrezisztencia gént, ami közvetlen szelekcióra ad lehetőséget. Még egyszerűbb a rekombinánsok szelekciója a pUC plazmidoknál. Ezekben ampicillinrezisztencia gén és olyan sokszoros klónozóhely van, amelyik megszakít egy részleges β -galaktozidáz gént, melynek terméke színreakció alapján könnyen kimutatható. A rekombinánsok az ampicillinrezisztens, β -galaktozidáz nem termelő klónok.

Két fágból fejlesztettek népszerű klónozó vektorokat. Elsőként a λ -fágból, amelyből néhány, nem létfontosságú gént eltávolítottak, hogy helyet biztosítsanak az inszertnek. A λ -vektorok egyes típusaiba 20 kb-nyi DNS is beépíthető. A kozmidok, a fág és a plazmid vektorok kombinációi, 50 kb-nyi DNS befogadására is képesek. Ezért különösen alkalmasak génkönyvtárak készítésére. A fág vektorok másik nagyobb csoportja az M13 fágoké. Ezek előnyös tulajdonsága a sokszoros klónozóhely, valamint az, hogy egyszálú rekombináns DNS-t termelnek, ami szekvenáláshoz és helyspecifikus mutagenézishoz használható. A fágmid nevű plazmidok egyszálú fág-DNS replikációs origóját tartalmazzák, így saját egyszálú másolataikat termelik.

Az expressziós vektorokat úgy szerkesztik meg, hogy a klónozott gén fehérjéje a lehető legnagyobb mennyiségben termelődjön. A génműködés optimumának elérésére ezekbe a vektorokba nagy hatékonyságú bakteriális promotereket és erős riboszóma-kötőhelyeket építenek, mert ezek a klónozott eukarióta génekből hiányozhatnak. A legtöbb ilyen vektor indukálható, hogy elkerüljék az idegen fehérje korai túltermelését, ami mérgezhetsé a gazdasejtet. Az expressziós vektorokban gyakran fúziós fehérjék képződnek, ezeknek hasznos tulajdonsága lehet nagyobb stabilitásuk, egyszerűbb izolálásuk. A klónozott génekből előre tervezett változtatások alakíthatók ki, amivel módosítani lehet a termelt fehérje aminosavsorrendjét.

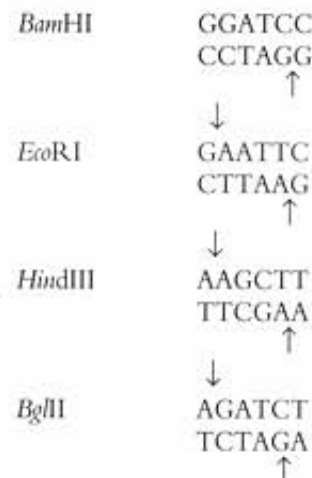
A klónozott DNS-molekulákat sokféle célra használják. Kiváló próbák, mert mind DNS-sel, mind RNS-sel hibridizálódhatnak, ha szekvenciájuk azonos vagy közel azonos. Így például azonosítani lehet velük egy meghatározott DNS-csíkot egy Southern-bloton, vagy egy RNS-t egy Northern-bloton. *In situ* hibridizálással megállapítható egy bizonyos gén helye is a kromoszómán. A klónozott

gének homogenitásuk miatt kiválóan alkalmasak a DNS bázis-szekvenciájának meghatározására is.

A DNS fizikai térképezése során jellegzetes pontok, például restriktív helyek egymáshoz viszonyított helyzet állapítják meg a molekulán.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. A *Xenobacterium giganticus* nevű hipotetikus baktérium egy restriktív endonukleázt termel. A konvencióknak megfelelően hogyan jelölné ezt az enzimet?
2. Az alábbi rövid DNS-szakasz egy hatbázisos palindrom szekvenciát tartalmaz, amely egy restriktív endonukleáz felismerőhelye. A DNS bázissorrendje: GACGATATCAACT. Keresse meg a felismerőhelyet!
3. Néhány restriktív endonukleáz 5-bázisnyi helyet ismer fel. Átlagosan milyen gyakran fordulhatnak elő az ilyen szekvenciák?
4. Négy restriktív endonukleáz felismerőhelyei az alábbiak:



Mind egyik a felső szál első két bázisa között, és az alsó szál utolsó két bázisa között hasít, ahogyan azt a nyilak jelölik. Melyik enzimpár képez komplementer ragadós végeket? Mi ennek a ragadós végnek a szekvenciája?

5. Tegyük fel, hogy két különböző DNS-t emészt, az egyiket *Bam*HI-lyel, a másikat *Bgl*II-vel! Az emésztés után ligázzal összekapcsolja a komplementer ragadós végeket. A ligálás után el lehet-e a két DNS-t választani egymástól a két restriktív enzim valamelyikével? Válaszát indokolja!
6. Rekombináns DNS-sel transzformál egy baktériumot, és véletlenül antibiotikumot egyáltalán nem tartalmazó táptalajra széleszti a transzformált sejteket. Mi lesz az eredmény? Miért?

7. A pBR322 *Bam*HI helyére akar beépíteni egy gént. Milyen antibiotikum felhasználásával tud szelektálni azok között a sejtek között, amelyek inszertet hordozó vagy inszert nélküli plazmidot vettek fel? (Segíthet a 15.2. ábra pBR322 térképe.)
8. Kimutatható-e antibiotikumokkal, hogy a pBR322 *Eco*RI helyére beépült-e idegen DNS? Válaszát indokolja!
9. Egy pUC18-hoz hasonló plazmid jó vektor lenne-e egy bonyolult szervezet géneknyvtárának elkészítéséhez? Válaszát indokolja!
10. A pUC18-hoz hasonló plazmid jó vektor lenne-e egy viszonylag egyszerű vírus géneknyvtárának összeállításához? Válaszát indokolja!
11. Borsó mRNS-einek felhasználásával készített cDNS könyvtárat a λ gt11-ben. A könyvtár 50 000 klónja közül azonosítani akarja a rubisco klónját. Ehhez rendelkezésre áll a dohány rubisco cDNS-e próbaként. A próba plakkhibridizálása során magasabb, alacsonyabb vagy azonos hőmérsékletet használna, mint amikor a dohány cDNS-ét egy dohány rubisco klónhoz hibridizáltatja? Miért?
12. Egy hipotetikus fehérjérszlet – amelynek génjét klónozni akarja – aminosavsorrendje a következő:

Pro-Arg-Tyr-Met-Cys-Trp-Ile-Leu-Met-Ser

- (a) Melyik öt aminosavnál szekvenciársz alapján készíthető el a legkisebb degeneráltsági fokú 14 tagú próba? (b) Hány különböző 14 tagú próbát kellene szintetizálnia, hogy biztos lehessen benne: próbája tökéletesen komplementer a klónozott gén kérdéses szekvenciájával? (c) Hányféle oligonukleotidot kellene elkészítenie akkor, ha a próbát egy aminosavval balra tolva kezdené az előző választásához (a) képest? A feladat megoldásához használja a kódszótárat!
13. Milyen feltételek esetén mellőzhető a ligálás, ha gazdasejtek transzformálásához rekombináns molekulát alakít ki? Miért?
 14. Mi az előnye egy expressziós vektor indukálhatóságának?
 15. Amikor λ gt11-et használunk cDNS-ek klónozó vektoraként, a beépült DNS-t a termelőző fúziós fehérje alapján is azonosíthatjuk, a 15.16. ábrán vázolt, ellenanyagot alkalmazó módszerrel. Hogy kivitelezhető legyen, a cDNS-nek helyes orientációban kell lennie, és ugyanabban a leolvasási keretben, mint az a λ -gén, amellyel fuzionálták. A szóban forgó gént hordozó λ gt11 cDNS klónok hányad része felel meg elméletileg ennek a kettős követelménynek? Miért?
 16. Egy gén részletének bázissorrendje és fehérje termékének aminosavsorrendje a következő:

Thr Asp Ala Val Gly
ACC GAT GCA GTG GGC

Helyspecifikus mutagenézissel akarja a gént módosítani úgy, hogy Ala helyett Ser-t kódoljon ebben a régióban. Milyen 15

tagú oligonukleotidot kellene készítenie primerként ehhez a kísérlethez? A megoldáshoz használja a kódszótárat!

17. Egy bizonyos állati vírus DNS-e gyűrűs és öt *Eco*RI restrikciós helyet tartalmaz. A fertőzött sejtek nagy mennyiségben termelik a vírus felületi fehérjéjét. Az mRNS alapján klónozták a fehérje cDNS-ét. Hogyan határozná meg Southern-blot segítségével, melyik *Eco*RI fragmentum tartalmazza a felszíni fehérje génjét?
18. Klónozza a petúnia egyik génjét, és szeretné megtudni, melyik szerv (levél, szár, gyökér, virág vagy mag), melyik szövetében íródik át a legnagyobb aktivitással. Hogyan alkalmazná a Northern-blotot a kérdés megválaszolására?
19. A 18. feladatban szereplő Northern-blot mit árul el még azon kívül, hogy melyik szövetben a legaktívabb a gén?
20. Keresse meg a leghosszabb nyitott leolvasási keretet az alábbi bázisszekvenciában!

CCAGATGCCTAAATGAGTTGGCCAGCAGAGCGAGCATGG
ATGTAATCAG

21. Egy 12 kb-nyi gyűrűs DNS-t két helyen hasít az *Eco*RI is és a *Hind*III is. Az *Eco*RI 7 és 5 kb-nyi, a *Hind*III 8 és 4 kb-nyi fragmentumokat képez. Az *Eco*RI-A fragmentumot a *Hind*IV két, 3 és 4 kb-nyi darabra, az *Eco*RI-B-t ugyancsak két, 1 és 4 kb-nyi darabra vágja. Vázolja fel a gyűrűs molekulát, mind a négy restrikciós helyel. Könnyítést jelent, ha az *Eco*RI-B fragmentumot a jobb felső negyedbe helyezi, egyik hasítási helyét 12 órához, a másikat pedig 5 órához. Ennek a fragmentumnak a *Hind*III helyét jelölje a 12 óras véghez közelebb. Jelezze a restrikciós helyek közötti távolságokat is!
22. Egy 3,5 kb nagyságú *Bam*HI fragmentumon lévő cDNS-t egy 4 kb-os expressziós vektor *Bam*HI helyére klónozza. A beépített inszerten van egy *Pst*I hely, 0,5 kb távolságra a jobb végétől, ha a néma szál orientációja a cDNS-en balról jobbra tart. A vektoron is van egy *Pst*I hely, 1 kb-sal jobbra a *Bam*HI helytől. A vektor promotere is balról jobbra, az óramutató járásával egyező orientációjú. Több klónt akar ellenőrizni, hogy melyikben található a cDNS megfelelő (az óramutató járasa szerinti) irányultsággal, hogy ezzel a vektor promotereinek vezérlése alá kerüljön. (a) Milyen restrikciós enzimet használna az ellenőrzéshez? (b) Milyen eredményt vár helyes orientáció esetén? (c) Fordított orientációban? (d) Vázolja fel a helyes irányultságú rekombináns plazmid diagramját! (Segítségét jelent, ha először a (d) feladatot oldja meg!)
23. Tanulmányozza a 15.29. ábrát! (a) Ha az *Eco*RI-es emésztéssel kapott fragmentumok (balra) Southern-blotját hibridizáltatja jelölt *Bam*HI-C-vel, milyen méretű csíkok jelölődnek? (b) Milyenek, ha a próba jelölt *Bam*HI-D volt?
24. Milyen méretű fragmentumok jelölődnének, ha a 15.29. ábra jobb oldalán lévő *Bam*HI emésztés fragmentumainak Southern-blotját hibridizáltatnánk a következő jelölt próbákkal: (a) *Eco*RI-A; (b) *Eco*RI-B; (c) *Eco*RI-C; (d) *Eco*RI-D?

25. Milyen típusú végeket (5' túlnyúló vég, 3' túlnyúló vég, tompa vég) képeznek az (a) *AluI*; (b) *PvuI*; (c) *MboI* enzimek? Milyen hosszúak a túlnyúló végek, ha egyáltalán vannak? Mindegyik restriktációs enzimmel történő hasítás után rajzolja le a kialakuló DNS-végeket! A megoldáshoz használja a 15.1. táblázatot.
26. Az alábbi DNS-szekvenciák közül melyek palindromok? Melyek a tükörszimmetrikus részeik?

- (a) TAAGCTTA
ATTCGAAT
- (b) GCGAAGCG
CGCTTCGC
- (c) GATCAGATC
CTAGTCTAG
- (d) GTTG
CAAC

A megoldások a könyv végén találhatóak.

16.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A klónozott gének termékei gyógyszerként és oltóanyagként használhatók.
- 2 A klónozott gének alkalmasak lehetnek az emberi betegségeket okozó hibás gének helyettesítésére.
- 3 Az előnyös tulajdonságokat kialakító klónozott gének bevihetők a természetett növényekbe és tenyésztett állatokba.
- 4 A molekuláris módszerek lehetővé teszik az összetett genomok, köztük az emberi genom részletes térképezését.
- 5 Néhány, emberi betegséget okozó gén térképezése.

A génklónozás gyakorlati alkalmazása és a genetikai térképezés

*Ó, drága új világ,
Amelyben ilyen nép van!*

William Shakespeare:
A vihar
(Babits Mihály fordítása)

A 15. fejezetben áttekintettük, hogyan lehet géneket klónozni és manipulálni, miként használhatók ezek a módszerek részletesebb vizsgálatokra. Arra is láttunk példát, hogy az expressziós vektorokba épített klónozott gének működnek. Ebben a fejezetben azzal foglalkozunk, hogyan alkalmazható mindez a gyakorlatban. Miként juttatnak be klónozott géneket az emberi szervezetbe a genetikai hibák kiküszöbölésére, vagy növényekbe és állatokba tulajdonságaik javítására. Végül szó lesz az emberi genom kutatásáról, azokról az eljárásokról, amelyekkel a kutatók nagy pontosságú genetikai térképeket készíthetnek, és arról, hogyan térképezték néhány fontos emberi betegség génjét.

KLÓNOZOTT GÉNEK TERMÉKEINEK FELHASZNÁLÁSA

Az expressziós vektorok tárgyalásakor láttuk (15. fejezet), hogy lehetségessé vált a baktériumok vagy más sejtek manipulálása abból a célból, hogy klónozott gének termékeit állítsák elő. A fehérjetermékek között van néhány nagyon hasznos, vagy nagyon ritka, esetleg egyszerre mindkettő, amelyek éppen ezért értékesek lehetnek. Ebben a fejezetrészen áttekintjük, hogy a klónozott gének és termékeik alkalmazása milyen új lehetőségeket nyit az orvostudományban, a mezőgazdaságban és a genetikában.

FEHÉRJÉK – ÚJ KORSZAK A GYÓGYSZERGYÁRTÁSBAN

Milyen fehérjék nagy mennyiségben való előállítása lehet fontos? Elsőként az emberi inzulint gyártották klónozással. A módszer kidolgozása két szempontból is lényeges volt. Először is azért, mert a cukorbetegség egy része allergiás lett a hagyományos eljárással készült sertés- és szarvasmarha-inzulinra. A sertésinzulin kismértékben eltér az emberi inzulintól, az immunrendszer érzékeli ezt a különbséget, ezért immunválaszt, néha allergiás reakciót is indíthat az idegen fehérjével szemben. Elvben az emberi inzulin nem okoz ilyen problémát, hiszen a szervezet nem azonosítja antigénként (bár néhány betegnél jelentkezik reakció). Másodsor, a klónozott gén szinte korlátlan inzulinforrást jelent, és így a gyártás független az állati termékek piacának ingadozásaitól.

A klónozással előállított fehérjék másik példája az emberi **növekedési hormon (hGH = human growth hormone)**. A gyermekek egy része örökletes **hipofízis törpeségben** szenved, aminek oka, hogy agyalapi mirigyükben túl kevés **növekedési hormon** képződik, ezért kezelés hiányában testmagasságuk jelentősen elmarad az átlagostól. Az állati eredetű növekedési hormonok nem hatékonyak. Korábban a gyermekeket halott emberek agyalapi mirigyéből kivont hormonnal kezelték, de ez nagyon költséges volt. Egy gyermek egyévi kezeléséhez hetven holttestből kellett kivonni a hatóanyagot. Ráadásul, az első hormonkészítmények szennyezettek voltak a halálos kimenetelű Creutzfeld-Jacob-betegség kórokozójá-

val. A megoldást tehát, a hGH génjének klónozása jelentette. Az így az előállított hormon hatásosnak bizonyult.

TOVÁBBFEJLESZTETT OLTÓANYAGOK ÉS AZ AIDS

Az új, biztonságosabb oltóanyagok ugyancsak értékes termékei a klónozott géneknek. A vakcinák általában a teljes, elölt vagy legyengített kórokozóból készülnek, amelyek megbetegedést már nem okoznak, de kiváltják a szervezet immunválasztát. A problémát az jelenti, hogy a kórokozókat esetenként nem sikerül elpusztítani vagy eléggé legyengíteni, ezért az oltóanyag néha betegséget okoz, ami ritkán halálos is lehet. A fekete himlő elleni vakcina az Egyesült Államokban nagyobb valószínűséggel okoz megbetegedést, mint a természetes úton való fertőződés. Ezért az USA-ban ezt a védőoltást már nem alkalmazzák rutinszerűen.

Ma az USA-ban az egyik legsúlyosabb víruseredetű betegség az AIDS (szerzett immunhiányos tünetegyüttes), amelynek kórokozója a **humán immundeficiencia vírus**, röviden **HIV**. A legígéretesebb, hosszú távú megoldást jelentő védekezési lehetőség az oltóanyag előállítása, de tekintettel az előzőekre, képzeljük el, mekkora veszélyt jelenthet, ha a vakcina élő vírust tartalmaz! Nincs olyan gyógyszergyártó cég, amely megkockáztatná egy ilyen termék forgalmazását.

A génlónozás ezt a problémát is megoldhatja. Több kutatócsoport klónozták már a HIV felszíni fehérjéinek génjeit, és sikerült előállítani a klónozott gének fehérjetermékeit is. Jelenleg ezekkel a vírusfehérjékkel próbálják immunizálni a szervezetet, azt remélve, hogy a vírusfehérjével szembeni immunitás védelmet jelent magával a vírussal szemben is. Fontos az is, hogy ezek a fehérjék nem közvetlenül a vírusból, hanem olyan, viszonylag veszélytelen baktériumokból származnak, amelyekben klónozták a gént. Így az oltóanyag biztonságos lehet. Hatékonyságuk azonban még kérdéses.

Hasonló az elvi alapja annak az elgondolásnak, mely szerint a HIV felszíni fehérjéjének klónozott génjét beviszik egy veszélytelen vírusba, például vaccinia vírusba. Évtizedekig ezt a vírust használták a fekete himlő elleni immunizálásra. A vaccinia vírus egy beépített HIV felszíni fehérje génnel együtt az AIDS elleni oltóanyag alapja lehet. Sokan azonban aggódnak, hogy a HIV-fehérje révén a rekombináns vaccinia vírus a segítő T-sejtek ellen irányulhat, vagyis azon sejtek ellen, amelyek normálisan a HIV célpontjai. Ezzel a segítő T-sejtek működésképtelenné válnának, ami az AIDS-hez hasonló állapothoz vezetne.

Ezeken a fenntartásokon kívül egyéb okok is vannak, amelyek miatt kétséges, hogy az AIDS megelőzése a közeljövőben várható. Egy oltóanyag kifejlesztése még a legjobb feltételek mellett is igen hosszadalmas. Ráadásul a kutatók számos különböző AIDS-vírust találtak, amelyek ellen más-más oltóanyagra lenne szükség. A vírus pedig, úgy tűnik, igen gyors genetikai változásokra képes, a felszíni fehérje megváltozása pedig hatástalanná teszi az oltóanyagokat. Ugyanez a helyzet az influenzavírus esetében is. A már felsorolt okok, a piaci bizonytalanságok, valamint a sikertelenség esetén vár-

ható súlyos jogi következmények miatt, a legtöbb gyógyszergyártó nem fektet pénzt az AIDS-vakcina kifejlesztésébe.

A klónozott gének felhasználásának legkézenfekvőbb módja a géntermékek előállítására. Már gyártanak ily módon néhány gyógyászati szempontból fontos fehérjét, mint például az emberi inzulint és a növekedési hormont. A jövőben várható olyan tisztított vírusfehérjék előállítása is, amelyek biztonságos és hatékony oltóanyagként használhatók a halálos fertőzések ellen. Elképzelhető, hogy ártalmatlan vírusok módosításával immunizálni lehet a szervezetünket más rokonsági körbe tartozó, veszélyes vírusok ellen is.

KLÓNOZOTT GÉNEK ALKALMAZÁSA A GYÓGYÁSZATBAN ÉS A MEZŐGAZDASÁGBAN

A klónozott gének azonfelül, hogy értékes fehérjéket termelnek, maguk is sokféle módon felhasználhatók. A normális működésű gének, ha csak időlegesen is, bejuttathatók olyan súlyosan beteg emberekbe, akiknek saját génjeik hibásak. De hosszú utat kell még megtenni ahhoz, hogy a génterápia elterjedt és hatásos legyen. A haszonállatokba és -növényekbe juttatott gének olyan kedvező tulajdonságokat alakíthatnak ki, mint például a betegségekkel szembeni ellenálló képesség, a gyorsabb növekedési ráta stb.

BEAVATKOZÁS AZ EMBERI ÖRÖKLŐDŐ BETEGSÉGEKBE

A genetikai betegségekben szenvedők klónozott génekkel történő kezelésére már vannak példák. Az elképzelés szerint normális gént ültetnek be a hiba kijavítására.

Az öröklődő betegségek egyik sokat emlegetett példája a sarlósejtes vérszegénység (11. fejezet). A betegek homozigóták a β -globin gén hibás alléljára, ezért rendellenes hemoglobint termelnek. A betegségre megoldást jelenthet a genetikai manipulálás. Mivel a vörösvérsejtek a csontvelőben termelődnek, ezért járható út a beteg rendellenes csontvelő állományának teljes eltávolítása és helyettesítése vad típusú globin gént hordozó sejtekkel. De sokkal célszerűbb a beteg saját csontvelősejtjeit használni, hiszen így elkerülhető a kilökődési reakció. Vajon be lehet-e juttatni vad típusú allélt az abnormalis csontvelősejtekbe? A megoldást ismét a klónozás jelentheti. A klónozott emberi globin gének nagyjából hasonló módon vihetők be a sejtekbe, mint a rekombináns DNS a baktériumokba.

A kísérlet menete például a következő lehet: (1) A beteg csontvelősejtjeiből mintát vesznek; (2) A sejtekbe klónozott, vad típusú β -globin gént juttatnak; (3) A manipulált sejteket mesterséges tenyésztésben felszaporítják; (4) A beteget olyan dózisu röntgensugárral kezelik, hogy csontvelősejtjei elpusztuljanak; (5) A manipulált sejteket beültetik. A sejtek osztódnak, elszaporodnak; (6) A beültetett vad típusú allél feltehetőleg annyira mű-

ködőképes lesz, hogy megelőzi a sarlósejtes állapot kialakulását. Az ilyen kezelési eljárást **ex vivo** terápiának nevezik, mivel a beteg sejtjeit a szervezetéből eltávolítva módosítják.

Biztos, hogy ez az eljárás megoldást jelent? Egyelőre még nem, de az már bizonyos, hogy a sarlósejtes vérszegénység csontvelőátültetéssel kezelhető. Bostonban egy nyolcéves kislány sarlósejtes vérszegénységben és leukémiában szenvedett. Az orvosok leukémiával kezelték, rákos csontvelőjét elpusztították, és helyére egy másik személyből származó normális csontvelőt ültettek. Ez nem csak a leukémiából jelentett a beteg számára gyógyulást, hanem a sarlósejtes vérszegénységből is, mivel a donor természetesen nem szenvedett sarlósejtes vérszegénységben. Ez bizonyítja, hogy a transzplantáció megoldást jelenthet.

Az egyik akadályt jelenleg a beteg sejtjeibe bevitt klónozott gén normális működtetése jelenti. Ez a probléma nem csak a globin gén, hanem minden állati szervezetbe bejuttatott gén esetében fennáll. Valamilyen oknál fogva a bevitt gének expressziója, szabályozása más, mint természetes állapotban. Ez különösen veszélyes lehet a globin gének esetében, amelyek normális körülmények között finoman szabályozottak, így az α - és β -globin körülbelül egyenlő mennyiségben termelődik a sejtekben. A másik gond a folytonosan osztódó őssejtek transzformálása. Amikor a gént bejuttatják ezekbe a sejtekbe, akkor azok élettartama lerövidül. A felsorolt okok miatt a sarlósejtes vérszegénység jelenleg még nem gyógyítható klónozott génekkel.

A génterápiával foglalkozó kutatók elhatározták, hogy elsőként olyan betegségek gyógyításával próbálkoznak, amelyekre a megoldás szempontjából két kedvező tulajdonság jellemző. Először is, a betegséget egy olyan génműködési rendellenességnek kell okoznia, amikor a donor gén kis mennyiségű terméke is segítséget jelent, és az esetleges túltermelés nem káros. Másodszor, a betegség háttérében egy olyan génnek kell állnia, amely a DNS-replikációban szerepel. Ezért a normális allélt hordozó sejtek gyorsabban replikálódnak a mutáns sejteknél, és így túlnövik azokat a beteg szervezetében. Az egyik ilyen betegség a Lesch-Nyhan szindróma, amelyre súlyos szellemi visszamaradottság és öncsonkítási hajlam jellemző (a betegek összeharapdálják ajkukat, leharapják saját ujjukat). A kórt a hipoxantin-guanin foszforibozil transferáz (HGPRT) enzimet kódoló hibás allél okozza, amelynek a purinnukleotidok szintézisében van fontos szerepe.

A génterápia szempontjából egy másik sikerrel kecsegtető lehetőség annak az immunhiányos állapotnak a gyógyítása, amelyet az adozin-dezamináz (ADA) gén hibás allélja okoz. Az enzim szintén a purin anyagcserében szerepel. A hibás allélra homozigóta betegek immunrendszere gyenge, a legtöbb, másokra ártalmatlan fertőzések is, állandó életveszélyes állapotot idézhetnek elő. Néhány súlyosan beteg gyerekeknek steril körülmények között kell élnie, hogy megóvják őket a fertőzésektől. French Anderson és munkatársai 1990-ben kezdték el az első engedélyezett génterápiás kísérletet egy ADA-hiányban szenvedő 4 éves kislánnyal. Két évig sikeresen kezelték a hiányzó enzimmal, de a terápia kezdett csődbe jutni. A gyermek gyakori fertőzésektől szenvedett, és ADA-szintje a normális érték 1%-a alatt volt. Ekkor a mutáns fehérvérsejtek egy részét eltávolították a kislányból és olyan retrovírus vektorral fertőzték, amibe beépítették a vad típusú ADA gént. A kezelt sejteket két éven

át egy-két hónapos időközökkel visszajuttatták a beteg testébe, miközben folytatták az ADA enzim kezelését is. Az *ex vivo* terápia eredményei olyan sikeresek voltak – a páciens ADA-szintje a normális érték 25%-ára nőtt –, hogy elkezdtek egy másik, 9 éves ADA-hiányos kislány kezelését is. Az eredmény minden képeletet felülmúlt. 1992-re a két gyermek immunrendszere működőképes lett, iskolába is járhattak. 1995 végére mindketten normális életet élhettek.

Sajnos, a többi génterápiás kísérlet nem volt ennyire eredményes, de az orvosok elképzelések tucatjait vizsgálják. Ezek közül az egyik, hogy olyan idegen gént próbálnak a rák leküzdésére felhasználni, amely erősíti a beteg saját immunrendszerét. A terv szerint, rákos fehérvérsejteket izolálnak, amelyek már infiltrálódtak egy daganatba, és sikertelenül próbálták elpusztítani azt. Az izolált sejtekbe egy gént visznek be, amely kedvező irányba billentheti az egyensúlyt. A bevételre szánt gén a rákos és a normális sejtekre egyaránt végzetes fehérjét, a tumor nekrosis faktort kódolja. Ha a gén csak azokban a sejtekben működik, amelyek már specializálódtak a tumorsejtek ellen, várható, hogy megsemmisítő képességük is inkább a rákos sejtek ellen irányul, nem pedig a normális sejtek ellen.

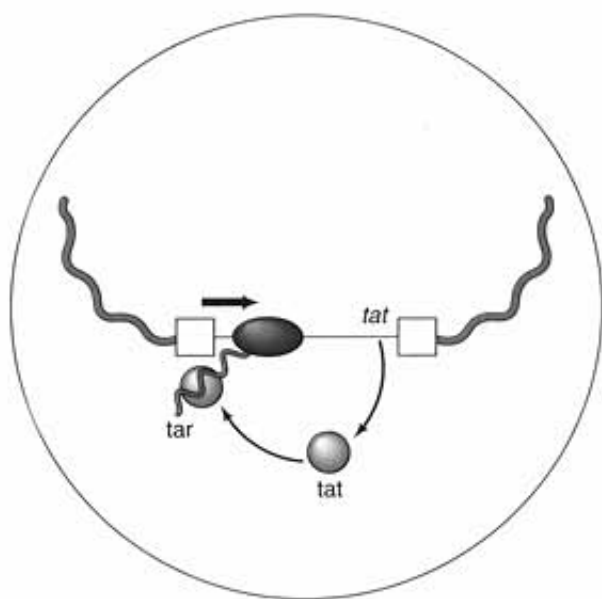
Egy másik génterápiás elképzelés szerint, az AIDS leküzdésére saját kórokozóját, a HIV-vírust kell felhasználni. A terv az, hogy legyengített HIV-vektorral a „trójai falóhoz” hasonlóan egy antivirális gént juttatnak a HIV-fertőzött sejtekbe. Az első lépés a vektor kialakítása a HIV-ből (16.2. ábra). A vektor, mivel nem tartalmazza a HIV replikációjához szükséges gént, veszélytelen a megfertőzött sejtekre. Ezután egy antivirális gént kell beépíteni a vektorba. Az egyik lehetőség a HIV DNS génje, a *tar*. Ez egy olyan RNS-szekvenciát kódol, amely a HIV replikációjához nélkülözhetetlen *tat* fehérjét köti meg. Így a vektor

külsőleg a HIV-hez hasonlít, ugyanazokat a sejteket fertőzi meg, amelyeket normálisan a HIV is, és bejuttatja a *tar* DNS-t a veszélyeztetett sejtekbe. A sejtekben nagy mennyiségű *tar* RNS képződik, ami megköti a *tat* fehérjét, ezzel megakadályozza, hogy az kifejtsen replikációt serkentő funkcióját (16.1. ábra).

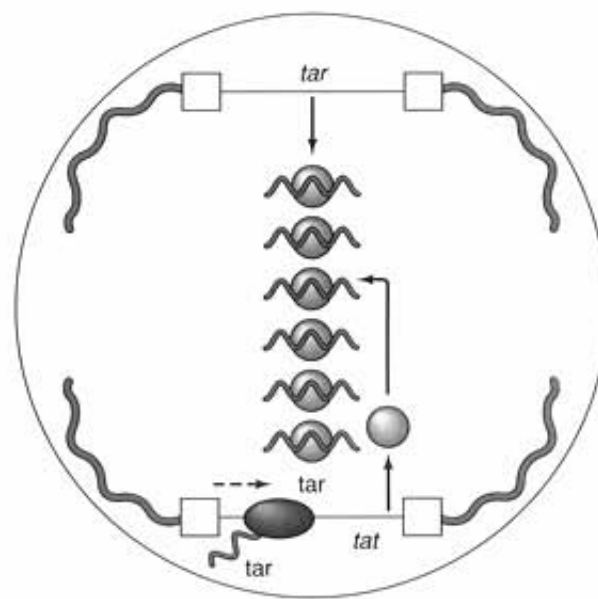
AZ EMBERI GÉNTERÁPIA PROBLÉMÁI

Annak ellenére, hogy az ismertett ADA-kísérletben áttörő sikert értek el, a legtöbb génterápiás próbálkozás, beleértve más ADA-kísérleteket is, legfeljebb mérsékelt eredményeket hozott. Még a két sikeres esetet is vitatottá tette az a tény, hogy a két beteget a génterápia alatt és után is ADA-fehérjével kezelték, így nem biztos, hogy a génterápia okozta a változást.

A génterápia visszatérő problémája az átmeneti hatás. Ahhoz, hogy a korrekció tartós legyen, a vad típusú géneket a folytonosan osztódó őssejtekbe kell bejuttatni, de ez mind a mai napig nehézségekbe ütközik. Anderson és csoportja néhány hónapos életidejű érett sejteket használt, nem őssejteket. Ez azt jelentette, hogy a beteget az ADA-szint fenntartása érdekében három-öt havonként újra kellett kezelni. Sőt a kezeléseket közötti idő lerövidült, ha a manipulált sejtek nem voltak növekedési előnyben a kezeletlenekkel szemben. Sok más betegség esetében, ahol a DNS-replikáció szabályosan zajlik, a módosított sejtek nem képesek hatékony kompetícióra a kezeletlen sejtekkel szemben, ezért néhány nap, legfeljebb néhány hét múlva elpusztulnak. Mindezek miatt megoldást kell keresni az őssejtek módosítására. Anderson és más genetikusok jelenleg is ezen fáradoznak az ADA és más génekkel kapcsolatban.



(a) Normál HIV-fertőzés



(b) HIV-vektor mint „trójai faló”

16.1. ábra. A HIV-vektor mint „trójai faló” az AIDS ellen. (a) Egy normális HIV-fertőzés során a *tat* gén *tat* fehérjét (narancssárga) termel, amely a virális transzkriptum (zöld) *tar* régiójához kötődik, és valamilyen módon serkenti az átírást (vastag nyíl). (b) A „trójai falónak” elnevezett terv szerint olyan retrovirus vektort alkalmaznak (fent), amelyben csak a *tar* szekvencia maradt meg, a virális gének hiányoznak. A *tar* szekvencia terméke a *tar* RNS megköti a sejtet már megfertőzött, ép vírus által termelt összes *tat* fehérjét. Így nem marad szabad *tat* fehérje, amelyhez a virális transzkriptum *tar* szekvenciája kötődhetne, az átírás gyenge lesz (vízszintes szaggatott nyíl). A gyenge átírás lassítja vagy gátolja a vírus replikációját. A sárga négyzetek a vírus és a vektor hosszú terminális ismétlődéseit (LTR) jelölik

Egy másik lehetséges problémát a vektor jelenti. A jelenlegi génterápiás eljárások csaknem mindegyikében retrovírusok a vektorok, mert DNS-üket beépítik a gazdasejt genomjába. Ez a mozzanat pedig kritikus, hiszen azt jelenti, hogy beépíthetnek a retrovírusba egy normális gént, így bejuttathatják azt a defektes genomba, ahol mindaddig replikálódik, amíg a célsejt él. Van azonban egy gond: a retrovírusok hírhedtek arról, hogy súlyos betegségeket okoznak, így rákot vagy AIDS-et. Ebből a megfontolásból a genetikusok a vektor kialakításakor a retrovírus valamilyeni génjét eltávolítják vagy megsemmisítik. Ezért a vírus, mivel nincs saját, működőképes géneje, nem okoz betegséget, de nem is replikálódik. Emiatt olyan speciális sejtekben kell fenntartani őket, amelyek az összes, a vírus replikációjához szükséges fehérjét termelik (16.2. ábra). Ezenfelül, ahogy azt a 17. fejezetben még látjuk, azok a retrovírusok, amelyeknek nincsenek saját, rákot okozó géneik, rákot idézhetnek elő a szomszédos, celluláris gének hiperaktiválásával. A celluláris tumorsuppresszor gének tönkretételével ugyancsak elősegíthetik rosszindulatú daganatok kialakulását. Mindez pedig kétségessé teszi a retrovírus vektorok hosszú távú veszélytelenségét. Bár Anderson kimutatta, hogy 1992-re már 106 esetben végzett majmokon, 23 esetben embereken olyan, több éven át tartó retrovírus vektort alkalmazó kísérleteket, amelyeknek nem voltak káros következményei. Egyetlen kivétel volt, amikor retrovírus vektorral történt kezelés után 3 majomban rák alakult ki. Ebben az esetben kimutatták, hogy a retrovírus preparátum replikációra képes „helpervírus” szennyeződést tartalmazott. Valószínűleg ez lehetett a rák kialakulásának oka.

Részben a retrovírus vektorok potenciális veszélyei miatt a kutatók más vektorok kifejlesztésén is dolgoznak. Az egyik lehetőség egy emberi kórokozó, az **adenovírus**. Az adenovírus egyes állatfajokban rákot okoz, de emberben csak légúti fertőzéseket, ezért a belőle kifejlesztett vektor remélhetőleg nem fenyeget rák kialakulásának veszélyével. Az adenovírusok általában nem építik be DNS-üket a gazdasejt genomjába, tehát a közreműködésükkel bevitt gének sem lehetnek olyan hosszú életűek, mint a retrovírusokkal bejuttatottak. Jó kompromisszumot jelenthet egy olyan vektor, amelynek alapja egy *adeno-asszociált vírus* (AAV). Az AAV a 19-es kromoszóma egy jól meghatározható pontján épül be a genomba, így egy idegen gén viszonylag tartós expresszióját biztosíthatja. Látszólag rákkeltő hatása sincs. Korlátokat jelent viszont az, hogy genomja kisméretű. Ez azt jelenti, hogy nagyobb géneket nem lehet beleépíteni, pedig az ember több genetikai betegségét is nagyon nagy méretű gének hibái okozzák.

Bizonyos esetekben egyáltalán nincs szükség vektorokra. Vannak olyan sejtek, amelyek képesek liposzómába csomagolt idegen DNS felvételére. A liposzómák kettős lipidréteggel határolt képződmények, amelyek összeolvadhatnak a célsejt membránjával, így tartalmuk, beleértve az idegen DNS-t, bejut a sejt belsejébe.

Utoljára említjük, de nagyon nagy gondot jelent a génterápia költségessége. A jelenleg hozzáférhető eljárások olyan bonyolultak és munkaigényesek, hogy csak a legfejlettebb intézményekben kivitelezhetőek, és nagyon magas költségekkel. Emiatt a génterápia jelenleg legfeljebb néhány ezer beteg részére elérhető, és nem a rászoruló milliósok. A megoldást csak a hatékony és olcsó eljárások kidolgozása jelentheti. A magas költségek azonnal felvetik azt az eti-

kai kérdést, hogy ki juthat hozzá a drága orvosi kezeléshez? Csak a gazdagok? Kinek kell ezt eldönteni? A 16.1. melléklet a genetikai manipulációkkal kapcsolatos más etikai kérdésekre is kitér.

A génterápia olyan eljárásokat jelent, amikor klónozott génekkel próbálnak kezelni, és esetleg gyógyítani emberi betegségeket, köztük öröklődő rendellenességeket, rákot, AIDS-t stb. A klónozott géneket vektorokkal, rendszerint fertőzésre képtelen retrovírusokkal juttatják a célsejtekbe. A génterápia eddig két esetben bizonyult sikeresnek, de jelenleg még nem elég hatékony, és rendkívül költséges.

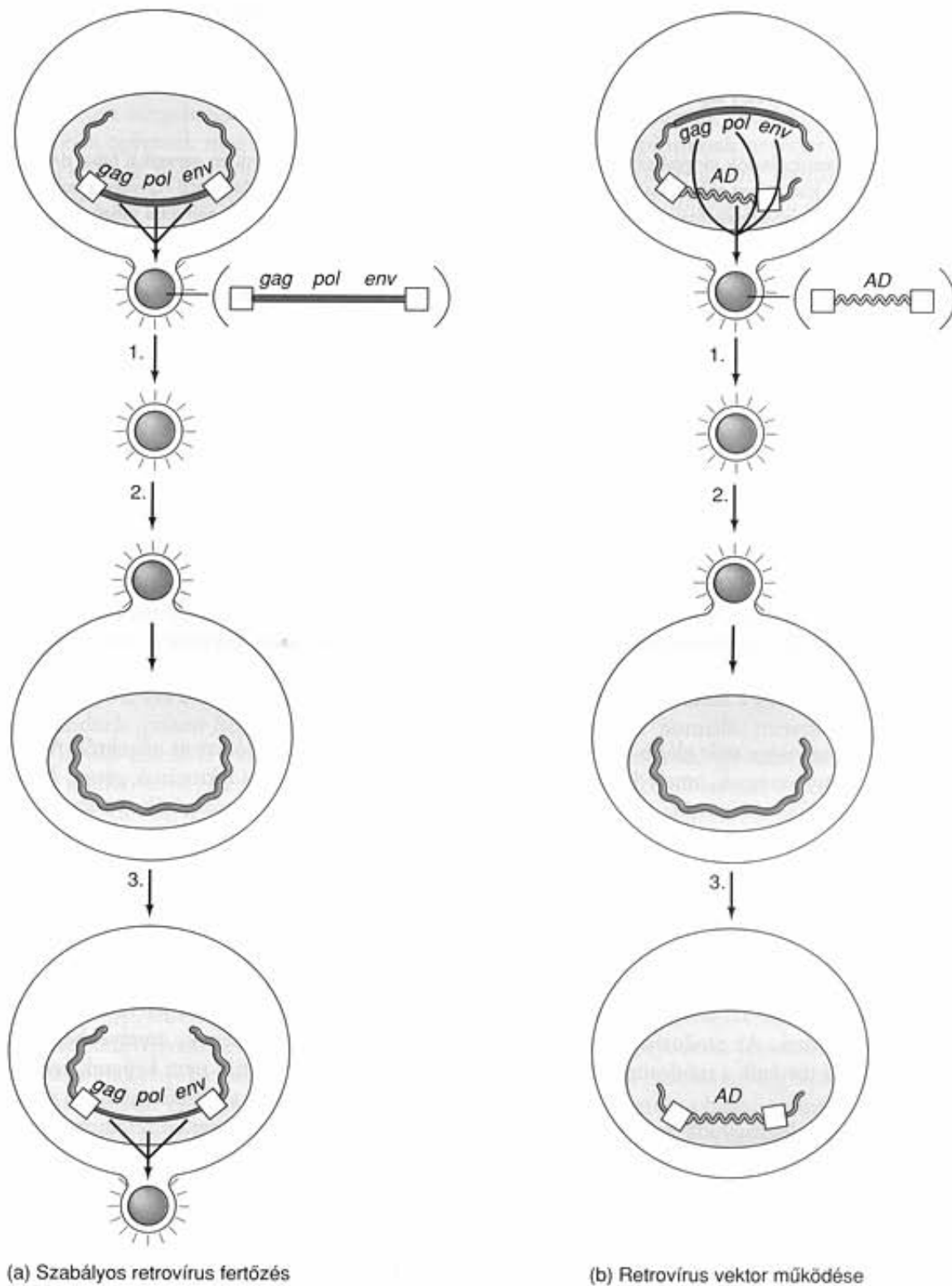
KLÓNOZOTT GÉNEK ALKALMAZÁSA A MEZŐGAZDASÁGBAN

1983-ban Richard Palmiter és Ralph Brinster korai stádiumú egérembrióba juttatták az ember növekedési hormon génjét. Az eredmény a sajtó által „szuperegérek” becézett, az átlagosnál kétszer nagyobb testű óriás egér volt. Az ilyen állatokat **transzgenikusnak** nevezzük, mert egy másik élőlényből átültetett gént hordoznak. Hangsúlyozni kell, hogy a transzgenikus állatokba az idegen eredetű gén, az ún. **transzgén** bejuttatása az embrionális fejlődési igen korai stádiumában történik, így a transzgén beépülhet a gazda sejtjeibe, beleértve a csiravonalat is, és a normális génekhez hasonlóan továbbadhat az utódokba. Ez különbözik attól, amikor egy kifejlett állat egyik szövetébe próbálnak géneket bevinni, mint azt a sarlósejtes vérszegénység kapcsán említettük. Ebben az esetben az átültetett gén nem juthat be az ivarsejtekbe, és így nem öröklődhet az utódokba.

Amikor nyilvánosságra került a szuperegér létrehozása, az emberek csodálkoztak. „Miért nem szupertehen vagy szupersertés?” (Hogy a szuperembert ne is említsük!) Az igazság az, hogy Palmiter és Brinster megkísérelték a szupersertés előállítását, de nem sok sikerrel. Létrehoztak transzgenikus sertéseket oly módon, hogy az ember (hGH), illetve a szarvasmarha növekedési hormon (bGH) génjét injektálták sertés petesejtekbe. A szarvasmarha hormonja hatásosabbnak bizonyult, de a transzgenikus malacok nem szolgálták rá a szuper jelzőre. Nem nőttek a normális méret többszörösére, de takarmányhasznosításuk (egységnyi takarmánymennyiségre jutó súlynövekedés) jobb volt. Ez pedig nagyon fontos szempont, hiszen a takarmány teszi ki a sertéstartás költségeinek 70%-át. Előnyt jelentett az is, hogy a transzgenikus állatok bőr alatti zsírrétege vékonyabb volt. Az étkezési szokások változása miatt ugyanis az állati eredetű zsíradékok fogyasztása jelentősen visszaszorult.

Az előnyös tulajdonságok mellett a transzgenikus sertések súlyos egészségügyi problémákkal küszködtek. Fokozottan hajlamosak a gyomorfekélyre, az ízületi gyulladásokra, a szívnagyobbodásra, a bőrgyulladásra és a vesebetegségekre. Mindezek miatt étvágyuk csökkent, elhullási arányuk magas volt. Világossá vált, hogy az igazi szupersertés előállításán még sokat kell dolgozni.

A szupersertésénél talán fenyesőbb jövő áll a „szuperhalak” előtt. A halhús világszerte népszerű fehérjeforrás, az évente



16.2. ábra. Retrovírus vektorok. (a) Szabályos retrovírus fertőzés. A sejtet egy olyan retrovírus fertőzte meg, amelyben megtalálható a replikációhoz nélkülözhetetlen három gén (*gag*, *pol*, *env*). A virális LTR szekvenciákkal (sárga) határolt gének (piros), beépültek a gazdasejt genomjába (kék). A kialakult utód vírusrészecske a sejthártyánál kitüremkedik. Tartalmazza a két LTR szakaszt és közöttük a három gént. Az 1. lépésben a vírusrészecske teljesen lefűződik. A 2. lépésben egy újabb sejtet fertőz. A harmadik lépésben a vírus genom beépül a gazdasejt genomjába, és megkezdődik az új vírusrészecske kialakulása. A valóságban a fertőzés során nem egy, hanem sok vírusrészecske képződik. (b) Retrovírus vektor. A *gag*, *pol* és *env* géneket eltávolították a vírusból, és beépítették a gazdasejt genomjába. A vírusban csak az LTR szakaszokat hagyták. A virális gének helyére bevitték az emberi adozin-dezamináz (*AD*) génjét. Az inaktívált vírus csak a gazdasejtben lévő három gén segítségével képes replikálódni. A gazdasejtben olyan vírusrészecskék képződnek, amelyek tartalmazzák az LTR szakaszokkal határolt *AD* gént. A három vírus gén nem csomagolódik be a vírusrészecskébe, mert nincsenek LTR határoló szakaszai. Az 1. és 2. lépésben a hiányos vírus lefűződik, és egy másik sejtet fertőz. A 3. lépésben a hibás vírus genom, amely a két LTR szakasz között az *AD* gént tartalmazza, beépül a gazdasejt DNS-ébe, ahol az *AD* gén kifejeződhet. Ezekben a sejtekben új vírusrészecskék már nem keletkeznek, mert nem tartalmazzák a három virális gént

16.1. A génterápia etikai kérdései

A génterápia, a genetikai manipulációk tárgyalásakor súlyos etikai problémák is felmerülnek, különösen akkor, ha emberi gének megváltoztatásáról van szó. Ezek a felvetések már a legelső génterápiás kísérlet óta napirenden vannak. Az első vita a génterápia biztonságossága körül forgott. Egyes kutatók olyan komolyan aggódtak az új gének baktériumsejtekbe való bevitelének esetleges veszélyeitől, hogy meggyőzték a molekuláris biológusokat: mindaddig állítsák le az ilyen típusú kísérleteket, amíg a részletes vizsgálatok le nem zárulnak. A moratórium 18 hónapig tartott, és addigra tisztázódott, hogy a veszélyes kórokozók gazdaszervezeteikkel együtt sok ezer év alatt fejlődtek ki, így valószínűleg gének tucatjai szükségesek ahhoz, hogy egy baktérium fertőzővé váljon. Csaknem teljesen valószínűtlen, hogy egyetlen új gén bevitelével egy ártalmatlan mikroorganizmusba, egy új, veszélyes kórokozót hozna létre. Meggyőző bizonyítékok támasztják alá, hogy a kezdeti félelmek alaptalanok voltak. Kutatók ezrei több mint két évtizede klónozzák a géneket, kimutatható káros következmények nélkül.

Ahogy a biztonság körüli vita elcsitult, fellángolt a következő az emberi gének megváltoztatásáról. A sarlósejtes vérszegénység és

az immunhiány egyértelműen genetikai hiba, de hol van a határ? Genetikai eltérés-e az átlag alatti IQ vagy a balkezesség? Ki döntheti ezt el? Az intelligencia több gén által meghatározott tulajdonság, és genetikai háttérének megismeréséhez feltehetően még több évtizedes kutatás szükséges, nem beszélve genetikai módosításáról. Ezért az ezzel kapcsolatos aggodalmak talán koraiak. De vannak sürgetőbb kérdések.

Mi lehet az álláspont a transzgenikus emberek előállításával kapcsolatban? Mi lesz akkor, ha a páciensekben nem csak a szöveti sejtek génjeit változtatják meg, hanem az ivarsejteket is, így az utódok génjei is módosulnak? Ez beavatkozást jelentene az ember evolúciójába, és sokak szerint nincs elegendő tudásunk ilyen fontos és megfordíthatatlan döntésekhez. Mások azt hangsúlyozzák, hogy kötelességünk az emberi szenvedéseket a lehető legkisebbre mérsékelni, ezért a hibás allélok kiküszöbölése a populációból csak jó lehet. De ismét felmerül a kérdés: Mit nevezünk hibának, és ki dönthet erről? Bármilyen érzéseink is vannak ezekkel a problémákkal kapcsolatban, egy biztos, olyan kérdéseket vetnek fel, amelyekre sohasem lesz könnyű válaszolni.

lehalászott vadon élő halak mennyisége már elérte legmagasabb fenntartható szintet. Így a haltenyésztésnek, amely jelenleg a fogyasztásra kerülő halmennyiség 15%-át biztosítja, kell a jövőben a világ növekvő népességének igényeit kielégítenie. Ez a gazdasági ösztönzés magyarázza a nagy érdeklődést a haltenyésztés hozamának növelésére.

A hozam növelésének egyik lehetséges útja egy növekedési hormon gén bevitelével halembriókba. Thomas Chen és munkatársai ponttyal és szívárványos pisztránggal már végeztek ilyen kísérleteket. A transzgenikus halak az átlaghoz viszonyítva 20–46%-kal gyorsabban növekedtek. Az eredmény ígértes, de még nincsenek adatok arról, mi történik a módosított állatokkal a laboratóriumon kívül.

Más kutatók a halgazdaságok legnagyobb veszteségeit okozó vírusfertőzések megelőzésével próbálkoznak. Mivel a haltenyésztők nem alkalmazhatnak oltóanyagot vagy gyógyszert a betegségek kezelésére, ezért a kísérletek antivirális gének bejuttatására irányulnak, melyek révén az állatok rezisztenssé válnak a vírusokkal szemben. A halgazdaságokban a halpusztulás másik oka – különösen a kanadai óriás laposhal- és lazacfenyészetekben – a megfagyás. Garth Fletcher egy északi elterjedésű, hidegtűrő lepényhalból akar átültetni egy olyan gént ezekbe a fajokba, amelynek terméke egy fagyálló fehérje, ami megakadályozza a vér megfagyását.

TRANSZGENIKUS SZERVEZETEKBŐL NYERT FEHÉRJÉK

Az utóbbi időben a kutatók a transzgenikus haszonállatokat kézzelfogható dolgokra is alkalmazzák: értékes fehérjéket állítanak

elő a segítségükkel klónozott génekről. Az egyik ilyen példa az ember IX. véralvadási faktorának génje. Azok az emberek, akik erre a hibás génre homozigóták, véralvadási rendellenességben, hemofília B-ben szenvednek. A betegeket hagyományosan emberi vérplazmával vagy részlegesen tisztított IX. faktorról kezelik, de a vérkészítmények fertőzöttnek lehetnek hepatitis- vagy HIV-vírussal, ami komoly veszélyt jelent. Ezért óriási előnnyel bírna egy klónozott génnel előállított fehérje.

Az emberi sejtek a IX. faktort prekursor formájában állítják elő, amelynek aktiválása jelentős módosítással jár. A baktériumok és az élesztősejtek, amelyekben a klónozott gént rendszerint működtetik, nem képesek ezekre a kulcsfontosságú módosításokra. Ezért az emlősejtekben való expresszió a megoldás, de az emlősejtek tenyésztésének fenntartása nagyon költséges. Egy másik lehetőség a transzgenikus állatok alkalmazása. A. J. Clark és munkatársai az emberi IX. faktor génjét hozzákapszolták a juh egyik tejfehérjéjébe, a β -laktoglobulint (BLG) kódoló gén szabályozó szekvenciájához. Ezután a fuzionált gént megtermékenyített birkapetesejtekbe injektálták, és azokat anyajuhokba ültették. Az elképzelés természetesen az volt, hogy a IX. faktor génje a tejmirigyekben kerül expresszióra, ahol normális körülmények között a BLG termelődik. Így a IX. faktor a transzgenikus anyajuhok tejéből kényelmesen kinyerhető. A kísérlet eredményeként két transzgenikus bárány született, amelyek tejében párosításuk után valóban megjelent az emberi IX. faktor, bár csekély mennyiségben. De minden remény megvan arra, hogy ez a teljesítmény javítható. A kutatók olyan transzgenikus birkákat is előállítottak, amelyek az emberi α_1 -antitripszin gént hordozzák. Egy anyajuh tejében 35 g/dm³ volt ebből a fehérjéből.

Ez az elképzelés nem csak a transzgenikus állatokra vonatkozatható. A kísérletek bebizonyították, hogy transzgenikus dohány-növényeket is lehet fehérjegyárként használni. Az egyik a legjelentősebb eredmény az antitestek termelése volt. Ezek a „növényi antitestek” nem mindenben egyeznek meg az emberi antitestekkel, de elég jól működnek ahhoz, hogy nagyon értékesé váljanak. Például kiegészítői lehetnek a csecsemőtápszereknek. Ha ez így van, akkor nagy mennyiségben lehet rájuk szükség. Ez rávilágít a transzgenikus növények másik nagy előnyére, arra, hogy óriási mennyiségű fehérjét képesek előállítani. Ezekben a „zöld gyárakban” várhatóan több tíz vagy több száz kg idegen fehérjét lehet majd előállítani hektáronként.

GENETIKAILAG MANIPULÁLT TERMESZTETT NÖVÉNYEK

A klónozott gének bevitele a növényekbe azonnal felveti azt a lehetőséget, hogy genetikai manipulációval nemesítsenek növényeket. Az ember évezredek óta szelekciós nemesítéssel igyekszik a növények tulajdonságait javítani, de ez nagyon időigényes és bizonytalan eljárás, mert az előnyös jellegeket kialakító génekkel együtt nem kívánatosak is átkerülnek. Napjainkban azonosítják és klónozással izolálják a hasznos géneket, majd közvetlenül beviszik egy új gazdanövénybe. Ha a bevitt gének új környezetükben szabályosan működnek (erősen hangsúlyozva a feltételes módot), akkor komoly javulás érhető el a recipiens növényben.

Az egyik első, ilyen módon átvitt gén a herbicidrezisztenciáért felelős gén volt. Ez a tulajdonság igen hasznos lehet, hiszen a herbicidrezisztens növények túlélnek a gyomirtóval való kezelést, míg a körülöttük lévők elpusztulnak. A kérdéses herbicid a Monsanto cég „Roundup” néven forgalmazott gyomirtójának hatóanyaga, a **glifozát** volt. A glifozát gátolja az EPSP-szintáz nevű enzimet, amely nélkülözhetetlen a fenilalanin, a tirozin és a triptofán szintéziséhez. Mivel a felsorolt aminosavak nélkül a növény életképtelen, a glifozát igen hatékony gyomirtó, de válogatás nélkül elpusztítja a haszonnövényeket és a gyomokat is. Ezért a cél glifozátrezisztens haszonnövények előállítása volt.

David Stalker és munkatársai glifozátrezisztens dohány-növényeket állítottak elő. Először glifozát jelenlétében tenyésztettek *Salmonella* baktériumokat, és izoláltak egy rezisztens mutáns. A mutáns glifozátrezisztenciáját az okozta, hogy az EPSP-szintáz aminosavszekvenciája egy ponton megváltozott. A mutáns gént klónozták és bejuttatták a dohány-növényekbe.

A bevétel azonban nem volt olyan egyszerű. Ahhoz, hogy az idegen gén egy növényben is aktív legyen, olyan vektorba kellett klónozni, amelyik lehetővé teszi a növényi sejtekben való hatékony működést. A gyakori bakteriális vektorok erre a célra nem alkalmasak, mert a növényi sejtek nem ismerik fel a prokarióta eredetű promotereket és replikációs kezdőpontjaikat. A kutatók a glifozátrezisztencia génjét ún. **T-DNS**-t hordozó plazmidba ültették. Ez a DNS-szakasz a **Ti plazmidból** (tumort indukáló) származik.

A Ti plazmid az *Agrobacterium tumefaciens* baktériumban található, amely kétszikűekben **gyökérgolyvának** nevezett tumorkat hoz létre (16.3. ábra). Amikor a baktérium megfertőzi a nö-

vényt, plazmidját átadja a gazdasejtnek, majd a T-DNS beépül a növényi sejt DNS-ébe. A növényi sejtek rendellenes burjánzásnak indulnak, kialakul a golyva. A fertőzést okozó baktériumok szempontjából ez előnyös, mert a T-DNS-en olyan gének vannak, amelyek az **opinoknak** nevezett szerves savak szintézisét irányítják. Az opinok a növény számára értéktelenek, a baktériumok azonban bontóenzimeik révén energiaforrásként hasznosítják.

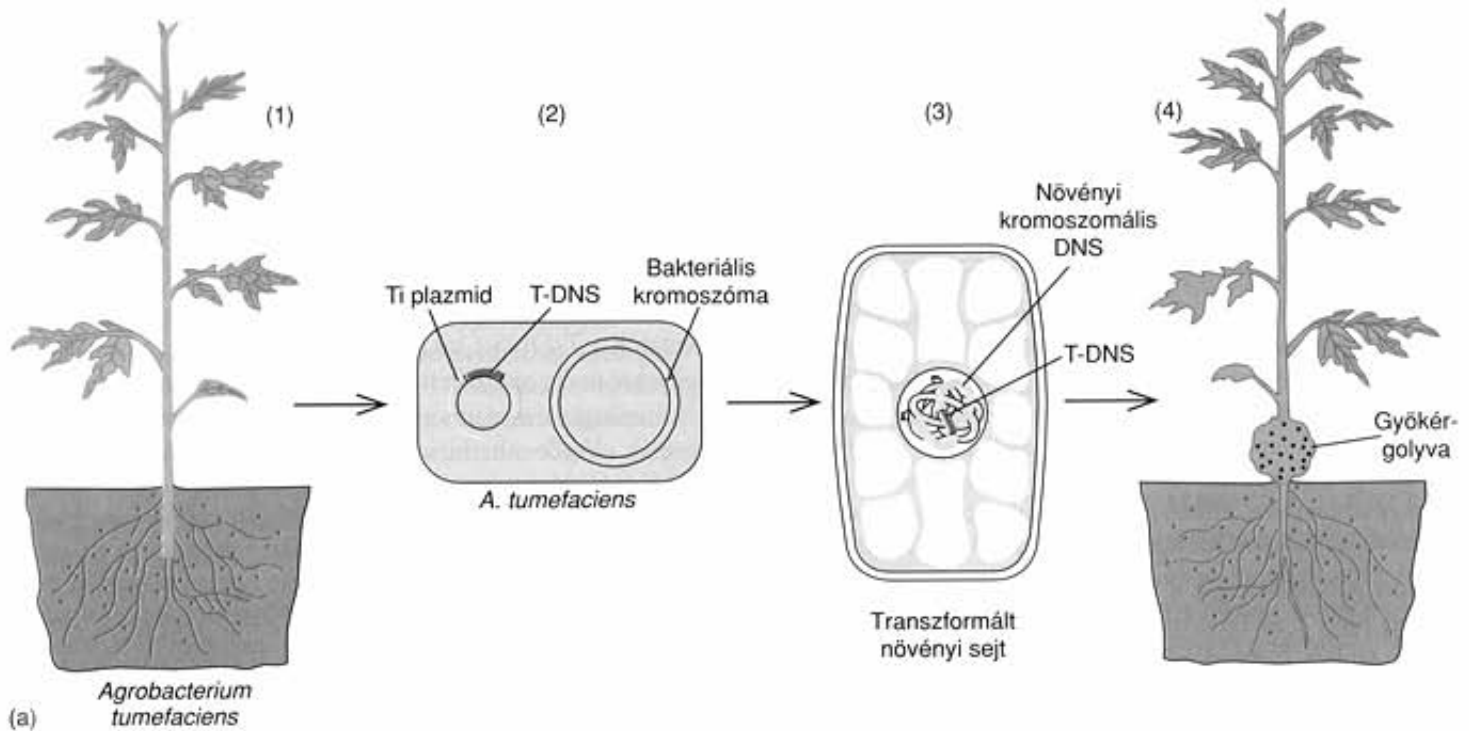
Az opinok szintéziséért felelős enzimeket kódoló T-DNS géneknek (pl. mannopin szintetáz) erős promotereik vannak. Ezért a kutatók a T-DNS-t kis plazmidokba helyezték, a beépített idegen géneket pedig az említett promoterek egyikéhez kapcsolták. Stalker és munkatársai a mannopin szintetáz promotert használták. Létrehozták először a herbicidrezisztencia gént tartalmazó rekombináns DNS-t, majd azt visszajuttatták az *Agrobacterium*-ba, amellyel megfertőzték a növényi sejteket, és ezzel átvitték a klónozott gént.

A 16.4. ábra azt a folyamatot vázolja, amellyel a kutatók bevitték a herbicidrezisztencia gént egy dohány-növénybe. A dohánylevélből kivágtak egy 2 mm átmérőjű korongot, és táptalajra helyezték. Ilyen körülmények között a korong szélén a szövetek növekedni kezdtek. Ezután hozzáadták a glifozátrezisztencia gént hordozó *Agrobacterium* sejteket. A baktériumok megfertőzték a növekedésben lévő dohánysejteket, és bevitték a klónozott gént.

Amikor a levéldarab szélén gyökerek jelentek meg, Stalker és munkatársai áthelyezték a gyökereket hajtást regeneráló táptalajra. A növények normális méretű dohány-növényekké fejlődtek, amelyek, ha működő glifozátrezisztencia gént tartalmaznak, akkor rezisztenseknek kell lenniük a herbiciddel szemben. A következő lépésben a növényeket herbiciddel permetezték le. A vizsgálat eredményét a 16.5. ábra foglalja össze. Az ábra felső részén látható vad típusú növények érzékenyek még a közepes herbicidkoncentrációra is. Az alsó sorban lévő transzgenikus növények a közepes dózissal szemben nagyon, a nagy dózissal szemben kevésbé ellenállóak.

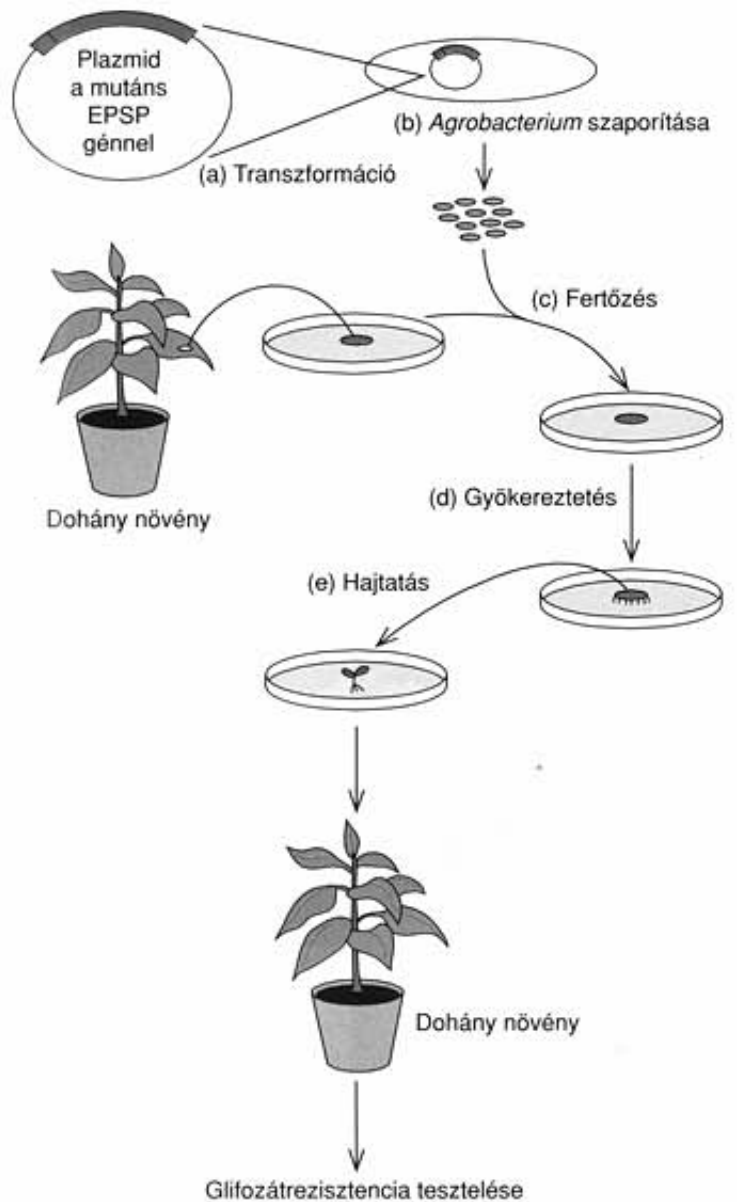
Ez csak az egyik példája a növények genetikai módosításának. Talán a leghíresebb eredményt a „Flavr Savr” transzgenikus paradicsom kifejlesztése jelentette. A Calgene cég kutatói annak a génnek az antiszenz kópiáját építették be a paradicsom genomjába, amely a bogó puhulását idézi elő az érés során. Az antiszenz gén RNS-terméke hibridizál a normális gén mRNS-ével, és így blokkolja annak működését. A bogó tehát megéri, de közben nem puhul meg jelentősen. Így a termés az érési folyamat végéig a növényen maradhat, nem kell zölden leszedni, és mesterségesen érlelni.

Más kutatók további eredményeket értek el ezen a területen. (1) A normális EPSP gén extra kópiáinak beépítésével glifozátrezisztens petúniát állítottak elő; (2) Virális burokképző gén bevitelével vírusrezisztens dohány-növényeket hoztak létre; (3) Egy inszekticid kódoló bakteriális gén bevitelével rezisztensé tettek dohány-növényeket rovarkártévkkel szemben; (4) A szentjánosbogár luciferáz génjét dohány-növényekbe juttatták. Ennek a kísérletnek ugyan nincs gyakorlati haszna, de nagyon érdekes, amikor a növények világítanak a sötétben (16.6. ábra); (5) Az idegen géneket *Agrobacterium* helyett, DNS-sel bevont parányi fémgyöngyök formájában lövik be a növényi sejtekbe.



16.3. ábra. (a) A gyökérgolyva kialakulása. (1) *Agrobacterium* sejtek jutnak a növénybe egy sérülésen keresztül, rendszerint a gyökér és a szár találkozásánál; (2) Az *Agrobacterium* a sokkal nagyobb bakteriális kromoszóma mellett egy Ti plazmidot is tartalmaz. A Ti plazmidban található ún. T-DNS (piros) elősegíti a daganat kialakulását a fertőzött növényen; (3) A Ti plazmid a baktériumból a növényi sejtbe jut, és a plazmid T-DNS-e beépül a növényi sejt kromoszómájába; (4) A T-DNS génei irányítják a fertőző baktériumokat tápláló gyökérgolyva kialakulását. (b) Egy gyökérgolyva tumorról készült felvétel. A tumor kialakításakor a dohánynövény hajtáscsúcsát levágták, és a növényt *Agrobacterium*val fertőzték. A gyökérgolyva egy torzképződmény (teratoma), amely normális és daganatos szövetet is létrehoz. Figyeljük meg a tumorból kinövő többé-kevésbé egészséges növényi szöveteket

(a) Mary-Dell Chilton: *A Vector for Introducing New Genes into Plants*. 1983, © Scientific American, Inc.; (b) Dr. Robert Turgeon és Dr. B. Gillian Turgeon (Cornell Egyetem) engedélyével



16.4. ábra. Génbevitel dohánynövényekbe T-DNS plazmid segítségével. (a) A plazmidot a mutáns EPSP gén (piros) és a mannopin szintetáz promoterének (kék) összekapcsolásával állították elő. A plazmiddal transzformálják az *Agrobacterium*-sejteket. (b) A transzformált baktériumsejtek sorozatosan osztódnak. (c) A dohánylevélből kivágott korongot transzformált baktériumsejteket is tartalmazó táptalajon inkubálják. A baktériumok megfertőzik a szöveti sejteket, és beviszik a sejtekbe a mutáns EPSP-t tartalmazó plazmidot. (d) A levéldarab gyökereket fejleszt a környező táptalajba. (e) Egy gyökérszálat más összetételű táptalajra helyeznek, ahol hajtást fejleszt. A növényke dohánynövényé fejlődik, amelyet glifozát-rezisztenciára tesztelnek

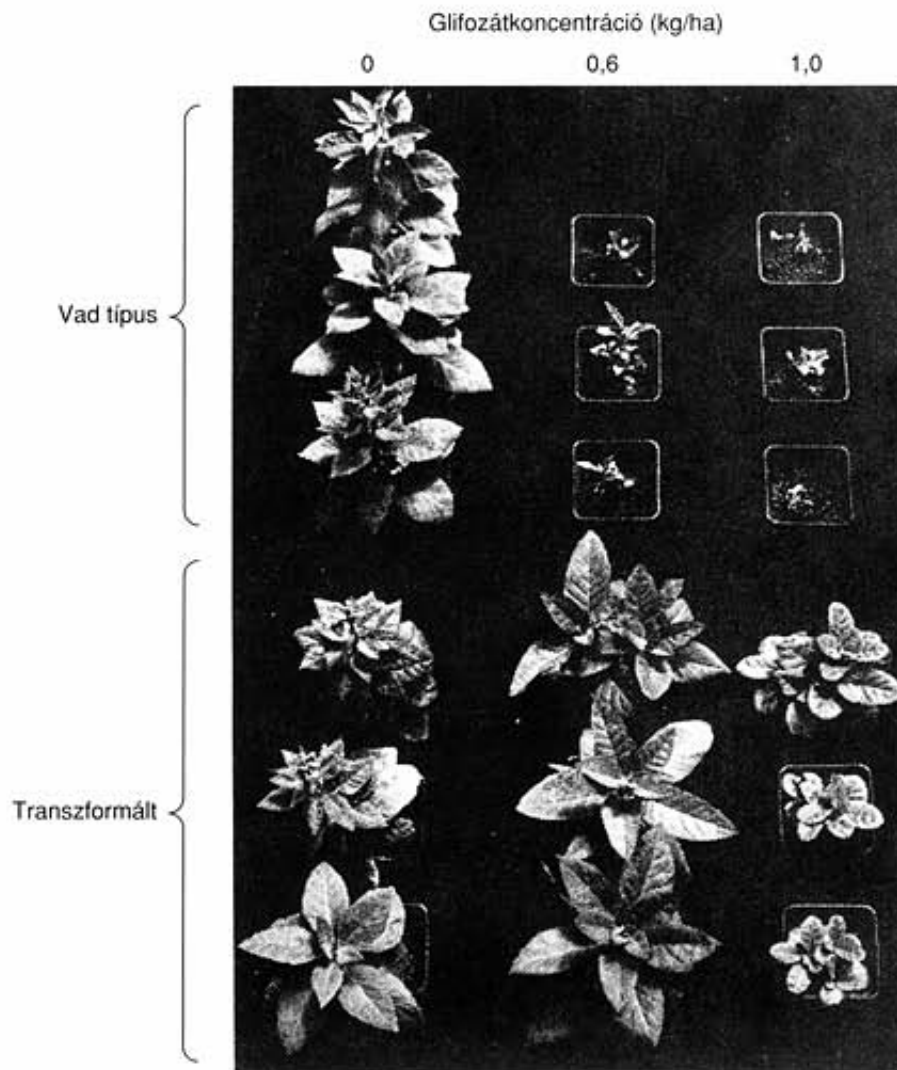
Az agrárgenetikusok klónozott gének növényekbe és állatokba való bejuttatásával előnyös tulajdonságokkal rendelkező transzgenikus szervezeteket hoztak létre. A transzgenikus szervezetek a bevitt gének fehérjetermékeinek előállítására is használhatók.

AZ EMBERI GENOM TÉRKÉPEZÉSE

Az 1980-as évek végén amerikai genetikusok elindították a teljes emberi genom részletes térképezésével foglalkozó kutatásokat (Humán Genom Projekt – HGP). A program világnéretűvé bővült és egy kissé ellentmondásos is lett, részben elképesztő költségei miatt. A költségek érthetőek, ha belegondolunk, hogy a program végső célja az emberi kromoszómák teljes nukleotidszekvenciájának megállapítása. A hatalmas költség oka természetesen az, hogy az emberi genom óriási, mintegy 3 milliárd bázispárból áll. Hogy érzékeltesük a feladat nagyságát, vegyük figyelembe azt, hogy ha le akarunk írni ezt a 3 milliárd bázispárt, akkor 200 darab 1000 oldalas könyvre lenne szükségünk. Ez egy életre szóló feladat, és 78 évig naponta nyolc órát kellene olvasni, hogy a végére érjünk. Az 1990-es költségekkel számolva, azaz bázispáronként egy dollárral, a program 3 milliárd dollárba kerül, ami sokszorosa annak, amit rendszerint egy biológiai kutatásra szánnak. De ma már sokkal hatékonyabb szekvenálási módszereink vannak, így a bázispáronkénti költség már 30 centre csökkent. A program befejezésére az eredetileg tervezettnél jóval korábban sor kerülhet. 2000 nyarán bejelentették, hogy a Humán Genom Projekt keretében elkészült az első vázlatos térkép az ember teljes genetikai állományáról a bázissorrenddel együtt (*szerk.*).

A programban részt vevő kutatók közül sokan a könnyebben elérhető célokra összpontosítják a figyelmüket. Ezek közé tartozik az emberi genom egy olyan kapcsoltsági térképének elkészítése, amelyen legalább 2 cM-onként vannak a markerek (ez kb. 2 Mb-nak felel meg). A Cooperative Human Linkage Center (CHLC) már 1994-ben túlteljesítette ezt a tervet, mert egy olyan humán kapcsoltsági térképet közölt, amelyen a markerek 0,7 cM távolságyira voltak. A célok közé tartozik egy olyan fizikai térkép elkészítése, amelyen legalább 100 kb-onként ún. szekvenciával jelölt helyek (STS) vannak. 1995 végére a Whitehead Intézet orvosbiológiai kutatásokkal foglalkozó egyik népes csoportja összeállította az emberi genom mintegy 95%-át lefedő fizikai térképet, amelyen az STS markerek átlagosan 200 kb távolságra találhatók. 1999 végére elkészítették a 22-es kromoszóma, míg 2000 tavaszára a 21-es kromoszóma genetikai térképét, és meghatározták a két kromoszóma bázissorrendjét (*szerk.*).

Miért érdekel bennünket annyira az emberi genom térképezése, hogy ilyen mérhetetlen pénzt és munkát fordítunk az elkészítésére? Az intellektuális kihíváson kívül nagyon fontos gyakorlati cél az öröklődő betegségek legyőzése. Könyvünkben már számos példáját említettük azoknak a betegségeknek, amelyeket génhibák okoznak. De az esetek többségében a hibás fehérjét még nem azonosították. Tehát keresünk egy gént anélkül, hogy pontos szerepét ismernénk. Ezt az eljárást **fordított genetikaként** is emlegetik, bár sokkal megfelelőbb elnevezés a **pozicionális klónozás**. A siker nagymértékben függ a genomban elszórtan található markerektől. Ha megtaláljuk azt az egy markert, amely szoros kapcsolatban van a kérdéses génnel, akkor megcélozhatjuk a genomnak azt a régióját, és azonosíthatjuk a betegséget okozó gént. Minél több ilyen markert térképeztünk, annál nagyobb az esély arra, hogy a kérdéses gén közelében is találunk egyet, és így gyorsabban haladunk a gén keresésében. A gén azonosítása után pedig megtervezhetjük azokat a módszereket, amelyek el- lentsúlyozzák a hibát, és meggyógyítják a betegséget. Ezzel számtalan emberi szenvedésnek lehet az elejét venni, és ez az, ami érdekeltté



16.5. ábra. Transzformált dohány növények herbicidrezisztenciájának tesztelése. A felső kilenc növény vad típusú, az alsó kilencet glifozátrezisztens EPSP-génnel transzformálták. A bal oldali oszlopban lévő növények nem kaptak glifozátot. A középső oszlopban lévő 0,6 kg/ha mennyiségnek megfelelő glifozátot, a jobb oldali oszlopban lévő pedig 1,0 kg/ha mennyiségnek megfelelő glifozátot kaptak. Figyeljük meg a transzformált növények ellenálló képességét, amely különösen az alacsonyabb glifozátkoncentráció esetén szembetűnő

Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W. R., Thompson, G., Rose, R. E., Stalker D. M.: *Nature* 317:744. © 1985, a Macmillan Magazines Ltd.

teszt mindenkit abban, hogy a lehető legtöbb marker segítségével elkészüljön az emberi genom nagy felbontású térképe.

A NAGYMÉRETŰ GENOMOK TÉRKÉPEZÉSÉNEK ESZKÖZEI

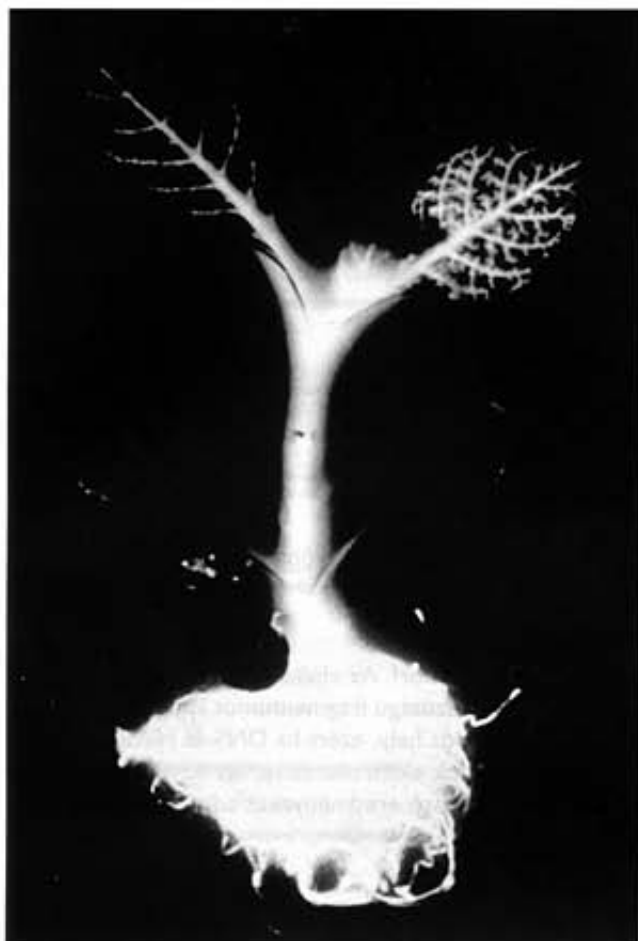
A fejezet hátralévő részében az emberi genom térképezésére használt új és hatékony módszerek közül ismertetünk néhányat. Azzal is foglalkozunk, hogyan alkalmazták ezeket a genetikusok néhány emberi betegség génjének térképezésére.

Restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus – RFLP

Viszonylag kevés génnek ismerjük a pontos helyét, ezért nagyon kis esély van arra, hogy találunk közülük egyet, amely az új, térképezendő gén közelében van. A másik lehetőség, ami nem függ egy ismert génnel való kapcsoltságtól, az, hogy egy olyan „anonim” DNS-sza-

kasszal állapítják meg a kapcsoltságot, amely akár egyetlen gént sem tartalmaz. Egy ilyen DNS-darabot valamelyik restrikciós enzimmel végzett hasítás után, a kapott mintázat alapján ismernek fel.

Mivel az egyének genetikailag különböznek egymástól, DNS-szekvenciájuk és a restrikciós enzimekkel kapott hasítási mintázatuk is eltér valamelyest. Vegyük például a *HindIII* restrikciós enzimet, amely az AAGCTT szekvenciát ismeri fel. Az egyik személy valamely kromoszómájának meghatározott szakaszán például három ilyen restrikciós helye lehet, egymástól 4 és 2 kb távolságra (16.7. ábra). Egy másik személyben a középső restrikciós hely hiányozhat, de a másik kettő megvan, egymástól 6 kb távolságra. Ez azt jelenti, hogy ha az első személy DNS-ét *HindIII* restrikciós endonukleázzal hasítják, akkor egy 2 kb és egy 4 kb hosszú fragmentumot kapnak. A második személy DNS-e pedig csak egy 6 kb hosszú fragmentumot ad. Más szóval, **restrikciós fragmentumhossz polimorfizmust**, röviden **RFLP-t** tapasztalnak. A polimorfizmus azt jelenti, hogy egy lokusznak különböző formái vagy alléljai vannak (5. fejezet). Ezért, ha bármely



16.6. ábra. A szentjánosbogár luciferáz génjével transzformált dohány növény. A növény által kibocsátott zöldes fény a luciferáz aktivitását bizonyítja. Figyeljük meg az enzim koncentrációját a gyökerekben és a szárnban

D. W. Ow és mások: Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science* 234:856–59. 1986. © AAAS

két személy DNS-ét egy restrikciós enzimmel hasítják, akkor különböző hosszúságú fragmentumokat kapnak.

Hogyan mutathatjuk ki az RFLP-t? Természetesen nem vizsgálhatjuk az egész emberi genomot egyszerre, hiszen egy tipikus restrikciós enzimnek több százezer hasító helye van a genomban. Így minden alkalommal, amikor a teljes genomot egy ilyen restrikciós enzimmel emésztik, fragmentumok százazreit hozzák létre. De nyilván senki sem szeretné ezt a hatalmas fragmentummennyiséget az egyének közötti kis különbségeikért szétválogatni.

Szerencsére van egy könnyebb megoldás. A genomikus DNS-t restrikciós enzimmel emésztik, a fragmentumokat elektroforézissel méret szerint szétválasztják, majd Southern-blottal egy membránra viszik át. Ezután a fragmentumokat jelölt DNS-próbával hibridizálják. Ha a próba komplementer ezekkel a fragmentumokkal, akkor hibridizál velük és megjelöli a fragmentumokat, amelyek autoradiográfiával vagy más módszerrel könnyen azonosíthatók. Minden egyes próbával a teljes genomnak csak egy kis részét vizsgálják, és ezáltal bármilyen különbséget könnyen észrevesznek. Természetesen van egy buktatója is a dolognak. Mivel mindegyik jelölt próba a teljes emberi DNS-nek csak egy kis részével hibridizál, nagyon kicsi az esélye an-

nak, hogy bármelyik próba éppen a keresett génnel kapcsolódó RFLP-t fogja kimutatni. Az alkalmas próba megtalálása előtt akár próbák ezreivel is elvégezhetik hibridizációt. Ez nagy munka, de legalább valami támpontot ad, és számtalan genetikai betegségért felelős gén megtalálásában kulcsszerepe volt.

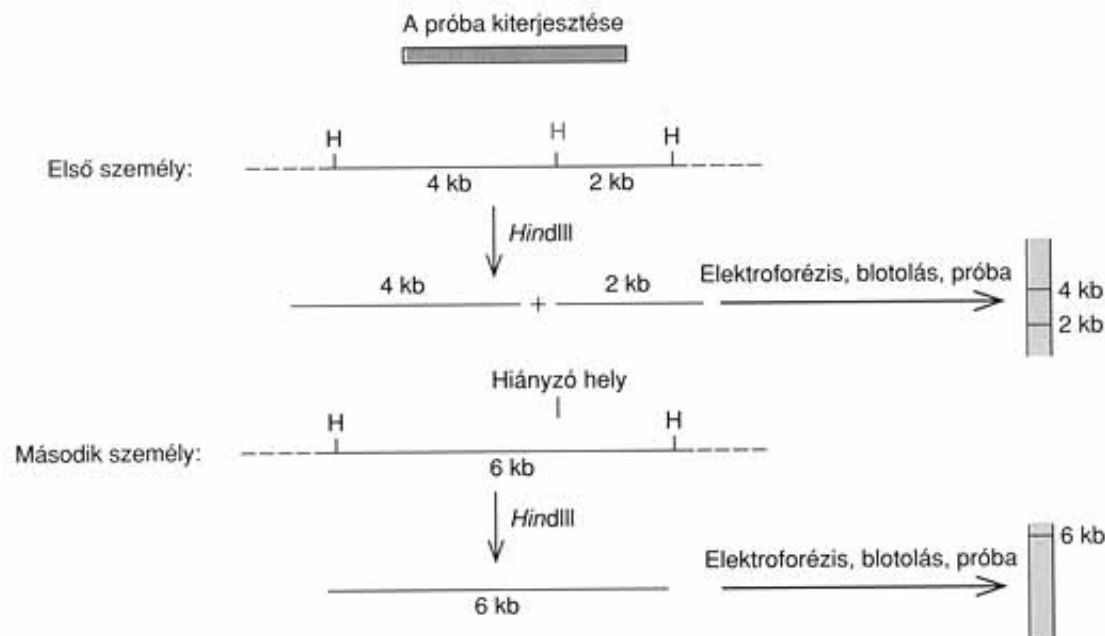
Változó számú tandem ismétlődések (VNTR-ek)

Minél nagyobb fokú egy RFLP változatossága, annál könnyebben használható. Ha például száz személy közül csak egy rendelkezik az RFLP egy formájával (pl. 6 kb fragmentum), a többi 99-nek pedig egy másik változata van (4 és 2 kb fragmentumok), akkor túl sok személyt kell megvizsgálni ahhoz, hogy azt az egy ritka variánst megtalálják. Ez unalmassá teszi a térképezést. Az RFLP-k egyik fajtája, az ún. **változó számú tandem ismétlődések**, röviden **VNTR-ek** sokkal használhatóbbak. Ezek **miniszatellit**ekből, vagyis olyan DNS-szakaszokból származnak, amelyekben egy rövid központi szekvencia egymás után többször, tandem ismétlődik. Mivel egy VNTR-ben a központi ismétlődések száma valószínűleg egyedenként változó, ezért a VNTR-ek erősen polimorfok, így térképezésük viszonylag egyszerű. De a VNTR-eknek mint genetikai markereknek van egy hátrányuk, mégpedig az, hogy rendszerint a kromoszómavégeken csoportosulnak, és ezért a kromoszómák belső részein kevés markert adnak.

Szekvenciával jelölt helyek (STS)

Egy másik anonim genetikai marker, amely nagyon népszerű a genom térképezői körében, a **szekvenciával jelölt hely**, röviden **STS**. Az STS-ek 60–1000 bázispár méretű, rövid szekvenciák, amelyek a **polimeráz láncreakciónak (PCR)** nevezett technikával azonosíthatók. Ezt a hatékony eljárást Kary Mullis és munkatársai fejlesztették ki a Cetus Corporation laboratóriumában. A 16.8. ábrán vázolt folyamat során DNS-polimerázzal a DNS egy meghatározott régiójáról másolatot készítenek. Ezután hővel szeparálják egymástól a molekula két szálát, és kiválasztják a felszaporítani, amplifikálni kívánt DNS-szakaszt (X). Ehhez rövid DNS-darabokat, a szintézis iniciációjához szükséges primereket hibridizálnak a kívánt szakasz mindkét végéhez. DNS-polimerázzal elkészítik az X szakasz mindkét szálának másolatát. Melegítéssel ismét elkülönítik egymástól a hélix két szálát, így az eredeti szálak mellett az újonnan képződtek is templátként szolgálnak a következő amplifikációs ciklusban. Ily módon a kiválasztott DNS-szakasz minden ciklus végére megkétszereződik, akár milliósorosára is felszaporítható. A folyamatot addig végzik, amíg gélelektroforézissel látható mennyiséget nem nyernek belőle. Eredetileg a DNS-polimerázt minden ciklusban frissen adták a reakcióelegyhez, mert az enzimek nem viselték el a szeparációhoz szükséges 90 °C feletti hőmérsékletet. Napjainkban már olyan speciális hőstabil polimerázokat használnak, amelyek kibírják a magas hőmérsékletet. Közülük legnépszerűbb a hóforrásokban élő *Thermus aquaticus* nevű baktériumból kivont **Taq polimeráz**. A PCR olyan hatékony amplifikációs eszköz, hogy ez adta az ötletet a népszerű tudományos-fantasztikus történet, a Jurassic Park megszületéséhez (16.2. melléklet).

A 16.9. ábrán látható, hogyan használható a PCR egy STS kimutatására. Először is elegendő információra van szükség a térképe-



16.7. ábra. Egy RFLP kimutatása. Két egyed egy *HindIII* restriktions hasítóhelyre (piros) polimorf. Az első egyed genomjában megtalálható a kérdéses restriktions hely, ezért ha a DNS-ét *HindIII*-mal emésztik, akkor egy 2 és egy 4 kb hosszúságú fragmentumot kapnak, amely az ábra felső részén látható próbával hibridizálhat. A második egyed genomjában nincs meg ez a restriktions hely, ezért ha DNS-ét *HindIII*-mal emésztik, akkor csak egy 6 kb hosszú fragmentumot kapnak, amely a próbával hibridizálhat. A fragmentumok elektroforézise, azt követő blotolása, majd a radioaktív próbával való hibridizálása az autoradiográfiás értékelés után az ábra jobb oldalán látható eredményeket adja. A két oldalt szaggatott vonallal jelölt fragmentumokat nem tüntettük fel, mert nem hibridizálnak a próbával

zendő DNS-szakasz szekvenciájáról, hogy meg lehessen tervezni azokat a rövid primereket, amelyek a térképezendő szakaszon kívül, attól néhány száz bázispár távolságra hibridizálnak, és közreműködnek a közöttük lévő, megjósolható hosszúságú DNS-szakasz amplifikálásában. Ezután ezzel a két primerrel bármilyen ismeretlen DNS-szakaszt amplifikálhatnak, és ha a megfelelő méretű amplifikált DNS-fragmentum megjelenik, akkor a keresett STS az ismeretlen DNS-en van. Meg kell jegyezni, hogy a primerek hibridizációja az ismeretlen DNS-hez nem elegendő, mivel speciális számú bázispár eredményez csak megfelelő méretű PCR fragmentumot. Ez gondoskodik a hibridizáció specifikusságának ellenőrzéséről.

Mikroszatellitiek

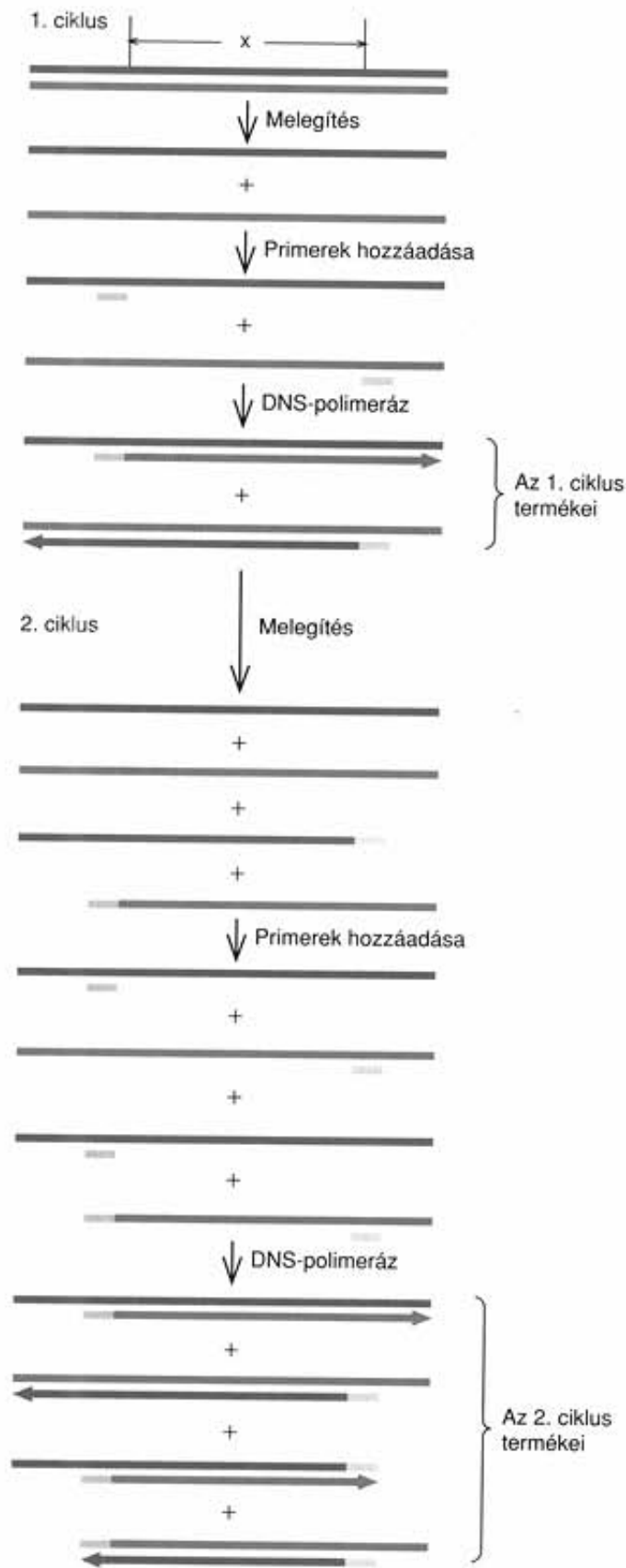
Az STS markerek nagyon hasznosak a fizikai térképezésben vagy specifikus szekvenciák helymeghatározására a genomban. A hagyományos genetikai térképezésben értéktelenek, hacsak nem polimorfok. Kizárólag ebben az esetben használhatók a genetikai kapcsoltság megállapítására. Szerencsére a kutatók felfedezték a STS-ek egy osztályát, a **mikroszatellit**eket, amelyek nagy poliformizmust mutatnak. A mikroszatellitiek abban hasonlítanak a miniszatellitiekhez, hogy sorban egymás után többször ismétlődő központi szekvenciából állnak. De amíg egy jellemző miniszatellit központi szekvenciája egy tucat vagy akár több bázispár hosszú, addig a mikroszatellitiek sokkal rövidebb, rendszerint csupán 2–4 bázispár hosszú. 1992-ben Jean Weissenbach és munkatársai az egész emberi genom egy olyan kapcsoltsági térképét hozták létre, amely 814 C-A dinukleotid ismétlődést tartalmazó mikroszatelliten alapult. Klónozott DNS-szakaszokat izoláltak, amelyek tartalmazták a mikroszatellit

mind egyik lokusznál határosak az ismétlődésekkel. Egy adott primer párral kapott PCR termék mérete attól függött, hogy a vizsgált személy mikroszatellitje milyen számú C-A ismétlődést tartalmazott ezen a lokuszon. Szerencsére, az ismétlődések száma kis egyedi változatosságot mutat. Azontúl, hogy a mikroszatellitiek erősen polimorfok, meglehetősen gyakori és viszonylag egyenletes eloszlású elemei az emberi genomnak. Ezért mind a fizikai, mind pedig a kapcsoltsági térképek készítésének ideális markerei.

Mesterséges élesztőkromoszómák

Az előző fejezetben és ennek a fejezetnek az elején bemutatott klónozó és térképező eszközökkel szemben a legfontosabb kifogás, hogy a klónozó vektorokba nem vihető elegendő DNS az emberi genom nagy méretarányú fizikai térképezéséhez. Még a kozmidokba is csak 50 kb méretű inszert építhető, és ez igen kevés akkor, ha például milliónál is több bázispárból álló régiót szeretnének térképezni. Az emberi genom egy adott szakaszát térképező genetikusok célja, hogy olyan klónkészlethez, ún. **contig**hoz jussanak, amely egymással érintkező (valójában átfedő), nagy távolságot magában foglaló DNS-eket tartalmaz. Ez leginkább egy kirakó játékhoz hasonlítható, amit annál könnyebb összerakni, minél nagyobbak a darabjai. Mindezek miatt óriási előnyt jelentenek azok a vektorok, amelyek tekintélyes méretű DNS-t tartalmaznak.

Szerencsére, a kifejlesztett vektorok között vannak olyan nagy kapacitásúak is, amelyek több százezer bázispár befogadására képesek. Ezek a **mesterséges élesztőkromoszómák** (yeast artificial chromosomes – **YAC**). Az egy megabázisnyi vagy ennél nagyobb YAC-okat megaYAC-oknak nevezik. A YAC az élesztő egy bal és egy jobb oldali kromoszomális telomeráját tartalmazza (7. fejezet).



16.8. ábra. DNS felszaporítása, amplifikációja polimeráz láncreakcióval (PCR). 1. ciklus: Kétszálú DNS-ből indulnak ki (fent), amelynek szárait (piros és kék) magas hőmérsékleten elválasztják egymástól. Ezután rövid, egyszálú, a felszaporítani kívánt szakasz (X) végeivel komplementer DNS-primereket (lila és sárga) adnak a rendszerhez. A primerek az egymástól elválasztott DNS-szálak megfelelő részéhez hibridizálnak. A primerekből kiindulva egy speciális hőstabil DNS-polimeráz komplementer DNS-szálat szintetizál. A nyílak az újonnan szintetizált DNS-t jelölik. Az 1. ciklus végén már két olyan DNS-kettős hélix van, amely az amplifikálni kívánt régiót tartalmazza. 2. ciklus: A folyamatot megismétlik, a DNS-szálakat melegítéssel elválasztják, hűtéssel lehetővé teszik a primerekkel való kapcsolódást, és a hőstabil DNS-polimeráz segítségével DNS-szintézist végeznek. Már négy olyan DNS-kettős hélix van a rendszerben, amelyek templátként szolgálhatnak a komplementer DNS szintéziséhez. A négy DNS-duplex mindegyike tartalmazza a felszaporítani kívánt szakaszt. Figyeljük meg, hogy a DNS-molekulák száma minden ciklus során megkettőződik, mert minden ciklus terméke a következő ciklusban templátként szolgál a szintézishez. Ez az exponenciális növekedés rövid idő alatt igen nagy számú molekulát eredményez.

16.2. Jurassic Park – Nem csak fantázia?

Michael Crichton „Jurassic Park” című könyvében és a könyv alapján készült filmben egy kutató és egy vállalkozó fantasztikus kalandba kezd: dinoszauruszokat akarnak életre kelteni. Azt tervezik, hogy dinoszaurusz-DNS-t izolálnak, de nem dinoszauruszok maradványaiból, hanem egy jura időszaki vérszívó rovarból, amelyik a dinoszauruszok vérével táplálkozott. A rovar beleragadt egy fa mézgájába, megkövesedett, és egy borostyánkőben találtak rá. Elképzelésük szerint a dinoszauruszok vérében lévő fehérvérsejtek DNS-e megmaradhatott a rovar bélcsatornájában. A következő lépésben PCR-rel amplifikálják a dinoszaurusz-DNS-t, a darabokat összekapcsolják, majd bejuttatják egy tojásba, és hipp-hopp, kikeltetik a dinoszauruszt.

A dolog meglehetősen abszurdnak tűnik, és felvet bizonyos gyakorlati problémákat, amelyek miatt a sztori teljes egészében a sci-fi világába tartozik. De megdöbbenő, hogy a történet egyes elemei napvilágot láttak a tudományos irodalomban is. 1993 júniusában, abban a hónapban, amikor a *Jurassic Park*ot bemutatták a mozikban, megjelent egy cikk a *Nature* c. tudományos lapban. Arról számolt be, hogy Libanonban rábukáltak egy rég kihalt ormányosbogárra, amely 120-135 millió évvel ezelőtt beleragadt egy borostyánkőbe. Kivonatot készítettek belőle, és egy génjének egy részét PCR-rel amplifikálták, majd szekvenálták. A lelet a kréta időszakból származik, tehát nem a korábbi jurából, de mindenesetre ebben az időben még jócskán éltek dinoszauruszok a Földön. Ha a cikk állítása igaz, akkor valóban lehetne konzerválódott vérszívókat találni dinoszaurusz-DNS-sel a bélcsatornájukban. Még az is lehetséges, hogy az a DNS eléggé ép ahhoz, hogy egy PCR-rel történő sokszorosításhoz templátként szolgáljon. Végül is a PCR technika elég hatékony módszer ahhoz, hogy egyetlen DNS-molekulából kiindulva, tetszés szerinti mennyiséget állítsunk elő.

Akkor hát, mi az akadály a dinoszauruszok gyártásának? Most felejtsük el, hogy nem tudjuk, miként lehet kizárólag DNS-ből egy gerinces állatot előállítani, foglalkozzunk csak a PCR korlátjaival. Ezek közül az egyik az, hogy jelenleg 40 kb körül van a PCR-rel amplifikálható DNS-fragmentumok mérete. Nagyságrendjét tekintve ez százvezred része lehet a dinoszaurusz genomnak, amiből az következik, hogy legalább százezer PCR fragmentumból kellene összerakni a teljes genomot. Ez pedig azt is feltételezi, hogy eleget tudunk a dinoszaurusz-DNS szekvenciájáról ahhoz, hogy PCR primereket készítsünk az összes fragmentumhoz.

De mi lenne a helyzet akkor, ha kifejlesztenénk egy olyan PCR módszert, amellyel 40 000 bázispár fölé tudnánk menni? Mi lenne, ha a PCR olyan hatékony lenne, hogy egész kromoszómákat, akár több százmillió bázispárt tudnánk egyszerre amplifikálni? Akkor ismét azzal az akadállyal találánk szemben magunkat, hogy a DNS

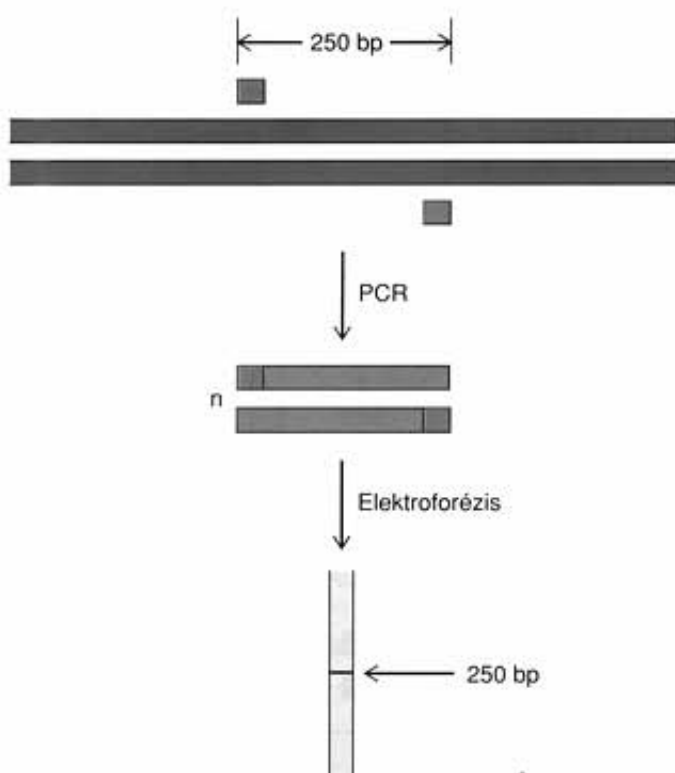
szerkezeténél fogva instabil molekula, és nem valószínű, hogy ép, egész kromoszómák évmilliókon át fennmaradjanak, még egy borostyánkőbe zárt rovarban sem. PCR-rel csak viszonylag rövid szakaszokat tudunk sokszorozni, hiszen a primereknek ép molekulához kell kapcsolódnuk ezen a rövid szakaszon. De nemhogy ép kromoszómát, de még egy ép megabázisnyi méretű DNS-darabot sem valószínű, hogy találunk.

Ezen megfontolások miatt meglehetősen hitetlenül fogadják az ősi DNS-molekulák amplifikálásáról közölt beszámolókat. Sokan azzal érvelnek, hogy egyszerűen elképzelhetetlen, hogy egy olyan törékeny molekula, mint a DNS, évmilliókig fennmaradjon. Úgy gondolják, hogy a dinoszaurusz-DNS már régen nukleotidokra bomlott, és teljesen alkalmatlanná vált arra, hogy a PCR-hez templát legyen. Úgy tűnik, hogy ez valóban igaz lehet valamennyi ősi DNS-re, kivéve azt, amely borostyánkőben maradt meg.

Másrészt tény, hogy a PCR berendezés valóban amplifikált valamilyen DNS-t az ősi rovarmaradvány mintáiból. Ha ez nem ősi rovar-DNS, akkor mi? Ilyenkor vetődik fel a PCR módszer következő korlátja: a rendkívüli érzékenység. Láttuk, hogy a módszer egyetlen DNS-molekula amplifikálására is alkalmas, ami nagyon hasznos, ha valóban azt a molekulát akarjuk felszaporítani. De ez az érzékenység azt jelenti, hogy akár egyetlen szennyező molekulát is sokszorozhatunk a mintából a kívánt DNS helyett. Ezért a kréta időszaki ormányosbogár DNS-ét tanulmányozó kutatók a PCR amplifikációt és a szekvenálást először az ősi DNS-en végezték el, majd csak ezután dolgoztak a mai rovar-DNS-sel való összehasonlításon. Így igyekeztek elkerülni azt a veszélyt, hogy a kihalt ormányosbogár DNS-e helyett, az előző kísérletekből visszamaradt nyomszennyeződések amplifikálódnak. Csakhogy DNS mindenhol van, főleg egy molekuláris biológiai laboratóriumban, és minden egyes molekula megsemmisítése rendkívül nehéz. Ráadásul, egy rovar bélrendszerében lévő dinoszaurusz-DNS nagymértékben szennyezett lehet a rovar DNS-ével, nem beszélve a bélbaktériumok DNS-éről. Továbbá, ki tudja megmondani, hogy vajon a rovar csak egy dinoszaurusz vérével táplálkozott-e, mielőtt beleragadt a mézgába? Ha a rovar kétféle dinoszaurusz vérével táplálkozott, akkor a PCR során a DNS-ek feltehetően együtt amplifikálódnak, és nem választhatók el egymástól.

A fentieket összegezve látható, hogy már van néhány olyan eszköz a kezünkben, amellyel létrehozhatunk egy Jurassic Parkot, de bármily csábító a gondolat, hogy igazi dinoszauruszt lássunk, a megvalósítás problémái olyan óriásiak, hogy erre nincs esély.

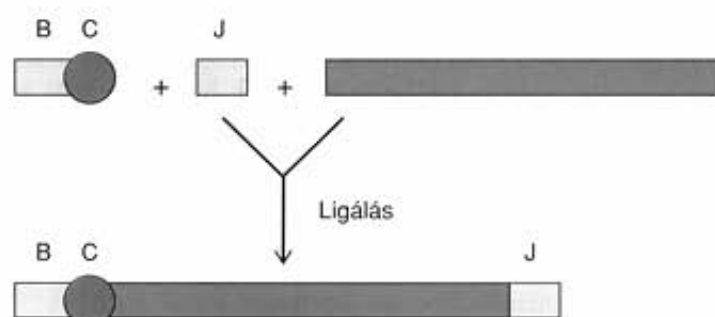
Sokkal realitásabb az a lehetőség, hogy a PCR technika segítségével régen kihalt szervezetek génszekvenciáit ma élő rokonaikkal hasonlítsuk össze. Michael Clegg botanikus ezt az új, izgalmas területet „molekuláris paleontológiá”-nak nevezi.



16.9. ábra. Szekvencajelölt helyek (STS-ek). Nagyméretű, klónozott DNS-ből indulnak ki, amely mindkét irányban meghatározatlan kiterjedésű. A DNS kis területeinek szekvenciáit ismerik, így ezekhez a régiókhoz primereket tervezhetnek, és közreműködésükkel PCR során kétfonalas, előre meghatározott hosszúságú fragmentumokat hozhatnak létre. Ebben az esetben két olyan PCR primert (piros) használtak, amelyek 250 bázispárra vannak egymástól. Több PCR ciklus után nagyszámú, kétfonalas, pontosan 250 bázispár hosszú terméket kapnak. Elektroforézissal a termék mérete pontosan meghatározható, és az is, hogy ez-e a megfelelő DNS szakasz

A szabályos kromoszomális replikációhoz a két telomera mellett egy élesztő centromeron is szükséges, amely biztosítja a testvérkromatidák szabályos szétválását az osztódás során. A centromeron a bal oldali telomera szomszédságában található. A centromeron és a jobb oldali telomera közé pedig hatalmas méretű emberi (vagy más eredetű) DNS-darabot lehet beépíteni (16.10. ábra). A beépítésre alkalmas nagy DNS-inszerteket nagy hosszúságú humán DNS-szakaszok enyhe restriktions endonukleázos emésztésével nyerik. Az inszertet tartalmazó YAC-okat élesztősejtekbe juttatják, ahol azok szabályos élesztőkromoszómaként replikálódnak.

Amikor az emberi genom YAC-könyvtára elkészül, akkor valamilyen módszerrel azonosítani kell azokat a klónokat, amelyek a térképezni kívánt régiót tartalmazzák. Erre többféle lehetőség is kínálkozik. A YAC DNS-t hibridizálni lehet egy olyan jelölt DNS-próbával, amely komplementer a kérdéses régióval, de a munka körülményeit igényel a nem-specifikus hibridizáció miatt. Megbízhatóbb módszer, ha a mesterséges élesztő kromoszómákon szekvenciával jelölt helyeket (STS-ek) keresnek. A legcélszerűbb a szűrést legalább kétféle, egymástól néhány százezer bázispárra lévő STS-re végezni a YAC könyvtárban. Így nagy távolságot átfogó mesterséges kromoszómák válogathatók ki.

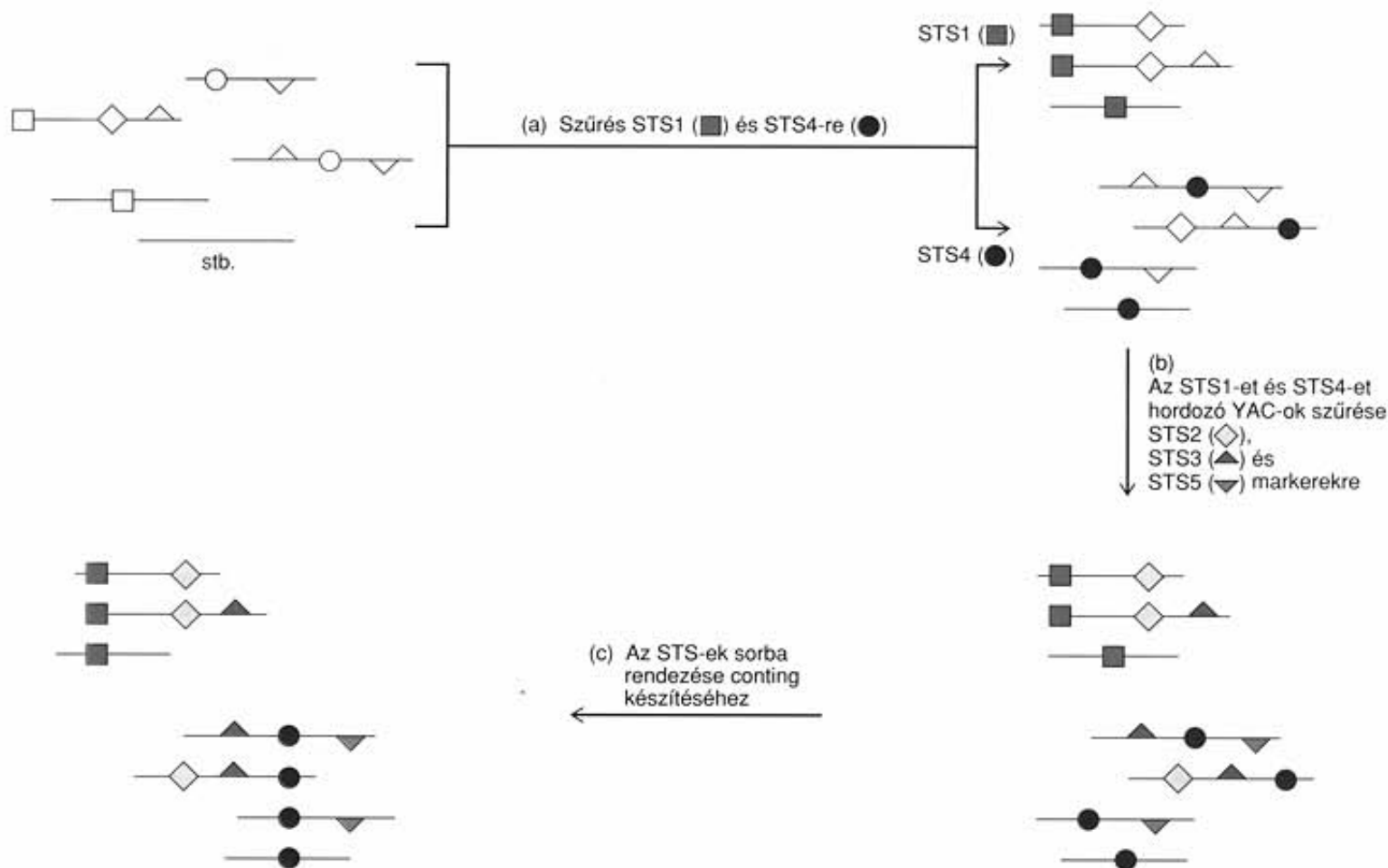


16.10. ábra. Klónozás mesterséges élesztőkromoszómákban (YAC-ok). Egy élesztőkromoszóma két végének rövid DNS-szakaszából indulnak ki. Egyikük, a bal kar a bal telomerát (B, sárga) és a centromeront (piros) tartalmazza. Másikuk, a jobb kar a jobb telomerát hordozza (J, sárga). A két karhoz nagyméretű idegen DNS-t (kék) – például több száz kb hosszúságú emberi DNS-t – kapcsolnak a YAC kialakításához. A YAC az élesztősejtekben a szabályos kromoszómákkal együtt replikálódik

Amikor már sok pozitív YAC-ot találtak, akkor a térképezést újabb STS markerekre való szűréssel kezdik, ami alapján sorba állítják őket (16.11. ábra). Az átfedő mesterséges kromoszómák ilyen sorozata fogja az új contigot alkotni. Ezután el lehet kezdeni a contig finomabb térképezését, sőt a legérdekesebb régiók szekvenálását is.

Ezeknek és más térképező technikáknak az alkalmazásával a kutatók jelentős előrelépéseket tettek az emberi genom feltérképezésében. Ahogy azt ebben a fejezetben már említettük, olyan genetikai térképeink is van a teljes genomról, amelynek átlagos felbontása 0,7 cM. Ezek a térképek különösen akkor hasznosak, ha YAC-ba klónozott DNS-szegmentumok contigjait ábrázolják. Tehát, ha valaki egy olyan betegség génjét keresi, amely ezen kromoszómák egyikén lokalizálható, akkor sokkal egyszerűbb a feladata. Csak találnia kell két olyan STS markert, amely a kérdéses gént határolja, meg kell néznie a térképen, hogy melyik YAC vagy YAC-ok tartalmazzák ezeket az STS-eket, és megkezdheti a gén végső kikeresését. Ezekon a térképeken hibák is vannak, melyek a térkép finomításával kiküszöbölődnek.

Az emberi genom térképezéséhez olyan markerekre van szükség, amelyekhez a gének helyzetét viszonyítani tudják. Ilyen markerek lehetnek más gének vagy ún. anonim DNS-szakaszok, például az RFLP-k, VNTR-ek, STS-ek és mikroszatellitek. Az utóbbi kettő olyan DNS-régiókat jelent, amelyek azonosíthatók primerpárokkal kialakított PCR-rel amplifikált meghatározott hosszúságú DNS-ek segítségével. A megabázis szintű DNS-térképezéshez nagyobb DNS-darabok szükségesek, amelyek például mesterséges élesztőkromoszómákban klónozhatók. Ezekkel az eszközökkel a genetikusok olyan térképet is készítettek a teljes emberi genomról, amelyen a markerek átlagosan 0,7 cM távolságra vannak egymástól. A 21-es és az Y-kromoszómákat még alaposabban térképezték, YAC-okból álló contiggal fedték le.



16.11. ábra. Térképezés szekvenciajelölt helyekkel (STS). Az ábra bal felső részén különböző szimbólumokkal jelölt YAC-ok láthatók. A szimbólumok a specifikus távolságokra elhelyezkedő különböző STS markereket jelölik. A térképezés (a) lépésében két vagy több, egymástól nagy távolságra lévő STS-re végzik a keresést. Ez esetben az STS1-re és az STS4-re. Az ábra jobb felső sarkában mindegyik STS1-et vagy STS4-et hordozó YAC látható. Az azonosított STS-ek színesek. A (b) lépésben a kiszűrt YAC-okon STS2, STS3 és STS5 markereket keresnek. Az ábra jobb alsó sarkában levő YAC-ok tartalmazzák az azonosított STS-eket. A (c) lépésben az STS-ek alapján sorrendbe rakják a YAC-okat, és contigot alakítanak ki. A YAC-ok hosszának gélelektroforézissel történő meghatározása segítséget jelent a YAC-párok közötti távolság megállapításához

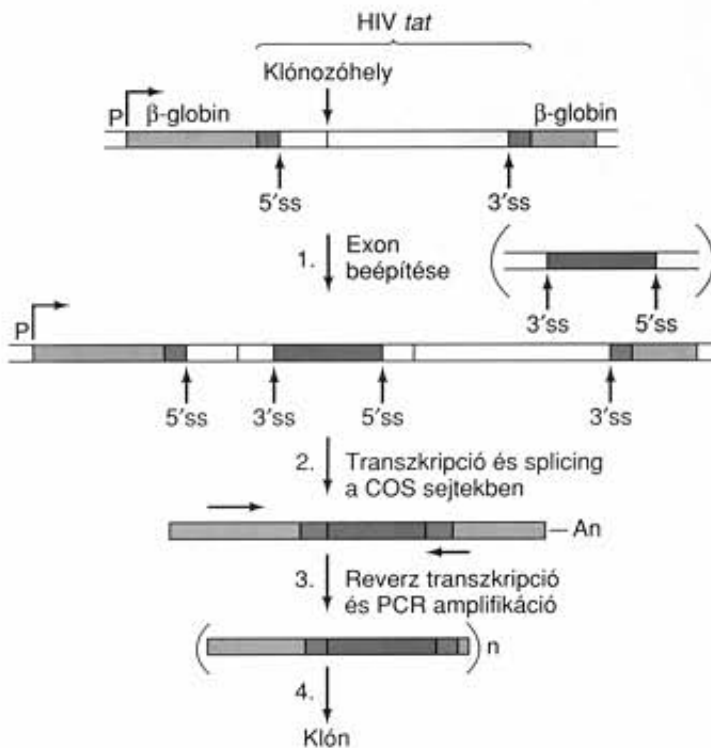
Exoncsapdák

Ha már van egy több száz kilobázis hosszú contigunk, akkor a következő probléma a gének szétválasztása a többi DNS-től. Az egyik mód az, hogy az egész régió bázissorrendjét meghatározzuk, és megkeresjük a nyitott leolvasási kereteket (ORF), de ez rendkívül munkaigényes. Számos hatékonyabb módszer is van, mint például az Alan Buckler által kidolgozott **exoncsapdázás** vagy **exonamplifikálás** (16.12. ábra). Az eljárás egy plazmid vektort, például a pSPL1-et használnak. Ezt a vektort Buckler erre a célra tervezte. Tartalmaz egy kimérés gént, amelyet az SV40 korai promotor szabályoz. A gén a nyúl β -globin génjéből származik, amelynek második intronját eltávolították, és helyettesítették HIV-ből származó idegen intronnal, annak saját 5'- és 3'-splice-helyeivel. A plazmid intronjának restrikciós helyére emberi kromoszomális DNS-fragmentumokat illesztnek, majd a rekombináns vektort majomsejtekbe (COS-7 sejtek) építik, amelyek az SV40 promoterről át tudják írni a gént. Ha az intronba beépített bármelyik genomikus DNS-fragmentum saját 5'- és 3'-splice-hellyel rendelkező teljes exon, akkor ez az exon része lesz a COS-7 sejtekben az érett transzkriptumoknak. A COS sejtek által előállított RNS-t tisztítják, reverz transzkripcióval cDNS-t ké-

szítenek belőlük, majd ezt a cDNS-t PCR-rel felszaporítják. A PCR-hez olyan primereket használnak, amelyek az új exonok amplifikálásához készültek. Végül a PCR termékeket klónozzák, amelyek csak az exonokat képviselik. Bármilyen más DNS-darab, amely beépült az intronba, nem rendelkezik splicing jelekkel, ezért az átírás után a környező intronnal együtt eltávolításra kerül.

CG-szigetek

Egy másik génkeresési technika azt a jelenséget használja ki, hogy az emberi gének hajlamosak metilálatlan CG szekvenciákhoz kapcsolódni, ugyanakkor az inaktív régiókban a CG szakaszok csaknem mindig metiláltak (14. fejezet). Továbbá, a *HpaII* restrikciós endonukleáz a CCGG szekvenciáknál hasít, de csak akkor, ha a második C nem metilált. Más szóval hasítja az aktív géneket, amelyek CCGG helyein belül metilálatlan CG-k vannak, de nem emészti a metilált CCGG-vel rendelkező inaktív géneket. Tehát a kutatók a DNS nagyobb szakaszain kutatják azokat a pontokat, amelyeket hasít a *HpaII*. Az ilyen helyet **CG-szigetnek** vagy **HTF-szigetnek** (*HpaII* tiny fragments) nevezik, mivel a *HpaII*-vel való emésztés kicsi fragmentumokat eredményez.



16.12. ábra. Exoncsapdázás. A folyamathoz egy olyan klónozó vektor szükséges, mint az itt kissé leegyszerűsített formában bemutatott pSPL1. A vektornak van egy SV40 promotere (P), amely egy hibrid gén expresszióját szabályozza. A hibrid gén egy nyúl β -globin génje (narancssárga), megszakítva a HIV *tat* génjének egy részével, amelyben egy intront (sárga) két exon (kék) vesz körül. Az exon-intron határon 5'- és 3'-splice-helyek (ss) találhatóak. A *tat* intronban van egy klónozóhely, ahová tetszőleges DNS-szakaszok építhetők. Az 1. lépésben egy exont (piros) építenek be, amelyet intronjainak részei, valamint saját 5'- és 3'-splice-helyei határolnak. A 2. lépésben a konstrukciót COS sejtekbe juttatják, ahol az átíródik, és a splicing is lezajlik. Figyeljük meg, hogy az idegen exon a splicing után megjelenik az érett transzkriptumok között, mert saját splice-helyei voltak. Végül, a 3–4. lépésben a transzkriptumokról reverz transzkripciót, majd a nyilakkal jelzett primerekkel PCR amplifikációt hajtanak végre. A folyamat végére nagyszámú idegen exont tartalmazó DNS-fragmentumot kapnak, amelyet ezután klónoznak és vizsgálhatnak. Egy olyan DNS-szakaszon, amely nem teljes exon, nincsenek splice-helyek, ezért a transzkriptumból az intronnal együtt splicingra kerül, így nem jut el a 3. lépésben történő amplifikációig.

Egy nagy contigon belül számos módszerrel lehet azonosítani a géneket. Ezek közül az egyik az exoncsapda, amely egy speciális vektor révén csak az exonok klónozását teszi lehetővé. A másik módszer metilátlan CG szekvenciákat tartalmazó DNS-régiók, CG-szigetek keresése metilációra érzékeny restriktív enzimekkel.

KNOCK-OUT ÁLLATOK

Ha a kutatóknak sikerült egy betegséget okozó génre jelöltet találniuk, három egymást kiegészítő módszerrel bizonyosodhatnak meg arról, hogy valóban az igazít találták-e meg. Az első lépés

annak kimutatása, hogy a beteg személyekben lévő allél valóban eltér-e az egészségesek alléljától. A második lépésben egy kísérleti állat megfelelő génjében szándékosan mutációkat idéznek elő, és megfigyelik, hogy a mutációk hasonló betegséget okoznak-e, mint az emberben. A harmadik lépésben a mutáns sejtek hibáját korrigálják a vad típusú gének bejuttatásával. A mutációk kiváltásának elterjedt módja egy egéren működésének célzott megszüntetése, más szóval **knock-out egér** létrehozása.

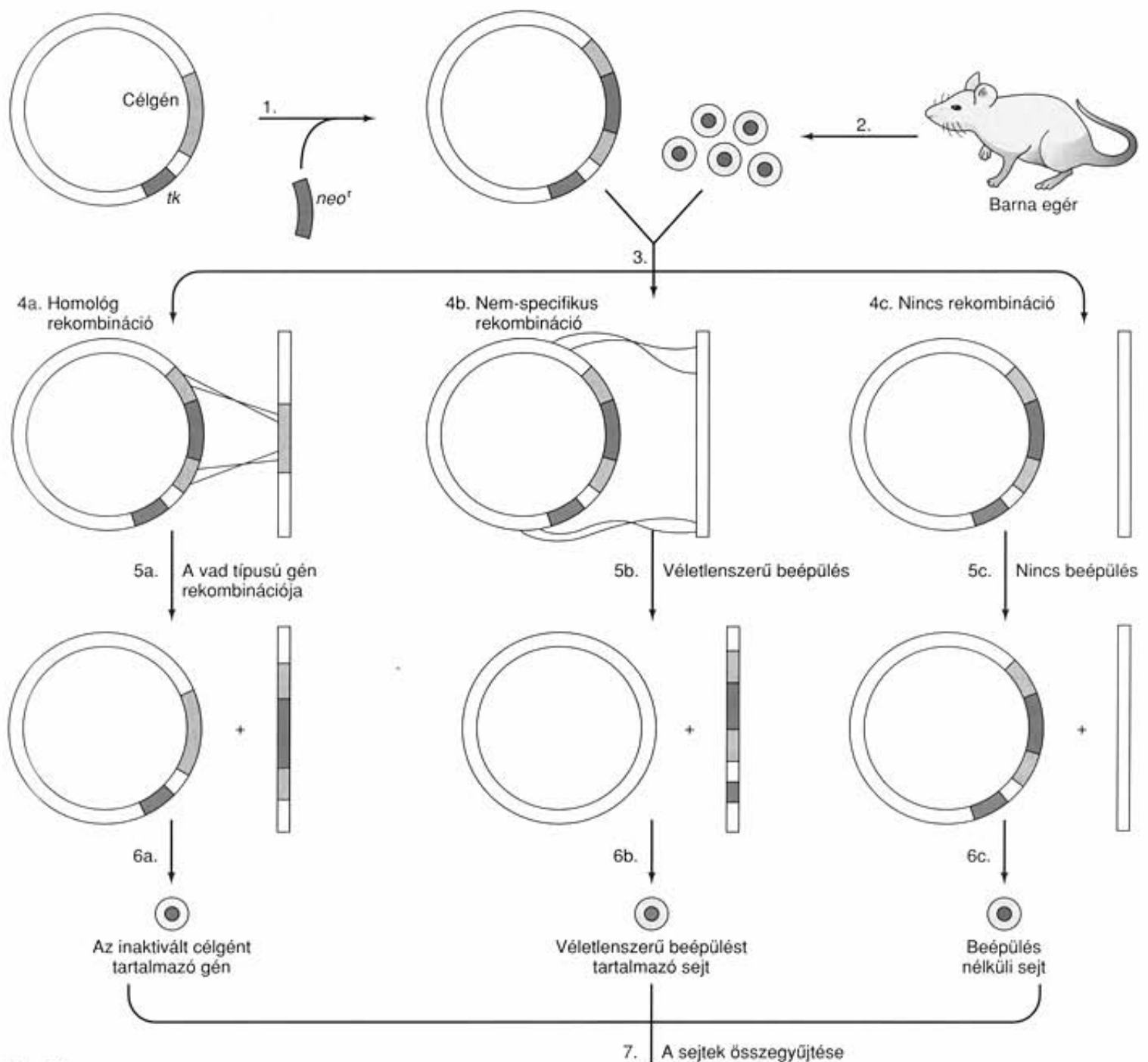
A 16.13. ábra a knock-out egér előállításának egyik módját szemlélteti. Először klónozzák a knock-outra szánt gént tartalmazó DNS-t. A kérdéses gént megszakítják a neomicin antibiotikumrezisztencia génjével. Ezután a klónozott DNS-be, de a célgénen kívül beépítik a timidin kináz (*tk*) génjét is. Később ezek az extra gének lehetővé teszik, hogy eltávolítsuk azokat a klónokat, amelyekben nincs megszakított gén.

A következő lépésben a manipulált egér-DNS-t barna egér embrionális őssejtjeivel keverik össze. A sejtek kis százalékában a megszakított gén bejut a sejtmagba, ahol homológ rekombináció történhet a módosított gén és a változatlan, ép gén között. Ezzel a rekombinációval a módosított gén az egér genomba kerül és eltávolítja a *tk* gént. Az ilyen rekombinációs események viszonylag nagyon ritkák, ezért nagyon sok őssejtben megmarad az eredeti, megszakítás nélküli gén. Ráadásul előfordulhat nem-specifikus rekombináció is, amely révén a manipulált gén véletlenül épül be a genom valamelyik pontjára, de az intakt gént nem szorítja ki.

A következő lépésben valahogyan el kell távolítani azokat a sejteket, amelyekben nem zajlott le homológ rekombináció. Erre alkalmasak a bevitt extra gének. Azoknak a sejteknek, amelyekben nem történt homológ rekombináció, nincs neomicinrezisztencia génjük, vagyis eliminálhatók, ha a sejteket a neomicin egy származékát, a G418-at tartalmazó táptalajon tenyésztjük. Azok a sejtek, amelyekben nem-specifikus rekombináció történt, a megszakított génnel együtt a *tk* gén is beépült a genomjukba. Ezeket a sejteket a *tk*⁺ sejtekre letális szer, a gangcyclovir pusztítja el. (A kísérletben szereplő őssejtek *tk*⁻-ok.) A két szerrel való kezelés után már csak azok az őssejtek maradnak meg, amelyek áttestek a homológ rekombináción, és ezért a módosított célgénre heterozigóták.

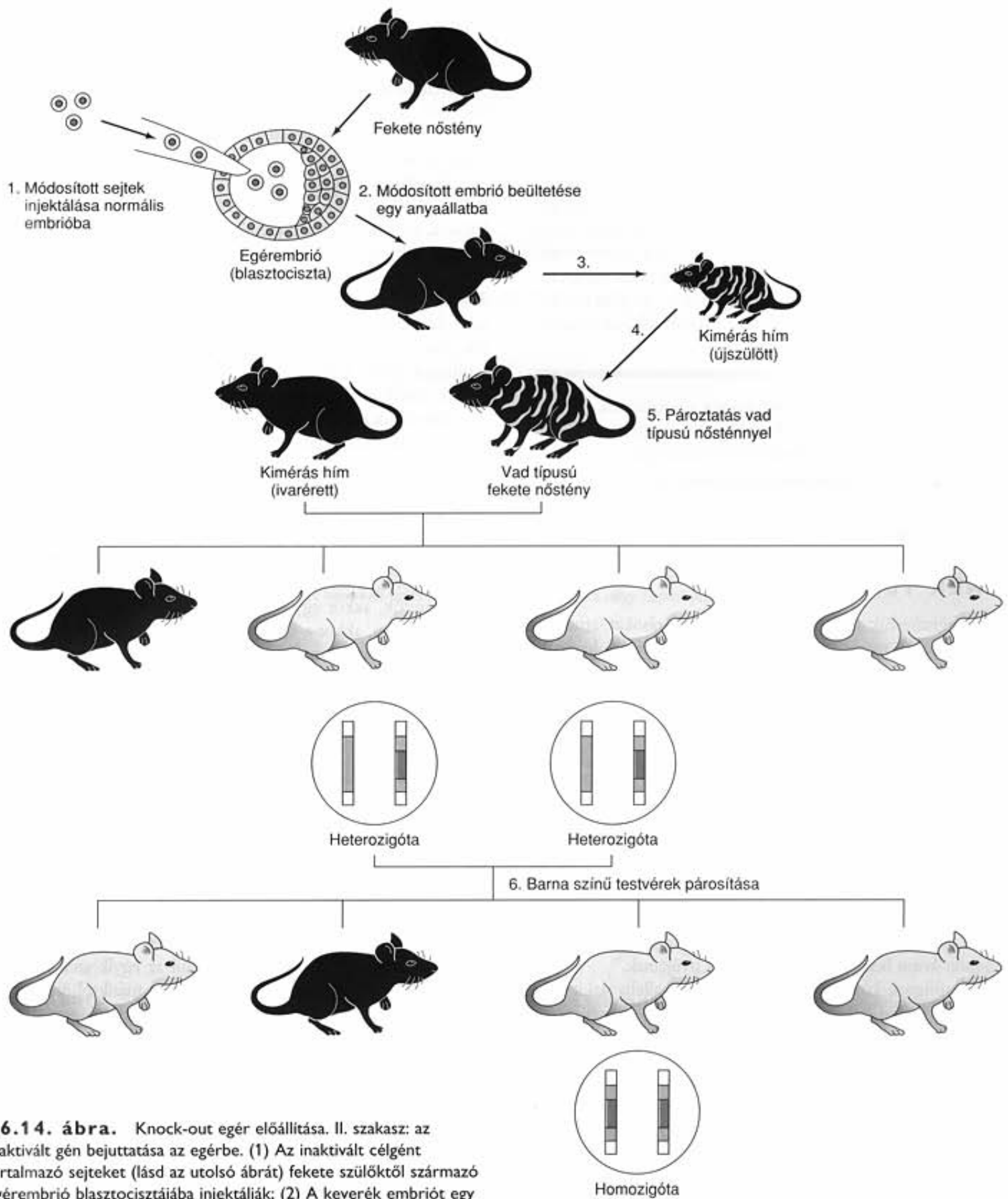
A következő cél, a módosított gén bevitele egy egérbe (16.14. ábra). A módosított sejteket olyan blasztocisztába injektálják, amelyből fekete színű egér fejlődik. Majd az embriót egy anyaállatba ültetik, amely világra hozza a kimérás egeret. A kiméra foltos szőrszíne alapján ismerhető fel. A fekete színű területek az eredeti fekete embrióból, a barna foltok pedig a beültetett, manipulált sejtekből származnak.

Valódi heterozigóta genotípusú egerek előállításához a kimérát felnevelik, és ivarérese után fekete egérrel keresztezik. Mivel a barna (*agouti*) szín domináns, ezért az utódok egy része barna. Pontosabban a manipulált őssejtekből fejlődő gamétákból kialakuló utódok a barnák. De ezeknek a barna egereknek csak a fele hordozza a manipulált gént, mert a manipulált őssejtek a megszakított gént heterozigóták voltak. A Southern-blotok azt mutatják, hogy a példában szereplő barna egerek közül kettő hordozta a módosított gént. A heterozigóta egerek párosítása



16.13. ábra. Knock-out egér előállítása. I. szakasz: Egy megszakított gént hordozó sejtek létrehozása. (1) Az inaktíválni kívánt célgént (zöld) és a timidin kináz gént (*tk*) hordozó plazmidból indulnak ki. A célgént megszakítják a neomicinrezisztencia gén (piros) beépítésével; (2) Barna (agouti) egérembrióból sejteket (barna) gyűjtenek; (3) A sejteket az inaktív célgént hordozó plazmiddal transzformálják; (4) és (5) A transzformáció következtében háromféle termék jöhet létre: 4a. A plazmidban lévő inaktív gén és a homológ vad típusú gén között, homológ rekombináció történik, így a sejtben lévő vad típusú gén a manipulált génnel cserélődik ki. (5a). 4b. A plazmid inszertje és a sejt genomjának egy nem homológ szekvenciája között nem-specifikus rekombináció történik, melynek eredményeként az inaktív célgén a *tk* génnel együtt beépül az egérsajt genomjába (5b). 4c. Nem történik rekombináció, az inaktívált célgén nem épül be a sejt genomjába (5c); (6) A háromféle eseménysorból származó sejteket különböző színnel jelöltük. A homológ rekombináció olyan sejtet (piros) eredményez, amely tartalmazza az inaktívált célgént (6a); a nem-specifikus rekombináción átment sejt (kék) a véletlenszerűen beépült inaktívált célgént és a *tk* gént is tartalmazza (6b);

a rekombináció nélküli sejtben (barna) nincs inaktívált gén (6c); (7) Mindhárom transzformált sejtípust (piros, kék, barna) összegyűjtik; (8) A sejteket a neomicinnel analóg G418-at és gancyclovirt tartalmazó táptalajon tenyésztik. A G418 hatására az összes olyan sejt, amelyben nincs neomicinrezisztencia gén, azaz nem rekombináns (barna) elpusztul. A gancyclovir a nem-specifikus rekombinációval létrejött *tk* gént hordozó sejteket (kék) pusztítja el. Ezért csak a homológ rekombináción átment, az inaktívált célgént hordozó sejtek (piros) maradnak életben



16.14. ábra. Knock-out egér előállítása. II. szakasz: az inaktivált gén bejuttatása az egérbe. (1) Az inaktivált célgént tartalmazó sejteket (lásd az utolsó ábrát) fekete szülőktől származó egérembrió blasztocisztájába injektálják; (2) A keverék embriót egy anyaállat méhében ültetik; (3) A világra jött kimérés egér barna-fekete foltos szőrzete alapján azonosítható. (Emlékezzünk vissza, hogy a megváltozott sejtek agouti egérből származtak, amelyeket fekete szőrű egerek embriójába ültettek!); (4) A kimérés egeret felnevelik (itt egy hím); (5) A kimérés vad típusú fekete nőténnyel keresztezik. A fekete színű utódokra a továbbiakban nincs szükség, mert azok biztosan vad típusú ivarsejtből keletkeztek. Csak a barna színű egerek származhatnak az átültetett sejtekből; (6) A barna

hímeket és nőtényeket kiválasztják, és Southern-blot analízissel ellenőrzik, hogy tartalmazzák-e az inaktivált célgént, majd pároztatják őket. A barna utódok DNS-ét ismét Southern-blotal vizsgálják. Az egyik egér homozigóta az inaktivált génre, ez az ún. knock-out egér

után az utódok között közvetlen DNS-vizsgálattal megkeresik azokat, amelyek erre a módosított génre homozigóták. A bemutatott példában a keresztezés után egy ilyen homozigóta, knock-out egér volt, amelynek a fenotípusát kell részletesen elemezni.

Más esetekben a knock-out letális és az érintett egérembriók még születésük előtt elpusztulnak. Megint más knock-out gének intermedier hatásúak. Például ilyen a p53 tumorsuppresszor gén, amelyről a 17. fejezetben lesz majd szó. Azok a személyek, akik ezt a hibás gént hordozzák, bizonyos típusú rákos megbetegedésekre fokozottan hajlamosak. A p53 knock-out gént hordozó egerek normálisan fejlődnek, de már fiatalon rákosak lesznek.

Egy emberi gén szerepének a tisztázására a genetikusok célzottan működésképtelenné teszik az egér megfelelő génjét, majd megfigyelik a mutáció hatását a knock-out egéren.

EMBERI BETEGSÉGEKET OKOZÓ GÉNEK TÉRKÉPEZÉSE

Miután megismertük azokat a legfontosabb eljárásokat, amelyeket a genetikusok nagyobb DNS-régiók térképezésére használnak, vizsgáljuk meg, hogyan segítettek ezek a módszerek néhány fontos emberi betegséget okozó gén azonosítását.

A HUNTINGTON-KÓR

A Huntington-kór (HD) egy fokozatosan kialakuló idegrendszeri rendellenesség. Majdnem észrevétlenül kezdődik, apró rángásokkal és ügyetlen mozdulatokkal. Az évek előrehaladtával ezek a tünetek intenzívebbé válnak és érzelmi zavarokkal társulnak. Végül 10-20 év elteltével a betegek meghalnak. Nancy Wexler, a Huntington-kór vizsgálatával foglalkozó kutató, így ír az előrehaladott állapotú betegség tüneteiről: „Az egész test járulékos, rendellenes mozgásokat végez. A törzse reszket, az arca eltorzul. A végső stádiumban a Huntington-kóros betegek tragikus látványt nyújtanak.”

A Huntington-kórt egyetlen gén domináns allélja alakítja ki. Így egy HD páciens gyermekének 50%-os esélye van arra, hogy beteg legyen. Az öröklődés lehetősége csak azzal kerülhető el, ha a beteg nem vállal gyermeket, de egyáltalán nem biztos, hogy az első tünetek megjelennek még a nemzőképes kor elérése előtt.

Mivel a genetikusok nem ismerték a Huntington-kór géntermékét, ezért közvetlenül nem keresték a HD gént (*HD*). A legjobb megközelítés egy, a *HD* génnel szorosan kapcsolt génnek vagy valamilyen más markernek a keresése volt. Michael Conneally és munkatársai több mint egy évtizedet töltöttek el egy szorosan kapcsolt gén keresésével, de eredménytelenül.

Wexler, Conneally és Gusella a *HD* génnel kapcsolt genetikai marker keresése során az RFLP módszert alkalmazták. Szerencsések voltak, mert vizsgálataikhoz egy igen népes családot találtak Venezuelában, Lake Maracaibo környékén. A XIX. század eleje óta a család több tagján jelentkeztek a Huntington-kór tünetei. Az első beteg a családban egy asszony volt, akinek az

apja, feltehetően egy európai származású férfi, hordozhatta a hibás allélt. A családfa hét generáción át nyomon követhető, és az egyes nemzedékek létszáma is szokatlanul népes egy tipikus nagycsaládban, tizenöt-tizennyolc gyermek van.

Gusella és kollégái tudták, hogy valószínűleg próbák százait kell tesztelniük ahhoz, hogy egy *HD* génnel kapcsolt RFLP-t találjanak, de nagyon szerencsések voltak. Az első tucat próba között találtak egyet (G8), amely nagyon szorosan kapcsolódott a *HD* génnel a venezuelai család mintáiban. A 16.15. ábra a *HindIII* hasító helyeket mutatja azon a DNS-szakaszon, amely hibridizált a próbával. Összesen hét ilyen hely látható, de közülük csak öt található meg minden családtagban. A másik kettő (csillaggal, illetve 1 és 2 számmal jelölve) vagy jelen van, vagy hiányzik. Ezért ez a két utóbbi hely **polimorf** vagy variábilis.

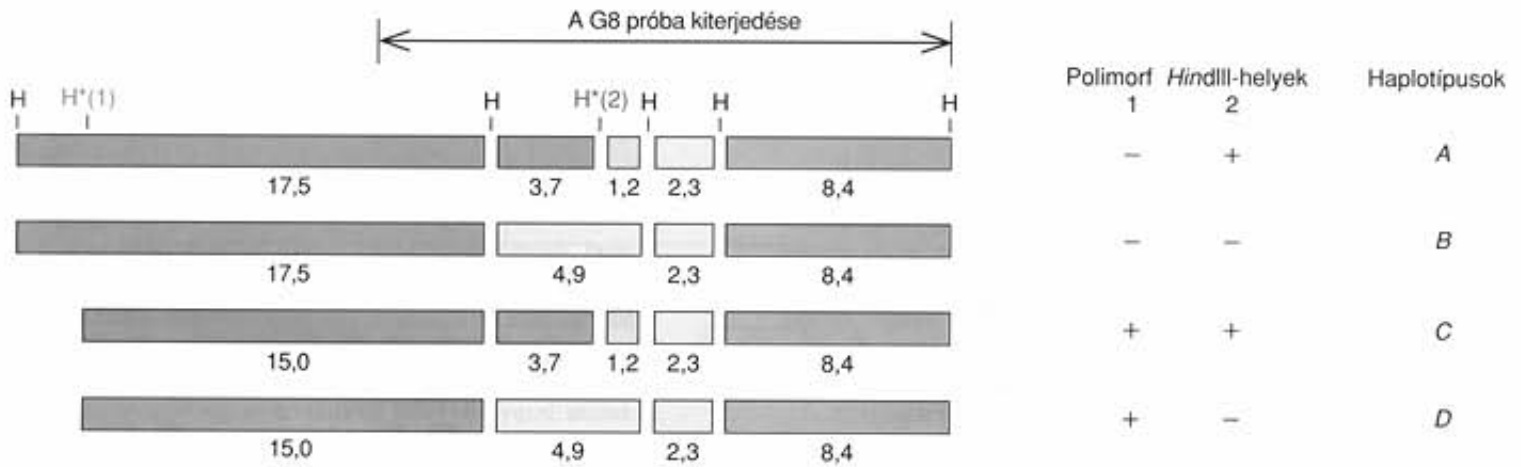
Vizsgáljuk meg, hogy ennek a két restriktív helynek a jelenléte vagy hiánya hogyan eredményez egy RFLP-t. Ha az 1-es hasítási hely hiányzik, akkor csak egy 17,5 kb hosszúságú fragmentum keletkezik. Amennyiben az 1-es hely megtalálható, akkor a 17,5 kb fragmentum két részre hasad, egy 15 kb és egy 2,5 kb hosszúságúra. Az autoradiogramon azonban csak a 15 kb-nyi fragmentum jelenik meg, mivel a 2,5 kb-nyi fragmentum kívül esik azon a régióban, amellyel a G8 próba hibridizál. Ha a 2-es hasítási hely hiányzik, akkor egy 4,9 kb fragmentum keletkezik. Ha viszont jelen van, akkor a 4,9 kb-os fragmentum egy 3,7 kb és egy 1,2 kb hosszúságú részre hasad.

A két polimorf *HindIII* restriktív hely alapján négy lehetséges **haplotípus** (allélok csoportja egyetlen kromoszómán) van, amelyet *A–D*-vel jelöltek:

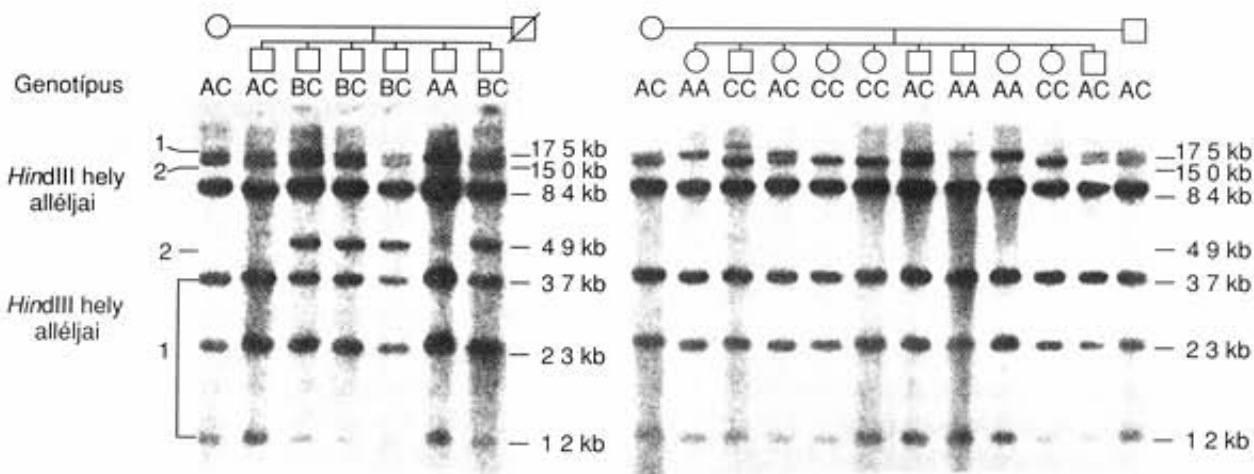
Haplotípus	1. hasítási hely	2. hasítási hely	Megfigyelt fragmentumok
A	–	+	17,5; 3,7; 1,2
B	–	–	17,5; 4,9
C	+	+	15,0; 3,7; 1,2
D	+	–	15,0; 4,9

A haplotípus kifejezés a „haploid genotípus” rövidítése, és azt hangsúlyozza, hogy minden családtag két haplotípust örököl, mindegyik szülőtől egyet-egyet. Például az egyik személy az *A* haplotípust az egyik szülőtől, a *D*-t pedig a másiktól örökölheti. Ez a személy *AD* genotípusú lesz. Néha az eltérő genotípusok (haplotípus párok) nem különíthetők el. Például, egy *AD* genotípusú személy RFLP mintázata ugyanolyan, mint az egyik *BC* genotípusúé, mert mindkét esetben mind az öt fragmentum kialakul. De a valódi genotípus a szülői genotípusok vizsgálata alapján levezethető. A 16.16. ábrán két család Southern-blot autoradiográfiája látható radioaktív G8 próbával. A 17,5 kb és a 15,0 kb fragmentumok egymáshoz nagyon közel futnak, így ha mindkettő jelen van, nehezen különíthetők el, mint például az *AC* genotípus esetében. Az *AA* genotípus a 17,5 kb-nyi fragmentum alapján viszonylag könnyen megkülönböztethető a *CC* genotípustól, amelyben csak a 15,0 kb-nyi fragmentum van jelen. A *B* haplotípus az első családban, a 4,9 kb fragmentum jelenléte alapján egyértelmű.

Ezután már csak az a kérdés, melyik haplotípus áll kapcsolatban a betegséggel ebben a venezuelai családban? A 16.17. áb-



16.15. ábra. Az RFLP alkalmazása a Huntington-kór génjének azonosításában. A G8 próba által lefedett szakasz *HindIII* restrikciós helyei az ábra felső részén láthatók. A megvizsgált családok ezen restrikciós helyek közül kettőre mutatnak polimorfizmust, a csillaggal és kék színnel jelzett 1-es, valamint a csillaggal és piros színnel kiemelt 2-es helyen. Amennyiben az 1-es restrikciós hely megtalálható a genomban, akkor az emésztés után egy 15,0 és egy 2,5 kb méretű fragmentum keletkezik. A 2,5 kb fragmentum azonban nem mutatható ki, mert kívül esik a G8-as próbával hibridizáló régió. Az 1. hely hiányában egy 17,5 kb fragmentum jelenik meg. A 2. hasító hely jelenléte egy 3,7 kb és egy 1,2 kb méretű fragmentumot ad, hiánya pedig egy 4,9 kb méretűt. A két hasítóhely jelenléte vagy hiánya négy kombinációt, négy haplotípust (A–D) eredményez, amelyek az ábra jobb oldalán láthatók, mellettük a *HindIII* hasító helyekkel és a G8 próbával haplotípusonként azonosított *HindIII* restrikciós fragmentumokkal. Az A haplotípusnak például nincs 1., de van 2. hasítóhelye. Ennek eredményeként 17,5 kb, 3,7 kb és 1,2 kb méretű *HindIII* fragmentumok keletkeznek. A próba a 2,3 és a 8,4 kb fragmentumokat is azonosítja, de ezeket nem kell figyelembe venni, mert mind a négy haplotípusnál előfordulnak.



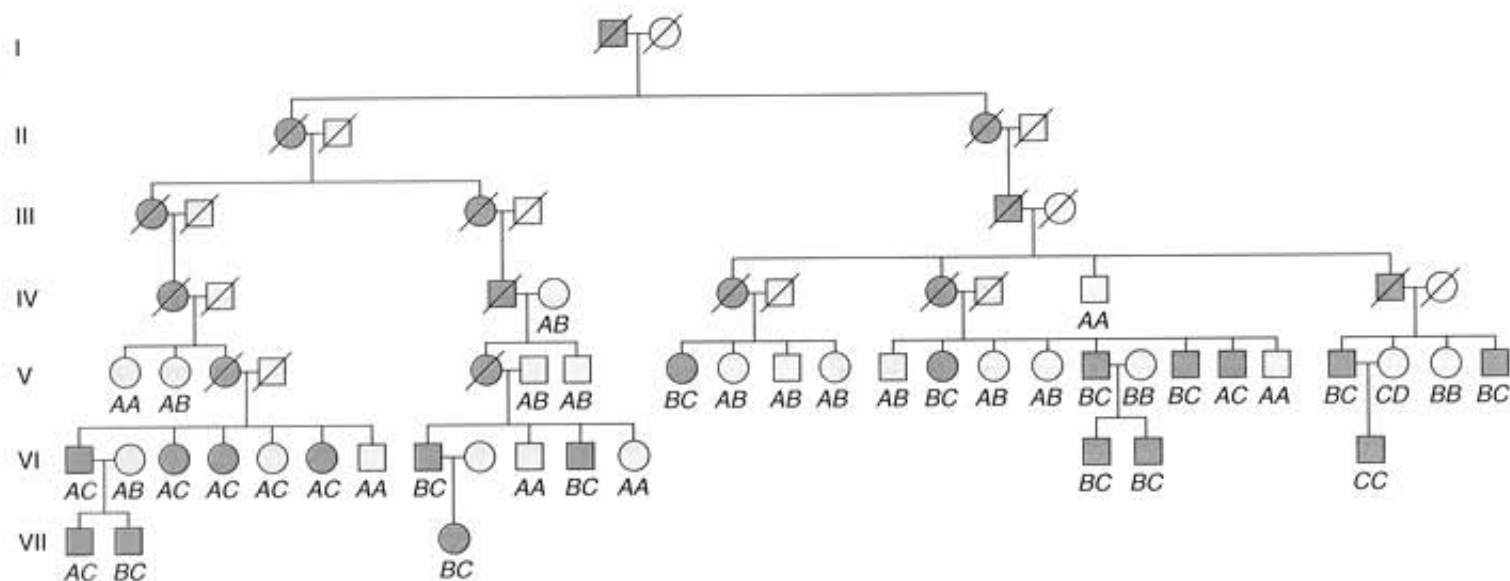
16.16. ábra. *HindIII* fragmentumok G8 próbával hibridizált Southern-blotja két család tagjaiból vett mintában. Az autoradiogramokon látható sávok DNS-fragmentumok, amelyek méretei a jobb oldalon olvashatók. Három szülő és az összes gyermek genotípusa az ábra felső részén látható. A negyedik szülő már meghalt, ezért genotípusát nem lehetett meghatározni

James F. Gusella és mások, *Nature*, 306:236 © 1983 Macmillan Magazines Ltd.

rából megállapítható, hogy minden bizonyosan a C, hiszen majdnem mindegyik ilyen haplotípusú személy beteg. Azok pedig, akik nem betegek, később csaknem biztosan azzá válnak. Ezzel egyenértékű, hogy azok, akikből hiányzik a C haplotípus, nem betegszenek meg Huntington-kórban. Ez a módszer tehát kiválóan alkalmas annak előrejelzésére, vajon a családnak egy tagja hordozza-e a Huntington-kórt kialakító allélt. Egy amerikai család hasonló vizsgálata során, a betegség az A haplotípushoz kapcsolódott. Tehát a betegséggel kapcsolt haplotípus családonként változó, de az egyes családokon belül az RFLP-hely és a HD gén kapcsoltsága olyan szoros, hogy nagyon ritka közöttük a re-

kombináció. Ezért egy RFLP-t genetikai markerként éppen úgy lehet használni térképezésre, mintha egy gén lenne.

Amellett, hogy genetikai tanácsadásra alkalmas eszköz, mit tárt még fel ez az analízis? Egyrészt lehetővé tette a HD gén helyének meghatározását a 4. kromoszómán. Gusella és munkatársai ezt egér-ember hibrid sejtvonalak kialakításával oldották meg. Mindegyik sejtvonalból DNS-t izoláltak, és radioaktív G8 próbával hibridizáltatták. Csak a 4. kromoszómát hordozó sejtvonalak hibridizáltak, a többi kromoszóma jelenléte vagy hiánya



16.17. ábra. A venezuelai Huntington-kóros család családfája. A lila színnel jelölt személyek a bizonyítottan betegek. Figyeljük meg, hogy a legtöbb C haplotipusú személy már beteg, és egyetlen betegnél sem hiányzik ez a haplotipus. A C haplotipus ezért erősen összefügg a betegség kialakulásával, a megfelelő RFLP pedig szorosan kapcsolt a Huntington-kór génjével

nem játszott szerepet. Tehát a Huntington-kór génjét a 4. pár kromoszóma tartalmazza.

Ennél a pontnál a kutatócsoportot cserbenhagyta a szerencse. Hosszú ideig bajlódtak egy térképezési vizsgálattal, amelyik azt jelezte, hogy a gén egészen a 4. kromoszóma végénél van. Ez a kutatást még bonyolultabbá tette, mert a kromoszóma vége egy „genetikai hulladéktelep”, tele ismétlődő szekvenciákkal, és géneket nem tartalmaz. Végül az évekig tartó munka után, amit Gusella „egy genetikai szeméttelen való kutakodásnak” nevezett, a kutatócsoport figyelme egy sokkal biztatóbb kromoszómaregió felé fordult. Néhány térképező munka alapján azt feltételezték, hogy a *HD* gén nem a kromoszóma végén, hanem egy 2,2 Mb méretű régióban van, amelyhez sok Mb-nyi szakaszt kell a kromoszómavégéről eltávolítani. A 2 Mb hatalmas mennyiségű DNS egy gén után való keresgéléshez, ezért Gusella úgy döntött, hogy egy olyan 500 kb méretű régióra koncentrál, amely nagyon konzervatívnek bizonyult a közös ősről visszavezethető Huntington-kóros betegek körülbelül $\frac{1}{3}$ -ában.

Gusella az exoncsapdázás módszerével próbálta megtalálni a *HD* gént az 500 kb méretű régióban, és számos exon klónt azonosított. Ezután ezeket az exonokat próbaként használta egy cDNS-könyvtárhoz, hogy azonosítsa a célregióból átíródott mRNS-ek DNS-kópiáit. Az egyik klón, az IT15 (interesting transcript number 15) olyan cDNS-ekkel hibridizált, amelyek egy nagyméretű transzkriptumot (10 366 nukleotid) azonosítottak, ami egy hatalmas fehérjét (3144 aminosav) kódol. A feltételezett fehérjetermék nem hasonlított egyetlen addig ismert fehérjére sem, és így semmilyen bizonyítékot nem adott arra, hogy kapcsolatban van a *HD* génnel. A génben viszont volt egy érdekes ismétlődés: 23 kópia a glutamint kódoló CAG tripletból (egy kópia ténylegesen CAA volt).

Gusella ennek segítségével igazolta, hogy valóban ez a *HD* gén. 75 érintett családban összehasonlította az egészséges és a beteg egyedek génjét, és kimutatta, hogy az egészséges emberekben a

CAG ismétlődések száma 11–34 között változott, 98%-ukban pedig 24 vagy kevesebb CAG ismétlődés volt. Valamennyi beteg személynél a CAG ismétlődések száma legalább 42 volt, de előfordult 100 körüli érték is. Így az ebben a génben lévő CAG ismétlődések száma alapján egy személyről előre meg lehet mondani, hogy megbetegszik-e Huntington-kórral. Továbbá a betegség súlyossága, kialakulásának kezdete és időtartama valamelyest korrelációt mutat a CAG ismétlődések számával. Azoknál az embereknél, akiknek 38–40 CAG ismétlődésük van, a tünetek csak felnőtt korban jelentkeznek, a felső értékhez közeli ismétlődéseknél pedig már gyermekkorban. Egy gyermekben az azonosított CAG ismétlődések száma 100 körül volt, és tünetei már 2 éves korban kialakultak. Végül két olyan beteget is találtak, akiknek szülei egészségesek voltak. Mindkét esetben kimutatták a megnövekedett számú CAG ismétlődéseket, amelyek a szülőkből hiányoztak. Bár új mutációk, amelyek a CAG ismétlődések számát növelik, ritkán fordulnak elő a *HD* génben, itt mindkét eset ezzel magyarázható.

Más úton is bebizonyítható, hogy a kérdéses gén valóban a Huntington-kórért felelős gén (*HD*), mégpedig a gén indukált mutációjával, és annak igazolásával, hogy a mutációnak idegrendszeri hatásai vannak. Természetesen ilyen kísérleteket emberen nem lehet végezni, de lehet például egéren, ha ismert a *HD*-nek megfelelő génje. Szerencsére a *HD* sok fajban, így az egérben is, ahol *Hdh* génnek nevezik, meglehetősen konzervatív. Michael Hayden kutatócsoportja 1995-ben a *Hdh* gén 5-ös exonjának inaktiválásával knock-out egereket állított elő. A mutációra homozigóta egerek embrionális korban elpusztulnak. A heterozigóták életképesek, de a neuronok számának csökkenése miatt intelligenciájuk alacsonyabb. Ez megerősíti azt az elképzelést, hogy a *Hdh* génnek és így a *HD* génnek is, fontos hatása van az agyra, mint ahogy az a Huntington-kór génjénél várható is.

Hogyan hasznosíthatók az eddigi ismeretek? Az egyik nyilvánvaló lépés, hogy alapos genetikai vizsgálatokkal kiszűrjék azo-

16.3. A genetikai szűrés árnyoldalai

Most, hogy a Huntington-kór, a cisztás fibrózis és más súlyos betegségek génjeit sikerült megtalálni, hogyan használhatjuk fel ezeket az információkat? Abban a helyzetben vagyunk, hogy azonosítani tudjuk a genetikai betegségek hordozóit, vagy azokat az embereket, akiknél a kialakulás kockázatával számolni kell. Ez jól hangzik, de felvet bizonyos etikai kérdéseket.

Vegyük például annak az örökbefogadási ügynökségnek az esetét, amelyik egy olyan kislányt akart elhelyezni, akinek az édesanyja Huntington-kóros volt. Érthető módon az örökbefogadó szülők szerették volna tudni, hogy a kislány örökölte-e az allélt. De Michael Conneally, az a genetikus, akivel konzultáltak ebben az ügyben, a következő indokkal utasította vissza a gyermek vizsgálatát: Ha az eredmény pozitív, és ezt később megmondják a gyerekek, akkor ő tudná, hogy biztosan megbetegszik. Sok ember, akinél fennáll ennek a szörnyű betegségnek a kockázata, úgy érzi, nem tudna együtt élni azzal a biztos tudattal, hogy hordozza a mutáns allélt, és ezért nem vállalja a vizsgálatot. Ebben az esetben a kislány túl fiatal volt ahhoz, hogy ő maga döntsön.

A döntés, hogy valaki meg akarja vagy éppen nem akarja megtudni, hordozza-e a HD gént, napjainkban még bonyolultabb lett. A génben lévő CAG ismétlődések számának megállapításával ugyanis előre megjósolható, várhatóan hány éves korban kezdődik a betegség. Korábban valaki, még akkor is, ha hordozta a gént, abba tudott kapaszkodni, hogy a tünetek csak idős korban jelentkeznek. Ma egy genetikai teszttel még ezt a reményét is elveszítheti.

Másfajta nehézség adódik a következő helyzetben: Egy asszony a Huntington-kór kockázatával néz szembe, mert apja beteg volt. Úgy érzi, nem tudná elviselni a betegség tudatát, ezért nem végezteti el a tesztet. De állapotos lesz, és férjével együtt úgy döntenek, csak akkor vállalják a gyermeket, ha nem hordozza a hibás allélt. Magzatvizsgálattal természetesen ellenőriztethetnék a születendő gyermek genotípusát. A negatív eredmény véget vethetne kétségeiknek a gyermekkel kapcsolatban, és reményt kelthetne az asszonyban saját jövőjét illetően. De egy pozitív eredmény megerősítené féltelmeit, nem csak a gyermekkel, hanem saját magával kapcsolatban is.

Az autoszómás recesszív cisztás fibrózis (CF) esetében más problémák merülnek fel. A cisztás fibrózis a leggyakoribb halálos kimenetelű genetikai betegség az amerikai gyermekek között. Húsz fehér bőrű ember közül egy CF gént hordozó, és ezért kétezer gyermek közül várhatóan több mint egy homozigóta a CF-re nézve, és így beteg. Most, hogy a CF gént azonosították, emberek milliói szeretnék magukat ellenőriztetni, hogy a családtervezéshez segítséget kapjanak. Azonban az Amerikai Humángenetikai Társaság 1989-ben a széles körű teszteléssel kapcsolatban moratóriumot hirdetett. De „fő az óvatosság” jelszóval szűk körben még folytatják szűréseket.

A kételyeknek két fő oka van. Először is, az a kezdeti elképzelés, hogy a cisztás fibrózist csak kisszámú különböző mutáció okozza, ma már nem tartható, hiszen az azonosított mutációk száma 1992-ben már elérte a 170-et. Ezek közül 20 fordul elő nagy gyakorisággal, ezért mindegyikre szűrni kellene, de még így is csak a hordozók 85-90%-át találnák meg. 90%-os sikerrel számolva, a veszélyeztetett házaspároknak csak a 81%-át ($0,9 \times 0,9 = 0,81$) azonosítanák. Ez ugyan több a semminél, de a várhatóan beteg gyermeket nemző házaspároknak csaknem 20%-a nem deríthető fel így, ami távolról sem kielégítő.

Ha a teszt megbízható lenne, még akkor is maradnának problémák. Mivel a CF gyakori betegség, várható, hogy a legtöbb leendő szülő elvégeztetné. Az USA-ban körülbelül 150 millió nemző korban lévő ember van! Még ha ennyi emberen el is tudnák végezni a vizsgálatokat, az eredményeket már nem tudnák szóban közölni az érintettekkel, hiszen egészen egyszerűen nincs annyi genetikai tanácsadó.

Az afroamerikaiak körében végzett sarlósejtes vérszegénységre való szűrés már elegendő tapasztalatot adott arra, mi történik, ha nem megfelelő a program. Az 1970-es évek elején sok államban bevezették a törvényt, amely előírta az afroamerikaiak szűrését a sarlósejtes vérszegénységre, de a program sikerességéhez nem biztosítottak megfelelő számú genetikai tanácsadót. Ennek számos kellemetlen következménye lett. Az egyik az volt, hogy sok hordozó arra a téves és pszichésen káros következtetésre jutott, hogy ő beteg. Az a javaslat pedig, hogy azoknak az afroamerikai házaspároknak, ahol a férj és a feleség is hordozó, ne legyen gyermeke – mivel ezt gyakran hallották fehérektől is – a rasszizmus vádját váltotta ki. Több esetben az orvosi titoktartást sem tartották be, ezért néhány hordozót a betegbiztosítóknál elutasítottak. Mindezek következtében éppen azok vesztették el bizalmukat a szűrési programban, akiket segíteni akartak. Ezért kevesen vettek részt benne, és még kevesebben használták fel a családtervezéshez kapott információt.

Ezek az esetek példázják, milyen kemények azok a döntések, amelyekkel az embereknek saját genetikai vizsgálatukkor szembe kell nézniük, és hogy milyen pszichológiai hatása lehet egy ilyen vizsgálatnak. Egészen más kérdés merül fel egyes kötelező vizsgálatokkal kapcsolatban. Etikus lenne-e például, ha a biztosító cégek megkövetelnék a genetikai tesztet? Akiknek a tesztje például pozitív a Huntington-kórra vagy az Alzheimer-kórra, azoktól megtagadnák-e az egészségbiztosítást, vagy magasabb díjat kellene fizetniük? Láttuk, ilyen eset a sarlósejtes vérszegénység allélját hordozókkal már megtörtént. Ha az igazságtalanság, hogy embereket génjeik miatt, amelyek felett semmiféle ellenőrzési lehetőségük nincs, megkülönböztetnek, akkor helyes lenne-e tesztet követelni tőlük az életbiztosítás megkötése előtt? Ne feledjük, hogy a biztosító-társaságok a szerződés megkötése előtt megkövetelik a megfelelő egészségi állapotról szóló igazolást! A genetikai szűrést egyszerűen ennek a gyakorlatnak a kiterjesztéseként tekinthetnek.

Vigyük egy lépéssel tovább a problémát, és tételezzük fel, hogy egy életbiztosítással foglalkozó társaság fizetett egy személy genetikai szűréséért, és úgy találták, hogy az illető valószínűleg Alzheimer-kóros lesz. Etikus lenne-e, ha a biztosító-társaság ezt az információt megosztaná másokkal, például az érintett munkaadójával vagy jövőendő munkáltatójával? Az információ bizonyosan jelzést adna az illető hosszú távú alkalmazhatóságáról, de ugyanilyen bizonyossággal óriási terhet rakna az adott emberre. A probléma még bonyolultabb, ha az alkalmazó maga a biztosító, ahogyan az nagy cégeknél előfordul.

Nem könnyű ezeket a kényes kérdéseket megválaszolni, de a genetikai betegségek vizsgálatára kifejlesztett tesztek arra kényszerítenek bennünket, hogy foglalkozzunk velük. Ha emelkedik a kezelések hatékonysága, akkor ezeknek a kérdéseknek a jelentősége is csökkenhet.

kat az embereket, akiknél várható a betegség kialakulása. A CAG ismétlődések számából még a tünetek jelentkezésének időpontja is megjósolható. Egy ilyen információ azonban lelkiileg tönkre is tehet valakit (16.3. melléklet). Amire tehát valóban szükség van, az a betegség gyógyítása, csakhogy ez még távolinak tűnik.

A gyógymód kidolgozásához azonban még legalább két kérdésre választ kell adni. Először is, mi a *HD* gén termékének, a *huntingtinnek* a funkciója? A kérdés megválaszolásához a genetikusok olyan transzgenikus egereket hoznak létre, amelyek a *HD* gén mutáns formáját hordozzák. Ily módon kiderülhet, milyen szerepe van a génnek az agyban és más szövetekben, amelyekben szintén aktív. Másodsor, ki kell deríteni, miért okoz betegséget a CAG ismétlődések számának növekedése. Gusella feltételezi, hogy a fehérjében lévő számfölötti glutaminok új funkciót adnak a fehérjének, ami valamilyen módon károsítja az agy aktivitását. Ma már tudjuk, hogy a huntingtin egy másik fehérjéhez, az ún. huntingtin-asszociált fehérjéhez (HAP) kapcsolódik, így elképzelhető, hogy az abnormális huntingtin rendellenesen kapcsolódik a HAP-hoz, ami károsítja az idegi funkciót.

Az RFLP-k felhasználásával a Huntington-kórt okozó gént (*HD*) a kutatók a 4. kromoszóma végéhez közel lokalizálták, majd a gént exoncsapdázással azonosították. A betegséget egy olyan mutáció okozza, amely a génben levő CAG ismétlődések számát a normális 11–34-ről legalább 38-ra növeli.

A CISZTÁS FIBRÓZIS GÉNJÉNEK AZONOSÍTÁSA

A cisztás fibrózis (CF) az amerikai fehér bőrű népesség leggyakoribb halálos kimenetelű öröklődő betegsége. Egy autoszómás recesszív mutáció okozza, amelyet átlagosan minden huszadik amerikai fehér bőrű ember hordoz (az USA-ban több mint 12 millió). Ez azt jelenti, hogy 400 fehér bőrű házaspár közül átlagosan egynek mindkét tagja hordozó, és gyermekük 25%-os valószínűséggel lehet beteg. Az USA-ban évente több mint ezer gyermek születik cisztás fibrózissal.

A betegség tünetei a szekréciós hámszöveteken jelentkeznek, amelyek a véráram és a külvilág között a só- és a víztranszportért felelősek (például a tüdőben, a belekben és a verejtékmirigyekben). A beteg személyekben ez a transzport zavart szenved, emiatt az érintett szervekben sűrű, nyálkás váladék keletkezik. Ez okozza a betegség klinikai tüneteit: a hasnyálmirigy nem képes az emésztőenzimeket leadni a bélbe; a tüdőben keletkező váladékban könnyen megtelepednek a baktériumok, ami fertőzésekhez vezet; a verejték sótartalma nagyon magas. Az utóbbi tünet nem veszélyes, de nagyon jó támpontot ad az orvosoknak a betegség felismeréséhez. A tüdőfertőzések azonban nagyon veszélyesek. Ez az elsődleges ok, ami miatt a cisztás fibrózisban szenvedők nem érik meg a húszéves életkort.

Mivel a betegség gyakori és súlyos kimenetelű, ezért igen intenzíven folynak a kutatások. A genetikusok tudják, hogy ha sikerül a defektes gént és termékét azonosítani, akkor az áttörést jelenthet a gyógyításban. De legalább lehetőség lenne a mutáció

tesztelésére, és így a házaspárok előre tudhatnák, mekkora eséllyel születhet beteg gyermekük. A tesztet a prenatális (születés előtti) diagnosztikában is alkalmazhatnák, annak eldöntésére, hogy a magzat homozigóta-e a mutációra.

Akárcsak a *HD* esetében, a kutatók úgy próbálták megtalálni a gént, hogy nem ismerték annak fehérjetermékét. Azt tudták, hogy a sótranszport szenvedett zavart, de a mutáns fehérjéről nem tudtak semmit. Az ilyen munka hasonlít ahhoz, mint amikor egy tűt próbálnak megkeresni a szénakazalban. Ennek ellenére a kutatók Lap-Chee Tsui, Francis Collins és John Riordan vezetésével hatékonyan egyesítették a klasszikus és a molekuláris módszereit, és 1989-ben lokalizálták a cisztás fibrózis génjét (*CF*).

A gén keresésekor az első lépés az volt, hogy megállapítsák a kapcsoltságot egy ismert kromoszómális lokalizációjú markerrel. Az első ilyen marker, amelyről kiderült, hogy a *CF* génnel kapcsolts, a paraoxonáz enzim szérum aktivitásának variabilitásával áll összefüggésben. Sajnos ezt a markert addig még nem térképezték, és azt sem tudták, melyik kromoszómán található. Az RFLP térképezési technikák alkalmazásával – hasonlóan a Huntington-kór génjének kereséséhez – azonban kapcsoltságot találtak a *CF* gén és egy ígéretesebb marker, a DOCRI-917 RFLP között.

A következő lépésben kimutatták, hogy ez az RFLP marker a 7. kromoszómán található. A térképezés során Tsui és munkatársai az 5. fejezetben leírt szomatikus sejthibridizációs technikát alkalmazták. Olyan hörcsög-ember hibrid sejttenyészeteket kaptak egy másik laboratóriumtól, amelyről tudták, hány emberi kromoszómát tartalmaznak. Majd tesztelték a sejtek DNS-ét, hogy hibridizál-e a radioaktív DOCRI-917 próbával. Amikor a sejt tartalmazta a 7. emberi kromoszómát, a DNS hibridizált a próbával. Amikor pedig a sejt a 7. emberi kromoszóma egyik részét sem tartalmazta, akkor DNS-e nem hibridizált a próbával. Így az RFLP a 7. kromoszómán van, és mivel a *CF* gén kapcsolts az RFLP-vel, ezért tudjuk, hogy a *CF* gén is a 7. kromoszómán van.

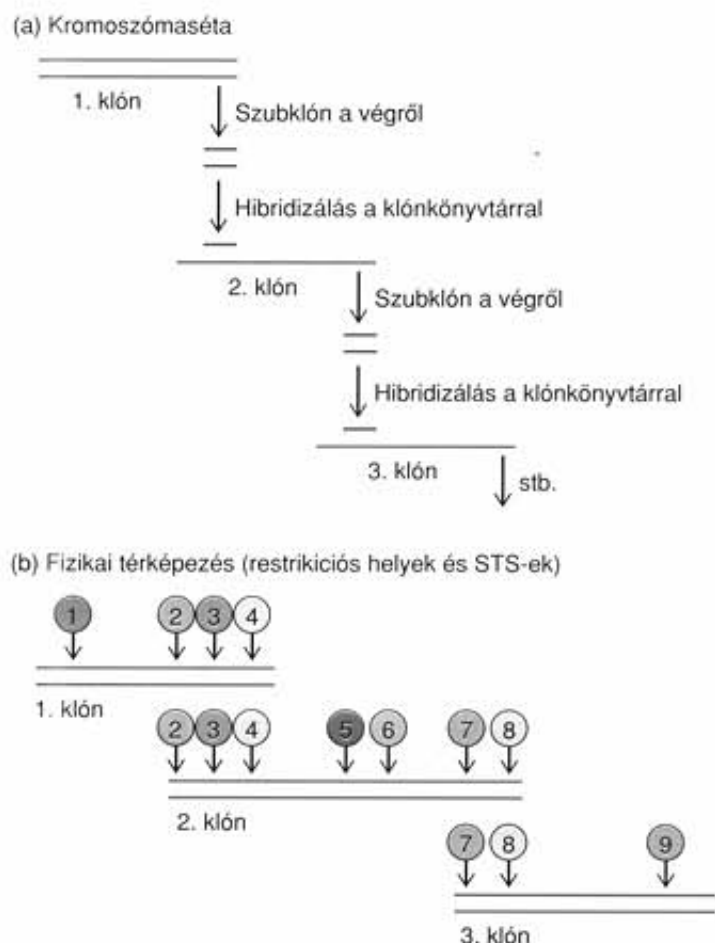
Ebben az időben fedezett fel szoros kapcsoltságot Ray White csoportja a *CF* gén és egy, a *met* génben található RFLP között. Ez értékes adat volt, mert a *met* gént a 7. kromoszóma hosszú karjának középső harmadában térképezték. Ez a *CF* gént is ugyanebbe a szomszédságba helyezte.

Ezt a következtetést Robert Williamson és Jorg Schmidtke is megerősítették, a *CF* gén és két RFLP közötti kapcsoltságot kimutatásával. Az egyik egy anonim, pJ3.11-nek nevezett RFLP volt, a másik pedig a *TCR* génben található RFLP. Schmidtke és munkatársai a pJ3.11 markert szomatikus sejthibridizációval a 7. kromoszóma hosszú karjának a tetejére, a q22-es sávba, míg más kutatók a másik RFLP markert a 7. kromoszóma hosszú karjának az aljára, a q3-as sávba térképezték.

Számos különböző markerrel való kapcsoltságot elemzésével a *CF* gént a 7. kromoszóma q31 sávjába térképezték, két szorosan kapcsolts marker, a *met* és a D7S8 (pJ3.11 RFLP) közé. A *met* és a *CF* gének közötti rekombinációs gyakoriság férfiakban 0,013 volt, míg a *CF* és a D7S8 között csak 0,009. Ennek alapján a *met* gén és a D7S8 RFLP marker csak 1-2 millió bázispár

távolságra lehet egymástól, ami a keresést az emberi genom viszonylag szűk régiójára korlátozta. De mivel még milliányi bázispár esetén is sok DNS-t kell egyetlen gén után kutatva aprólékosan átnézni, ezért hatékony módszerekre volt szükség.

Ahhoz, hogy egy megabázispárnyi DNS régióban megtaláljanak egy gént, elsőként klónozni kell legalább egy darabját a kérdéses DNS-nek. Ez nem könnyű feladat, de az olyan technikák, mint amilyen a YAC-ban való klónozás, egyszerűbbé teszik. Ebben az esetben a kutatók egy másik módszert, a „**kromoszómasétát**” (chromosome walking) alkalmazták. Egymással átfedő DNS-ekből olyan klóngyűjteményt hoztak létre, amely lefedte a kérdéses régió egészét (16.18. ábra). Ahhoz, hogy a bemutatott példában balról jobbra végighaladjanak („sétáljanak”) egy kromoszómán, egy genomkönyvtárból és egy klónból indulnak ki, ami a vizsgálandó szekvencia bal szélén található. A kezdő klón jobb oldali végétől lehasítanak egy darabot, és megjelölik. Ezt a



16.18. ábra. Kromoszómasétával történő térképezés. (a) A séta elkezdéséhez kiválasztanak egy klónozott DNS-darabot (1. klón), és az egyik végét szubklónozzák. Ezt a kis darabot (piros) próbaként használják egy átfedő klón (2. klón) könyvtárból történő kikereséséhez. A folyamatot ismételve a 2. klón túlsó végét szubklónozzák, és próbát készítenek a következő átfedő klón (3. klón) kikereséséhez. Az eljárást sokszor megismételve nagy kiterjedésű DNS-szakaszokat átfedő klónkészletet alakítanak ki. (b) Restriktációs helyek vagy STS-ek fizikai térképezése az egyes klónokban lehetővé teszi az átfedő DNS-szakaszok sorrendbe állítását, és a teljes contig térképének elkészítését

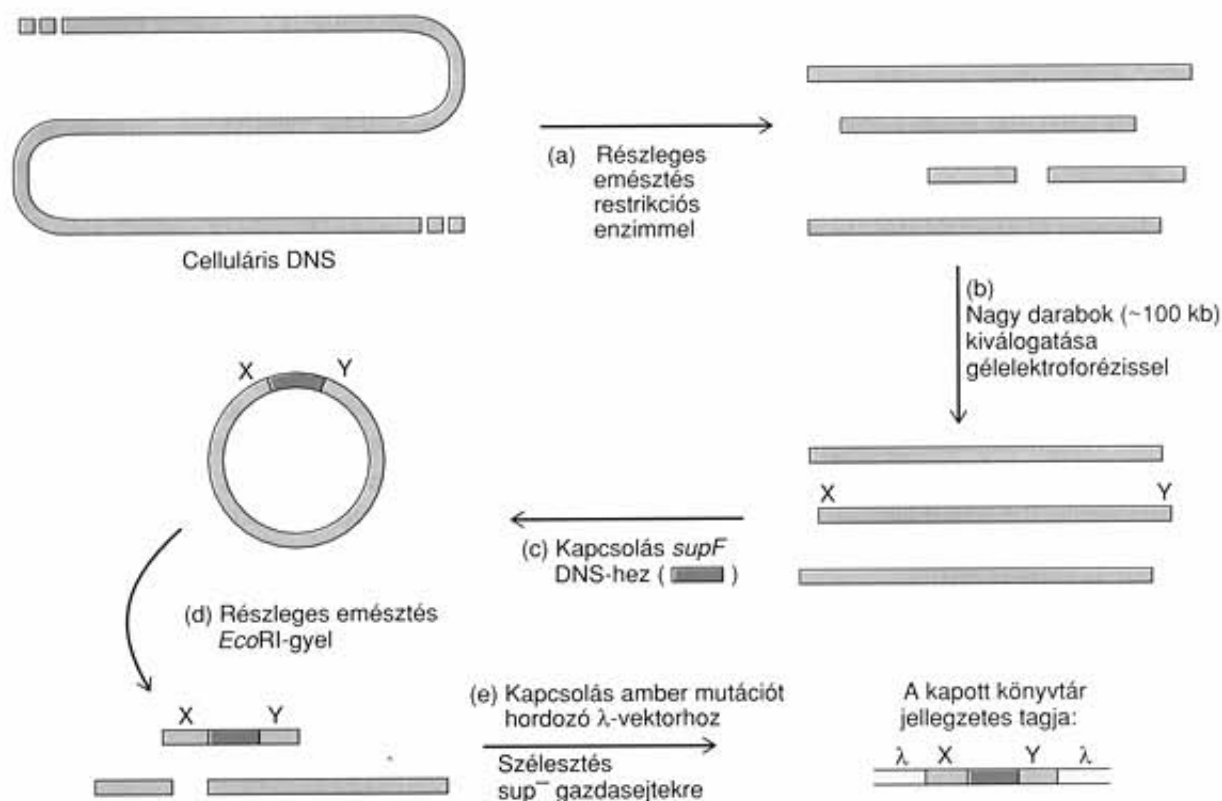
radioaktív fragmentumot próbaként használják a genomkönyvtár plakkhibridizációjához. Mindegyik hibridizáló klón átfedi a kezdő klón jobb szélét, és nagyon valószínű, hogy további DNS-szakaszt tartalmaz jobbra. Ezután megismétlik az eljárást a második klón DNS-ének jobb szélén lévő kis darabbal, és azzal további átfedő klónokat keresnek jobbra. Ezt mindaddig folytatják, amíg egy, az egész régiót képviselő, átfedő klónokból álló contigot nem kapnak. Végül a klónok szekvenálásával meghatározzák az egész régió bázissorrendjét.

A kromoszómaséta viszonylag rövid kromoszómaszakaszok esetében, úgy 100 kb nagyságig jól működik, de gondot okoz, ha sok száz kb DNS-t akarnak elemezni, mint ebben a példában is. A legnagyobb problémát az jelenti, hogy vannak bizonyos DNS-regiók, amelyeket néha „mérgező régióknak” neveznek, amelyeket nem lehet klónozni. Megint más régiók ugyan klónozhatók, de nem stabilak, és így elvesznek. Ezeknek a jelenségeknek az okai nem teljesen tisztázottak, de annyi ismert, hogy a szokatlan másodlagos szerkezetű DNS-ek vagy ismétlődő szekvenciák gyakran elvesznek a baktériumsejtekből.

A problémák feloldására Collins dolgozott ki egy ügyes módszert a kromoszómaséta módosításával, az ún. **kromoszómaugrást** (chromosome jumping – 16.19. ábra). Az eljárás lehetővé teszi a klónozzhatatlan régiók átugrását és a séta újratekésztését. A folyamat kulcsfontja egy olyan klónkönyvtár elkészítése, amely mintegy 100 kb méretű DNS darabokból áll. A klónozott DNS-eket ezután gyűrűvé zárják, de úgy, hogy egy szelektálható markert (pl. az amber mutációkat elnyomó *supF* gént) tartalmazó rövid DNS-darabot is kapcsolnak hozzá. Ezzel egymás közelébe helyezik a klón egymástól körülbelül 100 kb távolságra lévő két végét. A következő lépésben a kör alakú DNS-t egy restriktációs enzimmel hasítják, és a fragmentumokat egy amber mutációt hordozó λ fágba szubklónozzák. Ez biztosítja, hogy csak a *supF* gént hordozó klónok maradnak fenn, és a *supF* a gyűrűvé záródás helyét is megjelöli. Ezután plakkhibridizációval kiválasztanak egy klónt próbának egy adott helyre való kereséshez (pl. *met* lokusz). Mivel ebben a klónozott DNS-ben megtalálható a *met* lokusz, és a gyűrű kialakulásának helyét a *supF* génnel megjelölték, elég nagy arra az esély, hogy a *supF* gén másik oldalán lévő DNS a *met* géntől körülbelül 100 kb távolságra van. Ez a kromoszómaséta új kezdőpontjaként használható. Ezzel 100 kb távolságot ugrottak a kromoszómán.

Végül Riordan, Tsui, Collins és munkatársai egy megközelítően 500 kb hosszú DNS-darabból, majdnem 300 kb-nyit klónoztak. Gyanították, hogy a *CF* gén ezen a szakaszon található, de hol?

Az ilyen rejtélyek megoldásának az a nyitja, hogy keresni kell egy olyan DNS-szakaszt, amely több különböző fajban megőrződött. Ha a DNS konzerválódott, akkor valószínűleg valamit kódol is, tehát egy gén. A konzerválódott DNS-szakasz gyors megtalálása érdekében a kutatócsoport emberből, szarvasmarhából, egérből és csirkéből származó fragmentált genomikus DNS-t blotolt, és a blotot olyan radioaktív próbával hibridizálták, amely klónozott emberi DNS különböző részeiből készült. Négy radioaktív próba az emberén kívül más fajok DNS-ével is kereszthibridizációt mutatott, és ezzel négy régió jött számításba, amelyre a kutatásokat összpontosították.



16.19. ábra. Kromoszómaugrás. (a) Nagy molekulatömegű, celluláris DNS-ből indulnak ki, amit egy restriktációs enzimmal részlegesen emésztünk, így nagy fragmentumokat kapunk. (b) A fragmentumok közül gélelektroforézissel kiválasztjuk a 100 kb körüli darabokat. Az egyik ilyen fragmentum végét, hogy sorsát követni tudjuk, X-szel, illetve Y-nal jelöltük. (c) A hosszú fragmentumokat klónozott *supF* génhez (piros) kapcsoljuk, ami az amber mutációkat elnyomja. A *supF* gén a hosszú DNS-fragmentumok szabad végei (X és Y) közé épül be. (d) Az ily módon gyűrűvé zárt DNS-t *EcoRI*-gyel részlegesen emésztjük. A keletkező fragmentumok közül néhány tartalmazza az X-szel és Y-nal határolt *supF* gént. (e) Az *EcoRI* fragmentumokat letális amber mutációt hordozó vektorba ligáljuk. Becsomagoljuk a DNS-t, és a kapott fágészecskéket *supF* gént tartalmazó gazdasejtekre szélesztjük. Csak a *supF* gént hordozó fágészecskék szaporodnak, és ezek alkotják majd a könyvtárat a kromoszómaugrásához. Minden klónozott DNS X és Y régiókkal határolt *supF* gént tartalmaz, amelyek a sejt DNS-ében eredetileg mintegy 100 kb távolságra voltak egymástól. A (b) lépésben kiválasztott fragmentumméret módosításával változtatható az ugrálási távolság nagysága a könyvtárban. Figyelembe véve, hogy X egy ismert régió, amely egy előző kromoszómasétában szerepelt, akkor a 100 kb távolsággal arrébb lévő Y egy új séta kezdőpontja lehet a kromoszómán

Az első ilyen régiót a *met* génhez nagyon közel, a D7S8-től viszont távol térképezték, ezért a *CF* gén nem lehetett benne. A másodikban egyetlen nyitott leolvasási keretet sem találtak, ezért ez sem jöhetett szóba. A harmadik régiót próbaként használták ugyanolyan szekvenciájú mRNS-ek kereséséhez, de egyet sem találtak. Ebből arra következtettek, hogy ez a régió nem íródik át, tehát nem lehet benne a *CF* gén.

Szerencsére a negyedik régióban ráakadtak a *CF* génre. A szakasz szekvenálásakor egy nagyon kedvező jelet találtak, nevezetesen egy CG-szigetet. Kimerítő munka volt a sok cDNS-könyvtár végigkeresése a régió próbájával, de végül találtak egy egészséges ember (nem *CF*) verejtékmirigyéből származó 920 bp hosszú cDNS-klónt (10-1), amely egy mRNS kódoló része. Ez azt jelentette, hogy a CG-ben gazdag régió a normális verejtékmirigyben úgy íródott át, mintha *CF* (cisztás fibrózis) lenne. A 10-1 klón emberi RNS-ek Northern-blotján egy 6,5 kb méretű transzkriptumot is kimutattak, ami ismételten igazolta ennek a régióknak az expresszióját az emberi sejtekben. Végül cDNS-klónokat hibridizáltak genomikus klónokkal, és kimutatták, hogy a *CF* gén megközelítőleg 250 kb hosszú, és legalább 24 exon található benne.

Honnan tudható, hogy valóban ez a *CF* gén? Ezt a következtetést több bizonyíték is alátámasztja. Először is, a Northern-blot kísérletek kimutatták, hogy a gén minden *CF* által érintett szövetben átíródik. Másodszor, a gén bázisszekvenciája alapján olyan fehérjét kódol, amelynek egy transzmembrán doménje van. Így nagyon valószínű, hogy ez – mint ahogy az a *CF* fehérje esetében előre látható volt – egy membránfehérje, hiszen a membrántranszportban szerepel. A további szekvencia vizsgálatok elsősorban azt mutatták, hogy a *CF* gén terméke nem maga a klorid-csatorna, de valamilyen módon szabályozza az ionnak a transzportját. Ennek alapján a *CF* gén termékét átnevezték **CFTR**-re (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Ma már tudjuk, hogy a CFTR valójában klorid-csatorna, mivel ilyen csatornát hoz létre akkor is, ha egyetlen fehérjeként adják hozzá egy mesterséges membránhoz.

Harmadszor, a gén kapcsolatát a betegséggel (*CF*) az is bizonyítja, hogy a legtöbb betegnél a génben egy 3 bp-nyi deléciót mutattak ki. Ez egy olyan mutáns fehérjét eredményez, amelyből hiányzik egy fenilalanin. Tsui és munkatársai ezt a mutációt az elsőként tesztelt *CF*-betegek kb. 70%-ánál meg is találták. A többiek esetében valószínűleg másutt voltak mutációk a *CF* génben.

Végül döntő bizonyíték volt, amikor két kutatócsoport, köztük Tsui, Michael Wells és Collins igazolták, hogy a transzplantált vad típusú *CF* gén expressziója helyreállítja a *CF*-sejtek hibás klorid-transzportját. Tehát a *CFTR* fehérjét biztosan a *CF* gén kódolja, ezért ma általában *CFTR* génnek nevezik.

Most, hogy már ismert a *CFTR* gén helye és az általa kódolt fehérje funkciója, miként használhatók ezek az ismeretek a betegség gyógyítására? Kifejleszhetünk például egy állapotmodellt, amelyen alaposan vizsgálhatjuk, hogy a betegség előrehaladása, milyen hatással van a tüdőre és más szövetekre. A nagyon fiatalon elhunyt *CF*-betegektől nyerhető tüdőszövetek mennyisége ugyanis túl kevés az ilyen vizsgálatokhoz. A hosszabb életkort megélt betegek többségénél viszont a halál időpontjában már olyan súlyos elváltozások vannak a tüdőben, hogy nem lehet következtetni belőle a betegség korai stádiumára. Ezért két kutatócsoport is *CFTR* knock-out egereket állított elő, amivel elméletileg már nyomon lehet követni, mi történik a beteg szövetekben a születéstől a halálig. Sőt az emberekben történő alkalmazás előtt az egereken kipróbálhatók terápiás eljárások is. Bonyolítja viszont a helyzetet, hogy a *CFTR* knock-out egerek nem pontosan ugyanazt a fenotípust mutatják, mint a humán *CF*-betegek. Ezért a kísérletek kiértékelésekor óvatosságnak kell lenni.

A másik lehetőség, hogy a *CFTR* gén tanulmányozása segíthet a terápiás eljárások kidolgozásában. A genetikai felfedezések sok újszerű gyógymód alkalmazására adnak ötletet és lehetőséget. A legkézenfekvőbb elképzelés a vad típusú gén bejuttatása lenne a *CF*-betegekbe. A *CFTR* gén célzott bevitelére vírusok vagy liposzómák használhatók, de például a tüdőbe aeroszol belélegeztetésével is eljuttatható lehet. Továbbá az is elképzelhető, hogy új gén bevitele helyett, *CFTR* fehérje rendszeres belélegeztetésével enyhítik a tünetek. Ez esetben fennáll a veszélye annak, hogy a betegek allergiás tüneteket mutatnak a fehérjére. De ennek minimális az esélye, hiszen a vad típusú fehérje csak egy aminosavban tér el a mutánstól, és ez olyan kicsi különbség, hogy az immunrendszer vélhetően nem idegenként azonosítja. Egy másik stratégia lehet a mutáns fehérje aktivitásának valamilyen gyógyszerrel történő stimulálása. A *CF*-specialistáknak már van néhány ötletük is, mely gyógyszerek jöhetnek számításba.

Az RFLP-térképezés és a szomatikus citogenetikai módszerek kombinálásával a genetikusok a *CF* gént a 7-es kromoszóma q31-es sávjának 1-2 Mb méretű szakaszán találták meg. Ezután a gén pontos helyét úgy határozták meg, hogy a gént feltételezhetően tartalmazó DNS-régióból klónkönyvtárat hoztak létre. A könyvtár szomszédos klónjait a kromoszómaséta és -ugrás módszereivel azonosították. DNS-DNS hibridizálással négy olyan lehetséges génhelyet azonosítottak, amelyek az emlősfajokban konzervatívak, egyikükben CG-sziget jelenlétét mutatták ki. Ez a következők alapján valóban a *CF* génnek bizonyult: (1) működött azokban a szövetekben, például a verejtékmirigyekben, amelyekben a *CF* gén is; (2) szekvenciája alapján membránfehérjét kódol; (3) a *CF*-ben szenvedő betegek erre a génre vonatkozóan mutációkat hordoznak; (4) a vad típusú gén bevitelével a *CF*-sejtek klorid-transzportja helyreállítható.

A DUCHENNE-FÉLE IZOMDISZTRÓFIA

A kutatók a súlyos izomsorvadással járó Duchenne-féle izomdisztrófiáért (DMD) felelős gént is megtalálták az X-kromoszómán. A gén azonosítására többféle módszerrel próbálkoztak, köztük hagyományos térképezéssel is, de a rejtély a ritkán előforduló leánybetegek eseteinek tanulmányozásával oldódott meg. Ronald Worton munkatársai tizenkét ilyen beteg X-kromoszómáit vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy mindegyikük X-kromoszómája körülbelül azonos helyen, a rövid kar közepéhez közel, az Xp21 sávnál tört el. Ez minden esetben feltehetően a DMD génben lépett fel, inaktíválta azt, és ezért alakult ki a betegség.

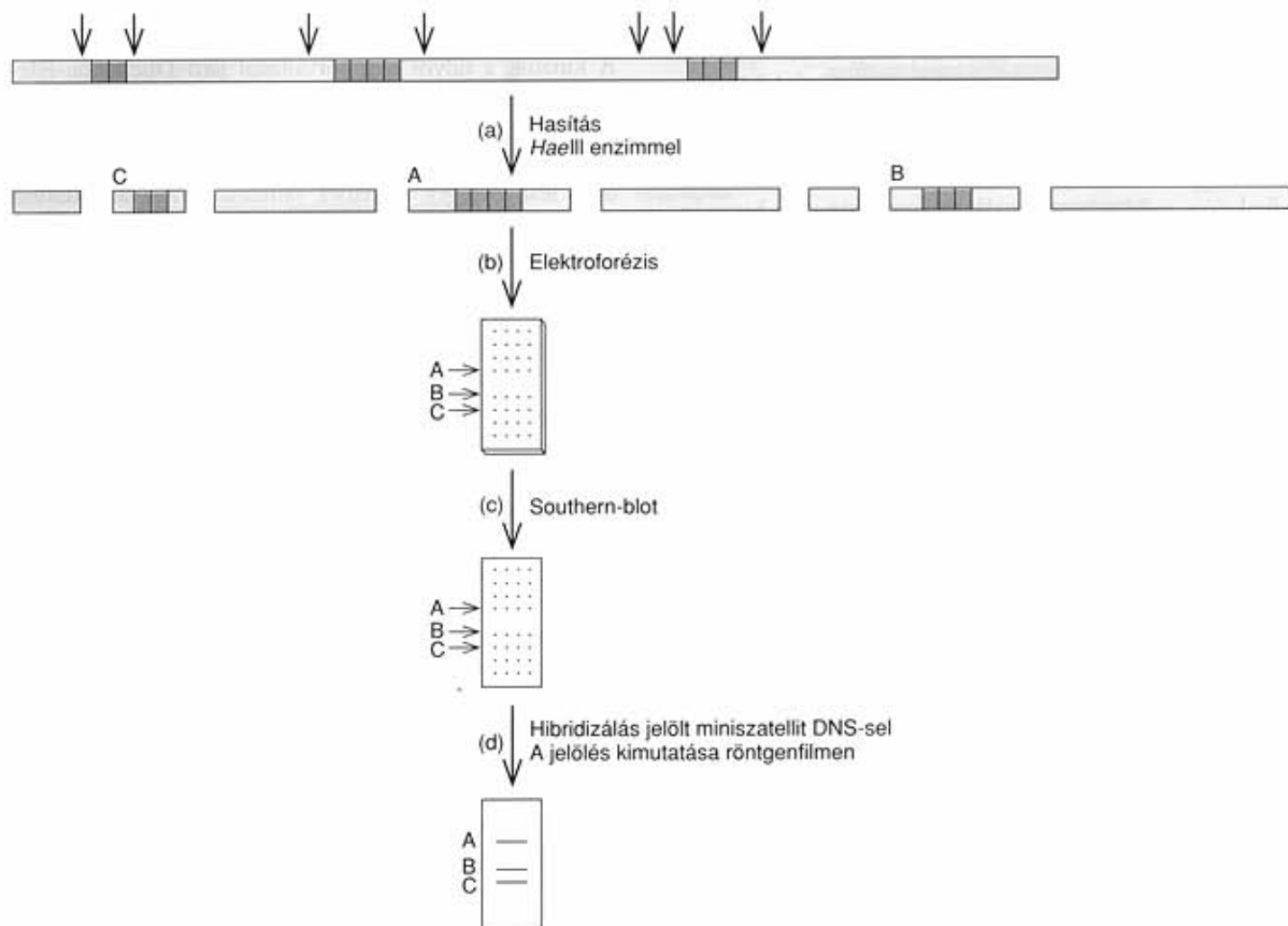
L. M. Kunkel munkatársaival a DMD gént az említett régióba térképezték, és nagyon nagyra találták. A gén 61 exont tartalmaz, terjedelme 2 Mb DNS. Vannak benne 100 kb-nál hosszabb intronok is. A génről készült érett mRNS több mint 14 kb, és egy körülbelül 400 000 molekulatömegű óriási polipeptidet kódol. Ez a fehérje a **dystrophin**, amely az átlagos polipeptideknél kb. tízszer nagyobb. Maga a gén az egyik legnagyobb, amit eddig emberben vagy bármely más szervezetben találtak. Olyan nagy, hogy átírása 24 órán át is eltarthat.

A dystrophin helyét az ember izomsejtjeiben az egér DMD génjének terméke ellen termelt antitest segítségével határozták meg. Ezek az antitestek a normális izomsejtek egyik fehérjéjével reagálnak, de nem kapcsolódnak a DMD-betegek izomsejtjeiben lévő fehérjékkel. Az antitesttel kapcsolódó fehérje a relatív molekulatömege 400 000 körül van. A DMD gén tanulmányozásával a genetikusok feladatuk lényeges részét tehát elvégezték. A következő lépés a sejtszociológusokra vár, hogy megállapítsák, milyen szerepet játszik a dystrophin a normális izomsejtben. Ez azután kulcsot jelenthet a betegség leküzdéséhez. Egy napon talán a génterápia is lehetséges lesz, és működőképes dystrophin gént juttatnak a betegek szervezetébe.

A kutatók azonosították a Duchenne-féle izomdisztrófiáért felelős gént, amely 2 Mb-nyi méretével az egyik legnagyobb eddig felfedezett gén.

DNS-UJJLENYOMAT ÉS DNS-TIPIZÁLÁS

1985-ben Alec Jeffreys munkatársaival az ember α -globin génjének egy darabját vizsgálta, amikor észrevette, hogy a fragmentum egy többször ismétlődő bázisszekvenciát tartalmaz. A fejezet előző részében már láttuk, hogy az ilyen ismétlődő szekvenciák a miniszatellitek. De még érdekesebb, hogy hasonló ismétlődő szekvenciákat az emberi genom más pontjain is találtak, és ezek is többször ismétlődtek. Kiderült, hogy ennek az egyszerű megfigyelésnek a következményei messzire vezetnek, mert az egyének között az alapszekvencia ismétlődései különböző mintázatúak. Az eltérés elegendő ahhoz, hogy csak kis esélye van annak,



16.20. ábra. DNS-ujjlenyomat. (a) A DNS-t először restrikciós enzimmel hasítják. Ebben a példában a *HaeIII* hét ponton (nyilakkal jelölve) hasítja a DNS-t, és így nyolc fragmentum keletkezik. Közülük csak három (méretük csökkenő sorrendjében A, B és C) tartalmazza a miniszatelliteket (kék). A többi fragmentumban (sárga) nem rokon szekvenciák vannak. (b) A keletkezett fragmentumokat méretük alapján elektroforézissel elválasztják. Az elektroforézis után a gélben mind a nyolc fragmentum megtalálható, de egyik sem látható. A fragmentumok helyzetét, beleértve a három miniszatellit tartalmazókat is (A, B és C) pontosított vonal jelöli. (c) A DNS-fragmentumokat denaturálják, majd Southern-blotot készítenek. (d) A Southern-bloton a DNS-fragmentumokat a miniszatellit több kópiáját tartalmazó jelölt DNS-sel hibridizálják. A próba csak a három miniszatellit tartalmazó fragmentumhoz kötődik, a többihez nem. Végül a jelölt sávot röntgenfilmen azonosítják

hogyan két személynek pontosan ugyanaz a mintázata legyen. Vagyis ezek a mintázatok olyan egyéniek, mint az ujjlenyomatok, ezért DNS-ujjlenyomatnak (fingerprint) nevezik őket.

Hogyan készítik a DNS-ujjlenyomatot? A vizsgálandó DNS-t először restrikciós enzimmel, például *HaeIII*-mal hasítják. Jeffreys azért választotta ezt az enzimet, mert az általa talált ismétlődő szekvencia *HaeIII* felismerőhelyet nem tartalmazott. Tehát a *HaeIII* enzim a miniszatellit régiók mindkét oldalán hasít, de az ismétlődő szakaszon belül nem (16.20.(a) ábra). A bemutatott példában a DNS-ben három ismétlődő szakasz van, és azok négy, három, illetve két ismétlődésből állnak. A hasítás után ezért három olyan, eltérő méretű fragmentum keletkezik, amelyek ezeket az ismétlődéseket tartalmazzák.

Ezután a kapott fragmentumokat elektroforézissel elválasztják egymástól. A gélen az összes fragmentum mérete szerint elkülönül, a sávok közül három a miniszatelliteket tartalmazza. Ezután a DNS-fragmentumok két szálát elválasztják egymástól, és az egyfonalas DNS-t a leírtak szerint blotolják. Emberi DNS

vizsgálata esetén fragmentumok millióit kapják, de közülük egy sem látható a bloton, csak egy nagy DNS-folt jelenik meg.

A miniszatelliteket tartalmazó sávok úgy találhatók meg a többi, számunkra érdektelen sáv között, hogy a blotot radioaktív izotóppal jelölt, egyfonalas miniszatellit szekvenciával hibridizáltatják. Ez a jelölt DNS-próba minden olyan egyfonalas fragmentumot megjelöl a bloton, amely a komplementer miniszatellit szekvenciát tartalmazza. Végül a jelölt sávokat röntgenfilmen láthatóvá teszik. Ebben az esetben három jelölt sáv van, tehát három sötét csíkot látunk a filmen (16.20.(d) ábra).

Természetesen az állatoknak és az embernek sokkal bonyolultabb genomjuk van, mint a példában szereplő egyszerű DNS-darab. Esetükben háromnál sokkal több fragmentum reagál a próbával. A 16.21. ábrán kilenc rokonságban nem álló személy, illetve két egypetéjű iker DNS-ujjlenyomata látható. A mintázat bonyolultsága miatt gyakorlatilag valószínűtlen, hogy két személy esetén ugyanazok a sávok alakuljanak ki, hacsak nem egypetéjű ikrek. A DNS-ujjlenyomat összetettségének köszönhetően nagyon hatékony azonosítási módszer.

A DNS-UJLENYOMATOK ÉS A DNS-TÍPIZÁLÁS KRIMINALISZTIKAI ALKALMAZÁSA

A DNS-ujjlenyomat értékes sajátossága az a tény, hogy majdnem minden egyének külön, egyedi mintázata van, és hogy a mintázat elemei, a sávok csoportjai mendeli öröklődést mutatnak. Ezért a DNS-ujjlenyomat vizsgálata a szülők azonosítására is felhasználható. A módszer hatékonyságát jól szemlélteti egy angliai bevándorlási eset. Egy Angliában született ghánai kislánynak Ghánába kellett utaznia, hogy apjával éljen. Amikor vissza akart települni Angliába az édesanyjához, a brit hatóságok kétségbe vonták, hogy valóban a fia-e az asszonynak, nem pedig az unokaöccse. A vércsoportvizsgálat alapján erre nem lehetett egyértelmű választ adni. A DNS-ujjlenyomat azonban bebizonyította, hogy valóban az asszony fia.

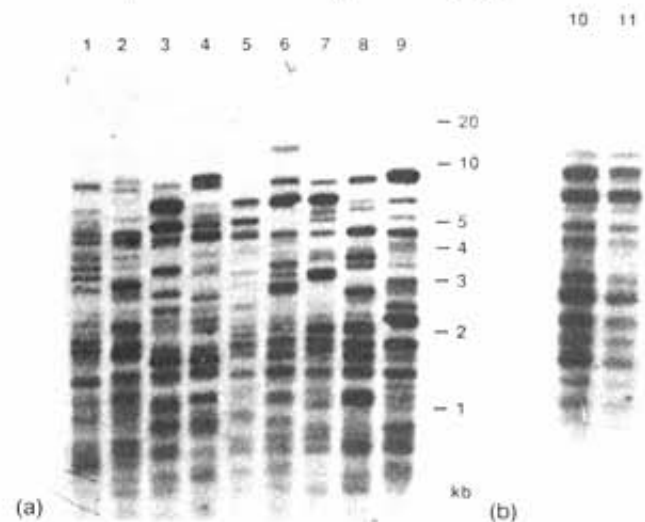
A DNS-ujjlenyomat nagyon hatékony eszköz más gerincesfajok rokonsági viszonyainak tanulmányozásához is. Alec Jeffreys emberből származó próbái meglepően jól működnek sok más gerincesfaj esetében, és más ismétlődő szekvenciákat tartalmazó próbákat is készítettek.

A szülők azonosításán kívül a DNS-ujjlenyomat módszer a bűnügyek felderítésében is igen jól alkalmazható. Ennek oka, hogy egy személy DNS-ujjlenyomata éppúgy egyedi, mint egy hagyományos ujjlenyomat. Amennyiben a bűnelkövető néhány sejtje (pl. vér, ondó vagy hajszál) valamilyen módon a helyszínen marad, akkor a sejtekből izolált DNS alapján az elkövető azonosítható. De ahogy az a 16.21. ábrán is látható, a DNS-ujjlenyomatok nagyon bonyolultak. Sávok tucatjait tartalmazhatja, amely közül néhány foltokat alkot, ezért nehezen értékelhető.

Ennek a problémának a megoldására a kutatók olyan próbákat fejlesztettek ki, amelyek egyszerű polimorf lokuszokkal hibridizálnak, nem pedig egy egész sorozattal, mint egy klasszikus DNS-ujjlenyomat esetében. Ezek a próbák sokkal egyszerűbb, egy vagy csak kevés sávból álló mintázatot adnak. Természetesen az egyes próbák önmagukban nem olyan egyértelmű azonosítási eszközök, mint egy teljes DNS-ujjlenyomat, de egy négy-öt próbából álló sorozat elegendő különböző sávot ad ahhoz, hogy egyértelmű le-

gyen. Az ilyen vizsgálatot helyenként még DNS-ujjlenyomatnak nevezik, de ennél megfelelőbb a **DNS-típizés** használata.

A DNS-típizés egyik első alkalmazása az a szörnyű bűntény volt, amikor egy férfi meggyilkolt egy teherautóban alvó férfit és nőt, majd negyven perccel később visszatért, és a halott nőt meggyalázta. Az áldozat testében talált ondóváladékból DNS-t izoláltak, típizták és kimutatták, hogy mintázata megegyezik a gyanúsítottéval. Ez a bizonyíték segítette az esküdtszék meggyőzni arról, hogy a vádlottat elítélik, és szigorú büntetést javasoljanak. A 16.22. ábra egy DNS-típizálást mutat be, amelyet egy másik nemi erőszak gyanúsítottjának azonosítására végeztek el. A gyanúsított személy mintázata kétségkívül megegyezik az ondóból



16.21. ábra. DNS-ujjlenyomat. (a) A kilenc párhuzamos minta kilenc, egymással rokonságban nem álló fehér bőrű ember DNS-ét tartalmazza. Figyeljük meg, hogy nincs közöttük két egyforma mintázat. Az eltérések különösen a felső részben szembetűnők. (b) A két minta egyetű ikrekből származik, akiknek mintázatuk azonos

G. Vassart és mások: A Sequence in M13 Phage Detects Hypervariable Minisatellites in Human and Animal DNA. *Science*, 235:683. © 1987 AAAS



16.22. ábra. DNS-típizés alkalmazása egy nemi erőszakot elkövető azonosítása során. Két férfit gyanúsítottak azzal, hogy megtámadtak és megerőszakoltak egy fiatal nőt. A gyanúsítottaktól és az asszonytól származó különböző mintákból DNS-analízist végeztek. Az 1., 5., és 9. mintahelyeken marker-DNS van. A 2. mintasáv az A gyanúsított vérmintájából származó DNS, a 3. pedig az asszony ruháján talált ondóból vett DNS-ből származik. A 4. mintasáv a B gyanúsított vérmintájának DNS-e, a 6. mintasávban az asszony hüvelyéből vett váladék DNS-e látható. A 7. mintasáv az asszony vérmintájából vett DNS, a 8. mintasáv kontroll-DNS, a 10. mintasáv pedig DNS nélküli, ún. negatív kontroll. Részben a bizonyítékok alapján a B gyanúsítottat találták bűnösnek. Figyeljük meg, hogy a gyanúsított 4. mintahelyen látható DNS-fragmentumai megegyeznek a 3. mintahely ondóváladékának és a 6. mintahely hüvelyváladékának DNS-fragmentumaival

vett DNS-ével. Ez csak egyetlen próba eredménye, de a többi próba is adott a sperma-DNS-sel megegyező mintázatot.

A DNS-típezés egyik előnye a nagy érzékenység. Néhány csepp vér vagy ondó elegendő a vizsgálathoz. Bár néha a törvényszéki szakértőknek ennél kevesebb áll rendelkezésükre ahhoz, hogy előbbre jussanak. Ilyen például az áldozat hajszála, amely a DNS-típezéshez egymagában nem elegendő, de hasznos lehet, ha szőrtüszősejtek is vannak rajta. Ezen sejtek DNS-ének kiválasztott szegmentumai PCR-rel amplifikálhatók és típezhetők.

Pontossága ellenére a DNS-típezést néha nem fogadják el a bíróságon. 1995-ben, Los Angelesben, az O. J. Simpson-perben a védőügyvédek a DNS-típezés két problémájára koncentráltak. Először is, a módszer bonyolult és a vizsgálatokat nagyon gondosan kell elvégezni, hogy használható eredményt kapjanak. Másodszor, vita van az adatkiértékeléshez használt statisztikai módszer körül. A második kérdés azzal kapcsolatos, hogy lehet-e a szorzat szabályt annak eldöntésére használni, hogy a DNS-típezés eredménye egyértelműen azonosítson egy gyanúsítottat. Tételezzük fel például, hogy egy adott próba egy adott allélt egy átlagos populációban minden századik emberben azonosít. Tehát annak az esélye, hogy egy személy ezzel az alléllal rendelkezzen, 10^{-2} . Ha öt ilyen próbát használnak a vizsgálathoz, és mind az öt kimutatja a gyanúsított allélját, akkor azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az ilyen megegyezés esélyét megadhatjuk, mint a valószínűségek szorzatát, azaz $(10^{-2})^5 = 10^{-10}$. Mivel 10^{10} , vagyis tízmilliárd embernél kevesebb ember van a Földön, ez azt jelentené, hogy a DNS-típezés a gyanúsított kivételével statisztikailag mindenkit kizárna.

Amikor a vád képviselői először használták a DNS-típezést bizonyítékként a bíróságon, olyan szorzat szabály számításokat idéztek, amelyek meggyőzően hangzottak. De vannak, akik a számítások megalapozottságát kétségbe vonják. Azt hangsúlyozzák, hogy egy bizonyos etnikai csoport tagjai közelebbi rokonságban vannak, mint az átlagos populáció tagjai. Ezért az etnikai csoportra jellemző valószínűségi adatot kell alkalmazni, nem pedig az egész populációra vonatkozót. Mások még azzal is érveltek, hogy DNS-típezés bírósági alkalmazása előtt, mindegyik etnikai csoportot részletesen kellene tanulmányozni. Ehhez természetesen sok év munkájára lenne szükség, a vád képviselői viszont nem várhatnak ilyen hosszú ideig. Hogy lerövidítsék ezt az időt, az Amerikai Egyesült Államok Tudományos Akadémiája a probléma kivizsgálására és egy kompromisszumos javaslat elkészítésére, bizottságot hozott létre. A bizottság 1992 áprilisában tette közzé jelentését, amely a „maximum elv” alkalmazását javasolta. Először is, mindegyik próba esetében 100-100 egyénnél kell megvizsgálni az allélgyakoriságot az Egyesült Államok 15-20 legfontosabb etnikai csoportjában (pl. német, angol, kubai, vietnami stb.). Ezután a kriminálisztikai laboratóriumok számára megengedik, hogy a számításokhoz az etnikai csoportok bármelyikében tapasztalt legnagyobb gyakoriságot használják, vagy 5%-ot, ha az a magasabb. Vegyünk egy konkrét példát. Egy gyanúsított esetén öt próbával azonosították az allélgyakoriságokat. Ezeknek az alléloknak a gyakorisága a Puerto Ricó-i, az angol, a kínai, a skandináv és az orosz etnikai csoportokban volt a legnagyobb: 10%, 7%, 3%, 6% és 5%. Annak a valószínűségét, hogy ezzel az öt alléllal véletlenszerűen megegyezőzt találunk a populációban, úgy számítjuk ki, hogy először is a 3%-os gyakoriságot 5%-ra növeljük, majd valamennyi százalékot összeszo-

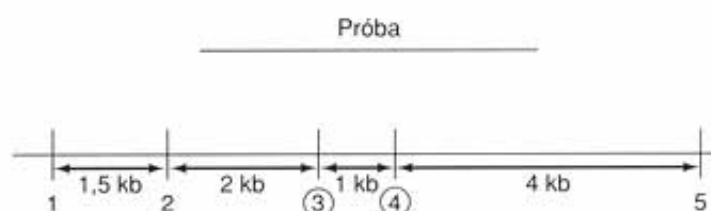
rozzuk. A szorzat a következő: $10^{-1} \times 7 \times 10^{-2} \times 5 \times 10^{-2} \times 6 \times 10^{-2} \times 5 \times 10^{-2} = 1,05 \times 10^{-6}$, azaz egy a millióhoz. Ez egy nagyon óvatos becslés, amit szinte minden tudós elfogad, és még mindig nagyon meggyőző a bíróságon. Végül meg kell jegyeznünk, hogy a DNS típezés nem csak a bűnöst azonosíthatja, hanem a gyanúsított ártatlanságát is bizonyíthatja.

A modern DNS-típezés emberek és állatok egyedeiben a polimorf helyek azonosítására DNS-próbákat használ. A DNS-típezést bírósági eljárásokban, például apasági keresetekben vagy bűnelkövetők azonosításakor használják.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Az alábbi rajzon egy DNS-régió fizikai térképe látható, amelyet RFLP analízissel térképez.



A számozott függőleges vonalak a *Pst*I enzim hasítási helyeit jelölik. A 3-as és a 4-es (körrel kiemelve) polimorf, a többi nem. A *Pst*I hasítási helyek közötti távolságok adottak. Az RFLP azonosítására használt próba kiterjedését a fenti vízszintes vonal jelöli. Különböző személyek DNS-ét *Pst*I enzimmal emésztik, a fragmentumokat elektroforézissel elválasztja, blotolja egy membránra, majd a blotot jelölt próbával hibridizáltatja.

(a) Rajzolja le a blot mintázatát, ha a DNS a következő haplotípusokra homozigóta egyénekből származik!

Haplotípus	3-as hely	4-es hely
A	+	+
B	+	-
C	-	+
D	-	-

(b) Milyen hatással lenne az 1-es hasítási hely jelenléte, illetve hiánya az eredményre?

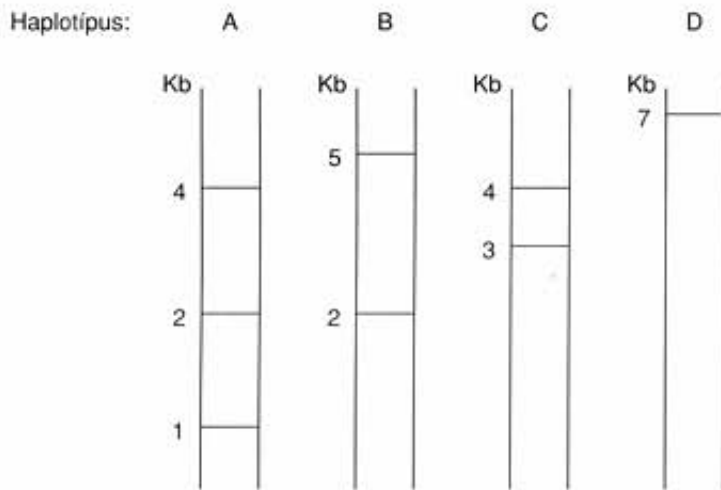
M E G O L D Á S

(a) A haplotípus: Ha mind a 3-as, mind a 4-es restriktós hely jelen van, akkor az összes lehetséges fragmentum létrejön. Balról jobbra haladva ezek a következők: 1,5 kb; 2 kb;

1 kb és 4 kb. Közülük a 2 kb, az 1 kb és a 4 kb méretűek hibridizálnak a próbával, és így láthatók lesznek.

B haplotípus: A 3-as restrikciós hasítási hely jelen van, tehát még kialakul a 2 kb méretű fragmentum; mivel a 4-es hely hiányzik, ezért az 1 kb és a 4 kb fragmentumok együtt maradnak, és egy 5 kb fragmentum keletkezik.
C haplotípus: Mivel a 3-as restrikciós hely hiányzik, a 2 kb és az 1 kb fragmentumok együtt maradnak, és egy 3 kb fragmentumot adnak; a 4-es hasítási hely jelen van, tehát a 4 kb fragmentum létrejön. D haplotípus: Mind a 3-as, mind a 4-es restrikciós hasítási hely hiányzik, így a 2 kb, 1 kb és 4 kb fragmentumok együtt maradnak, és egyetlen 7 kb méretű fragmentum keletkezik.

Az alábbi ábra az ön által kapott eredményeket foglalja össze:



- (b) Az 1-es hely megléte vagy hiánya nem módosítja az eredményt, mert a próba 2-es restrikciós helytől balra eső szakaszra, amely mindig jelen van, már nem nyúlik át. Bár az 1-es hasítási hely hiányában a 2-es helytől balra egy hosszabb fragmentum keletkezik, ezt a rendelkezésére álló próbával nem tudja kimutatni.

2. FELADAT

Egy bűnügyi laboratóriumban DNS-típusozást végez. Három különböző próbát használ több gyanúsított, valamint a gyilkosság helyszínéről származó vérminta DNS-ének Southern-blot analiziséhez. A vérmintában megfigyelt sávok nem egyeznek az áldozat vérmintájában találtakkal, de az egyik gyanúsított esetében mindhárom gén két-két alléljára vonatkozóan egyezést tapasztal. A sávok (allélok) gyakorisága az átlagos populációban a következő:

Allél	Gyakoriság (átlagos populációban)
1	2%
2	1%
3	0,5%
4	1,5%
5	1,2%
6	3%

A következő táblázatban azok az etnikai csoportok láthatók, akiknél ezek az allélok a legnagyobb gyakorisággal vannak jelen:

Allél	Gyakoriság	Etnikai csoport
1	5%	orosz
2	2%	kubai
3	1,3%	német
4	6%	japán
5	10%	afroamerikai
6	10%	vietnami

- (a) A szorzat szabály alapján számítsa ki, milyen valószínűséggel fordul elő az alléloknak ez a kombinációja az átlagos populáció egy egyedében?
(b) A maximum elv figyelembevételével végezzen óvatosabb becslést!

MEGOLDÁS

- (a) A szorzat szabály szerint, az átlagos populáció allélgyakorisági értékeit szorozzuk össze. Így:

$$P = 0,02 \times 0,01 \times 0,005 \times 0,015 \times 0,012 \times 0,03 = 5,4 \times 10^{-12}$$

- (b) A maximum elv szerint annak az etnikai csoportnak az allélgyakorisági értékét kell használni, ahol az a legnagyobb. Ha a gyakoriság 5%-nál alacsonyabb, akkor 5%-kal számolunk. A második adatsor a legnagyobb allélgyakoriságokat mutatja, amelyek közül a 2% és az 1,3% alacsonyabb 5%-nál, tehát ezek helyett 5%-kal kell számolnunk. Mindegyik allélpárt kettővel megszorozzuk, majd valamennyit összeszorozzuk. Így:

$$P = 2(0,05 \times 0,05) \times 2(0,05 \times 0,06) \times 2(0,1 \times 0,1) = 6 \times 10^{-7}$$

A 2-es szorzó faktornak ugyan kevés tudományos jelentése van, de sok bíróság igényli.

3. FELADAT

Egy humángenetikai betegség génjét térképezi. Azt figyelni meg, hogy a gén a B-101 próbával kimutatható RFLP-vel kapcsolt. Jelölt B-101 DNS-t hibridizál különböző egér-ember hibridsejtek DNS-ével. A következő táblázat a hibrid sejtvonalakban található emberi kromoszómákat mutatja, és azt, hogy a próba melyik sejtvonal DNS-ével hibridizált. Melyik emberi kromoszómán van a betegség génje?

Sejtvonal	Jelenlévő emberi kromoszóma	Hibridizáció a próbával
A	1, 2, 17	-
B	3, 5, 9, 12	+
C	5, 18, 22	-
D	1, 3, 9	+
E	2, 9, 18	-
F	2, 3, 7	+

MEGOLDÁS

Figyeljük meg az emberi kromoszómák jelenlétét a pozitív hibridizációt adó sejtvonalakban (B, D és F). Ezek az alábbiak:

B: 3, 5, 9, 12;

D: 1, 3, 9; és

F: 2, 3, 7.

Most keressük ki azt a kromoszómát, amelyik mindhárom pozitív vonalban közös. Ez a 3-as kromoszóma. Vagyis az RFLP a 3-as kromoszómán van, és így a vele kapcsolt betegséget okozó génnek is ott kell lennie.

ÖSSZEFOGLALÁS

A klónozott gének legnyilvánvalóbb felhasználási módja a hasznos fehérjék termeltetése. A klónozott gének néhány termékét, például az inzulint és a növekedési hormont, már használják is a gyógyászatban. A jövőben pedig biztonságos és hatásos oltóanyagok is készülhetnek ily módon. Egy klónozott gén közvetlen terápiás eszközként is alkalmas lehet. Egy ilyen eljárás során a genetikusok gént vittek be a beteg szervezetébe, hogy segítségével egy genetikai betegséget, az ADA-hiány okozta immunelégtelenséget gyógyítsák. Hasonló módszerekkel kísérleteznek olyan betegségek kezelésében, mint például a rák vagy az AIDS. A génbeviteli eljárások vektorai vírusok, főként legyengített retrovírusok. A kutatók növényekbe és állatokba is juttattak be géneket, hogy kedvezőbb tulajdonságokat alakítsanak ki. Transzgenikus növényekben és állatokban hatékonyan állíthatók elő a bevitt gének termékei.

A kutatók óriási vállalkozásba kezdtek, amikor a Humán Genom Projekt keretében elkezdték a teljes emberi genom térképezését és szekvenálását. Az első lépés, a teljes genom egy kis feloldású kapcsoltsági térképének elkészítése, már befejeződött. Három kis kromoszómának, a 22., a 21. és az Y-kromoszómáknak már elkészült a részletes térképe. Ilyen nagy DNS-régiók térképezéséhez speciális módszereket kell alkalmazni. Mesterséges élesztőkromoszómákkal (YAC) még 1 Mb-nál nagyobb DNS-darabok is klónozhatók. A YAC-ok azonosítására és DNS-ük térképezésére számos fizikai marker használható, többek között az RFLP-k, a VNTR-ek, az STS-ek és a mikroszatellitek. A mikroszatellitek, mivel nagyon variábilisak és viszonylag egyenletesen oszlanak el az egész genomban, a kapcsoltsági térképek készítésének fontos eszközei.

A kutatások egyik fontos célja a humángenetikai betegségekért felelős gének térképezése és azonosítása. Már sok betegség (Huntington-kór, cisztás fibrózis, Duchenne-féle izomdisztrófia) génjét azonosították. Ha a keresést sikerült egy viszonylag kis DNS-régióra korlátozni, akkor az exoncsapdázás, valamint CG-szigetek és konzervatív DNS-régiók keresése segített a gének azonosításában. A gén azonosítása után annak szerepét még úgy is igazolhatják, hogy a megfelelő gént egérben célzottan működés-képtelenné teszik, és a mutáció hatását ezeken a knock-out egereken tanulmányozzák.

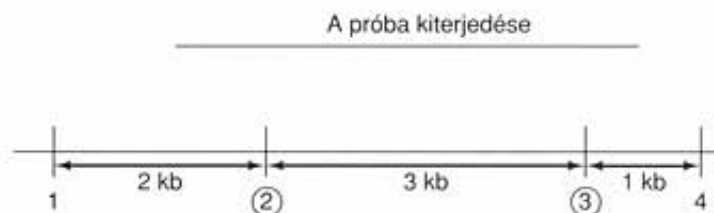
A DNS-típezés, a DNS-ujjlenyomat készítését is beleértve, az egyedek azonosításának egy fontos módszere. Az eljárás során a vizsgált DNS Southern-blotjaival specifikus próbákat hibridizálnak. A DNS-típezést a bűnüldöző szervek egyre gyakrabban alkalmazzák a tettesek azonosítására.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Miért lenne kockázatos egy legyengített, de működőképes HIV-oltóanyag?
- Miért nem jár ugyanazzal a kockázattal a HIV felszíni fehérjéjéből kifejlesztett oltóanyag, mint a teljes vírustól készült?
- Soroljon fel két okot arra, miért nem kísérlik meg a sarlósejtes vérszegénység gyógyítását génterápiával!
- Várhatóan miért lehet könnyebben kezelni a DNS-szintézisben szereplő gén hibájából fakadó betegséget, mint egy átlagos genetikai betegséget?
- Töltse ki az alábbi táblázatot, amelyben a génterápiás vektorok jellemzői szerepelnek! A „DNS beépítése” című rovatba írjon „+”-t vagy „-”-t, ha a vektor DNS-e a gazdasejt genomjába beépül, illetve ha nem épül be! A „Rák indukálásának veszélye” és „képessége” alá pedig a „viszonylag magas”, illetve a „viszonylag kicsi” kategóriákat írja!

Vektor	DNS beépítése	Rák indukálásának veszélye	Képessége
retrovírus			
adenovírus			
AAV			

- Milyen céllal alakították ki a kutatók a transzgenikus állatokat és növényeket?
- Soroljon fel két olyan módszert, amellyel idegen gént lehet bevinni növényekbe!
- Az alábbi rajzon egy régió fizikai térképe látható, amelyet RFLP analízissel térképez.



A számozott függőleges vonalak a *Sma*I restrikciós helyei. A 2-es és 3-as körrel jelölt helyek polimorfok, a többiek nem. A DNS-t az *Sma*I-gyel emésztjük, a fragmentumokat elektroforézissel elválasztjuk, blotoljuk egy membránra, és az ábra tetején látható, adott kiterjedésű próbával hibridizáljuk. Milyen méretű fragmentumokat kap az alábbi haplotípusokra homozigóta egyedekben a 2-es és a 3-as hasítási helyekre vonatkozóan?

Haplotípus	2-es hely	3-as hely
A	+	+
B	+	-
C	-	+
D	-	-

- Miért használhatók jobban térképezésre a mikroszatellitek a miniszatellitekénél?

10. Melyek egy YAC vektor leglényegesebb elemei?
11. Ki lehet-e az alábbi DNS-fragmentumokat exoncsapdázással mutatni? Miért igen, és miért nem?
- Egy intron.
 - Egy exon része.
 - Egy teljes exon, két oldalán az intronok darabjaival.
 - Egy egész exon, egyik oldalán egy introndarabbal.
12. Soroljon fel három olyan módszert, amelyekkel egy mega-YAC méretű klónon ki lehet mutatni egy gént!
13. (a) Milyen mutáció okozza a Huntington-kórt?
(b) Milyen bizonyítékok támasztják alá, hogy az azonosított gén valóban a Huntington-kórt okozó gén?
14. Egy humángenetikai betegség génjét térképezi. Azt tapasztalja, hogy a gén az X-21 próbával kimutatható RFLP-vel kapcsolt. A jelölt próbát egér-ember hibrid sejtek sorozatából izolált DNS-mintákkal hibridizáltatja. Az alábbi táblázatban az egyes hibrid sejtvonalakban meglévő emberi kromoszómák láthatók, és az, hogy melyik próbával adnak pozitív hibridizációt. Melyik emberi kromoszómán lehet a betegség génje?
- | Sejtvonal | A jelenlévő emberi kromoszómák | Hibridizáció az X-21 próbával |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------|
| A | 1, 5, 21 | + |
| B | 6, 7 | - |
| C | 1, 22, Y | - |
| D | 4, 5, 18, 21 | + |
| E | 8, 21, Y | - |
| F | 2, 5, 6 | + |
15. (a) Melyik a leggyakoribb CF mutáció a betegek többségében?
(b) Mi bizonyítja azt, hogy a CFTR-t kódoló gén valóban a CF gén?

16. DNS-tipizáláson dolgozik egy bűnügyi laboratóriumban. Több gyanúsítottból és egy megerősített áldozatról származó ondóminta DNS-ének Southern-blot analizisét végzi három különböző próbával. Az egyik gyanúsított DNS-mintáján kapott sávmintázat mindhárom gén hat alléja esetében azonos az áldozaton talált ondóból kapott mintázattal. Az allélok gyakorisága az átlagos populációban a következő:

Allél	Gyakoriság átlagos populációban
1	3%
2	2%
3	1%
4	0,5%
5	4%
6	10%

Ezeknek az alléloknak a gyakorisága a következő táblázatban lévő etnikai csoportoknál a legnagyobb:

Allél	Legnagyobb gyakoriság	Etnikai csoport
1	6%	skandináv
2	3%	Puerto Ricó-i
3	20%	arab
4	9%	mexikói
5	10%	koreai
6	10%	angol

- (a) A szorzat szabály felhasználásával számítsa ki annak a valószínűségét, hogy ez az allélkombináció az átlagos populáció egy egyedében megjelenik.
(b) A maximum elv felhasználásával is számolja ki ezen allélkombináció előfordulásának a valószínűségét!

A megoldások a könyv végén találhatóak.

17.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A mutagén vegyületek és sugárzások rákot okozhatnak.
- 2 Sok retrovírus tartalmaz onkogéneket, amelyek rák előidézésére képesek.
- 3 A normális sejtekben megtalálhatóak az onkogének megfelelői, a protoonkogének.
- 4 A protoonkogéneket sokféle mechanizmus aktiválhatja, az aktiválás pedig rákhoz vezethet.
- 5 Sok protoonkogén a sejtosztódás szabályozásában részt vevő fehérjéket kódol.
- 6 A sejtekben vannak tumorszuppresszor gének, amelyek ellenőrzésük alatt tartják a sejtosztódást. A tumorszuppresszor gének hibája rákos átalakuláshoz vezethet.

A gének és a rák

Egy megkerült sejt, amely valamilyen módon... legyengíti a szervezetet védő erőket, megtámadja a körülötte lévő, jól szervezett rendszerben élő sejteket, telepeket hoz létre a test távoli részeiben, és kannibalisztikus orgiája végén úgy követ el öngyilkosságot, hogy gazdaszervezetét is elpusztítja.

Pat McGrady
amerikai genetikus

Pat McGrady jellemzése szerint a rákos sejt „megkergült”, és valóban így van. A rákos sejtek nem reagálnak azokra a szabályozó jelzésekre, amelyek a normális sejteket osztódásra készítik vagy éppen nyugalmi állapotban tartják, és amelyekre az egészséges sejtek rendkívül érzékenyek. Könnyörtelenül osztódnak, rosszindulatú daganatokat képeznek, összenyomják és kiszorítják a körülöttük lévő egészséges sejteket. Mohón elfogyasztják a tápanyagokat, ezért a szomszédos sejtek éheznek. Bármennyire destruktív is ez a viselkedés, egymagában legtöbbször nem lenne elég ahhoz, hogy a rák halálos kimenetelű betegség legyen. A rákos sejtek azonban többet tudnak: kitörnek az elsődleges tumorból, bekerülnek a véráramba vagy a nyirokkeringésbe, és eljutnak a test távoli pontjaira, ahol megtelepednek, és új daganatokat alakítanak ki. Ez a folyamat az áttétképzés, a **metasztázis**. Ha egy tumor nem áttétes, akkor általában kezelhető sebészeti eszközökkel. Az áttétek kialakulása után azonban gyakran végzetes a betegség.

A RÁKOS SEJTEK JELLEGZETESSÉGEI

A sors iróniája, hogy a megkergült rákos sejt nem külső betolakodó, hanem a test valamelyik saját, normális sejtjének leszármazottja. Egy rendes, szabályos sejt valamilyen okból deviáns módon kezd viselkedni. Mi változott meg benne? Erre a kérdésre még nem ismerjük a teljes választ, de a normális és a tumorsejtek tenyésztésének a vizsgálata azt mutatja, hogy a rosszindulatú, malignus sejtek három fontos tulajdonságban különböznek normális társaiktól.

A rosszindulatú sejtek halhatatlanok, folyamatosan osztódnak. A méhnyakrákból származó HeLa-sejteket 1952-ben vették sejttenyészetbe (l. 9. fejezet). Ezek a sejtek már messze túlélték donorukat, és minden okunk megvan arra, hogy elhiggyük: mindaddig szaporodni fognak, amíg a kutatók érdeklődnek irántuk és tenyésztik őket. Ez a halhatatlanság egyáltalán nem jellemző a normális gerincessejtekre. Ahogy a bonyolult szervezetek meghatározott élettartamúak, sejteik is csak korlátozott számú osztódáson mennek át (sejttenyészetben kb. 60 osztódás) mielőtt megöregednek és elpusztulnak. Emlékezzünk vissza arra, amit a 7. fejezetben a telomeráz enzimről és az enzimmek a sejtek halhatatlanságában és a rák kialakulásában betöltött szerepéről olvastunk.

A halhatatlanság mellett a rákos sejtek sok olyan jellegzetességgel rendelkeznek, amelyek alapján **transzformált sejteknek** nevezzük őket. A normális sejtek a növekedéshez növekedési faktorokat igényelnek és szilárd felületet, amelyen meg tudnak tapadni. Amikor érzékelik, hogy egy bizonyos határon túl elszaporodtak, abbahagyják az osztódást. A transzformált sejtek nem ismerik ezeket a korlátokat. Általában lágy agaron éppúgy növekednek, mint szilárd felszínen, többnyire nincs szükségük növekedési faktorokra. Akkor is folytatják a szaporodást, ha a felszín telítődik, és egymás hegyére-hátára torlódnak, egészen addig, amíg a tápanyagokból ki nem fogyanak.

A 17.1. ábrán a normális és a transzformált sejtek megjelenése közötti eltéréseket tanulmányozhatjuk. A normális sejtek hosszúkás alakúak és egymással párhuzamosan rendeződnek (17.1.(a) és 1.(b) ábra), a transzformált sejtek viszont legömbölyödnek, és rendezetlenül helyezkednek el (17.1.(c) és 1.(d) ábra). Lényeges kérdés, hogy a rendezetlen és könnyörtelen növekedésű transzformált sejtek azonosak-e a malignus sejtekkel? A válasz az, hogy mindegyik malignus sejt transzformált sejt, de nem minden transzformált sejt malignus. A transzformált, de nem malignus sejtek nem növekednek rosszindulatú daganattá kísérleti állapotba oltva. Ugyanakkor nyilvánvalóan nem normális sejtek, már megtették annak az útnak a legnagyobb részét, amelynek végére érve rosszindulatúvá válnak.

A halhatatlanság és a transzformált fenotípus mellett egyre inkább elveszítik azoknak a normális sejteknek a jellegzetességeit, amelyekből származnak. A rákos májsejtek például kezdetben a normális májsejtek enzimműködésének nagyon sok tagját termelik, de enzimtermelő képességüket fokozatosan elveszítik. Ezenfelül rendszerint aneuploidok, és ennek a foka egyre nagyobb lesz. Tehát a rákos sejtek mind biokémiaileg, mind genetikailag egyre kevésbé hasonlítanak az eredeti szöveti sejtekre.

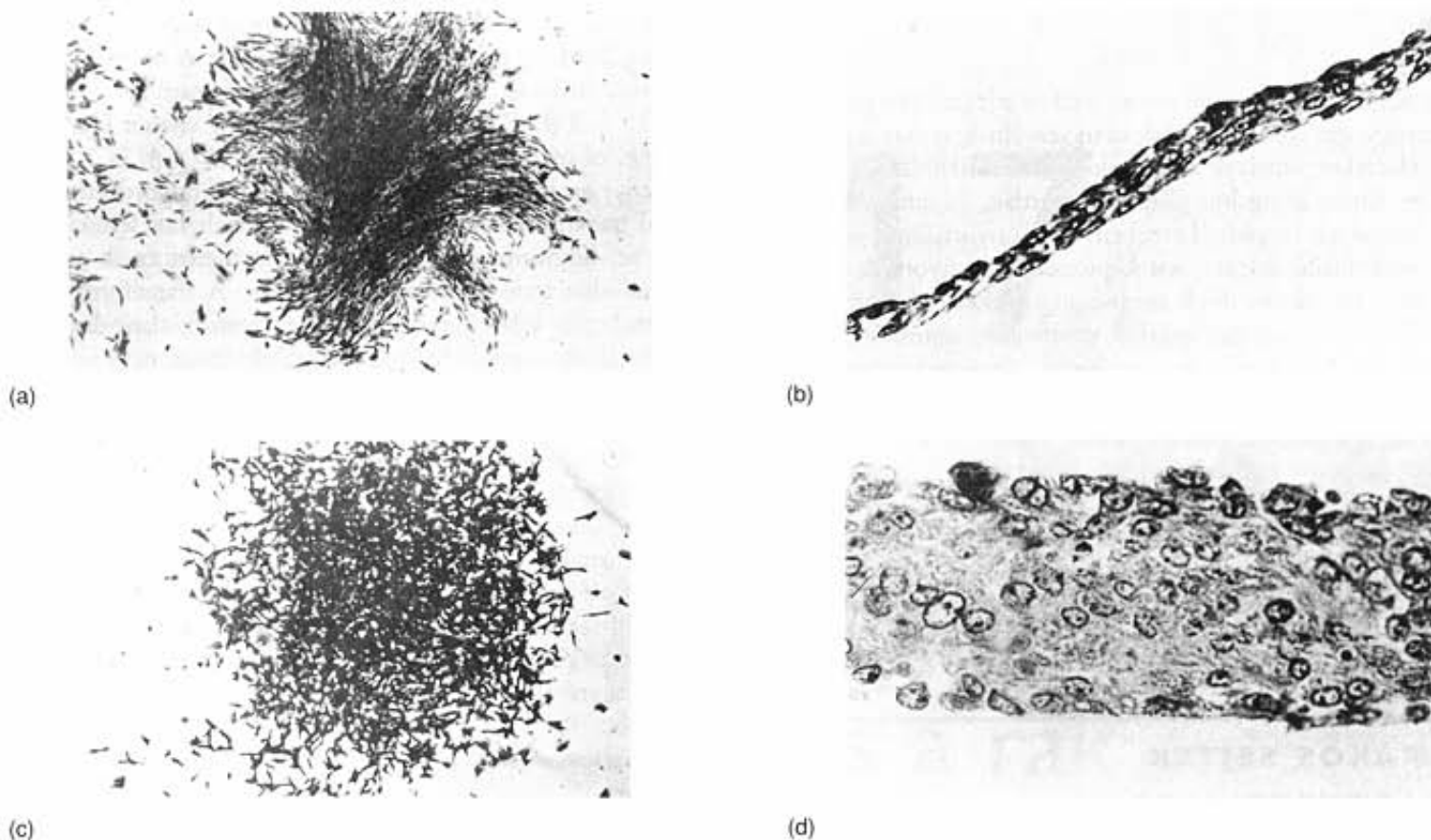
A rákos sejtek több tekintetben különböznek a normális sejtektől: halhatatlanok és transzformáltak, azaz olyan fizikai és kémiai környezetben is képesek növekedésre, amelyek között a normális sejtek nem életképesek, és egyre inkább elveszítik a normális ősökre jellemző biokémiai és genetikai tulajdonságokat.

A RÁK OKAI

Nyilvánvaló, hogy a rákos sejtek aneuploidiója nem oka, hanem következménye rosszindulatúvá válásuknak. Az is nyilvánvaló azonban, hogy a géneknek mélyreható szerepük van a sejtek malignus transzformációjában. Néha maguk a gének változnak meg, máskor a gének működésében lép fel zavar. Ebben a fejezetben a gének és a **karcinogenezis** (a rákos sejt kialakulása) kapcsolatát tárgyaljuk.

A KARCINOGEN ANYAGOK MUTAGÉNEK

A gének és a rák közötti kapcsolatot erősen alátámasztja az a tény, hogy sok rákkeltő anyag (**karcinogén**) egyben mutagén is. A XVIII. század vége óta gyanakodnak arra, hogy bizonyos kémiai anyagok rákot okozhatnak. Sir Percival Pott vette észre elsőként, hogy a kéményseprők között gyakori az egyébként ritka hererák. Pott következtetése szerint a betegség azzal lehet kapcsolatban, hogy a kéményseprők állandóan ki vannak téve a korom hatásának. Valóban, a koromban ugyanazok a mutagén hatású égéstermékek találhatók meg, mint a cigarettafüstben, és nagyon valószínű, hogy ezek okozzák a betegséget.



17.1. ábra. A normális és a transzformált sejtek morfológiai különbségei. (a) Törpehórcsóg veséjéből származó normális fibroblaszt sejtek telepe. Figyeljük meg szabályos, párhuzamos elrendeződésüket. (b) Az (a) ábra egyik sejtcsoportjának felnagyított képe. A sejtek alakja megnyúlt, és egymással párhuzamosan helyezkednek el. (c) Polyomavirussal (tumorvírus) transzformált sejtek. Figyeljük meg a szabálytalan, nem párhuzamos elrendeződést. (d) A (c) felvétel egyik sejtcsoportja nagyobb nagyítással. A sejtek viszonylag gömbölydedek és rendezetlen elhelyezkedésűek

Forrás: Tooze, John: *The Molecular Biology of Tumor Viruses*. 353, 1973. © Cold Spring Harbor, fotó G. G. P. Stoker

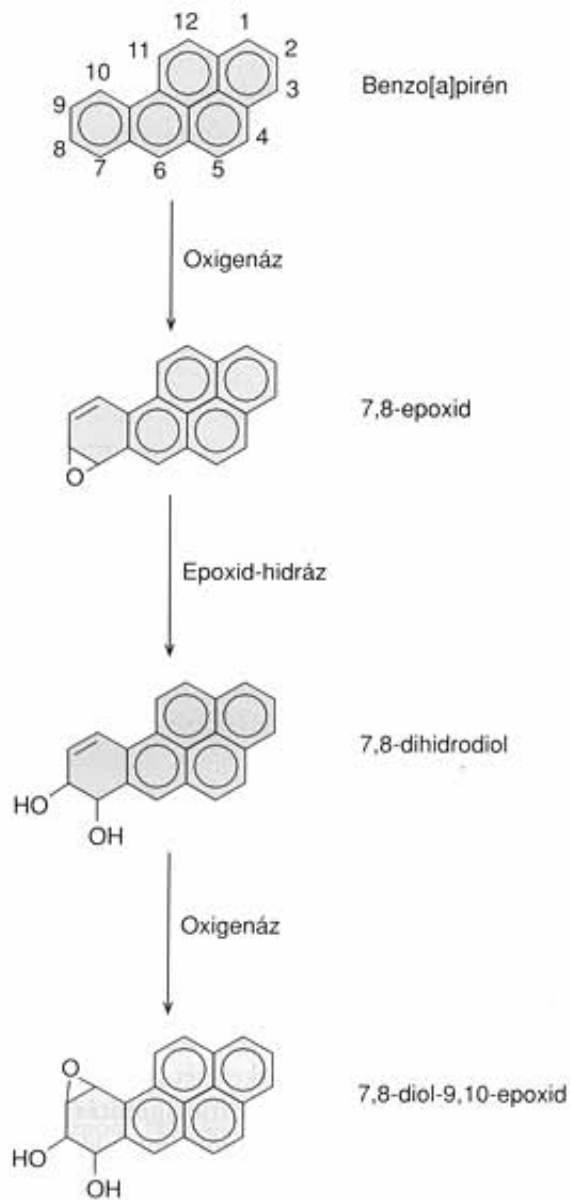
A 11. fejezetben tárgyaltuk a legtöbb kémiai karcinogén hatásmechanizmusát: elektrofil vegyületek, amelyek a DNS negatív töltésű helyeit megtámadva okoznak mutációt. A mutációk pedig események olyan láncolatát indítják el, amely rákos állapothoz vezethet. A cigarettafüst legvalószínűbb karcinogén hatóanyaga például a benzo[a]pirén (17.2. ábra). Szerkezetileg a szénhidrogének közé tartozik, azaz szénből és hidrogénből áll. A benzin is szénhidrogének keveréke, de egyszerűbb vegyületekből áll, mint a benzo[a]pirén. A szénhidrogének kevésbé reakcióképesek, és egyáltalán nem elektrofilok. Első pillantásra tehát nehezen érthető, miért lehet a benzo[a]pirén karcinogén. A szénhidrogének nem oldódnak vízben; ezért a szervezet átalakítja őket, hogy kiválasztódhassanak a vizelettel. Ez a kémiai átalakítás változtatja a reakcióképtelen szénhidrogént veszélyes, rákkeltő vegyületté.

A 17.2. ábrán látható az az enzimreakció-sorozat, amelyben a benzo[a]pirénből elektrofil karcinogén termék, az ún. **végző karcinogén** képződik (a vegyület nem a legerősebb karcinogén, hanem a benzo[a]pirénből képződő karcinogének leghatékonyabbja.) Az első lépésben egy oxigenáz enzim a benzo[a]pirént epoxiddá oxidálja, ezután ehhez egy epoxid-hidráz enzim vizet kapcsol. A kialakult terméket, egy dihidrodiolt az oxigenáz enzim alakítja tovább a végző karcinogénné, egy diol-epoxiddá.

A 17.3. ábra bemutatja, hogyan támadja meg a diol-epoxid a DNS egy bázisának elektronokban gazdag centrumát, miként változtatja meg a bázis szerkezetét, és végső soron a bázispárt.

Rákot okozó környezeti tényezők közé tartoznak a sugárzások is. Mutagén hatásukat a 11. fejezetben tárgyaltuk, és több bizonyítékunk van karcinogén hatásukkal kapcsolatban is. A világos bőrű emberek esetében nagyobb a bőrrák kialakulásának veszélye, mint a sötét bőrűeknél, mert sokkal kisebb védekező képességgel rendelkeznek az ultraibolya sugárzással szemben. A xeroderma pigmentosum nevű betegségben szenvedő emberek DNS-javító mechanizmusa hibás (l. 11. fejezet). Ennek következtében, ha kimerészkednek a közvetlen napfényre, különböző rákos elváltozások jelennek meg bőrükön, többek között halálos kimenetelű melanomák. Ez arra enged következtetni, hogy az ultraibolya fény hatására keletkezett DNS-törések és deformációk javítatlanul maradtak, és ezek felelősek a rákért. A helyzet azonban nem ennyire egyszerű.

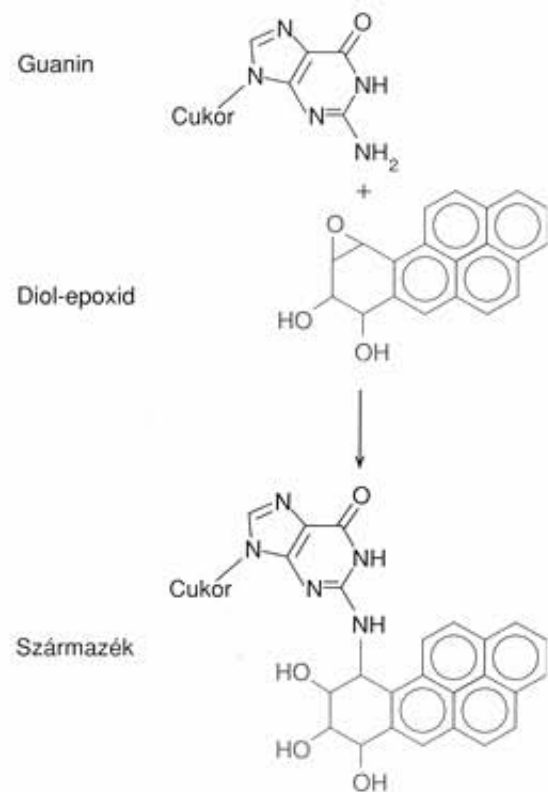
Emlékezzünk vissza arra, hogy a baktériumok egyik DNS-javító mechanizmusa hibázásra hajlamos (11. fejezet). Ha ezt a javító mechanizmust gátolják, a baktériumok mutációs rátája alacsonyabb lesz. Más szóval, nem maga a károsodás okoz sok megmaradó mutációt, inkább a nem megfelelő javítás. Ha az euka-



17.2. ábra. A benzo[a]pirén átalakulása végső karcinogénné

rióták esetében is ilyen folyamatok játszódhatnak le, akkor a valódi mutagén (és karcinogén) eseményeket néhány xeroderma pigmentosumban szenvedő betegnél nem a javítatlan károsodások, hanem a hibás javítások jelentik. Ugyanez igaz lehet a kémiai karcinogének által károsított DNS-re is. A sejt sikertelen javítási kísérlete lehet az, ami miatt ezek a károsodások végül állandósult mutációkká válnak és rákhoz vezethetnek.

Hasonló megközelítést alkalmazhatunk a nagy energiájú sugárzások – például a röntgensugárzás – károsító hatására is. A röntgensugarak a kétfonális DNS-lánc töréseit váltják ki (kromoszómatoréseket). Ez természetesen mutagén folyamat, ami karcinogénné alakulhat, amikor a sejt megpróbálja helyrehozni a károsodást a törött kromoszómavégek összekapcsolásával. Ha egynél több kromoszómatorés történt, a nem megfelelő végek is összekapcsolódhatnak, amelynek eredménye transzlokáció. A transzlokációk hibásan aktiválhatnak, vagy éppen inaktiválhatnak bizonyos géneket, amelynek végső következménye a rákos folyamat kialakulása.



17.3. ábra. A benzo[a]pirénből származó diol-epoxid (piros) és a DNS guaninjának kölcsönhatása

A mutagén anyagok és a sugárzások valószínűleg azért vezethetnek rákhoz, mert károsodásokat okoznak a DNS-ben. A vegyületek néha közvetlenül hatnak, de rendszerint az anyagcsere-folyamatok során keletkezik belőlük olyan elektrofil karcinogén, amely károsítja a DNS-t. A vegyületek vagy a sugárzások közvetlen károsító hatása is karcinogén, de rákot eredményezhet a pontatlan javítási folyamat is.

A VÍRUSOK ÉS A RÁK

A vírusok képezik a harmadik, malignus transzformáció kiváltására képes csoportot. Az **onkogén** (tumorkeltő) vírusok tanulmányozása során sok olyan vírusgént, ún. onkogént azonosítottak, amelyek rákot okozhatnak. Meglepő módon ezen gének megfelelőit megtalálták a sejtekben is, és ezek közreműködnek a nem víruseredetű tumorok előidézésében. Az utóbbi gének a celluláris onkogének, pontosabban celluláris **protoonkogének**.

A tumorvirologia története 1908-ig nyúlik vissza, amikor V. Ellerman és O. Bang vírusot tartalmazó kivonattal leukémiát vitt át beteg csirkéről egészségesre. Sajnos a kor patológusai nem úgy tekintettek a leukémiára, mint rákra, és nem ismerték fel a kísérleti eredmény jelentőségét.

Peyton Rous mindössze három évvel később hasonló kísérletet végzett csirkével és egy kötőszöveti tumor sejtmentes kivonatával. Rous kiment a Rockefeller Intézet laboratóriuma

közélemben lévő piacra New York Cityben, és az eladásra szánt csirkékből **szarkóma** (kötőszöveti tumor) mintákat gyűjtött. A laboratóriumban homogenizálta a tumorokat, a homogenizátumot átsűrte, hogy minden vírusnál nagyobb részecskét eltávolítson, majd ezzel a szűrlettel fertőzött meg egy másik csirkét. A fertőzött állaton is kialakult a szarkóma, sőt olyan fertőzőképes sejt- és baktériummentes anyagot is termelt, amely megfertőzött egy harmadik csirkét. Így nyilvánvalóan a szűrhető anyag, feltételezhetően egy vírus okozta a rákot.

Ezek a kísérletek ismételten arra utaltak, hogy vírus rákot okozhat, de a kísérlet most sem keltett visszhangot. Rous eredményeinek mellőzése részben azzal magyarázható, hogy a csirkék tumorát nem tekintették az emberi rák megfelelő modelljének. Évtizedeknek kellett eltelnie, mire emlősökön végzett kísérletekkel mindenki számára kielégítően bebizonyították,

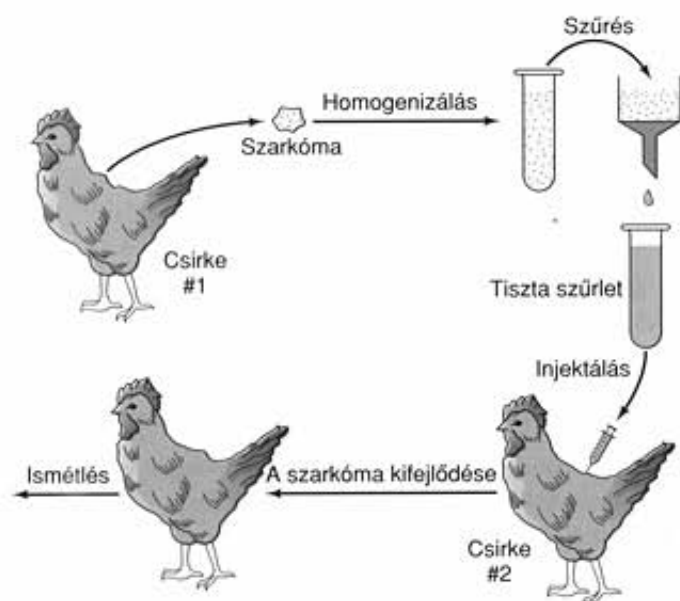
hogy a vírusok valóban rákot okozhatnak. Szerencsére Rous elég hosszú életű volt ahhoz, hogy megérje a megérdemelt elismerést, beleértve a Nobel-díjat (1966). Ma a **Rous-szarkóma-vírus** (RSV), más néven **madárszarkóma-vírus** (ASV), a legjobban ismert rákkeltő vírusok egyike.

Az említett kísérletek kivitelezése Robert Koch klasszikus posztulátumainak megfelelően történt, amely szerint egy fertőző ágens jelenlétét akkor lehet bizonyítottan tekinteni, ha a kutató: (1) izolálja a kórokozót egy beteg állatból; (2) megfertőz vele egy egészséges állatot; (3) az így megbetegített állatból izolálja újra a kórokozót. Ez a kísérletsorozat alkalmazható alacsonyabb rendű állatok esetében, de embernél nyilvánvalóan nem, és főleg nem, ha rákról van szó. Két esetben azonban az 1950-es években beoltottak embereket olyan élő vírusokkal, amelyek később tumorvírusoknak bizonyultak (l. 17.1. melléklet). Szerencsére egyik esetben sem fejlődött ki rák.

A TUMORVÍRUSOK MOLEKULÁRIS GENETIKÁJA

A tumorvírusok lehetnek DNS- vagy RNS-vírusok. Mindegyik típust tárgyaltuk már az előző fejezetekben. Az adenovírus és az SV40 két olyan DNS-tumorvírus, amelyek nagyon értékes modellként segítettek az eukarióták génműködésének tanulmányozását. Az intronokat például ezekben fedezték fel először (l. 9. fejezet), az adenovírus ezen felül a splicing vizsgálatának is kedvelt objektuma. Az RNS-tumorvírusok mindegyike **retrovírus** (l. 12. fejezet) és kétfonális DNS-intermediereken keresztül replikálódik. Az AIDS vírusa, a HIV (humán immundeficiencia vírus) is retrovírus. A 17.5. ábrán látható a HIV modellje, amely egyben az RNS-tumorvírusok szerkezetét is bemutatja.

A **tumorfejlesztő képesség (tumorigenitás)** meghatározása döntő vizsgálat egy vírus tumorvírusként való osztályozásához. Ez annak a képességnek a megállapítása, hogy a vírus az egész állatban képes-e rákot okozni. A vizsgálat azonban nagyon időigényes, hónapokba is telhet, mire a kísérleti állatban kifejlődik egy tumor. Szerencsére vannak könnyebben kezelhető rendszerek is, amelyek nem igazolják ugyan abszolút biztonsággal egy vírus tumorigenitását, de jó jelzést adnak annak lehetőségére. A leggyakrabban alkalmazott ilyen vizsgálat az ún. sejttranszfor-



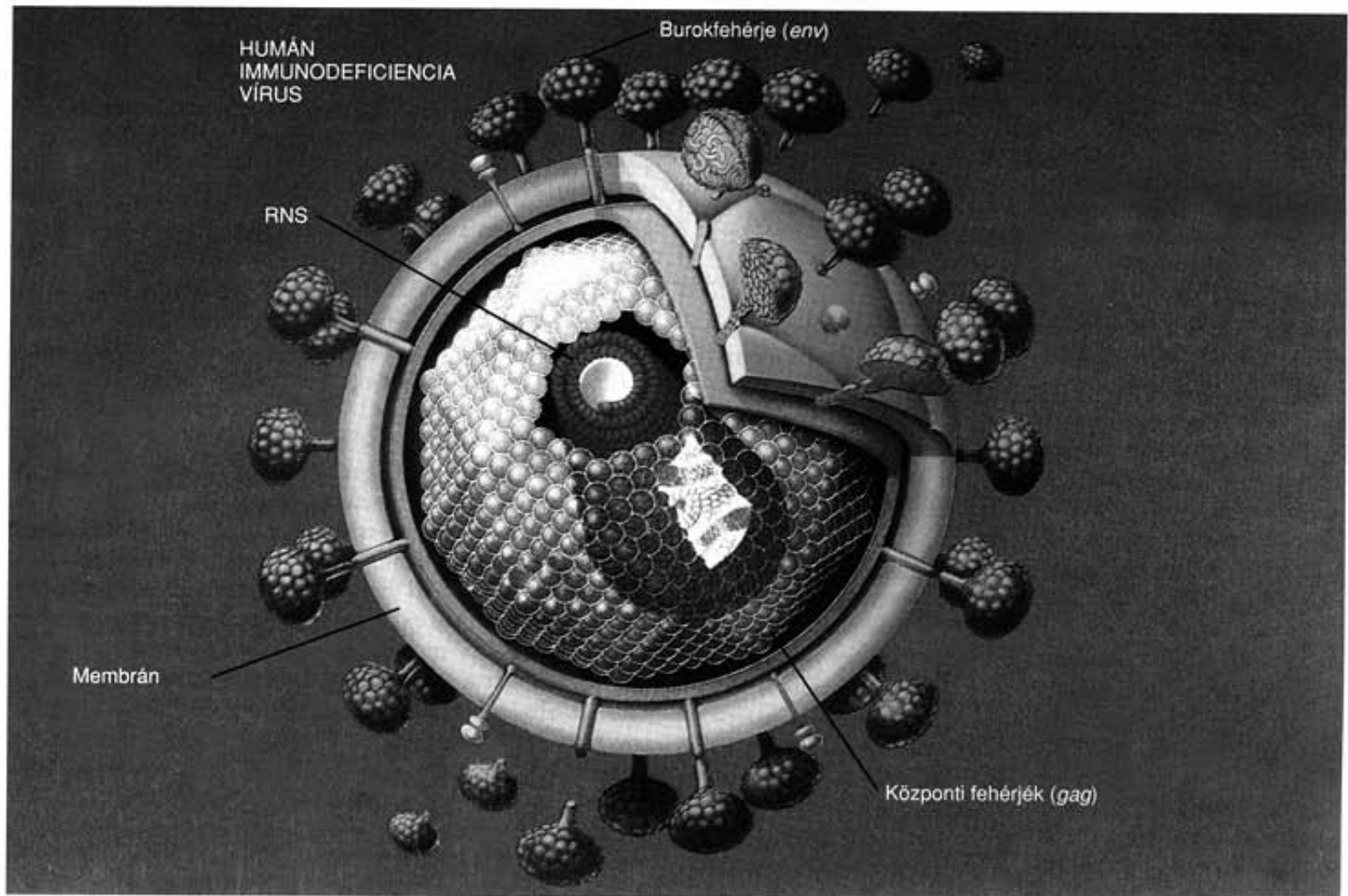
17.4. ábra. A vírusok okozhatnak daganatokat. Rous egy beteg csirke szarkómájából kivett egy darabot, és homogenizálta. A homogenizátumot baktériumszűrőn tisztította, hogy a vírusoknál nagyobb részecskéket eltávolítsa belőle. Amikor a szűrletet egy másik csirkébe injektálta, az állaton az injekció beadásának környékén szarkómák alakultak ki, amelyekből hasonló módszerrel fertőzőképes virust sikerült kinyernie

17.1. Két nem szándékos emberi tumorvírus kísérlet

Amikor az 1950-es években a Salk-féle vakcinát bevezették a gyermekparalízis ellen, élő, de legyengített poliovirust használtak. A vírusokat majom-vesesejtekben szaporították. Miután már egymilliónál is több embert beoltottak, felfedezték, hogy a majom sejtjeiben ott voltak saját, szintén aktív vírusai is. Ezek közül az egyik az SV40 (simian 40) volt, amelyről ma már tudjuk, hogy ez a vírus rágszálókban tumort okoz. Szerencsére úgy tűnik, emberben nem, mert ma, negyven évvel a nem

szándékosan végzett kísérlet után sem mutattak ki ilyen típusú rákos megbetegedéseket.

A koreai háború idején sok besorozott amerikai újonc légúti fertőzéssel érkezett a kiképzésre. A kórokozót vírusként azonosították, ezért vakcinát állítottak elő ellene, és ezeket immunizáltak vele. Később kiderült, hogy ez egy adenovírus, a rágszálók egyik rákkeltő vírusa. Szerencsére ez sem okozott megbetegedést az emberekben.



17.5. ábra. A HIV (humán immundeficiencia vírus) modellje. A középpontban a retrovírus RNS-genomja látható (bíbor). A genomot körülveszi a központi fehérjékből álló köpeny, (szürke). Ezeket a fehérjéket a *gag* gén kódolja. A vírus központi részét körbefogja a sejt plazmamembránjából származó burok (sárga). A membránba virális burokfehérjék (zöld) épülnek be, amelyeket az *env* gén kódol. Az RNS-tumorvírusokban hasonló gének találhatóak, és az RNS-tumorvírusok hasonló modell szerint épülnek fel

Coulter Corporation engedélyével

mációs teszt. Ebben az értelmezésben a **transzformáció** azt jelenti, hogy egy tenyésztet normális sejtjei átalakulnak rákos sejtekké. Nem azt figyeljük meg, hogy az egész szervezetben kifejlődik-e rák, hanem megelégszünk azzal, hogy csak sejttenyésztetben történik meg a sejtek átalakulása.

Azok a DNS- és RNS-vírusok, amelyek rákos elfajulást okozhatnak, a tumorvírusok csoportjába tartoznak. Az ilyen vírusok képesek a sejttenyésztet sejtjeinek transzformálására, azaz a normális sejteket úgy alakítják át, hogy a rákos sejtekhez hasonlóan viselkedjenek.

A virális onkogének

Mivel a tumorvírusok transzformálják a sejteket, a transzformációt irányító géneknek a vírusok genomjában kell lenniük. A virális onkogének vizsgálata azért alapvető fontosságú, mert fényt de-

ríthet arra, hogyan transzformálja a vírus a sejteket. Ez a kérdés valójában még fontosabb, mint gondolták, mert sok, a vírusok onkogénjeivel homológ gén, ún. protoonkogén található a normális, nem fertőzött emberi sejtekben is. Ennek a ténynek ugyanis mélyrehatóak a következményei. Minthogy vannak olyan géneink, amelyek nagyon hasonlítanak a virális onkogénekre, a protoonkogének szerkezeti, illetve működésbeli megváltozása okozhatja, hogy igazi onkogénként kezdenek működni, vagyis tumort alakítsanak ki. A későbbiekben tárgyaljuk, hogy a virális onkogének a gazdasejt géneiből származnak. Vannak retrovírusok, amelyek magukba építették ezeket a géneket más olyan génekkel együtt, amelyek sikeresebb replikációt tettek lehetővé, de nem mindegyik retrovírusban található onkogén.

Mivel bizonyos retrovírusok tartalmaznak a sejt protoonkogénjeivel homológ onkogéneket, kezdjük a tárgyalást a retrovírusok genetikájának rövid áttekintésével. A 17.6. ábra a transzformáló képességű Rous-szarkóma vírus géntérképét mutatja be. Az ábrán a vírus genomjának DNS-re átírt változata, az ún. provírus szerepel (l. a 12. fejezetet és a következő bekezdést). A replikációjához három



17.6. ábra. A Rous-szarkóma-vírus géntérképe. A vázlat a DNS vagy provírus formát ábrázolja. A genom két végén ismétlődő egységek, LTR-szakaszok találhatók. A gének, a *gag*, a *pol*, az *env* és az *src* sorrendben a vírus burokfehérjét, reverz-transzkriptázát, membránfehérjét, valamint a transzformáló képességért felelős fehérjét kódolják

gén szükséges. Az első, a *gag*, olyan polipeptint kódol, amely több, a vírus köpenyt képző polipeptidre hasad. A második a *pol*, a reverz-transzkriptázát kódolja. Ez az enzim végzi a vírus RNS-ének másolását DNS-provírus formába (l. 12. fejezet). A harmadik az *env*, azokat a fehérjéket kódolja, amelyek a külső burokba épülnek be.

Végül, a 3'-végnél található az *src*, a vírus onkogénje. Ez a gén nem szükséges a vírus replikációjához. A retrovírusok valószínűleg onkogén nélkül alakultak ki, és sok retrovírus igen életképes onkogének nélkül is, de kompetitív előnyt jelent annak a vírusnak, amelyekben megtalálható. A vírus szempontjából az onkogén haszna az, hogy transzformálja a sejteket, és megállás nélküli osztódásra bírja őket. Az osztódások során a sejt természetesen a vírus genomját is replikálja a sejt genomjába **provírusként** beépült formájában.

Az RSV szokatlan vonása, hogy képes önmagában is replikálódni. A legtöbb transzformáló retrovírus miközben a sejt génei közül magába épít egyeseket, saját génei közül elveszít néhányat, és emiatt tulajdonképpen **defektes** lesz. Vannak olyan transzformáló retrovírusok, amelyek nem is tartalmaznak ép virális géneket, csak egy onkogént, és egy kevés egyéb, sejteredetű DNS-t, két LTR szekvencia közé ékelve. Az ilyen vírusok replikációja az ún. **helpervírusok** jelenlététől függ. Ezek a segítő vírusok pótolják a hiányzó funkciókat, ezért segítségükkel replikálódhatnak a defektes retrovírusok is.

Amint már említettük, az onkogének nyilvánvalóan nem vírusokból származnak. Több tucat virális onkogént azonosítottak (17.1. táblázat), és mindegyiknek van közeli rokon sejtbeli megfelelője, valamelyik protoonkogén. Honnan tudjuk, hogy a vírusok szerezték ezeket a géneket a sejtekből, és nem fordítva történt a géntranszfer? A legmeggyőzőbb érv az, hogy a sejtől származó gének intronokat tartalmaznak, a vírusok génei azonban nem. Ez a helyzet könnyen magyarázható a sejt → vírus géntárolási iránnyal (17.7. ábra). Elsőként egy retrovírus provirusa rekombinálódott egy sejttes protoonkogénnel. Majd a provirus a protoonkogénnel együtt átíródott, az intronok pedig kihaladtak. Az elkészült RNS bepakolódott az új retrovírus-részecskébe, amely tovább fertőzött. Mindegyik lépésnek megvan a maga jól kialakult genetikai mechanizmusa. Ugyanakkor nem ismerünk egyetlen esetet sem intron beépülésére, aminek révén víruseredetű onkogénből celluláris onkogén alakulhatott volna ki.

Az elméleti érvek mellett minden kétséget kizáró bizonyíték van arra, hogy transzformációra defektes retrovírus szerezhethet onkogént a gazdasejtől. Egy kísérletben az RSV-vírus *src* génjének (*v-src* – virális *src*) legnagyobb részét eltávolították, majd csirkékbe injektálták. Az *src*-génnel rendelkező RSV-vírus az injekció helyéhez közel nagyon rövid időn belül szarkómát okozott. Mivel a de-

fektes vírusból hiányzott a működőképes onkogén, nem várták, hogy tumort okozzon. Két hónappal később azonban az injekciók helyétől távol néhány tumor jelent meg. A daganatokból izolált RSV-részecskékből működőképes *src* gének voltak. A legegyszerűbb magyarázat az, hogy a celluláris *src* gén (*c-src*) rekombinálódott a virális onkogén maradványával, és kiegészítette azt. A folyamat hasonló a 17.7. ábrán bemutatott folyamathoz, csak valószínűsége sokkal nagyobb, mert a *v-src* maradványa a provírusban elősegíti a homológ rekombinációt a celluláris protoonkogénnel.

A lassan transzformáló vírusok esetében sincs szüksége a retrovírusnak onkogénre ahhoz, hogy tumorvírus legyen. A madár-leukózis-vírus (ALV) egyáltalán nem tartalmaz onkogént, mégis okozhat rákot egy celluláris protoonkogén aktiválásával. Több kutató kimutatta, hogy az ALV provirusa egy speciális celluláris protoonkogén, a *c-myc* mellé épül be. A vírus LTR-régiójában elhelyezkedő erősítő szabályozó szakasz aktiválja a *c-myc* gént, és emiatt következik be a transzformáció (17.8. ábra).

Viszonylag kevés emberi tumorvírust ismerünk, mert nagyon nehéz azt bizonyítani, hogy egy vírus emberben rákkeltő. Ugyanakkor több olyan vírusról van tudomásunk, amelyeknek előfordulása valamely ráktípus megjelenésével nagymértékben egybeesik. Ez arra mutat (bár a bizonyítékok nem teljesek), hogy az említett vírusok ténylegesen szerepet játszanak a rákok kialakulásában. Közülük legrészletesebben két DNS-vírust és egy retrovírust ismerünk. A feltételezett DNS-tumorvírus az Epstein-Barr-vírus, a Burkitt-limfoma vírusa (l. a fejezet későbbi részében), és az ember papillomavírusa, amely a méhnyakrákkal kapcsolatos. Az említett retrovírusok pedig T-sejtes leukémiavírusok, a **HTLV-I** és **HTLV-II**.

Mindkét retrovírus felépítése nagyon hasonló a HIV víruséhoz, még a megtámadott sejt típusa is egyezik, hiszen a T-limfocitákban replikálódnak. Hatásuk azonban nagyon eltérő: míg a HIV végül elpusztítja a sejtet, a HTLV-I és II transzformálja. Onkogénjük nagyon emlékeztet a HIV *tat* génjére, a neve is hasonló: *tax*. A *tat* és a *tax* gének egyaránt serkentik a provirus kialakulását, és ezzel biztosítják, hogy a fertőzés után azonnal sok vírusalkotórész keletkezzék. De ezen túl a *tax* a gazdasejt géneit is serkenti, közöttük valószínűleg protoonkogéneket is, amivel a sejtosztódást stimulálja.

Mindegyik ismert RNS-tumorvírus retrovírus.

RNS-genomjuk tartalmazhatja a köpenyfehérjék, a reverz-transzkriptáz és a külső burokfehérjék géneit, valamint rendszerint egy onkogént, amely transzformálja a gazdasejtet. A virális onkogének valószínűleg a velük közeli rokonságot mutató celluláris protoonkogénekből származnak. Vannak olyan retrovírusok, amelyek saját onkogének nélkül is működőképesek, mert provirusaik a sejt saját protoonkogénjeit aktiválják. A legtöbb transzformáló retrovírusból hiányzik egy vagy több, a vírus replikációjához szükséges gén. Az ilyen defektes vírusok replikációja a helpervírusoktól függ. Két retrovírus, a HTLV-I és a HTLV-II jelenléte szorosan összefügg az ember T-sejtes leukémiájának megjelenésével.

17.1. táblázat. A sejteredetű onkogének termékeinek funkciója:

1. osztály: Növekedési faktorok		5. osztály: Citoplazmatikus protein-szerin-kinázok	
<i>sis</i>	PDGF növekedési faktor β -lánc	<i>raf/mil</i>	Citoplazmatikus protein-szerin-kináz
<i>int-2</i>	FGF-fél rokon növekedési faktor	<i>pim-1</i>	Citoplazmatikus protein-szerin-kináz
<i>hst</i> (KS3)	FGF-fél rokon növekedési faktor	<i>mos</i>	Citoplazmatikus protein-szerin-kináz (citoszztatikus faktor)
FGF-5	FGF-fél rokon növekedési faktor	<i>cot</i>	Citoplazmatikus protein-szerin-kináz?
<i>int-1</i>	Növekedési faktor?		
2. osztály: Receptor és nem-receptor protein-tirozin-kinázok		6. osztály: Citoplazmatikus szabályzó anyagok	
<i>src</i>	Membránhoz kötött nem-receptor protein-tirozin-kináz	<i>erk</i>	SH-2/3 fehérje, amely a foszfortirozint tartalmazó fehérjékhez kötődik (és szabályozza működését?)
<i>yes</i>	Membránhoz kötött nem-receptor protein-tirozin-kináz		
<i>fgf</i>	Membránhoz kötött nem-receptor protein-tirozin-kináz	7. osztály: A sejtmag transzkripciósi faktorai	
<i>lck</i>	Membránhoz kötött nem-receptor protein-tirozin-kináz	<i>myc</i>	Transzkripciósi faktor
<i>fps/fes</i>	Nem-receptor-protein-tirozin-kináz	<i>N-myc</i>	Transzkripciósi faktor
<i>abl/ber-abl</i>	Nem-receptor protein tirozin-kináz	<i>L-myc</i>	Transzkripciósi faktor
<i>ros</i>	Membránhoz kötött receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>myb</i>	Transzkripciósi faktor
<i>erbB</i>	Csonka EGF-receptor protein-tirozin-kináz	<i>lyl-1</i>	Szekvensspecifikus DNS-kötő fehérje
<i>neu</i>	Receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>fos</i>	A <i>c-jun</i> termékével együtt az AP-1 transzkripciósi faktor része
<i>fms</i>	Mutáns CSF-1-receptor protein-tirozin-kináz	<i>jun</i>	A szekvensspecifikus DNS-kötő fehérje; az AP-1 része
<i>met</i>	Oldható, csonka receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>erbA</i>	Domináns-negatív mutáns tiroxin (T_3) receptor
<i>trk</i>	Oldható, csonka receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>rel</i>	Domináns-negatív mutáns tiroxin NF_{κ} -B rokon fehérje
<i>kit</i> (W lokusz)	Csonka összeceptor protein-tirozin-kináz	<i>vav</i>	Transzkripciósi faktor?
<i>sea</i>	Membránhoz kötött receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>ets</i>	Szekvensspecifikus DNS-kötő fehérje
<i>ret</i>	Csonka, receptorszerű protein-tirozin-kináz	<i>ski</i>	Transzkripciósi faktor?
3. osztály: Receptorok protein-tirozin-kináz aktivitása nélkül		<i>evi-1</i>	Transzkripciósi faktor?
<i>mas</i>	Angiotenzin-receptor	<i>gli-1</i>	Transzkripciósi faktor?
4. osztály: Membránhoz kötött G fehérjék		<i>maf</i>	Transzkripciósi faktor?
H- <i>ras</i>	Membránhoz kötött-GTP-kötő/GTPáz	<i>phx</i>	Kiméra E2A-homeobox transzkripciósi faktor
K- <i>ras</i>	Membránhoz kötött GTP-kötő/GTPáz	<i>Hox2,4</i>	Transzkripciósi faktor?
N- <i>ras</i>	Membránhoz kötött GTP-kötő/GTPáz	Azonosítatlan:	
<i>gsp</i>	G _s mutáns aktivált fomája	<i>dbl</i>	Citoplazmatikus, lerövidült citoszkeletális fehérje?
<i>glp</i>	G _s mutáns aktivált fomája	<i>bcl-2</i>	Plazmamembrán-jelátvivő?

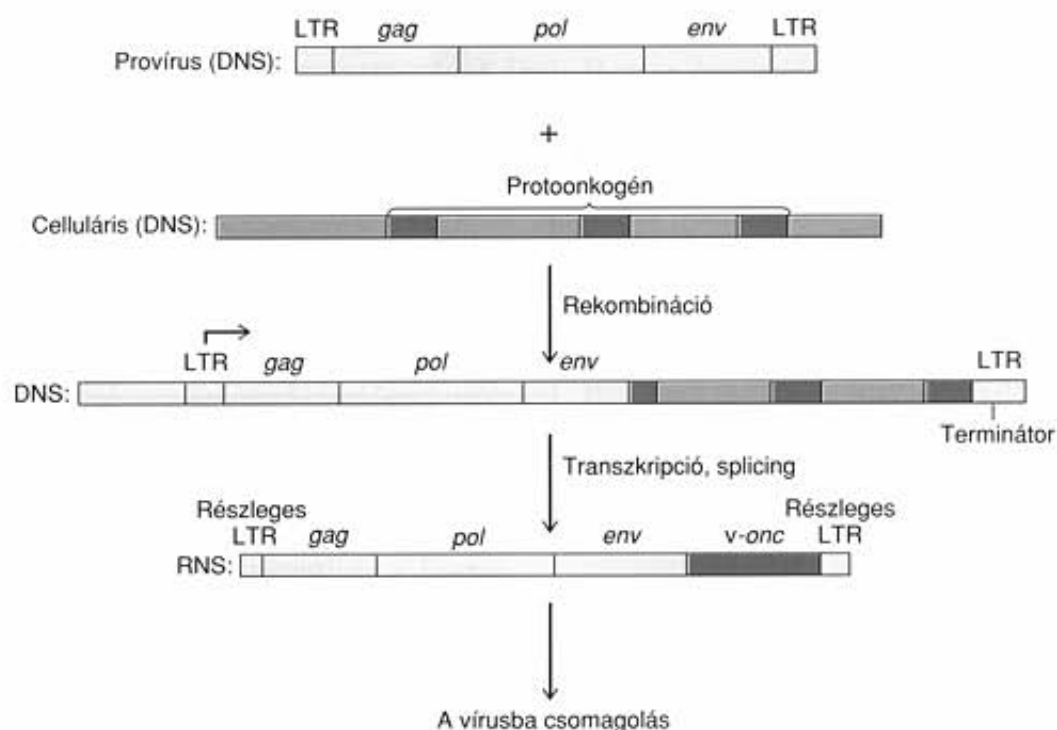
A CELLULÁRIS PROTOONKOGÉNEK ÁTALAKULÁSA ONKOGÉNEKKÉ

A fejezet előző részben tárgyaltuk, hogy a virális onkogének transzformálják a sejteket, rosszindulatú daganatokat váltanak ki, és bizonyos feltételek mellett a sejten belül megfelelőik is hasonlóan viselkednek. Bőséges bizonyíték áll rendelkezésünkre arra vonatkozóan, hogy ártalmatlan celluláris protoonkogének átalakulhatnak onkogénekké és rákot okozhatnak, vagy legalábbis hozzájárulhatnak az **onkogenezis** folyamatához. Még azoknak a körülményeknek egy részét is ismerjük, amelyek között a átalakulás bekövetkezhet.

A protoonkogének pontmutációi

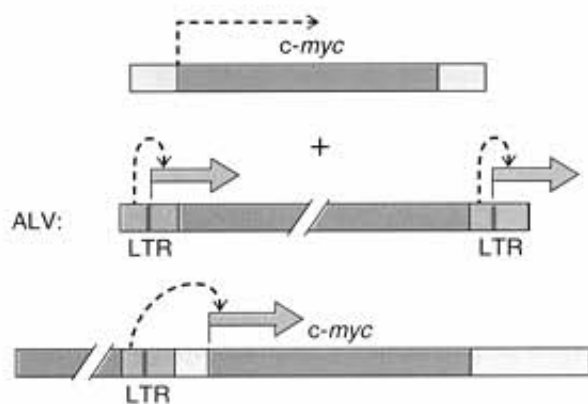
A mutáció a legkézenfekvőbb esemény, amelynek során a sejt protoonkogénje onkogénné alakul. Mivel a virális és celluláris onkogének nagyon hasonlítanak egymásra, nem nehéz elképzelni, hogy néhány megfelelő helyen bekövetkező mutáció transzformációt okoz. A **Ha-ras** onkogén esetében például egyetlen pontmutáció elegendő a protoonkogén átalakulásához.

A c-Ha-ras protoonkogén a Harvey-féle patkányszarkóma-vírus onkogénjének (v-Ha-ras) celluláris változata. Nézzük meg,



17.7. ábra. Intronokat tartalmazó celluláris onkogén intron nélküli virális onkogénné történő hipotetikus átalakulása.

Az onkogén nélküli provírus rekombinálódik a celluláris onkogénnel (*c-onc*), amely két intront (kék) tartalmaz. A rekombináns provírus transzkripciójával és a splicing révén olyan vírus-RNS keletkezik, amelyben megtalálható az onkogén kódoló szakasza (piros), de az intronok már nem. Az így elkészült RNS csomagolódik be a vírus fehérjeburkába



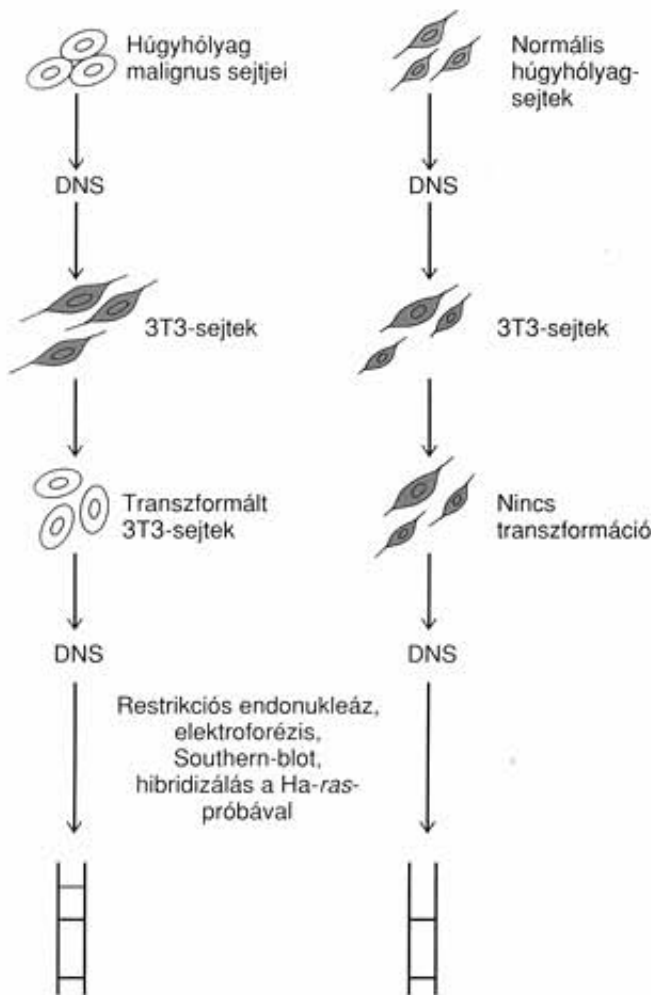
17.8. ábra. Celluláris protoonkogén aktiválódása a provírus beépülése miatt. A beékelődés előtt a celluláris onkogén (*c-myc*, kék) csak gyenge aktivitást mutat, ha egyáltalán sor kerül a transzkripcióra. A madárleukózis-vírus (ALV) provírusának beépülése után a *c-myc* transzkripciója nagymértékben fokozódik (--->), a provírus LTR szekvenciájában lévő enhancer (piros) hatására

milyen szerepet játszik ez a gén az emberi onkogenezisben. Michael Wigler és munkatársai kimutatták, hogy az emberi húgyhólyag karcinómasejtjeiben egy olyan onkogén található, amely képes transzformálni az NIH 3T3-sejteket. A tudóscsoport bejuttatta a 3T3-sejtekbe a rákos emberi sejtek DNS-ét. A 3T3-sejtek egérből származnak, halhatatlanok, és úgy tűnik, a transzformáltsági állapot határán egyensúlyoznak. A rákos sejtek DNS-e átlendítette őket ezen a határon, és átettek a transzformáción (17.9. ábra). A normális sejtek DNS-ének nincs transzformációs hatása.

Melyik gén rendelkezik transzformáló aktivitással? Robert Weinberg és munkatársai radioaktívan jelölt onkogéneket használtak próbaként az emberi húgyhólyag rákos sejteinek DNS-ével transzformált 3T3-sejtek DNS-fragmentjeinek Southern-blotjához (l. 15. fejezet). Kiderült, hogy a transzformált sejtekben egy olyan új DNS-fragmentum van, amely hiányzik a közösleges 3T3-sejtekből és reagál a *Ha-ras*-próbával (17.9. ábra). Ez azt jelenti, hogy az emberi karcinómasejtek DNS-e egy *Ha-ras* onkogént juttatott a 3T3-sejtekbe. Az is kiderült, hogy az újonnan bejuttatott gén aktív a transzformált sejtekben, mert az RNS-eik Northern-blotján van egy olyan RNS, amely a humán *Ha-ras*-próbával hibridizált, de a tipikus 3T3-sejtekben nem volt jelen.

Az egészséges sejtekkel szemben az emberi húgyhólyagrák sejteji tartalmaznak egy transzformáló ágenst, és úgy tűnik, hogy ez azonos a *Ha-ras* onkogénnel. Fontos volna tehát tudni, miben különbözik a normális sejtek ártalmatlan *Ha-ras* protoonkogénjétől. Mariano Barbacid és munkatársai az onkogén és a protoonkogén fragmentteket *in vitro* rekombinálták és a rekombináns génekkel próbálták transzformálni a 3T3-sejteket (17.10. ábra). Ezzel az eljárással egy 350 bázispárnyi hosszú, fontos régiót sikerült behatárolniuk. Ha ez a DNS-szakasz rákos sejt onkogénjéből származott, minden esetben transzformáló hatású volt, ha normális sejtből, akkor sosem. Egyetlen báziscsere, egy G → T transzverzió a különbség az onkogén és a protoonkogén között, tehát úgy tűnik, hogy ez az apró változás alakítja át a protoonkogént onkogénné.

A *Ha-ras* onkogén az ún. *ras* onkogén család tagja és egy 21 000 relatív molekulatömegű **p21** vagy **Ras** fehérjét kódol.



17.9. ábra. Az emberi húgyhólyagrák sejteinek a DNS-e transzformálóképességgel rendelkezik. A húgyhólyag malignus (balra), illetve egészséges sejteiből (jobbra) DNS-kivonatot készítettek, és azokat bejuttatták NIH 3T3-sejtekbe. Azok a sejtek, amelyekbe a rákos sejtek DNS-ét juttatták, transzformálódtak, a normális sejtek DNS-ét kapó sejtek azonban nem. Ezután mindkét sejtenyészetből kivonták a DNS-t, restrikciós endonukleázzal fragmentumokra hasították, a fragmentumokat elektroforézissel szétválasztották, Southern-blotot készítettek, és azokat radioaktív Ha-ras DNS-próbával hibridizálták. A kétféle DNS-ről készített lenyomaton két közös sávot találtak, amelyek NIH 3T3-sejtek endogén ras génjének feleltek meg. A transzformált sejtek esetében egy harmadik sáv (kék) is kimutatható volt. Ez a sáv az emberi Ha-ras génnek felelt meg, amely transzformálta a 3T3-sejteket

A $G \rightarrow T$ transzverzió következménye a húgyhólyag rákos sejteiben az, hogy a Ras láncába a 12. helyen glicin helyett valin épül be. Mikor történik ez a változás? Szomatikus mutációnak látszik, mert megjelenik például az emberi tüdő rákos sejteiben is, de ugyanannak a betegnek a légsövényben lévő egészséges sejtekben nem. Vajon egyedül ez a mutáció okozza a tüdőrákot? Ez nagyon kétséges, mert a rák kifejlődése évekig tartó, sok lépésből álló, összetett folyamat. A ras mutációja valószínűleg csak a folyamat egyik lépése.

Wigler, Weinberg és mások úttörő munkái óta a mutáns ras gént már többféle emberi tumorban megtalálták, így a vastagbélrákos esetek 40%-ában. Ezek a mutációk nem korlátozódnak a

12. aminosav tripletjére, de majdnem minden esetben a gén három régiójában fordulnak elő: a 12–16., az 59–63. vagy a 116–119. kodonokat érintik. A fejezetben még visszatérünk a Ras funkcióira és ezeknek a mutációknak a hatásaira.

Bizonyos emberi tumorsejtek tartalmazzák a ras onkogén család valamely tagját, amely képes az egér 3T3 sejtek transzformálására. A normális emberi DNS ezzel az aktivitással nem rendelkezik. Az először vizsgált tumorsejtek Ha-ras onkogénjei egyetlen bázisban szenvedtek mutációt. A génen egy $G \rightarrow T$ transzverzió mutatható ki a 12. aminosavat meghatározó tripletben, aminek következménye, hogy a fehérjébe glicin helyett valin épül be. Ez a változás okozza a protoonkogén \rightarrow onkogén átalakulást. Az emberi tumorsejtekben talált ras-mutációk zöme a gén három kisebb szakaszán lokalizálható.

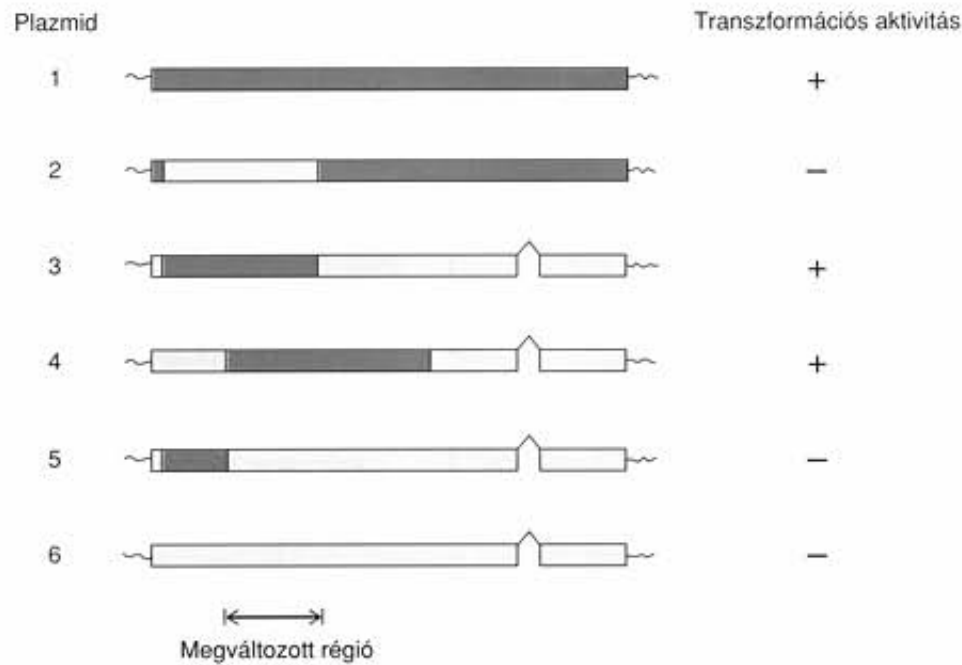
A protoonkogén transzlokációja

A protoonkogének megváltozásának egyik módja a pontmutáció, a másik a transzlokáció. Az egyik legtöbbet tanulmányozott protoonkogén \rightarrow onkogén átalakulás a *myc* protoonkogén transzlokációja a **Burkitt-limfoma** esetében. Ezekben a rákos sejtekben tipikus a 8;14 transzlokáció, különösen a 8. kromoszóma *myc* régiójának áthelyeződése a 14. kromoszómának arra területére, amelyen az ellenanyagok H-láncának génei lokalizálhatók (17.11. ábra).

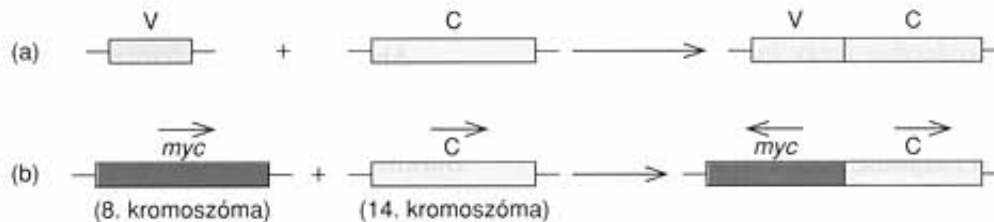
Ahogy a 14. fejezetben tárgyaltuk, az antitestek génei a differenciálódás során transzlokációban vesznek részt, amelynek során a variábilis régió a konstans régió mellé kerül. A Burkitt-limfoma 8;14 transzlokációjakor ez a folyamat hibásan játszódik le. A H-lánc konstans szakaszának kódja mellé a *myc* gén lép a variábilis régió helyébe. A folyamatban két dolog történik a *myc* génnel, ami megzavarhatja a normális funkciót. Először is elveszíti három exonja közül az elsőt. Ez a változás nem a képződő fehérjét, hanem a génműködés szabályozását érinti, mert az első exonban a szabályozó régió található. Másodsor, a gén a nagy aktivitású H-lánc génjének közelébe kerül, ami valószínűleg aktiváló hatást fejt ki a *myc* génre is. A Burkitt-limfoma esetén valóban kimutatható az aktivitás növekedése.

A *myc* génjének megváltozása nemcsak arra példa, hogy a transzlokáció miatt átalakulhat egy protoonkogén, hanem arra is, hogy aktiválódhat. És ez még nem minden. A transzlokálódott *myc* gén ugyanis kikerülhet a szabályozó mechanizmus hatása alól. Melyik játssza a három tényező közül a fontosabb szerepet a transzformációban? A válasz még nem ismert, lehetséges, hogy mindhárom egyformán fontos.

Mielőtt befejeznénk a Burkitt-limfoma tárgyalását, szót kell még ejtenünk az **Epstein-Barr-vírusról (EBV)**, amely a világszerte elterjedt fertőző mononukleózis okozza. Az amerikaiak 90%-a felnőtt koráig átesik a vírusfertőzésen anélkül, hogy tudomást szerezne róla. Közép-Afrikában azonban ez a vírus a gyer-



17.10. ábra. A *Ha-ras* onkogén és a protoonkogén közötti eltérés kimutatása. Az onkogént (piros) vagy a protoonkogént (sárga) tartalmazó klónozott plazmidokat hasították, és a darabjaikat *in vitro* különböző kombinációkban újra összekapcsolták, mint ahogyan az az ábrán is látható. Emellett négy plazmidban deléciókat is létrehoztak (Δ). Ezután megvizsgálták a rekombináns plazmidok transzformációs képességét. Az eredmény az ábra jobb oldalán látható. A deléció nyilvánvalóan nem befolyásolta a transzformációs aktivitást, mert a 3. és a 4. plazmidban is előfordult a deléció, mégis teljes transzformációs aktivitást mutattak. Mivel a 3. és a 4. plazmid transzformációra képes, az onkogénben kialakult megváltozásnak abban a régióban kell lennie, amely a két plazmid onkogén szakaszában átfedést mutat („megváltozott régió” – az ábra alján). A 2. és az 5. plazmiddal kapott eredmények megerősítik a következtetést, mert ezekben a kérdéses régiókban protoonkogén eredetű szakasz található, transzformációs képességük pedig nincs. A további vizsgálatok egyetlen bázisnyi eltérést mutattak ki ebben a szakaszban a protoonkogén és az onkogén között.



17.11. ábra. 8;14 transzlokáció a Burkitt-limfoma esetében, amely egy antitestgén rendellenes átrendeződésének következménye. (a) Az ellenanyagot kódoló gén átrendeződésének szabályos menete: a variábilis (V) és a konstans (C) régiókat kódoló szakaszok külön-külön egységekként helyezkednek el a kromoszómákon, és a rekombináció hozza őket egymás mellé a működő nehéz láncot kódoló gén kialakulásakor. Az egyszerűség kedvéért az ábrán az intronokat, a D és a J régiókat nem jelöltük. (b) Szabálytalan átrendeződés, amelyben a 8-as kromoszóma *myc* szakasza és a 14-es kromoszómának a nehéz lánc konstans régióját kódoló szakasza vesz részt. A *myc* gén az első exonja kivételével hozzákapszolóódik a nehéz lánc konstans régiójának egy részéhez, mégpedig úgy, hogy a két géndarab irányultsága fordított lesz.

mekek Burkitt-limfómájával van összefüggésben. Lehetséges, hogy a különbség a malária immunrendszerre kifejett hatásával kapcsolatos, amely betegség szintén endemikus Közép-Afrikában.

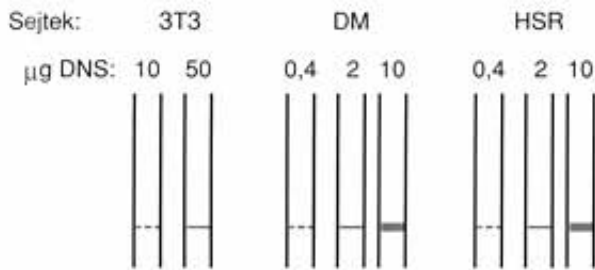
Egyes protoonkogének transzlokáció következtében alakulhatnak onkogénekké. A Burkitt-limfoma esetében a *myc* onkogén kerül át az antitest H-láncának régiója mellé. A folyamatban elvesz az első (nem kódoló) exon, a gén aktiválódik, és kiszabadul a normális szabályozás alól.

A protoonkogének aktiválása

Az eddigiekben két esettel foglalkoztunk, amelyben a malignus transzformáció a protoonkogén aktivizálódásával kapcsolatos: a madárleukózis-vírus erős promotor/enhancer régiója aktiválja a csirkék *myc* génjét; a Burkitt-limfómában szenvedőknél pedig transzlokáció következménye az aktiválódás. Bár további példák is ismertek, a jelenség nem általános. Sok rákos elváltozás a protoonkogének szembetűnő aktiválódása nélkül is kifejlődik.

A protoonkogének amplifikációja

Az **amplifikáció** az aktiválás speciális esete. Sok fehérje keletkezik, de ennek elsősorban nem a gén fokozott működése az oka.



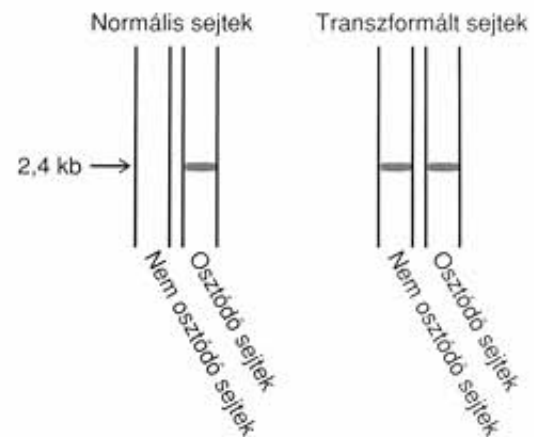
17.12. ábra. A *myc* amplifikációja daganatos sejtekben. Nem transzformált 3T3, dupla miniatűr kromoszómákat (DM), és homogén festődésű (HSR) régiókat tartalmazó sejtek különböző mennyiségű DNS-ét *EcoRI* enzimmel emésztették, a fragmenteket elektroforézissel szétválasztották, majd Southern-blotot készítettek. A lenyomatot radioaktív *Ki-ras* próbával hibridizáltatták, és autoradiográfiával vizsgálták. A DM és a HSR minták DNS-ei 60-szoros, illetve 30-szoros erősebb hibridizációt mutattak a *Ki-ras* próbával, ami jelzi, hogy az onkogén a tumorsejtekben megsokszorozódott.

Ehelyett újabb és újabb másolatok keletkeznek a génről (ez az amplifikáció), és a végén a szokásos két kópiánál jóval több lesz a sejtben. Ilyenkor a protoonkogén extra dózisa miatt termelődik több fehérje. Harold Varmus, Michael Bishop és munkatársaik több tumorvonalat vizsgáltak meg a génsokszorozódás jeleinek kimutatására. Az egyik ilyen jel lehet az ún. **dupla miniatűr kromoszómák (DM)** megjelenése. Ezek olyan kicsi méretű kromatintestecskék, amelyeken nincsen centromeron és megsokszorozódott DNS-kópiákat hordoznak. A **homogén festődésű régiók (HSR)** megjelenése a kromoszómákon ugyancsak ilyen folyamatot jelezhet. A szabályos sávozási mintázat helyett amorf, egyformán festődő zónák tűnnek fel, amelyekben a megsokszorozódott DNS lokalizálható.

Az első két olyan sejtvonalt, amelyekben az említett kutatók génamplifikációt mutattak ki, az egér mellékveséjének rákos sejtjeiből származtak. A sejtvonaltak jelzése Y1-DM (a kettős miniatűr kromoszómák jelenléte miatt) és Y1-HSR (homogén festődésű régiók miatt). Azt kutatták, vajon egy ismert onkogén sokszorozódott-e meg bennük. A *Ki-ras* gén 30-szoros és rokona, a *Ha-ras* 60-szoros amplifikációját mutatták ki. Először a két sejtvonalt DNS-éből különböző mennyiségeket hasítottak az *EcoRI* enzimmel, a fragmentumokat elektroforézissel elválasztották, Southern-blotot készítettek, majd a lenyomatot a *Ki-ras* próbájával hibridizáltatták. Az eredmény a 17.12. ábrán látható. A tumorsejtek DNS-e sokkal erősebb hibridizációt mutatott a próbával, mint a nem-transzformált 3T3-egéresejtek ugyanolyan mennyiségű DNS-e. A radioaktivitás mérésével állapították meg, hogy milyen mértékben sokszorozódott meg a *Ki-ras* gén a malignus sejtekben.

A protoonkogének szabályozásának megszűnése

Arthur Pardee, Gail Sonenshein és munkatársaik vizsgálták a *myc* gén működését normál és kémiai úton transzformált 3T3-sejteken. Nem találtak géntrendeződést, amplifikációt vagy túlműködést, viszont a gén nem válaszolt a normál szabályozási folyamatokra. Northern-blot segítségével (17.13. ábra) kimutatták, hogy a nyug-



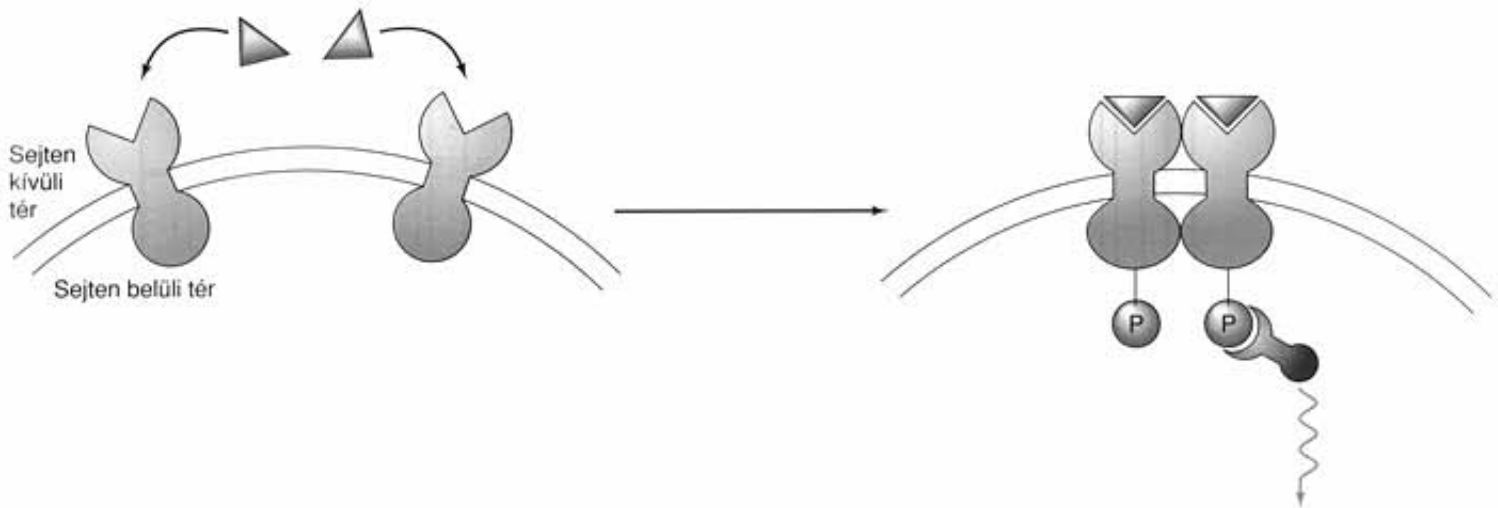
17.13. ábra. A transzformált sejtekben a *myc* szabályozása megszűnhet. Normál és kémiai úton transzformált, éppen osztódó, illetve nem osztódó sejtek RNS-eit elektroforézissel szétválasztották. A Northern-blotot radioaktív *myc* DNS-sel hibridizálták, és autoradiográfiával vizsgálták. Az éppen osztódó, de nem transzformált sejtekben jellegzetes, 2,4 kb méretű *myc* mRNS-t találtak, amely a nem transzformált, nyugalomban lévő sejtekből hiányzott. Vagyis a *myc* gén működése a nem transzformált sejtekben szabályozott. A kémiailag transzformált sejtekben ez a szabályozás megszűnt, a *myc* RNS termelődött, akár nyugalomban voltak a sejtek, akár osztódtak.

vó (nem osztódó) normális sejtekben a *myc* génről nem készül kimutatható mennyiségű RNS-másolat, míg a proliferáló (osztódó) normális sejtekben jelentős mennyiség található. A kémiai transzformálás után a 3T3-sejtek ugyanazt a *myc* RNS mennyiséget termelték nyugvó és proliferáló stádiumban is. Vagyis amikor a transzformált sejtek éppen nem szaporodtak, akkor sem kapcsolták ki a *myc* gént, ahogyan azt a normális sejtek teszik.

Onkogének vagy protoonkogének gyakran rendellenesen magas szinten aktiválódnak a rákos sejtekben. Néha ezek a gének még amplifikálódnak is, ami rendszerint az általuk kódolt fehérje túlermeléséhez vezet. A protoonkogéneket előkészítheti az onkogenezis folyamatára a génműködés szabályozásának meghibásodása is.

A PROTOONKOGÉNEK FUNKCIÓI

Néhány protoonkogén eredeti funkciójára bázisszekvenciájuk alapján következtethetünk. Gyakran szoros hasonlóság tárul fel egy protoonkogén és egy ismert funkciójú gén között, amiből sejthetjük, hogy a két gén funkciója is hasonló lehet. A legtöbb esetben a protoonkogének a sejtosztódás szabályozásában részt vevő gének. Ennek alapján könnyen belátható, hogy ezen gének mutációi miatt megszűnhet a sejt növekedés szabályozása, a sejt rákossá válhat. Az alábbiakban néhány példát vizsgálunk meg, amelyek négy kategóriába sorolhatók: (1) növekedési faktorok; (2) növekedési faktorok receptorai; (3) a jelátvitel elemei; (4) transzkripció faktorok.



17.14. ábra. Az EGF-működése. Az EGF molekulák (piros) a sejtmembránon (sárga) átérő EGF-receptorokhoz (kék) kötődnek. Amikor a növekedési faktor a receptordoménhez kapcsolódik, a két receptor egymás mellé rendeződik. Ezután a plazmamembrán belső oldalán az EGF-receptorok protein-tirozin-kináz doménjei aktiválódnak és foszforilálják egymást. Ennek hatására egy átvivő molekula (lila) kapcsolódik a foszforilált doménhez, és sejtosztódásra készítő jelet küld a sejt belsejébe

AZ ONKOGÉNEK TERMÉKEI ÉS A NÖVEKEDÉSI FAKTOROK

A rákos sejtcsoport legszembevetőbb sajátossága a növekedés. A sejtek szinte szünet nélkül osztódnak, mintha még megfelelő körülmények hiányában is állandóan osztódásra készítő jeleket kapnának. Az egészséges sejtek csak akkor osztódnak, ha ténylegesen jelzést kapnak rá. Ilyen jelzés lehet például egy növekedési faktor.

Rita Levi-Montalcini és Stanley Cohen közösen kaptak Nobel-díjat 1986-ban az első növekedési faktor, az **idegi növekedési faktor (NGF)** felfedezéséért és jellemzéséért. A vizsgálatokat az 1950-es években végezték. (Stanley Cohen nem azonos azzal a tudóssal, aki az első génklónozásban részt vett.) Amint a növekedési faktor neve mutatja, az NGF az idegsejtek növekedését serkenti. Két rokon fehérje, a **vérelemzke-eredetű növekedési faktor (PDGF)** és az **epidermális növekedési faktor (EGF)**, hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek. Mindkettő specifikus receptorfehérjékhez kötődik a sejtek felszínén, majd hatásukat a receptor továbbítja a sejt belsejébe.

Cohen és munkatársai kimutatták, hogy az EGF receptora átéri a sejtmembránt, ahogy a 17.14. ábrán látható. A kifelé türemkedő fehérjerész köti meg a növekedési faktort, amely aktiválja a fehérje másik, citoplazmával érintkező részét. Az aktivált belső domén protein-kináz-aktivitást mutat, vagyis foszfátcsoportot visz át ATP-ről fehérjére. A legtöbb protein-kináz a fehérjék szerin vagy treonin aminosavait foszforilálja, az EGF viszont szokatlan módon a tirozint.

A fentiek fényében érdekes, hogy a **sis** onkogén olyan fehérjét kódol, amely erősen emlékeztet a PDGF-re, az **erb-B** onkogén által kódolt fehérje pedig az EGF-receptor protein-tirozin-kináz részére hasonlít. A két onkogén működési mechanizmusára vonatkozóan két tetszetős elmélet adódik. Az a sejt, amelyik túl sok **c-sis** által meghatározott fehérjét termel, vagy nem a megfelelő időben termeli a fehérjét, *saját magát* készíti mértéktelen osztó-

dásra. Az a sejt, amely túltermeli, illetve rosszul termeli az **erb-B** által kódolt fehérjét, csonka receptort épít a membránjába. Erről a receptorról hiányzik a növekedési faktort megkötő rész, de úgy viselkedik, mintha állandóan össze volna kapcsolódva a növekedési faktorról, és emiatt állandóan osztódási jelet küld a sejt belsejébe.

A növekedési faktorok osztódásra készítik a sejteket. A sejtmembrán receptoraihoz kötődnek, és ezzel a receptorfehérjék citoplazmatikus oldalán protein-tirozin-kináz aktivitását váltják ki. A **sis** onkogén erősen emlékeztet a PDGF génjére, az **erb-B** onkogén pedig az EGF tirozin-kináz doménját kódoló DNS-régióra. Ez a hasonlóság adhat magyarázatot arra, hogyan okozhatják az onkogének által kódolt fehérjék a sejtek kontrollálatlan osztódását.

A **c-src** PROTEIN-TIROZIN-KINÁZT KÓDOL

Az **src** a sejtes megfelelővel rendelkező virális onkogén klasszikus példája. Mind a **v-src**, mind a **c-src** protein-kinázt kódol. Honnan tudjuk ezt? Az első bizonyíték genetikai volt. Egyes Rous-szarkóma-vírusok mutánsai transzformációra képtelenek, tehát **src** génjük biztosan mutáns. A mutánsokból hiányzik a tirozin-kináz-aktivitás is. Még meggyőzőbb a hőre érzékeny mutánsok esete. A mutánsok transzformálóképessége és tirozin-kináz-aktivitása egyszerre szűnik meg a hőmérséklet emelkedésével, ami arra utal, hogy ugyanaz a gén felelős a két aktivitásért. Mivel bizonyított tény, hogy a transzformálóképességért az **src** gén felelős, ebből az következik, hogy a tirozin-kináz-aktivitásért is.

A tirozin-kináz célpontja az **src** gén által kódolt fehérje egy foszfoprotein, a **pp60^{src}**, amely 60 000-res relatív molekulatömegű foszfoproteinjének (pp) alapján kapta a nevét. A

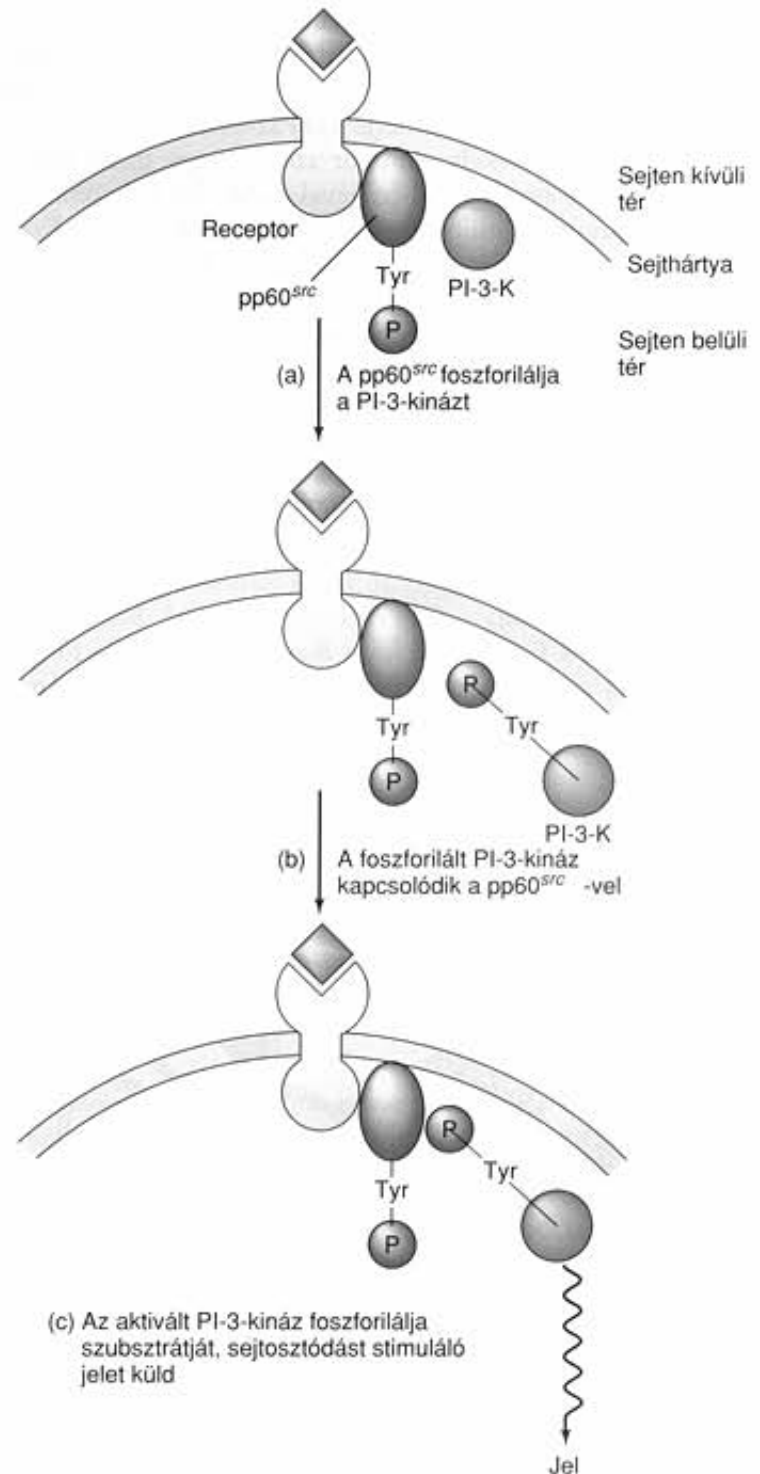
pp60^{src} vad típusa (pontosabban a pp60^{c-src}) a membrán belső oldalához kapcsolódó fehérje, amely érintkezik a citoplazmával. Minthogy nem ér át a membránon, közvetlenül nem reagálhat a sejt külső felszínéhez érkező növekedési faktorokra, de kapcsolatban áll a transzmembrán-receptorfehérjékkel, amelyek felfogják a sejt külső jeleket (17.15. ábra). A receptor megköti ligandumát a sejt külső felszínén, ennek hatására foszforilálódik a membrán belső felszínénél a pp60^{src}. Ez aktiválja a pp60^{src}-t, hogy az foszforilálja a szubsztrátját. Nem tudjuk még, hogy milyen szubsztrátok fontosak a sejt transzformálásában, de a legvalószínűbb jelölt egy enzim, a **foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-K)**, amely szorosan kötődik a pp60^{src}-hez (17.15. ábra). Az enzim feladata foszfátcsoport rákapcsolása egy lipidmolekulára, a foszfatidil-inozitolra (PI). A foszforilációt követően a PI kisebb molekulákra bomlik, amelyek a sejtet többféle működésre, köztük sejtosztódásra serkentik. Tehát az *src* protoonkogén mutációja onkogén formához vezethet, amelynek következtében túl sok PI-3-K foszforilálódik, vagy nem megfelelő időben aktiválódik az enzim. A PI-3-K rendellenes aktivitásnövekedése indíthatja el az abnormális sejtosztódáshoz vezető események láncolatát.

A celluláris *src* gén a pp60^{src} foszfoproteint kódolja, amely a protein-tirozin-kináz. Az enzim célpontját még nem azonosították, de feltehetően a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-kináz). Amikor ez az enzim foszforilálással aktiválódik foszforilálja a foszfatidil-inozitol (PI), amely a sejtet működésének megváltoztatására, például gyorsabb osztódásra serkenti.

A c-Ha-ras GÉN EGY G FEHÉRJÉT KÓDOL

Az előzőekben tárgyaltuk, hogy a *Ha-ras* protoonkogén átalakulása onkogénné egyetlen bázis pontmutációjával megtörténhet, és a mutáció következtében a polipeptidláncba glicin helyett valin épül be. Miért olyan fontos ez az egyetlen báziscsere? A választ a *Ha-ras* szekvenciája adja meg, amely a Ras fehérjét kódolja. A Ras aminosavsorrendje nagyon hasonlít az ún. **G fehérjék** osztályának tagjaihoz.

A G fehérjék GTP megkötése után válnak működőképesé. GTPáz-aktivitásuk is van, tehát a GTP-t GDP-vé hidrolizálják, amikor inaktíválódnak egy következő GTP megkötéséig. G fehérjék funkciója nagyon változatos. Egyesek a sejtmembránban található és hormonokra vagy egyéb hatóanyagokra reagálnak. A G fehérjék a jelhordozók, GTP hatására aktiválódnak, és a sejtet meghatározott működésre késztesztetik. Más csoportjuk fényre reagál, és a fényjelet kémiai jelzéssé alakítja. A G fehérjékhez hasonló jellemzőkkel rendelkezik az EF-Tu, az eukarióták fehérjeszintézisében szereplő faktor is. Az EF-Tu fehérje GTP-t köt, majd az amino-acil-tRNS-hez kötődik, és azt a riboszómához szállítja, ahol az aminosav beépül a növekvő fehérjeláncba (l. 10. fejezet).

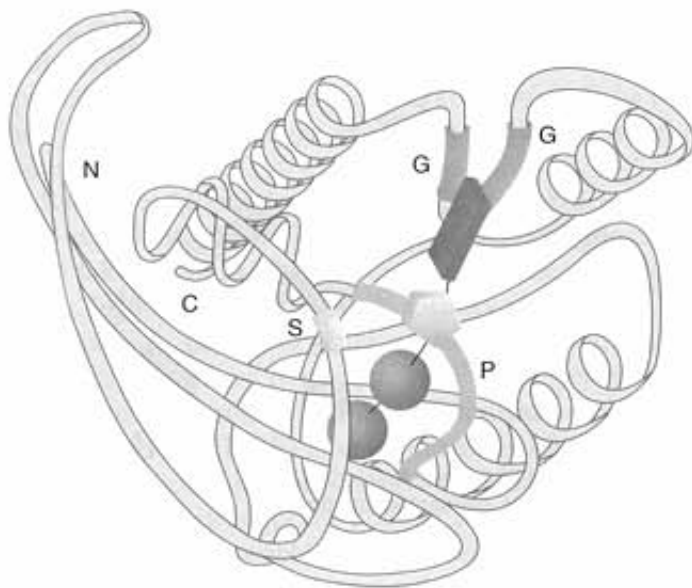


17.15. ábra. Az *src* onkogén feltételezett működése.

(a) Az *src* gén kódolja a pp60^{src} foszfoproteint, amely a membrán belső felszínéhez és a transzmembrán receptorfehérjéhez kapcsolódik. Amikor a ligandum kötődik a receptorhoz, egy protein-tirozin-kináz foszforilálja és egyben aktiválja a pp60^{src}-t. Az aktiválódott pp60^{src} a célmolekulát foszforilálja. A reakcióban az ATP a foszfátdonor és nem a fehérje saját foszfátcsoportja.

A beindult foszforilációs reakciósorozat generálja a sejtosztódást. A pp60^{src} egyik lehetséges célmolekulája a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-K), amely az ábrán foszforilált állapotban szerepel. (b) A PI-3-K ezután összekapcsolódik a pp60^{src}-vel. (c) A kapcsolódás aktiválja a PI-3-K-t, hogy foszforilálja saját szubsztrátját, ami sejtosztódás fokozódásához vezető reakcióláncolatot indít el.

A normál emberi Ras háromdimenziós szerkezetét röntgenkristallográfiás eljárással derítették fel. Felépítését a hozzákapcsolódó GDP-vel együtt a 17.16. ábrán tanulmányozhatjuk. Bár a legtöbb G fehérje GTPáz-aktivitása jelentős, a vad típusú Rasé csekély. Amikor azonban egy másik fehérjével, a GTPáz-aktivátor fehérjéjével (GAP) lép kölcsönhatásba, az aktivitás körülbelül 20-szorosára fokozódik. Ezzel szemben a mutáns Ras GTPáz-aktivitását a GAP nem stimulálja, tehát az onkogén által kódolt fehérje elveszíti GTPáz-aktivitásának nagyobb részét. Mindezek alapján feltételezték, hogy a GTPáz enzim aktív centruma (a GTP vagy GDP kötőhely) a mutációval megváltozott aminosavak közelében van. A feltevés tökéletesen beigazolódott. Emlékezzünk vissza arra, hogy a mutáns Ras fehérjén a legtöbb aminosavcsere a 12–16. pozíció között történt (a 17.16. ábrán narancsszínnel kiemelt rész). Ez a régió hurkot képez a GDP (vagy GTP) foszfátja körül, így nem csoda, ha az aminosavsorrend megváltozása befolyásolja a GTP-vel való reakciót. Minthogy a GTP serkenti a G fehérjék, így a Ras aktivitását, ha a fehérje nem képes a GTP-t eltávolítani, akkor az aktivált állapot fennmarad. A malignus transzformáció okának felderítésében a Ras szerepének tisztázása kulcsfontosságú.



17.16. ábra. A ras protoonkogén által kódolt fehérje és a GDP kölcsönhatása. A fehérjemolekula (világoskék) kapcsolatba lép a GDP-vel (sötétlila, sárga és narancssárga színek). A sötétlila hasáb a guanin, a sárga ötszög a ribóz, a narancssárga gömbök pedig a foszfátcsoportok. A GDP különböző részeivel kölcsönhatásba lépő fehérjedoménok a szalagon látható színes mandzsetták, melyek színei követik a GDP alkotórészeinek színezését. A világoslila mandzsetták (G) a guaninnal, a sárga (S) a ribózzal, a narancssárga pedig (P) a foszfátcsoportokkal kötést létesítő fehérjerészeket ábrázolják. A fehérje P doménje a 12-es pozícióban glicint tartalmaz, tehát ez az aminosav kritikus helyen, a nukleotid foszfátjaihoz közel helyezkedik el. Az N és a C a fehérjelánc N- és C-terminális végeit jelöli

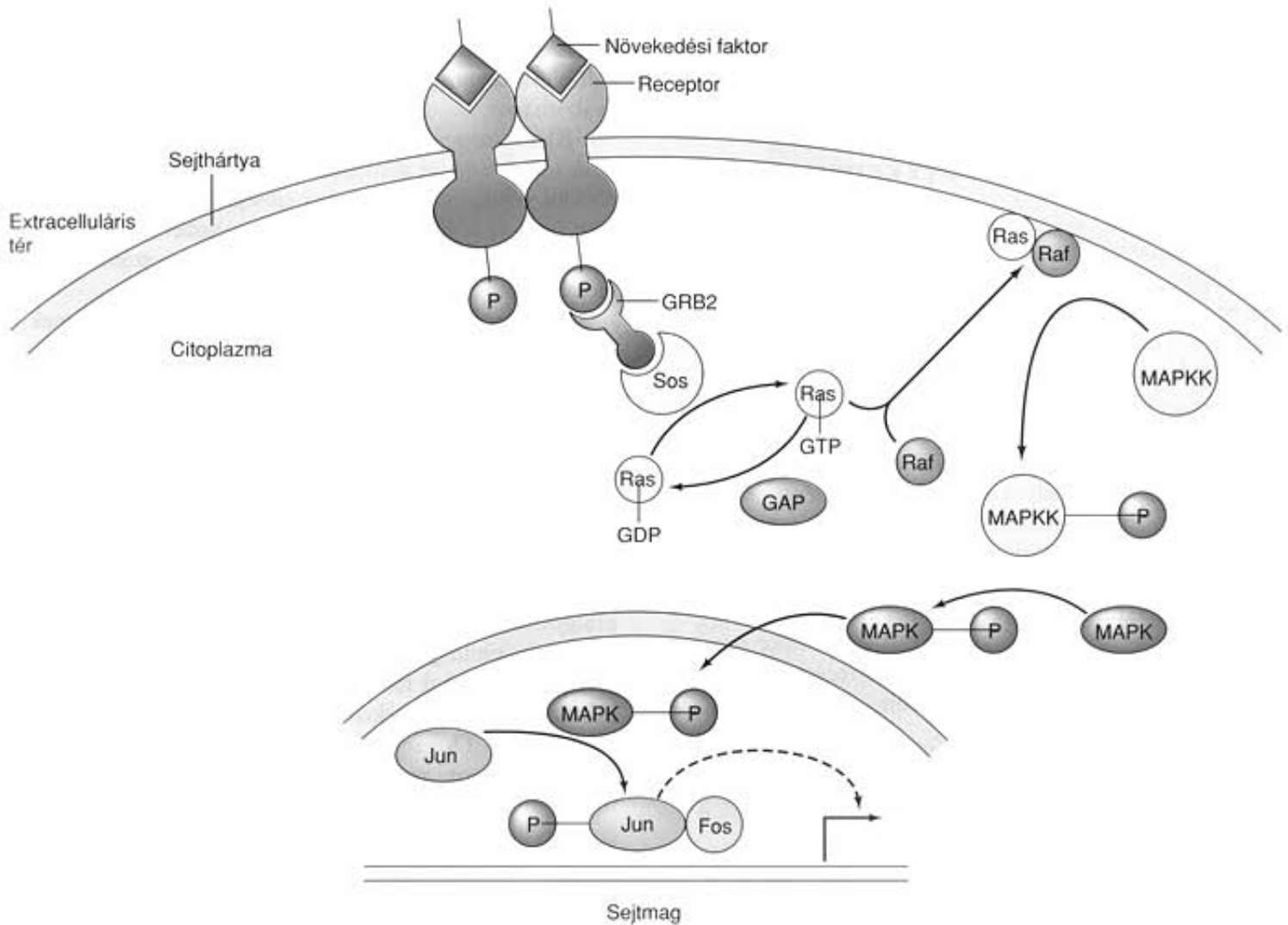
L. Tong és mtsai: Science: 245:244, 1989; © az AAAS és Sung-Hou Kim, a University of California-Berkeley professzora engedélyével

Ma már sokat tudunk a Ras fehérjéről. Annak az összetett jelátviteli rendszernek az egyik eleme, amely a jelzést a sejtmembrántól a sejtmagba szállítja és hatása a sejtosztódás fokozódásában nyilvánul meg. Lényegében ugyanarról a jelátviteli útról (*sevenless*) van szó, amelyet a 14. fejezetben taglaltunk a *Drosophila* fotoreceptorának differenciálódása kapcsán. A 17.17. ábrán a jelátviteli rendszer sémája látható *Drosophila*-gének helyett az emlősök génjeinek elnevezéseivel. A Ras sok jelátviteli útvonal közös eleme. Közülük legjobban a sejtmembrán növekedési receptorától kiinduló utat ismerjük. Az epidermális növekedési faktor (EGF) a receptor extracelluláris részéhez kötődik (17.17. ábra). Ennek hatására két szomszédos receptor dimert képez, és kiváltja, hogy a receptor sejten belüli tirozin-kináz doménjei foszforilálják egymást. Amikor a receptorok foszforilálódtak, a foszfortirozinok olyan fehérjéket vonzanak magukhoz, amelyekben speciális foszfortirozin-kötő elemek, ún. **SH2** domének vannak. Ilyen fehérje például a **GRB-2**. Az SH2 néven az SH az „Src-vel homológ” kifejezés rövidítése, mert ilyen domén található a pp60^{src} fehérjében is. A GRB-2 másik jellegzetes része az **SH3 domén** (szintén megtalálható a pp60^{src}-ben), amely az ún. **Sos** fehérjét köti meg. Az Sos fehérje egy speciális Ras „cserélő”. Nevét onnan kapta, hogy a Ras fehérjén a GTP-t GDP-re cseréli, ezzel aktiválja. Az aktivált Ras képes arra, hogy egy másik fehérjét (**Raf**) a sejtmembrán belső felszínéhez kössön, ahol az egy ismeretlen mechanizmus hatására aktiválódik. A Raf szintén protein-kináz, de nem tirozint, hanem szerint és treonint foszforilál. A Raf célfehérjéje ugyancsak egy protein-szerin-kináz, a **MEK**. A MEK egy fehérjecsoportot foszforilál, amelyeknek összefoglaló neve **MAP-kináz (MAPK)**. A MAP jelentése „mitogénaktivált protein”. A csoport két tagja a Jun és a Fos fehérje, amelyeket a *jun* és a *fos* gének kódolnak. A foszforiláció hatására a Jun fehérje hozzákapcsolódik a Fos fehérjéhez és együtt alkotják az AP-1 transzkripciós faktort. Ez a transzkripciós faktor olyan gének átírását serkenti, amelyek termékei elősegítik a sejtosztódást.

Tehát a jelátviteli mechanizmus egy sejtfelszíni receptorhoz kötődő növekedési faktorról indul, és a sejtosztódást elősegítő gének fokozott transzkripciójával végződik. A folyamat az alábbi módon foglalható össze:

növekedési faktor → receptor → Grb-2 → Sos →
 Ras → Raf → Mek → MAP-kináz →
 transzkripciós faktor → fokozott transzkripció →
 több sejtosztódás

A folyamat áttekintése után könnyen belátható, hogy a jelátviteli rendszer sok más elemének a génjei is protoonkogének. A fehérjék túlermelése vagy aktivitásuk fokozódása az egész rendszer működését felgyorsíthatja, ami fokozott sejtosztódáshoz, végső soron pedig rák kialakulásához vezethet. Hangsúlyoznunk kell, hogy a fenti reakciósorozat csak az egyik Ras érintő jelátviteli lánc. Valójában a reakcióút több ponton elágazik, hálózatot alkot.



17.17. ábra. A Ras jelátviteli lánc. A jelátvitel akkor kezdődik, amikor egy növekedési faktor vagy más extracelluláris szignál molekula (piros) a receptorához (kék) kötődik. Ebben az esetben a receptor a ligandum kötődésének hatására dimerizálódik. A receptorok intracelluláris proteintirozin-kináz doménjei foszforilálják egymást. Az új foszfortirozinokat egy adapter molekula, a GRB2 (sötétzöld) ismeri fel, amely ezután a Ras-cserélő Sos fehérjéhez kapcsolódik. Az Sos (zöldesbarna) aktiválódik, a Ras-on lévő GDP-t GTP-re cseréli, és ezzel aktiválja a Ras-t (sárga). A Ras a sejtmembránhoz szállítja a Raf fehérjét (lila), ahol annak a protein-szerin/treonin-kináz doménje aktiválódni tud. Ez az aktív Raf a MAP-kináz kináz-t (MAPKK, sötétsárga) foszforilálja. A MAPKK célmolekulája a MAP-kináz (MAPK, ciklámenszín), a MAPK pedig a sejtmag Jun (világoszöld) fehérjét foszforilálja. A Jun transzkripció faktor, amely összekapcsolódik a Fos (szürke) transzkripció faktorral, és együtt képezik az AP-1 transzkripció faktort. Az AP-1 által stimulált gének a sejtosztódást serkentik

A *c-Ha-ras* gén egy G fehérjét kódol, a p21-et, más néven Ras-t. Ez GTP-t köt meg, és ezután egy protein-kinázt, a Raf-ot a sejtmembrán belső felszínéhez szállítja. Itt a Raf aktiválódik és továbbadja a jelet más fehérjéknek, ami végül a sejtosztódást serkentő gének transzkripcióját aktiválja a sejtmagban. Végül a Ras-t inaktíváló enzim, a GAP segíti a GTP hidrolízisét GDP-re, és ezzel leállítja a Ras működését. A protoonkogén onkogénné alakulásához egy kulcsfontosságú pozícióban lévő aminosav szubsztitúciója vezet, ami a p21 GTP kötőhelyének közelében van. A mutáció valószínűleg a GAP által stimulált GTPáz-aktivitás csökkenését okozza, aminek következményeként a Ras aktivált állapota a normálisnál hosszabb ideig fennmarad. Ilyen módon a sejt elveszítheti a sejtosztódás kontrollját.

AZ ONKOGÉNEK TERMÉKEI MINT TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK

Annak alapján, hogy a transzformáció a génműködés megváltozásával jár, azt várnánk, hogy az onkogének szabályozó fehérjéket kódolnak, amelyek a géneket be- és kikapcsolják a sejtmagban. Ehhez képest a legtöbb eddig tárgyalt és legjobban ismert onkogén által kódolt fehérje a sejtmagon kívül működik, főként a sejtmembránban. Vannak azonban magfehérjéket kódoló onkogének is. Közülük legrészletesebben a *myc* onkogént vizsgálták, amelynek transzlokációja, amplifikációja, szabályozási hibája, illetve túlműködése egy sor emberi ráksejtnél megfigyelhető. Ma már világos, hogy a *myc* gén terméke, a Myc-fehérje transzkripció faktor.

Az előzőekben láttuk, hogy két másik protoonkogén, a *c-fos* és a *c-jun* is transzkripció faktorokat kódol. Termékeik, a Fos és

a Jun ún. leucin-cipzár fehérjék, amelyek dimert képeznek, és együttesen az AP-1 enhancer-kötőfehérjét alkotják. Ez a transzkripció faktor sokféle gént aktivál, közöttük néhány olyat is, amelyek a sejtosztódást stimulálják.

AZ ONKOGENÉK ÉS A NÖVEKEDÉS SZABÁLYOZÁSA

Az eddig tárgyaltakból látható, hogy az onkogének által kódolt fehérjék négy csoportba sorolhatók, és végső soron mindegyikük valamilyen kapcsolatban állhat a növekedés szabályozásával:

1. Növekedési faktorok, mint például a *sis* gén terméke.
2. Növekedési faktorok receptorai, mint az *erb-B* gén fehérjéje.
3. A növekedési faktorok receptoraival együttműködő jelátvivő fehérjék, amelyek a növekedést serkentő jel célba juttatásában segítenek. Az *src* által kódolt fehérje például egy protein-tirozín-kináz, amelynek nincsen extracelluláris doménje. Valószínűleg egy olyan növekedési faktor receptorával kooperál, amelynek nincs saját protein-tirozín-kináz aktivitása. A *ras* terméke egy G fehérje, amely valószínűleg sejt felszíni receptorral áll kapcsolatban és osztódási jelet továbbít.
4. Transzkripció faktorok, mint a *fos* és a *jun* fehérjéi, amelyek géneket aktiválnak a növekedési faktor serkentésének hatására.

A négy csoport négy lépést képvisel azon a jelátviteli úton, amely a sejt felszínétől a sejtmagig tart, vagyis a növekedési faktor stimuláló lépésétől azoknak a géneknek a működéséig, amelyek kiváltják a sejt osztódását. Nem szorul magyarázatra annak fontossága, hogy ez a pálya normálisan működik a sejtekben. Bármely pontján következhet be változás, az eredmény a sejtosztódás túlzott serkentése lehet, ami rákhoz vezethet.

A TUMORSZUPPRESSZOR GÉNEK

Mivel az onkogének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek aktívan részt vesznek a sejt transzformációjában, azt várnánk, hogy a malignus transzformáció domináns tulajdonság. A sejtfúziós kísérletek azonban kimutatták, hogy rendszerint nem ez a helyzet, ezért a rákos állapotról sokkal összetettebb módon kell gondolkodnunk. Különösen annak ismeretében, hogy a géneknek van egy csoportjuk, a **tumorszuppresszor gének**, amelyek kordában tartják a sejtosztódást. Ezen gének mutációit számos tumor esetében kimutatták, így fontos szerepük van a rák kialakulásában.

A TESTI SEJTEK GENETIKÁJA

Sokféle sejt tenyészthető laboratóriumban, közöttük a legtöbb rákos sejt is. Számos sejt fuzionálhat egy másikkal, ami új genetikai kombinációkat eredményez (l. 5. fejezet). A sejtfúzió ter-

mészetes körülmények között ritka jelenség. Ahhoz, hogy jelentős számú fuzionált sejtet kapjunk, mesterséges eljárásokat kell alkalmaznunk, amelyek nagymértékben növelik a fúziós gyakoriságot.

Klasszikus sejtfúziós módszer a Sendai-vírus alkalmazása. A vírus membránja az állati sejtekéhez hasonló, ezért képes összeolvadni velük, és ilyen módon elősegíteni a sejtek egymás közötti fúzióját is. Egy másik technika a polietilén-glikol felhasználása, amely valószínűleg egymáshoz ragasztja a szomszédos sejtek membránját, s ezzel elősegíti a fúziót.

A fuzionáló sejtek genetikailag jelentősen eltérhetnek egymástól, például egér- és emberi sejteket is fúzióra lehet készíteni. A fúzió után a sejtmagok elkülönülten maradnak, ezért az ilyen sejteket **heterokarionoknak** nevezzük. Egy idő után rendszerint a sejtmagok is egyesülnek, és a heterokarionokból **hibrid** sejtek jönnek létre. Az egér-ember hibrid sejtek genetikailag instabilak. A sejtosztódások során elveszítik kromoszómáikat, és általában nem az egér-, hanem az emberi kromoszómákat.

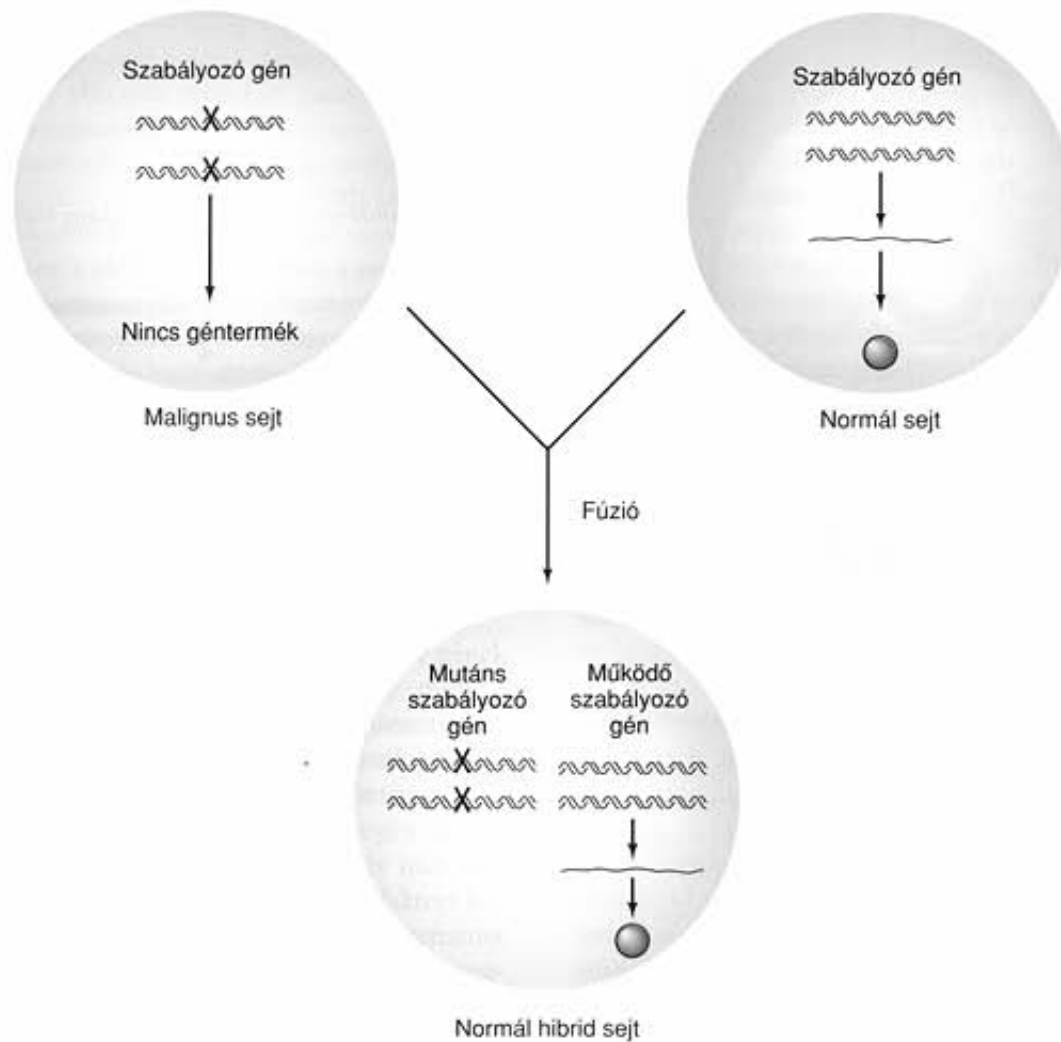
Egy bizonyos emberi kromoszóma fennmaradásáról úgy bizonyosodhatunk meg, ha a hibrid sejteket kizárólag az emberi kromoszómán lokalizálható tulajdonságra szelektáljuk. Ha például aktív timidin-kináz gént (TK^+) hordozó emberi sejteket olyan egérsejtekkel fuzionáltatunk, amelyekből a kérdéses gén hiányzik (TK^-), a sejteket pedig **HAT-táptalajon** növesztjük, akkor csak a TK^+ sejtek növekednek. A szelekció eredménye olyan hibrid sejt, amelyik mindegyik egérkromoszómát tartalmazza, és legalább az egyik emberi kromoszómát, amelyik a TK gént hordozza.

Hasonló módszerekkel olyan hibrid sejtvonalsorozatokat konstruáltak, amelyek mindegyike más-más emberi kromoszómát vagy kromoszómacsoportot tartalmazott. Ezek a sejtvonalak DNS-hibridizációs eljárásokkal kombinálva jól használhatók emberi gének kromoszómális lokalizációjának megállapítására (l. 5. és 15. fejezet).

A MALIGNUS FENOTÍPUS MINT RECESSZÍV TULAJDONSÁG

Képzelnünk el egy olyan sejtfúziós kísérletet, amelyikben malignus transzformáción átesett sejtet normális sejtrel fuzionáltatunk. A heterokarion malignus lesz-e vagy normál? Ha egy onkogén, mint például a *myc*, vagy a *ras* felelős a malignus fenotípusért, azt várnánk, hogy domináns a hibrid sejtben. Ezek az onkogének ugyan rendszerint valamilyen mutációt szenvednek a rákos sejtekben (transzlokáció, illetve báziscsere történik), és a megváltozott gének jelen vannak a heterokarionban.

Meglepő módon azonban a malignus és normál sejt hibridje általában szabályos: a malignus jelleg nem jut érvényre, vagyis recesszív bélyegként viselkedik. A jelenség legegyszerűbb magyarázata az, ha feltételezzük egy szabályozó tumorszuppresszor gén jelenlétét, amely normális esetben ellenőrzése alatt tartja a sejtosztódást. A szabályozó gén termékének hiányában a tumorsejt korlátlanul szaporodik (17.18. ábra). A sejtfúzióban szereplő normál sejtben megtalálható a működőképes tumorszuppresszor gén, amely szabályozza a hibrid sejt osztódását is.



17.18. ábra. A malignus transzformáció sejt-fúziós kísérletekben tapasztalt recesszív viselkedésének hipotézise. A malignus sejtben (bal felső) két mutáns szabályozó gén van, ezért nem termel sejtosztódást szabályozó anyagokat. A normál sejt (jobb felső) működő szabályozó génei által kódolt fehérjék (piros) szabályozzák a sejtosztódást, és ezzel megelőzik a transzformációt. A fúzió során a mutáns és a vad típusú gének közös hibrid sejtbe kerülnek. Mivel a normális sejtől származó két regulátor gén működőképes, elegendő sejtosztódást szabályozó anyag termelődik. Ennek következtében a hibrid sejt normál sejtnek viselkedik.

A rákos és ép sejtek fúziójából keletkező hibrid sejtek rendszerint normális működésűek. A magyarázat valószínűleg az, hogy az ép fúziós partner tartalmaz egy működő tumorszuppresszor gént, amely hiányzik a rákos sejtől. Ez a regulátor gén kontrollálja a sejtosztódást, ezért a hibrid sejtek is szabályosan viselkednek.

A RETINOBLASZTÓMA GÉNJE

Egyes családokban megfigyelhető bizonyos típusú rák-betegségek halmozódása. Amennyiben a betegségre való hajlam örökletes, majdnem mindig domináns jellegűnek bizonyul. Jó példa erre a szem ideghártyájának (retina) örökletes tumora, a **retinoblasztóma** (17.19. ábra). Általában nem maga a retinoblasztóma öröklődik, hanem a kialakulására való hajlam.

Az érintett családok genetikai vizsgálata alapján a következő hipotézist állították fel (17.20. ábra): egy egyed testi sejtjei diploidok, tehát sejtjeikben a **retinoblasztóma-gén** (*RB*) két példányban van jelen. A gén olyan szabályozó anyagot kódol, amelyik ellenőrzés alatt tartja a retinoblasztómát okozó sejteket. Ha az allélok egyike mutáció miatt később károsodik, a másik még képes a betegség megelőzéséhez elegendő szabályozó anyagot termelni. Ha azonban valaki egy ép és egy mutáns génkópiát örököl, esélye van arra, hogy működő génje is mutáción esik át az egyik retinasejtjében, és így kialakul a betegség. A mutáció szinte mindig bekövetkezik a negyedik-ötödik életévre, de ritkán végzetes kimenetelű és a hordozók általában megérik az ivarérett kort. Érdekes módon az érintett személyek kamaszkorukban egy, a csontokat érintő rákos elváltozásra, az **oszteosarkómára** is hajlamosak.

Amennyiben a hipotézis helyes, lehetőség van a retinoblasztóma gén lokalizálására és az érintett személyekben a mutáns



17.19. ábra. A retinoblasztóma

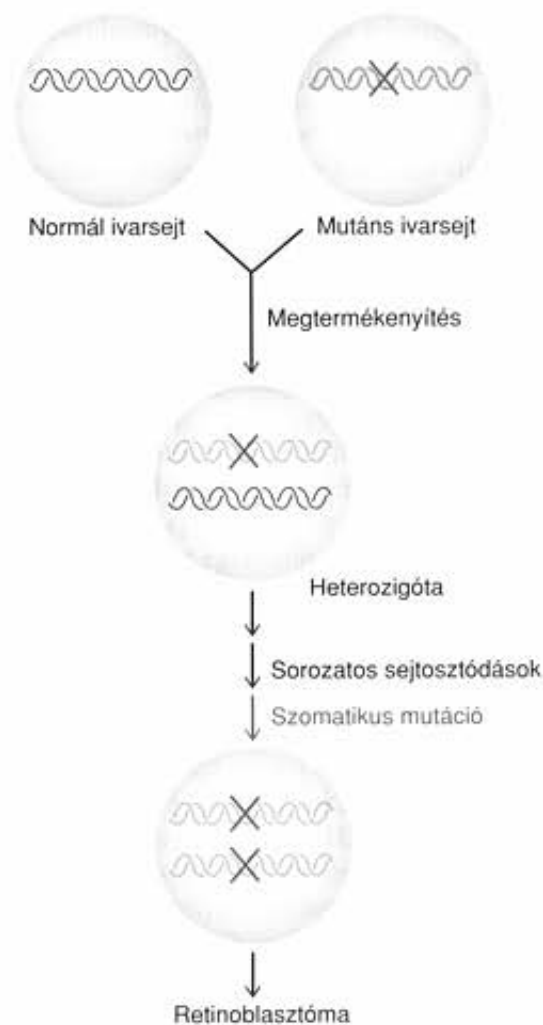
T. Dryja, Massachusetts Eye and Ear Infirmary

allél kimutatására. Mindezt sikerült is megvalósítani. A vizsgálatok során először a kapcsoltságot mutatták ki a retinoblasztóma génje és egy enzim, az észteráz D-génje között azokkal a géntérképezési eljárásokkal, amelyeket az 5. és a 16. fejezetben tárgyaltunk. Mindkét gén a 13. kromoszómán található, a q14 sávban. Később igazolták, hogy majdnem minden retinoblasztómás betegben mutáció történt, amely látható változást okoz a 13. kromoszóma q14 sávjában.

A régió DNS-ének klónozásával és fizikai térképezésével találtak egy olyan szegmentumot, amely az ember- és az egérsejtek klónozásakor stabilan megmaradt. Ez arra engedett következtetni, hogy a szegmentum DNS-e fehérjét kódol. Ha a régió valóban az *RB*-gén, és a beteg emberek esetében deléciós vagy erősen megváltozott formában található meg, akkor várhatóan nem kerül transzkripcióra a retinoblasztómás sejtekben, míg az egészséges sejtekben átíródik. A normál sejtekből sikerült is kimutatni olyan RNS-t, amelyik hibridizált a feltételezett *RB*-szekvenciával, míg a retinoblasztómás sejtekben és legalább egy oszteoszarkóma sejtvonalban ilyen RNS nem volt. Ennek alapján úgy tűnik, hogy valóban a retinoblasztóma-gént sikerült azonosítani.

Az *RB*-gén terméke egy 110 000 relatív molekulatömegű transzkripciós faktor, a p110RB fehérje. Úgy tűnik az a feladata, hogy a sejtciklust vezérelje, és megakadályozza a sejtek idő előtti osztódását. A differenciálódott szemlencse sejtjei normálisan nem osztódnak, ellenkező esetben, a lencse megvastagodna és elhomályosodna. A retinoblasztóma-gén (egerekben *Rb*) mutáns alléljára homozigóta egérembriók szemlencsesajtjei azonban a differenciálódás után is osztódnak. Ugyanígy viselkednek a retinoblasztómás betegek sejtjei is, mert mindkét *RB*-génjük mutáns, ezért nincs p110RB fehérjéjük, amely megakadályozná a rendellenes sejtosztódásokat.

Ha a p110RB gátolja a sejtosztódást, hogyan képesek osztódni a sejtek, amikor szükséges? Ennek magyarázata, hogy a p110RB minden sejtciklusban foszforilálódik. A foszforiláció át-



17.20. ábra. Hipotézis a retinoblasztóma öröklődésének magyarázatára. Normális retinoblasztóma-allélt hordozó gaméta egyesül egy mutáns allélt hordozóval. Heterozigóta sejt keletkezik, amelyben a gén normál alléja elegendő szabályozó anyagot termel a retina sejtjeinek megfelelő működéséhez. Számos sejtosztódás után egy véletlenszerű szomatikus mutáció inaktíválja az egyik sejtben a működőképes *RB*-allélt, így ebben a sejtben már csak mutáns allélok lesznek. A szabályozó fehérje hiányában a sejtosztódás aktiválódik, a mutáns, transzformált sejtből kialakul a retinoblasztóma

menetileg, csak annyi időre inaktíválja a p110RB-t, hogy a sejt osztódni tud. Ezután egy enzim eltávolítja a foszfátot a p110RB-ről, ezzel aktiválja a szabályozó fehérjét, ami megakadályozza a sejtosztódást, egészen a következő foszforilációig.

A DNS-tumorvírusok, mint az adenovírus, az SV40 és a humán papillomavírus (HPV) csak akkor replikálódnak, ha gazdasajtjuk osztódik. Tehát valahogyan inaktíválniuk kell az osztódást gátló p110RB fehérjét. A vírusok speciális onkoproteineket kódolnak (az E1A, a T-antigén, illetve az E7 fehérjéket), amelyek a p110RB-hez kötődnek és inaktíválják azt. Ezek a tumorvírusok nem foszforilálás útján inaktíválják a p110RB-t, és hatásuk végleges. A p110RB végleges inaktíválása legalábbis részben felelős a DNS-tumorvírusok transzformációs képességéért.

A retinoblasztómában szenvedő betegek valószínűleg egy mutáns retinoblasztóma- (RB) allélt örökölnek. Ezután, általában gyermekkorukban, szomatikus mutáció következtében a másik RB-alléljuk is inaktíválódik egyik retinoblasztsejtjükben. A normál RB-allél hiányában a retinoblasztsejt korlátlanul osztódik, ami retinoblasztómához vezet. Az RB-gén terméke egy transzkripció faktor, a p110RB fehérje, amely a sejt-osztódással kapcsolatos géneket szabályozza. Foszforilálatlan formában aktív, gátolja a sejtosztódást, de minden egyes osztódás előtt foszforiláció útján inaktíválódik, így a sejt osztódhat. Néhány DNS-tumorvírus olyan fehérjéket kódol, amelyek kötődnek a p110RB-hez és inaktíválják azt, így a vírusok szabadon replikálódhatnak.

A P53 GÉN

Az RB-gén az egyre növekvő számú tumorszuppresszor gének egyike. A helyzet nem mindig olyan egyszerű, mint a retinoblasztóma esetében, ahol csak egy tumorszuppresszor gén működése fontos. Az ember colorectalis karcinómáinak (vastag- és végbélrák) többségében például három kromoszómán (5., 17. és 18.) inaktíválódnak gének, valamint a Ki-ras onkogén aktiválódik. A 17. kromoszóma tumorszuppresszor génjét már klónozták, és megállapították, hogy a p53 transzkripció faktor kódolja, amely normálisan önálló alegységekből álló tetramer formában aktív. Már sokféle emberi malignus daganatban megtalálták a hibás p53 gént. Jelentőségét növeli, hogy a szórványosan fellépő (nem családi halmozódású) rákbetegségek legalább 40%-ában kimutatható a hibás p53 gén. Egy mutáns p53 allél öröklése hajlamossá teszi a hordozókat rák kialakulására. Egy ritka öröklődő rendellenességgel, a Li-Fraumeni-szindrómával születetteknek körülbelül 50%-ánál rákos megbetegedés lép fel a 30 éves életkorra, míg az átlagos populációban ennek gyakorisága csak 1%.

A p53 fehérje két úton fejt ki hatását. Először is, érzékeli a DNS károsodását és leállítja a DNS-replikációt, valamint a sejt-osztódást, amíg a DNS hibajavító rendszere helyre nem állítja a hibát. Ezzel megakadályozza a mutációk kialakulását. A p53-at ezért szokták „a genom őreként” említeni. Másodszor, amennyi-

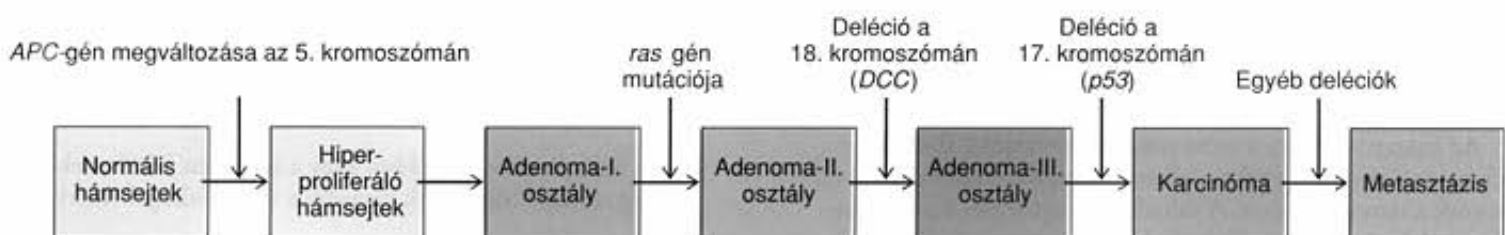
ben a sejtosztódást nem sikerül leállítani, a p53 képes egy másik folyamat, a **programozott sejthalál**, az **apoptózis** elindítására. Más szóval a károsodott DNS-t tartalmazó sejtet „öngyilkosságra” készíti, és ezzel megakadályozza a rákos elfajulásra hajlamos mutáns sejt kialakulását. Az apoptózis és a p53 kapcsolatára azok a kísérletek derítettek fényt, amelyekben nagy dózisu besugárzás után a kezelt sejtek életképességét vizsgálták. A normális és a p53 mutációjára heterozigóta sejtek a besugárzás után apoptózis miatt elvesztik életképességüket. A homozigóta p53⁻ sejteknél azonban a programozott sejthalál elmarad, és a sejtek nagy sugárdózis után is megőrzik életképességüket.

Ugy tűnik, hogy a sejtekben a p53 és a p110RB együttműködik. Az előző fejezet részben ismertetett, egerekkel végzett szemlencse kísérletben a differenciálódott Rb⁻ sejtek folytatták az osztódást. A p53 valamilyen módon érzékelt a rendellenes osztódást és apoptózist indukált az aberráns sejtek elpusztítására. Az Rb⁻/Rb⁻; p53⁻/p53⁻ genotípusú sejtek rendellenesen osztódtak, és a működőképes p53 gén hiányában nem következik be az apoptózis.

A p53 gén egy transzkripció faktor kódol, amely a szervezetet a mutáns sejtektől megvédő gének működését szabályozza. Amennyiben egy sejt DNS-e károsodik, a p53 leállítja a DNS replikációját és a sejtosztódást a hiba kijavításáig. Ennek eredményeként a replikációs hiba nem rögzül mutációként. Ha ez a kontroll valami más okból, például a p110RB szabályozási hibája miatt nem működik, és a sejt tovább folytatja az osztódást, a p53 apoptózist indukál. Ilyen módon a rendellenes sejt elpusztul, mielőtt rákos sejté alakulna.

EGYÉB TUMORSZUPPRESSZOR GÉNEK

A második, már klónozott colorectalis tumorszuppresszor gén a 18. kromoszómán található DCC. Szekvenciája alapján olyan sejtfelszíni fehérjét kódol, amely a sejtek egymáshoz kapcsolásában vesz részt. Ez a tény különös jelentőséget kap annak fényében, hogy a rákos sejtek esetében a sejtfelszíni adhézió általában megszűnik. Az 5. kromoszóma tumorszuppresszor génjét, az



17.21. ábra. Colorectalis tumor keletkezésének modellje. A normál bélhámsejtek (balra) átalakulása metasztatizáló colorectalis rákos sejtekké (jobbra) több lépésben zajlik. A legtöbb lépés valamelyik tumorszuppresszor gén működésének megszűnésével vagy onkogének aktiválódásával áll kapcsolatban

APC-t is sikerült klónozni. A gén az öröklődő vastagbélrák egyik típusát (adenómás colon polyposis) alakítja ki. Ez a gén bizonyítottan hasonló szerepet játszik az *APC* és más öröklődő bélrákok kialakulásában, mint az *RB*-gén a retinoblasztóma esetében, eltekintve attól, hogy a vastagbélrákok kialakulásában több tumorsuppresszor gén is közreműködik.

Az ilyen típusú többgénés hatás valószínűleg sokkal jellemzőbb a tumorsuppresszor génekre, és lehetővé teszi az egyes gének szerepének tisztázását a rákos folyamatokban. A colorectalis karcinóma különösen jó példa lehet, mivel egyértelműen elkülöníthetők az egyes stádiumok a normál bélhámsejtektől a metasztázisos rákos sejtekig. Az egyes szakaszokra jellemző kromoszomális változások alapján B. Vogelstein és munkatársai a 17.21. ábrán vázolt modellt állították fel. Az elképzelés összhangban van a legtöbb rák esetében megfigyelhető többlépéses fejlődési folyamattal, és arra is magyarázatot ad, hogy miért olyan hosszú idő alatt alakul ki a legtöbb rákos megbetegedés.

A colorectalis karcinóma kialakulása többlépéses folyamat. Legalább három tumorsuppresszor gén, az *APC*, a *DCC* és a *p53* gének inaktiválódása, és legalább egy (*Ki-ras*) onkogén aktiválódása szükséges hozzá.

ÖSSZEFOGLALÁS

A mutagén vegyületek és sugárzások rák kialakulásához vezethetnek, valószínűleg azért, mert károsítják a DNS-t. Ezenkívül a vírusok – DNS- és RNS-vírusok egyaránt – okozhatnak daganatokat. Mindegyik eddig ismert RNS-tumorvírus retrovírus. Genomjukban rendszerint megtalálható egy olyan onkogén, amely a gazdasejteket daganatsejtté transzformálja. A virális onkogének valószínűleg a velük közeli rokonságban álló celluláris protoonkogénekből származnak. Vannak olyan retrovírusok is, amelyek nem saját onkogéneikkel működnek, hanem provírus formájuk aktiválja az endogén celluláris protoonkogéneket.

A celluláris protoonkogének többféle folyamatban alakulhatnak át tumort okozó onkogénné. Egyes tumorokban például a celluláris *c-Ha-ras* protoonkogén egyetlen bázisának megváltozása elegendő az onkogénné való transzformációhoz. Más protoonkogének transzlokáció következtében válnak onkogénné. A Burkitt-limfómában például a *myc* onkogén helyeződik át az ellenanyagok H-láncát kódoló gének csoportja mellé.

Az onkogének vagy a protoonkogének – mint a Burkitt-limfóma *myc* génje is – gyakran abnormálisan nagy aktivitást mutatnak a tumorsejtekben. A túlműködés egyik oka lehet a génszorzódás (amplifikáció), aminek következtében a géntermék mennyisége kiugróan megnő. A másik ok, hogy a protoonkogénben megszűnik a génműködés szabályozása. Ez utóbbi történik a *myc* génnel egyes kémiai transzformált sejtekben.

Az onkogének által kódolt fehérjék azonosítása után fény derülhet aktivitásuk és transzformáló szerepük összefüggésére. Működésük

alapján négy fő csoportba oszthatók, és legalább potenciálisan, de mindegyikük kapcsolatban van a sejtnevelés szabályozásával: (1) növekedési faktorok (*sis*); (2) növekedési faktor receptorok (*erb-B*); (3) a növekedési faktorok receptoraival együttműködő fehérjék, amelyek eljuttatják a sejt belsejébe az osztódást serkentő jeleket (az *src* protein-tirozin-kináz aktivitása, illetve a *ras* G fehérjének aktivitása); (4) transzkripciós faktorok, amelyek növekedési faktor hatására aktiválják a géneket (*fos*, *jun*).

Az onkogenezisre vonatkozó elméleteknek figyelembe kell venniük azt a tényt, hogy a sejtfüziós kísérletekben a malignitás recesszív jelleg. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a malignus transzformációt a sejtosztódást szabályozó, ún. tumorsuppresszor gén meghibásodása okozza. Ennek klinikai példája a retinoblasztóma. A hajlam öröklődésének hátterében feltehetőleg egy, a szülőktől örökölt hibás szabályozó allél áll. A tumor azonban csak akkor fejlődik ki, ha a heterozigóta egyedben a normál szabályozó allélt szomatikus mutáció inaktiválja.

A tumorsuppresszor gének hibájának másik példája a Li-Fraumeni-szindróma. A betegek egy hibás *p53* allélt örökölnek, a gén másik kópiája pedig szomatikus mutáció következtében meghibásodik. Ez a Li-Fraumeni-szindrómás családok tagjainál az esetek 50%-ában rák kialakulásához vezet, már 30 éves kor előtt. A colorectalis karcinóma kialakulásához három tumorsuppresszor gén, köztük a *p53* inaktivációja, valamint egy onkogén, a *Ki-ras* aktiválódása szükséges. A *p53* és a *p110RB* együttműködése védi meg a sejtet a rendellenes osztódásoktól. Ha az *RB* mutál, a sejt szabálytalanul osztódhat, de a *p53* ezt érzékeli és indukálja az érintett sejt apoptózisát. Ha a *p53* is defektes, az apoptózis nem indul be, a sejt a továbbiakban kontrollálatlanul osztódik.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Honnan tudjuk, hogy a kijavítatlan DNS-károsodás rákhoz vezethet?
- Soroljon fel három karcinogén környezeti tényezőt!
- Hogyan mutatta ki Rous, hogy a csirkék szarkómájának hátterében a baktériumoknál kisebb méretű kórokozók állnak?
- A transzformációnak a biológiában két jelentése is van. Mit jelent a szó a daganatbiológiában?
- (a) Mindegyik malignus sejt transzformált? (b) Minden transzformált sejt rosszindulatú?
- A retrovírusok *gag* génje a vírus burkának különböző polipeptidjeit kódolja, de ez nincs ellentétben az „egy gén – egy polipeptid” elvvel. Miért?
- Miben hasonlít egy retrovírus provirusa egy profághoz?
- Az onkogének a vírusokban vagy a sejtekben jelenhetnek-e meg először? Melyiknek nagyobb a valószínűsége? Miért?
- Hogyan transzformálják a sejteket az onkogének nélküli, ún. lassan transzformáló vírusok, mint például a madár-leukózis vírusa?
- Az onkogenezis soklépéses folyamat, de az emberi tumorok *Ha-ras* onkogénje egyetlen lépésben transzformálja

- a NIH 3T3-sejteket. Miért nincs ellentmondás a két tény között? (Vegye tekintetbe a 3T3-sejtek természetét!)
11. A Ha-*ras* tumort okozó mutációja ivarsejteket vagy szomatikus sejteket érintő mutáció-e? Honnan tudhatjuk?
 12. Hogyan lehetne eldönteni, hogy a tüdőrák *c-aal* onkogénje amplifikálódott-e a rákos sejtekben? (A *c-aal* a mitikus aardvark leukémia vírus onkogénjének celluláris megfelelője.)
 13. Hogyan derítené ki, hogy a *c-bas* onkogén nagy intenzitással iródik-e át a rákos májsejtekben? (A *c-bas* gén a sejtjes megfelelője a mitikus denevérszarkóma vírusának).
 14. A varacskosdisznó-szarkóma vírusa (WSV, egy hipotetikus vírus) onkogénje a *was*. A fertőzött sejtekben kimutatható egy új protein-tirozin-kináz aktivitása. Egy hőérzékeny WSV-mutáns magas hőmérsékleten elveszíti transzformációs képességét, és a fertőzött sejtekből sem mutatható ki magas hőmérsékleten a protein-tirozin-kináz aktivitása. Milyen következtetést von le ebből?
 15. Tegyük fel, hogy a Ha-*ras* protoonkogén fehérjéjének (Ras) G fehérje aktivitása van, és válaszol egy növekedést serkentő hormonnra. Milyen kihatása lenne a növekedésre (a) egy olyan mutációnak, amelyik fokozza a Ras és a GAP GTPáz aktivitását; (b) egy olyan mutációnak, amelyik csökkenti a Ras és a GAP GTPáz aktivitását. Miért?
 16. Tegyük fel, hogy a retinoblasztómát egy olyan regulátor gén inaktiválása okozza, amely normálisan a sejtosztódást szabályozza. Nagy valószínűséggel milyen lesz a retinoblasztóma sejt és egy normál sejt hibridjének fenotípusa? Normál vagy malignus? Miért?
 17. A sejtfüziós vizsgálatokban a malignusság recesszív bélyegnek tűnik, de a rákos daganatra való hajlam általában domináns jellegként öröklődik. Hogyan oldható fel ez az ellentmondás?
 18. Sorolja fel a normális sejtek és a malignus tumorsejtek közötti leglényegesebb különbségeket!

A megoldások a könyv végén találhatóak.

18.

F E J E Z E T

Extranukleáris öröklődés

Tanulási program

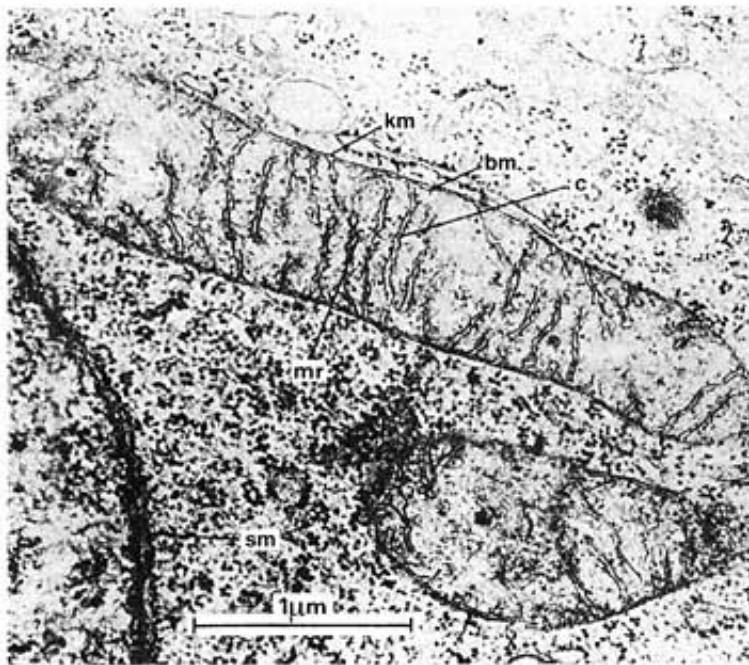
- 1 Egyes tulajdonságokat örökítő eukarióta gének, amelyek nem követik a mendeli öröklődés szabályait, nem a sejtmagban, hanem a mitokondriumokban és a plasztiszokban találhatóak.
- 2 A mitokondriumok és a kloroplasztiszok génjeinek térképezése.
- 3 A mitokondriumok és a kloroplasztiszok genomjának analízise.
- 4 A mitokondriumok és a kloroplasztiszok valószínűleg egykor szabadon élő prokariótákból származtathatók, amelyek szimbiózisra léptek az eukarióta sejtek elődeivel.

*A mitokondriumok stabil,
megbízható albérlők, és én meg is
bízom bennük.*

Lewis Thomas
A sejt élete

A sejt felépítése alapján az élőlényeket két nagy csoportba, a prokarióták és az eukarióták közé soroltuk, és sajátosságait ennek alapján tárgyaltuk. A prokarióták (görög szó, jelentése elősejtmagos) közé tartoznak a baktériumok és a kékmoszatok, újabb elnevezésük szerint **kékbaktériumok**. Ahogy nevük is jelzi, a prokariótáknak nincsen sejtmagjuk. Génjeiket egyetlen gyűrű alakú kromoszóma tartalmazza, amely a sejt **nukleoidnak** nevezett régiójában található. A nukleoidot nem választja el a sejt többi részétől membrán, mint a sejtmagot a magmembrán.

Az eukarióták (görög szó, jelentése valódi sejtmaggal rendelkező) közé sorolható az összes többi élőlény, amelynek sejtjében sejtmag van. A sejtmag megléte vagy hiánya alapvető különbség a prokarióták és az eukarióták között, de emellett az eukariótáknak számos fontos sajátosságuk van, amelyek a prokariótákra nem jellemzők. Az eukariótáknak membránnal körülhatárolt sejt szervecskéik, más szóval **sejtorganelleumaik** vannak, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtek életében. Szinte minden eukariótának vannak **mitokondriumai** (18.1. ábra), amelyekben lebontó anyagcsere-folyamatok és ATP-képzés zajlik. A zöld növények sejtjeiben **plasztiszok** vannak, többek között **kloroplasztiszok** (18.2. ábra), amelyekben fotoszintézis történik, vagyis a napfény energiájának felhasználásával szén-dioxidból és vízből szerves anyagot szintetizálnak.



18.1. ábra. Mitokondriumok a csirkeembrió hasnyálmirigyének sejtjében. A mitokondrium felépítése: külső membrán (km), belső membrán (bm), crista, a belső membrán betüremkedése (c), a mitokondrium riboszómái (mr). A belső membrán tartalmazza a terminális oxidáció enzimszisztémát. Az ábra bal alsó sarkában a membránnal körülvevett sejtmag (sm) részlete látható

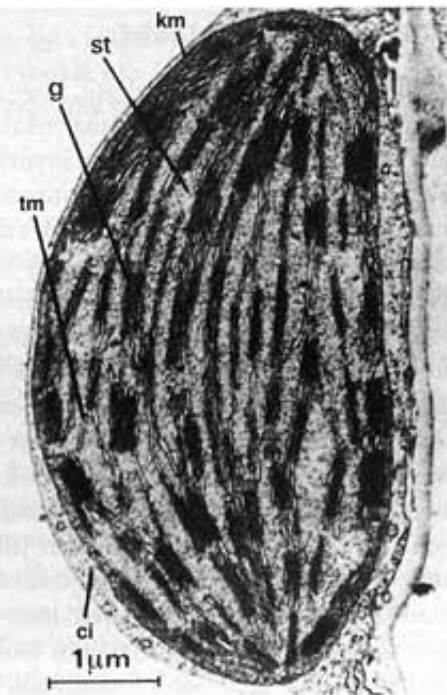
Forrás: Beale, G. és Knowles, J. A.: *Extranuclear Genetics*. © Edward Arnold Publishers, 1978. J. A. Knowles felvétele

CITOPLAZMATIKUS ÖRÖKLŐDÉS

Eddig a fejezetig feltételeztük, hogy az eukarióták fenotípusát szabályozó gének a sejtmagban találhatók. A Mendel által vizsgált tulajdonságok és a legtöbb eddigi példánkban szereplő eukarióta gén esetében is biztosan ez volt a helyzet. De nem minden gén lokalizálódik a sejtmagban. Az eukarióták több lényeges tulajdonságát olyan gének szabályozzák, amelyek nem a sejtmagban, hanem a sejtorganelleumokban, pontosabban a mitokondriumokban és a plasztiszokban vannak. Ebben a fejezetben az extranukleáris genetikai rendszereket vizsgáljuk. Látni fogjuk, hogy a mitokondriumok és a kloroplasztiszok genetikai szerveződése sokkal inkább prokarióta, mint eukarióta jellegzetességeket mutat, ami eredetük tisztázásához is értékes információkat szolgáltatott.

A KLOROPLASZTISZOK GÉNJEINEK ÖRÖKLŐDÉSE

Az extranukleáris öröklődés első meggyőző példáit Carl Correns csodatölesérről (*Mirabilis jalapa*) és Erwin Baur muskátlival (*Pelargonium sp.*) végzett kísérletei szolgáltatták. Érdekes, hogy mindketten 1909-ben publikálták munkájukat, néhány évvel Mendel kutatásainak újrafelfedezése után. Mindkét növény levele gyakran zöld-fehér tarka (18.3. ábra), és mindkettőnek van-



18.2. ábra. A kukorica zöld szinteste. A kloroplasztisz a külső membrán (km) veszi körül. A belső membránrendszer a tilakoid membrán (tm) és az egymásra halmozódó membránokból álló gránumok (g) építik fel. A membránok között található a plazmaszerű alapállomány, a sztróma (st). A sejtalkotó mellett kevés citoplazma (ci) is látható

Forrás: Beale, G. és Knowles, J. A.: *Extranuclear Genetics*. © Edward Arnold Publishers, 1978, fotó J. Braugeon



18.3. ábra. Tarka levelű muskátli (*Pelargonium*) levelei

© Leonard Lessin/Peter Arnold, Inc.

nak olyan fajtái is, amelyek levele egyszínű zöld, illetve fehér (az utóbbiak persze nem hosszú életűek).

A CSODATÖLCSÉR LEVÉLSZÍNÉNEK NEM-MENDELI ÖRÖKLŐDÉSE

A szokatlan öröklésmenetet először az jelezte, hogy a levél színének öröklődése nem követte a Mendel-szabályokat. Mendel kísérleteiben nem okozott eltérést a hasadási arányokban az, hogy a két szülő közül melyik volt a domináns fenotípusú és melyik a recesszív. Mindegy, hogy homozigóta sárga sziklelevelű borsó pollenjével porozták be a zöld sziklelevelű borsót vagy fordítva, az F_1 utódok mindkét esetben heterozigóta sárga sziklelevelűek lettek. A csodatölcsér viszont alapvetően másképp viselkedett. Választhatott Correns bármilyen porzós növényt (zöld, fehér vagy foltos levelűt), ha a termős virág zöld levelű volt, valamennyi utód zöld levelű lett. Amikor bármelyik hím partnert fehér levelű anyai egyedekkel keresztezte, az összes utód fehér levelű lett. Ha pedig az anya tarka levelű volt, az utódokban mindhárom fenotípus – zöld, fehér és tarka – megjelent. (A fehér jelleget örökítő gaméták a tarka levelű növények fehér hajtásainak virágaiból származtak, mert a teljesen fehér növények nem életképesek, nem érik meg a virágzást.) Összegezve, a hím szülő fenotípusa egyáltalán nem befolyásolta az utódok fenotípusát. Ez az **anyai öröklés** a visszakeresztezésekben is fennállt.

Az anyai öröklés két okból sem egyeztethető össze a Mendel-szabályokkal. Először, mert nem jelentkeztek a Mendel-féle hasadási arányok. Másodszor, mert a reciprok keresztezések eredménye eltért egymástól: a fehér levelű hím és zöld levelű női vonal keresztezése eltérő utódokat eredményezett, mint a zöld levelű hím és a fehér levelű női vonal keresztezése.

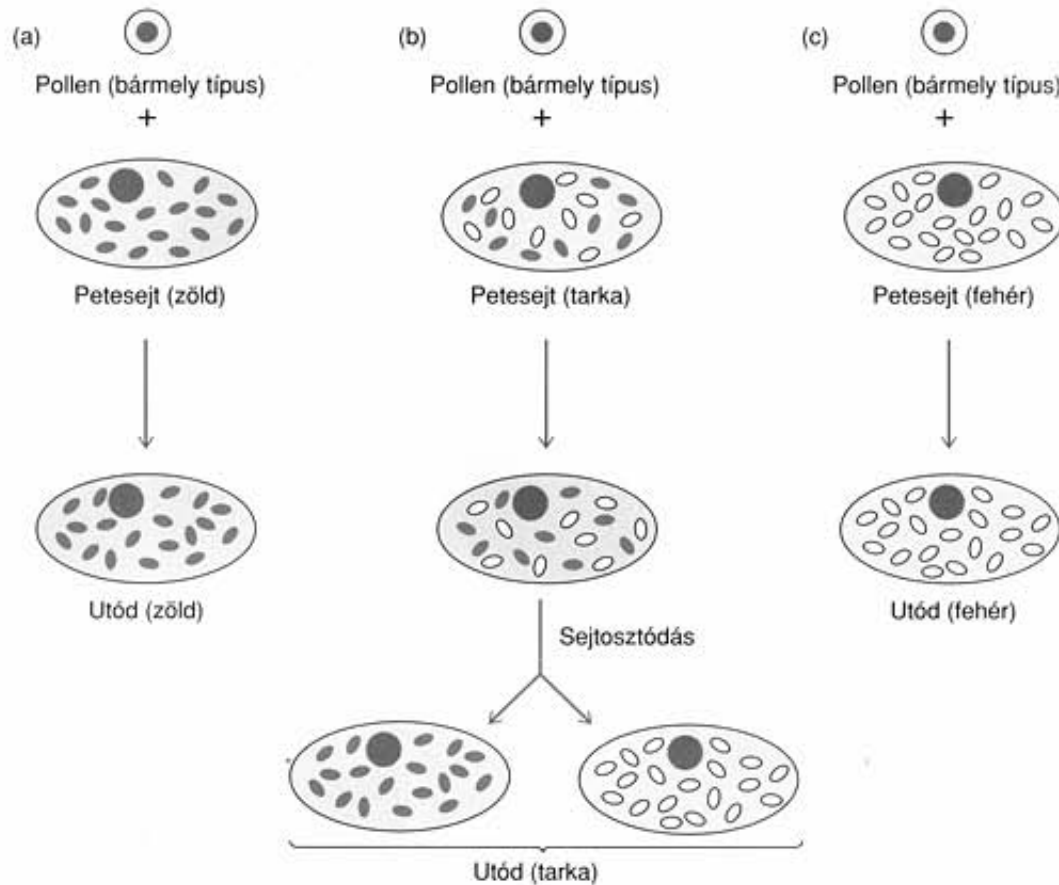
Hogyan magyarázható ez a furcsa jelenség? Vegyük figyelembe, hogy a növények zöld színét a kloroplasztiszokban talál-

ható zöld színű klorofill okozza. Ha a levél egy területén nem termelődik klorofill a kloroplasztiszok hibája miatt, a levél érintett része fehér lesz. Ha pedig ezt a tulajdonságot nem a sejtmagban, hanem a kloroplasztiszban levő gén határozza meg, öröklődése eltérhet a Mendel-szabályoktól. A mendeli arányok azért jönnek létre, mert a meiózis során a haploid sejtek képződésekor, a sejtmagban levő kromoszómák véletlenszerűen válnak szét, és a zigóta kialakulásakor a szülői ivarsejtek véletlenszerűen egyesülnek. A kloroplasztiszokban levő géneket mindez nem érinti. De miért anyai ágon öröklődik a vizsgált tulajdonság? Azért, mert a csodatölcsér és sok más magasabb rendű növény esetében a zigóta citoplazmájának túlnyomó része és azzal együtt az összes kloroplasztisz, a petesejtől származik. Az utódok kloroplasztiszai, ezért a levelük színe is olyan lesz, mint az anyanövényé.

Ez a magyarázata, miért fehér levelűek a fehér női vonal utódai, és miért zöldek a zöld vonalé. De mi a helyzet a tarka levelű női vonallal? Miért mutatják az utódok mindhárom fenotípust? A válasz feltehetőleg abban rejlik, hogy milyen kloroplasztiszok jutnak a petesejtbe (18.4. ábra). Amikor ivarsejt képződik egy tarka levelű egyedben, lehetséges, hogy az ivarsejtbe csupa hibás, fehér kloroplasztisz kerül, de az is előfordulhat, hogy csupa zöld, és az is, hogy vegyesen mindkettő. Ha a petesejt kloroplasztiszai fehérék, a zigótából fejlődő egyed is fehér lesz, míg a zöld kloroplasztiszú petesejt zöld utódot ad. Végül a kétféle plasztiszt hordozó petesejtől fejlődő utód tarka levelű lesz.

Vajon egy vagy több gén határozza-e meg a kloroplasztisz színét? Eddigi ismereteink alapján nem tudunk a kérdésre válaszolni. Az egyszerűség kedvéért néha a kloroplasztisz „génjéről” és a mitokondrium „génjéről” beszélünk, még akkor is, ha több gén határozza meg a tulajdonságot.

A kloroplasztiszban lokalizálódó gének mindig anyai öröklődésűek? Általában igen, de vannak kivételek is. A legismertebb kivétel az örökzöld mamutfenyő (*Sequoia sempervirens*), amelynek



18.4. ábra. Háromféle utód kialakulása a tarka levelű növény petesejtjéből. A tarka levelű hajtáson kialakuló virágban a három típus bármelyikébe tartozó petesejt fejlődhet. Az egyik típus (a) kloroplasztiszai szabályos zöldek, így a belőlük fejlődő utód is zöld. A másik típus (c) kloroplasztiszai rendellenesek, ezért a belőlük kialakuló utód fehér. A harmadikban (b) mindkét fajta kloroplasztisz megtalálható, amelyek a sorozatos sejtosztódások során más-más sejtekbe kerülhetnek. Így a fejlődő utódban lehetnek zöld és fehér kloroplasztiszokat tartalmazó sejtek is, vagyis a növény levele tarka lesz. A barna pettyek a sejtmagokat jelölik.

kloroplasztiszai és mitokondriumi szintén csak az egyik szülőtől származnak, de nem anyai, hanem apai öröklődésűek.

A csodatölcsér levelének színét nem a sejtmagban, hanem a kloroplasztiszban található gének határozzák meg. Ennek az a következménye, hogy a levél színe anyai öröklődést mutat, hiszen az összes kloroplasztisz és a zigóta citoplazmájának legnagyobb része a petesejtből származik. A kloroplasztiszban lévő gének rendszerint anyai öröklődésűek, de van példa apai öröklődésre is.

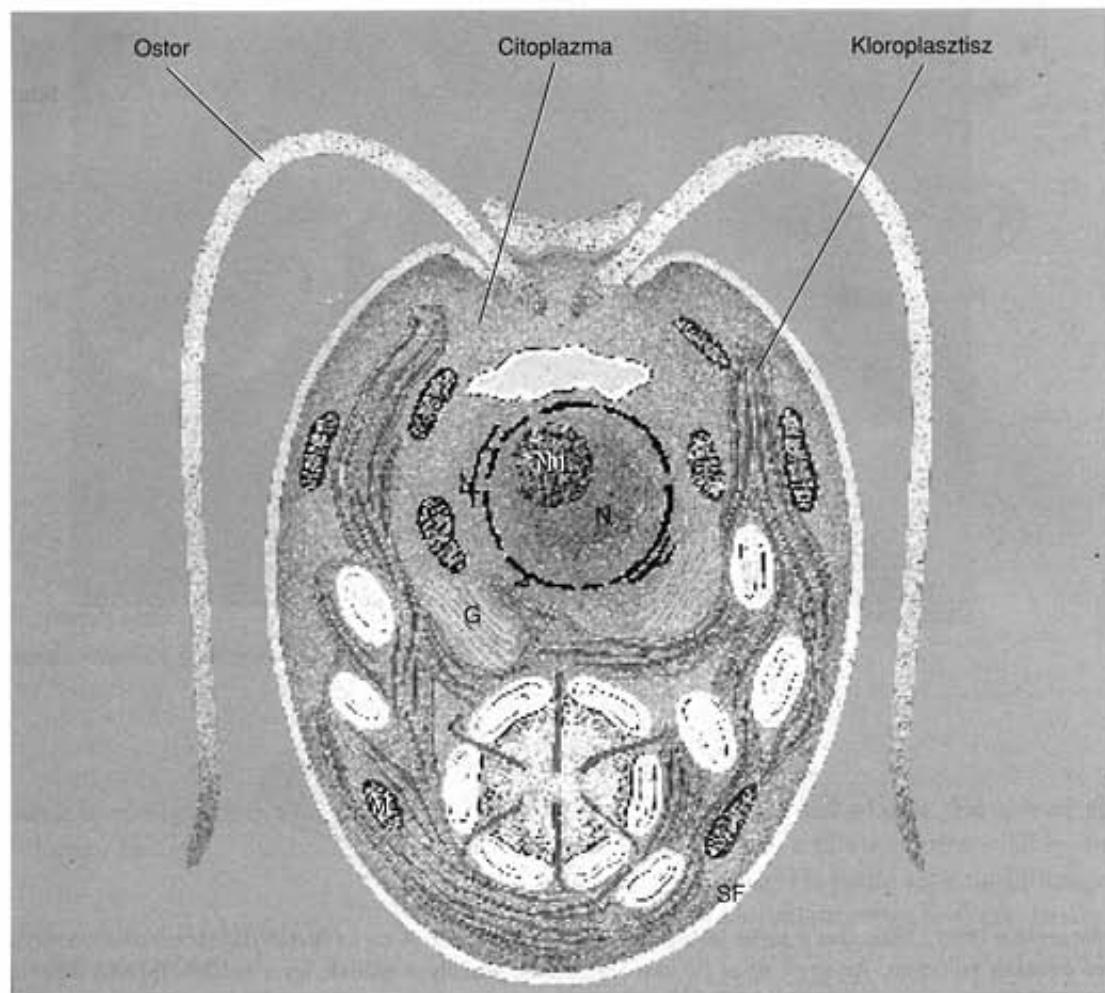
A *Chlamydomonas* kloroplasztisz génjeinek nem-mendeli öröklődése

A *Chlamydomonas reinhardtii* jól használható szervezet a kloroplasztisz génjeinek vizsgálatára. Egysejtű alga, amely életciklusának nagy részét haploid állapotban tölti. Tenyésztete könnyen fenntartható, és mindegyik sejt egyetlen kloroplasztiszt tartalmaz (18.5. ábra). Szaporodásának és egyedfejlődésének vázlata a 18.6. ábrán látható. Két, ellenkező párosodási típusúhoz tartozó, *mt*⁺, il-

letve *mt*⁻ haploid gaméta zigótát képez. A zigóta kialakulásakor nemcsak a sejtmagok egyesülnek, hanem a kloroplasztiszok is, ami meglehetősen ritka jelenség. Amint a zigóta „kihajt”, meiózis játszódik le, és négy haploid vegetatív sejt alakul ki, az ún. **zoospórák**. A zigótaképzés a meiózis előtt következik be, és nem fordítva, mert a *Chlamydomonas* vegetatív sejtjei haploidok, tehát csak a diploid zigóta kialakulása után kerülhet sor a redukciós osztódásra.

A *Chlamydomonas* nukleáris öröklődése előre megjósolható, rendkívüli elemeket nem tartalmaz, az egyedfejlődés vázlata alapján jól követhető. Mivel mindegyik haploid gaméta egy-egy haploid sejttaggal járul hozzá a zigótához és a meiózis után a zigótából négy haploid zoospóra keletkezik, a szülői nukleáris gének a négy utódsejtben 2:2 arányban oszlanak el.

Számos *Chlamydomonas*-gén ezt az öröklésmenetet mutatja, de vannak, amelyek nem. Ehelyett az **uniparentális öröklődés** jellemző rájuk, akár csak a csodatölcsérré, ahol a hím szülő geno- és fenotípusa nincs hatással az utódok levélszínének alakulására. Ruth Sager izolált egy streptomycinrezisztens *Chlamydomonas*-mutánst, amelynek genotípusát *sm2*-vel jelölik. Egy streptomycin rezisztens és egy szenzitív vonal keresztezésekor az utódok több mint 99%-a az *mt*⁺ szülő streptomycinérzékenységi típusával mutatott megegyezést, az *mt*⁻ szülő fenotípusa majdnem lényegtelen volt. Felmerülhet a kérdés,



18.5. ábra. *Chlamydomonas*. Az algasejt felépítését bemutató rajz elektronmikroszkópos felvételek alapján készült. Figyeljük meg a sejtmagot (N), a sejtmagvacskát (Nu), az egyetlen óriási kloroplasztiszt, a mitokondriumokat (M), a Golgi-apparátust (G) és a sejtfalat (SF)

beszélhetünk-e a *Chlamydomonas* esetében ivarjellegről, amikor a gaméták megjelenésre azonosak? Első hallásra furcsán hangzik, de az mt^+ szülő dominanciája Sager arra indította, hogy a magasabb rendűek anyai öröklődésének analógiájára ezt a típust nevezze női típusnak.

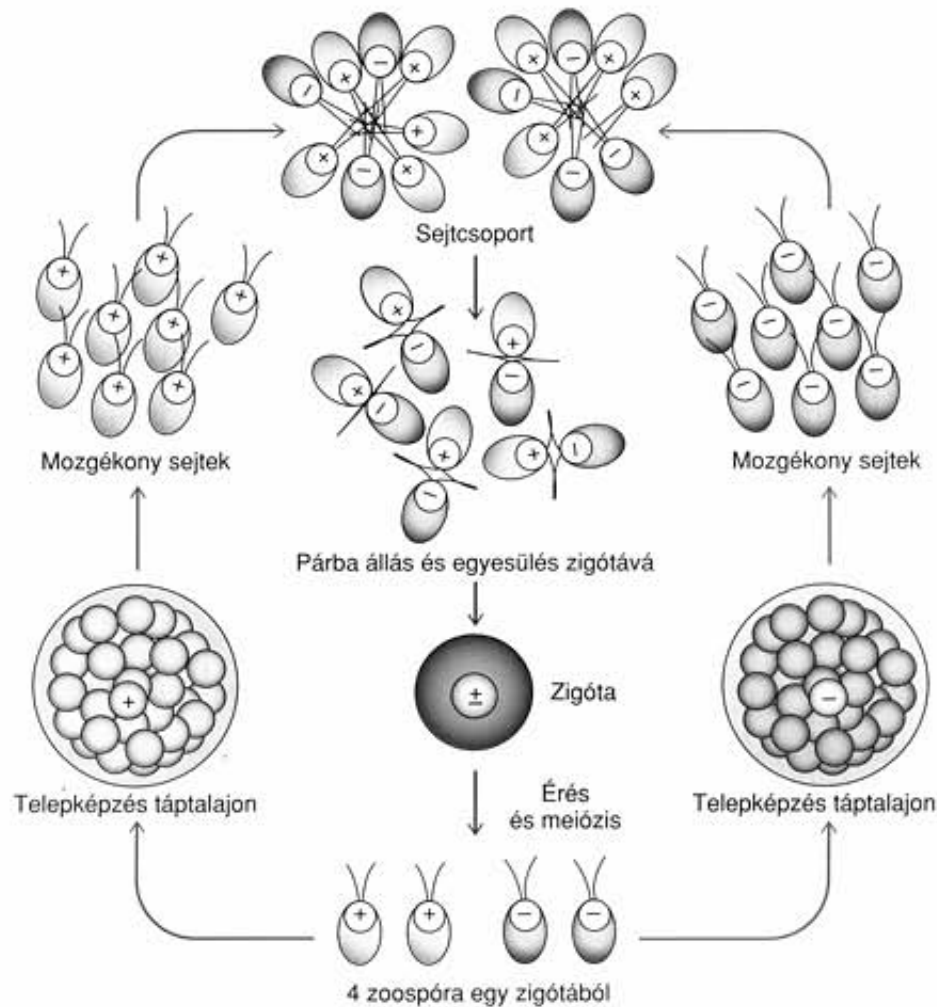
A *sm2* nem-mendeli öröklődése arra enged következtetni, hogy ezt a tulajdonságot extranukleáris gén határozza meg. A prokarióták és az eukarióták sejtorganellumainak sztreptomycinérzékenysége a fehérjeszintézis folyamatával kapcsolatos tulajdonság (l.11. fejezet). Ugyanez igaz a *Chlamydomonas sm2* génjeit tartalmazó sejtorganellumokra (a kloroplasztiszokra és a mitokondriumokra) is.

Sager kísérleti eredményei alátámasztják a kloroplasztisz hipotézist. Sager és D. Lane egyik vizsgálatában az egyik szülői vonalat a nitrogén nehézionotópjával (^{15}N) jelölte (18.7. ábra), és normál nitrogénizotópot (^{14}N) tartalmazó vonallal keresztezte. Ezután sűrűséggradiens-centrifugálással megvizsgálták az utódsejtekben a kloroplasztisz DNS-ének sűrűségét, hogy a nehéz vagy a normál nitrogénizotópot tartalmazzák-e, esetleg mindkettőt. Amikor az mt^+ szülőt jelölték a ^{15}N -tel, az utódok is nehéz kloroplasztisz DNS-t tartalmaztak. Amikor az mt^+ szülő ^{14}N -t tartalmazott, az utódok kloroplasztisz DNS-e is normálsűrűségű volt. Az mt^- szülő DNS-ének típusa nem számított. Ennek alapján a kloroplasztisz

DNS-ének öröklődése uniparentális, ugyanúgy, mint az *sm2*-é. Ez azt jelenti, hogy az mt^- típusú kloroplasztisz DNS valahogyan elvész. Ha az *sm2* gént a kloroplasztisz DNS tartalmazza, akkor ez magyarázatot ad arra, miért befolyásolja olyan ritkán az mt^- típusú szülő sztreptomycinérzékenysége az utódokét. A kísérleti adatok tehát arra mutatnak, hogy az *sm2* gén a kloroplasztiszban lokalizált.

Hogyan vesztet el szelektíven az mt^- típus DNS-e? Sager kimutatta, hogy az mt^+ típus DNS-ének specifikus helyzetű citozinjai metilálódnak az ivarsejtképzés során, az mt^- típusban viszont nem. A zigótában egy speciális DNS-t hidrolizáló enzimrendszer a nem-metilált DNS-t lebontja, míg a védő metilcsoportokat tartalmazó mt^+ DNS megmarad.

A *Chlamydomonas* alga *sm2* mutáns alléja sztreptomycin-rezisztenciát okoz. Az *sm2* allél öröklődése uniparentális jellegű, és szinte teljes egészében az mt^+ szülőtől függ. Sőt a sejt kloroplasztisz DNS-ének öröklődése is uniparentális, a sejt elveszti az mt^- szülő kloroplasztisz DNS-ét. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy az *sm2* genotípust a kloroplasztiszban lévő gén vagy géncsoport alakítja ki.



18.6. ábra. A *Chlamydomonas* életciklusa. Az alga két különböző tulajdonságú vonalába tartozó egyedek ivaros folyamata (fent és középen). Az ellentétes párosodási típusúhoz tartozó sejteket + és – jelzi. A sejtmagban található, nem kapcsolt génpárt késsel, illetve rózsaszínnel jelöltük. A sejtek csoportokat alkotnak (fent), majd párba állnak, és a párok diploid zigótává egyesülnek. A zigóta meiózissal osztódik, és négy haploid zoospórárt hoz létre. A sejtmagban kódolt genotípus hasadása követi a Mendel-szabályokat

A MITOKONDRIÁLIS GÉNEK ÖRÖKLÖDÉSE

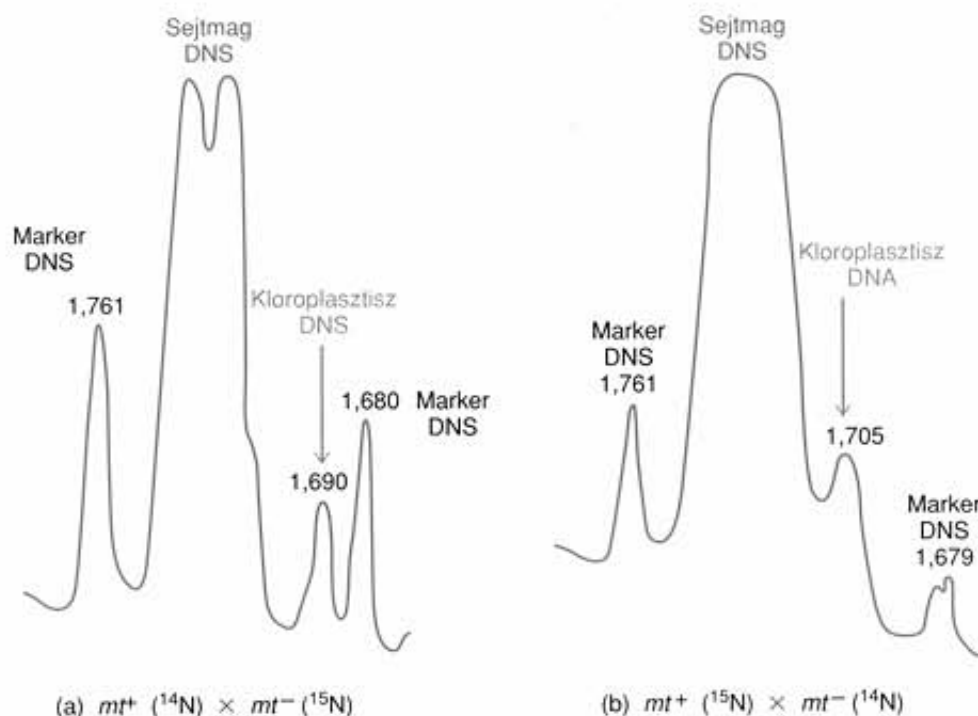
Az élesztőtől az emberig, a legkülönbözőbb szervezetek mitokondriumi genetikai változásokon mennek keresztül. A mutációk megjelennek a fenotípusban, és nem-mendeli öröklődést mutatnak. A következőkben a legismertebb példákat tekintjük át.

Az élesztő *petite* mutánsai

A mitokondriális genetikai defektusok klasszikus példáját Boris Ephrussi és kollégái írták le 1949-ben, az élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*). A mutáns a **petite** elnevezést kapta, mert a sejtek osztódása és növekedése lassú, ezért kis telepeket képeznek. A *petite* mutánsok három típusba tartoznak: a **neutrális** (ρ^0), a **szuppresszív** (ρ^-) és a **szegregációs**. Az utóbbi elnevezése azon alapul, hogy ez a típus mendeli hasadást mutat, vagyis sejtmagban található gén kódolja. A neutrális és a szuppresszív *petite* mutánsok ezzel ellentétben nem-mendeli öröklődésűek, és feltételezhető, hogy egy citoplazmatikus faktor, a ρ áll a háttérükben.

A ρ faktor természetesen a mitokondrium, de honnan tudjuk ezt? Már Ephrussi kimutatta, hogy a *petite* mutánsok mitokondriumi abnormalisak. Hiányoznak belőlük egyes **citokrómok**, azok a fehérjék, amelyek a terminális oxidációban, az ATP-szintézis folyamatában vesznek részt. Mivel a citokrómok a mitokondrium belső membránjában helyezkednek el, nem meglepő, hogy a mutánsok mitokondriumainak belső membránja fejletlen. A hibás működésű mitokondriumokat tartalmazó sejtek csak apró telepeket képeznek. Ha a mitokondriumok nem képesek ATP előállítására, az élesztő csak a sokkal kevésbé hatékony fermentációval juthat energiához, és ez természetesen lassú növekedést okoz.

A felsorolt eltérések a mutáns élesztősejtek mitokondriumai-ban önmagukban nem bizonyítják, hogy a genetikai változás is a mitokondriumban lokalizálható. A későbbiekben látni fogjuk, hogy a mitokondriumok több fehérjéjét a sejtmag génei kódolják, és ezek a fehérjék a citoplazmából kerülnek a mitokondriumokba. Emiatt egy mitokondriális fehérje szekvenciájának változását nemcsak a mitokondriális DNS (mtDNS), hanem a sejtmag DNS-ének mutációja is okozhatja. Az 1960-as években felfedezték, hogy a mitokondriumoknak saját DNS-ük van, és lehetővé vált a normál és a *petite* mtDNS-ek közvetlen összehasonlítása.



18.7. ábra. A *Chlamydomonas* kloroplasztisz DNS-ének öröklődése uniparentális. Mindkét keresztezésben (a és b) az egyik kloroplasztisz DNS normálizotópot (^{14}N) tartalmaz, sűrűsége 1,689, míg a másik nehézizotópot (^{15}N), sűrűsége 1,706. A DNS-t a és b esetben is kivonták, és cézium-klorid sűrűséggradiens-centrifugálással elválasztották egymástól (l. 6. fejezet). (a) az mt^+ típus DNS-e könnyű, az mt^- típusé nehéz. A zigóta kloroplasztiszának DNS-e az mt^+ típusú szülőnek megfelelően könnyű (sűrűsége 1,690). (b) Az mt^+ típus DNS-e nehéz, az mt^- típusé könnyű. A zigóta kloroplasztisz DNS-e nehéz (sűrűsége 1,705), azaz ismét az mt^+ típusú szülőével egyezik. A nyilak a kloroplasztisz DNS-ek helyét jelzik. A többi csúcsot ismert sűrűségű, ún. standard vagy marker DNS (1,761; 1,680; 1,769), illetve a sejtmag DNS-e (nagy csúcsok) adja

A szuppresszív petite mtDNS mindig hiányos, átrendeződések, deléciók és duplikációk is felléptek benne. A neutrális petite pedig egyáltalán nem tartalmaz mitokondriális DNS-t. Mindezek alapján már bizonyítottnak tekinthető, hogy a petite fenotípust a mitokondriális DNS hibái okozzák.

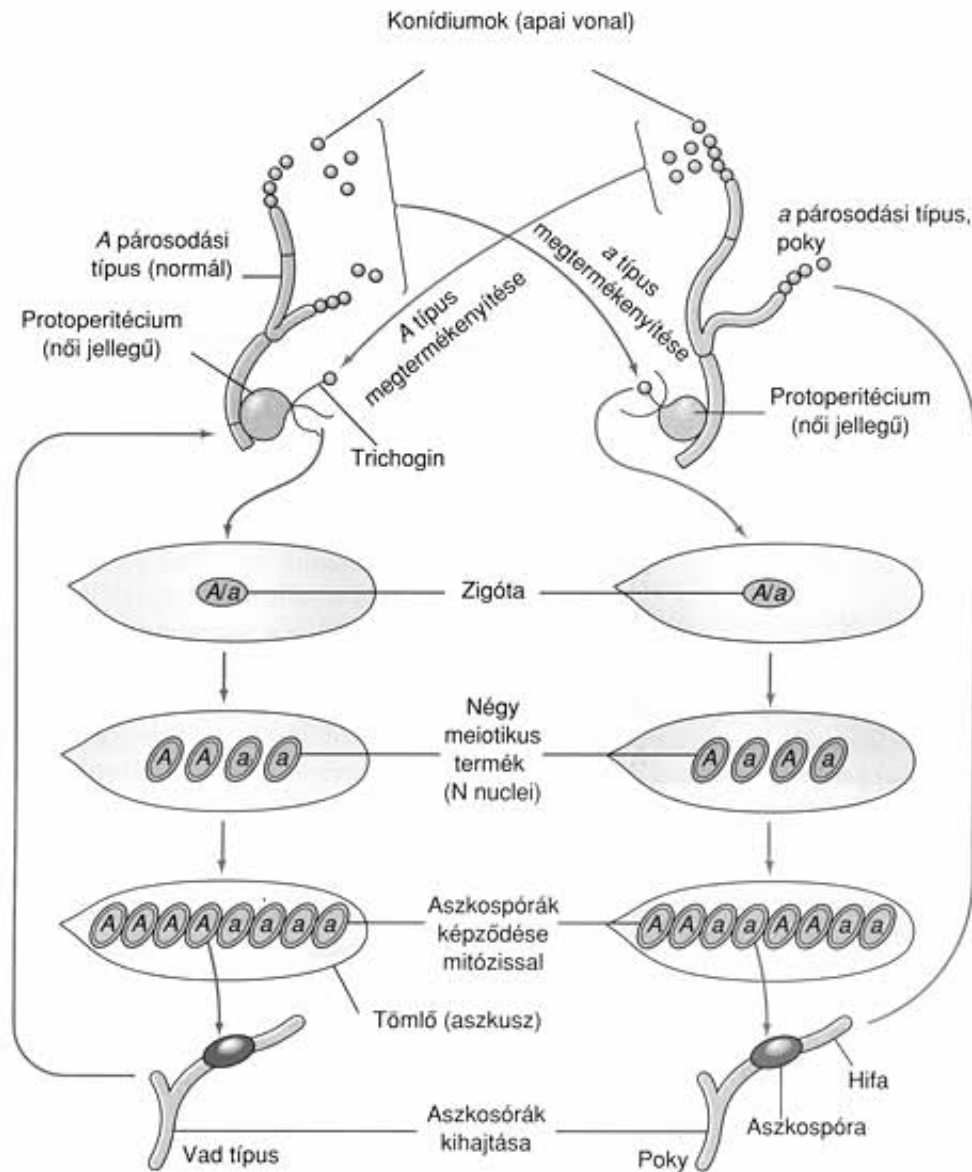
Az élesztő szuppresszív és neutrális petite mutációi extranukleáris öröklődésűek. A mutánsok mitokondriumi fejletlenek, és hiányoznak citokrómjaik. A mutánsok mitokondriális DNS-e vagy rendellenes, vagy teljesen hiányzik. Nagyon valószínű, hogy a petite fenotípus kialakításáért az mtDNS hibái felelősek.

A *Neurospora* poky mutánsai

Az élesztőgomba működőképes mitokondriumok nélkül erjesztéssel nyer energiát. A tömlősgombák közé tartozó *Neurospora* számára azonban nem elegendő a fermentációval szerzett energia, ezért működőképes mitokondriumok hiányában életképtelen. Ennek ellenére ismertek olyan mutációk, amelyek a *Neurospora* mitokondriumait érintik, és közülük néhány citoplazmatikus öröklődésű. De amint az várható, a mitokondriumok csak részlegesen károsodtak.

A *Neurospora* poky mutánsát M. B. Mitchell és H. K. Mitchell írták le 1952-ben. A „poky” (lassú, vacak) nevet azért kapta, mert rendellenes mitokondriumai miatt csak lassan növekszik. A petite élesztőnél bizonyos mitokondriális fehérjék teljesen hiányoznak, a poky *Neurospora*nál ugyanezen fehérjéknek egy része jelen van, de hibás.

A rendellenes mitokondriumok jelenléte ebben az esetben sem bizonyítja egyértelműen, hogy a mutáció a mitokondrium génjeiben történt, de a poky fenotípus anyai öröklődése már sokkal meggyőzőbb. Mit értünk anyai öröklődés alatt a *Neurospora* esetében? Léteznek-e hím, illetve női jellegű egyedek? Az ivaros szaporodás során az egyik fél egy éretlen női termőtestet, **protoperitéciumot**, hoz létre. Ebben történik meg a másik párosodási típusú hifán fejlődő ivarszervekkel az összeolvadás. A hím jellegű sejtmagvak az anteridiumból a párzófonalon (trichogin) keresztül vándorolnak az askogóniumba (női ivarszerv). A magpáros (heterokarion) hifákkal indul meg a termőtest (peritécium) kialakulása. Tehát amikor a poky jelleg anyai öröklődéséről beszélünk, arra gondolunk, hogy az utódok fenotípusa a protoperitéciumot adó (női jellegű) szülőtől függ. Ha a női jellegű szülő poky volt, utódai is poky típusúak lesznek, míg ha vad típusú, akkor utódai is vad típusúak lesznek. A hím szülő genotípusa nem befolyásolja az utódok fenotípusát (18.8. ábra). Mivel a női jellegű szülő, amely a mitokondriumok zömét adja a zigótába, egyértelműen meghatározza az utód fe-



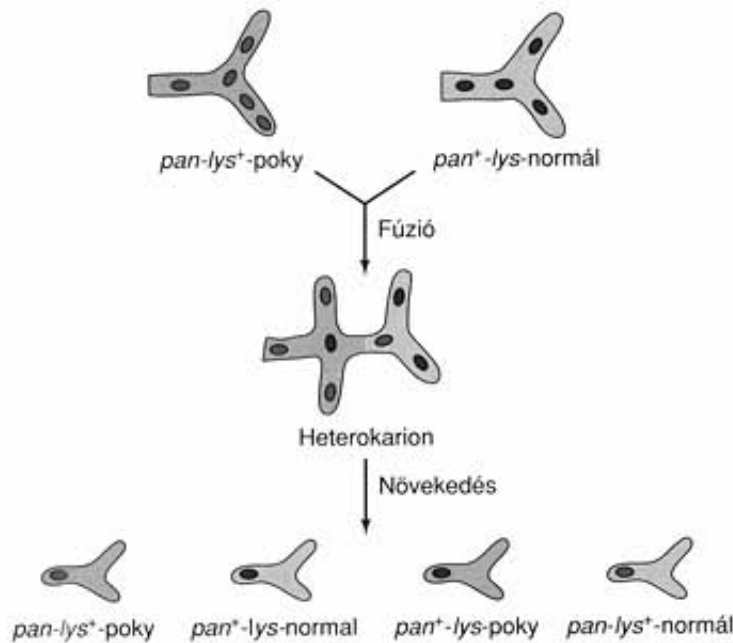
18.8. ábra. A *Neurospora* életciklusa a poky fenotípus anyai öröklődésének szemléltetésével. Két eltérő párosodási típusú (A és a) törzs kereszteződik. Az a törzs kék színe azt jelzi, hogy poky mutáns (jobbra). A rózsaszín A pedig vad típusú (balra). Az a típus női jellegű és az A típus hím jellegű ivarszervei között jön létre az összeolvadás (jobbra). A zigóta meiózissal nyolc haploid spórát képez, amelyek az A és a jellegre nézve a mendeli hasadási arányt mutatják (4:4), de valamennyien a poky genotípusához tartoznak. A másik esetben a normál A női ivarsejtje a poky a hím gamétájával képez zigótát (balra). A nyolc haploid spóra ismét 4:4 arányban A, illetve a típusú, de nem poky. Látható, hogy kizárólag a női jellegű szülő határozza meg a poky vagy normál típus megjelenését

notípusát, az öröklésment a poky jelleg mitokondriális öröklődését támasztja alá.

A poky mitokondriális voltát bizonyítják a heterokarionokkal végzett kísérletek is (18.9. ábra). A *Neurospora* két különböző törzsét összekeverték, lehetővé tették, hogy gombafonalaik, más néven **hifáik** fuzionálhassanak. Az egyik törzs poky volt és sejt-magjában egy marker mutációt, *pan*-t hordozott. A *pan* mutánsok nem képesek a vitaminok közé tartozó pantoténsav szintézisére. A másik törzs egyedének mitokondriumai vad típusúak voltak, és sejt-magjukban egy másik marker mutációt, a lizin szintézisének defektusát hordozták (*lys*). A hifák összeolvadása után a két törzsből származó sejt-magok ugyanabba a sejtbe kerülnek. Azok a sejt-magok, amelyek a kétféle törzsből származó sejt-magokat tartalmazzák, a **heterokarionok**.

Kezdetben a heterokarion a poky jellegre nézve normál fenotípusú, mert mindkét sejt mitokondriumait tartalmazza, és a vad típus a domináns. A heterokarion vad típusú a *pan* és *lys* jellegekre is, mert a két szülői sejt-mag kölcsönösen kiegészíti egymást. (A *pan* sejt-magja tartalmazza a vad típusú *lys*⁺ allélt, a *lys* típus sejt-magja pedig normál *pan*⁺ allélt.) A tömlősgombák, így a *Neurospora* sejtjei között is pórások vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a sejt-magok és a mitokondriumok szabadon átjussanak egyik sejt-ből a másikba. Ennek következtében előfordulhat, hogy a hifák egyes részeibe csak az azonos típusú sejt-magok (pl. *pan*) kerülnek be. Más szóval, a sejt-magok és a mitokondriumok véletlenszerű újraeloszlása lehetővé teszi a mutáns fenotípusok ismételt megjelenését.

Ez azonnal felvet egy izgalmas kérdést: Megjelenik-e a poky jelleg azokban a hifarészekben, amelyek a *lys* fenotípust



18.9. ábra. *Neurospora* heterokaryon tesztje. Két különböző vonalba tartozó hifából indulunk ki: A bal oldali sejtmagjában (zöld) *pan* és *lys*⁺ markerek vannak, citoplazmatikus markere a poky (kék). A jobb oldali hifa sejtmagjának (lila) *pan*⁺ és *lys* markerei mellett a citoplazmatikus marker a normál típus (rózsaszín). A két hifa fúziójával heterokarion jön létre. A sejtmagok és a citoplazma függetlenül válnak szét, így a hifa egyes részeiben négyféle genotípus alakulhat ki, a két eredeti szülői genotípus és két új kombináció. Az utóbbiak *pan-lys*⁺-normál (zöld sejtmag rózsaszín citoplazmában), illetve *pan*⁺-*lys*-poky (lila sejtmag kék citoplazmában). Az a tény, hogy a poky/normál genotípus a sejtmagban kódolt genotípustól függetlenül alakul ki, azt bizonyítja, hogy a poky/normál jelleg nem a sejtmagban található gének határozzák meg

mutatják? Emlékeztetőül, a kiindulási fenotípus kombinációk a poky/*pan*, illetve a vad/*lys* voltak, tehát a poky/*lys* kombináció megjelenése a poky és a *lys* jelleg független kombinálódását jelentené. A heterokarionokon végzett teszt eredménye pontosan ez volt (18.9. ábra). Minthogy a heterokarionokban nem olvadnak össze a sejtmagok, és a genomok sem rekombinálnak, emellett ismert, hogy a *lys* jelleg allélja a sejtmagban van, a poky és a *lys* független kombinálódásának egyetlen magyarázata lehet: a poky fenotípust egy sejtmagon kívül lévő gén allélja határozza meg, amely feltehetőleg a mitokondrium genomjának része.

Mivel a poky fenotípus olyan mitokondriális rendellenesség, amelyet citoplazmatikus gén kódol, logikus, hogy a gén a mitokondriumban van, de az eddig végzett kísérletek még nem igazolják ezt minden kétséget kizáróan. A legmeggyőzőbb bizonyítékot J. F. Wilson kísérlete szolgáltatta. Poky fenotípusú gombából izolált mitokondriumokat injektált normál fenotípusú egyedekbe, és a vad típusú hifák lassú növekedésűek lettek. Ennek alapján nagyon valószínű, hogy a poky allél vagy allélok a mitokondrium vannak.

A poky *Neurospora* mitokondriumi rendellenesek, ezért hifái lassú növekedésűek. A mutációra jellemző az extranukleáris öröklődés három sajátja: (1) anyai öröklésment; (2) heterokarionnal végzett kísérletekben függetlenül kombinálódik a sejtmag génjeivel; (3) a vad típusú törzs poky típusúvá alakítható a poky mutánsok mitokondriumainak bevitelével. Mindezek alapján valószínű, hogy a poky tulajdonságot kialakító allél(ok) a mitokondriumban van(nak).

A mitokondriális gének és a drogrezisztencia

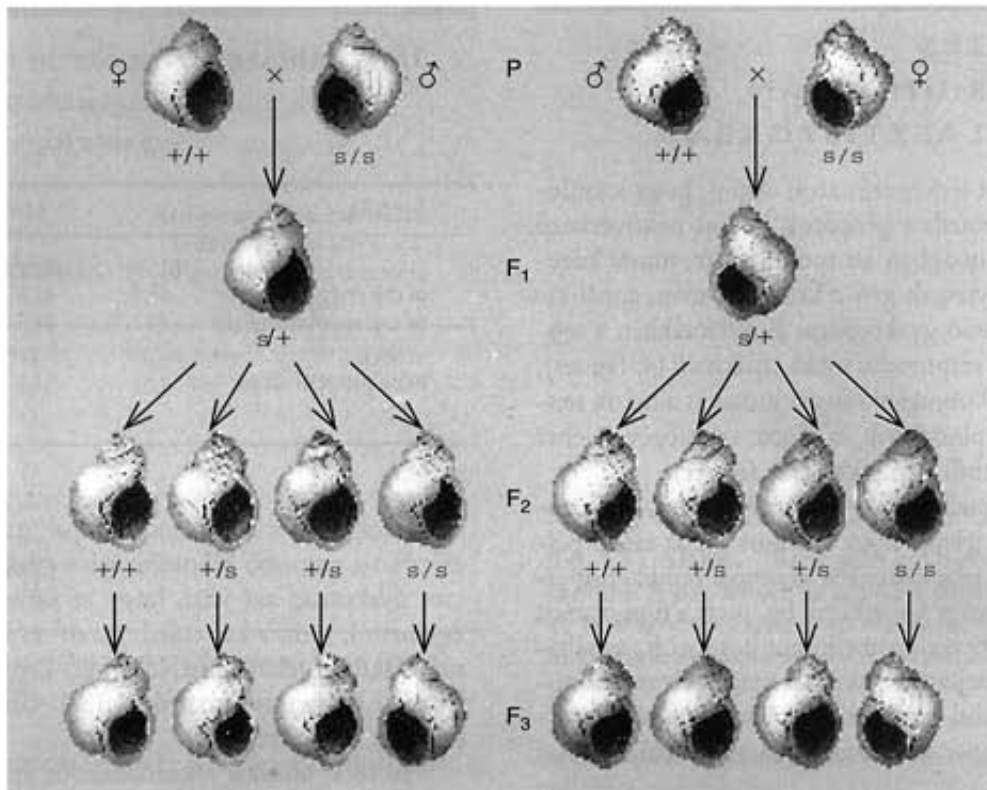
A mitokondriális gének működése sokkal inkább hasonlít a prokarióták génműködéséhez, mint az eukariótákéhoz, ami a sejt-organellumok valószínű eredetére utal (ezt a kérdést a fejezet későbbi részében tárgyaljuk). A prokariótákhoz való hasonlóság egyik példája a mitokondriumok transzlációjának érzékenysége klóramfenikol és eritromicin antibiotikumokkal szemben. Az antibiotikumok a bakteriális transzlációt gátolják, és elpusztítják a baktériumokat. Nincsenek azonban hatással az eukarióták transzlációjára, amely a **citoplazmatikus riboszómákon** folyik. A citoplazmatikus jelző az organellumok riboszómáitól való megkülönböztetést szolgálja (11. fejezet).

Bizonyos gombák (köztük az élesztő és az *Aspergillus*-fajok), a papucsállatkák, sőt még egyes emberi (HeL-a) sejtek is rezisztensek egy vagy több antibiotikummal szemben. Különböző vizsgálatok bizonyítják, hogy a sejtek rezisztenciáját mitokondriális gének okozzák. Például az élesztő eritromicinrezisztenciája nem-mendeli öröklődésű, az *Aspergillus* drogrezisztenciája pedig átvihető rezisztens törzsekből izolált mitokondriumok injektálásával. Szokatlan módon bizonyították be, hogy a HeL-a sejtek klóramfenikolrezisztenciája citoplazmatikus öröklődésű. A rezisztens sejteket megfosztották sejtmagjaiktól, majd a sejteket normál, érzékeny sejtekkel fuzionáltatták. Az így kapott sejtek rezisztensek lettek, ami azt bizonyítja, hogy az ellenálló képességet a sejtmagon kívül található gének határozzák meg.

Egyes antibiotikumokkal, például az eritromicinnal és a klóramfenikollal szembeni rezisztencia anyai öröklődést mutat. A rezisztencia átvihető mitokondriumok injektálásával vagy a sejtmaguktól megfosztott sejtek citoplazmájával. Mindebből arra következtethetünk, hogy a rezisztenciát extranukleáris gének határozzák meg.

AZ „ANYAI HATÁS” ÉS AZ ANYAI ÖRÖKLŐDÉS

Végezzünk el képzeletben egy kísérletet: keresztezzünk két olyan szervezetet, amelyek egyetlen tulajdonságukban különböznek, és vizsgáljuk meg az F₁ nemzedéket. Azt találjuk, hogy erre a jellegre nézve az utódok mindig az anyára hasonlítanak, ezért hajlamo-



18.10. ábra. A csigaház csavarodásának öröklődése. A csigaház lehet jobbmertes (+) vagy balmentes (s), és öröklődését az anya (petesejtet adó egyed) genotípusa szabja meg, nem pedig fenotípusa. Mivel a jobbmertes jelleg domináns a balmentes felett, a +/+, illetve a +/s genotípusú anya utódainak háza jobbra csavarodik. Csak az s/s genotípusú anya utódainak a háza lehet balmentes. Az F₁ nemzedékben ez anyai öröklésmentnek tűnhet, de a következő generációkban szabályos, mendeli szegregáció történik

sak vagyunk arra következtetni, hogy a tulajdonságot extranukleáris gén határozza meg. De ez a következtetés tévútra vezethet.

A 18.10. ábrán bemutatunk egy ilyen esetet, amelyet Alfred Sturtevant fedezett fel 1923-ban. A mocsárcsiga (*Lymnaea sp.*) háza lehet jobbra csavarodó (+), illetve balra csavarodó (s). Amikor Sturtevant olyan keresztezést végzett, amelyben a petesejtek homozigóta jobbra csavarodó házú egyedekből (++) származtak, és a hím ivarsejteket adó párzótárs homozigóta ss egyed volt, az összes utód háza jobbra csavarodó lett. Amikor viszont a petesejtek származtak homozigóta ss egyedből és a hím ivarsejteket adta a homozigóta ++ egyed, az utódok háza balra csavarodott, azaz ismét a petesejtnek megfelelően. Miért nem anyai öröklődés ez? Ennek megválaszolásához még két generáció elemzése szükséges. Sturtevant öntermékenyítéssel szaporította tovább az F₁ nemzedék egyedeit. Megtehetette, mivel a *Lymnaea* hímnős állat (mint a *C. elegans* a 14. fejezetben). Szervezetében mind a női, mind a hím ivarszervek megtalálhatóak, így pete- és hím ivarsejteket is termel. Az F₂ nemzedékben már nem minden egyed mutatta az anyai jellegét, sőt mindegyik háza jobbra csavarodott! Ez pedig nem felel meg sem az anyai, sem a mendeli öröklődésnek. Végül az F₃ generációban (az F₂ öntermékenyítése után) 3:1-es fenotípus arány alakult ki. Miért nem jelent meg ez az arány az F₂ nemzedékben? Azért, mert a csigáknál a ház csavarodásának iránya nem az adott egyed, hanem a petesejtet adó szülő (továbbiakban anya) genotípusától függ, és a jobbra csavarodó típus domináns a balra csava-

rodóval szemben. Az anya egyik génjének vagy géncsoportjának hatására olyan körülmények alakulnak ki, amelyek meghatározzák az embrió fejlődését. Ezek a körülmények szabják meg az embrió első néhány osztódásának orientációját, az pedig eldönti a ház csavarodásának irányát. Kövessük figyelmesen a 18.10. ábrán az öröklésmentet, amiből látható, hogy ha az anya +/+, vagy +/s genotípusú, akkor az utód háza jobbra csavarodik, ha pedig az anya genotípusa s/s, akkor balra.

Tehát egy generáció vizsgálata nem elég az anyai öröklődés bizonyítására, a sejtorganellumokban levő gének szerepének tisztázására. Azokban az esetekben, mint amilyen a csigaház csavarodásának öröklődése is, nem valódi anyai öröklődésről van szó, hanem **anyai hatásról**. A 14. fejezetben, a *Drosophila* egyedfejlődésének kapcsán már ismertettük az anyai hatás néhány példáját.

Az anyai hatás az a jelenség, amelyben az utódok fenotípusa nem az anya fenotípusától, hanem genotípusától függ. Az F₁ nemzedékben a jelleg öröklődése anyai öröklődésnek tűnhet, de a következő generációkban nyilvánvalóvá válik a mendeli öröklődés. A fenti példa is kiemeli annak fontosságát, hogy a kísérleteket több mint egy generáción át kell követni, különösen akkor, ha nem-mendeli öröklődést feltételezünk.

GÉNTÉRKÉPEZÉS A MITOKONDRIUMOKBAN ÉS A KLOROPLASZTISZOKBAN

A hagyományos genetikai térképezés azon alapul, hogy a szülőket keresztezik, majd elemzik a génpárok között bekövetkező rekombinációkat. Általánosságban azt mondhatjuk, minél közelebb van egymáshoz két vizsgált gén a kromoszómán, annál kisebb köztük a rekombináció gyakorisága. Eukariótákban a sejt-magok genomja az ivaros szaporodás során találkozik (4. fejezet). Prokariótákban a DNS a konjugáció során juthat át a másik sejtbe, vagy mesterségesen, plazmidok és fágok segítségével lehet átvenni géneket egyik sejtől a másikba (13. fejezet).

Az eukarióta sejtorganelumok genomjainak tanulmányozásában komoly problémát jelent, hogy – amint azt az előző példákban is láttuk – az apai organellumok genomja rendszerint elvész. Egyes esetekben ez azért következik be, mert a hím ivarsejt kevés citoplazmát, és így kevés organellumot hordoz, ha egyáltalán tartalmazza a vizsgált sejtsejtszervecskét. A magasabb rendű növények pollenjeiben például rendszerint nincsenek kloroplasztiszok. Más esetekben az apai sejtsejtszervecske vagy annak DNS-e lebomlik a zigótában. Ezt a jelenséget a *Chlamydomonas* esetében elemeztük, ahol az ivarsejtek kloroplasztiszai megjelennek ugyan a zigótában, de az apai kloroplasztisz DNS-e degradálódik.

A magasabb rendű állatok spermiumai bevihetnek néhány mitokondriumot a petesejtbe, de a zigótában az apai eredetű mtDNS elvész. Nagyon jól megfigyelhető ez a jelenség az öszvérnél, ahol a szülők mitokondriumainak DNS-e könnyen megkülönböztethető. A ló és a szamár mitokondriumának DNS-e restrikciós enzimekkel eltérő fragmentumokra hasítható (l. 16. fejezet). Tehát, ha enzimekkel hasítjuk egy öszvér mtDNS-ét, megállapíthatjuk, hogy ló vagy öszvér típusú mitokondriumai vannak-e. Ha ló volt az anyaállat, az öszvér mitokondriális DNS-e olyan, mint a lovaké, ha pedig szamár volt, az öszvér mitokondriumai is a szamáréhoz hasonlóak.

Az élesztő viszont mindkét szülőől örököl mitokondriumokat, sőt a kétféle mitokondriális DNS rekombinálódik is, a genetikusok nagy örömeire. Ez a jelenség lehetőséget ad bizonyos térképezési kísérletekre, de mivel még nem ismerjük az mtDNS rekombinációjának mechanizmusát, az ilyen kísérletek értékelése bizonytalan.

AZ ÉLESZTŐ MITOKONDRIÁLIS GENOMJAINAK REKOMBINÁCIÓS TÉRKÉPEZÉSE

Az első mitokondriális rekombinációs kísérletekről D. Y. Thomas és D. Wilkie számolt be 1968-ban. Két élesztőtörzset kereszteztek, az egyik a klóramfenikolra rezisztens, *cap^r* mutáns, a másik pedig az eritromicinnel szemben ellenálló *ery^r* mutáns volt. A keresztezett törzsek genotípusa eszerint: *cap^rery^r*, illetve *cap^rery^r* volt, rekombinánsaik pedig *cap^rery^r* vagy *cap^rery^r* lehettek. A 18.1. táblázatból látható, hogy a rekombinánsok elég nagy gyakorisággal fordultak elő. A táblázatban szerepel még két másik marker,

18.1. táblázat. Az élesztő mitokondriális géneinek rekombinációs gyakoriságai

Szülők	Utódok (%)			
	<i>cap^rery^r</i>	<i>cap^rery^r</i>	<i>cap^rery^r</i>	<i>cap^rery^r</i>
$\omega^- \text{cap}^r \text{ery}^r \times \omega^- \text{cap}^r \text{ery}^r$	47,5	41,5	6	5
$\omega^+ \text{cap}^r \text{ery}^r \times \omega^- \text{cap}^r \text{ery}^r$	44	44,5	7	4,5
	<i>oli^rpar^r</i>	<i>oli^rpar^r</i>	<i>oli^rpar^r</i>	<i>oli^rpar^r</i>
$\omega^+ \text{oli}^r \text{par}^r \times \omega^- \text{oli}^r \text{par}^r$	42,6	31,3	15,4	10,5

az *oli^r* (oligomicinrezisztens) és a *par^r* (paromomicinrezisztens) az előzőknél nagyobb rekombinációs gyakorisága is. A rekombinációs gyakoriság azt jelzi, hogy az utóbbi két gén távolabb van egymástól, mint a két előző. Az ω^+ és a ω^- jelzés két ún. „polaritási faktort” jelent, amelyek egyes keresztezésekben szabálytalan hasadási arányokat okoznak (a 18.1. táblázatban szereplő markerekre ez nem érvényes).

A 18.1. táblázat rekombinációs gyakorisági értékeiből nem lehet egyszerűen kiszámítani a géntávolságokat. Az egyik probléma a polaritási faktor, a másik az, hogy nagyon magas a nemzedékenkénti rekombináció, aminek következtében nagy a rekombináció gyakorisága két, valójában egymás közelében lévő gén között is. Az utóbbi jelenségnek az a következménye, hogy a kapcsoltságot nem lehet kimutatni, hacsak a gének nincsenek nagyon szorosan egymás szomszédságában.

Az élesztő mitokondriumaiban a kapcsoltságot elvileg becsülhető a rekombinációs gyakoriság alapján, mert a zigótában mindkét szülő mitokondriuma megmarad. A módszer azonban csak korlátozottan alkalmazható, mert a rekombinációs gyakoriság a legtöbb marker között annyira magas, hogy még akkor sem jeleznek kapcsoltságot, ha a gének viszonylag közel vannak egymáshoz.

TÉRKÉPEZÉS AZ ÉLESZTŐ PETITE MUTÁNSAIVAL

Anthony Linnane és munkatársai a rekombinációs gyakoriságok alapján történő géntérképezésnél hatékonyabb módszert dolgoztak ki. Az új típusú eljárás alapját az élesztő szuppresszív petite mutánsainak mtDNS-ében levő deléciók adják.

Petite mutánsok kodeléció és koretenciós térképezése

Minél közelebb van két gén egymáshoz, annál nagyobb a valószínűsége, hogy együtt vesznek el (kodeléció) a petite deléciós mtDNS-éből. Kövessük végig a két különböző oligomicinrezisztens mutáns, az *oli1* és az *O_{II}* valamint három másik marker

18.2. táblázat. Az élesztő petite mutánsok két génjének kodeléció és koretenciós analízise

Petite genotípus (<i>r</i> = megmaradt; <i>d</i> = kiesett)		Koretenció és kodeléció százalékos aránya az oligomicinrezisztencia faktorral	
		Retenció	Deléció
<i>mik1-r ery1-r</i>	<i>oli1</i>	100	0
	O_{II}	28	72
<i>mik1-d ery1-d</i>	<i>oli1</i>	5	95
	O_{II}	48	52
<i>par-r mik1-r</i>	<i>oli1</i>	71	29
	O_{II}	100	0
<i>par-d mik1-d</i>	<i>oli1</i>	72	28
	O_{II}	0	100

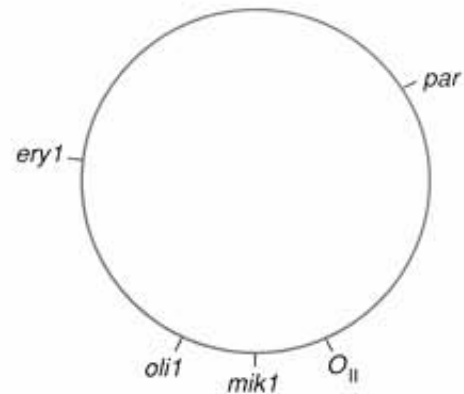
M. K. Trembath és mtsai: Biogenesis of Mitochondria 44 *Molecular and General Genetics*, 145, 43–52, © 1976, Springer Verlag

gén, az eritromicinrezisztencia *ery1*, a mikamicinrezisztencia *mik1* és a paromomicinrezisztencia *par* térképezését.

Hagyták, hogy az *oli1*-et, vagy az O_{II} -t és a másik három rezisztencia marker valamelyikét együtt hordozó törzsek spontán mutációval petite mutánsokká alakuljanak. Ez után megvizsgálták a petit mutánsok a markereinek retencióját, illetve delécióját. Az eredményeket a 18.2. táblázat foglalja össze. A *mik1* és az *ery1* retenciójakor az *oli1* is 100%-ban megmaradt. A *mik1* és az *ery1* delécióját 95%-ban követte az *oli1* kiesése is. Ennek alapján feltehető, hogy az *oli1* a *mik1* és az *ery1* között helyezkedik el. A másik oligomicinrezisztencia faktor azonban másképp viselkedik. Ha mind a *mik1*, mind az *ery1* megmaradt, az O_{II} retenciója csak 28% volt, a *mik1* és az *ery1* deléciója esetén pedig csak 52%-ban tapasztalták az O_{II} delécióját is. Eszerint az O_{II} nagy valószínűséggel nem az előző két gén között található.

Az O_{II} a *mik1* és a *par* között lokalizálódik. Ez abból a kísérleti eredményből következik, hogy mindig ezzel a két markerrel együtt esik ki vagy marad meg. Az *oli1* viszont nem minden esetben marad meg, vagy esik ki a *mik1*-gyel, illetve a *par*-ral, mert nem azok között található. A 18.11. ábrán az élesztő mitokondriális genomjának egyszerűsített géntérképe látható a fenti öt marker egymáshoz viszonyított helyzetével.

Hogyan állapították meg a markerek közötti távolságokat? Legtöbbjüket a markerek közötti rekombinációs gyakoriságok alapján határozták meg, de úgy is kaphatunk egy vázlatos képet, ha folytatjuk a petite mutánsok vizsgálatát. Most az *oli1* vagy az O_{II} mellett lévő mindkét markerüket elvesztett mutánsok kiválogatása helyett, azokat keressük meg, amelyeknél csak az egyik esett ki, és határozzuk meg az *oli1*-gyel, majd az O_{II} -vel együtt bekövetkezett deléciók gyakoriságát. Azt kaphatjuk például, hogy az O_{II} kodeléciója kétszer olyan gyakori a *mik1*-gyel, mint a *par*-ral. Következésképpen, közelebb lehet a *mik1*-hez, mint a *par*-hoz, ahogy az ábrán is látható.



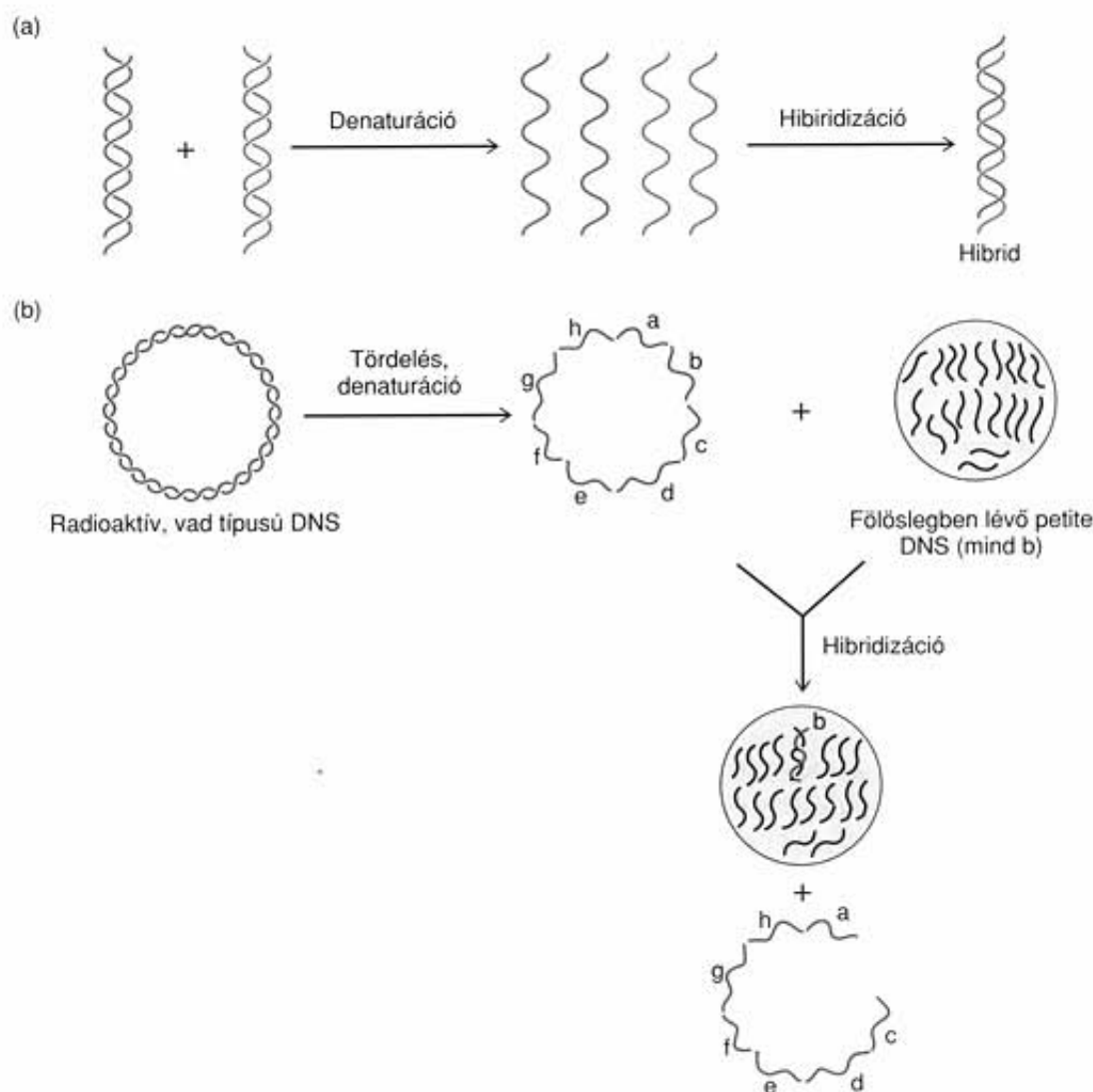
18.11. ábra. Az élesztő mtDNS-ének részleges genetikai térképe. A *par*, a *mik1* és az *ery1* a paromomicin-, a mikamicin- és az eritromicinrezisztencia markerei, az *oli1* és az O_{II} pedig az oligomicinrezisztencia két független markere

Az élesztő mitokondriális génjeinek kapcsoltságát a petite mutánsok kromoszómáján bekövetkező kodeléció és koretenció gyakoriságának megfigyelésével becsülhetjük. Minél szorosabban kapcsolt a két marker, annál nagyobb a valószínűsége a kodeléciónak, illetve a koretenciónak.

A petite mutánsok mitokondriális DNS-ének hibridizációs térképezése

A DNS–DNS-hibridizáció (l. 6. és 16. fejezet) a mitokondriális gének térképezésére is alkalmazható. Például a petite törzsből vett nagy mennyiségű mitokondriális DNS-t hibridizáljuk a vad típusból vett kisebb mennyiségű, radioaktívan jelölt mitokondrium DNS-ével, majd megállapítjuk, hogy a radioaktivitás hány százaléka esik a hibrid szakaszra (18.12. ábra). A kapott értékből megtudhatjuk, hogy a vad típusú genom hány százaléka van jelen a vizsgált mutánsban. Ha egy petite a normál genomnak mindössze 20%-át tartalmazza, a jelölt vad típusú DNS 20%-a hibridizál a nagy többletben lévő petite DNS-sel. A petite DNS-ét filteren rögzítjük, hogy a hibridben lévő radioaktív DNS mennyiségét egyszerűen meghatározhatjuk a filterre kötődött radioaktivitás mérésével.

Linnane az U4 típusú petite mutáns DNS-ét hibridizálta normál DNS-sel, és azt találta, hogy a normál DNS 36%-a képzett hibridet. Ebből az következik, hogy az U4 petite mutánsban a vad típus DNS-ének 36%-a maradt meg. Linnane azt is kimutatta, hogy az U4 mutánsban megtalálható a *cap1* marker, a klóramfenikolrezisztencia faktor, az *ery1*, az *oli1* és a *mik1* markerek. Más kísérletek alapján már ismert volt, hogy a *cap1* és a *mik1* távolsága a legnagyobb. Ezért arra a következtetésre jutott, hogy a két gént nem választhatja el egymástól nagyobb rész, mint a normál genom 36%-a, más szóval 36 DNS-egység.



18.12. ábra. A petite mutáns mtDNS-ének vizsgálata hibridizációs kísérlettel. (a) A hibridizáció menete: a közösnek gondolt szekvenciákkal rendelkező DNS-molekulákat denaturálják, majd az egyfonalas szálat kétfonalas hibrid száalakká hibridizáltatják. (b) A petite mutáns DNS-tartalmának megállapítása: vad típusú mitokondrium radioaktívan jelölt DNS-ét (piros) kisebb szakaszokra tördelik, denaturálják, és nagy fölöslegben lévő, egyfonalas petite mtDNS-sel hibridizálják valamilyen filteren. Az ábrán bemutatott petite DNS csak a vad mitokondrium genom b fragmentjével megegyező szakaszt tartalmazza, csak azzal hibridizál. A jelölt DNS százalékos aránya a filteren lévő hibrid molekulákban 12,5%, tehát a vad típusú mitokondrium genomjának 12,5%-a maradt meg a petite mutánsban

A különböző petite mutánsok DNS-ének hibridizálása is hasznos információkat nyújthat. Tanulmányozzuk a 18.13. ábrán bemutatott vizsgálatot! Először az U4 petite törzs DNS-ét az Y1,3 petite törzs DNS-ével hibridizálták. Az előzetes vizsgálatok szerint az U4 törzs 36, az Y1,3 pedig 58 DNS-egységet tartalmaz. A két DNS hibridizálása 18 egységnyi átfedést mutatott ki. A két genom markerei a következők:

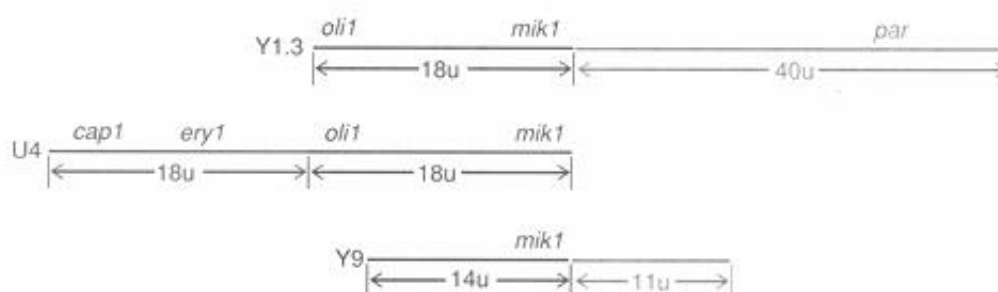
U4: *cap1*, *ery1*, *oli1* és *mik1*

Y1,3: *oli1*, *mik1* és *par*

A 18 egységnyi átfedő szakasz tartalmazza az *oli1* és a *mik1* markereket, tehát ezek legfeljebb 18 egységnyire vannak egymástól. Mivel az U4 DNS mérete 36 egység, és ebből 18 tartalmazza az *oli1*-et és a *mik1*-et, a másik 18 egységben kell lennie a *cap1* és az *ery1* markereknek. Ugyanilyen alapon, minthogy az Y1,3

DNS 58 egység, és ebből 18 hordozza az *oli1*-et és a *mik1*-et, a fennmaradó 40 egységnyi részben van a *par*. Vagyis a *par* legfeljebb 40 egységnyire lehet a *mik1*-től.

Az analízis tovább finomítható más petite mutánsok bevonásával. Az Y9 petite mutáns 25 egységnyi, és az U4-gyel csak a *mik1* a közös eleme (18.13. ábra). Az U4 és az Y9 törzsek DNS-ének hibridizálása azt mutatja, hogy 14 közös egységük van. Ennek alapján meghatározhatjuk az *oli1* helyzetét. A *mik1* és az *oli1* egy 18 egységnyi szakasz végein vannak az U4 DNS-én, és ennek a szakasznak a jobb vége 14 egységgel átfed az Y9-cel, amelyben nincsen benne az *oli1*. Ebből az következik, hogy az *oli1* marker az U4 bal szélső 4 egységében van. Az adatok a *par* pozíciójáról még valamit elárulnak. Az Y9 11 egysége, amely a *par* irányában található, nem hibridizál az U4-gyel (nem éri el a *par* pozícióját), tehát a *par* legalább 11 egységnyire van a *mik1*-től.



18.13. ábra. Az élesztő mitokondriális DNS-ének hibridizációs térképezése. Az átfedések bemutatására három petite mutáns, Y1.3, az U4 és Y9 genomját egymás mellé helyeztük. A DNS-molekulákat szimbolizáló vonalak alatt a genomok hossza olvasható DNS-egységekben. A színek a különböző törzsek DNS-ének egyes szakaszait emelik ki

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Négy mitokondrium gén (*A*, *B*, *C* és *D*) térképezésére petite élesztő mutánsokat használ és megfigyelései a következők:

1. *A* és *B* együttes deléciójakor, minden esetben a *C* is kiesik.
2. *C* és *D* együttes deléciójakor, mindig kiesik a *B* is.
3. *A* és *C* kodeléciójának gyakorisága 80%.
4. *B* és a *D* kodeléciójának gyakorisága 40%.
5. *A* *B* és a *C* kodeléciójának gyakorisága mindössze 20%.

Rajzolja fel a négy gén lineáris térképét! Az *A* legyen a bal oldalon, és tüntesse fel a hozzávetőleges távolságokat is!

MEGOLDÁS

Mivel a *C* mindig az *A*-val és a *B*-vel együtt esik ki, ezért *C*-nek *A*- és *B*-gén között kell elhelyezkednie. Hasonlóképpen, minthogy a *B*-gén mindig a *C*-vel és a *D*-vel együtt esik ki, közöttük kell lennie. A négy gén lineáris sorrendje:

A-C-B-D

A gének közötti távolság becslésére vegyük a kodeléció gyakorisági értékeit. A leggyakrabban az *A* és a *C* esik ki együtt (80%), így ezek vannak a legközelebb egymáshoz. *B*- és *D*-gén kodeléciója 40%, tehát távolabb vannak egymástól, mégpedig kb. kétszer olyan távolságban, mint *A* és *C*. Mivel a *C* és a *B* csak 20% gyakorisággal esik ki együtt, ezek vannak a legtávolabbra egymástól:

A-C---B-D

2. FELADAT

Két petite mutánst izolál és elnevezi őket 14x, illetve 17y-nak. A 14x mutáns hordozza a *C*-, *B*- és *D*-gént, és a teljes mitokondriális genom 50%-ával hibridizál, tehát 50 DNS-egységet tartalmaz. *C* és *D* egészen a 14x DNS-ének végéin helyezkednek el. A 17y mutáns hordozza a *B*-, *D*- és az *E*-gént, amely távolabb, a jobb szélén van. A 17y DNS-e az egész mitokondrium genom 40%-ával hibridizál, mérete ezért 40 egység. A két mutáns átfedése 20 egységnyi. Mekkora a *D*- és az *E*-gén maximális távolsága?

MEGOLDÁS

Mivel a 14x és a 17y átfedése 20 egység, és a *D*-gén a 14x DNS jobb szélén található, az átfedő szakaszt egyszerűen kivonhatjuk a 17y méretéből és megkapjuk a *D*-*E* távolságot: $40 - 20 = 20$ egység. A könnyebb érthetőség kedvéért vázoljuk fel a szakaszokat:

$$\begin{array}{r}
 \leftarrow 20 \rightarrow \\
 14x: \quad C \text{-----} B \text{---} D \\
 17y: \quad \quad \quad B \text{---} D \text{---} E \\
 \leftarrow 40 \text{---} \rightarrow \\
 \leftarrow 20 \rightarrow
 \end{array}$$

Ha az *E*-gén nem a 17y végén található, akkor *D* és *E* 20 egységnyi távolságra van egymáshoz.

Az élesztő mitokondriális géneinek térképezéséhez a petite törzsek és a vad típus DNS-ének hibridizálása vagy a petite DNS-ek hibridizálása nyújt információt. A vad típusal végzett hibridizációból megtudhatjuk, hogy a vad típusú DNS hány százaléka maradt meg a mutánsban. A petite DNS-ek egymás közötti hibridizálásával pedig a kétféle mutáns genom közötti átfedést állapíthatjuk meg.

KLOROPLASZTISZGÉNEK TÉRKÉPEZÉSE

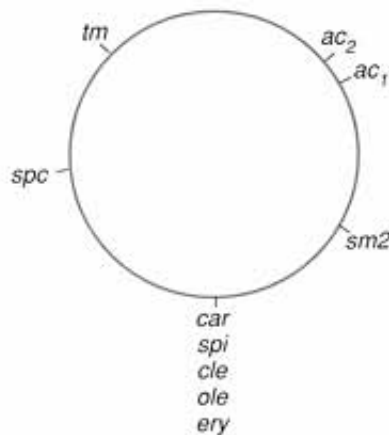
A kloroplasztiszgenomot hagyományos genetikai analízissel is vizsgálták, például a *Chlamydomonas* esetében. Ez első látásra lehetetlennek tűnhet, mert a hagyományos térképezés a rekombinációs gyakoriság analízisén alapul, a *Chlamydomonas* zigótában pedig majdnem az összes *mt⁻* DNS degradálódik. Hogyan történhet rekombináció, ha az egyik szülő kloroplasztiszgenomja elvész?

A válasz természetesen a „majdnem” szóban rejlik. A *Chlamydomonas* zigóták körülbelül 0,1%-a **citoplazmatikus heterozigóta**, mert mind az *mt⁺*, mind az *mt⁻* kloroplasztisz DNS megmarad bennük. Ezeket **citohet** néven is szokták említeni, mert a két különböző kloroplasztisz miatt heterogén citoplazmával rendelkeznek. A citohetben a kloroplasztisz DNS-ek rekombinálódnak. A rekombinánsok megjelenésének esélye nem túl nagy (hiszen a citohetek is ritkák), de je-

lentősen növelhető, ha az mt^+ szülőt ultraibolya fényel kezelik. A kezelés valószínűleg inaktíválja a DNS-t degradáló mechanizmust, így akár 40-100% citohet is keletkezhet a szokásos 0,1% helyett.

Sager a spontán megjelenő és a sugárzással létrehozott citohetek segítségével kétféle módszerrel elemezte a kapcsoltságot. Az egyik a szabályos rekombinációs analízis volt, a másik az ún. **koszegregációs analízis**. Az utóbbi módszer alapelve az, hogy két különböző markert hordozó szülőt kereszteznek, majd a meiózis utódsejtjeit, illetve a zoospórák első néhány mitózissal létrejövő utódgenerációját vizsgálják a markerek szegregációjának kimutatására. Ha két marker egy gamétából származik és szorosan kapcsolts, rendszerint együtt szegregálódik. Ha kapcsoltságuk nem szoros, nagyobb a független hasadás valószínűsége. A 18.14. ábra a *Chlamydomonas* kloroplasztisz-géntérképének vázlatát mutatja be, amelynek felderítéséhez mindkét módszer hozzájárult. A legtöbb marker antibiotikum-rezisztencia mutánt jelent.

A *Chlamydomonas* citohetjei, amelyek mt^+ és mt^- kloroplasztisz DNS-t egyaránt tartalmaznak, természetes körülmények között kis gyakorisággal (0,1%) fordulnak elő. A gyakoriság 40-100%-ra növelhető, ha az mt^+ gamétát ultraibolya sugárzással kezelik a keresztezés előtt. A kloroplasztiszgének kapcsoltsága becsülhető a citohetek rekombinációs és koszegregációs analízisével.



18.14. ábra. A *Chlamydomonas* kloroplasztiszának vázlatos géntérképe. A feltüntetett mutációk rövidítései: ac_1 , ac_2 – acetát igényes; $sm2$, car , spi , cle , ole , ery , spc – sztreptomycin-, karbamicin-, spiramicin-, kloeizin-, oleandomicin-, eritromicin-, spektinomycin-rezisztencia gének; tm – hőmérséklet-érzékenység mutációja.

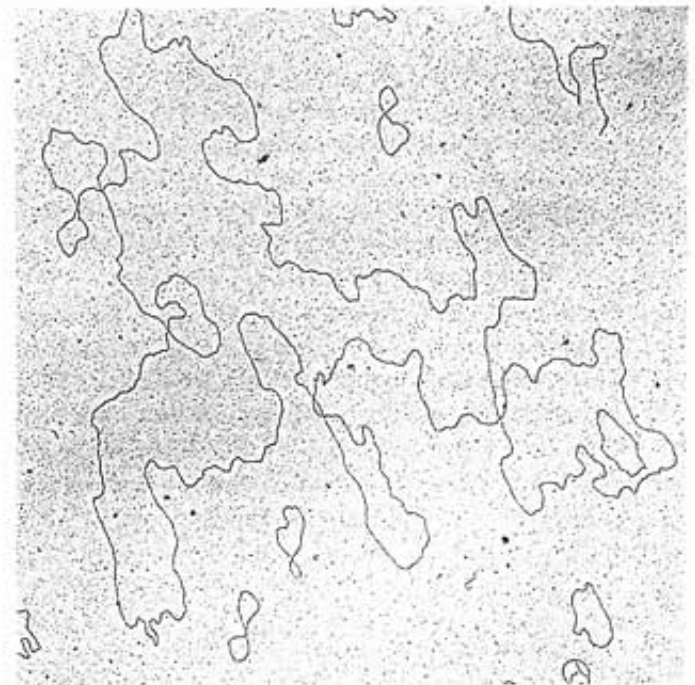
A SEJTORGANELLUMOK MOLEKULÁRIS GENETIKÁJA

A fejezet korábbi részeiben tárgyalt kísérletek feltárták, hogy a kloroplasztiszok és a mitokondriumok géneket tartalmaznak. A sejtorganellumok génjeit általában gyűrű alakú DNS-molekulák hordozzák. Az organelum DNS molekuláris genetikai vizsgálatai sok információt szolgáltattak a genom szerveződésével és a bennük tárolt genetikai információ kifejeződésével kapcsolatban.

A KLOROPLASZTISZ CIRKULÁRIS DNS-E

A 18.7. ábrán látható kísérlet igazolja, hogy a kloroplasztisz DNS-ének sűrűsége eltérő bázisösszetétele miatt különbözik sejtmag DNS-étől, ezért cézium-klorid sűrűséggradiens-centrifugálással elválasztható tőle. A különválasztott kloroplasztisz DNS elektronmikroszkópos képén (18.15. ábra) tisztán látható, hogy a molekula gyűrű alakú, szuperhelikális szerkezete nincs. Ha belenézhetnénk egy kloroplasztiszba, a nukleoidban több cirkuláris DNS-t látnánk, hasonlóan a prokarióták nukleoidjához, és benne a DNS-molekulák szupertekercselt formában találhatók.

Mekkora a kloroplasztisz DNS-e? A 18.15. ábrán a saláta kloroplasztisz DNS-e látható, mérete 150 kb. A legtöbb virágos növény, a mohák és páfrányok kloroplasztisz DNS-e hasonló méretű. Az algáknál figyelemre méltó változatosság



18.15. ábra. A felvétel közepén lévő nagy cirkuláris molekula a saláta kloroplasztisz DNS-e. Az $\phi X174$ bakteriofág kis kör alakú DNS-molekuláit a molekulaméretük összehasonlítása miatt keverték az organelum DNS-hez

Richard D. Kolodner felvétele, engedélyével

tapasztható a kloroplasztiszgenom méretében. A skála a *Codium fragile* 57 kb méretű kloroplasztisz DNS-étől a *Chlamydomonas reinhardtii* 195 kb nagyságú DNS-én át az *Acetabularia* 1500 kb értékéig terjed. Ez utóbbi, nem csak méretét tekintve, hanem alakjában is kivételes. Kloroplasztiszának legnagyobb DNS-molekulája lineáris és mellette több, kisebb kör alakú molekula is van.

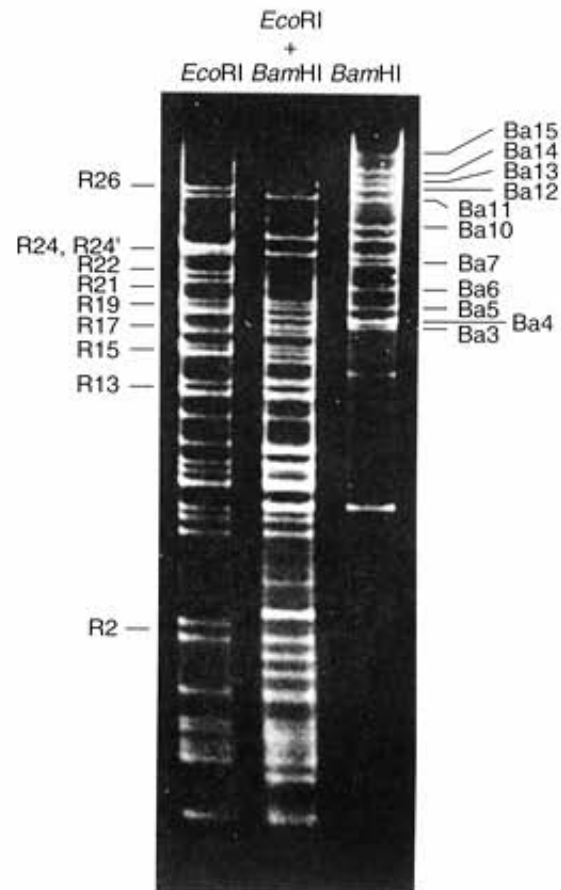
Ahogy már említettük, a kloroplasztiszgenom általános jellemzője a poliploidia. A spenót kloroplasztiszában például a levél korától függően 30-200 kópia található, a fiatalabb levelek kloroplasztiszában több a DNS. A búza fiatal leveleiben még ennél is több, körülbelül 1000 kópia van. A poliploidia miatt sok kloroplasztisz DNS-tartalma nagyobb, mint a baktériumoké. A kloroplasztisz DNS kódoló kapacitása azonban sokkal kisebb, mint a bakteriális genomé, mert az összes kópia ugyanazt az információt hordozza.

A kloroplasztisz DNS legtöbbször cirkuláris, mérete 57 kb-tól 195 kb-ig terjed. A kloroplasztiszgenom poliploid, a gyűrű alakú molekulák száma a fiatal levelek kloroplasztiszában elérheti az ezret is.

A KLOOROPLASZTISZ GENOM MOLEKULÁRIS TÉRKÉPEZÉSE

A genetikusok a kloroplasztiszgenom szerkezetének megfigyeléséhez főként két módszert alkalmaztak, a restrikciós térképezést, és a DNS-szekvenálást. Az eljárás első lépése a DNS fizikai térképének összeállítása (l. 16. fejezet). A *Chlamydomonas* kloroplasztisz DNS-én például 36 *EcoRI* hasítóhely van, ami azt jelenti, hogy az enzim 36 darabra hasítja a molekulát. A *BamHI* enzimnek 17 restrikciós helye van a DNS-en, tehát 17 fragmentumot hoz létre. A 18.16. ábrán látható a DNS-fragmentek elektroforetikus vizsgálatának eredménye, amelyet a két enzimmel külön-külön, illetve együtt végzett hasítás után készítettek.

A restrikciós fragmentumok szétválasztása után rekonstruálhatjuk, miként illeszkednek egymáshoz a DNS-darabok az ép genomban. Ennek egyik módja, hogy izoláljuk az egyik *BamHI* fragmentet, radioaktív izotóppal megjelöljük, és az *EcoRI* kezeléssel kapott fragmentekkel hibridizáljuk. Egy vagy több *EcoRI* fragmentumnak kell radioaktívan jelölődnie, és ennek alapján kiderül, melyek vannak egymás mellett. A 18.17. ábrán látható a *Chlamydomonas* kloroplasztisz DNS-ének térképe, amely *EcoRI* és *BamHI* enzimekkel kapott fragmentumok alapján plusz egy harmadik enzim, a *BglII* tizenkét fragmentjének vizsgálatával készült. Látható például, hogy a *BglII*-vel kapott Ba10 fragmentum átfedésben van az *EcoRI* enzim R17, R10 és R24 fragmentjeivel, ezért mindhárommal hibridizál. A folyamatot a 18.18. ábra szemlélteti. A kísérlet akkor is igazolná, hogy a három említett fragmentum szomszédos, ha egyéb információ nem állna rendelkezésre. Ugyanilyen okból a radioaktívan jelölt R24 hibridizál a Ba10-zel és Ba13-mal, mivel azok szomszédosak.

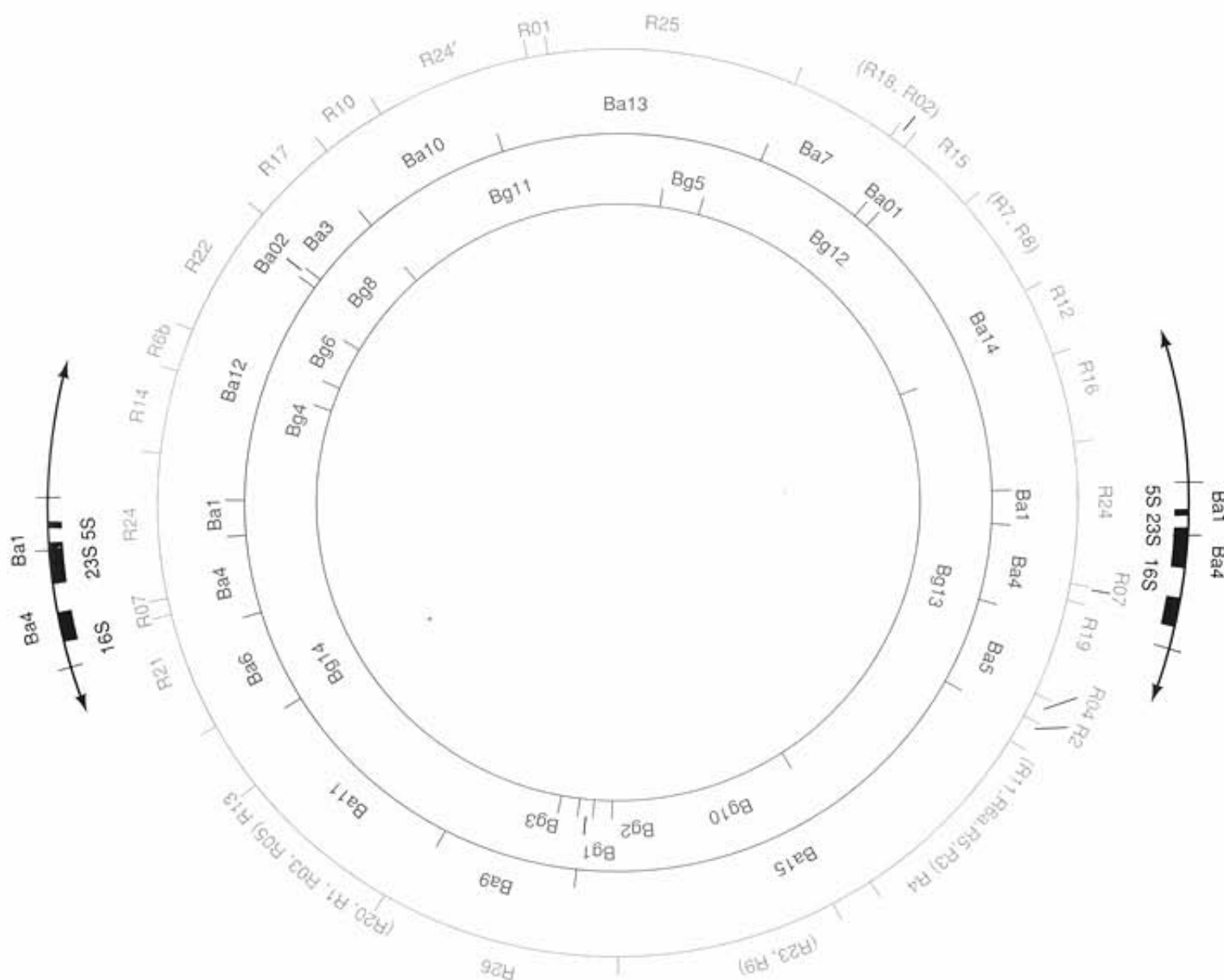


18.16. ábra. A *Chlamydomonas* kloroplasztisz DNS-ének restrikciós fragmentjei. A DNS-t *EcoRI*, illetve *BamHI* enzimekkel hasították, valamint a középső mintában a két enzim együttes alkalmazásával hidrolizálták. A képződött fragmentumokat elektroforézissel elválasztották, fluoreszcens festékkel festették, és ultraibolya fényben láthatóvá tették

Forrás: Rochaix, J. D., *Journal of Molecular Biology*, 126:604, 1978

RNS-DNS-hibridizáció alkalmazása a gének lokalizálására

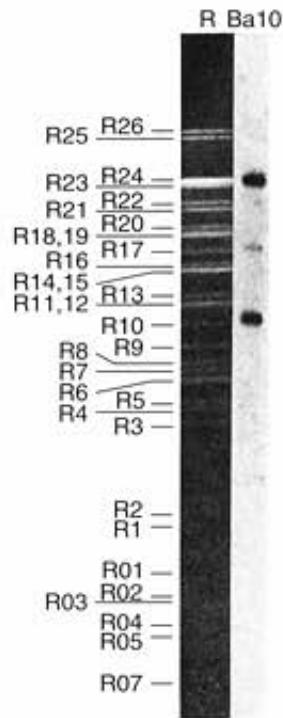
Miután elkészült a 18.17. ábrán látható térkép és megvan minden szükséges „jelzőtábla”, elkezdhetjük a gének helyének meghatározását. J. D. Rochaix és munkatársai tisztított kloroplasztisz rRNS-eket hibridizáltak különböző restrikciós fragmentekkel, többek között az R07, R24, Ba4 és Ba1-gyel. Rochaix felfedezte, hogy ez a négy szakasz kétszer olyan erősen festődik fluoreszcens festékkel, mint ahogyan egy ilyen méretű fragmentum festődni szokott. Ebből arra következtetett, hogy a vizsgált fragmentumok mindegyike két példányban fordul elő a genomban. A térképezés során a feltételezés igazolódott és kiderült, hogy a fragmentumok két inverziós, ismétlődő egysége távol helyezkedik el egymástól a DNS-en. Másképp fogalmazva, az rRNS-gének két példányban található meg a kloroplasztisz genomjában ellenkező orientációval (18.17. ábra). Ez az elrendeződés több algafajra is jellemző a *Chlamydomonas*on kívül, ezen kívül majdnem mindegyik szárazföldi növényre (a borsó kivétel). A *Chlamydomonas* esetében a kloroplasztisz 23S rRNS Ba1 fragmentumának R-hurkos vizsgálatával (l. 10. fejezet) egy intron létezését mutatták ki mindegyik 23S rRNS-génen belül (18.19. ábra).



18.17. ábra. A *Chlamydomonas* kloroplasztiszgenomjának térképe: az ábra az EcoRI (szürke), a BamHI (piros) és a BglI (kék) restriktív enzimek segítségével kapott fragmentumok relatív helyzetét mutatja be. A fragmentumok elnevezése a restriktív enzim valamely kiemelt betűjével és a fragmentumok számozásával történt: EcoRI – R; BamHI – Ba; BglI – Bg. A zárójelben feltüntetett fragmentumok sorrendje még nem ismert. Bejelöltük a két ellentétes irányultságú rRNS-t kódoló régió térképhelyzetét is. Az inverz szakaszokat nyilak jelzik. Figyeljük meg, hogy ezekben a szakaszokban teljes egészében ismétlődnek a Ba1, a Ba4, illetve az R07 és az R24-es restriktív fragmentumok

A kloroplasztiszok genomja nemcsak az rRNS-géneket, hanem a tRNS-gének teljes sorozatát is tartalmazza. A különböző növények kloroplasztiszából izolálták a tRNS-eket, és segítségével ugyanúgy lokalizálták génjeiket, ahogyan azt az rRNS-gének helyének megállapításánál láttuk. A kloroplasztiszok genomja számos polipeptidet kódol, amelyek génjeit a tisztított mRNS-ek és a DNS restriktív fragmentjeinek hibridizációjával lehet lokalizálni. Más esetekben épp az ellenkező oldalról közelítették meg a problémát: a restriktív fragmentet izolálták, majd *in vitro* átírták, és a képződő mRNS-t használták fel a polipeptid szintézisére. Az így szintetizált fehérjét egy olyan ellenanyag segítségével azonosították, amelyik specifikusan egy bizonyos kloroplasztiszfehérjéhez kötődött. A 18.20. ábra négy különböző növény kloroplasztisz DNS-ének vázlatos térképét mutatja be.

A kloroplasztisz DNS géntérképét restriktív enzimek segítségével állították össze. A hasítás során keletkező fragmentumokat elektroforézissel elválasztották, azonosították, és egymás közti hibridizálásukkal felderítették az átfedéseket. A gének helyzetét az rRNS-termékek és a fragmentumok hibridizálásával határozták meg. A legtöbb kloroplasztisz DNS-ben mindegyik rRNS-génnek két inverz kópiája van. A kloroplasztiszok ezen kívül az összes tRNS-t és több mint huszonöt fehérjét is kódolnak.

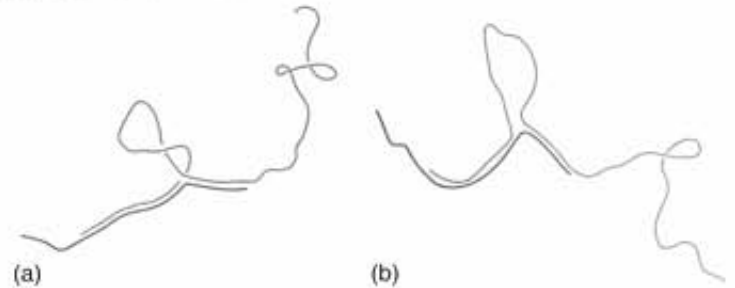
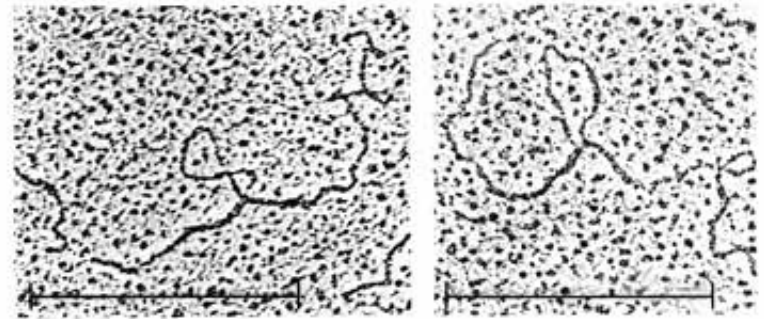


18.18. ábra. Géntérképezés restriktív fragmentumok hibridizációjával. Rochaix a *Chlamydomonas* kloroplasztisz DNS-ét *EcoRI* enzimmel darabolta és a fragmentumokat két oszlopban vizsgálta elektroforézissel. A bal oldali (R) mintában olyan festést alkalmazott, hogy markerként szolgáljon. A jobb oldali (Ba10) mintán ugyanezeket a fragmentumokat a *BamHI* restriktív emésztéséből származó, radioaktívan jelölt Ba10-es fragmentummal hibridizáltatta. A radioaktív hibrideket autoradiográfias eljárással hívta elő. A Ba10 fragmentum az R24, R17 és R10 fragmentumokkal hibridizált, ahogyan azt az előző ábra alapján várták.
Forrás: Rochaix, J. D., *Journal of Molecular Biology*, 126:604, 1978. Az Academic Press engedélyével

A kloroplasztisz DNS szekvenálása

Az eddig bemutatott vizsgálatok jó áttekintést adtak a kloroplasztisz géntérképezési technikáiról, de egy új eljárás, a DNS-szekvenálás segítségével már tökéletesen sikerült megfejteni a térképet. Három japán kutatócsoport két faj teljes kloroplasztisz DNS-ének bázisszekvenciáját derítette fel. A májmoha (*Marchantia polymorpha*) kloroplasztisz DNS-e 121 024 bázispárt, a dohány (*Nicotiana tabacum*) kloroplasztisz DNS-e 155 844 bázispárt tartalmaz. A szekvenciák összehasonlításából kiderült, hogy ezek a genomok nagyon hasonlítanak egymáshoz. Az rRNS-ek és a tRNS-ek mellett ötvenöt azonosítható fehérjét kódolnak, és ezenfelül még körülbelül harminc hipotetikus fehérjét. Az utóbbiak létét a kimutatott nyitott leolvasási keretek (ORF) alapján jósolták meg. A nyitott leolvasási keretek olyan DNS-szekvenciák, amelyeket nem szakít meg translációs stopjel. A 18.21. ábrán a májmoha kloroplasztisz DNS-ének szekvenálással készített térképe látható. Nemrég a rizs és az *Euglena* kloroplasztisz DNS-ét is sikerült szekvenálni.

A 18.21. ábrán felismerhető gének a kloroplasztiszok származásának kérdéséhez is érdekes adalékot jelentenek. Először is, a gének prokarióta jellegűek. Megvan például az *E. coli* RNS-polimeráz enzim mag (core) alegységét kódoló gén megfelelője, vagyis a kloroplasztisz RNS-polimeráza jobban hasonlít egy bakteriális RNS-polimerázhoz, mint a növény sejtmagjában lévő RNS-polimerázhoz.



18.19. ábra. Az R-hurok kialakulásának vizsgálata *Chlamydomonas* 23S rRNS-ével. A 23S rRNS-t kódoló Ba1 fragmentumot hibridizálták a 23S rRNS-sel, majd a hibridet elektronmikroszkóppal vizsgálták. Az ábrán két kísérlet (a és b) eredménye látható, a magyarázó rajzokon az RNS piros, a DNS kék színű. Figyeljük meg a hibrid molekulák közepén jól kivehető hurkot, ami az érett rRNS-ből hiányzó, de a DNS-ben megtalálható intronok felel meg.

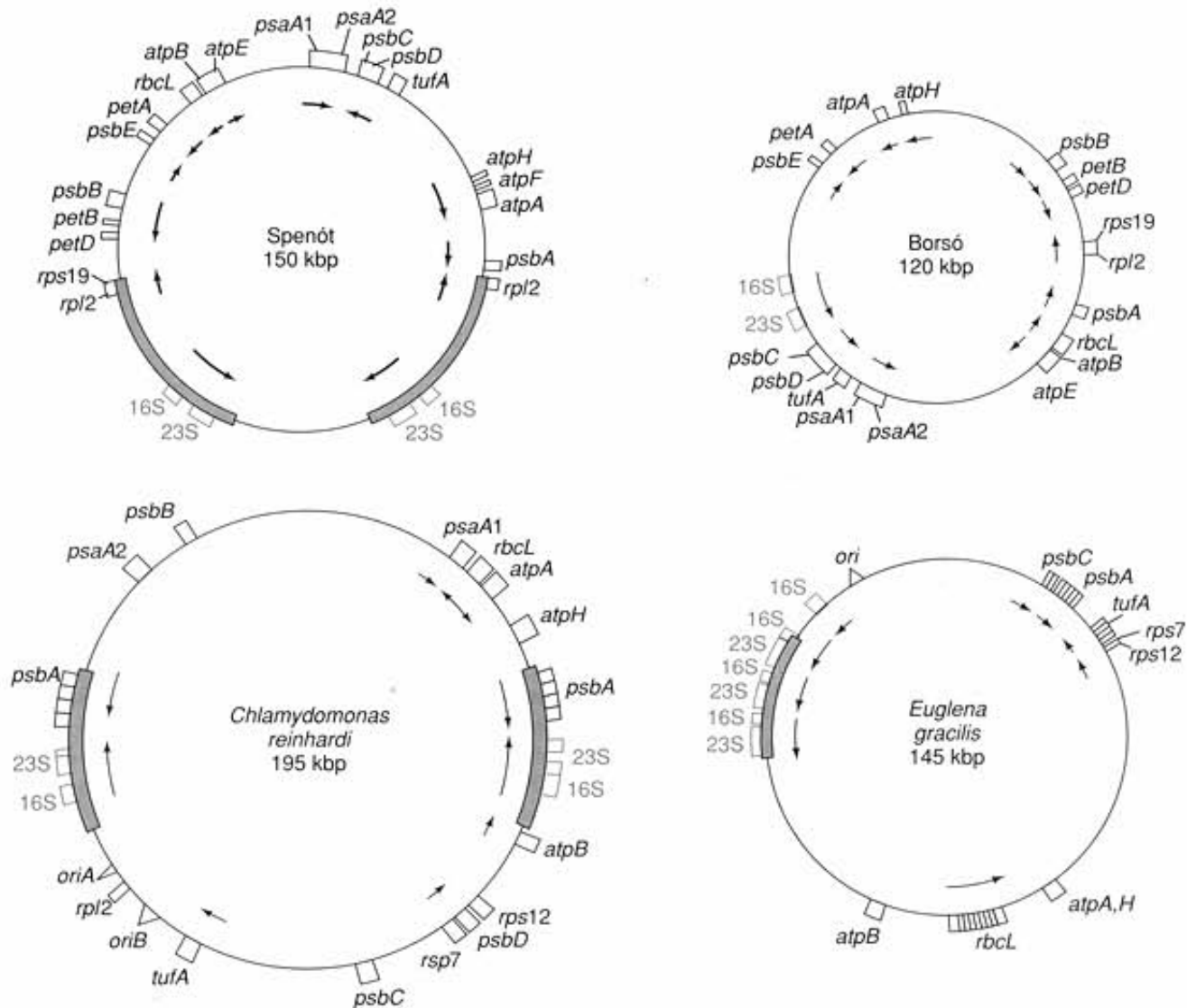
Rochaix, J. D. és P. Malnoe, *Cell*, 15:666, 1978 © Cell Press

Még ennél is megdöbbentőbb, hogy néhány kloroplasztiszgén operonokba szerveződik, ami pedig a nukleáris genom esetében ismeretlen. Az operonok egyik párjában, amely a riboszómális fehérjék nagy részét kódolja (például az *L2*-gén a nagy alegység *L2* fehérjéjét, az *S3*-gén pedig a kis alegység *S3* fehérjéjét) a következő a gének elrendeződése:

L23-L2-S19-S3-L16-L14-S8-infA-secX-S11-rpoA

Ez a génszekvencia azonos az *E. coli*-génnek sorrendjével, ami meggyőző érv a kloroplasztiszok prokarióta eredetére. Másrészt egyes kloroplasztiszgének intronokat tartalmaznak, ami pedig az eukarióták jellemzője. Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a kloroplasztiszok a mai prokarióták őseitől származtathatók, és ezek a primitív szervezetek még nem szabadultak meg az intronoktól, így az intronok a mai napig megmaradtak, mint egy korábbi, kevésbé kifinomult rendszer maradványai. A másik lehetőség, hogy az intronok a sejtmagból vagy más szervezetekből jutottak be a plasztiszba.

Eddig több különböző kloroplasztisz genom teljes DNS-szekvenálását végezték el. Ezek a DNS-molekulák kódolják a plasztisz minden rRNS-ét, tRNS-ét, emellett több mint nyolcvan fehérjéjét, amelyek közül ötvenötöt sikerült azonosítani. A kloroplasztiszok génjei szekvenciájukat és szerveződésüket tekintve egyértelműen prokarióta jellegűek, leszámítva, hogy intronokat tartalmaznak.



18.20. ábra. Négy kloroplasztisz DNS-térképe. Az rRNS-ek géneket (kék) nevükkel jelöltük (16S és 23S). A kloroplasztisz-fehérjék géneit hárombetűs rövidítések jelzik (*psb*, *pet* stb.). A vastagított szürke vonalak az ismétlődő szakaszokat jelentik

A MITOKONDRIÁLIS GENOM MOLEKULÁRIS TÉRKPEZÉSE

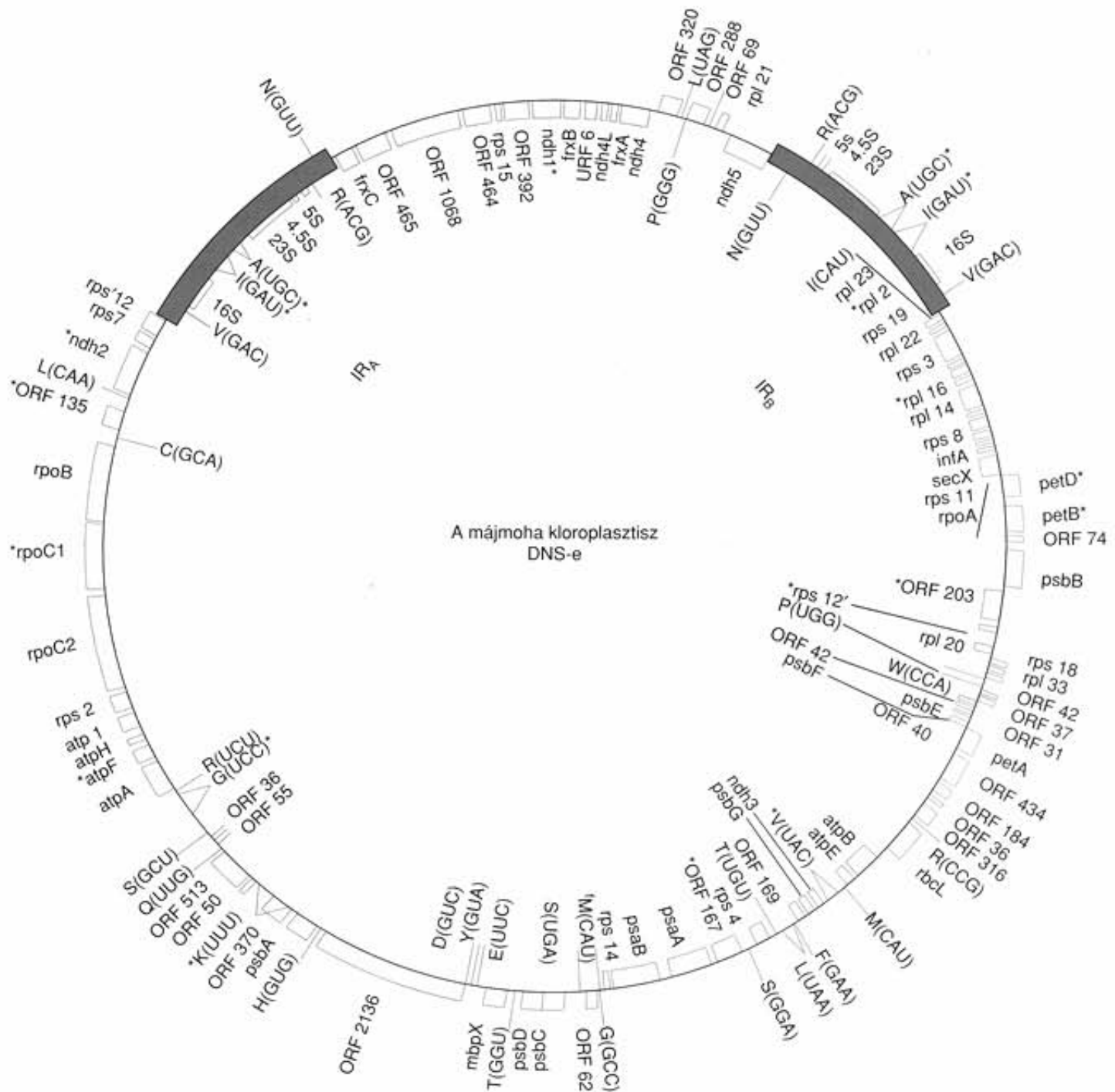
A különböző rendszertani kategóriákba tartozó élőlények mitokondriális DNS-e nagyon változatos méretű. Az állati sejtek mitokondriális DNS-e a legegyszerűbb, mintegy 16 kb méretű. Ezután az élesztő mitokondriuma következik, melynek DNS-e 75 kb nagyságú. A sort a szárazföldi növények zárják, feltűnően összetett, változatos mitokondriumgenomjukkal. Egyes esetekben a restriktív enzimekkel hasított fragmentumok teljes hossza meghaladja az 1000 kb-t. Ennek fényében nem meglepő, hogy az állati sejtek mitokondriumait tanulmányozták a legalaposabban.

Az emlősök mitokondriumainak DNS-szekvenciái

Az emlősök, köztük az ember és a szarvasmarha mitokondriális genomjának DNS-szekvenciáját teljes egészében sikerült meg-

határozni. A szekvenciák rendkívül hatékony és gazdaságos működésről árulkodnak. A 18.22. ábra az ember kisméretű mitokondriális DNS-ét szemlélteti az élesztő mitokondriális genomjával összevetve. Arányait tekintve az emberi mitokondriális DNS még kisebb az itt ábrázoltnál. A rajzon mintegy kétszeresére növelték a méretét, hogy a feliratok olvashatóak legyenek.

Az emberi mitokondriális genomban nincsen fölösleges szekvencia. Először is, a gének nem tartalmaznak intronokat. A gének között csak néhány extrabázis van – ha van egyáltalán –, sőt egyes gének kisebb átfedő szekvenciákat tartalmaznak. Ugyancsak a gazdaságosságot jelzi, hogy a génekben az mRNS-eket kódoló régiók előtt és után nincsenek nem kódoló, határoló szekvenciák. Ehelyett az iniciációs kodon nagyon közel esik az mRNS-ek 5'-végehez, a terminációs kodon pedig pontosan a 3'-végeken található. Történetesen a mRNS-eknek több mint a felében a translációs stopjel sem teljes, ezzel a rendszer mRNS-enként egy-két bázist megtakarít. Hogyan történik akkor a transláció befejezése? A megoldás a követke-

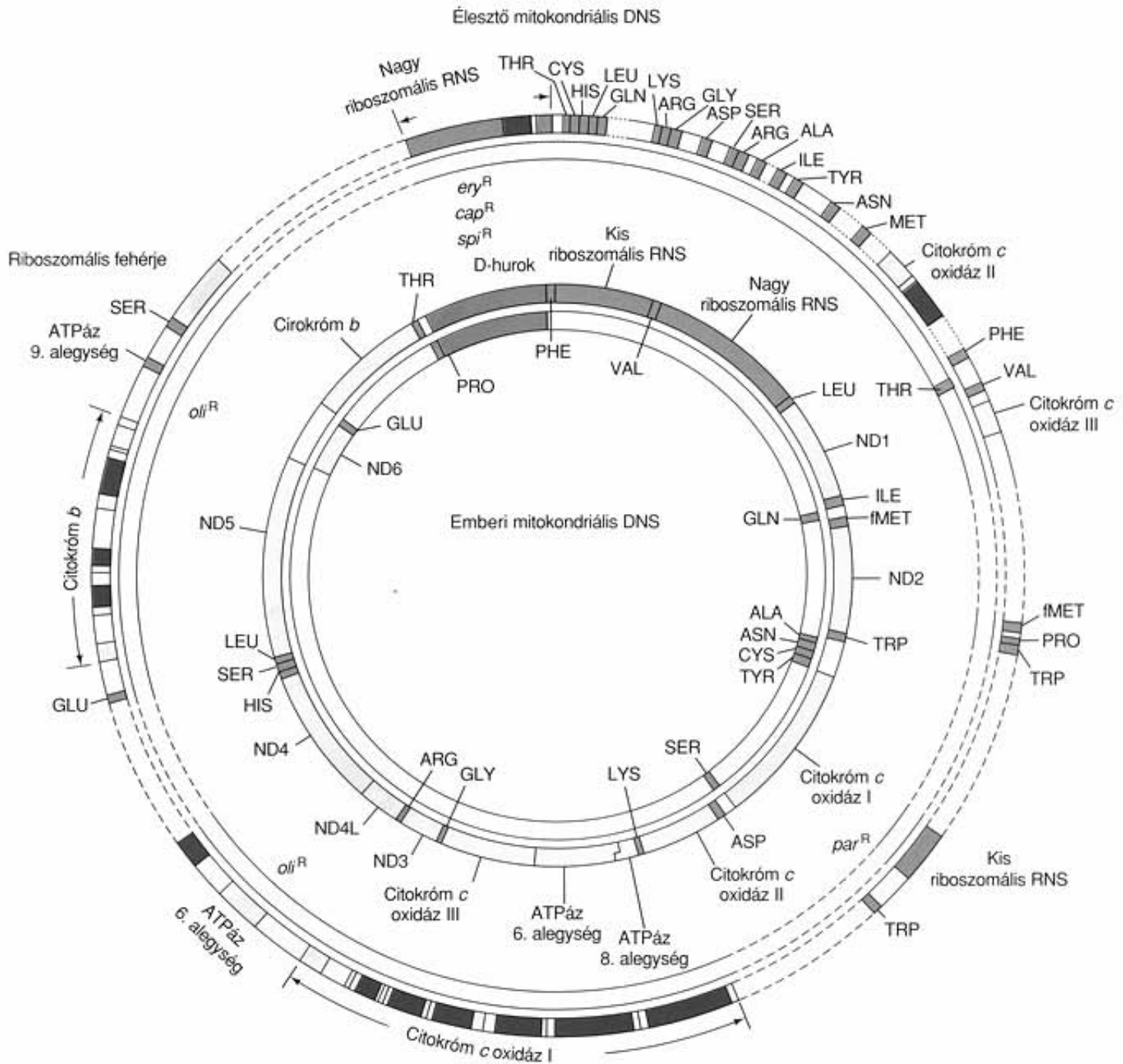


18.21. ábra. A májmoha kloroplasztiszának genomja. A vastag piros vonalak az inverz ismétlődő szakaszokat (IR_A és IR_B) emelik ki, amelyek az rRNS-ek génjeit tartalmazzák. Az ábra belső körén feltüntetett gének az egyik, a külső körön jelölt gének a DNS másik száláról íródnak át. Azok a gének, amelyeknek jelzése egy nagybetűvel indul és utána zárójelben másik három nagybetű következik, a tRNS-ek génjei. Az első betű a tRNS által felismert aminosavat jelzi, a zárójelben lévő három betű pedig az antikodon szekvenciája. Az intronokat tartalmazó géneket csillag emeli ki

zõ: ha a stopjelből az utolsó egy-két adenin hiányzik (pl. az UAA kodonból), akkor a poliadenilációs lépésben valószínűleg pótlódik, és ezzel a kodon kiegészül. A feltételezett mechanizmust a 18.23. ábra vázolja.

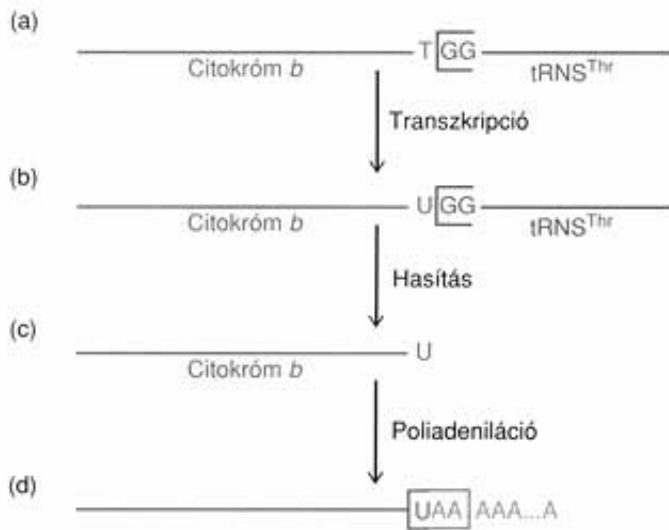
Mivel a mitokondriumok a kloroplasztiszokhoz hasonlóan képesek fehérjeszintézisre, várhatóan szintén tartalmazzák az rRNS-ek és a tRNS-ek génjeit. Az ember mitokondriumának

térképén (18.22. ábra) látható, hogy ez valóban így is van, de mind a nagy (16S), mind a kis (12S) rRNS génje jóval kisebb az eukarióták sejtmagjában, illetve a prokariótákban lévő rRNS-génekénél. Az mtDNS 22 tRNS-gént is tartalmaz. Ez éppen eggyel több, mint az elméletileg szükséges minimum, a húsz aminosavat és a lánckezdő formilmetionint is figyelembe véve. Az rRNS- és a tRNS-gének mellett az emberi mitokondriális DNS tizen-



18.22. ábra. Az ember és az élesztő mitokondriális DNS-ének térképe. A térképek mutatják a DNS-ek mindkét szálát, az egyes géneket azon a szálon feltüntetve, amelyikről az átírás folyik. Az emberi mitokondriális DNS-t az élesztőéhez viszonyítva kétszeresére nagyították. Az rRNS-géneket kék, a fehérjéket kódoló részeket sárga, a tRNS-géneket zöld szín jelzi. Az azonosítatlan leolvasási keretek lilák, a D-hurok piros. Az élesztő genomjában sok azonosítatlan leolvasási keret található az intronokon belül (például a citokróom-oxidáz génjében). Ezekben az esetekben az intron azonosítatlan leolvasási kerete is lila színű, nem fehér. A tRNS-gének a megfelelő aminosav három-betűs rövidítése alapján azonosíthatók, és szerepelnek az előző térképeken bemutatott antibiotikumrezisztencia gének is. Az ND1–6 a NADH-dehidrogenáz 1–6 alegységének kódja

Forrás: Grivell, L: *Mitochondrial DNA*. Copyright © 1983 Scientific American, Inc. engedélyével



18.23. ábra. Az ember mitokondriális génjeinek működése a transláció terminációs kodonjai nélkül. (a) A citokróm *b* génjének (kék) és a threon tRNA-génjének (piros) kapcsolódásánál szögletes zárójel mutatja az átfedési pontot. A citokróm *b* génben nincs translációs stopkodon. (b) A gének együtt íródnak át, a folyamat eredménye policisztronos RNS. (c) Az átíródott RNS-t az enzim a kapcsolódási pontnál hasítja, így az mRNA 3'-végen marad egy U. (d) A translációs stopjel, az UAA szekvencia poliadenilációval (szürke) alakul ki

három hosszú, nyitott leolvasási keretet tartalmaz, amelyek mitokondriális fehérjéket kódolnak. Az egyik ilyen nyitott leolvasási keret specifikus defektusa áll az ember egyik öröklődő betegségének hátterében (l. 18.1. melléklet).

Az ember mitokondriális DNS-ének mindkét fonalán található gének, így a mitokondriális RNS-polimeráz egyetlen promotertől kiindulva egyszerre, egy darabban írja át a két szálát. Ez azt jelenti, hogy a mitokondrium génműködésének szabályozása viszonylag egyszerű, és poszttranszkripció mechanizmusoktól függ.

Amikor a genomnak megfelelő méretű RNS elkészült, használható szakaszokra kell darabolni. A folyamat pontos mechanizmusa még nem ismert, de Giuseppe Attardi egy érdekes, ún. **tRNA punktuációs hipotézist** javasolt. Nézzük meg ismét a 18.22. ábrát! Feltűnő, hogy majdnem minden rRNA-t vagy mRNA-t kódoló szakaszt tRNA-gének fognak közre. Ezért valószínűleg mindössze egyetlen olyan ribonukleázra van szükség a preRNS feldarabolásához, amely felismeri a tRNA-ek végét, és azokon a helyeken elhasítja a preRNS-t. Az enzim ezzel szabaddá teszi a tRNA-eket, de egyúttal a nagyobb rRNA-eket és az mRNA-eket is.

A DNS-szekvenálás nagyszerű lehetőséget biztosít, hogy megismerjük a mitokondriumok és a kloroplasztizok genomjának szerkezetét. Ugyanakkor a nyitott leolvasási keretek problémája rávilágít a módszer előnyeire és gyengeségeire is. A szek-

18.1. A mitokondriális mutációk és a betegségek

Az ember testi sejtjei diploidok, a legtöbb kromoszómából két példányt tartalmaznak, ezért általában két mutáció szükséges ahhoz, hogy egy nukleáris gén mindkét kópiája inaktiválódjon. Ugyanakkor egy átlagos emberi sejtben mitokondriumok ezrei találhatóak. Vajon ez azt jelenti, hogy csak független mitokondriális mutációk ezrei vezetnek fenotípusos hatáshoz? Ha így lenne, valószínűleg sosem találkozoznánk a mitokondriumok mutációjára visszavezethető betegségekkel. Azonban több betegség vezethető vissza mutáns mitokondriális génekre. Hosszabb idő alatt bizonyos sejtek felhalmozhatják magukban a mutáns mitokondriumokat, és az energiatermelés részleges elvesztése miatt sejtműködési zavarok alakulhatnak ki bennük.

Úgy tűnik, a mitokondriumok csökkent működésével függ össze a Lebers-féle öröklődő látóideg-neuropátia (LHON), amely az egyik legjobban tanulmányozott ilyen jellegű betegség. Az LHON anyai öröklődésű, és a látóideg degenerációja miatt már fiatal korban vakságot okoz. A betegség oka, úgy tűnik, egy G → A tranzíció az ND4 génben, amely a mitokondriális NADH-dehidrogenáz enzim negyedik alegységét kódolja (18.22. ábra). A legtöbb szövetben ez nem okoz problémát, de a látóidegben a csökkent ATP-képzés elegendő a sejtek elhalásához, és így a látás elvesztéséhez.

Ugyancsak mitokondriális mutációra vezethető vissza az epilepszia egyik, anyai öröklődést mutató fajtája (MERRF). Bár a rendellenességnek pontos genetikai okát még nem sikerült

megállapítani, az bizonyos, hogy a betegekben változó mértékben ugyan, de mindig kimutatható a mitokondriumok elégtelen működése. Minél súlyosabb a mitokondriumok hibája, annál komolyabbak a tünetek. Ugyancsak a mitokondriumok hibás működésére utal, hogy az MERRF-ben érintett szövetek éppen azok, amelyek leginkább függenek a mitokondriumok energia-szolgáltatásától.

Más betegségek nem öröklődnek, hanem szomatikus mutációk következményei, és a mitokondriális DNS nagyméretű deléciójára vezethetők vissza, hasonlóan a *Neurospora* pely, illetve az élesztő petite mutációihoz. Ebbe a csoportba tartozik két neuromuszkuláris rendellenesség, a krónikus progresszív szemizombénulás (CPEO) és a Kearns–Sayres-szindróma (KSS), valamint a vörösvérsejtképzés súlyos zavarával járó Pearson-szindróma.

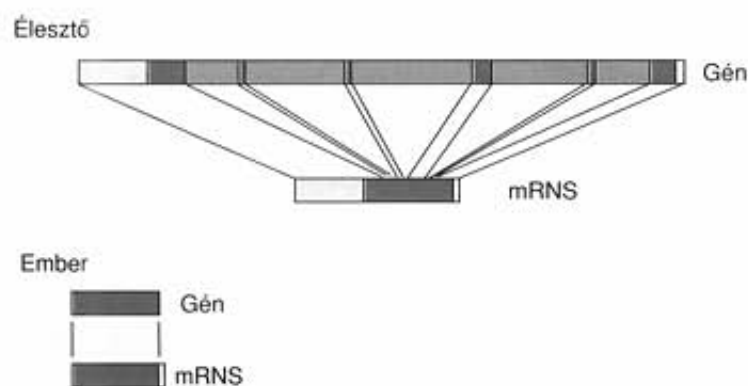
Sokkal nagyobb érdeklődésre számíthat az a lehetőség, hogy az öregedés – legalábbis részben – ugyancsak visszavezethető a mitokondriumokban történő sorozatos mutációkra. A hipotézis szerint az idő kétféleképpen kedvezhet a károsodásnak: egyrészt a test öregedésével egyre több és több mitokondriális mutáció halmozódik fel; másrészt hosszú idő elteltével bizonyos sejtekben nagy lesz a mutáns mitokondriumok aránya, ami már befolyásolja a sejtek működését. Bármelyik is történik, a változások végül a szövetek fokozatos leromlásához vezetnek, ami az öregedés egyértelmű jele.

venálás különösen hatékony, ha csak a gének bázissorrendjét kell megállapítani, de önmagában nem nyújt információt a DNS-szakasz funkciójával kapcsolatban.

Az ember és a szarvasmarha mitokondriális DNS-ének teljes szekvenciáját meghatározták. Az adatok szerint ezekben a genomokban igen csekély „fölösleges” szekvencia van. Az mRNS-ek génjeiben nincsenek sem intronok, sem vezér-szekvenciák, sem pedig végszakaszok, és nagyon kevés bázis ékelődik a struktúrgének közé. Az emlősök mitokondriuma két rRNS-t, huszonnégy tRNS-t és tizenhárom mitokondriális fehérjét kódol.

„Fölösleges” szekvenciák az élesztő mitokondriális genomjában

Mivel magyarázható a majdnem ötszörös méretbeli eltérés az élesztő és az emlősök mitokondriális genomja között? A különbség több tényező következménye. Az egyik az, hogy az élesztőnél „fölösleges”, tényleges információt nem hordozó részek vannak a gének között (18.24. ábra). A további eltéréseket jól példázza egyetlen gén is, például a mitokondrium egyik fehérjéjét, a citokróom *b*-t kódoló gén. A 18.24. ábrán egymás mellett látható az élesztő és az ember mitokondriális citokróom *b* génje és RNS-másolataik. Az emberi gén csak kódoló régiókat tartalmaz, míg az élesztő a feltűnően hasonló méretű kódoló szakasz mellett egyéb részeket is tartalmaz. Az 5'-végén van egy körülbelül 1000 bázisnyi, translációra nem kerülő vezérszekvencia, 3'-végén pedig egy 50 bázisnyi végszekvencia. Emellett öt hosszú intront is tartalmaz, amelyek a gén méretét az emberi génnek sokszorosára növelik. Ugyanakkor az emberi mitokond-



18.24. ábra. Az élesztő (felül) és az ember (alul) citokróom *b* génjének összehasonlítása. A két gén lényegében azonos méretű kódoló szakaszokat (narancssárga) tartalmaz, de az élesztőben intronok (kék) szakítják meg. Ezenfelül az élesztő génje translációra nem kerülő vezér- és végszekvenciákat is tartalmaz, az 5'- és a 3'-végeken (sárga). A gének rajza alatt feltüntettük az érett mRNS-eket is: a gének és az mRNS-ek megfelelő régióit vonalak kötik össze. A translációra nem kerülő szekvencia az ember mRNS-ének végén a poli-A farkat jelenti

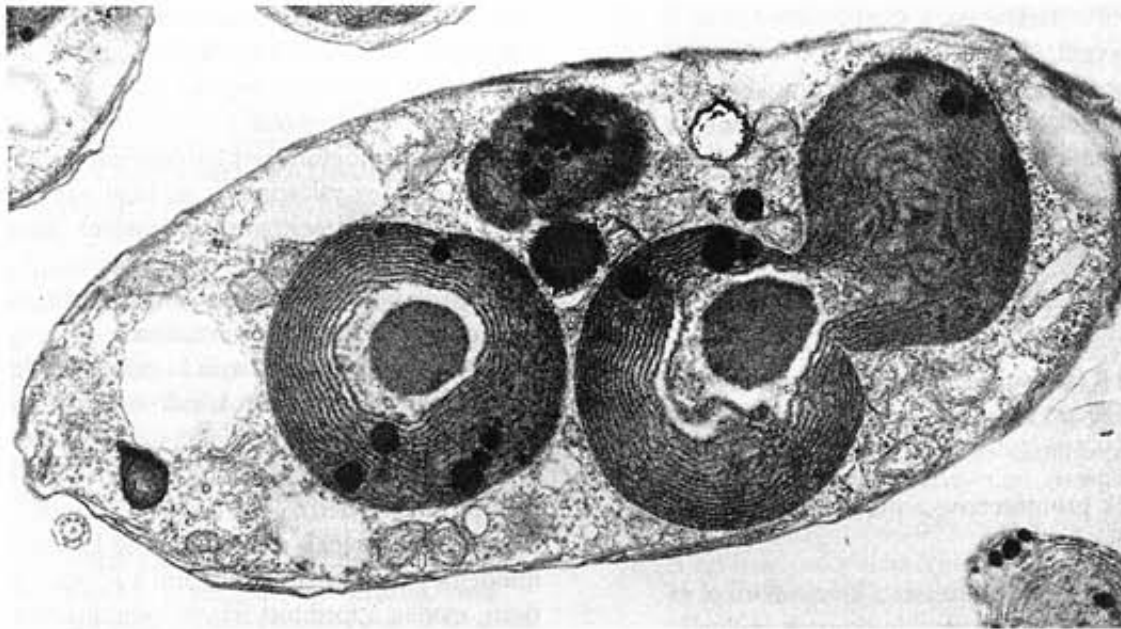
riális mRNS-ből csak a poli-A fark nem kerül translációra. Ennek első két bázisa az mRNS UAA stopkodonját egészíti ki. Az élesztő mitokondriális genomja legalább 5 független promotert tartalmaz, vagyis a genom nem egyszerre íródik át.

Milyen kapcsolat van az élesztő 18.22. ábrán vázolt mitokondriális térképe és a korábban vázolt genetikai térkép (18.11. ábra) között? A legtöbb marker, amelyet a fejezet elején tárgyaltunk, a 18.22. ábrán is szerepel. Az eritromicin-, klóramfenikol- és spiramicinrezisztencia például a nagy (21S) rRNS génjének mutációi, a paromomicinrezisztencia pedig a kis (15S) rRNS génjének mutációi miatt lép fel. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azokkal a kísérleti eredményekkel, amelyek szerint az antibiotikumok a fehérjeszintézis folyamatát gátolják. Az oligomicinrezisztencia az ATPáz enzim egyik alegységének génjében fellépő mutáció következménye. Ez ismét egybevág a tapasztalattal, hogy az oligomicin az ATP-szintézist gátolja a mitokondriumokban, hiszen az ATPáz nélkülözhetetlen az ATP-szintéziséhez. Mindez arra is megadja a választ, miért találtak kétféle oligomicin rezisztens mutánst: az élesztő mitokondriális DNS-e az ATPáz két alegységét kódolja.

Az élesztő mitokondriális DNS-e körülbelül ötször akkora, mint az emlősöké. Tartalmazza az emlősök genomjában is megtalálható mitokondriumgének többségét, köztük az rRNS-, tRNS- és mRNS-géneket. Ezenfelül vannak benne intronok, valamint hosszú, translációra nem kerülő vezér- és végszekvenciák az mRNS-gének végén és nem-kódoló elválasztó szakaszok a gének között.

A MITOKONDRIUMOK ÉS A KLOOROPLASZTISZOK EREDETE

Honnan származnak a mitokondriumok és a kloroplastiszok? Miért találhatók meg az eukariótákban, és miért hiányoznak a prokariótákból? A legelfogadottabb elmélet szerint a prokarióta sejt jelent meg korábban, és 1 milliárd éven át, talán még tovább is, az élet egyetlen formája volt a Földön. Mintegy 1,5 milliárd évvel ezelőtt megjelentek az első eukarióta sejtek, amelyek kezdetben nem tartalmaztak sem mitokondriumokat, sem kloroplastiszokat. (Ilyen primitív eukarióta sejtek mind a mai napig léteznek.) Feltehetően nem túl hosszú idővel megjelenésük után, egyesek közülük bekebeleztek fotoszintetizáló, illetve aerob baktériumokat, de nem emésztették meg azokat, hanem szimbiózisra léptek velük. A két sejt többé-kevésbé együtt osztozott, az utódsejtekbe is átkerültek a baktériumok. Idővel a baktériumsejtek már csak az energiatermelésre specializálódtak, sok génjüket elvesztették, a gazdasejt nélkül életképtelenek lettek. Ugyanakkor a gazdasejt is elveszítette néhány génjét, és ezzel az energiatermelés képességét, élete a vendégsejt energiatermelésétől függött. Ezzel a vendégsejt ősi mitokondriummá vagy szintestté alakult.



18.25. ábra. Cianellumok a *Cyanophora paradoxa* egysejtében. Annyira emlékeztetnek a kékbaktériumokra, hogy eredetileg annak is tartották őket

Forrás: Hall, William T. és Margulis, Lynn: *Symbiosis and Evolution*. Scientific American, 225:49–57, 1971.

AZ ENDOSZIMBIONTA ELMÉLET

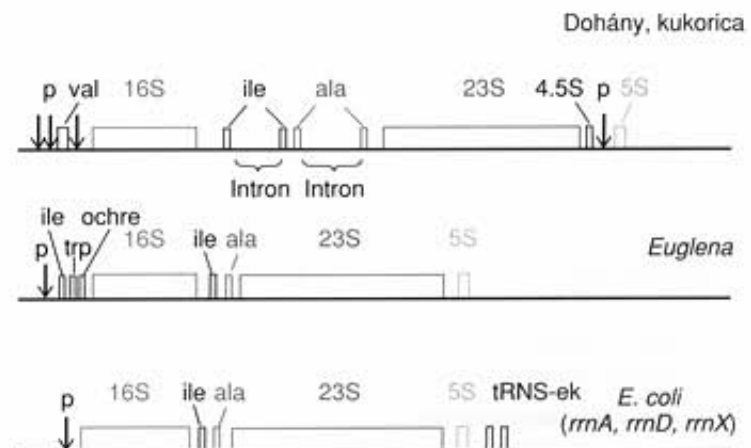
Az imént ismertetett kölcsönhatás, amely mindkét szervezet számára előnyökkel jár, a **szimbiózis**. Ebben a speciális esetben az egyik partner a másikban él, ezért a pontos elnevezés **endoszimbiózis**, és a kisebbik társ az **endoszimbionta**. Lynn Margulis hipotézise a sejtorganellumok eredetéről **endoszimbionta elmélet** néven vált ismertté. Az elmélet a kloroplasztisz eredetét magyarázza. A plasztiszok feltehetőleg ősi fotoszintetizáló kékbaktériumokból fejlődtek ki, amelyek beépültek egy primitív eukarióta sejtbe, majd fokozatosan elvesztették az önállóságukat.

Mi támasztja alá az endoszimbionta elméletet? Először is, a kloroplasztiszok és a kékbaktériumok hasonlósága. A *Cyanophora paradoxa* egysejtű organelluma átmenetnek tekinthető az endoszimbionta kékbaktérium és a kloroplasztisz között (18.25. ábra). A zöld, membránokban gazdag testeket sokáig szimbionta kékbaktériumoknak hitték, amelyek a kloroplasztisz ősi evolúciós stádiumát képviselhetik. Valójában ezekben a testekben a DNS-tartalom sokkal kisebb, mint a baktériumokban – túl kevés ahhoz, hogy független anyagcserét folytassanak. Ezek az ún. *cianellumok* egy fejlett átmeneti formát jelenthetnek a kloroplasztisz evolúciójában.

A mitokondriumok kevésbé hasonlítanak azokhoz a nemkén bíborbaktériumokhoz, amelyekből valószínűleg kialakultak. Alakjuk is jelentősen megváltozott az idők folyamán.

Ha a mitokondriumok és a kloroplasztiszok valóban szabadon élő baktériumokból származnak, várható, hogy működő génekkel rendelkezzenek, ahogyan azt ebben a fejezetben láttuk is. Ugyanakkor sokkal több fehérjéjük van, mint ahány struktúrgénjük. A fehérjék génei ugyanis a sejtmagban vannak, transzlációjuk a citoplazma riboszómáin történik, majd innen kerülnek az organellumokba.

A mitokondriumok, kloroplasztiszok és baktériumok közötti hasonlóság kromoszómáikban is megfigyelhető. Majdnem mindegyik mitokondriumban és kloroplasztiszban a bakteriális kromoszómához hasonló cirkuláris DNS van, ritka kivételt jelentenek egyes egysejtűek mitokondriumainak és az *Acetabularia* kloroplasztiszainak lineáris kromoszómái. Mindemellett feltűnő hasonlóság van az rRNS-géncsoportok elrendeződésében egyes kloroplasztiszok és baktériumok között (18.26. ábra). Ezenfelül



18.26. ábra. A kloroplasztisz rRNS- és a bakteriális rRNS-gének hasonló elrendeződése. Az rRNS-géneket az általuk kódolt RNS mérete jelöli (pl. 16S), a tRNS-géneket pedig a szállított aminosav három betűből álló rövidítése (pl. ile); az ochre terminációs kodont szuppresszázó tRNS kódja; a promotereket nyilak jelzik. Figyeljük meg az állandó 16S-ile-ala-23S-5S elrendeződést mindhárom szervezet esetében. Az ile és ala tRNS-ek géneit a dohány és a kukorica kloroplasztisz DNS-ében intron szakítja meg. Ugyanezen RNS-ek sejtmagban kódolt géneit egészen más elrendeződésűek. Ez a tény is a prokarióták és a kloroplasztiszok evolúciós rokonságát jelzi

egészen megdöbbentő a hasonlóság a kloroplasztisz és az *E. coli* operonjai között. Végül, az organellumok transzkripció és transláció rendszere sokkal inkább a baktériumokéra hasonlít, semmint az eukarióta sejtére, amelynek plazmájában él. Ezt a megállapítást több bizonyíték is alátámasztja:

1. Az organellumokban a transzkripciót a rifampicin nevű antibiotikum gátolja. A rifampicin inhibitora a prokarióta RNS-polimeráznak, de az eukarióták RNS-polimerázára nincs hatással.
2. A kloroplasztisz RNS-polimerázának alegységszerkezete és aminosavsorrendje sokkal jobban hasonlít a prokariótákéra, mint az eukariótákéra.
3. Az organellumok promoterei is a prokariótákéhoz hasonlóak.
4. Az organellumok fehérjeszintézisét a klóramfenikol és a tetraciklin gátolja. Ezek az antibiotikumok leállítják a bakteriális translációt is. Az eukarióta transláció inhibitora, a cikloheximid azonban nem hat a mitokondriumokban zajló translációra.
5. A mitokondriális és a kloroplasztisz rRNS-ek bázissorrendje a baktériumokéhoz hasonlít, de az analóg eukarióta rRNS-ekhez nem.
6. Az organellumok riboszómáinak mérete közel megegyezik a prokarióták riboszómáival.
7. Az organellumokban is formil-metionin a képződő fehérjék első aminosava, ugyanúgy mint a prokariótákban.

A mitokondriumok és a kloroplasztiszok a mai nem-kén bíorbaktériumok, illetve a kékbaktériumok szabadon élő őseiből fejlődhetek ki. Az endoszimbionta elmélet szerint ezen baktériumok ősei évmilliárdokkal ezelőtt bekerültek a gazdasejtekbe, és endoszimbionta kapcsolat alakult ki közöttük. A bekebelezett szervezetek fokozatosan megosztották génműködésüket a gazdasejttel, elveszítették géneik egy részét és önállóságukat. Eközben a gazdasejt is függő viszonyba került az endoszimbiontától, energia-termelését, illetve fotoszintetikus aktivitását tekintve.

A „közös” DNS

A fentiekben láttuk, hogy azok a szabadon élő prokarióták, amelyek a mai mitokondriumok és kloroplasztiszok ősei voltak, a szimbiózis során fokozatosan elveszítették géneik nagy részét. Ma már fehérjék túlnyomó részét a sejtmag kódolja. Ez egyben azt jelenti, hogy az organellum DNS-ének egy része nem egyszerűen elveszett, hanem a sejtmagba került át. Ha ez igaz, akkor elképzelhető, hogy találunk bizonyítékot is a mitokondrium, illetve a kloroplasztisz felől a magba irányuló génáramlásra.

Valóban ismerünk példákat ilyen „közös” DNS-re. Az élesztő sejtmagjában van olyan DNS-régió, amely több különböző mitokondriális gén részeit foglalja magába.

Ez az eset bizonyosan a mitokondrium → sejtmag géntranszfer példája, de hogyan szerkesztődhetett egybe több mitokondriális gén? A válasz valószínűleg az, hogy ezek a gének mutáns mitokondriumokból származnak, amelyek belső rekombinációval elveszítették DNS-ük nagy részét, és csak használhatatlan fragmentumaik maradtak meg. Az élesztő petite mutánsainál találkozunk már ilyen mitokondriumokkal.

A következő példát a kukoricánál találták meg, amelynek kloroplasztiszában és mitokondriumaiban kimutatható egy közös 12 kb hosszúságú DNS-szakasz. Erre akkor derült fény, amikor a növény mitokondriális DNS-ének különböző fragmentumait próbaként használták, hogy hasonló szakaszokat keressenek ugyanannak a fajnak a kloroplasztisz DNS-ében. Az eredmény minden esetben pozitív volt, ami a kloroplasztisz → mitokondrium, esetleg a fordított irányú géntranszfer igazolja, és nem a mag felé irányuló génátadást. Az organellum DNS mozgékony-sága viszont azt sejteti, hogy az a sejtmagba is bejuthat.

Az endoszimbionta elméletet támasztja alá a közös DNS léte, amely egyik lokuszról a másikra vándorolhat a sejtben. Az élesztő sejtmagjaiban például található egy olyan DNS-régió, amely nagyon hasonlít egyes mitokondriális gének darabjaira. A DNS áthelyeződési folyamata magyarázhatja, hogyan juthatott be a mitokondriumok és a kloroplasztiszok őseinek genetikai anyaga a sejtmagba.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az eukarióták számos fenotípusos tulajdonságát, például bizonyos növények levelének színét, az élesztő lassú növekedésű petite és a *Neurospora* poky típusát, sok szervezet antibiotikumrezisztenciáját, nem-mendeli módon öröklődő gének kódolják. Ezeket a géneket, csak az egyik szülő, rendszerint az anya adja át az utódoknak. Az uniparentális öröklődés magyarázata, hogy általában az anya adja a zigóta citoplazmájának a zömét. A kérdéses gének pedig a citoplazmában lévő sejtorganellumokban (mitokondriumok, kloroplasztiszok) találhatóak.

Az anyai hatás az a jelenség, amely során az utódok fenotípusát az anya genotípusa határozza meg, és az nem függ az utód genotípusától. Az F_1 generációban ez anyai öröklődésként jelentkezik, de a következő generációk a mendeli öröklődést bizonyítják.

Az élesztő mitokondriumaiban a rekombinációs gyakoriságokból is lehet következtetni a kapcsoltságra, mert ennél a szervezetenél mindkét szülő mitokondriuma bejut az utódba. A petite mitokondriális genomokban kodelációs és koretenciós gyakoriságok alapján meghatározható a kapcsoltság mértéke. A géntérképezéshez a petite és vad típusú DNS, illetve két petite DNS hibridizációja is

szolgáltathat adatokat. A kloroplasztiszgének térképezése a citohetek rekombinációs viselkedésének, valamint koszegregációs analizisének alapján történhet.

A kloroplasztisz DNS legtöbbször cirkuláris, mérete 57–195 kb között van. A kloroplasztiszok genomja poliploid, a cirkuláris molekulák száma akár ezer is lehet a búza fiatal leveleiben. A kloroplasztisz DNS fizikai térképét restriktions fragmentumok analizisével állították össze, hibridizálással állapították meg az egyes fragmentumok közötti átfedéseket, majd ennek alapján a génsorrendet. A gének helyét az így összeállított térképen úgy határozták meg, hogy RNS-termékeiket a restriktions fragmentumokhoz hibridizáltatták. A legtöbb kloroplasztisz DNS-en mindegyik rRNS-nek két inverz kópiája van. Ezenkívül a kloroplasztiszokban megtalálható minden tRNS és nyolcvannál több fehérje génje. Számos kloroplasztiszgenom teljes bázissorrendjét meghatározták, és feltűnő hasonlóságot tapasztaltak a prokarióták genomjával.

Ugyancsak meghatározták több faj teljes mitokondriális genomjának bázisszekvenciáját is. A vizsgálatokból kiderült, hogy a gerincesek mtDNS-e nagyon kevés fölösleges szekvenciát tartalmaz. Nincsenek intronjaik, transzlációra nem kerülő vezér- és végszekvenciák, struktúrgénjeik között csak néhány bázis van. Az emlősök mitokondriális genomjában két rRNS, huszonek tRNS és tizenhárom fehérje génje van. Az élesztő mitokondriális DNS-e körülbelül ötször nagyobb az emlősökénél. Megtalálható benne a legtöbb információ, amely az emlősökénél is, köztük az rRNS-ek, a tRNS-ek és az mRNS-ek génjei is. Ezenfelül intronok, a gének között nem kódoló, elválasztó szakaszok, és hosszú, transzlációra nem kerülő vezér- és végszekvenciák találhatók a mRNS-ek génjeiben.

A mitokondriumok és a kloroplasztiszok a nem-kén bimbobaktériumok, illetve a kékbaktériumok őseiből származtathatók. Az endoszimbionta elmélet szerint ezek a baktériumok 1,5 milliárd évvel ezelőtt léptek kapcsolatba nagyobb eukarióta sejtekkel, és endoszimbionta kölcsönhatást alakítottak ki a gazdasejtrel. A bekebelezett szervezetek fokozatosan átadták génjeik egy részét a befogadó sejtnak, így elveszítették önállóságukat. A gazdasejtek is függővé váltak a befogadott sejtek energiatermelésétől és fotoszintézisétől.

Az endoszimbionta elméletnek sok bizonyítéka van. A legmeggyőzőbb, hogy a prokarióták és az organelumok megdöbbentő hasonlóságot mutatnak génjeikben, valamint transzkripciós és transzlációs apparátusukban. További bizonyíték a lokuszok között mozgó közös DNS jelenléte is. Ez a DNS-transzfer magyarázatot ad arra, hogyan kerülhetett a mitokondriumok és kloroplasztiszok őseinek genetikai anyaga a sejtmagba.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Miért rövid életűek a *Mirabilis* fehér színű törzsei?
- A gyermekláncfű hipotetikus mutáns fenotípusa, a zsugorodott kloroplasztisz, anyai öröklődést mutat. Milyen fenotípus eloszlást vár az F_1 generációban, ha
 - zsugorodott kloroplasztiszú pollen poroz be normál, sima kloroplasztiszú termős virágot?
 - A reciprok keresztezést végezz?

- Indokolja meg logikus hipotézissel a 2. feladatban szereplő öröklésmenetet!
- Amikor tarka levelű *Mirabilis* adja a petesejtet egy keresztezéshez, az utódok három különböző fenotípus osztályba sorolhatók – zöld, tarka és fehér. Mi a jelenség magyarázata?
- Miért csak a kereszteződés után játszódhat le a meiózis a *Chlamydomonas* sejtjében?
- Mi alapján tekintik a *Chlamydomonas mt* típusát a női jellegűnek?
- Egy növényen az ág hosszúsága az anya fenotípusától függ: vagyis, ha az anya hosszú ágú, akkor az F_1 egyedek is hosszú ágúak, míg egy rövid ágú anyának utódai is hasonlóak. Egy generáció megfigyelése alapján bizonyosra vehető-e a jelleg anyai öröklődése?
- A neutrális petite élesztő mitokondriumában nincs DNS. Hogyan létezhetnek ezek a mitokondriumok gének nélkül?
- A *Fungus amungus* tömlősgombának két törzse van. Az egyik klóramfenikolrezisztens (*cap*⁺) és leucin igényes (*leu*⁻), de a biotint szintetizálja (*bio*⁺). A másik klóramfenikolszenzitív (*cap*⁻), a leucint képes előállítani (*leu*⁺), de biotint nem (*bio*⁻). A *leu* és a *bio* génről tudjuk, hogy a sejtmagban találhatók. Tervezzon egy heterokarionos kísérletet annak kimutatására, hogy a *cap* gén valószínűleg mitokondriális!
- Milyen bizonyítékok szükségesek ahhoz, hogy egyértelműen állíthassa, a *cap* gént valóban a *Fungus amungus* mitokondriumai hordozzák?
- Izolált egy új élesztő mutáns négy olyan mitokondriális génnel, amelyeneket a vad típusú élesztő nem tartalmaz. Azt tapasztalta, hogy ez a mutáns a szokásos módon petite telepeket növeszt, ezért a négy új gént petite térképezésnek vetette alá. Megfigyelései a következők:
 - Amikor a *zig* és a *twi* gén együtt marad meg vagy esik ki, az *frd* is követi a viselkedésüket.
 - Amikor az *frd* és az *spa* együtt vész el, vagy együtt marad bent, akkor a *zig* is így viselkedik.
 - Az *frd* deléciója esetén, 60%-ban a *zig* is deléciós. Az *spa* gén csak 10%-ban került delécióra a *zig* génnel együtt.
 - A *zig* deléciójakor 30%-ban a *twi* is deléciós volt. Váolja fel a négy gén lineáris térképét, a bal oldalon a *twi*-vel kezdje. Adja meg a hozzávetőleges távolságokat is!
- A fenti mutációkat hordozó két petite törzsben (A1 és B2) az alábbiakat állapította meg: az A1 hordozza a *twi*, *frd* és *zig* mutációkat, és a *twi*-*zig* távolság 40 DNS-egység. A B2 hordozza a *twi*, *frd* géneket, ezen kívül a *twi*-től balra a *pap* gént. Az A1 a teljes élesztő genom 40%-ával hibridizál, a B2 60%-ával. (Az A1 tehát 40, a B2 pedig 60 DNS-egységnyi.) A két petite átfedése 25 DNS-egység. Mekkora lehet a maximális távolság DNS-egységekben kifejezve a *pap* és a *twi* között?
- Vannak olyan kloroplasztiszok, amelyeknek DNS-tartalma meghaladja az *E. coli*-sejt DNS-tartalmát, a gének száma

azonban jóval kevesebb a kloroplasztiszban. Hogyan lehetséges ez? Magyarázza meg az ellentmondást!

14. A *Chlamydomonas* kloroplasztiszának DNS-ét az *EcoRI*-gyel hasítja, majd a fragmentumokat elektroforézissel elválasztja, és membránszűrőn rögzíti. A mintát a *BamHI* radioaktív Ba13 fragmentummal hibridizálja. Melyik *EcoRI* fragmentumot lehet ilyen módon kimutatni? A válasz megadásához használja a 18.17. ábrát!
15. Mi a válasz az előző kérdésre, ha a radioaktívan jelölt fragmentum a Bg5?
16. Milyen kísérlettel mutathatnánk ki (a 14. feladathoz hasonlóan), hogy a kloroplasztisz rRNS-e az R07 és az R24 fragmentumokban található?
17. Egy kísérletben izolálja a *Chlamydomonas* kloroplasztiszgenomjából a Ba15 fragmentumot, és *in vitro* transzkripció rendszerbe viszi. Keletkezik néhány mRNS, amelyeket *in vitro* transláció rendszerhez adva fehérjekeverék keletkezik. A fehérjék egyike kötődik a *psbC* gén által kódolt fehérje antitestjéhez. Milyen következtetést von le ebből a *psbC* gén helyzetére nézve?
18. Melyek azok a fő tényezők, amelyek miatt az élesztő mitokondriális genomja ötször nagyobb az emlősökénél?
19. Honnan tudjuk, hogy a *Cyanophora paradoxa* cianellumai nem endoszimbionta kékbaktériumok?
20. Mit jelent a közös DNS az organellumok genetikájában?

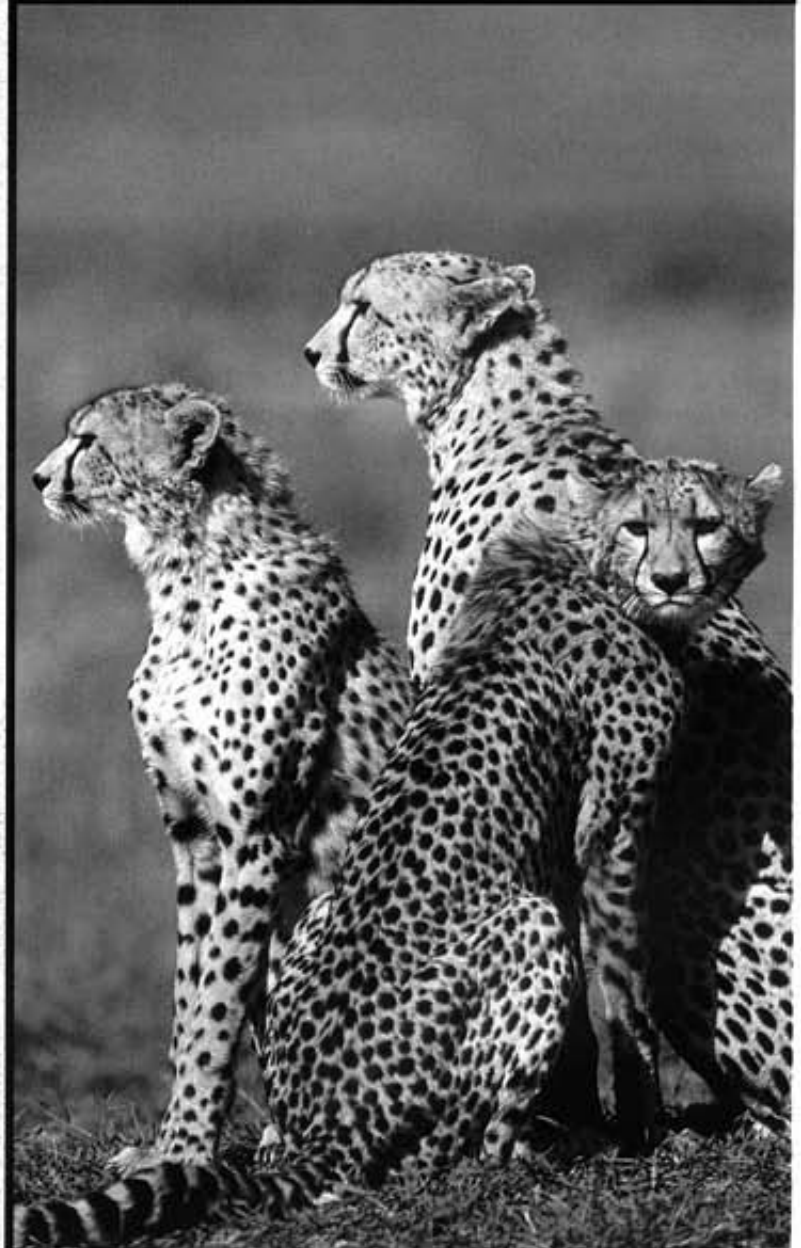
A megoldások a könyv végén találhatóak.

3.

R É S Z

Populáció- genetika

- 19** Bevezetés a
populációgenetikába 532
- 20** A populációgenetika gyakorlati
alkalmazásai 557



A gepárd veszélyeztetett, kihalt szélén álló faj, genetikai variabilitása alacsony

© Tim Davis/Tony Stone Images

19.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 A természetes populációk genetikai variabilitása.
- 2 A genetikai variabilitás becslése a polimorf lokuszok arányának vagy a heterozigócia mértékének kiszámításával.
- 3 A Hardy–Weinberg-szabály alapján, az allélgyakoriságok ismeretében meghatározhatók a relatív genotípus gyakoriságok a népességben.
- 4 A beltenyésztés növeli a homozigóták arányát a populációban.
- 5 A genetikai variabilitás alapja a mutáció.
- 6 A genetikai sodródás a genetikai variabilitás elvesztéséhez vezethet.
- 7 Génáramlással új allélok kerülhetnek a populációba.

Bevezetés a populáció- genetikába

A természetes szelekció legfőbb jelentősége az, hogy alig észrevehető eltérések között is képes különbséget tenni, és az eltéréseket addig fokozni, amíg azok minden megfigyelő számára nyilvánvalóvá válnak.

Charles Darwin
angol természettudós

Az előző fejezetekben főleg olyan genetikai változatokkal foglalkoztunk, amelyek ritkán fordulnak elő a népeségekben. Ezek közé tartoznak például az emberi anyagcsere öröklődő zavarait, köztük az albinizmust okozó mutációk. Ugyanakkor a legtöbb faj természetes populációiban jelentős gyakorisággal fordulnak elő egyes tulajdonságokat, pl. a színváltozatokat, a vörösvérsejt-típusokat vagy a peszticidrezisztenciát meghatározó allélok. Miért alakulnak ki és maradnak fenn genetikai változatok egy populáción belül, és milyen tényezők szabják meg gyakoriságukat? A kérdések megválaszolásához meg kell ismerkednünk a **populációgenetika** alapjaival. A populációgenetika az a tudomány, amely a természetes populációk genetikai variabilitásának kérdéseivel foglalkozik, és magyarázatokat keres a fenti megfigyelésekre.

Charles Darwin 1859-ben megjelent, *A fajok eredete* c. művéig nyúlik vissza az a ma is gyakori nézet, hogy a populációk genetikai sokféleségét alapvetően a természetes szelekció befolyásolja. Bizonyos körülmények között és bizonyos fajok esetében azonban egyéb tényezők is fontos szerephez jutnak. Ezen tényezők közül ebben a fejezetben megismerkedünk a beltenyésztés, a mutáció, a genetikai sodródás és a génáramlás hatásával. A 20. fejezetben a felsorolt tényezők együttes hatásával és ennek alapján a populációgenetika gyakorlati alkalmazásaival foglalkozunk. Sorra kerülnek az ember öröklődő betegségei, a molekuláris evolúció, a természetvédelem genetikai vonatkozásai, a mezőgazdasági genetikai alapjai és a peszticidrezisztencia kérdései.

A genetikai alaptörvényeinek ismerete nélkülözhetetlen a populációgenetika megértéséhez. A hasadás elve szerint egy heterozigóta egyedben azonos valószínűséggel keletkeznek a különböző allélokot hordozó ivarsejtek. Ha ezt az elvet a populáció összes egyedére értelmezzük, könnyebben megérthetjük, hogyan alakul a teljes populáció genetikai összetétele. Egy véletlenszerűen párosodó populáció egyedeiben jelenlévő gének összessége a **génkészlet** (gene pool). A populációgenetika alapelveinek tár-

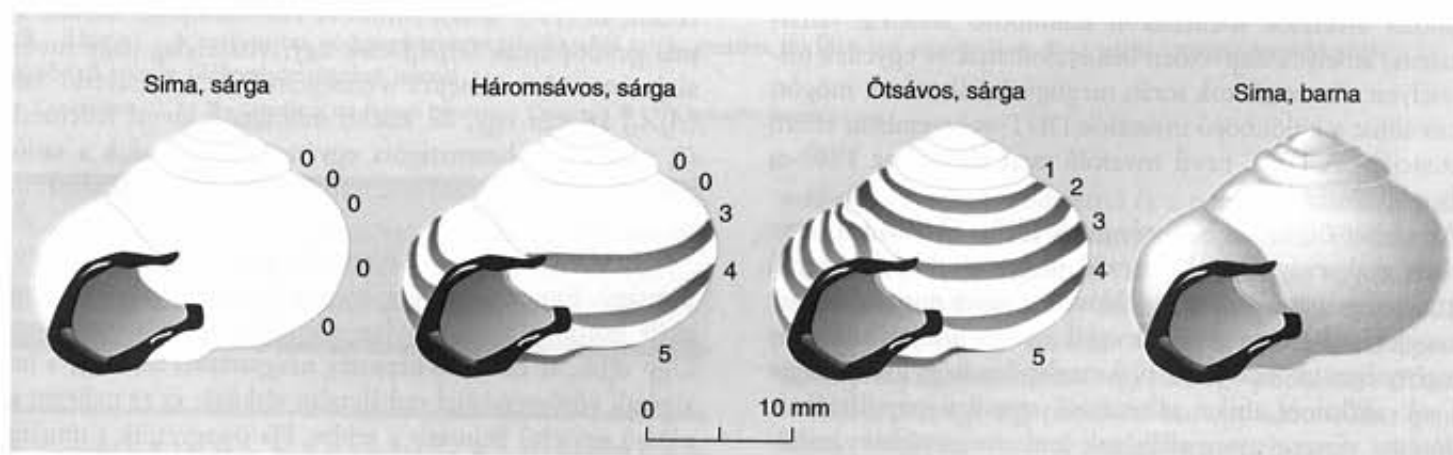
gyalása előtt a genetikai variabilitás néhány példáját elemezzük. Ezek a példák megvilágítják a genetikai variabilitás lényegét és megmutatják, hogyan történhetnek a változások a populációban.

A GENETIKAI VARIABILITÁS

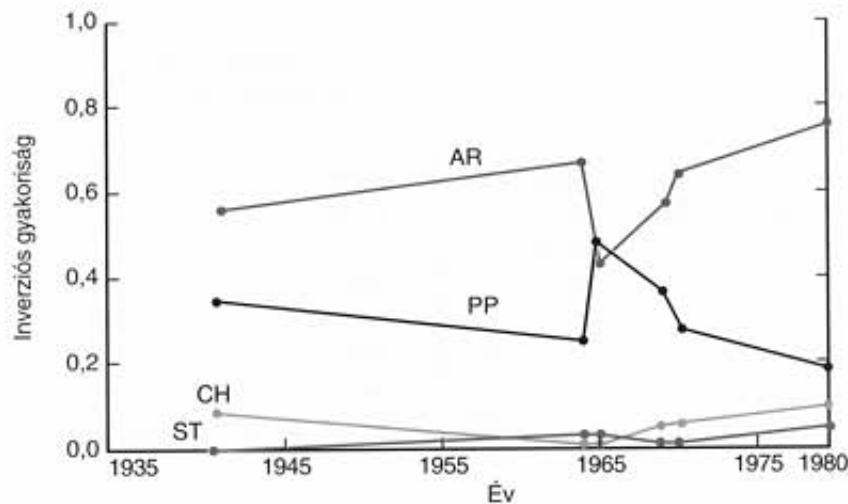
Egy természetes (vad) populációt alkotó egyedek általában nem egyformák, hanem a testfelépítést vagy a testszint tekintve öröklődő változatok vannak. Klasszikus példa a ligeti csiga (*Cepaea nemoralis*) populációk morfológiai variabilitása, amely évtizedeken át élénken foglalkoztatta a kutatókat Angliában és Franciaországban. A ligeti csiga kertekben és mezőkön egyaránt honos. A csigaház színét és mintázatát több szorosan kapcsolt gén alléljai határozzák meg. A szín és mintázat változatai a sima sárga (sáv nélküli) típustól az ötcsíkos változaton át a sima, barna változatig terjednek (19.1. ábra). A sárga színt és a sávot meghatározó allélok gyakorisága széles határok között változik Európa egyik részétől a másikig, de az egyes populációkat tekintve a variabilitás kicsi.

Egy hollandiai földgát 200 méteres szakaszán végzett mérések szerint a sárga, sáv nélküli típus gyakorisága a vizsgált szakasz egyik végén mért 60%-ról a szakasz másik végéig 40%-ra csökkent. Ráadásul a vizsgálat tizenkét éve alatt ezek az értékek állandóak maradtak, ami arra enged következtetni, hogy az eltérést evolúciós tényezők tartják fenn. Egy másik tanulmányból kiderül, hogy a héj színe és mintázata a rejtőzködést szolgálja a ragadozókkal szemben. Amikor a csigák a fűszálakon pihennek, függőleges helyzetű sávjaik jól álcázzák őket a fűben. A talajon mászó csigák közül viszont a sima, barna színűek a legnehezebben észrevehetőek.

Számos faj esetében mutattak ki olyan genetikai variabilitást, amely a kromoszómák finom szerkezetében mutatkozó eltéréseken alapul. Az utóbbi időben a kromoszómák szerkezetének vizsgálatára kifejlesztett korszerű eljárások (l. 4. fejezet) sok új kromoszómális változatra derítettek fényt, és valószínű, hogy



19.1. ábra. A ligeti csiga (*Cepaea nemoralis*) házának mintázattípusai. A 0-tól eltérő számok egy sáv meglétét jelentik



19.2. ábra. Az inverziók gyakorisága a *Drosophila pseudoobscura* harmadik kromoszómáján, három évtized adatai alapján. Új-Mexikó, Capitan-körzet (AR = arrowhead; PP = pikes peak; CH = chiricahua; ST = standard)

további, a kromoszómák szerkezetét érintő változások, például deléciók, duplikációk és inverziók felfedezése-várható. Ezen a téren az egyik legalaposabb vizsgálatot Theodosius Dobzhansky (orosz származású genetikus, az 1920-as években vándorolt az Amerikai Egyesült Államokba) kezdeményezte. Tanítványaival az Észak-Amerika nyugati hegységeiben közönséges gyümölcs-légy, a *Drosophila pseudoobscura* harmadik kromoszómájának inverziós változatait elemezték (4.25. ábra).

Az 1930-as években Dobzhansky ezen inverziós változatok hosszú távú kutatásába kezdett. A 19.2. ábra a több mint harminc évre kiterjedő vizsgálat eredményét foglalja össze. Az ábra a négy inverzió gyakoriságának alakulását mutatja az egyik mintavételi helyen, Új-Mexikóban. Kezdetben az AR (arrowhead) inverzió volt a leggyakoribb, de 1965-ben a PP (pikes peak) gyakorisága megnőtt, majd a következő években lecsökkent. Két másik inverzió, a CH (chiricahua) és a ST (standard) is mindig jelen volt a populációban, de csak kis gyakorisággal.

Az inverziók általában gének százait tartalmazzák, mégis egy egységként öröklődnek, mintha egyetlen allélt alkotnának. A különböző inverziók lokuszakon különböző allélokat tartalmazhatnak, amelyek alapvetően befolyásolhatják az egyedek túlélési esélyeit. A vizsgálatok során megfigyelt változások mögött valóban állhat a különböző inverziók DDT-vel szembeni eltérő rezisztenciája. A DDT nevű rovarölő szert először az 1940-es években alkalmazták.

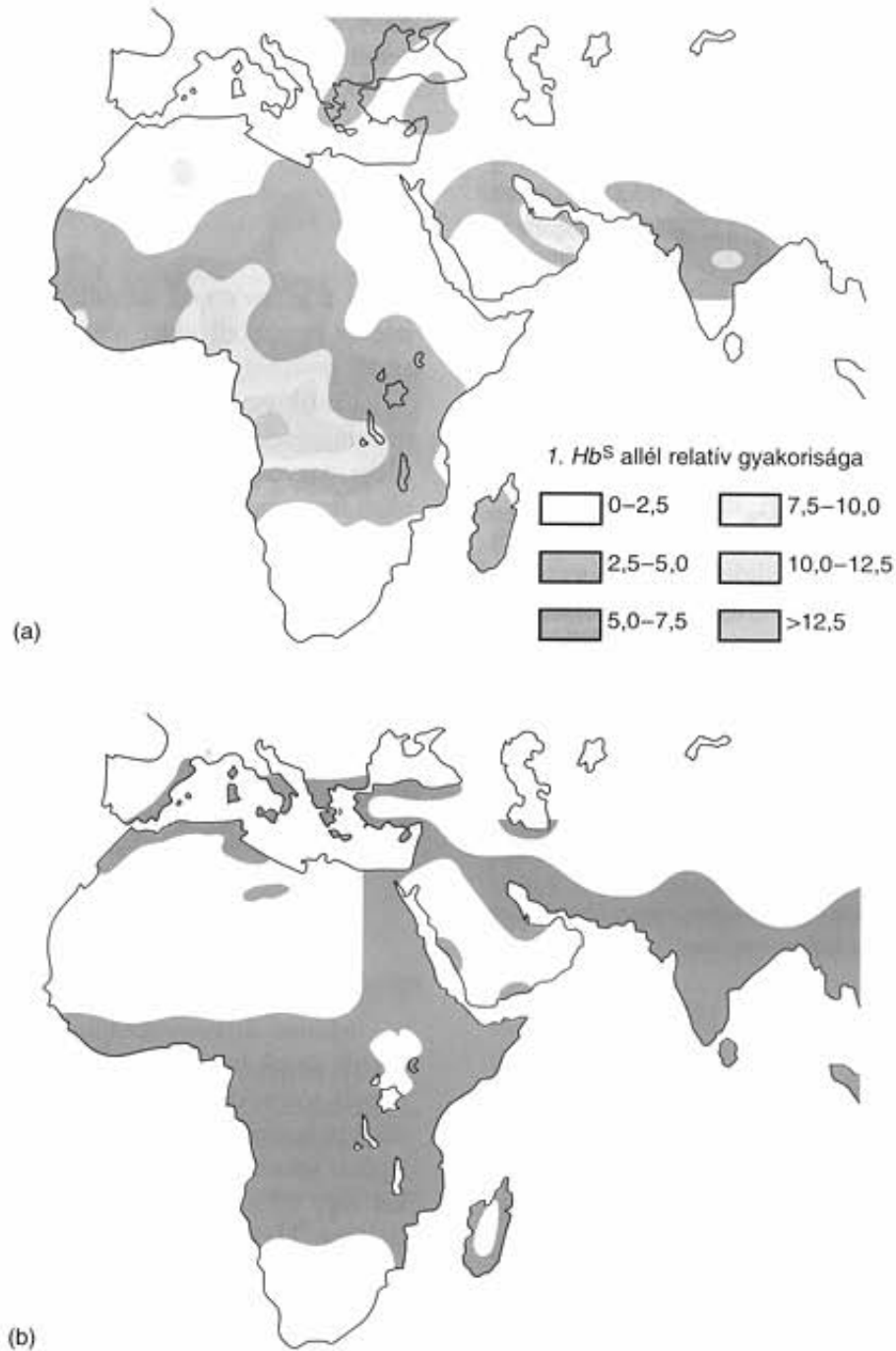
Az ember öröklődő betegségeinek alléljai általában nagyon kis relatív gyakorisággal fordulnak elő, de bizonyos körülmények között a betegséget okozó allél feldúsulhat egyes populációban. A hemoglobin β -globin génjének egyik mutáns allélja a sarlósejtes vérszegénységet okozza. Ez az allél meglepően nagy gyakoriságot ér el sok afrikai és afrikai származású amerikai populációban. A sarlósejtes vérszegénység alléljának gyakorisága néhány mediterrán és ázsiai populációban is meglehetősen magas (19.3. ábra).

A sarlósejtes anémia alléljának jelenlétét a β -globinok biokémiai vizsgálatával lehet kimutatni (a normál és a sarlósejtes vö-

rösvérsejtek fotóit l. a 11.6. ábrán). A fehérjék változatai **gél-elektroforézis** segítségével azonosíthatók (l. 6. fejezet). Ez a vizsgálati technika lehetővé teszi, hogy vérből, egyéb szövetekből, illetve az egész szervezetből kivont fehérjeelegyből szétválasszák és azonosítsák az egyes fehérjéket. Elektromos erőter hatására a gél szerkezetű hordozóanyagban (poliakrilamid- vagy keményítőgél) a fehérjék vándorolni kezdenek. A különböző fehérjék eltérő sebességgel mozognak, ezért meghatározott idő alatt különböző távolságokat tesznek meg. Az elektroforézis után a fehérjéket speciális festékekkel megfestik, és így az egyes fehérjék sávok vagy foltok formájában tűnnek elő. Meghatározható a különböző fehérjék relatív mobilitása is (19.4. ábra). A relatív mobilitás függ a molekula töltésétől, méretétől és alakjától. Ha a két allél által meghatározott fehérjék aminosavsorrendje eltérő, akkor gyakran relatív mobilitásuk is különbözik, mert a szekvenciabeli eltérés töltés-, méret- vagy alakbeli változást okoz.

A három genotípus (homozigóta a normál, homozigóta sarlósejtes, heterozigóta) β -globinjának elektroforézise eltérő mintázatot ad (19.5. ábra). Amint az első oszlopban látható, a normál genotípusnak (A_1A_1) csak egy, viszonylag nagy mobilitású sávja van. A sarlósejtes vérszegénységben szenvedő betegek (A_2A_2) szintén egy, de kisebb mobilitású sávval jellemezhetők (3. oszlop). A heterozigóta egyének (A_1A_2), akik a sarlósejtes anémia alléljának hordozói, mindkét típusú fehérje sávját mutatják (2. oszlop).

A károsító hatású mutáns allél viszonylag nagy relatív gyakoriságú. Ennek az az oka, hogy a heterozigóták (akik mindkét allélt hordozzák) viszonylag ellenállóak a maláriával szemben. Úgy vélik, az ellenálló képesség magyarázata az, hogy a heterozigóták vörösvérsejtjei szabálytalan alakúak, és ez nehezíti a kórokozó egysejtű bejutását a sejtbe. Ha összevetjük a mutáns allél gyakoriságát és a malária földrajzi elterjedését a fertőzést terjesztő malariaszúnyogok irtását megelőző időben, rendkívül nagyfokú egybeesést találunk (19.3. ábra).



19.3. ábra. A sarlósejtes vérszegénységet okozó allél (a) és malária (b) földrajzi elterjedése. A sárgától a zöldig terjedő skála a különböző relatív allélgyakoriságokat jelenti

Forrás: Cavalli-Sforza, L. L.: *The Genetics of the Human Populations*. Copyright © 1974 Scientific American, Inc.

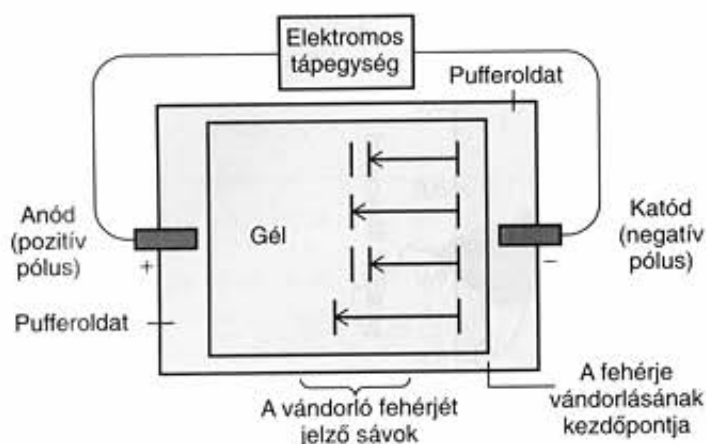
A legtöbb populáció nagyfokú genetikai sokféleséget mutat, köztük a morfológiai jeleket, a kromoszómák szerkezetét és a fehérjék tulajdonságait érintő variabilitást.

A GENETIKAI VARIABILITÁS MÉRÉSE

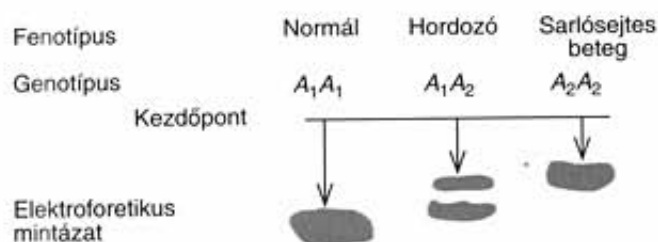
Mekkora egy populáció genetikai variabilitása? Hogyan lehet a variabilitást számokkal kifejezni? A válaszhoz kvantitatív mérés-

sekkel, szimbólumrendszerrel és a populációk leírására alkalmas statisztikai eljárásokkal kell megismerkednünk. Először is definiáljuk a populáció fogalmát! A **populáció** az ugyanazon fajhoz tartozó, egy helyen és egy időben élő egyedek szaporodási közössége. Például egy kis tóban adott évben élő és szaporodó tarajos gőte (*Triturus cristatus*) egyedei egy populációt alkotnak.

Ahhoz, hogy egy populációban egy adott lokusz genotípusainak és alléljainak gyakoriságát meghatározzuk, először meg kell számolni a különböző genotípusba sorolható egyedeket. A β -globin gén esetében legyen az A_1A_1 genotípushoz sorolható egyedek száma N_{11} , az A_1A_2 genotípusúaké N_{12} és az A_2A_2



19.4. ábra. A gélelektroforézis-készülék elvi vázlata. A pufferoldatokat a megfelelő pH biztosítására, és mint elektrolitot áramvezetőként alkalmazzák



19.5. ábra. β -globin gén alléljai által meghatározott fenotípusok, genotípusok és az elektroforézissel kapott mintázat

genotípusúaké N_{22} . Ha összesen N egyed szerepel a mintában, akkor az egyes genotípusok gyakorisága a populációban:

$$\text{Az } A_1A_1 \text{ genotípusé } D = \frac{N_{11}}{N}$$

$$\text{Az } A_1A_2 \text{ genotípusé } H = \frac{N_{12}}{N}$$

$$\text{Az } A_2A_2 \text{ genotípusé } R = \frac{N_{22}}{N}$$

Mivel három genotípus van, gyakoriságaik összege $D + H + R = 1$. Jegyezzük meg, hogy a homozigóta A_1A_1 genotípus csak A_1 , a homozigóta A_2A_2 genotípus csak A_2 allélt tartalmaz, míg az A_1A_2 heterozigóták alléljainak fele A_1 , fele A_2 . Ezért az A_2 allél gyakoriságát (jele: q) úgy kaphatjuk meg, ha a heterozigóták gyakoriságának felét és az A_2A_2 homozigóták gyakoriságát összegezzük:

$$q = \frac{1}{2}H + R$$

Helyettesítsük be az előző képletekben megadott genotípus-gyakoriságokat:

$$\begin{aligned} q &= \frac{\frac{1}{2}N_{12}}{N} + \frac{N_{22}}{N} \\ &= \frac{\frac{1}{2}N_{12} + N_{22}}{N} \end{aligned}$$

Az A_1 allél gyakoriságát p -vel jelölve, ugyanezzel a gondolatmenettel a következő képletet kapjuk:

$$p = D + \frac{1}{2}H$$

$$p = \frac{N_{11} + \frac{1}{2}N_{12}}{N}$$

Mivel a génnek csak két alléja van, gyakoriságuk összegének szintén egyet kell adnia, vagyis $p + q = 1$, illetve ebből $p = 1 - q$, amely összefüggést a későbbiekben használjuk.

Lássuk egy konkrét példán, hogyan alkalmazhatók a fenti összefüggések! Afrika egyes részein a sarlósejtes vérszegénység alléja nagyon gyakori ahhoz képest, milyen súlyos betegséget okoz homozigóta formában. Nyugat-Afrikában egy 400 egyénből álló mintában 320 fő normál A_1A_1 genotípusú volt, 72 fő hordozó (A_1A_2), és 8 fő sarlósejtes vérszegénységben szenvedett (A_2A_2), vagyis az $N_{11}=320$, $N_{12}=72$ és $N_{22}=8$. A három genotípus gyakorisága ebben a populációban:

$$D = \frac{320}{400} = 0,80$$

$$H = \frac{72}{400} = 0,18$$

$$R = \frac{8}{400} = 0,02$$

Ez azt jelenti, hogy a népesség 2%-a beteg és 18%-a a mutáns allél hordozója. Az A_2 allél gyakoriságára vonatkozó képlet alapján:

$$\begin{aligned} q &= \frac{1}{2}(0,18) + 0,02 \\ &= 0,11 \end{aligned}$$

A normál A_1 allél gyakorisága $p = 1 - q = 0,89$.

Miután megismerkedtünk a fenti összefüggésekkel, következék annak bemutatása, hogyan lehet számszerűen jellemezni a populációk sokféleségét, genetikai variabilitását. Az egyik megoldás a polimorf lokuszok arányának kiszámolása, a másik a heterozigócia számítása. Egy lokuszt akkor tekintünk **polimorfnak**, ha két vagy több alléja számottevő gyakorisággal van jelen a populációban. Ha csak egy alléja szerepel nagy gyakorisággal, a lokuszt **monomorfnak** tekintjük. A genetikai variabilitás megállapításának legegyszerűbb módja, hogy a génlokuszokat polimorf vagy monomorf kategóriába soroljuk, majd meghatározzuk a polimorf lokuszok arányát. Általánosan használt (tulajdonképpen önkényes) definíció szerint a lokusz monomorf, ha egyik alléljának gyakorisága 0,99 vagy nagyobb, illetve az összes többi allél gyakorisága összevonva 0,01 vagy kisebb. Ettől eltérő értékeknél a lokusz polimorf. Az előző példában a β -globin lokusz polimorf, mert az A_1 allél gyakorisága kisebb 0,99-nél.

A másik lehetőség a populáció variabilitásának jellemzésére az összes lokusz átlagos heterozigóciájának meghatározása. A heterozigócia mértékének ismerete azért hasznos, mert inkább figyelembe veszi a genetikai variabilitás egészét, mintha csak az előző módszer szerint két kategóriába soroljuk a lokuszokat. Az **átlagos heterozigócia** egy n lokuszt tartalmazó mintában:

$$H = \frac{1}{n}(H_A + H_B + H_C \dots)$$

ahol H_A az A-gén heterozigóciája, H_B a B-géné és így tovább. Egy egyszerű példával öt lokuszt figyelembe véve, ha $H_A = 0,5$, $H_B = 0,0$, $H_C = 0,1$, $H_D = 0,0$, és $H_E = 0,2$, $n = 5$, az átlagos heterozigócia:

$$H = (\%) (0,5 + 0,0 + 0,1 + 0,0 + 0,2) = 0,16$$

A példában három lokusz, A, C és E polimorf, ezért a polimorf lokuszok aránya $\% = 0,6$.

Egy faj genetikai variabilitásának kvantitatív jellemzését először az 1960-as évek közepén kísérelték meg. Richard Lewontin a *Drosophila pseudoobscura*, Harry Harris pedig az ember esetében végzett vizsgálatokat. Mindkét felméréshez fehérjék elektroforézisének eredményeit használták, és a vizsgált gének között jelentős genetikai variabilitást találtak. Ennek illusztrálására szolgál a 19.1. táblázatban Harris angliai európai populációra vonatkozó néhány adata. A felmérésben hetvenegy lokuszt vizsgáltak, és közülük húsz bizonyult polimorfoknak, vagyis a legelterjedtebb allél gyakorisága 0,99 vagy ennél kisebb volt. A polimorf lokuszok aránya $\% = 0,282$. A heterozigócia mértéke a monomorf lokuszok 0,0 értékétől 5 polimorf lokusz esetében egészen 0,5 körüli értékéig terjed, és legtöbbjük többallélos rendszert képez. A hetvenegy lokusz átlagos heterozigóciája 0,067. Másként kifejezve ez a szám azt jelenti, hogy az egyes egyedeknél a vizsgált biokémiai jellegekre nézve a lokuszoknak átlagosan 6,7%-a heterozigóta.

19.1. táblázat. Hetvenegy emberi einzimlokusz heterozigóciája

Lokusz	Heterozigócia (H)
51 monomorf lokusz	0,00
Peptidáz C	0,02
Peptidáz D	0,02
Glutamát-oxálacetát transzamináz	0,03
Leukocita hexokináz	0,05
6-foszfoglukonsav dehidrogenáz	0,05
Alkohol-dehidrogenáz-2	0,07
Adenil-kináz	0,09
Hasnyálmirigy-amiláz	0,09
Adenozin-dezamináz	0,11
Galaktóz-1-foszfát uridil-transzferáz	0,11
Acetil-kolin-észteráz	0,23
Mitokondriális alamasavenzim	0,30
Foszfoglukomutáz-1	0,36
Peptidáz A	0,37
Foszfoglukomutáz-3	0,38
Pepszinogén	0,47
Alkohol-dehidrogenáz-3	0,48
Glutamát-piruvát transzamináz	0,50
RBC savas idszfatáz	0,52
Méhlepény lúgos foszfátáz	0,53

Harris és Hopkinson, *Annals of Human Genetics*: 36:9–20., 1972., © Cambridge University Press engedélyével

Viszonylag friss felfedezés a populációgenetikában (amely alapjainak radikális felülvizsgálatához vezetett), hogy a modern biokémiai vizsgálatok eredményeként a legtöbb természetes populációban milyen magas fokú polimorfizmust és heterozigóciát találtak. Az első pillantásra ez a variabilitás meglepő, mert a legtöbb populációban a vad típusok kis morfológiai eltéréseket mutatnak. Ugyanakkor az a siker, amelyet a növény-termesztési és állattenyésztési programok a morfológiai bélyegek (pl. a méret) megváltoztatása terén elértek, arra enged következtetni, hogy a háttérben jelentős genetikai variabilitás húzódik meg (l. 3. és 20. fejezet).

Különböző fajok genetikai variabilitásának elemzése szerint az elektroforézissel vizsgálható fehérjék génjeinek 20%-a polimorf, és ezeknek a géneknek átlagosan 10%-a heterozigóta egy adott egyednél. A 19.2. táblázat különböző variabilitású fajokat mutat be. A gerinctelenek és néhány növény esetében a legnagyobb a variabilitás, míg a gerinceseknél kisebb. Egyes fajok különösen figyelemre méltók. Az atlanti tőfarkú, amely a kövületek tanúsága szerint évmilliók óta nem mutat morfológiai változást, genetikailag igencsak variabilis. Tehát a morfológia szintjén tapasztalható, akár geológiai hosszúságú időkre is érvényes **sztázis** (állandóság) biokémiai szinten nem jelenti szükségképpen a genetikai variabilitás hiányát. Ezzel szemben az északi elefántfóka, amelyet majdnem a kipusztulásig vadásztak a XIX. században, és a szintén veszélyeztetett gepárd fehérjék elektroforetikus vizsgálatai nem mutatnak ki genetikai variabilitást. Mindkét esetben a kis létszámú populációban fellépő genetikai sodródás okozhatta a variabilitás elvesztését. Ezt a jelenséget még a fejezet hátralévő részében és a 20. fejezetben tárgyaljuk. Érdekes az árpa esete is, amelynek néhány populációjában egy sor polimorf lokuszt mutattak ki, noha a növény 99%-ban öntermékenyülő, és így jóformán nincs heterozigóta egyed (l. a beltenyésztésről szóló fejezetrészt).

A különböző genotípusok számának ismeretében meghatározható a populáció genotípus- és allélgyakorisága, valamint a heterozigócia foka. A populáció genetikai variabilitását a polimorf lokuszok aránya és a heterozigócia mértéke jellemzi. Sok faj esetében jelentős variabilitást állapítottak meg a fehérjék elektroforetikus vizsgálatával.

A HARDY-WEINBERG-SZABÁLY

Az allélgyakoriságok segítségével sokkal egyszerűbben jellemezhetjük egy populáció genetikai összetételét, mint a genotípusgyakoriságokkal. 1908-ban, röviddel a Mendel-törvények újrafelfedezése után Godfrey Hardy angol matematikus és Wilhelm Weinberg német orvos és statisztikus kimutatták, milyen matematikai összefüggés áll fenn az allélgyakoriságok és a genotípusgyakoriságok között. (Történetesen William Castle amerikai genetikus is publikálta ennek az összefüggésnek egy speciális esetét

19.2. táblázat. A polimorf lokuszok átlagos aránya és az átlagos heterozigócia

Szervezet	Vizsgált gének száma	Polimorf lokuszok aránya	Heterozigócia
Emberi	71	0,28	0,067
Északi elefántfőka	24	0,0	0,0
Elefánt	32	0,29	0,089
Gepárd	52	0,0	0,0
Levelibéka	27	0,41	0,074
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	24	0,42	0,12
Királyrák	25	0,25	0,057
Árpa	28	0,30	0,003

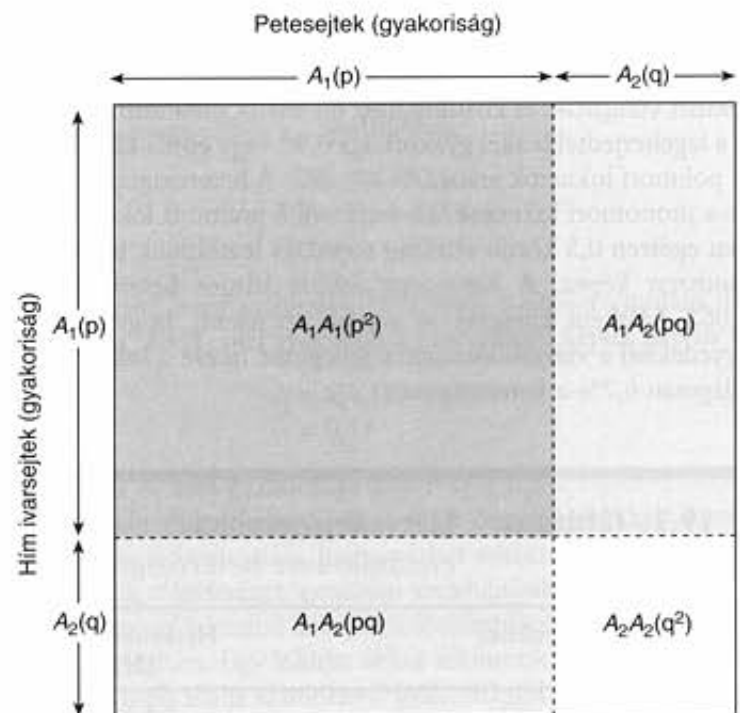
1903-ban.) Az összefüggést általában **Hardy–Weinberg-szabályként** ismerik, amely kimondja, hogy egy kétallélos gén esetében a genotípus-gyakoriságok az allélgyakoriságok binomiális eloszlásával írhatók le.

Tegyük fel, hogy az A -génnek két alléja van, A_1 , amelynek gyakorisága p és A_2 , amelynek gyakorisága q . Ebből adódóan $p + q = 1$. Feltételezzük, hogy a hím és a női ivarsejtek véletlenszerűen egyesülnek zigótává, vagyis a zigóták kialakulására érvényes a független események együttes bekövetkezésének valószínűségére vonatkozó matematikai összefüggés (1. 2. fejezet). Ezen felül feltételezzük, hogy mutáció, genetikai sodródás, génáramlás és szelekció nem történik a populációban.

A 19.6. ábra a gaméták véletlenszerű egyesülését szemlélteti. A négyzet egységnyi oldalhosszát a p és q arányának megfelelően osztották fel, az egyik oldalon a petesejteket, a másikon a hím ivarsejteket ábrázolták (az allélok gyakorisága a két nemnél azonos). A gaméták véletlenszerű egyesülését úgy képzelhetjük el, mintha az ivarsejtek egy medencében lennének, és mind a női, mind a hím ivarsejtek p hányada A_1 , q hányada pedig A_2 allélt tartalmaz, a zigóták pedig az ivarsejtek véletlenszerű találkozásának következtében alakulnak ki.

Az egységnyi területű négyzetben a különböző színnel jelölt területek a különböző genotípusú zigóták létrejöttének valószínűségét (illetve arányát) jelentik. A bal felső négyzet például, amelynek p^2 a területe az A_1A_1 genotípusú, a jobb alsó q^2 nagyságú terület pedig az A_2A_2 genotípusú zigóták kialakulásának valószínűségét ábrázolja. A fennmaradó két kombináció mindegyike pq gyakoriságú, és mindkettő heterozigóta genotípust eredményez, tehát a heterozigóták aránya $2pq$. Összegezve: A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2 zigóták keletkezésének valószínűsége p^2 , $2pq$, q^2 és a genotípusok ugyanezzel a gyakorisággal alakulnak ki a népességben. Az allélgyakoriságok összegét négyzetre emeljük, a $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Látható, hogy a Hardy–Weinberg-szabály valóban binomiális eloszlást ír le.

Természetesen a különböző populációkban az allélgyakoriságok értékei is különbözők. A 19.7. ábrán látható miként alakulnak a genotípusok gyakoriságai az allélgyakoriságok függvényében. Figyeljük meg, hogy a heterozigóták aránya



19.6. ábra. A gaméták véletlenszerű egyesülésével kialakuló genotípusok Hardy–Weinberg-egyensúly szerinti megoszlása egységnyi oldalú négyzettel ábrázolva

közepes allélgyakorisági értékek esetén a legmagasabb, a homozigótáké pedig a határértékeknél. A heterozigóták gyakoriságának maximuma $p = q = 0,5$ esetén tapasztalható, ekkor az egyedek fele heterozigóta. Amikor a lokusz monomorf ($p > 0,99$ vagy $q > 0,99$), a heterozigóták aránya csekély.

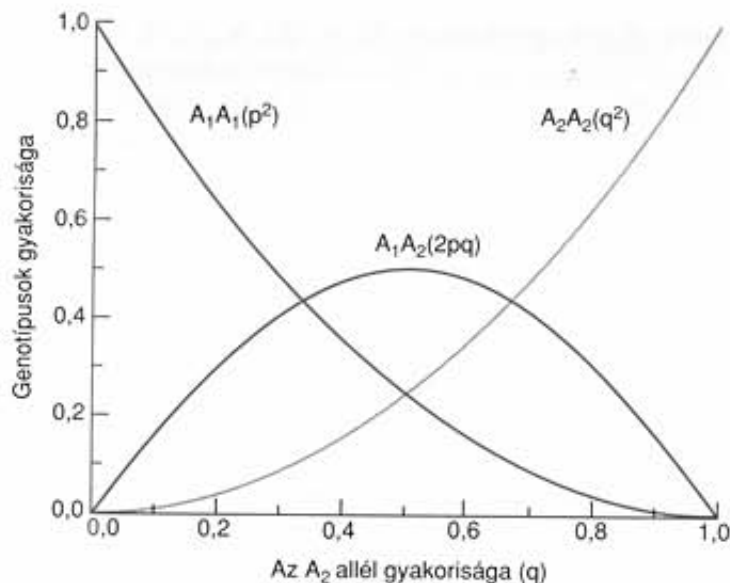
A legtöbb szervezet esetében a zigótaképzés nem egyszerűen a gaméták véletlenszerű egyesülésével történik, hanem a szülői egyedek találkoznak, párosodnak, és az általuk termelt ivarsejtek olvadnak össze, függetlenül attól, milyen allélokat tartalmaznak. Tehát ezekben az esetekben a női és hím genotípusok **véletlenszerű párosodása** történik. Figyeljük meg, milyen genotípus-megoszlás várható, ha a populáció diploid szervezetekből áll, és a vizsgált lokusz 2 alléja három lehetséges genotípust (A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2) alakít ki, amelyek gyakorisága D , H , R . Ne felejtjük el, hogy

$D + H + R = 1$. Mindkét nemnél a három genotípussal számolva kilenc párosodási kombináció lehetséges, ahogy azt a 19.3. táblázat mutatja. Egy bizonyos párosodási típus valószínűsége, tehát a független események együttes bekövetkezése egyenlő lesz a szóban forgó genotípusok gyakoriságainak szorzatával. Így például az $A_1A_1 \times A_1A_1$ párosodás valószínűsége D^2 . Összesen hatféle párosodási típus van, mert a reciprok párosodások genetikai következményei azonosak (az $A_1A_1 \times A_1A_2$ és az $A_1A_2 \times A_1A_1$ párosodások eredménye ugyanaz, függetlenül attól, melyik szülő a hím és melyik a nő ivarú). A 19.4. táblázat tartalmazza a párosodási típusokat, gyakoriságukat, és az utódok genotípusainak várható gyakoriságát a hasadás elve alapján. Az $A_1A_1 \times A_1A_1$ párosodásból például csak A_1A_1 utódok származnak; az $A_1A_1 \times A_1A_2$ párosodásból az A_1A_1 , illetve A_1A_2 , genotípusú utódok kialakulásának valószínűsége azonos ($\frac{1}{2}$), és így tovább. Ha összegezzük az A_1A_1 utódok arányát mindegyik párosodási típusra (a táblázatban az utódok első oszlopa), azt kapjuk, hogy összesen $D^2 + 2DH + \frac{1}{2}H^2 = (D + \frac{1}{2}H)^2$ gyakorisággal jönnek létre. Az A_1 gyakoriságára az előzőekben tárgyaltak alapján tudjuk,

hogy $p = D + \frac{1}{2}H$, ezért az utódok p^2 hányada A_1A_1 genotípusú. Hasonló módon, az A_1A_2 és az A_2A_2 genotípusú utódok gyakorisága $2(D + \frac{1}{2}H)(R + \frac{1}{2}H) = 2pq$, illetve $(R + \frac{1}{2}H)^2 = q^2$. Beláthatjuk, hogy a Hardy–Weinberg-szabály érvényes a véletlenszerűen párosodó populációban. A véletlenszerű párosodás feltételezése a legtöbb lokusz esetében logikusnak tűnik.

A Hardy–Weinberg-szabályból következik, hogy bármilyen a populáció kezdeti genotípus-gyakorisága (D, H, R), egy generációval később, véletlenszerű párosodás mellett az utódok genotípus-gyakorisága $p^2, 2pq$ és q^2 lesz. Például 0,2; 0,4; 0,4 kiindulási genotípus-gyakoriságoknál, ami $p = 0,4$ és $q = 0,6$ -nek felel meg, egy generációval később a genotípus-gyakoriságok értéke 0,16; 2(0,4)(0,6); 0,6², azaz 0,16; 0,48 és 0,36 lesz. Amennyiben mindig véletlenszerű párosodás történik, pontosan ugyanezek a relatív genotípus gyakoriságok maradnak meg generációról generációra, amennyiben allél- vagy genotípus-gyakoriságokat megváltoztató tényezők sem hatnak. Ha a populáció genotípus gyakorisági értékei binomiális eloszlást mutatnak, és generációról generációra változatlanok, a népegyensúlyban lévőnek tekintjük, illetve azt mondjuk, Hardy–Weinberg-egyensúlyban van.

A fejezet előző részében az allélgyakoriság kiszámításakor azt feltételeztük, hogy a heterozigótákban mindkét allél kifejeződik. Sok esetben azonban a heterozigótákat nem lehet fenotípus alapján elkülöníteni a homozigóta dominánsoktól az egyik allél teljes dominanciája miatt. Ez tapasztalható például az ember számos örökldő anyagcsere-betegségénél vagy sok szervezet színváltozatainál.



19.7. ábra. A genotípus-gyakoriságok alakulása az allélgyakoriságok függvényében Hardy–Weinberg-egyensúly esetén. A heterozigóta genotípus közepes allélgyakoriságnál a legnagyobb arányú

19.3. táblázat. A párosodási lehetőségek gyakorisága kétallélos rendszerben, véletlenszerű párosodás mellett

Női genotípus (gyakoriság)	Hím ivarsejtek (gyakoriság)		
	$A_1A_1(D)$	$A_1A_2(H)$	$A_2A_2(R)$
$A_1A_1(D)$	D^2	DH	DR
$A_1A_2(H)$	DH	H^2	HR
$A_2A_2(R)$	DR	HR	R^2

19.4. táblázat. A Hardy–Weinberg-szabály, véletlenszerű párosodás és normál hasadás mellett

Szülők			Utódok	
Párosodás	Relatív gyakoriság	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
$A_1A_1 \times A_1A_1$	D^2	D^2	–	–
$A_1A_1 \times A_1A_2$	2DH	DH	DH	–
$A_1A_1 \times A_2A_2$	2DR	–	2DR	–
$A_1A_2 \times A_1A_2$	H^2	$\frac{1}{2}H^2$	$\frac{1}{2}H^2$	$\frac{1}{2}H^2$
$A_1A_2 \times A_2A_2$	2HR	–	HR	HR
$A_2A_2 \times A_2A_2$	R^2	–	–	R^2
Összesen	1	$(D + \frac{1}{2}H)^2 = p^2$	$2(D + \frac{1}{2}H)(R + \frac{1}{2}H) = 2pq$	$(R + \frac{1}{2}H)^2 = q^2$

Amennyiben a populáció Hardy–Weinberg-egyensúlyban van, ezekben az esetekben is megállapíthatjuk az allélgyakoriságokat. Vizsgáljunk egy kétallélos gént, ahol az A_1 dominanciája teljes. Feltelezhetjük, hogy az A_2A_2 homozigóta recesszív genotípus gyakorisága a populációban:

$$q^2 = \frac{N_{22}}{N}$$

A q^2 értékből az A_2 allél gyakorisága

$$q = \left(\frac{N_{22}}{N} \right)^{1/2}$$

Ezt a megközelítést sok emberi anyagcsere-rendellenesség esetében alkalmazzák, amikor fontos annak ismerete, mekkora a hordozók gyakorisága a populációban. A károsító mutáns allél gyakran recesszív, tehát a hordozók egészségesek, nem különböztethetők meg a normál allélra homozigóta dominánsoktól. A hordozók gyakorisága a populációban:

$$H = 2pq$$

ahol q a mutáns allél gyakorisága, és $p = 1 - q$. Az albinizmus esetében például minden 40 000 újszülött közül 1 recesszív fenotípusú, vagyis A_2A_2 homozigóta, akkor a $q = (\frac{1}{40000})^{1/2} = 0,005$. Tehát $p = 0,995$ és a hordozók gyakorisága $H = 2(0,005)(0,995) = 0,00995$. Másképp megfogalmazva, a populáció egyedeinek körülbelül 1%-a hordozza a mutáns allélt. (A laikusok sokszor meglepődnek azon, milyen sokan hordoznak recesszív, betegséget okozó allélokot, noha maga a betegség ritkán fordul elő.)

A KHI-NÉGYZET PRÓBA

A reális populációkban mért genotípus-gyakoriságok sokszor igen jól közelítik a Hardy–Weinberg-szabály alapján becsült értékeket. Ugyanakkor az öntermékenyítéssel szaporodó növények esetében a populációkban a megfigyelt és a várt genotípus-gyakoriságok nagymértékben eltérhetnek. Annak megállapítására, hogy a Hardy–Weinberg-eloszlástól való eltérések csak a véletlennek köszönhetők, vagy szignifikánsnak tekinthetők, statisztikai tesztet kell alkalmazni. Erre a célra leggyakrabban a khi-négyzet próbát használják, amelyet a 2. fejezetben, a mendeli arányok ellenőrzésére ismertünk meg. Annak eldöntésére, hogy a populáció vizsgálata során kapott adatok megfelelnek-e a binomiális eloszlásnak, kiszámítjuk a χ^2 értékét a képlet alapján:

$$\chi^2 = \sum \frac{(T - E)^2}{E}$$

ahol T a mért, E pedig a Hardy–Weinberg-szabály alapján számított egyedszám. Ne felejtjük el, hogy T és E nem gyakoriságok, hanem egyedszámok, a Σ pedig azt jelenti, hogy az összes genotípus-osztályra el kell végezni a műveletet, és az eredményeket össze kell adni. Másképp fogalmazva, a khi-négyzet értéke a megfigyelt és a számított egyedszámok kü-

lönbségének négyzetösszege osztva a várható egyedszámmal, majd összegezve mindegyik genotípus-osztályra. A kapott érték és a szabadságfok ismeretében a khi-négyzet táblázatokból kikereshetjük, hogy adott valószínűségi értéknél az eltérés milyen mértékben köszönhető a véletlennek (2.5. táblázat).

Ha egy lokusz két allélját vizsgáljuk és mindhárom genotípus egyértelműen elkülöníthető, a khi-négyzet értéket az alábbi kifejezés adja meg:

$$\chi^2 = \frac{(N_{11} - p^2N)^2}{p^2N} + \frac{(N_{12} - 2pqN)^2}{2pqN} + \frac{(N_{22} - q^2N)^2}{q^2N}$$

A három tag a három genotípus A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2 várttól való eltéréseinek négyzetét jelenti. N_{11} például az A_1A_1 genotípusban megfigyelt egyedszám, a p^2N pedig a Hardy–Weinberg-szabály alapján számított egyedszám.

Az eljárás bemutatására végezzük el a számítást az előzőekben szereplő β -globin változatok adataival! A három genotípusban megfigyelt egyedszámok: $N_{11} = 320$, $N_{12} = 72$, $N_{22} = 8$, amiből $p = 0,89$ és $q = 0,11$. Tehát a három becsült egyedszám: $p^2N = (0,89)^2 400 = 316,8$, $2pqN = 2(0,89)(0,11)400 = 78,3$ és $q^2N = (0,11)^2 400 = 4,8$. A khi-négyzet formulát használva:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{(320 - 316,8)^2}{316,8} + \frac{(72 - 78,3)^2}{78,3} \\ &\quad + \frac{(8 - 4,8)^2}{4,8} \\ &= 0,03 + 0,51 + 2,13 \\ &= 2,67 \end{aligned}$$

Ahhoz, hogy megállapíthassuk, szignifikáns-e ez az érték, ismernünk kell a szabadságfokot. Mint azt a 2. fejezetben láttuk, először megállapítjuk, hányféle genotípus-kategória van. Ebben az esetben a kategóriák száma három. Ebből levonunk egyet, mert az N osztályba sorolt minta szabadságfoka $N-1$. A szabadságfok értékéből a khi-négyzet próba ezen alkalmazásában le kell vonnunk még egyet, mivel a p allélgyakoriság értékét is becsülni kellett a várható egyedszámok megállapításához. Így a szabadságfok $3 - 2 = 1$.

Ezután a 2.5. táblázatból kikeressük, hogy a 2,67 khi-négyzet érték 1 szabadságfoknál, 5% valószínűségi érték mellett szignifikáns-e. Mivel a 2,67 kisebb, mint a táblázatban található 3,84 (1 szabadságfoknál a legalacsonyabb statisztikus szignifikancia), azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a mintában megfigyelt egyedszámok megfelelnek a Hardy–Weinberg-egyensúlynak.

A MULTIPLEX ALLÉLIA

Sok génnek van kettőnél több allélja, ahogyan azt a 3. fejezetben tárgyaltuk. A β -globin génnek (ennek egyik változata a sarlósejtes vérszegénységet okozó allél) történetesen száznál is több allélja ismert, bár legtöbbjük ritka. Az elektroforézissel

vizsgálható fehérjék génjei közül is jó néhányuk van kettőnél több allélja. Sőt, ha a DNS-szekvenciát vennénk figyelembe, még több alléllal kellene számolnunk a populációban.

Multiplex allélia esetén egy bizonyos allél gyakoriságát úgy határozzuk meg, hogy az allélra homozigóták gyakoriságához hozzáadjuk mindazon heterozigóták gyakoriságának felét, amelyekben a vizsgált allél jelen van. Tegyük fel, hogy egy lokusznak három allélja van. A vizsgálati minta N egyedből áll. Ahogy a 3. fejezetben tárgyaltuk, hat genotípus jelenhet meg: három homozigóta (A_1A_1 , A_2A_2 , A_3A_3) és három heterozigóta (A_1A_2 , A_1A_3 , A_2A_3). Az A_1 allél gyakoriságát a két allélos esethez hasonlóan számítjuk ki, azzal az eltéréssel, hogy az A_1 allél két különböző heterozigóta genotípusban fordul elő (A_1A_2 , A_1A_3). Tehát az A_1 allél gyakorisága:

$$p = \frac{N_{11} + \frac{1}{2}N_{12} + \frac{1}{2}N_{13}}{N}$$

ahol N_{13} az A_1A_3 heterozigóták száma.

A Hardy–Weinberg-szabály multiplex allélia esetén is érvényes. Elemezzük az ember AB0-vércsoport-rendszerének példáját! A vércsoport kialakításáért felelős I génnek három allélja van: I^A , I^B és I^O . A 19.5. táblázatban foglaltuk össze a gaméták p , q , illetve r allélgyakoriságai, valamint a geno- és a fenotípus-gyakoriságok közötti összefüggéseket. A genotípusok gyakoriságát a hím és a női gaméták gyakoriságának szorzata adja. Az $I^A I^A$ genotípus gyakorisága p^2 . Egy gén három allélja esetén a genotípus-gyakoriságok az alábbi trinomiális eloszlás szerint alakulnak:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + 2pq + q^2 + 2pr + 2qr + r^2$$

Az I^O allél recesszív, ezért az A-vércsoportot kétféle genotípus alakíthatja ki ($I^A I^A$ és $I^A I^O$), és szintén kettő a B fenotípust ($I^B I^B$ és $I^B I^O$). A 0 fenotípus gyakorisága Hardy–Weinberg-egyensúlyban a recesszív I^O allél gyakoriságának négyzete, r^2 ; az A és a B fenotípusok gyakorisága $p^2 + 2pr$, illetve $q^2 + 2qr$; az AB fenotípusé $2pq$. Az Amerikai Egyesült Államokban az európai származású népességben az allélok átlagos gyakorisága

$I^A = 0,28$, $I^B = 0,06$ és $I^O = 0,66$, a fenotípusoké pedig $A = 0,45$, $B = 0,08$, $AB = 0,03$, és $O = 0,44$.

A multiplex allélia azzal a fontos következménnyel jár, hogy rendszeren a populáció legtöbb tagja heterozigóta. Például a $HLA-A$ és $HLA-B$ lokuszokra nézve a heterozigóta személyek gyakorisága több mint 90%, a homozigótáké így 10% alatt van (l. 3. fejezet). A fenti, AB0-vércsoportrendszerre vonatkozó adatokkal illusztrálva a heterozigóták arányát:

$$\begin{aligned} H &= 2pq + 2pr + 2qr \\ &= 2(0,28)(0,06) + 2(0,28)(0,66) + 2(0,06)(0,66) \\ &= 0,482 \end{aligned}$$

Amennyiben egy génnek sok allélja van (ami a homozigóták sokszorosát kitevő heterozigótákat jelent), úgy a legegyszerűbb meghatározni a heterozigóciát, ha a Hardy–Weinberg-szabály alapján kiszámoljuk a homozigóták arányát, és ezt a számot kivonjuk 1-ből.

AZ X-KROMOSZÓMÁHOZ KAPCSOLT GÉNEK

Vannak olyan öröklődő betegségek, például a vérzékenység (hemofília) és az izomdisztrófia, amelyeknek recesszív alléljai X-kromoszómához kapcsolt gének változatai. A Hardy–Weinberg-szabály alapján megérthetjük, miért fordulnak elő ezek a betegségek sokkal gyakrabban férfiakban, mint nőkben. A 19.6. táblázat mutatja, hogy X-kromoszómához kapcsolt gén esetén milyen genotípus-gyakoriságok várhatók, ha az ivarsejtek egyesülését véletlenszerűnek tekintjük. Az érintett férfiak (A_2Y) gyakorisága q , az érintett nőké (A_2A_2) azonban q^2 . Ha a q értéke alacsony (mint az a betegséget okozó allélok nál általános), például 0,005, akkor a beteg férfiak gyakorisága 0,005, a nőké pedig 0,000025. Vagyis a beteg férfiak és nők aránya $q:q^2$ vagy $1:q$. Ha $q = 0,005$, az arány $1:0,005 = 1:200$. Mivel a vérzékenység alléljának gyakorisága viszonylag magas, a recesszíven öröklődő betegségekben szenvedők jelentős hányadát teszik ki a vérzékeny férfiak (egyes populációkban minden negyedik). Ugyanakkor a hemofiliás nők száma igen alacsony.

19.5. táblázat. A Hardy–Weinberg szabály alkalmazása az AB0-vércsoportrendszer alléljaira

Petesejtek gyakorisága	Hím ivarsejtek gyakorisága		
	$I^A(p)$	$I^B(q)$	$I^O(r)$
$I^A(p)$	$I^A I^A(p^2)$	$I^A I^B(pq)$	$I^A I^O(pr)$
$I^B(q)$	$I^A I^B(pq)$	$I^B I^B(q^2)$	$I^B I^O(qr)$
$I^O(r)$	$I^A I^O(pr)$	$I^B I^O(qr)$	$I^O I^O(r^2)$
	A	B	0

19.6. táblázat. A gaméták és a genotípusok gyakorisága X-kromoszómához kapcsolt gén két allélja esetén

Petesejtek gyakorisága	Hím ivarsejtek gyakorisága		
	Leánygyermek		Fiúgyermek
	$A_1(p)$	$A_2(q)$	Y(1)
$A_1(p)$	$A_1A_1(p^2)$	$A_1A_2(pq)$	$A_1Y(p)$
$A_2(q)$	$A_1A_2(pq)$	$A_2A_2(q^2)$	$A_2Y(q)$

A Hardy–Weinberg-szabály kimondja, hogy a genotípus-gyakoriságok az allélgyakoriságok binomiális eloszlását követik egy generációval azután, hogy a populációban véletlenszerű párosodás történik. A khi-négyzet próbával ellenőrizhető, megfelel-e a népesség genotípus-eloszlása a Hardy–Weinberg-szabálynak. A Hardy–Weinberg-szabály multiplex allélia és X-kromoszómához kapcsolt gének esetében is alkalmazható.

A BELTENYÉSZTÉS

A fejezet eddigi részében véletlenszerűen párosodó egyedekből álló populációkat vizsgáltunk. Az öntermékenyülő növény- vagy állatfajok populációi nyilvánvalóan nem ilyenek. A **beltenyésztés** nem véletlenszerű, hanem közeli rokonok közötti párosodás. Az emberi populációkat is érintő kérdéssről van szó, mert sok személy, aki recesszíven öröklődő betegségben szenved, rokonházasságból született. Ugyanakkor a növény- és állatnemesítésben felhasználják a beltenyésztést olyan vonalak vagy változatok előállítására, amelyek egy bizonyos, kívánt tulajdonsággal rendelkeznek. A beltenyésztés és a szelekció együttes hatását, amely a beltenyésztéses leromláshoz vezet, a 20. fejezetben tárgyaljuk.

A genotípusokra nézve nem-véletlenszerű párosodás azokban a populációkban fordul elő, ahol a kereszteződő egyedek vagy sokkal közelebbi vagy sokkal távolabbi rokonságban vannak egymással, mint a véletlenszerűen kiválasztott egyedek lennének.

Az első párosodás eredménye a **beltenyésztés**, a második az **idegentermékenyülés**. Látjuk majd, hogy önmagában egyik sem vezet az allélgyakoriságok megváltozásához, de mindegyik módosítja a genotípusok gyakoriságát. Egy beltenyésztett populációban a homozigóták gyakorisága megnő, a heterozigótáké pedig lecsökken a véletlenszerűen párosodó, Hardy–Weinberg-egyensúlyban lévő populációhoz képest. Idegentermékenyülés esetén ennek ellenkezője következik be, a heterozigóták gyakorisága növekszik, a homozigótáké pedig a véletlenszerű párosodással kapott arányokhoz képest csökken. Ezek a genotípus-változások a genom összes lokuszára érvényesek.

A fenotípusokra nézve nem-véletlenszerű párosodás a kiválogató, **asszortatív párosodás**, amely gyakoribb az előző eseteknél. **Pozitív asszortatív párosodás** esetén az egyedek gyakrabban tartoznak ugyanahhoz a fenotípushoz, mint az a véletlenszerű párosodás alapján várható, **negatív asszortatív párosodáskor** pedig épp ellenkezőleg. A 19.7. táblázat szerint az embereknél pozitív asszortatív párosodási helyzet figyelhető meg például a testmagasság és a szemszín tekintetében, bár egyes populációkban épp ezek a tulajdonságok nem játszanak szerepet, és az is nyilvánvaló, hogy a fejformát jellemző fejjindexnek nincs jelentősége a párválasztásban. A kiválogató párosodás hatása általában csak azoknak a

19.7. táblázat. Pozitív asszortatív párosodás öt emberi tulajdonság vizsgálata alapján

Tulajdonság	A különböző korrelációs együtthatót adó vizsgálatok száma			
	<0,1	0,1–0,2	0,2–0,3	>0,3
Testmagasság	7	8	7	5
Testtömeg	1	2	3	1
Fejjindex	14	5	3	–
Hajszín	–	2	2	1
Szemszín	2	1	1	1

lokuszoknak a genotípus-eloszlását érinti, amelyek meghatározzák a párválasztásban szerepet játszó fenotípusos tulajdonságokat. Minthogy az asszortatív párosodás a beltenyésztéshez hasonló hatást vált ki, azzal a különbséggel, hogy nem az összes, hanem általában csak néhány lokuszt érint, a következő szakaszban csak a beltenyésztés hatásait tárgyaljuk meg.

AZ ÖNTERMÉKENYÍTÉS

A beltenyésztés legszélsőségebb esete az öntermékenyítés, amikor a zigótát képző hím ivarsejt és a petesejt ugyanabban a szervezetben termelődik. Ha az egyedek kizárólag öntermékenyítéssel szaporodnak, a populáció beltenyésztett vonalakra tagolódik, amelyek rövid idő alatt nagymértékben homozigóttá válnak. Azok a homozigóta borsóvonalak is öntermékenyítők voltak, amelyeket Mendel vizsgált keresztezési kísérleteiben.

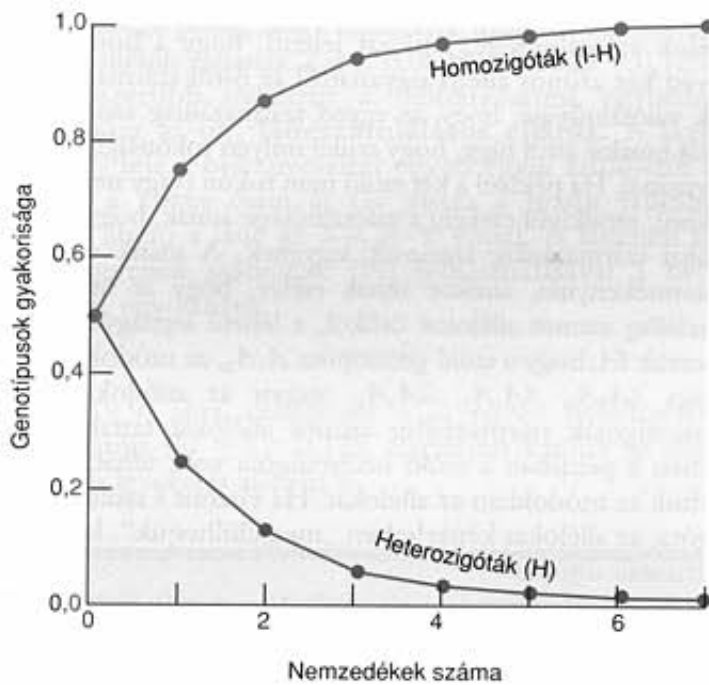
Tekintsünk egy példát arra, milyen magas fokot érhet el a homozigóták aránya! A szülők körében az A_1A_1 , az A_1A_2 és A_2A_2 genotípusok gyakorisága D, H és R (19.8. táblázat). Minthogy az A_1A_1 és az A_2A_2 homozigóta, az öntermékenyítéssel keletkező utódaik is homozigóták; a heterozigóta A_1A_2 genotípus utódainak azonban csak a fele lesz a szülőhöz hasonlóan heterozigóta, a másik fele egyenlő arányban A_1A_1 , illetve A_2A_2 genotípusú lesz.

Ha a táblázat alapján meghatározzuk a különböző genotípusú utódok arányát, azt kapjuk, hogy a heterozigóták relatív gyakorisága az eredeti szülői érték felére csökkent, a két homozigótáé viszont megemelkedett. Ha például az A_1A_1 , A_1A_2 és A_2A_2 genotípusok gyakorisága a szülőknél 0,25, 0,5 és 0,25 volt, a következő generációban 0,375, 0,25 és 0,375-re módosul.

Hogy jobban megérthessük, milyen radikálisan megváltoztatja a beltenyésztés a genotípusok arányát, kövessük nyomon a heterozigóták gyakoriságának alakulását teljes öntermékenyítés esetén néhány nemzedéken keresztül. Az öntermékenyítés következtében két egymást követő generációban a heterozigóták gyakorisága a felére csökken. Ezért t generáció alatt a heterozigóták gyakorisága t alkalommal feleződik, tehát a teljes öntermékenyítés hatására az eredeti

19.8. táblázat. A szülők és az utódok gyakoriságának teljes önmegtermékenyítés esetén

	Szülők		Utódok		
		Gyakoriság	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
A_1A_1	D		D	—	—
A_1A_2	H		$\frac{1}{2}H$	$\frac{1}{2}H$	$\frac{1}{2}H$
A_2A_2	R		—	—	R
		1,0	$D + \frac{1}{2}H$	$\frac{1}{2}H$	$R + \frac{1}{2}H$



19.8. ábra. A heterozigóták és a homozigóták arányának változása a nemzedékek számának függvényében önmegtermékenyítő populációban

érték $(\frac{1}{2})^n$ -ed részére csökken. Ha kezdetben $H = 0,5$, öt nemzedékkel később $H = (\frac{1}{2})^5 0,5 = 0,016$, vagyis az 50% helyett kevesebb, mint 2% heterozigóta lesz, ami igen gyors változásnak tekinthető. A 19.8. ábra a heterozigóták és a homozigóták arányának változását ábrázolja a generációk számának függvényében.

A beltenyésztés egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy bár a genotípus gyakoriságokat jelentősen megváltoztatja, az allélgyakoriságokat egyáltalán nem befolyásolja. Jelöljük az allél- és genotípus-gyakoriságokat az utódgenerációban vesszővel ($'$). Az A_1 allél gyakorisága a következő generációban p' :

$$p' = D' + \frac{1}{2}H'$$

ahol a D' és H' az A_1A_1 , illetve az A_1A_2 genotípus gyakorisága a következő generációban. Értékeiket a 19.8.

táblázat képleteibe helyettesítve a következő összefüggést kapjuk:

$$p' = D + \frac{1}{2}H + \frac{1}{2}H = p$$

Beláthatjuk, hogy a allélgyakoriság nem változott meg az önmegtermékenyítés következtében.

A BELTENYÉSZTÉSI EGYÜTTHATÓ

A **beltenyésztési együttható** (f) definíció szerint annak a valószínűsége, hogy egy ivaros szaporodással létrejött egyedben egy lokusz két alléja ugyanattól a közös őstől származik. Jól használható annak becslésére, hogy milyen mértékben változtatja meg a beltenyésztés a genotípus-gyakoriságokat a populációban. Legnagyobb értéke 1, ebben az esetben egy populáció minden genotípusa homozigóta és azonos eredetű allélokat tartalmaz, mint Mendel tiszta származéksorú borsóvonalai. Legkisebb értéke 0, ami azt jelenti, nincs két azonos eredetű allél jelen. Nagy létszámú, véletlenszerűen párosodó populációkban általában 0-hoz közeli értékeket feltételezünk, mert bármely esetlegesen fellépő beltenyésztés nagyon távoli rokonságban álló egyedek között jöhet létre, amely kis beltenyésztési együtthatót eredményez.

A három genotípus arányát általános formában is felírhatjuk a beltenyésztési együttható és az allélgyakoriságok figyelembe vételével (19.9. táblázat). Feltételezzük, hogy a populáció két részre osztható annak megfelelően, hogy egyik része beltenyésztett (f), a másik pedig véletlenszerűen párosodik ($1-f$). A beltenyésztett részben az A_1A_1 , A_1A_2 és A_2A_2 gyakorisága p , 0, illetve q . Az alábbi képletek azt a genotípus-gyakoriság változást írják le, amely abból származik, hogy a heterozigóta szülők utódai között a beltenyésztés következtében nő a homozigóták aránya. A genotípus-gyakoriságok a következőképpen alakulnak:

$$\begin{aligned} D &= p^2 + fpq \\ H &= 2pq - 2fpq \\ R &= q^2 + fpq \end{aligned}$$

Az egyenletek első tagja az illető genotípus-gyakoriságok véletlenszerű párosodáskor kialakuló értéke, a második tag pedig a beltenyésztés következtében fellépő változás. A beltenyésztésből származó homozigóta egyedek alléljai származásilag azonosak (fpq), a véletlenszerű párosodásból származó homozigóták aránya p^2 és q^2 . A beltenyésztési együttható nagysága tükrözi a genotípusok gyakoriságának eltérését a Hardy-Weinberg-egyensúlytól. Ha az f értéke 0, a genotípusok eloszlása binomiális, ha $0 < f < 1$, heterozigóta-hiány és homozigóta-többlet tapasztalható az egyensúlyi állapothoz képest.

A BELTENYÉSZTÉSI EGYÜTTHATÓ KISZÁMÍTÁSA

A beltenyésztési együtthatót a genotípus-gyakoriságok alapján, illetve családfaelemzéssel lehet meghatározni.

19.9. táblázat. A beltenyésztés hatása az egyes genotípusok gyakoriságára

Genotípusok	Betenyésztett (f)	Véletlenszerű párosodás (1 - f)	Összesen
A_1A_1	fp	$(1-f)p^2$	$fp + (1-f)p^2 = p^2 + fpq$
A_1A_2	—	$(1-f)2pq$	$(1-f)2pq = 2pq - 2fpq$
A_2A_2	fq	$(1-f)q^2$	$fq + (1-f)q^2 = q^2 + fpq$
	f	$1-f$	1 1

Először meghatározzuk egy természetes populáció beltenyésztési együtthatóját a heterozigóták gyakoriságára az előzőekben alkalmazott összefüggés alapján, tehát kifejezzük az egyenletből f -et:

$$H = 2pq - 2fpq$$

$$1 - f = \frac{H}{2pq}$$

$$f = 1 - \frac{H}{2pq}$$

A fenti egyenlet alapján nyilvánvaló, hogy a beltenyésztési együttható (f) nagysága a mért (H) és a Hardy–Weinberg-egyensúly alapján becsült heterozigóta-gyakoriság ($2pq$) hányadosától függ. Ha nincs beltenyésztés, $H = 2pq$, tehát $f = 0$, beltenyésztés esetén H kisebb $2pq$ -nál, ezért f nagyobb 0 -nál. Ha pedig nincs heterozigóta genotípus, akkor $f = 1$.

Sok növényfaj szaporodási rendszerében mind az öntermékenyítés, mind a véletlen párosodás előfordul. Ha az öntermékenyítés aránya nagy, a populáció szinte minden egyede homozigóta lehet. Jó példa erre a héla-zab (*Avena fatua*), a Földközi-tenger régiójában elterjedt öntermékenyülő faj, amelyet Kaliforniába is behurcoltak. Egyik populációjában egy enzimlokuszának három genotípus gyakorisága $D = 0,67$, $H = 0,06$ és $R = 0,27$ volt. A beltenyésztési együttható meghatározásához először az allélgyakoriságokat kell meghatározni. Az A_2 gyakorisága (q):

$$q = \frac{1}{2}H + R$$

$$= \frac{1}{2}(0,06) + 0,27$$

$$= 0,3$$

A p értéke $1 - q = 0,7$. A fenti képlet alapján:

$$f = 1 - \frac{0,06}{2(0,3)(0,7)}$$

$$= 0,86$$

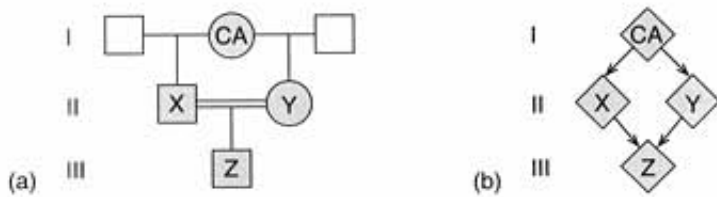
Ebből a rendkívül magas beltenyésztési együtthatóból arra következtethetünk, hogy a populáció legnagyobb

része öntermékenyüléssel szaporodik, és csak kis hányada véletlen beporzású.

Ahogy korábban megállapítottuk, a beltenyésztési együttható azt mutatja meg, mekkora a származásilag azonos allélok valószínűsége, ami azt jelenti, hogy a homozigóta egyed két azonos alléla ugyanattól az őstől származik. Ennek valószínűsége, hogy az egyed származásilag azonos allélokot hordoz attól függ, hogy szülei milyen rokonságban álltak egymással. Ha például a két szülő nem rokon (vagy nem közeli rokon), rendkívül csekély a valószínűsége annak, hogy az utód alléljai származásilag azonosak legyenek. A másik véglet az öntermékenyítés, amikor annak esélye, hogy az utód származásilag azonos allélokot örököl, a lehető legnagyobb. Tétélezzük fel, hogy a szülő genotípusa A_1A_2 , az utódok gyakorisága $\frac{1}{2}A_1A_1$, $\frac{1}{2}A_1A_2$, $\frac{1}{2}A_2A_2$, vagyis az utódok fele, a homozigóták származásilag azonos allélokot tartalmaznak. Ebben a példában a szülő heterozigóta volt, tehát követni tudtuk az utódokban az allélokot. Ha viszont a szülő homozigóta, az allélokot képzeletben „megjelölhetjük”, hogy követhessük útjukat.

A beltenyésztési együttható meghatározásának másik lehetősége olyan családfa elemzése, amelyben **rokonházasság** (közeli rokonok kereszteződése) fordult elő. Első példaként számoljuk ki a beltenyésztési együtthatót két féltestvér utódainak esetében. A féltestvérek egyik szülője közös. A 19.9(a) ábrán látható egy családfa, ahol X és Y a két féltestvér, CA az anya, a közös ő (common ancestor). A 19.9(b) ábra lényegében ugyanezt az esetet szemlélteti, csak kicsit másként: az apákat elhagyták, és az egyedeket egy-egy rombusz jelöli, mert a nemnek ebben az esetben nincs jelentősége. A nyilak az allélok átadásának irányát jelzik.

Tegyük fel, hogy az anya genotípusa A_1A_2 . A beltenyésztési együttható kiszámításához tudnunk kell, hogy az unoka (Z) milyen valószínűséggel lehet A_1A_1 vagy A_2A_2 , vagyis alléljai mennyiben lehetnek származásilag azonosak. Az első lehetőség, hogy Z egyed A_1A_1 genotípusú, akkor következhet be, ha X és Y ugyanazt az A_1 allélt örökölte a közös anyától, és örököltette Z-nek. Ennek valószínűsége, hogy X anyjától az A_1 allélt örökölje, $0,5$. Ennek valószínűsége, hogy ezt továbbörökítse Z-nek, ugyancsak $0,5$. A két esemény együttes valószínűsége $0,5 \times 0,5 = 0,25$. Ugyanígy $0,25$ a valószínűsége annak is, hogy Y közvetítésével kerüljön az A_1 allél Z-be. Mindezek miatt annak



19.9. ábra Két féltestvér, X és Y, családfája. (a) Minden egyed feltüntetésével; (b) az apák feltüntetése nélkül. (CA = a közös ő; a rokonházasságot kettős vonal jelzi)

valószínűsége, hogy X-től és Y-től is A_1 allélt örököljön az utód, $(0,25)^2 = 0,0625$. Ugyanezzel az okoskodással az A_2A_2 genotípus megjelenésének valószínűsége is 0,0625. Annak valószínűsége pedig, hogy bármelyik úton, de azonos származású allélok jussanak Z-be: $0,0625 + 0,0625 = 0,125$.

Egyszerűbb módszer a beltenyésztési együttható megadására az ún. **lányszámlálós eljárás**. A lánc a közös ő felé a beltenyésztett egyed egyik szülőjétől indul, és a közös őn át tér vissza a másik szülőhöz. A 19.9. ábrán a lánc az X-CA-Y vonal. A láncban szereplő egyedek számának (N) felhasználásával a beltenyésztési együttható:

$$f = \left(\frac{1}{2}\right)^N$$

Így a 19.9. ábra családfáján a Z egyed beltenyésztési együtthatója $\left(\frac{1}{2}\right)^3 = \frac{1}{8} = 0,125$. Ugyanezt kaptuk az előző, hosszabb levezetés alapján is.

A beltenyésztés növeli a homozigóták gyakoriságát, ugyanakkor csökkenti a heterozigótákét, és nem változtatja meg az allélgyakoriságokat. A beltenyésztési együttható a genotípus-gyakoriságok alapján vagy családfaelemzéssel határozható meg.

A MUTÁCIÓ

A mutáció különösen fontos tényező a populációgenetikában és az evolúcióban, mert a genetikai variabilitás fő forrása. A mutációnak sok formája ismeretes (l. 12. fejezet). Érinthet egyetlen vagy több bázispárt a DNS-ben, érintheti a kromoszóma egy részét, az egész kromoszómát vagy akár egész kromoszómakészletet is. Egy adott mutáció közvetlen oka lehet a DNS-replikáció hibája, a kromoszóma törését eredményező mutagén hatás, mozgó genetikai elem beékelődése, vagy a kromoszómapárok szétválásának hibája a meióziban. Ebben a fejezetben elsősorban a **spontán mutációkkal** foglalkozunk, nem pedig a mutagén hatásokra kialakuló **indukált mutációkkal**.

A következőkben megvizsgáljuk a mutáció hatását a populáció genetikai variabilitására. A **mutációs ráta** (u) annak

valószínűségét fejezi ki, hogy a vad típusú allél (A_1) milyen gyakorisággal alakul át mutáns alléllá (A_2) egy generáció során. A **backmutációs ráta** (v) a mutáns allél visszaalakulásának gyakorisága. Az A_1 allélok mutációja csökkenti A_1 , és növeli A_2 allél gyakoriságát. Ha az A_1 allél gyakorisága p, az A_2 allél gyakoriságának növekedése a mutációk miatt: up. Ugyanilyen elv alapján az A_2 gyakorisága a backmutáció miatt vq értékkel csökken. Az A_2 allélgyakoriságának változása (q) a két folyamat eredőjeként:

$$\Delta q = up - vq$$

q pozitív maximuma u, ha $p = 1$ és $q = 0$ (vagyis kiindulási állapotban mindegyik allél vad típusú). A negatív maximum v, ha $p = 0$ és $q = 1$. A mutáció következtében nagyon kis mértékű változásra számíthatunk, mivel u és v értéke rendszerint nagyon kicsi (l. 11. fejezet). Ha például $u = 10^{-5}$, és $v = 10^{-6}$, a $q=0$ esetben:

$$\Delta q = (10^{-5})(1,0) - (10^{-6})(0,0) = 10^{-5}$$

ami nyilvánvalóan csekély allélgyakoriság-változás. Noha a mutáció bekövetkezésének kicsi a valószínűsége, mégis alapvető szerepe van az ember ritka öröklődő betegségeinek kialakulásában (l. 20. fejezet). A mutáció (a mutáns, betegséget okozó allél gyakoriságát növelő folyamat) és a szelekció (a mutáns allél gyakoriságát csökkentő folyamat) között egyensúly állhat be. Ez a magyarázata annak, hogy az öröklődő betegségek előfordulási gyakorisága nagyjából állandó. Ezen kívül a mutáció a genetikai sodródással együtt elfogadható magyarázatot ad a sok faj esetében megfigyelhető magasfokú molekuláris szintű variabilitásra (20. fejezet).

A mutáció a genetikai variabilitás elsődleges oka, de az allélgyakoriságokban csak kismértékű változásokat eredményez egyik nemzedékről a másikra.

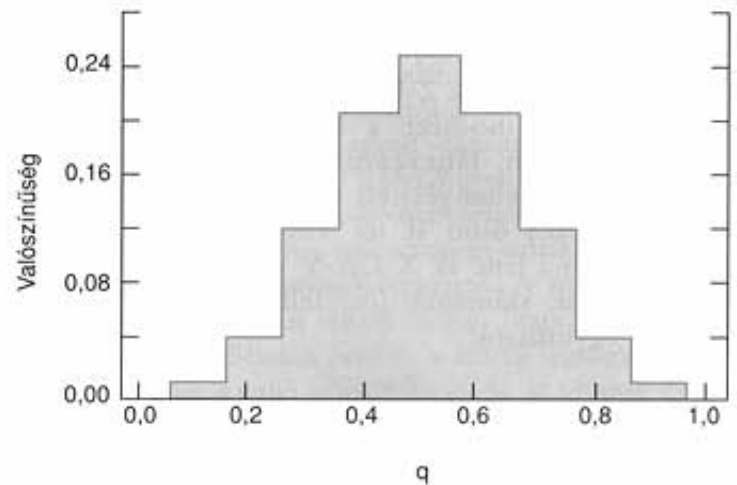
A GENETIKAI SODRÓDÁS

Eddig azzal a feltételezéssel éltünk, hogy a vizsgált népesség nagy létszámú. A valóságban sok populáció egyedszáma alacsony, különösen a veszélyeztetett fajok vagy egy új élőhelyre betelepülő faj egyedeinek esetében. A kis egyedszám következtében a véletlen események drámai hatást gyakorolhatnak populáció allélgyakorisági értékeire. Az allélgyakoriságok véletlen megváltozása a **genetikai sodródás**. Nagy egyedszámú populációban kicsi annak az esélye, hogy az allélgyakoriságok sodródás miatt, véletlenül változnak meg, kis egyedszámú populációkban azonban az allélgyakoriság ingadozása igen jelentős lehet generációról generációra, és a változás iránya nyilvánvalóan nem jósolható meg előre. A genetikai sodródás hatása fontos szempont a természetvédelem genetikai vonatkozásainak és a molekuláris evolúciónak a megértésében (l. 20. fejezet).

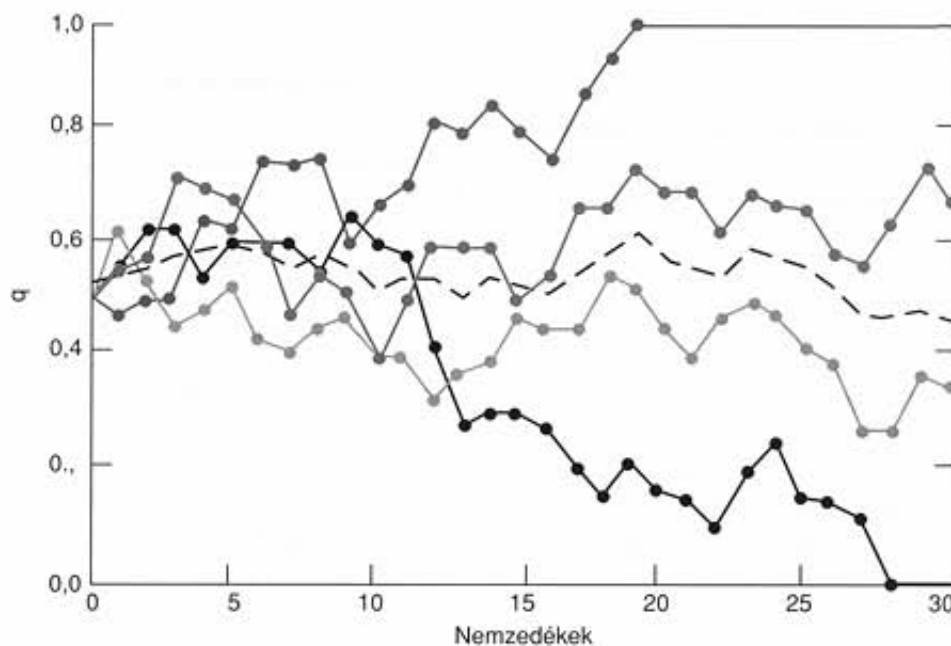
A következő példa azt mutatja be, hogy mekkora allélgyakoriság-változást okozhat a genetikai sodródás kis létszámú populációban. Tegyük fel, hogy egy 5 diploid egyed számú populációban az allélok fele A_1 , fele pedig A_2 , és az egyes nemzedékek egyedei 10 véletlenszerűen kiválasztott ivarsejt egyesülésével jönnek létre. A tíz A_1 , illetve A_2 allél tartalmazó ivarsejt kiválasztása megfelel annak az esetnek, amikor tízszer feldobunk egy érmét, és feljegyezzük a fej és írás eseményeket. Néha az A_1 allélok gyakorisága a nagyobb, néha az A_2 -é, néha pedig egyenlők az arányok. Ha sok 5 tagú egyedből álló csoportot véletlenszerűen kiemelünk egy népes populációból, amelyben az A_1 és A_2 aránya egyenlő, a 19.10. ábrán látható eloszlást kapjuk a kis populációk A_2 allélgyakoriságára. A 0,4-es gyakoriság azt jelenti, hogy a tízből négy gaméta A_2 allélt hordozott. Láthatjuk, hogy a legtöbb populációban a gyakoriságok 0,5-höz közeledek, de az egyes kis populációk allélgyakoriságai nagy szórást mutatnak. Így például 1%-nál nagyobb a valószínűsége annak, hogy az A_2 allél gyakorisága a kiválasztott kis populációban 1,0, noha a nagy populációban 0,5.

A genetikai sodródás következtében idővel felhalmozódó genetikai változások mértékét négy különböző, egyenként húsztagú populáción (populációnként 40 gamétát véve) modellezték (19.11. ábra). A számítógépes szimulációt négyszer futtatták, vagyis a modellkísérletet négyszer ismételték meg. A modellkísérletben minden nemzedék 40, véletlenszerűen kiválasztott ivarsejt egyesülésével jött létre. A folyamatos vonalak a négy szimulációt jelentik, a szaggatott vonal pedig az A_2 gyakoriságának átlagát a négy szimulációban. Mind a négy modellkísérletben A_2 allél gyakoriságának kezdeti értéke 0,5 volt. Egy generáció után a allélgyakoriságok értéke 0,625, 0,55, 0,55 és 0,475 értékek-

re módosult a genetikai sodródás következtében. A tizenötödik generációra még inkább széthúzódott az allélgyakorisági értékek tartománya: 0,8, 0,5, 0,475 és 0,3. Az egyik szimulációban a tizenkilencedik generációra az A_2 gyakorisága elérte 1,0-et, vagyis csak A_2 allél maradt a populációban. Egy másik esetben az A_2 gyakorisága a 28. generációban 0,0 lett. A fennmaradó két szimulációban még a 30. generációban is megvolt mindkét allél. Az A_2 allél gyakoriságának átlaga 0,625 és 0,475 között volt a 19. és 30. generáció között, és általában a kezdeti 0,5 körüli érték körül ingadozott. (Ha elég sokszor ismétlik a modellkísérletet, az A_2 allél gyakoriságának átlaga nem változik meg, mert az



19.10. ábra. A genetikai sodródás hatása egy öttagú populáció allélgyakoriságára. A grafikon azt fejezi ki, hogy az A_2 allél egyes előfordulási gyakoriságai (q) milyen valószínűséggel alakulnak ki a következő nemzedékben



19.11. ábra. Számítógépes szimuláció eredménye négy, egyenként húsz egyedből álló populációban a genetikai sodródás hatásának vizsgálatára harminc nemzedéken át. A szaggatott vonal a 4-szer ismételt szimuláció átlagát mutatja. Amikor az allél fixálódik ($q = 1,0$) vagy elvész ($q = 0,0$), többé nem következik be allélgyakoriság-változás



19.12. ábra Északi elefántfóka

© Richard Humbert/Biological Photo Service

egyik szimulációban bekövetkező csökkenést kiegyenlíti a másik szimulációban fellépő növekedés).

Ebből a példából nyilvánvaló, hogy a genetikai sodródás rövid időn belül jelentős és véletlenszerű változásokat idézhet elő egy populáció allélgyakoriságaiban, és a populációk közötti differenciálódáshoz vezethet. Egy kis populációban nagy a valószínűsége annak, hogy egy gén fixálódjon, vagyis egyik alléljának gyakorisága rövid időn belül 1,0 legyen. Ugyanennyi idő alatt nagy létszámú populációkban alig változik az allélgyakoriság sodródás következtében, ezért a populációk között nem alakul ki fel jelentős különbség.

A sodródás egyik előrelátható következménye az, hogy a kis egyedszámú populáció rövid időn belül nagymértékben homozigóta lesz, amit a veszélyeztetett fajok populációinak vizsgálata is alátámaszt. Az északi elefántfóka (19.12. ábra) például a századfordulón majdnem kipusztult a mértéktelen vadászat miatt, száznál is kevesebb példánya maradt életben. Jelenleg az elefántfókák egyedszáma már 70 000 fölé emelkedett, de hosszú ideig igen alacsony volt, és a kis populációban fellépő sodródás miatt elvesztette genetikai variabilitását, 24 gén vizsgálati eredményei alapján becsült heterozigóciája 0 (19.2. táblázat).

A genetikailag elszegényedett fajok további példája a Dávid-szarvas. Ezt a fajt 1856-ban fedezték fel a kínai császári vadaskertben, ahol valószínűleg háromszáz éven át elzárva tartották. Ma mindössze négyszáz példánya van, és mindegyikük annak a tizenegy állatnak a leszármazottja, amelyet Kínából gyűjtöttek be. A megvizsgált enzimlokuszon ebben az esetben sem mutattak ki heterozigóciát.

A sodródás hatását többféle módon kimutathatjuk. Láttuk, hogy az A_2 allél fixálódhat ($q = 1$), vagy elveszhet ($q = 0$). Annak a valószínűsége, hogy egy populációban fixálódik az A_2 allél, azonos az A_2 kezdeti gyakoriságával. Ha például az A_2 gyakorisága kezdetben 0,2 volt, akkor a fixálódás valószínűsége 0,2, az allél elvesztésének a valószínűsége pedig 0,8. Könnyen belátható, hogy a fixálódáshoz az allél gyakoriságának a véletlen folytán 0,2-ről 1,0-re kellene növekednie, ez pe-

dig sokkal nagyobb változás, mint az elvesztéshez elegendő 0,2→0,0 változás. Láttuk a szimulációs kísérletben, hogy az átlagos allélgyakoriság nem változik, az allélgyakoriságok eloszlása azonban igen. A sodródás általános hatását megérthetjük, ha megvizsgáljuk az egyes populációk allélgyakoriságának átlag körüli megoszlását. A variancia (l. 3. fejezet) az átlagtól való eltérés kifejezésére szolgál. Az egyes populációk adatai alapján az allélgyakoriságok várható varianciája (V) egy generációban ható genetikai sodródás következtében:

$$V = \frac{pq}{2N}$$

Népes populációk esetén, amikor N értéke nagy, a V kicsi, ami a sodródás csekély hatását jelzi. A sodródás következményét úgy is lemérhetjük, ha a heterozigócia elvesztésének ütemét vizsgáljuk. Ezt a módszert a 20. fejezetben a veszélyeztetett fajok védelmének genetikai vonatkozásainál ismertetjük.

Annak megállapítására, hogy a genetikai sodródás más tényezőkhöz képest milyen hatást gyakorol az allélgyakoriságokra, a variancia négyzetgyökét (átlagos négyzetes eltérés, lásd 3. fejezet) lehet használni, amely megközelítőleg egyenlő a relatív allélgyakoriság változásának átlagos abszolút értékével:

$$|\Delta q| = V^{1/2}$$

Ha például $p = q = 0,5$ és $N = 50$, akkor

$$V = \frac{0,5 \times 0,5}{2 \times 50} = 0,0025$$

A variancia pozitív négyzetgyöke pedig:

$$|\Delta q| = 0,05$$

Nyilvánvaló, hogy, ha N viszonylag kicsi, a sodródás hatása nagy lehet; sokkal nagyobb, mint a mutációé, és összevethető a szelekció és a génáramlás hatásaival.

Ha N nagy, mint a legtöbb faj esetében, a sodródás következtében várt allélgyakoriság változás generációnként alacsony. Ugyanakkor a sok generáción keresztül felhalmozódó változások jelentőssé válhatnak. A 20. fejezetben a molekuláris evolúció tárgyalásakor ezt a kérdést is megvizsgáljuk.

Genetikai sodródás kis létszámú populációkban jelentős allélgyakoriság-változásokat eredményezhet.

A veszélyeztetett fajok esetében megfigyelhető igen alacsony szintű heterozigóciát a genetikai sodródás okozhatja.

A GÉNÁRAMLÁS

Az eddigiekben egyetlen véletlenszerűen párosodó, nagy létszámú populációval foglalkoztunk. Ugyanakkor sok faj egyedei élnek kis létszámú populációkban, amelyek öko-

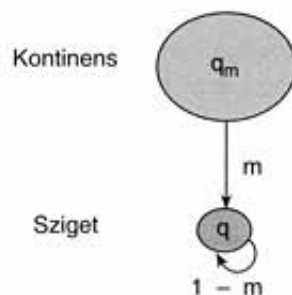
lógiai és etológiai hatások következtében alakultak ki. A dagály után visszamaradó tengervízben élő halak, a tanyák körüli fák vagy egy meghatározott gazdanövényen megtelepedő rovarok populációi egymástól elkülönülő, sziget-szerű élőhelyeken alkotnak populációkat. Az elkülönülő populációk között az egyedek vándorlása miatt ezekben az esetekben genetikai kapcsolat áll fenn. Az elvándorló egyedek új élőhelyükön szaporodnak, ezzel megváltoztatják mind az eredeti, mind az új populáció allélgyakoriságát. A vándorlás miatt bekövetkező allélgyakoriság változás a **génáramlás**.

A DDT-vel szemben ellenálló genetikai változatok kezdetben nagyon kevés populációban jelentek meg (20. fejezet), az egyedek vándorlása azonban eljuttatta a rezisztencia alléljait azokba a populációkba is, amelyekben azok eredetileg nem voltak jelen. A DDT-rezisztencia esetében a génáramlás igen gyors volt, szétterjedésében mozgékony fajok, pl. szúnyogok, házi legyek működtek közre.

A génáramlás legegyszerűbb esete, amikor egy allél kívülről jut be egy populációba. Ilyen egyirányú génáramlás jön létre, ha egy szigetlakó populáció a faj népes, nagy génkészlettel rendelkező, kontinensen élő populációjából kap utánpótlást. De ezzel a jelenséggel találkozunk akkor is, amikor egy tavacszában élő populációba a közeli nagyobb tóból rendszeresen bevándorolnak egyedek, vagy amikor egy faj elterjedési területének a szélén élő populációkba érkeznek a központi helyzetű területekről elvándorló egyedek.

A génáramlás hatásának vizsgálatához feltételezzük, hogy a szigetlakó populációba a 19.13. ábrán látható módon érkeznek bevándorlók a kontinens felől. Előfordulhat kétirányú génáramlás is, de példánkban a visszáramlás mértéke csekély, a kontinensen élő populáció pedig olyan nagy, hogy hatása amúgy is elhanyagolható az allélgyakoriságra. Tétélezzük fel, hogy nemzedékenként a szigetlakó populáció egyedeinek m hányada származik a kontinensről, így a szigetlakók között $1-m$ lesz az őslakók aránya. Ha a bevándorló egyedekben az A_2 allél gyakorisága q_m , az őslakókban pedig q , akkor az új allélgyakoriság (q') a következőképpen alakul:

$$q' = (1 - m)q + mq_m \\ = q - m(q - q_m)$$



19.13. ábra. A génáramlás modellje egy faj kontinensen élő és szigetlakó populációja között, ahol m a génáramlás mértéke és q_m az allélgyakoriság a bevándorló egyedek között

Az A_2 allélgyakoriságának változása a bevándorlást követő nemzedékben pedig:

$$\Delta q = q' - q$$

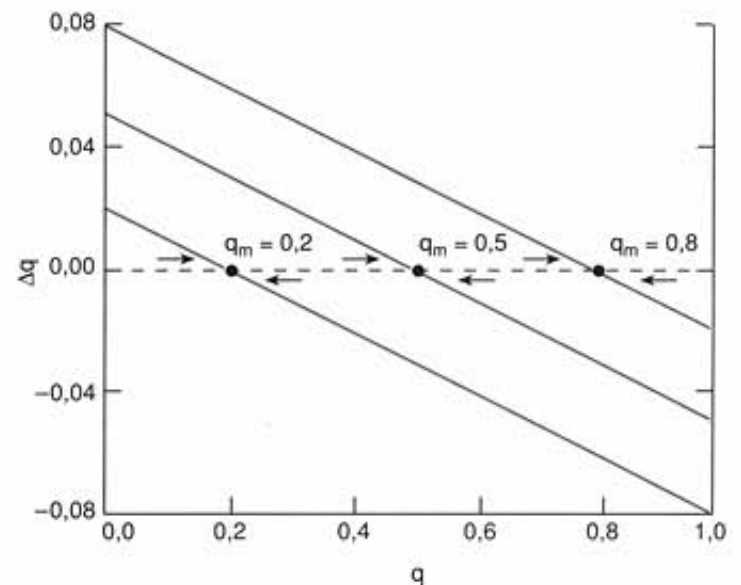
A q' behelyettesítésével:

$$q = -m(q - q_m)$$

Az egyenletekből nyilvánvaló, hogy nem változik meg az allélgyakoriság ($\Delta q = 0$), ha $m = 0$, illetve ha $q = q_m$ ($m = 0$ esetén nincs génáramlás). A levezetésben feltételeztük, hogy q_m és m értéke nulla és egy közötti, és időben állandó. Ha q kisebb q_m -nél, Δq pozitív lesz, a génáramlás következtében az A_2 allél relatív gyakorisága nő a szigetlakó populációban. Ha Δq nagyobb q_m -nél, akkor Δq negatív, az A_2 allél gyakorisága csökken. Ha $q_m = q$, az A_2 allél **stabil egyensúlyi gyakorisága** alakul ki a szigeten. A stabil egyensúly állapotában az allélgyakoriság visszaáll az eredeti értékre, miután valamilyen hatás miatt ezen érték fölé emelkedett vagy alá süllyedt.

A 19.14. ábrán látható, hogyan alakul Δq a génáramlással bejutó q függvényében $m = 0,1$ esetén, vagyis akkor, amikor nemzedékenként az egyedek 10%-a bevándorló. Az allélgyakoriság lineárisan változik, amikor a gyakoriság az egyensúlyi értéktől elmozdul, és abszolút maximumát nullánál vagy egynél éri el, a q_m értékétől függően. A génáramlás következtében fellépő allélgyakoriság változás jelentős mértékű lehet. Kis populációkban a sodródáshoz mérhető hatást okozhat, és jóval túllépheti a mutáció hatását.

Sok populáció különböző népességekből származó egyedekből alakult ki. Tétélezzük fel, hogy egy adott populáció génkészlete csak két ősi populációból ered – az



19.14. ábra. A génáramlás következtében fellépő allélgyakoriság változása egy nemzedéken belül, ha a génáramlás aránya $m = 0,1$ és $q_m = 0,2$; $0,5$; vagy $0,8$. A nyilak az allélgyakoriság változásának irányát mutatják

egyszerűség kedvéért nevezzük ezt a populációt **hibrid-populációnak** –, és határozzuk meg a **keveredés** mértékét, vagyis azt, milyen arányban járul hozzá az egyik populáció a közös génkészlethez. A keveredés becsléséhez tekintsük a fejezetrész első egyenletét:

$$q' = (1 - m)q + mq_m$$

Oldjuk meg az egyenletet meg m -re! A megoldás a keveredés mértékét jelenti:

$$m = \frac{q - q'}{q - q_m}$$

Hogy ne tévesszük össze a keveredés mértékét (M) a génáramlással (m), írjunk az egyenletbe m helyére M -et:

$$M = \frac{q - q'}{q - q_m}$$

Különböző rasszokból származó emberi populációkban is végeztek a keveredés mértékére vonatkozó becsléseket. Vizsgálták például az amerikai fekete bőrű népséget, akiknek ősei nagyrészt afrikai származásúak, de fellelhetők köztük európaiak is (19.10. táblázat). Hogyan becsülhető a keveredés mértéke? Az egyik lehetőség egy olyan marker gén vizsgálata, amelynek allélgyakorisága a két népségben nagyon eltérő. Ilyen például a Duffy-vércsoport lokusza, amely a vörösvérsejtek antigén sajátosságainak kialakításában játszik szerepet. A táblázat a becsült allélgyakoriságok értékeit mutatja be, az afrikai és az európai, valamint az afrikai eredetű amerikai népségekben. Oakland városban végzett vizsgálat szerint:

$$M = \frac{0,0 - 0,094}{0,0 - 0,429} = 0,220$$

Bár a keveredés mértéke mindkét mintában viszonylag alacsony, figyelemre méltó, hogy az északon fekvő Oakland esetében sokkal magasabb (0,22), mint déli Charlestonban (0,037). Mindez arra utal, hogy az Egyesült Államok déli területein élő fekete bőrű lakosság esetében a keveredés mértéke csekély.

19.10. táblázat. A keveredés (M) becslése afrikai származású amerikaiak között

Város	Afrikai származású amerikai népség (q')	Afrikai (q)	Európai származású népség (q_m)	M
Oakland, CA	0,094	0,0	0,429	0,220
Charleston, SC	0,016	0,0	0,429	0,037

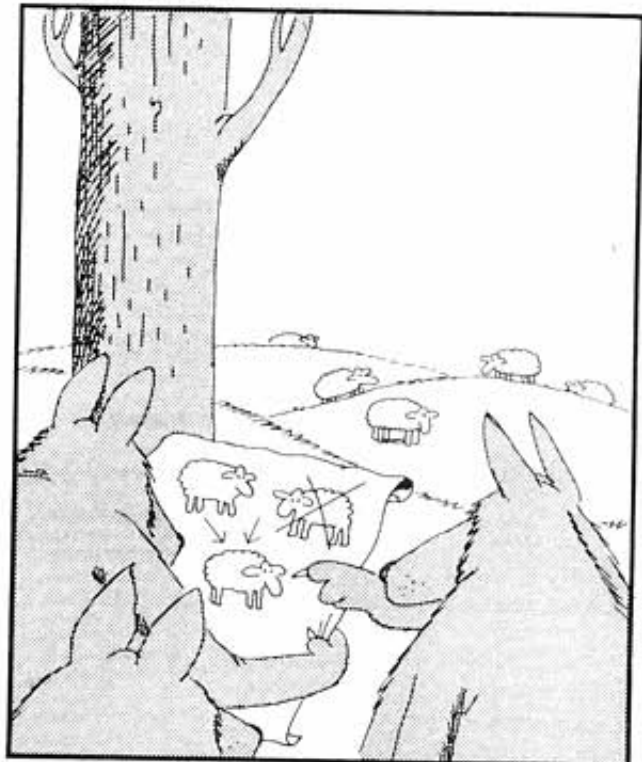
A génáramlás új allélokat vihet be a populációkba, és esetenként gyorsan megváltoztathatja az allélgyakoriságokat. A populációk között lejátszódott génáramlás mértékét becsléssel lehet megállapítani.

A TERMÉSZETES SZELEKCIÓ

A természetes szelekció elméletének megalkotója, Charles Darwin munkája során nagymértékben támaszkodott arra a hatalmas, növényekre és állatokra is vonatkozó, bizonyító erejű anyagra, amelyet a H. M. S. *Beagle* hajón tett világméretű útján sikerült összegyűjtenie. Darwin elmélete szerint egy faj egyedeinek variabilitása az a nyersanyag, amelyből a természetes szelekció a környezethez jobban alkalmazkodó egyedekből álló populációkat hoz létre. Darwin elsősorban a mennyiségi jellegek (l. 3. fejezet) evolúciójával foglalkozott, de ugyanazok az általános alapelvek vonatkoznak az egyetlen gén által meghatározott tulajdonságokra is.

A szelekció különböző módon fejtheti ki hatását: befolyásolhatja a termékenységet, a párosodási sikert, vagy például az egyedek élősködőkkel szembeni ellenálló képességét. A téma tárgyalása során úgy tekintjük, hogy a szelekció a különböző genotípusok túlélési arányát befolyásolja. Ennek szemléltetésére tekintsünk egy a haploid egyedekből álló po-

HADITERV



A természetes szelekció működés közben

pulációt, amelyben A gén A_1 és A_2 alléljai vannak jelen. Az A_1 genotípus egyedeinek 50%-a, az A_2 genotípusnak pedig 40%-a éri meg a felnőttkort, tehát A_1 túlélési aránya nagyobb, mint A_2 -é. Ennek alapján azt várjuk, hogy idővel az A_1 genotípus gyakorisága nő, az A_2 -é pedig csökken a populációban.

A szelekciónak, amely mindig a fenotípusra hat, két alapvető hatása van a genetikai változatosságra. Egyrészt, ha egy bizonyos allél által meghatározott fenotípusnak kedvez a szelekció, akkor az a genetikai variabilitás csökkenésére – következésképpen a kedvezményezett allélra nézve homozigóciához – vezethet. Példa erre a DDT-rezisztenciát okozó allél esete: a rovarölő szer hatásának sok generáción át kitett szúnyogpopulációkban nőtt a rezisztencia alléljára nézve homozigóta egyedek aránya. Másodsor, a szelekció eredményezheti két vagy több allél együttes megmaradását is a populációban – ahogyan azt a ligeti csiga házáinak sávozási mintázata vagy a sarlósejtes vérszegénység példáin láttuk.

A szelekció genetikai variabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatához be kell vezetnünk a **relatív rátermettség** (relative fitness, W) fogalmát. Biológiai értelemben azt fejezi ki, mekkora az egyes genotípusok egymáshoz viszonyított képessége arra, hogy alléljaikat a következő generációnak továbbadják. A relatív rátermettség matematikailag a genotípusok túlélési arányának hányadosa. A populációban mért legmagasabb túlélési arányt használva nevezőnek, a rátermettség 0 és 1,0 közé esik. Az előző példában szereplő adatokkal az A_1A_1 genotípus $W_{A_1A_1} = \frac{50\%}{40\%} = 1,0$ és az A_2A_2 -é $W_{A_2A_2} = \frac{40\%}{50\%} = 0,8$.

AZ EGYIK HOMOZIGÓTA ELLEN IRÁNYULÓ SZELEKCIÓ

A szelekció hatásának matematikai elemzését azzal az esettel kezdjük, amelyben a szelekció az egyik homozigóta ellen hat, a másik homozigóta és a heterozigóta relatív rátermettsége pedig azonos. Ezt a típust helyenként **tisztító szelekciónak** is nevezik, mert kiszoríthatja a homozigóta formában megjelenő mutáns allélokat a génkészletből. A **szelekciós hátrány**, másképp **szelekciós együttható** definíciószerűen $s = 1 - W$. A három lehetséges genotípus,

A_1A_1 , A_1A_2 és A_2A_2 és a szelekció az A_2A_2 ellen hat. $W_{A_1A_1} = W_{A_1A_2} = 1$, illetve $W_{A_2A_2} = 1 - s$. Ha $s = 1$, akkor az A_2A_2 recesszív letális. Ha $W_{A_2A_2} = 0,8$, akkor $s = 1 - 0,8 = 0,2$.

A szelekciónak abban a formájában, amely a genotípusok eltérő életképességét hozza létre, egy genotípus relatív rátermettsége megegyezik annak valószínűségével, hogy egy zigótából új egyed fejlődik és eljut a reprodukció szakaszába. Tételizzük fel, hogy egy populáció a szelekció bekövetkezése előtt Hardy–Weinberg-egyensúlyban van. Az egyes genotípusok hozzájárulása a következő generációhoz a szelekció előtti relatív genotípus gyakoriságok és a genotípusok relatív rátermettségének szorzata. Az egyes genotípusokra kapott szorzatok összege a populáció **átlagos rátermettsége** (w):

$$w = p^2(1) + 2pq(1) + q^2(1 - s) \\ = p^2 + 2pq + q^2 - sq^2$$

Mivel $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, az átlagos fitness:

$$w = 1 - sq^2$$

Ha a relatív hozzájárulást standardizáljuk az átlagos rátermettséggel, akkor megkapjuk a genotípus-gyakoriságokat a szelekció után (19.11. táblázat). Az A_2 allél gyakorisága (q') a szelekció után a heterozigóták gyakoriságának fele (mert alléljaiknak fele A_2), plusz az A_2A_2 homozigóták gyakorisága:

$$q' = \left(\frac{1}{2}\right) \left(\frac{2pq}{1 - sq^2}\right) + \frac{q^2(1 - s)}{1 - sq^2} \\ = \frac{pq + q^2(1 - s)}{1 - sq^2} \\ = \frac{q(p + q - sq)}{1 - sq^2} \\ = \frac{q(1 - sq)}{1 - sq^2}$$

9.11. táblázat. A genotípusok, gyakorisága szelekció előtt és után, Hardy–Weinberg-egyensúlyt feltételezve a szelekció előtt

	Genotípus			Összesen
	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	
Relatív rátermettség	1	1	$1 - s$	–
Gyakoriság szelekció előtt	p^2	$2pq$	q^2	1,0
Hozzájárulás a következő nemzedékhez	p^2	$2pq$	$q^2(1 - s)$	$1 - sq^2$
Gyakoriság szelekció után	$\frac{p^2}{1 - sq^2}$	$\frac{2pq}{1 - sq^2}$	$\frac{q^2(1 - s)}{1 - sq^2}$	1,0

A szelekció mértéke az A_2 allél gyakoriságának kezdeti (szelekció előtti) értékétől és a szelekciós együtttható nagyságától függ.

Tegyük fel, hogy az A_2A_2 genotípus életképtelen, $W_{A_2A_2} = 0$, vagyis az A_2 allél recesszív letális, $s = 1,0$. Vezessük le, hogyan változik A_2 allél gyakorisága több generáción át! Ha kezdetben $q = 0,5$, az előbbi képlet alapján:

$$q' = \frac{0,5[1 - (1,0)(0,5)]}{1 - (1,0)(0,5)^2} = 0,333$$

Ugyanezzel a képlettel tovább számolva, a következő generációra a kiindulási érték $q = 0,333$, így:

Függelék

19.1. Az ipari melanizmus

A szürkepettyes araszoló lepke (*Biston betularia*) általában világos alapszínű és barnásszürkén pettyezett; de Anglia egyes területein a sötét alapszínű forma is közönséges (M19.1. ábra). 150 évvel ezelőtt a sötét változat ritka volt, ma már azonban néhány városi populációnak közel 100%-át ez a színváltozat teszi ki. A sötét színű lepkék azért terjedtek el, mert a szennyezett környezetben rejtve maradtak a madarak elől. Ez a jelenség az ún. **ipari melanizmus**, amely más fajok esetében is előfordul. A hipotézis helyességét megerősíti, hogy a világos forma gyakorisága növekszik azokon a területeken, ahol a környezetvédelem hatá-sára tisztább lett a levegő. Tehát térbeli és időbeli összefüggés áll fenn a levegőszennyezés és a sötét forma gyakorisága között.

A szelekció mérésére Cedric Clarke és Philip Sheppard brit biológusok kipreparált lepkéket tűztek ki sötét és világos háttérre, és megfigyelték, milyen arányban veszik észre ezeket a madarak. A sötét háttérre kitett hetven sötét lepkéből ötvennyolc maradt sértetlen, míg a hetven világosból harminckilenc (M19.1.(a) táblázat). Ennek alapján a világos lepke relatív rátermettsége szennyezett

környezetben 0,67 volt a sötét 1,0 értékéhez képest. Világos háttérre (M19.1.(b) táblázat) a világos forma relatív rátermettsége volt 1,0, a sötété pedig 0,75.

Használjuk fel a sötét háttérre kapott relatív rátermettség-értékeket, hogy megbecsüljük a világos színt meghatározó allél gyakoriságának várható változását! A szelekciós együtttható $s = 0,33$, mert $1 - s = 0,67$. Ha feltételezzük, hogy a világos szín kialakulásáért felelős allél gyakorisága 0,2, akkor:

$$q' = \frac{0,2[1 - (0,33)(0,2)]}{1 - (0,33)(0,2)^2} = 0,189$$

Vagyis az allélgyakoriság 0,2-ről 0,189-re csökken, ami viszonylag kicsi, de szignifikáns változás.



(a)



(b)

M.19.1. ábra. A szürkepettyes araszoló (*Biston betularia*) sötét és világos alapszínű formája (a) korommal borított és (b) zúzmóval fedett

© Michael Tweedie/Photo Researchers

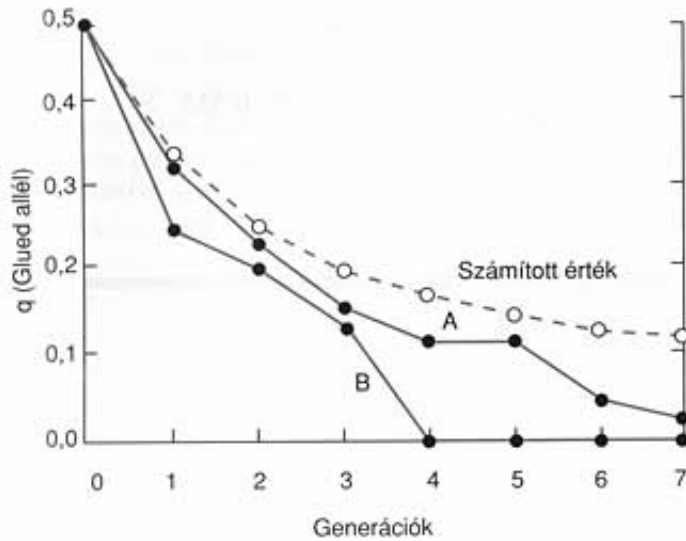
M19.1. táblázat. A sötét és világos alapszínű araszoló túlélése sötét és világos háttérre helyezve

(a) Sötét háttér

	Sötét alapszínű kihelyezett túlélő		Világos alapszínű kihelyezett túlélő	
Egyedszám	70	58	70	39
A túlélés aránya	$\frac{58}{70} = 0,83$		$\frac{39}{70} = 0,56$	
Relatív rátermettség	$\frac{0,83}{0,83} = 1$		$\frac{0,56}{0,83} = 0,67$	

(b) Világos háttér

	Sötét alapszínű kihelyezett túlélő		Világos alapszínű kihelyezett túlélő	
Egyedszám	40	24	40	32
A túlélés aránya	$\frac{24}{40} = 0,6$		$\frac{32}{40} = 0,8$	
Relatív rátermettség	$\frac{0,6}{0,8} = 0,75$		$\frac{0,8}{0,8} = 1$	



19.15. ábra. A *Glued* allél gyakoriságának számított változása (kék vonal) és a kísérletekben megfigyelt értékek (piros vonal)

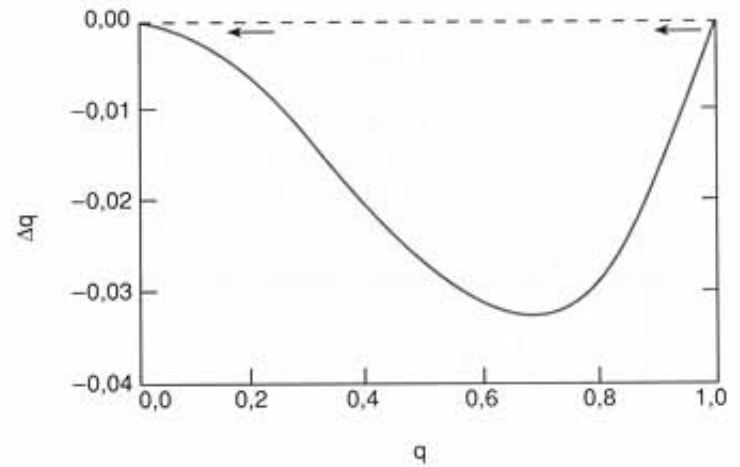
Forrás: Clegg és társai, *Genetics*, 83:793–810, 1976

$$q' = \frac{0,333[1 - (1,0)(0,333)]}{1 - (1,0)(0,333)^2} = 0,250$$

Az egymást követő generációkban hasonló módon határozható meg az allélgyakoriság. Húsz generáció múltán az A_2A_2 genotípus teljes szelekciója miatt az A_2 gyakorisága a 0,5-ről lecsökken 0,045-re (19.1. Melléklet).

A populációgenetika számos alapelvének érvényesülését vizsgálták *Drosophila* laboratóriumi törzsekből kialakított modellrendszereken. Például a *Glued* mutáns allél domináns és homozigóta formában letális, heterozigóta formában pedig a vad típushoz képest jól elkülöníthető fenotípust eredményez: a szem mérete csökken. Michael Clegg és munkatársai kísérletesen követték a *Glued* mutáns allél gyakoriságának csökkenését olyan mesterséges populációban, amely kezdetben heterozigóta egyedekből állt. A kiindulási allélgyakoriság $q = 0,5$ volt. A 19.15. ábrán a szaggatott vonal a számított allélgyakoriság-változást, az A és a B vonal a két kísérletben mért adatokat mutatja. Figyeljük meg, hogy eleinte a kísérleti eredmények jól egybeesnek a számított értékekkel, de a nemzedékek számának növekedésével egyre nagyobbak az eltérések. Későbbi kísérletekben kimutatták, hogy a heterozigóták ellen is hat bizonyos szelekció, ami megmagyarázza, miért csökkent az allélgyakoriság a vártnál gyorsabban az első kísérletsorozatban.

Az allélgyakoriság változása a szelekció következtében egy nemzedék alatt: $\Delta q = q' - q$. Behelyettesítve az előzőekben megismert q' -t:



19.16. ábra. Az A_2 allél gyakoriságának változása (Δq) egy nemzedéken belül különböző kezdeti gyakoriságok (q) esetén. A szelekció a homozigóta recesszív, A_1A_2 genotípusaira hat, és $s = 0,2$. A nyílak az allélgyakoriság változásának irányát jelzik

$$\begin{aligned} \Delta q &= \frac{q(1-sq)}{1-sq^2} - q \\ &= \frac{q(1-sq) - q(1-sq^2)}{1-sq^2} \\ &= \frac{q(1-sq - 1 + sq^2)}{1-sq^2} \\ &= \frac{-spq^2}{1-sq^2} \end{aligned}$$

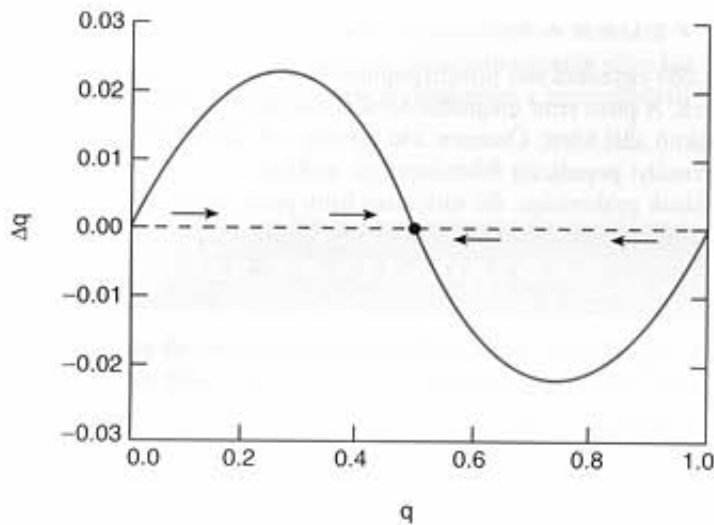
Az allélgyakoriság változása negatív, ami azt jelenti, hogy a szelekció csökkenti A_2 értékét.

Vizsgáljuk meg ennek és a fentebb q' -re kapott képletnek az összefüggését! Tételezzük fel, hogy $q = 0,5$ és $s = 1$. Helyettesítsük ezeket az értékeket az allélgyakoriság-változás képletébe:

$$\Delta q = \frac{-(1,0)(0,5)(0,5)^2}{1 - (1,0)(0,5)^2} = -0,167$$

Vagyis az allélgyakoriság 0,5-ről 0,333-ra csökkent, ahogy azt már korábban is láttuk.

Az allélgyakoriság változása a kezdeti allélgyakoriság és a szelekciós együttható értékétől függ. A 19.16. ábra bemutatja, miként alakul Δq különböző kezdeti allélgyakoriságok függvényében $s = 0,2$ mellett. Ha $p = 0$ vagy $q = 0$, akkor $\Delta q = 0$, mert a populáció ilyen esetben vagy az A_1 vagy pedig az A_2 allélra monomorf. Δq közepes allélgyakoriságoknál éri el maximumát, és egészen alacsony, amikor q nullához közeli érték. Ennek az az oka, hogy kis q értékeknél az A_2 allél többsége heterozigótákban található, így nem hat rá a szelekció.



19.17. ábra. Az A_2 allél gyakoriságának változása egy generáció alatt, különböző kiindulási gyakoriságok esetén, amikor szimmetrikus heterozigóta előny ($s_1 = s_2$) áll fenn. A nyilak a allélgyakoriság változásának irányát jelzik.

HETEROZIGÓTA ELŐNY

A homozigóták ellen ható szelekció az egyik allél fixálódásához vezethet, és ennek eredményeként csökken a populáció genetikai variabilitása. Amikor azonban a heterozigóták rátermettsége mindegyik homozigótáénál nagyobb, mindkét allél fennmaradhat a populációban. Klaszikus példája ennek a már tárgyalt sarlósejtes vérszegénység esete, valamint a patkányirtásra használt warfarin ellen kialakult rezisztencia (l. 20. fejezet).

A heterozigóta előny modelljének vizsgálatához olyan esetet tekintünk át, amelyben a heterozigóta (A_1A_2) rátermettsége a lehető legnagyobb, vagyis 1,0, a homozigóták rátermettsége pedig $1-s_1$ és $1-s_2$ (ahol s_1 az A_1A_1 , s_2 pedig az A_2A_2 genotípus szelekciós együtthatója). Az előbbi levezetés alapján:

$$\Delta q = \frac{pq(s_1p - s_2q)}{w}$$

Ahhoz, hogy mindkét allél megmaradjon a populációban, Δq -nak nullának kell lennie a $0 < q < 1$ valamely tartományában. Az a Δq érték, ahol $\Delta q = 0$, az A_2 allél **egyensúlyi gyakorisága**.

Ha $\Delta q = 0$, és mindkét allél jelen van, akkor a zárójeles kifejezés értéke is 0:

$$s_1p - s_2q = 0$$

Az egyenletet q -ra megoldva megkapjuk az egyensúlyi (q_e) értéket:

$$q_e = \frac{s_1}{s_1 + s_2}$$

19.12. táblázat. Különböző transzferrin genotípusú galambok fészekaljának vizsgálata

	A tojó genotípusa		
	TJ^aTJ^a	TJ^aTJ^b	TJ^bTJ^b
A lerakott tojások száma	128	267	144
A kiköltött tojások száma	59	180	75
A kiköltött tojások aránya	0,46	0,67	0,52
Relatív rátermetség	0,69	1,0	0,78

Ennél az allélgyakoriságnál nincs változás, és mindkét allél fennmarad a populációban. Figyeljük meg, hogy az egyensúly csak a két homozigóta szelekciós együtthatójának értékétől függ.

Az egyensúly sajátosságát úgy is megvizsgálhatjuk, ha Δq értékét az egyensúlyi allélgyakoriságra érvényes összefüggéssel írjuk fel:

$$\Delta q = \frac{-pq(s_1 + s_2)(q - q_e)}{w}$$

A képletből látható, hogyha q nagyobb q_e -nél, akkor Δq negatív; így az allélgyakoriság csökkenni fog, és tart az egyensúlyi érték felé. Ha pedig q kisebb q_e -nél, akkor Δq pozitív, és az allélgyakoriság növekedni fog az egyensúlyi érték irányába. Vagyis ahogyan a génáramlás esetében már kifejtettük, az egyensúly stabil, mert az egyensúlyi helyzetből kimozdítva az egyensúly felé tér vissza.

Az allélgyakoriság változása a kezdeti allélgyakoriság és a szelekciós együtthatók függvénye. A 19.17. ábrán a három genotípus rátermettsége 0,8, 1,0 és 0,8, tehát $s_1 = s_2 = 0,2$. A rátermettségi értékeket figyelembe véve az egyensúlyi allélgyakoriság $q_e = 0,2 / (0,2 + 0,2) = 0,5$. Ha q kisebb 0,5-nél, az allélgyakoriság változása pozitív, maximális értéke $q = 0,2$ -nél van. Ha q értéke nagyobb 0,5-nél, az allélgyakoriság változása negatív, és 0,8-nál éri el abszolút értéke maximumát.

A korábbiakban már bemutattuk, hogy az emberi β -globin gén sarlósejtes anémiát okozó allélja azért maradhat fenn meglehetősen nagy gyakorisággal, mert a heterozigóták életképessége nagyobb az egészséges homozigótáénál a maláriával fertőzött területeken. Úgy tűnik, a heterozigóták rezisztensek a maláriával szemben, mert kissé torzult vörösvérsejtjeikbe nehezebben hatol be a parazita. Ha a heterozigóták relatív rátermetségét 1,0-nek vesszük, a normál homozigótáké 0,8 körüli érték, és $s_1 = 0,2$. A sarlósejtes vérszegénységben szenvedő betegek ritkán érik meg az ivarérettséget, így az A_2A_2 genotípus rátermettsége 0,0, ezért $s_2 = 1,0$. A szelekciós együtthatókkal kifejezve az egyensúlyi allélgyakoriságot: $q_e = 0,2 / (0,2 + 1,0) = 0,17$. A tapasztalatok szerint a sarlósejtes anémia alléljának gyakorisága Afrika számos, maláriával fertőzött területén általában 0,15 és 0,2 között van és a popu-

lációk vizsgálatakor nyert adatok jól egybevágnak a számított értékekkel (l. 19.3. ábra).

A transzferrin, egy vasat kötő fehérje, amely a legtöbb gerinces faj esetében polimorf. Galamboknál két gyakori alléja van, a Tf^A és a Tf^B , amelyek előfordulása a különböző tenyészetekben 0,38 és 0,59 közé esik. Jeffrey Frelinger vizsgálatai szerint a heterozigóta egyedek tojásai ellenállóbbak a bakteriális fertőzésekkel szemben. A 19.12. táblázatból leolvasható, hogy a heterozigóták tojásainak 67%-a élte túl a fertőzést, míg a homozigóta tojók esetében 46%, illetve 52% volt az arány. Ha meghatározzuk a relatív rátermettséget, majd ennek alapján a szelekciós együtthatót, akkor $s_1 = 0,31$ és $s_2 = 0,22$. Ebből $q_c = 0,584$ -nek adódik, ami a megfigyelt tartomány felső határán van.

A természetes szelekció a károsító hatású allél eltűnését eredményezheti a populációból, amennyiben a homozigóták ellen hat. A heterozigótákra ható szelekció ezzel szemben elősegíti a genetikai variabilitás fennmaradását.

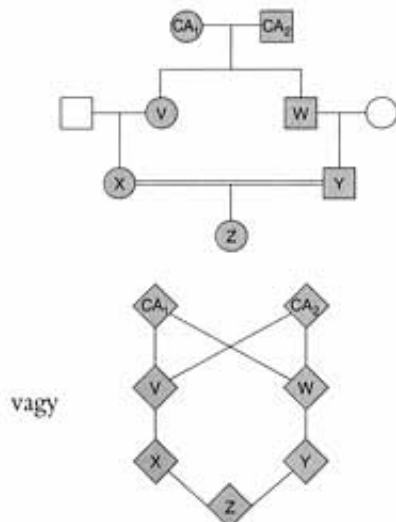
KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

A rokonházasságok között a leggyakoribb az elsőfokú unokatestvérek házassága, amikor a házasságkötő felek nagyszülei azonosak. Rajzolja fel egy ilyen házaspár családfáját! A családfában két közös ős van, a két nagyszülő. Vezesse le a két különböző közös őshöz a leszármazási láncot és számolja ki a beltenyésztési együtthatót (f) mindegyik alapján! A teljes beltenyésztési együttható ennek a kettőnek az összege. Mekkora az értéke?

MEGOLDÁS

Alább látható a családfa ábrája. A két közös ős, CA_1 és CA_2 , a nagyszülők. X és Y a két házasságot kötő unokatestvér.



A láncok: $Z-X-V-CA_1-W-Y-Z$ és $Z-X-V-CA_2-W-Y-Z$. Az f értéke CA_1 -re: $(\frac{1}{2})^7 = 0,03125$ és ugyanannyi CA_2 -re is. Tehát a teljes beltenyésztési együttható: $0,0625$, másképp $\frac{1}{16}$.

2. FELADAT

Egy 289 egyedből álló növénypopulációban piros és fehér virágok nőnek. A piros színt meghatározó allél domináns a fehér színt kialakító allél felett. Összesen 246 növény volt piros virágú. Egyensúlyi populációt feltételezve (a) mekkora a fehér virágszín alléljának gyakorisága, (b) várhatóan hány piros virágú egyed heterozigóta genotípusú?

MEGOLDÁS

(a) A megoldásnál a következő összefüggéseket vesszük figyelembe: a két allél relatív gyakoriságának összege, $p + q = 1$. A genotípusok gyakoriságának összege: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (ahol p^2 és q^2 a kétféle homozigóta gyakorisága, $2pq$ pedig a heterozigótáké).

Tudjuk, hogy 246 növény volt piros virágú, tehát a fennmaradó 43 fehér virágú, vagyis a fehér virágúak gyakorisága: $q^2 = \frac{43}{289} = 0,149$. Ebből a fehér színt kialakító allél gyakorisága $q = \sqrt{0,149} = 0,386$.

(b) A heterozigóta növények számának megadásához szükségünk van p -re, a piros szín alléljának a gyakoriságára is, mert a heterozigóták gyakorisága $2pq$. Mivel $p + q = 1$, ezért $p = 1 - q = 1 - 0,386 = 0,614$. A heterozigóták gyakorisága: $2pq = 2(0,614)(0,386) = 0,474$. Egyedszámuk pedig: $(0,474)(289) = 136,986 = 137$, tehát a piros növények közül 137 heterozigóta genotípusú.

ÖSSZEFOGLALÁS

A legtöbb populációban nagymértékű genetikai variabilitás figyelhető meg. A változatosság anatómiai jellegekben, a kromoszómák szerkezetében és a fehérjék jellemzőiben egyaránt megnyilvánulhat. A populációban lévő különböző genotípusok száma alapján kiszámítható a genotípusok gyakorisága, az allélgyakoriságok és a heterozigócia mértéke. A genetikai variabilitást kétféle módon határozzuk meg: a polimorf lokuszok aránya és a heterozigócia szintje alapján. Sok faj esetében kimutatták a fehérjéket kódoló gének nagyfokú variabilitását. A Hardy-Weinberg-szabály kimondja, hogy a genotípusgyakoriságok az allélgyakoriságok binomiális eloszlását mutatják, ha a populáció egyensúlyban van. A khi-négyzet próbával vizsgálható, hogy a genotípusok eloszlása követi-e a Hardy-Weinberg-szabályt. A Hardy-Weinberg-szabály és az allélgyakoriságok becslésére alkalmazott eljárások kiterjeszthetők multiplex alléliára és az X-kromoszómához kapcsolt génekre is.

A beltenyésztés növeli a homozigóták gyakoriságát és csökkenti a heterozigótákét, anélkül hogy az allélgyakoriságok megváltoznának. A beltenyésztési együttható meghatározható a genotípusok gyakoriságából vagy családfa-elemzéssel. A mutáció a genetikai variabilitás elsődleges forrása, de generációnként csak kis változást eredményez az allélgyakoriságokban. Kis létszámú populációkban a genetikai sodródás nagyobb allélgyakoriság-változásokat okoz. A veszélyeztetett fajoknál megfigyelt alacsony heterozigócia egyik oka lehet a genetikai sodródás. A populációk közötti génáramlás új allélokot juttathat a populációkba, és egyes esetekben gyorsan módosíthatja is az allélgyakoriságokat. Becsléssel megállapítható a korábban lezajlott

génáramlás mértéke. A fenotípusra ható természetes szelekció eltüntethet allélok a populációból, ha a homozigóták ellen hat, vagy pedig fenntarthatja a genetikai variabilitást a heterozigóták előnyben részesítésével.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

1. Számolja ki az A_1 és A_2 allélok gyakoriságát a következő populációkban:

Populáció	N_{11}	N_{12}	N_{22}
a	20	40	40
b	30	8	12
c	72	122	91

Mennyi lenne az egyes genotípus kategóriákba tartozó egyedek száma Hardy–Weinberg-egyensúly esetén? Határozza meg a khi-négyzet értékeket is! Eltérnek-e a populációk a Hardy–Weinberg-egyensúlytól?

2. Az A_1A_1 , A_1A_2 , és az A_2A_2 genotípusok gyakorisága 0,1, 0,4 és 0,5. Ezeknek az adatoknak és a 19.3. táblázatnak a felhasználásával mutassa be, hogy a véletlen párosodás egy generáció múltán Hardy–Weinberg-egyensúlynak megfelelő arányokat eredményez. Tételezzük fel, hogy a populáció 200 egyedből áll. A khi-négyzet próba alkalmazásával állapítsa meg, hogy egyensúlyban van-e a populáció!
3. Egy génnek két allélja van. Hardy–Weinberg-egyensúly esetén, $q = 0,3$ mellett, melyik a leggyakoribb genotípus és mennyi a gyakorisága? Melyik a legritkább genotípus és milyen a gyakorisága?
4. Ha A_2 allél recesszív, és 400 egyed közül 4 A_2A_2 genotípusú (a többi a domináns fenotípust mutatja). Mekkora az A_2 gyakorisága? Egyensúlyt feltételezve a populáció hányad része heterozigóta?
5. Dobzhansky kollégáival Új-Mexikóban az egyik vizsgálat során 50 *Drosophila*-t elemzett (19.2. ábra), és a következő inverziós genotípusokat találta: AR AR 18; AR PP 19; AR ST 5; PP PP 5; PP ST 3; ST ST 0. (a) Tekintsük az AR, PP és ST inverziótípusokat alléloknak, és számoljuk ki gyakoriságukat! (b) Mennyi lenne a hat genotípus gyakorisága egyensúlyi populációban?
6. Mennyi az A_1 , A_2 és A_3 allélok gyakorisága a következő két populációban:

Populáció	N_{11}	N_{12}	N_{13}	N_{22}	N_{23}	N_{33}
a	10	20	30	10	20	10
b	40	–	–	40	–	120

Melyek a várható genotípus-gyakoriságok? Számolja ki khi-négyzet értékeket! Egyensúlyban vannak-e a populációk? (A szabadságfok 3.)

7. Egyes populációkban a férfiaknak megközelítőleg 8%-a vörös-zöld színtévesztő (X-kromoszómához kapcsolt,

recesszív tulajdonság). Hardy–Weinberg-egyensúlyt feltételezve, a nőknek hány %-a színtévesztő és hány %-a hordozó?

8. A kiindulási gyakoriságok az A_1A_1 , A_1A_2 és az A_2A_2 genotípusokra 0,04, 0,32 és 0,64. Mennyi lesz a gyakoriságuk egy nemzedék múlva, teljes öntermékenyítés esetén? Mennyi lesz a heterozigóták gyakorisága ugyanilyen feltételek mellett öt generáció után?
9. Egy gén két allélja esetén számolja ki a három genotípus gyakoriságát, ha $f = 0,2$ és $q = 0,4$. Mekkora az f értéke, ha az A_1A_1 , A_1A_2 , A_2A_2 genotípusok gyakorisága rendre 0,35, 0,1 és 0,55?
10. Észak-Kaliforniában három vadzab populáció vizsgálatkor a heterozigóták megfigyelt relatív gyakorisága 0,05, 0,07 és 0,03 volt. A számított heterozigóta gyakoriságok pedig: 0,41, 0,44 és 0,32. (a) Mekkora a három populáció beltenyészési együtthatója? (b) Mit gondol, mi okozhatja ezt a beltenyészési szintet?
11. (a) Rajzolja fel a családfát két másod-unokatestvér házasságára, akiknek csak egyik nagyszülőjük azonos. Mennyi a várható beltenyészési együttható? (b) Rajzolja fel a családfát két testvér házasságára! Mennyi a várható beltenyészési együttható? (Ebben az esetben két lánc van, mert a közös ősök száma kettő. A beltenyészési együttható kiszámításához a két f értéket össze kell adni.)
12. Ha $u = 10^{-6}$ és $v = 10^{-7}$, mennyi lesz Δq , a $q = 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0$ esetekben? Mikor a legnagyobb a Δq , és miért?
13. Hogyan befolyásolja a kis populációméret a genetikai variabilitást hosszú időszakot figyelembe véve? Értékelje az allélok fixálódására és a populáció homozigócia szintjére kifejtett hatását!
14. Az A_2 allél kezdeti gyakorisága egy kis létszámú populációban 0,3. Mekkora a valószínűsége, hogy fixálódjon A_2 a populációban? Mi a valószínűsége A_1 fixálódásának? Indokolja a választ!
15. Egy 100 egyedből álló populációban $q = 0,4$. Mekkora a V és a Δq hozzávetőleges értéke egy generáció után? Hogyan viszonyul ez a Δq a mutáció okozta allélgyakoriság-változáshoz? (Lásd a 12. feladatot.)
16. Milyen hatást gyakorol a génáramlás egy populáció genetikai variabilitására? Hogyan függ a génáramlás mértékétől és a bevándorlók allélgyakoriságától?
17. Tegyük fel, hogy $m = 0,05$ és $q_m = 0,1$. (a) Rajzolja fel a Δq görbét (l. 19.14. ábrát) ezekkel az adatokkal, különböző q értékekre. (b) Mekkora a várható egyensúlyi gyakoriság?
18. Két populációban egy bizonyos allél gyakorisága 0,0, illetve 0,6 volt, hibrid populációjukban pedig 0,08. Mekkora a keveredés? Milyen feltételeknek kell teljesülniük a génáramlás ilyen becsléseinél?
19. (a) Egy recesszív allélra $s = 0,4$. Mekkora Δq értéke, ha $q = 0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0$? (b) Ábrázolja a Δq értékeket q függvényében!

- (c) Egy recesszív allélra $s = 0,1$. Mekkora az allélgyakoriság egy, illetve két generáció után, ha a kezdeti érték $0,2$?
20. Egy, az M19.1.(a) táblázatban bemutatott kísérlethez hasonló vizsgálatban 120 sötét alapszínű araszolóból 96 maradt sértetlen, a 120 világosból azonban csak 74. Becsülje meg a két forma relatív rátermettségét! Mekkora a sötét színért felelős allél várható gyakorisága egy generáció után, ha a kiindulási érték $0,4$?
21. A_1A_1 , A_1A_2 és A_2A_2 genotípusok relatív rátermettsége $0,8$, $1,0$ és $0,2$. Mekkora A_2 várható egyensúlyi gyakorisága? Számolja ki q -t $\Delta q = 0,1$ és $q = 0,8$ értékeire! Mit árul el ez a várható allélgyakoriság változásról?
22. A galamboknál a heterozigóta előny következtében két gyakori transzferrin allél marad fenn. Három másik galambtenyésztésben a gyakoriságok értéke rendre $0,32$; $0,81$ és $1,0$ volt.
- Több nemzedék múlva mit vár a tenyészetekben az allélgyakoriságokra? Mit gondol, miért lehetnek kezdetben mások az értékek?
23. Hasonlítsa össze általánosságban a mutáció, a génáramlás, a sodródás és a szelekció következtében lezajló allélgyakoriság változásokat! Melyik tényező és milyen feltételek mellett okozza a legnagyobb változást (Δq)? Milyen módon különbözik a genetikai sodródás hatása az allélgyakoriságra a mutáció, a szelekció és a génáramlás ilyen hatásától?
24. A beltenyésztés a többi tényezőtől eltérően befolyásolja a genetikai variabilitást. Jellemezze hatását, és részletezze, hogyan mutatná ki nagyfokú beltenyésztés létezését egy populációban! Miként lehet felhasználni a beltenyésztést a növénynevelésben és az állattenyésztésben?

A megoldások a könyv végén találhatók.

20.

F E J E Z E T

Tanulási program

- 1 Sok emberi öröklődő betegség előfordulásának gyakorisága a mutáció és a szelekció egyensúlyától függ.
- 2 A szelekció, a beltenyésztés és a genetikai sodródás is befolyásolhatja az öröklődő betegségek előfordulási gyakoriságát.
- 3 A nem-darwini evolúció elmélete jól összeegyeztethető a molekuláris evolúció sok jellegzetességével.
- 4 Hogyan használhatók a molekuláris törzsfák a fajok rokonsági viszonyainak felderítésére.
- 5 A termesztett növények és a tenyésztett állatok genetikai változatosságának megőrzése éppen úgy a természetvédelmi genetika részét képezi, mint a ritka és veszélyeztetett fajok variabilitásának biztosítása.
- 6 A természetvédelmi genetika elsődleges célja a variabilitás elvesztésének és a beltenyésztéses leromlásnak az elkerülése.
- 7 Sok fajban kialakult a peszticidekkel és a herbicidekkel szembeni rezisztencia.
- 8 A peszticidrezisztencia kitűnő példát nyújt arra, hogyan jönnek létre az evolúciós változások.

A populáció- genetika gyakorlati alkalmazásai

A tudósok sikere ..., hogy olyan eljárásokat sikerült kifejleszteniük, amelyekkel megbizonyosodhatnak elképzeléseik helyességéről, illetve amelyek segítségével elvethetik mindazt, amit helytelennek találnak.

Sir Francis Galton
angol tudós

A 19. fejezetben a populációk allélgyakorisági értékeit befolyásoló tényezőket egyenként tárgyaltuk, de a valóságban mindig több tényező együttes hatása érvényesül. Ebben a fejezetben olyan hatásokat mutatunk be, amelyek a biológiai kutatások különféle területein jelentőséggel bírnak.

A populációgenetika alapelvei betekintést adhatnak a biológia, az orvostudomány és a mezőgazdaság számos kérdésébe, például az öröklődő emberi betegségek, a molekuláris szintű evolúció, a természetvédelem, a növénynevelés, az állattenyésztés, a peszticidekkel szembeni rezisztencia problémáiba. Bemutatjuk, hogyan lehet ezeken a területeken alkalmazni a populációgenetika eredményeit, és azt, miért kell több tényező együttes hatását vizsgálni. Például az öröklődő emberi betegségek előfordulási gyakoriságának megértéséhez szükséges a mutáció és a szelekció együttes hatásának ismerete, a molekuláris evolúció tárgyalásakor pedig a mutáció és a sodródás következményeit kell figyelembe venni. A természetvédelmi genetika, az állattenyésztés és a növénynevelés, valamint a peszticidrezisztencia jobb megértéséhez jóformán az összes tényező hatását ismerni és integrálni kell.

AZ ÖRÖKLŐDŐ EMBERI BETEGSÉGEK ELŐFORDULÁSA

Az öröklődő betegségek elég ritkák; egyesek csak néhány családban fordulnak elő, mint például a Mal de Meleda-, vagy az Ellis-van Creveld-szindróma, amelyeket a fejezet későbbi részeiben tárgyalunk. Az ilyen ritka betegségeket „**árva**” **betegségeknek**” is nevezik, mert kisszámú előfordulásuk miatt kutatásuk nem olyan intenzív, mint a sokakat érintő rák, vagy AIDS-betegségeké. Más öröklődő betegségek, mint a sarlósejtes anémia vagy a cisztás fibrózis, viszonylag gyakoriak bizonyos populációkban (20.1. táblázat). A következőkben megvizsgálunk néhány olyan tényezőt, amelyek mind a ritka, mind a gyakoribb betegségek előfordulását befolyásolják. Általában elmondható, hogy a betegségek kialakulásában összetett hatások érvényesülnek – az Amerikai Egyesült Államokban az újszülöttek közel 2%-ában kimutatható egy-egy hibás gén. A továbbiakban először a mutáció és a szelekció együttes hatását vizsgáljuk a recesszíven öröklődő betegségek gyakoriságának meghatározására. Végül a beltenyésztés, a genetikai sodródás és a korlátozott mértékű génáramlás hatásai kerülnek tárgyalásra.

A MUTÁCIÓ ÉS A SZELEKCIÓ EGYENSÚLYA

A szelekció a legerőteljesebb tényező, amely megakadályozza a káros allélok gyakoriságának növekedését egy populációban. Például a cisztás fibrózisban, egy autoszómás recesszív betegségben szenvedők nagy része csak gondos orvosi kezelés mellett éri meg a felnőttkort, így nagyon ritkán vannak utódaik (bár az új gyógymódok növelik az élettartamot). Ezért az erős szelekció

20.1. táblázat. Öröklődő emberi betegségek alléljainak gyakorisága különböző populációkban

Betegség	Populáció	Allélgyakoriság
Tay-Sachs	Izrael	0,014
	USA (zsidó)	0,013
	USA (nem zsidó)	0,0013
Cisztás fibrózis	Egyesült Királyság	0,022
	Ohio	0,013
	Afrika	0,0036
	Hawaii (ázsiai)	0,0033
Sarlósejtes anémia	Nyugat-Afrika	0,10–0,20
	USA (afrikai származású)	0,08
	USA (európai származású)	<0,001
Fenilketonuria	Írország	0,0141
	USA (afrikai származású)	0,0079
	USA (európai származású)	0,0023
	Izrael	0,0063

miatt a betegséget okozó allél gyakorisága alacsony marad. Azonban mindig történnek új mutációk, emiatt a cisztás fibrózis allélja sosem tűnik el teljesen. A szelekció és a mutáció ellentétes egyensúlyozó hatása sok más öröklődő betegség esetén is megnyilvánul.

Vizsgáljuk meg a szelekció és a mutáció együttes hatását egy gén két allélja esetében, amikor a recesszív mutáns allél, A_2 az életképesség csökkenését okozza. Ha a károsító allél recesszív, akkor a szelekció következtében előálló allélgyakoriság csökkenése:

$$\Delta q_s = \frac{-spq^2}{1-sq^2}$$

ahol s az A_2 szelektív együtthatója (l. 19. fejezet). A mutáció következtében az allélgyakoriság növekedése megközelítőleg:

$$\Delta q_m = up$$

ha v , a backmutáció ($A_2 \rightarrow A_1$) gyakorisága elhanyagolható u -hoz, a mutációs rátához ($A_1 \rightarrow A_2$) viszonyítva. Mivel a mutációból származó allélgyakoriság növekedés kiegyensúlyozza a szelekció által okozott gyakoriság csökkenést:

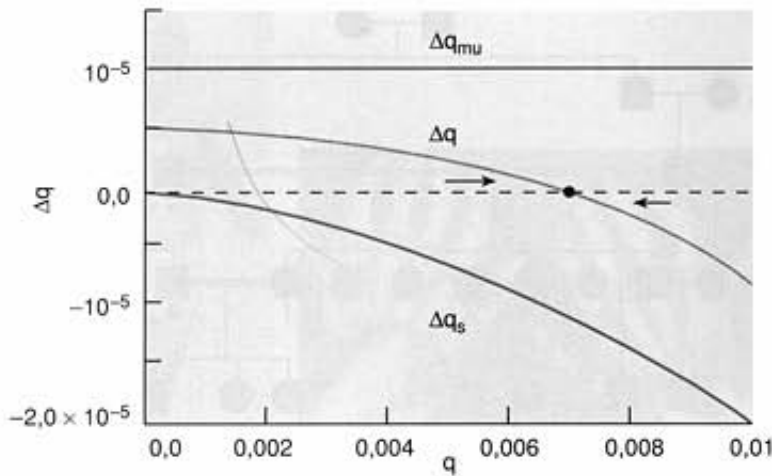
$$\Delta q_m + \Delta q_s = 0$$

A fenti képleteket behelyettesítve ebbe az egyenletbe:

$$up - \frac{spq^2}{1-sq^2} = 0$$

Ha a mutáns allél gyakorisága (q) kicsi, és emiatt q^2 is kicsi (ha $q = 0,01$ akkor $q^2 = 0,0001$), a nevező értéke a szelekció hatását reprezentáló törtben az 1-hez közeli ($sq^2 = 0$), és így:

$$up - spq^2 = 0$$



20.1. ábra. Az allélgyakoriság változása mutáció és a homozigóta recesszívek elleni szelekció együttes hatása esetén. A Δq jelölésű görbe a Δq_{mu} és Δq_s a görbék eredője

$$up - spq^2 = 0$$

A homozigóta recesszív genotípus gyakorisága:

$$q_e^2 = \frac{u}{s}$$

Tehát az egyensúlyi allélgyakoriság:

$$q_e = \left(\frac{u}{s}\right)^{1/2}$$

Az allélgyakoriság nyilvánvalóan növekszik a magasabb mutációs rátánál, és csökken a nagyobb szelekciós együtthatónál. Ha az allél recesszív letális, akkor $s = 1,0$ és a genotípus, illetve az allélgyakoriság u , illetve $(u)^{1/2}$ lesz. Minthogy a mutációs ráta általában igen kicsi (l. a különböző becsléseket a 11.1. táblázatban), ezért a letális allélok gyakorisága is igen alacsony érték.

A szelekció és a mutáció közötti egyensúly megértéséhez vizsgáljuk meg Δq_{mu} -t és Δq_s -t alacsony A_2 értékeknél. A 20.1. ábra $u = 10^{-5}$ és $s = 0,2$ esetre mutatja a görbék lefutását. A Δq_{mu} az ábrázolt kicsi allélgyakoriságnál végig 10^{-5} körül stagnál; a $\Delta q_s = 0,0$, amikor $q = 0,0$, és q növekedésével egyre inkább negatív tartományba kerül. Az egyensúly erre a példára:

$$q_e = \left(\frac{10^{-5}}{0,2}\right) = 0,00707$$

Más szóval ennél az értéknél $\Delta q_{mu} + \Delta q_s = 0$. A két görbe eredője a Δq görbe, amelyen a pont jelzi az egyensúly helyét.

A 2. fejezetben már volt szó arról, hogy az albinizmus recesszív jelleg, amelynek oka a melanin nevű pigment szintézisében fellépő biokémiai hiba. Az albinó személyek látása sokszor igen gyenge és érzékenyek a napfényre, de relatív rátermettségük valószínűleg nem csökkent jelentősen. A relatív életképességük vizsgálatán alapuló becslés szerint az albinók rátermettsége körülbelül az egészségesek 0,9 része, így $s = 0,1$. A gének mutációs rátája általában $10^{-5} - 10^{-6}$ között van (l. 11. fejezet). Ha

5×10^{-6} mutációs rátával számolunk, akkor az albinó személyek várható egyensúlyi gyakorisága:

$$q_e^2 = \frac{5 \times 10^{-6}}{0,1} \\ = 0,00005$$

azaz húszezer személy közül átlagosan egy albinó. A vizsgálatok szerint a legtöbb populációban az albinizmus $\%_{10000} - \%_{100000}$ gyakorisággal fordul elő, ami összhangban van a mutáció és a szelekció együttes hatására alapozott magyarázattal.

A mutáció és a szelekció egyensúlya alapján előre jelezhető egy öröklődő betegség jövőbeli előfordulása is. Az előfordulási gyakoriság növekedhet az orvostudomány fejlődésének következtében, mivel nő az érintett genotípusok relatív rátermettsége. Ugyancsak nő a gyakoriság az emelkedő mutációs ráta miatt, ami több mutáns allélt produkál. Ha a szelekciós együttható csökken a javuló orvosi kezelés miatt, és s' -vel jelöljük az új szelekciós együtthatót, akkor az új egyensúly:

$$q_e^2 = \frac{u}{s'}$$

Ha például a betegség korábban letális volt ($s=1,0$), napjainkban pedig az orvosi kezelés következtében már csak kevés hátrányt jelent ($s' = 0,1$), az egyensúlyi gyakoriság a tízszeresére növekszik. A fenilketonuria esetében a rátermettség majdnem nulla volt a kezelés hiányában, a szellemileg súlyosan visszamaradott betegeket általában intézetekben lehetett csak ellátni. Ma, ha betartják az előírt diétát, a rátermettség megközelíti az egészségesekét. Ennek eredményeként várható, hogy a fenilketonuriás betegek gyakorisága idővel emelkedik, ami maga után vonja az orvosi költségek növekedését is.

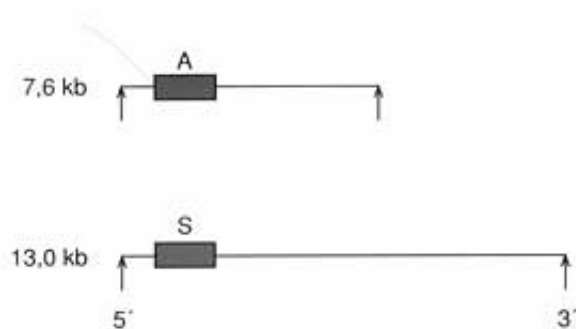
Hasonlóképpen, a mutációs ráta növekedése szintén emeli az egyensúlyi értéket. Tegyük fel, hogy a környezet-szenyvezés, az ételmiszer-adalékok és egyéb mutagének hatására megemelkedik a mutációs ráta, u' lesz. Az új egyensúly pedig:

$$q_e^2 = \frac{u'}{s}$$

Ha $u' = 10u$, akkor a mutációs ráta tízszeres növekedése az egyensúlyi gyakoriságban is tízszeres növekedést okoz. A mutációs ráta növekedése azonban számos lokuszt érint egyidejűleg. A javuló orvosi ellátás és a mutációs ráta emelkedése miatt egyes betegségek gyakorisága csak igen lassan, sok-sok generáció alatt növekedhet.

A BETEGSÉGEK GYAKORISÁGÁT BEFOLYÁSOLÓ EGYÉB TÉNYEZŐK

A mutáció és a szelekció egyensúlya általában megfelelő magyarázatot ad sok öröklődő betegség előfordulására, de mellette más evolúciós tényezők is fontosak. Például a sarlósejtes anémia alléljának gyakorisága maláriával fertőzött területeken megnöve-



20.2. ábra. A normál és a sarlósejtes β -globin allél restriktions fragmentjeinek vázlatja. A nyilak a HpaI enzim hasító helyeit jelölik

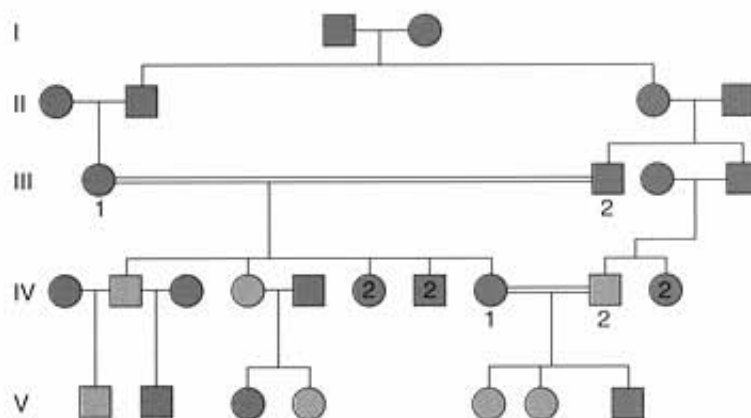
kedett a heterozigóták előnye miatt (a homozigóták hátrányban vannak). Az USA jelenlegi népességében az allél gyakoriságát különféle evolúciós tényezők befolyásolják. A malária valamikor endemikus volt az Egyesült Államok déli részén, de napjainkra a malária visszaszorulása miatt az érintett genotípusok rátermettsége megváltozott. Afrikától eltérően nem tapasztalható a heterozigóta előny, és sokszor a homozigóta recesszív sem letális.

A genetikai tanácsadás rávezetheti a hordozókat a kisebb családok tervezésére, és megoldható a sarlósejtes homozigóták szelektív abortusza is. Ráadásul a régebbi és a mostani génáramlás az európai származású népességből (ahol az allél gyakorisága majdnem nulla) az afrikai eredetű populációba, tovább csökkenti ott az allélgyakoriságot. Mindezek alapján megjósolható, hogy a sarlósejtes anémia alléljának gyakorisága kis értékre csökken az afrikai származású amerikaiak körében.

A sarlósejtes anémia DNS-ének vizsgálata arra mutat, hogy a mutációk csak néhány alkalommal jelentek meg a populációkban. Ezt abból a kísérletből következtetik, hogy a legtöbb személy β -globin génje HpaI enzimmel hasítva egy 7,6 kb nagyságú restriktions fragmentet eredményez (20.2. ábra). Az afrikai származású amerikaiak populációiban azonban a sarlósejtes anémia alléljával majdnem mindig egy hosszabb restriktions fragmentum asszociálódik. Az S allél valójában egy restriktions hely hiányával kapcsolatos, amely a normál allél fragmentumának 3' végénél található.

Különböző lokuszok bizonyos alléljainak összekapcsolódása, mint az S allél asszociációja a restriktions helyet nem tartalmazó régióval, a **linkage disequilibrium**. A mutáns allélok és a kapcsolt restriktions helyek közötti linkage disequilibrium alkalmas a betegségekért felelős gének helyének meghatározására az adott DNS-fragmentumon. Más afrikai sarlósejtes allélok vizsgálata és a különböző DNS-markerekkel való linkage disequilibrium tanulmányozása azt mutatja, hogy szinte minden, Afrikában található mutáns allél három, egymástól független mutációból származtatható. Más szóval, a mutáció (vagy a mutáció hiánya) behatárolhatja az evolúciós választ.

A beltenyésztés egy másik tényező, amely befolyásolhatja egy öröklődő betegség megjelenését. Elszigetelt emberi populációkban gyakran előfordul vérrokonok házassága a szülőpárok kis száma miatt. A beltenyésztés növelheti a re-

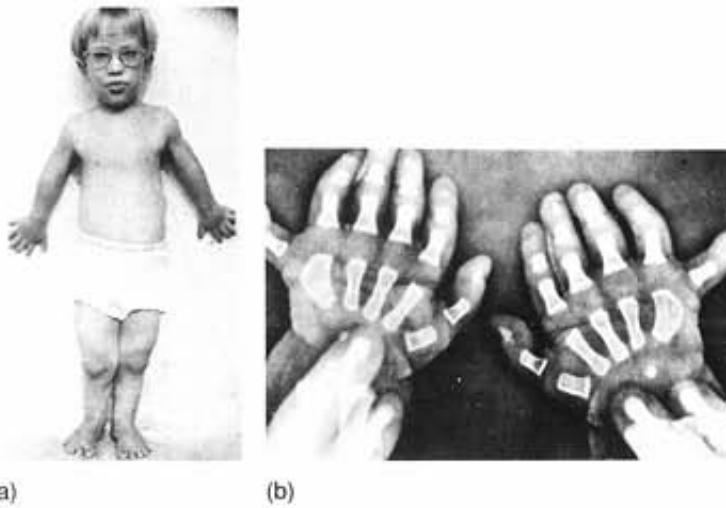


20.3. ábra. A családfában két elsőfokú unokatestvérek közötti házasság is előfordul (kettős vonallal jelölve), a III-1 és a III-2, illetve a IV-1 és IV-2 személyek között. A lila színnel kiemelt személyek a ritka, recesszíven öröklődő Mal de Meleda-betegségben szenvednek

cesszív betegségek gyakoriságát ezekben a populációkban. A Szahara távoli déli részén élő Kel Kummer tuareg törzs például csupán háromszáz főből áll, a házasságok 30%-át első unokatestvérek kötik. Jól dokumentált olaszországi esetek is ismertek, ahol a katolikus egyház speciális engedélyével köthetők vérrokon házasságok. Az adatok szerint a vérrokon házasságok háromszor-négyszer olyan gyakoriak a távoli, gyéren lakott hegyi falvakban, mint a sűrűbben lakott területeken.

A 20.3. ábra rokonházasságokat mutat be egy család példáján, amely a jugoszláv tengerpart egy kis szigetének izolált populációjában élt. A családban halmozódó betegség az igen ritka Mal de Meleda, egy autoszómás recesszív rendellenesség, amelynek tünete a kéz és a láb bőrének megvastagodása. A III. generáció 1. és 2. személye, valamint a IV. generáció 1. és 2. személye közötti házasság első unokatestvérek között kötött. A III-1 és a III-2 biztosan heterozigóták voltak, mert hét gyermekük közül kettő lett beteg. A másik házasságban a IV-1. heterozigóta volt, a IV-2 pedig homozigóta érintett. Három gyermekük közül kettő beteg volt. (Ez a betegség máshol nagyon ritka, de ebben a populációban a relatív allélgyakoriság miatt sok a heterozigóta genotípus.) A vérrokon kapcsolatok miatt a vizsgált népességben sokkal nagyobb a Mal de Meleda előfordulási gyakorisága, mint egy véletlenszerű házasságkötésekkel szaporodó populációban.

Vannak olyan izoláltan élő vallási csoportok, amelyekben egyes ritka betegségek gyakorisága viszonylag magas. Egy sor ritka betegséget olyan zárt populációkban írtak le, mint például az anabaptista Amish szekta az Egyesült Államokban. Ezeket a csoportokat rendszerint néhány főből álló, kis létszámú közösség alapította, majd elzárkózott a bevándorlók elől. A betegség abnormálisan magas gyakorisága elsősorban az ún. **alapító hatás** következményeként alakult ki. Természetesen a mutáns allél nagy gyakorisága időleges, és a szelekció majd csökkenti a gyakoriságot sok generáció után.



20.4. ábra. a) Ellis–van Creveld-szindrómában szenvedő gyermek. A Pennsylvániában élő Amish populációban előforduló recesszíven öröklődő rendellenesség egyik tünete a törpenövés. A betegek végtagjai rövidek, szívükön fejlődési rendellenességek jelentkeznek, és mindkét kezükön hat ujjuk van (lásd a röntgenfelvételt a (b) képen)

Fotók © Victor McKusick

Az Amish szekta körében, Pennsylvániában, Lancaster megyében, feltűnően gyakori egy recesszív rendellenesség, az ún. Ellis–van Creveld-(EvC) szindróma, amelynek legszembetűnőbb tünete hat ujj kialakulása a kézen és a törpe termet (20.4. ábra). A populáció lélekszáma tizenháromezer körüli, és nyolevankét érintett személyt diagnosztizáltak. A szülők családfájának vizsgálatakor kiderült, hogy mindegyikük Samuel King és feleségéig vezetik vissza őseiket, akik a közösség alapító tagjai voltak. Elég biztosnak látszik, hogy az EvC-szindróma gyakoriságáért első sorban az alapító hatás a felelős: Samuel King vagy felesége lehetett a recesszív allél hordozója, és mivel a populáció sok tagja tőlük származtatható, a betegség gyakorisága nagy.

Az öröklődő emberi betegségek előfordulásának gyakorisága általában jól leírható a mutáció és a szelekció egyensúlyával. A mutáció növeli, a szelekció pedig csökkenti a mutánsok gyakoriságát. A mutáció és a szelekció mellett a betegséget okozó allélok gyakoriságát a genetikai sodródás, a génáramlás, valamint a beltenyésztés is befolyásolhatja.

A MOLEKULÁRIS EVOLÚCIÓ

A populációgenetika egyik legizgalmasabb és potenciálisan igen jól felhasználható alkalmazása a **molekuláris evolúció** folyamatainak feltárása. Mindazoknak a tényezőknek a megismerése, amelyek a DNS nukleotidszekvenciájának és mennyiségének változásait előidéznek, és így a fehérjék módosulását eredményezik az evolúció során. A makromolekulák közötti eltérések alapján ki lehet mutatni a fajok közötti rokonsági vi-

szonyokat. A következő elemzés során feltételezzük, hogy a DNS-szekvenciák közötti eltérések többsége, illetve a fehérjék aminosavsorrendjének sok megváltozása nem áll erős szelekciós nyomás alatt. Ennek következtében a genetikai változottságot más evolúciós tényezők befolyásolják, mint például a genetikai sodródás és a mutáció, amelyek döntő szerepet játszhatalnak a molekuláris szekvenciák evolúciójában és a variabilitás kialakításában.

NEUTRALITÁS

A molekuláris evolúció menetének leírására Motoo Kimura japán kutató és munkatársai a mutáció és a genetikai sodródás együttes hatásán alapuló elméletet dolgoztak ki. A sodródás a nagy létszámú populációk egy-egy generációjában csekély mértékben módosítja az allélgyakoriságot, de hatásai a generációk során felhalmozódhatnak és jelentőssé válhatnak. A mutációs ráta hasonlóképp kis hatású az egyes nemzedékekben, de számos generáción keresztül már jelentőssé válhat. Ezért a mutáció és a sodródás együttesen és hosszú időn át jelentősen befolyásolhatja a molekuláris evolúciót.

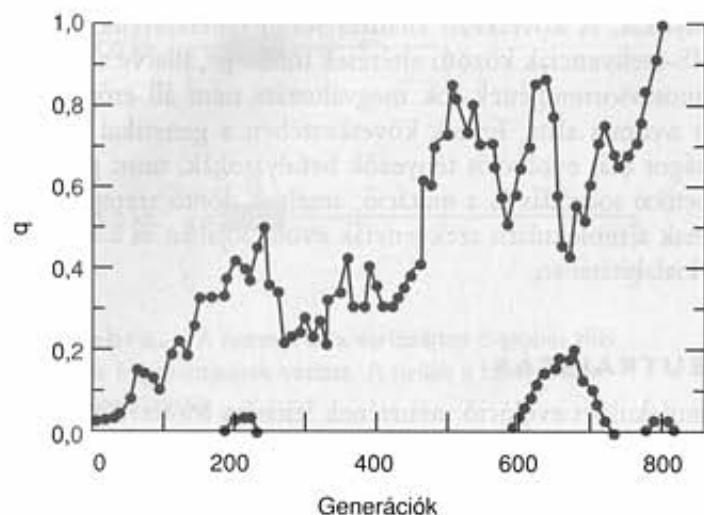
Hogy egy véges méretű populációban vizsgálhassuk a mutációt, tételezzük fel, hogy a szelekciós különbségek nem lényegesek, azaz a különböző alléloknak nincs (vagy csak elenyésző) szelektív előnyük vagy hátrányuk van. Ez a **neutralitás** elve. A neutralitás olyan helyzetekre vonatkozik, amikor a populáció allélgyakoriságának változásában a sodródásnak nagyobb a hatása, mint a szelekcióé. Az A_1 és az A_2 allélok semlegesnek tekinthetők, ha az A_1A_1 , A_2A_2 és az A_1A_2 genotípusok relatív rátermettsége egyenlő. Más szóval az allélok gyakoriságuk arányában járulnak hozzá a következő nemzedékhez.

Tételezzük fel, hogy egy új mutáns, A_3 allél jelenik meg egy N létszámú populációban, ahol egyébként csak A_1 allélok vannak. A mutáns allél kezdeti gyakorisága:

$$q = \frac{1}{2N}$$

ahol $2N$ az allélok száma a diploid szervezetekből álló populációban. A két allél semleges, és az új mutáns allél fixálódásának valószínűsége azonos kezdeti gyakoriságával, $1/(2N)$, ahogyan azt a 19. fejezetben tárgyaltuk. Ennek a valószínűsége, hogy a mutáns allél elvész, egyenlő az eredeti allél fixálódásának valószínűségével, $1-1/(2N)$. Ez azt jelenti, hogy hacsak nem nagyon kicsi a populáció, az új neutrális mutáns allél majdnem mindig eliminálódik. $N = 50$ egyedszámú populációban például az új, mutáns allél fixálódásának valószínűsége csak 0,01.

A mutáns allél eliminációjának és fixálódásának időszükséglete nagyon különböző. Mivel az elvesztéshez az allélgyakoriság kicsi változása is elégséges ($1/(2N)$ -ről 0,0-ra csökken), ehhez rövid idő elegendő. Ezzel szemben az új mutáns fixálódása nagymértékű allélgyakoriság-változást igényel ($1/(2N)$ -ről 1,0-ra változik), tehát az ehhez szükséges idő is sokkal hosszabb. A 20.5. ábra négy különböző mutáció fixálódásához, illetve eltűnéséhez szükséges időtartamokat ábrázolja. Ebben a példában az



20.5. ábra. Négy új mutáns allél gyakoriságának változása véges egyedszámú populációban az idő függvényében. Az első fixálódott, a többi a genetikai sodródás miatt eliminálódott

első mutáns allél végül fixálódik, míg a többi a genetikai sodródás miatt eliminálódik.

Ha egy lokusznak sok allélja van, a mutáció növeli az allélok számát, a genetikai sodródás pedig a csökkenti. Az egyensúlyi heterozigócia (H_e) a két tényező egyensúlyának eredménye:

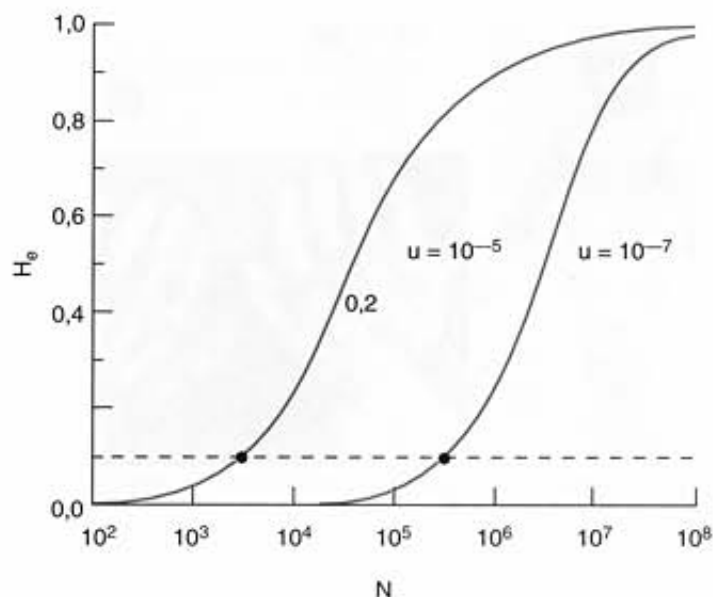
$$H_e = \frac{4Nu}{4Nu + 1}$$

ahol N a populáció egyedszáma és u a mutációs ráta. A 20.6. ábra különböző méretű populációk számított egyensúlyi heterozigóciáját mutatja 10^{-5} és 10^{-7} mutációs ráta mellett. $N = 10^4$ esetén az egyensúlyi heterozigócia közel áll nullához, ha $u = 10^{-7}$. Ugyanilyen egyedszámnál és $u = 10^{-5}$ esetén 0,286. Általánosságban, ha Nu sokkal nagyobb 1-nél és a populáció nagy, a mutációs ráta határozza meg leginkább a heterozigóciát, ha pedig Nu sokkal kisebb egynél, a sodródás lesz a fő tényező, és H_e értéke kicsi lesz.

Más oldalról is vizsgálhatjuk a neutralitás alapján adott előrejelzéseket. Ha egy elektroforézises vizsgálatban kapott átlagos heterozigócia értéke 0,1- és feltételezzük, hogy u ismét 10^{-5} és 10^{-7} között van, megjósolhatjuk az N nagyságát. A konkrét példában N 3000 és 300 000 közötti szám (a 20.6. ábrán a tartományt a heterozigócia görbéjének és az átlagos heterozigócia egyenesének metszéspontjai jelölik ki).

A mutáció és a sodródás egyensúlya alapján létrejövő heterozigócia elég nagy lehet, ha a populáció mérete nagy. Ahogyan a 19. fejezetben tárgyaltuk, a fehérjék elektroforézisével vizsgálható gének sok fajnál nagy variabilitásúnak bizonyultak. A neutralitás elve arra enged következtetni, hogy változatosság nagy része a mutáció és a sodródás közös hatásának következménye.

Ugyanakkor a természetes populációkban észlelt elektroforetikus variabilitás egy részét valószínűleg a szelekció tartja fenn. Nincs tudományos egyetértés abban, hogy mely loku-

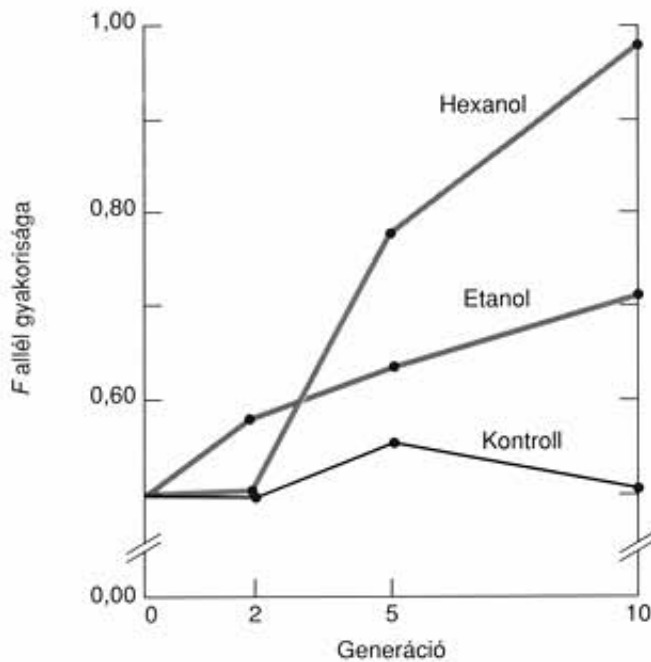


20.6. ábra. Egyensúlyi heterozigócia (H_e) véges egyedszámú populációban (N), különböző mutációs ráták (u) mellett

szokra hat inkább a szelekció, és melyekre a neutralitás erői. A *Drosophila melanogaster* alkohol-dehidrogenáz (*Adh*) génjének sokfélesége a legrészletesebben vizsgált biokémiai polimorfizmusok közé tartozik. A két gyakori allél, az *S* és az *F* csak egy aminosavban tér el egymástól a 255 közül. Az *F* allélban a 192. pozícióban treonin található, az *S* allélban viszont lizin. Mivel az erjedő gyümölcsökben és zöldségfélékben, amelyeken a *Drosophila* él, alkoholok mindig vannak, a muslicák életben maradásához nélkülözhetetlen, hogy a dehidrogenáz lebontsa azokat. Több kutató azt tapasztalta, hogy a két allél gyakoriságára hatnak az alkoholok. Ezen felül az allélgyakoriságok változásának sebességét befolyásolja a jelenlévő alkohol anyagi minősége (20.7. ábra). A legtöbb vizsgált alkohol valamilyen mértékben növeli az *F* allél gyakoriságát. Ebből arra lehet következtetni, hogy alkohol hatására az *F* allélnak kedvező erős szelekció indul meg, és a variabilitás fenntartásában a neutralitásnak valószínűleg nincs szerepe.

MOLEKULÁRIS ÓRA

Sokféle szervezet számos fehérjéjének aminosavsorrendjét ismerjük. A különböző szervezetek őseinek szétválására vonatkozó paleontológiai adatok azt mutatják, hogy egy adott fehérjében az evolúció során szabályos gyakorisággal jelennek meg, halmozódnak fel szubsztitúciók. Természetesen a bizonyos szabályossággal történő helyettesítés hosszú idő alatt bekövetkezett események átlaga. Feltéve, hogy szabályos szubsztitúciók történtek, két, közös őstől származtatható faj fehérjéjének aminosavsorrendbeli különbsége molekuláris óráként szolgálhat. A **molekuláris óra** jelzi, mennyi idő telt el a fajok szétválásától. Különböző fajok homológ fehérjéinek aminosavsorrendjét vagy a fehérjét meghatározó gének nukleotidszekvenciáját összehasonlítva, becsülni tudjuk a mo-



20.7. ábra. Az Adh^F allél gyakoriságának változása különböző alkoholok hatására *Drosophila melanogaster*-ben

20.2. táblázat. Két faj fehérjéjének hipotetikus aminosavsorrendje

Faj	Aminosavszekvencia				
	1	2	3	4	5
a	arg	asp	val	glu	lys
b	arg	asp	arg	glu	leu

lekuláris változatok szubsztitúciós rátáját, ha ismerjük a két faj szétválásnak hozzávetőleges időpontját.

A 20.2. táblázatban két faj homológ fehérjéjének hipotetikus aminosavsorrendjét hasonlítjuk össze. Az öt aminosav közül az 1., 2. és 4. megegyezik, a 3. és 5. helyen különbség van. Az eltérő helyek aránya $\frac{2}{5} = 0,4$. A neutralitás elve alapján a különbséget azzal magyarázhatjuk, hogy az egyik fajban mutáció történt, majd a sodródás fixálta a változatot. Ha a két faj közeli rokon volt, aminosavsorrendjük majdnem azonos lehet, ha távoli rokonok voltak, sok eltérés lehetséges.

A molekuláris óra hipotézise összeegyeztethető a neutralitás elméletével. Más szóval, a molekuláris változatok a genetikai sodródás és a mutáció következtében alakulnak ki, és hosszú idő alatt viszonylagos rendszerességgel jelennek meg. Tegyük fel, hogy a molekuláris változatok gyakoriságát kizárólag a genetikai sodródás és a mutáció befolyásolja. Az új változatot kialakító mutációs ráta legyen u , így az N egyedszámú diploid populációban generációnként $2Nu$ új mutáns jelenik meg. Ne felejtjük el, hogy az új neutrális mutáns fi-

xálódásának valószínűsége kezdeti gyakoriságával ($1/(2N)$) egyenlő. A mutáció és sodródás egyensúlyát feltételezve az **allélszubsztitúció rátája** generációnként (k) a fixálódás valószínűségének és az új mutáns megjelenési valószínűségének szorzata:

$$k = 2Nu \frac{1}{2N}$$

$$= u$$

Vagyis az allélszubsztitúció átlagos rátája ebben az egyszerű modellben egyenlő a lokusz mutációs rátájával.

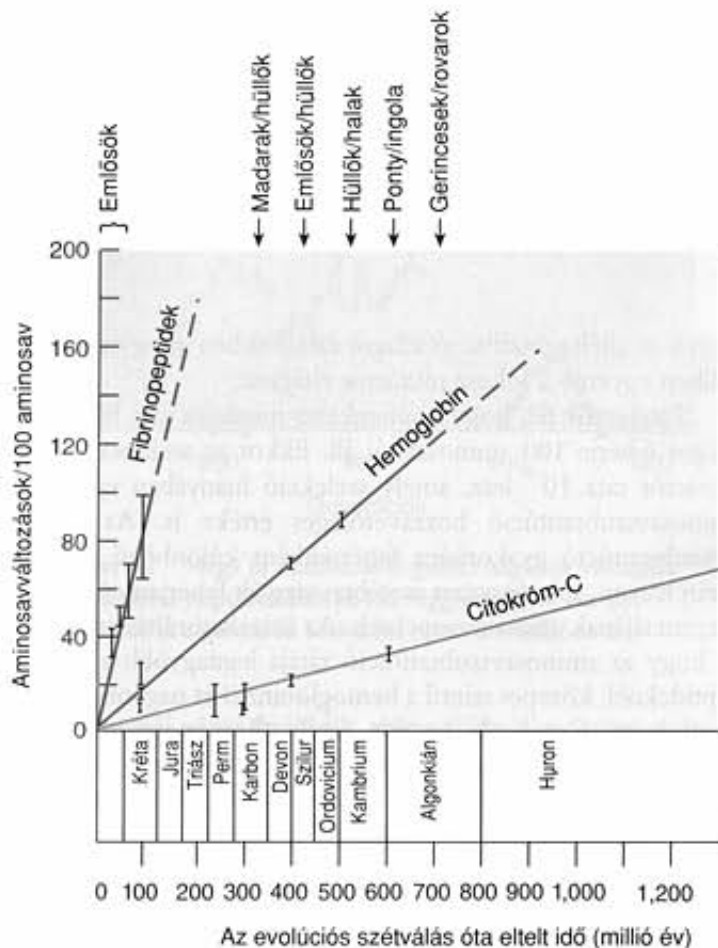
Tételezzük fel, hogy a génenkénti mutációs ráta 10^{-6} és egy átlagos fehérje 100 aminosavból áll. Ekkor az aminosavankénti mutációs ráta 10^{-8} lesz, amely szelekció hiányában egyben az aminosavszerkezet változatlanságának mértékét is jelöli. Az aminosavszerkezet gyakorisága fehérjénként különböző. A 20.8. ábrán három, sok szervezet esetében vizsgált fehérjemolekula divergenciájának adatai szerepelnek. Az összehasonlítás azt mutatja, hogy az aminosavszerkezet változatlanságának legnagyobb a fibrinopeptideknél, közepes szintű a hemoglobinnál és nagyon alacsony a citokróm-C-nél. A becült érték fibrinopeptid esetében $9,0 \times 10^{-9}$, a hemoglobinnál $1,4 \times 10^{-9}$, a citokróm-C-nél pedig $0,3 \times 10^{-9}$.

A különbségeket a molekulák térszerkezetében vagy az aktív centrum kialakításában fontos aminosavak eltérései okozzák. A H4 hiszton szubsztitúciós rátája $0,006 \times 10^{-9}$. Mivel a fehérje szorosan kapcsolódik a DNS-hez, jóformán az egész aminosavszekvencia fontos a térszerkezet kialakításában. A másik szélsőséges példa a már említett fibrinopeptidek esete: enzimaktivitásuk nincs és alig többek térkitöltő elemeknél. Az egyik magyarázat szerint minél szigorúbban kötött a fehérje aminosavszekvenciája, annál kisebb a szubsztitúciós rátája. A fibrinopeptidek szubsztitúciós rátája közelít a képlet alapján számított értékhez, míg a hisztonoké sokkal kisebb.

MOLEKULÁRIS TÖRZSFÁK

A rokon fajok közötti különbségeket morfológiai, biokémiai, immunológiai vagy más bélyegek alapján mérhetjük. A közelebbi rokonságban álló fajok esetében a hasonlóság várhatóan nagyobb. A genetikai és fenotípusos eltérések mérésének egyik fontos felhasználási területe a rokon populációk vagy fajok leszármazási viszonyainak meghatározása. A leszármazási viszonyokat rendszerint **törzsfán** ábrázolják. A 20.9. ábrán az ősi típus a felső részen, az evolúciós leszármazottak az ábra alsó részén láthatók. A különböző szervezetek molekuláris felépítésének hasonlóságai és eltérései segítségünkre lehetnek evolúciós kapcsolataik tisztázásában. A hasonló szerkezetű molekulákkal rendelkező szervezetek valószínűleg közeli rokonok, míg a nagyon eltérő molekulákkal rendelkezők csak távoli rokonságban állnak egymással.

Egy egyszerű törzsfá szerkesztésének bemutatására vizsgáljuk meg különböző populációk és fajok csoportjait. Tételezzük fel, hogy a csoportok genetikai távolságát az allélgya-

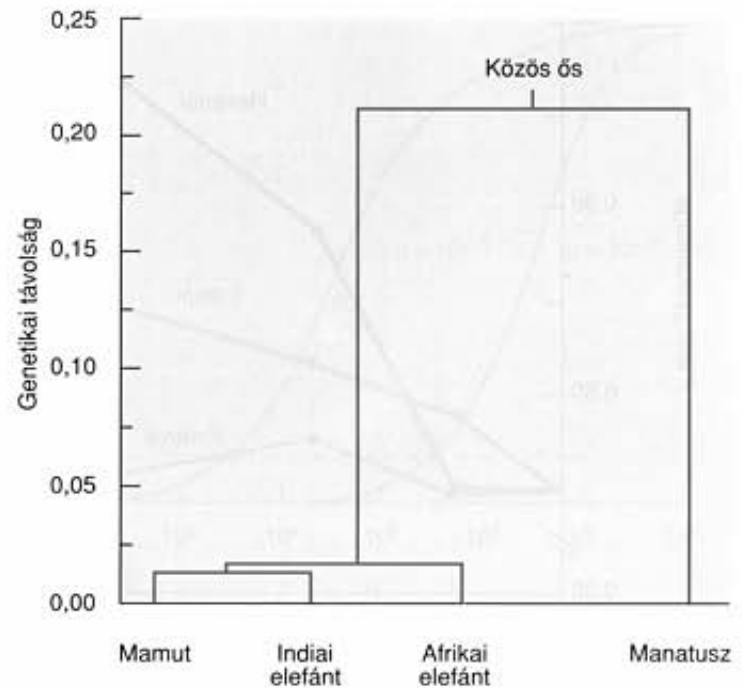


20.8. ábra. Három különböző fehérjemolekula aminosavszekvenciájában bekövetkezett változások száma különböző földtörténeti korokban szétvált szervezetek esetében

Forrás: Dickerson, R. C.: *The Structure of Cytochrom C and the Rates of Molecular Evolution*. J. Molec. Evol. 1:26–45, 1971

korisági értékek, az aminosavsorrend különbségei vagy restrikciós térképek alapján meghatároztuk, így az értékek mátrixa rendelkezésre áll.

Az adatokat úgy kell elrendezni, hogy tükrözzék a biológiai viszonyokat. Néhány kihalt állatfaj maradványaiból egyes fehérjék vizsgálhatók. Ezeknek a fehérjéknek immunológiai tulajdonságait összevetve a ma élő rokon fajok fehérjeinek jellemzőivel egy mérőszámot kapunk, a **genetikai távolságot**. A Szovjetunióban, 1977-ben feltárták egy 40 000 éve elpusztult mamutborjú maradványait. A maradványból a szérumalbumin vizsgálható volt, és összehasonlították a ma élő két elefántfaj és egy manatusz faj albuminjával. A vizsgálati eredmények alapján rajzolt törzsfá a 20.8. ábrán látható. A mamut, az indiai elefánt és az afrikai elefánt esetében az albuminok között kicsi a különbség, ami alátámasztja azt, hogy e három faj közeli rokonságban áll egymással. A három faj molekuláris szintű hasonlósága arra utal, hogy körülbelül azonos időben válhattak szét. A 20.9. ábra törzsfája alapján nem mondható meg egyértelműen, hogy a mamut az indiai vagy az afrikai elefánthoz áll-e közelebb. Részletesebb adatokra



20.9. ábra. Immunogenetikai adatok alapján szerkesztett törzsfá. Az adatok a mamut, az indiai és az afrikai elefánt közeli rokonságát jelzik

Forrás: Lowenstein, J. M. és tsai: *Albumin Systematics of the Extinct Mammoth and Tasmanian Wolf*. Nature, 291:409–411, 1981

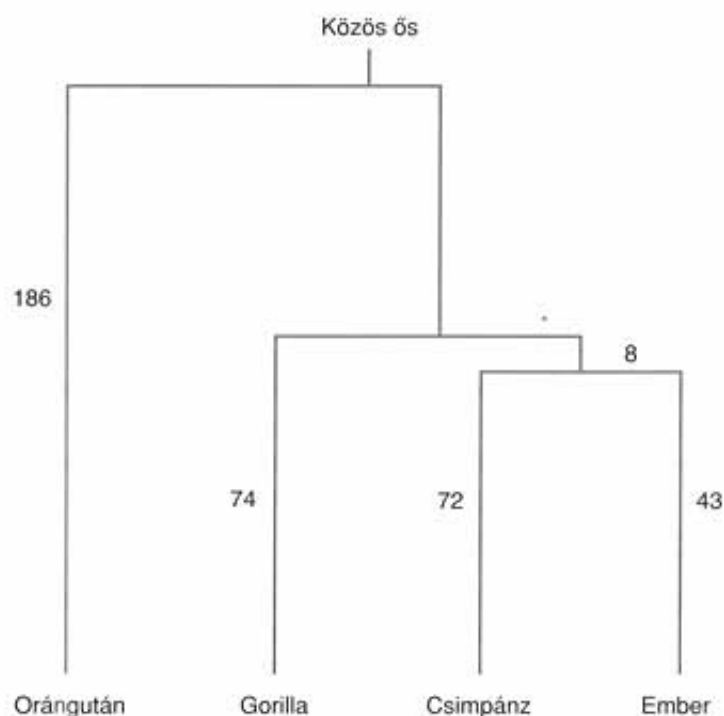
van szükség annak megállapítására, hogy melyik faj vált el először a másik kettőtől.

Az ember, a csimpánzok és a gorillák rokonsági kapcsolatainak vizsgálata is sok kérdést vet fel. A 4. fejezetben tárgyaltuk, hogy a három faj kromoszómaszerelvénye nagyfokú hasonlóságot mutat. Összehasonlították a három faj és az orangután β -globin génjének 7100 bázispárnyi DNS-szekvenciáját. Az eltérés mindegyik között igen kicsi, de az orangután 3% körüli eltérése a legnagyobb (20.3. táblázat). Vegyük észre, hogy az ember és a csimpánz között valamivel nagyobb a hasonlóság, mint az ember és a gorilla között.

Az adatok alapján törzsfát készíthetünk, amely a fajok származási viszonyait szemlélteti (20.10. ábra). Az ábra azt a törzsfajlódási rendszert mutatja, amely a legkevesebb számú változáson át éri el a jelenleg meghatározott különbségi szintet (az ún. legtakarékosabb út elve); az ágak mentén a DNS-szekvenciában bekövetkezett változások száma szerepel. Az adatok alapján más hasonló fák is szerkeszthetők, de azok nem illeszkednek ilyen megbízhatóan a kísérleti adatokhoz. Az ember DNS-szekvenciájában a szétválás óta 43 változás történt, a csimpánzokéban pedig 72. Érdekes, hogy az ember és a csimpánzok β -globin génjében nyolc olyan közös változás van, amely a gorillánál nem mutatható ki. Ez alátámasztja azt a feltételezést, hogy legközelebbi rokonaink a csimpánzok. A közeljövőben más gének nukleotidsorrendjének összehasonlító elemzése további segítséget nyújthat ezen fajok származásának felderítésében.

20.3. táblázat. Az eltérés mértéke a β -globin szekvencia 7100 bázispárnyi szakaszában két faj között

	Csimpánz	Gorilla	Orángután
Ember	0,016	0,017	0,034
Csimpánz	—	0,021	0,038
Gorilla	—	—	0,037



20.10. ábra. Az ember, a csimpánz, a gorilla és az orangután leszármazása a β -globin gén bázissorrendjének vizsgálata alapján. A számok az egyes ágakon bekövetkezett változások számát mutatják

Az mtDNS FELHASZNÁLÁSA ROKONSÁGI VISZONYOK ELEMZÉSÉRE

A mitokondriumoknak saját mtDNS-ük van, amely függetlenül öröklődik a sejtmag DNS-étől. Az mtDNS elválasztható a mag DNS-étől ezért sok, a DNS variabilitását vizsgáló eljárásban használják. Az mtDNS szinte teljes egészében anyai ágon öröklődik (l. 18. fejezet), az öröklődő információ anyáról lányára száll. Természetesen a hímnemű utódok is öröklök anyjuk mitokondriumait, de azokat nem adják tovább utódaiknak. Mivel a mitokondrium anyai öröklődésű és a mitokondriumok között elenyésző a génkicserélődés, feltételezhető, hogy az azonos mtDNS típust mutató egyedeknek közös anyai ősiük volt. Az emlősök mtDNS-ének szubsztitúciós rátája 5-10-szerese a mag DNS-ének. A magas

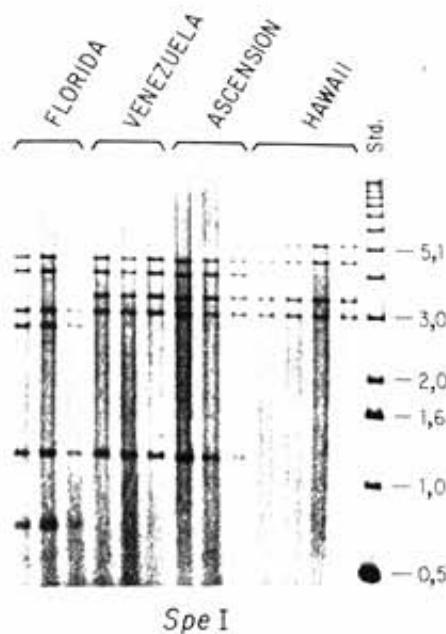
mutációs ráta oka, feltehetően a DNS-szintézis javító mechanizmusának kisebb hatékonysága.

A mitokondriumok anyai öröklődése miatt a mag DNS-e és az mtDNS egészen eltérő variabilitást mutat. Például a házi egér két fajának elterjedési területe Dániában egy 50 kilométer szélességű hibrid zónában átfedi egymást, de a két faj anatómiai különbségei szembevetődnek. Számos sejtmagban található gén allélgyakorisága eltérő a hibrid zóna két oldalán. A fehérjék elektroforetikus vizsgálatai szerint az allélgyakoriság eltérései jól egybevágnak az anatómiai különbségekkel. Az mtDNS vizsgálatok azonban nem mutatnak eltérést az önálló elterjedési területeken.

Az mtDNS vizsgálatok hatékonyságát illusztrálja Jon Avise és munkatársainak közös levesteknősökön végzett vizsgálata. A nőstény teknősök minden évben mintegy 2000 kilométert vándorolnak a Brazília közelében lévő élőhelyükről az Ascension-szigetig, Afrika közelébe. A feltételezések szerint ez a vándorlás több mint negyvenmillió éve kezdődött, amikor Dél-Amerika és Afrika még közel voltak egymáshoz, de azóta a kontinensvándorlás miatt eltávolodtak. A nőstény teknősök feltehetőleg azért úsznak el szigetig, hogy ott rakják le tojásaikat, ahol ők is kikeltek. Ha az évmilliók során az Ascension-szigeti populáció valóban izolálódott a többi Atlanti-óceáni populációtól, akkor genetikailag is különbözőnek kell lennie.

A Hawaii-szigetek, Florida, Venezuela és az Ascension-sziget teknőseinek mtDNS-ét megvizsgálva, nyilvánvalóvá vált, hogy a szigetről származó teknősök mtDNS-e azonos a Venezuelában talált leggyakoribb típusal. A legtöbb restriktív hely (95-öt vizsgáltak) azonos volt minden vizsgált populációban. A 20.11. ábráról leolvasható, hogy néhány restriktív hely a venezuelai és az Ascension-szigeti populációnál azonos, a floridai és a Hawaii-szigeti populáció esetében viszont különböző. A vizsgálati eredményekből arra lehet következtetni, hogy az Ascension-szigeti populáció nem régen izolálódott, mivel azonos a venezuelai mintával, és valószínűleg más Atlanti-óceáni szigeteken költő populációból származik.

Az ember mtDNS-én végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a mai mtDNS-szekvencia valószínűleg egy körülbelül 200 000 évvel ezelőtt élő anyai őstől származtatható (ez azonnal spekulációkhoz vezetett Éva létezésével kapcsolatban). A feltevés azon a megfigyelésen alapul, hogy az ember mtDNS-ének változatossága – a magas mutációs rátát figyelembe véve – a vártnál kisebb. Az adatok értelmezésénél a következőket vegyük figyelembe. Először: a humán mtDNS csak 16 kb méretű, ami a mag DNS-éhez képest igen kicsi. Másodszor, már láttuk, hogy az mtDNS és a nukleáris DNS variabilitása eléggé eltérő. Végül gondoljunk arra, hogy a genetikai változatosságot a sodródás csökkenti. Egy kisméretű populációban bekövetkező sodródás, amely 50 000 évvel ezelőtt történt, ugyanolyan mértékű variabilitás csökkenést eredményezhet, mint ami egy 200 000 évvel ezelőtt élt női őstől származtatható. Amikor a nukleáris DNS-ről hasonló információ áll rendelkezésünkre, reálisabb képet kaphatunk az ember evolúciójáról.



20.11. ábra. Négy különböző költőhelyről származó közönséges levesteknős mtDNS-ének fragmentjei SpeI restriktióval emésztve. A Venezuelából és az Ascension-szigetéről származó teknősök mtDNS-ének mintázata azonos, szemben a Hawaii-szigetéről és a Floridából származókéval

Forrás: Bowen, B. W., Meylan, Anne B. és Avise, J. C.: *An Odyssey of the Green Sea Turtle: Ascension Island Revisited*. Proceedings of the National Academy of Science, 86:573–576, 1989

MULTIGÉN CSALÁDOK

Számos gén, például az immunoglobulinok, a HLA gének, a hisztonok, az rRNS-ek és tRNS-ek génjei multigén családokban léteznek. A multigén családok olyan kópiái egy génnek, amelyek tandem duplikációval alakultak ki egy kromoszóma mentén (l. 4. fejezet). A multigén családokban a kópiák száma változhat a különböző egyedekben, és az egyenlőtlen crossing over folytán a családba tartozó gének száma csökkenhet, vagy növekedhet.

Az ember 16-os kromoszómáján van az α -globin gén két kópiája, rendszerint 3,7 kb távolságra egymástól. Az egyik vagy mindkét lokusz deléciója esetén az egyedben talasszémia, egy vérszegénységgel járó rendellenesség alakul ki. Az egyenlőtlen crossing over következményeként olyan gaméták is termelődhetnek, amelyekben három kópiája van az α -globin génnek. A 20.4. táblázat összesíti egy restriktióval végzett vizsgálat adatait három olyan populációban, amelyben a három kópiás α -globin talasszémia nagy gyakoriságú. Hét személyt találtak, akik heterozigóták voltak egy normál és egy három kópiás kromoszómára, de egyiküknél sem jelentkeztek a triplikáció klinikai tünetei.

Ahhoz, hogy megértsük, miért éppen egy bizonyos számú és miért éppen az adott típusú gének tartoznak egy géncsaládba, ismernünk kell a kialakulásukhoz vezető genetikai folyamatokat – az egyenlőtlen crossing over, a génkonverziót és a transzpozíciót. Ráadásul a multigén család méretét és szerkezetét befolyásolja a genetikai sodródás, a mutáció és a szelekció is. Tehát az általános kép meglehetősen összetett, de a genetikai folyamatok és a populációgenetikai tényezők együttesen magyarázatot adnak ezeknek a fontos szekvenciáknak az evolúciójára.

20.4. táblázat. Az α -globin gén egy- és háromkópiás változatának gyakorisága

Populáció	Az α -globin gének száma		
	1	2	3
Afrikai származású amerikai	0,16	0,836	0,004
Szardíniai	0,18	0,816	0,004
Ciprusi görög	0,07	0,88	0,05

A molekulák evolúciós változásai általában jól egybevágnak a neutralitás elvével, amely a genetikai sodródás és a neutrális mutáció együttes hatásán alapul. A DNS- és a fehérjeszekvenciák megváltozásai általában szabályos gyakorisággal következnek be, ezen alapul a molekuláris óra. A különböző fajok molekuláris szintű eltéréseit használják fel a fajok leszármazási viszonyait tükröző törzsfák megszerkesztéséhez. A törzsfajlódási kapcsolatok elemzésére az mtDNS is alkalmas.

A TERMÉSZETVÉDELEM GENETIKAI VONATKOZÁSAI

Évtizedeinkben az élőhelyek lerombolása, a vadászat és más okok miatt sok faj kipusztult, és sokakat fenyeget a kipusztulás veszélye. Vannak olyan állatfajok, például a kaliforniai kondor és a feketelábú nyest, amelyeknek csak fogságban maradt fenn néhány példányuk. A világ sok részén, így az Amazonas medencéjében is, a növény- és állatfajokban gazdag ökoszisztéma került veszélybe. A mezőgazdaságban jelentősen csökkent a kultúrában tartott állat- és növényfajták száma. Ezek a tények erősítik azokat a törekvéseket, hogy a fajokat és a fajok genetikai változatoságát fenntartsuk. A természetvédelmi genetika azon tényezők hatásait foglalkozik, amelyek a különböző fajok és fajták variabilitásának fenntartását szolgálják.

A TERMESZTETT NÖVÉNYEK

Régen sokféle, helyi viszonyokhoz alkalmazkodott fajtát termesztettek. A termesztésben lévő fajták száma egyre csökken, ami a génekészletek beszűkülésére vezet, mert a világ sok részén az újonnan nemesített, nagy terméshozamú fajtákkal váltották fel az ún. tájfajtákat. Egyes régiókban, a „zöld forradalom” során új fajtákkal váltották fel a rizs és a búza tájfajtáit. A nagy terméshozamú fajták sokszor nagyüzemi gazdálkodást, a műtrágyák és növényvédők szerek gépesített kijuttatását, nagyarányú alkalmazását igénylik. A helyi változatokat pedig már nem termesztik, mert a megfelelő terméshozamot csak igen munkáigényes termesztéssel tudják elérni. A helyi változatokban azonban sok-



20.12. ábra. Csöpenészedés a délvidéki levélfoltosságot okozó gombafertőzés másodlagos hatásaként. A betegség súlyosan károsította a kukoricát, amíg ellenálló fajtát nem nemesítettek

USA Mezőgazdasági Minisztérium engedélyével

szor olyan allélok vannak, amelyek az adott viszonyokhoz való jó alkalmazkodást biztosítják, megfelelnek a talajtípusnak, ellenállóak a betegségekkel és kártevőkkel szemben, tehát nagyon értékesek lennének új változatok nemesítéséhez. Sajnos, sok tájfajta kipusztult, és ma már csak a hozzájuk közeli vadon termő változatok lehetnek az előnyös allélok forrásai.

Ebből a fejlődésből két, egymással kapcsolatban álló jelenség következik. Először, a termesztett növények sérülékenyekké válhatnak bizonyos betegségekkel szemben, mert a hatalmas táblákon termesztett változat minden egyede homozigóta a rezisztencia allélokra. 1970-ben az Egyesült Államokban a termés közel 15%-a pusztult el levélfoltosságot előidéző gombafertőzése miatt (20.12. ábra A fertőzés másodlagos hatása a kukorica csövény). A katasztrófa elhárítása csak egy ellenálló fajta nemesítésével oldódott meg.

Az ilyen irányú tendenciák másik lehetséges következménye az, hogy az egész faj genetikai változatossága, amelyet a termesztett fajták, a csíraplazma- vagy maggyűjtemények, valamint vad ősök együttesen hoznak létre, lecsökkenhet. Többféle eljárást dolgoztak ki a termesztett növények genetikai változatosságának fenntartására. Az egyik eljárás az, hogy a genetikai változatosságot a tájfajták ún. *in situ* termesztésével őrzik, vagyis ott termesztik azokat, ahol kialakultak. A módszer nyilvánvaló előnye, hogy további adaptív változások is bekövetkezhetnek a meglévő genetikai variabilitás fenntartása mellett.

A másik megoldás a termesztett fajták és vad őseik magjainak összegyűjtése és megőrzése a fajtagyűjteményekben. A gyűjtemények létrehozásakor három alapvető szempontot kell figyelembe venni: a populációnként begyűjtendő magok számát, a mintapopulációk számát és a populációk eloszlását a faj elterjedési területén belül. Jelentős mértékű génáramlás esetén a helyi populációk eléggé hasonlóak lehetnek, míg a nagy arányban öntermékenyülő fajoknál a populációk lényegesen különböznek. Amennyiben a fajról nem áll rendelkezésre elegendő



20.13. ábra. Nemesített és vad paradicsomok változatossága

Dr. Raymond L. Clark, National Plant Introduction Station, Iowa State University engedélyével

információ, tanácsos a lehető legtöbb populációból mintát venni, a mintavétel eloszlását illetően pedig mind a faj felépítésére, mind a környezet heterogenitására ügyelni kell.

Akár tájfajták, akár vad rokonaik genetikai sokféleségét tesztelik, három fő tulajdonságcsoporthoz vizsgálják: ökonómiai vagy más metrikus bélyegeket, betegségekkel és kártevőkkel szembeni rezisztenciát, valamint mendeli öröklődést mutató morfológiai tulajdonságokat. Ezek a tulajdonságok, valamint a környezethez való adaptáció a mintavétel fontos szempontjai. Hasznosak lehetnek az elektroforetikus vizsgálatok is, mert az allélgyakorisági értékek eloszlása jellemezheti a populációk szerkezetét és segítheti a helyi populációk azonosítását. Azoknak a genotípusoknak az azonosításában is fontosak lehetnek, amelyek csak egy-egy populációban fordulnak elő.

A paradicsom (20.13. ábra) az egyik olyan termesztett növényünk, amelyen bemutathatjuk, milyen fontos a vad típusok genetikai változatossága. A paradicsom egy Dél-Amerikában, az Andok területén élő faj nemesítésével keletkezett. Európában viszonylag új termesztett növény, mivel állítólagos mérgező volta miatt (a burgonyafélék családjába tartozik) még a XX. század elején is elkerülték. Ma pedig hatalmas mennyiségben termesztik, és nagyobb hasznot hoz sok más zöldségféléknél.

A paradicsomfajtákban utóbbi évtizedekben sok fontos tulajdonság rögzült. Közéjük tartozik az az allél, amely a termés egyenletes érését biztosítja (nem marad zöld a kocsány környéke), egy másik allél a szár korlátozott növekedését alakítja ki. Bizonyos fajták géppel is jól betakaríthatók, mert a növények egyformán alacsony termetűek, terméshéjuk viszonylag vastag és a termés egyszerre ér be.

A vad paradicsomfajok széles körű változatosságának is van potenciális termesztési jelentősége. Az egyik faj mindössze 5 méterrel él a Galápagos-szigeteken a dagályszint fölött. Mivel képes elviselni a tenger felől jövő sós permetet is, reményteljes génforrás olyan fajta nemesítéséhez, amely a sós vízzel való öntözést is kibírja. Egy másik faj Peru rendkívül

száraz területein él, és vízszükségletének legnagyobb részét a levegő páratartalmából vagy a ködből szerzi. Extrém módon tűri a vízhiányt, ami nagyon hasznos lehet egy öntözéses fajtánál.

A BELTENYÉSZTÉSES LEROMLÁS

A 19. fejezetben tárgyaltuk, hogy a beltenyésztés növeli a homozigóták arányát és csökkenti a heterozigótákét. Ezért, ha a recesszív homozigóták rátermettsége alacsonyabb, a recesszíven öröklődő rendellenességek és hátrányos tulajdonságok gyakorisága nő, ami azt jelenti, hogy a populáció rátermettsége is csökkenhet. Ez a hatás kis egyedszámú veszélyeztetett fajok esetében különösen káros.

A beltenyésztés és a szelekció együttes hatásának megértéséhez vizsgáljuk meg a vérrokonok házaságából származó egyedek között a recesszíven öröklődő betegségek megjelenését. A beltenyésztés miatt nő a homozigóta recesszívek aránya, tehát a recesszív betegségek előfordulási aránya is. A hatás genetikai hátterét megvilágítja, ha összehasonlítjuk a recesszív homozigóták arányát egy véletlenszerűen párosodó ($R = q^2$) és egy beltenyészéssel is szaporodó, ($R_f = q^2 + fpq$) populációban:

$$\begin{aligned} \frac{R_f}{R} &= \frac{q^2 + fpq}{q^2} \\ &= \frac{q + fp}{q} \end{aligned}$$

A tört értéke bármely allélgyakoriságnál nagyobb egynél, és kis recesszív allélgyakoriságnál nagyon nagy. Ha például $f = 1/6$ (az első unokatestvérek házaságánál szereplő beltenyészési koefficiens) és $q = 0,01$ (mint az albinizmusnál), akkor:

$$\begin{aligned} \frac{R_f}{R} &= \frac{0,01 + (0,0625)(0,99)}{0,01} \\ &= 7,2 \end{aligned}$$

Vagyis hétszer annyi érintett egyed van a beltenyészített csoportban, mint a véletlenszerűen párosodóban. Ha $q = 0,001$, mint sok ritka betegség esetében, az arány 63 lesz, ami jól illusztrálja, miért van olyan sok recesszíven öröklődő rendellenességben szenvedő utód a rokonházaságokban.

Mivel a káros recesszív allélokra homozigóta egyedek aránya a beltenyészített populációban magasabb lehet, a populáció átlagos rátermettsége csökkenhet. A populáció rátermettségének csökkenése a **beltenyésztes leromlás**. A leromlás jelensége általánosnak tekinthető, de különböző szervezeteknél más és más. A japán fűrjénél három generáció testvérpárosítás a reprodukív fitness teljes elvesztését eredményezi. Sok részleges öntermékenyüléssel szaporodó növényfaj rátermettsége viszont alig csökken a beltenyészítés során.

Vizsgáljuk meg, hogyan hat a beltenyészítés a populáció átlagos rátermettségére! Tegyük fel, hogy a szelekció miatt az A_1A_1 , A_1A_2 és A_2A_2 genotípusok relatív rátermettsége rendre 1,

1, illetve $1-s$. Ha a beltenyészítésre megadott genotípus gyakoriságokat használjuk (l. 19. fejezet), az átlagos rátermettség:

$$\begin{aligned} w &= (1)(p^2 + fpq) + (1)(2pq - 2fpq) \\ &\quad + (1-s)(q^2 + fpq) \\ &= 1 - sq^2 - sfpq \end{aligned}$$

A kifejezés kifejtésénél felhasználtuk, hogy $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Véletlenszerűen párosodó populáció átlagos rátermettsége recesszív allélra ható szelekció esetén $1 - sq^2$ (l. 19. fejezet), tehát a beltenyészítés miatt a csökkenése $sfpq$. A képletből láthatjuk, hogy a beltenyészítési koefficiens növekedésével a rátermettség lineárisan csökken (a beltenyésztes leromlás nő), amit az ecetmuslicán, emberen és más fajokon végzett vizsgálatok is alátámasztanak.

Sokan, akik veszélyeztetett fajokat neveltek fogságban, egészen az utóbbi időkig nem gondoltak arra (vagy nem tartották fontosnak), hogy a rátermettség a beltenyészítés következtében csökken. Ennek egyik oka az, hogy a közelmúltig kevés törzskönyv és egyéb információ állt rendelkezésre az állatkertekben tenyésztett állatok származási kapcsolatairól. Kathy Ralls és Jon Ballou a National Zoo-ban végzett családfavizsgálataik során kimutatták, hogy a beltenyészítés miatt az utódok pusztulási aránya közel kétszerese a nem beltenyészítettékének. A 20.5. táblázat nyolc emlősfaj fiatalkori halálózási rátáját tartalmazza, viszonylag nagyszámú beltenyészített és nem-beltenyészített utód adatai alapján. A legalacsonyabb halálózási rátát a degu, a legmagasabbat a szőke oroszlánmajom (20.14. ábra) esetében tapasztalták. Mindegyik fajnál magasabb a beltenyészített mortalitása, és hatnál szignifikáns a különbség.

A veszélyeztetett fajok fenntartásakor egy sor kedvezőtlen evolúciós esemény bekövetkezésére is számítani kell. A beltenyészítés miatt fellépő fitness csökkenés mellett a nem megfelelő szelekció olyan állatok kitenyésztéséhez vezet, amelyek jobban adaptálódtak a fogsághoz, mint a természetes körülményekhez. Szelíd és könnyen kezelhető állatok alakulnak ki,

20.5. táblázat. Fiatalkori halandóság nem-beltenyészített és beltenyészített populációkban

	Fiatalkori halandóság	
	Nem-beltenyészített	Beltenyészített
Degu	0,106	0,235*
Elefántorrúccikány	0,153	0,233
Törpevíziló	0,245	0,549*
Gepárd	0,263	0,442*
Gazella	0,280	0,595*
Japán gorál	0,288	0,565*
Óriás fülesmaki	0,308	0,386
Szőke oroszlánmajom	0,501	0,634*

* $p < 0,05$



20.14. ábra. Szőke oroszánmajom. Beltenyésztés hatására a fajon belül növekszik a halandóság

© Michael Dick/Animals Animals/Earth Scenes

amelyek azonban nem ellenállóak a természetes környezetükben fellépő betegségekkel és a parazitákkal szemben. Az ilyen állatok nem képesek életben maradni sem a természetben, sem a rezervátumokban. A fogságban élő és szaporodó állatok körében a beltenyésztés, illetve az alapító hatás következtében gyakrabban jelenhetnek meg öröklődő betegségek. A mesterségesen fenntartott szőke oroszánmajom populáció például a befogott 51 egyed utódjaiból áll, és gyakori közöttük az örökletes rekeszizomsérv.

A GENETIKAI VÁLTOZATOSSÁG ELVESZTÉSE

A fogságban élő populáció mérete szükségszerűen kicsi (körülbelül 100 bengáli tigris lehet az Egyesült Államok állatkertjeiben), ezért a fellépő genetikai sodródás következményeként a variabilitás csökkenhet, vagy káros allélok fixálódhatnak. Legjobban akkor érthetjük meg a sodródás hatására fellépő variabilitás csökkenést, ha megvizsgáljuk a heterozigócia alakulását generációról generációra véges populációméret mellett. Az alábbi képlet alapján megjósolható a változás:

$$H_1 = \left(1 - \frac{1}{2N}\right) H_0$$

ahol H_0 a kezdeti heterozigócia, H_1 a heterozigóták aránya egy generáció múltán, N az egyedszám. Ha $N = 50$, akkor

$$H_1 = 0,99 H_0$$

Vagyis a genetikai sodródás hatására a heterozigócia 1%-kal csökken egy generáció alatt.

A fogságban tartott állatok esetében általában a genetikai változatosság csökkenésével kell számolni hosszabb időtartam alatt. Több generációra a következő képletet alkalmazhatjuk:

$$H_t = \left(1 - \frac{1}{2N}\right)^t H_0$$

20.6. táblázat. A kezdeti heterozigócia megmaradt hányada 100 év után

A populáció mérete	Generációs idő (években)			
N	1	2	5	10
10	0,01	0,08	0,36	0,60
50	0,37	0,61	0,82	0,90
250	0,82	0,90	0,96	0,98

ahol t a generációk száma. Ha egy veszélyeztetett antilopfaj esetében a generációs idő két év, akkor 100 év alatt közel 50 generációval számolhatunk. Ha a fennmaradt populáció egyedszámát is ötvennek vesszük, akkor ötven generáció alatt:

$$H_{50} = \left(1 - \frac{1}{100}\right)^{50} H_0 \\ = 0,61 H_0$$

Tehát a heterozigócia a kiindulásnak mindössze 61%-a. A 20.6. táblázatból leolvasható, hogy három különböző populációméret és négy különböző generációs idő kombinációja 100 év alatt milyen heterozigócia értékeket hozhat létre. Ahhoz, hogy az eredeti variabilitás 90%-a fennmaradjon 100 év múltán is, a két év generációs idejű szervezet populációjának 250 egyedből kellene állnia. Hosszabb generációs idő mellett az egyedszám kisebb is lehet. Ezek az értékek az optimális helyzetet tükrözik, és nem tartalmazzák azokat a hatásokat (pl. egy súlyos betegség) amelyek a populáció egyedszámát drasztikusan csökkenthetik.

Elméletben a fogságban tartott állatok genetikai változatosságának csökkenése ellensúlyozható azzal, hogy rendszeresen vad állatokat visznek a tenyésztésbe. Ez azonban sokszor megoldhatatlan, mert vagy nincs mód vadon élő példányokat befogni, vagy nem szaporodnak fogságban. A genetikai sodródás kiküszöbölésének másik lehetősége az egyedek, illetve a szaporítóanyag (petesejtek és spermium) cseréje állatkertek között. Ez a mesterséges génáramlás késleltetheti a variabilitás csökkenését, de csak rövid távon. A veszélyeztetett fajok eredményes védelme átfogó populációgenetikai ismereteket igényel, különös tekintettel a genetikai sodródás, a szelekció és a beltenyésztés kérdéseire.

A természetvédelem genetikai kérdései közé tartozik a természetű növények és a tenyésztett állatok, valamint a ritka és veszélyeztetett fajok genetikai változatosságának fenntartása. A beltenyésztéses leromlás a populáció átlagos rátermettségének csökkenését jelenti a beltenyésztés következtében. A fogságban tartott populációkban erős genetikai sodródás hatására a genetikai variabilitás elveszhet.

ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS NÖVÉNYNEMESÍTÉS

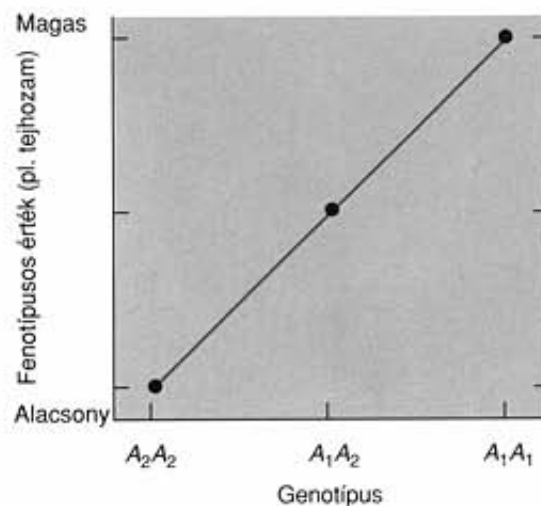
A populációgenetika alapelvei széles körben alkalmazhatók új állat- és növényfajták nemesítésekor és lehetővé teszik a nemesítés során bekövetkező változások megértését és előrejelzését. A nemesítő a kívánt típusok kiválogatásával megváltoztatja a populációban a fenotípusok gyakoriságát. A nemesítési szempontból fontos tulajdonságok között vannak olyanok, amelyeket csak egy vagy néhány gén határoz meg és olyanok is, amelyek háttérben szó szerint gének százai állnak. A betegségekkel szembeni ellenálló képesség általában az első csoportba, a termés mennyiségét meghatározó gének inkább a második csoportba tartoznak. A szelekció mellett a beltenyésztést is alkalmazzák a kívánt tulajdonságokkal rendelkező vonalak előállítására, a mesterséges génáramlással pedig új allélokat visznek be a tenyésztésbe. A genetikai sodródás gyakran gondot okoz a tenyésztésben, mert hatására a kedvező allélok véletlenszerűen elveszhetnek, a kedvezőtlen allélok gyakorisága pedig növekedhet. A következő fejezet részben a mesterséges szelekció, a beltenyésztett vonalak és a heterózis kérdését tárgyaljuk, bemutatjuk, hogyan alkalmazzák a populációgenetika alapelveit a növénynemesítésben és az állattenyésztésben.

A MESTERSÉGES SZELEKCIÓ

A kiválasztott tulajdonságok gyakoriságának növelése a populációban általában **mesterséges szelekcióval** történik. Azokat az egyedeket választják ki szülőkné a következő generációhoz, amelyek legközelebb állnak az ideálisnak tekintett fenotípushoz. Ahogyan a 3. fejezetben tárgyaltuk, a mesterséges szelekcióra kapott válasz a tulajdonság heritabilitásának és a szelekciós differenciának (a továbbtenyésztésre kiválogatott szülők és a teljes szülői populáció fenotípusos átlagának különbsége) a szorzata. Amikor a heritabilitás nagy (a fenotípusos különbségek genetikailag meghatározottak) és a szelekciós differenciál is nagy, a nemesítés gyorsan halad.

Az irányító szelekció megnöveli azoknak az alléloknak a gyakoriságát, amelyek a kívánt fenotípus javára változtatják meg a fenotípusok eloszlását. Tételizzük fel, hogy az A -gén szerepet játszik egy gazdaságilag fontos tulajdonság kialakításában, mondjuk a szarvasmarhák tejhozamának meghatározásában. A 20.15. ábra az A -gén A_1 és A_2 alléljainak hatását ábrázolja a fenotípusra. A konkrét példában az A_1A_1 genotípusú a legmagasabb fenotípusos érték, ezért a mesterséges szelekció végül az A_1 allél gyakoriságát növeli, elméletileg a fixálódásig.

Sok generációs mesterséges szelekció után, gyakran tapasztalható a **szelekciós határ** megjelenése, amelyen túl a szelekció nem képes a fenotípusos érték további megváltoztatására. A 20.16. ábra konkrét kísérletet mutat be, amelyben két irányban folytattak szelekciót: az alacsony, illetve a magas fenotípusos értékekre is. Richard Roberts a hathetes korban mért testsúlyra szelektált egereket, és azt tapasztalta, hogy az alacsony értékeknél a szelekciós határ 10 és 15 gramm között jelentkezett. Nagy



20.15. ábra. Egy gén alléljainak a hatása a tejhozam fenotípusos értékeire. A bemutatott példában az A_1A_1 genotípus adja a legmagasabb tejhozamot

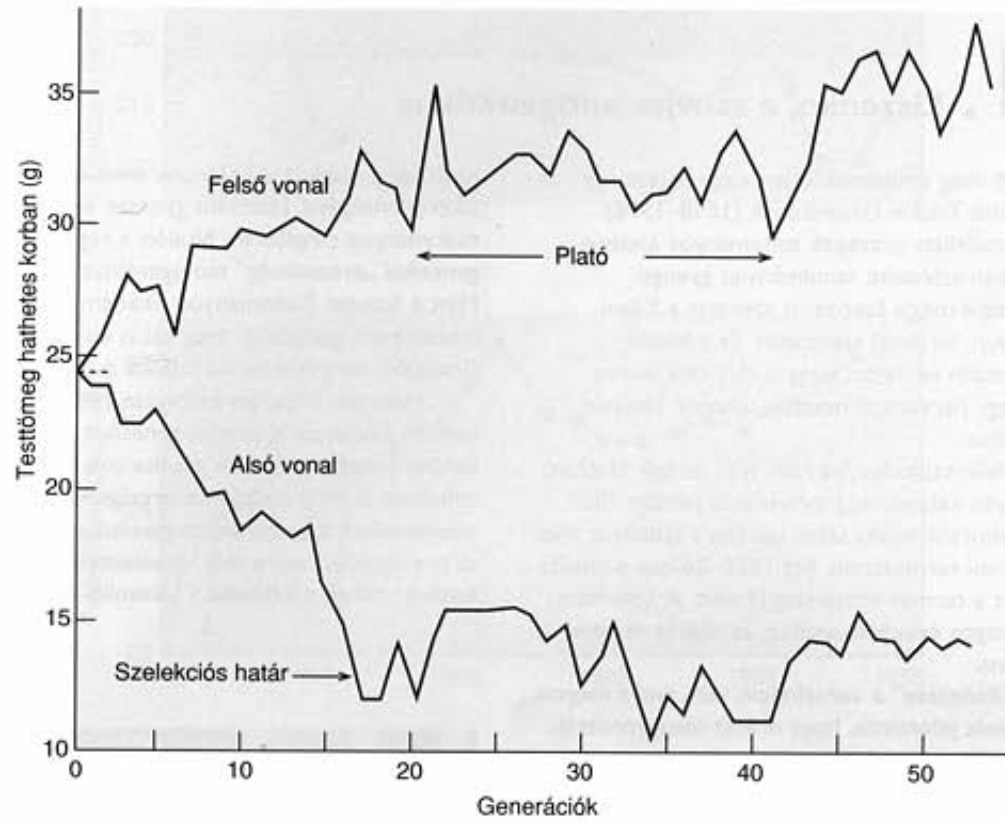
testsúly esetén a plató kicsivel 30 gramm fölött volt sok generáción keresztül, majd váratlanul a 40–45. generációnál újabb, 35 grammos határérték alakult ki.

A szelekciós határ kialakulásának számos oka van. Lehetséges, hogy megszűnt a genetikai változatosság a populációban, mert az összes kívánt allél fixálódott. Az is lehetséges, hogy a szélsőséges fenotípusú egyedek, például a nagyon nagy termetű állatok termékenysége vagy életképessége csökkent.

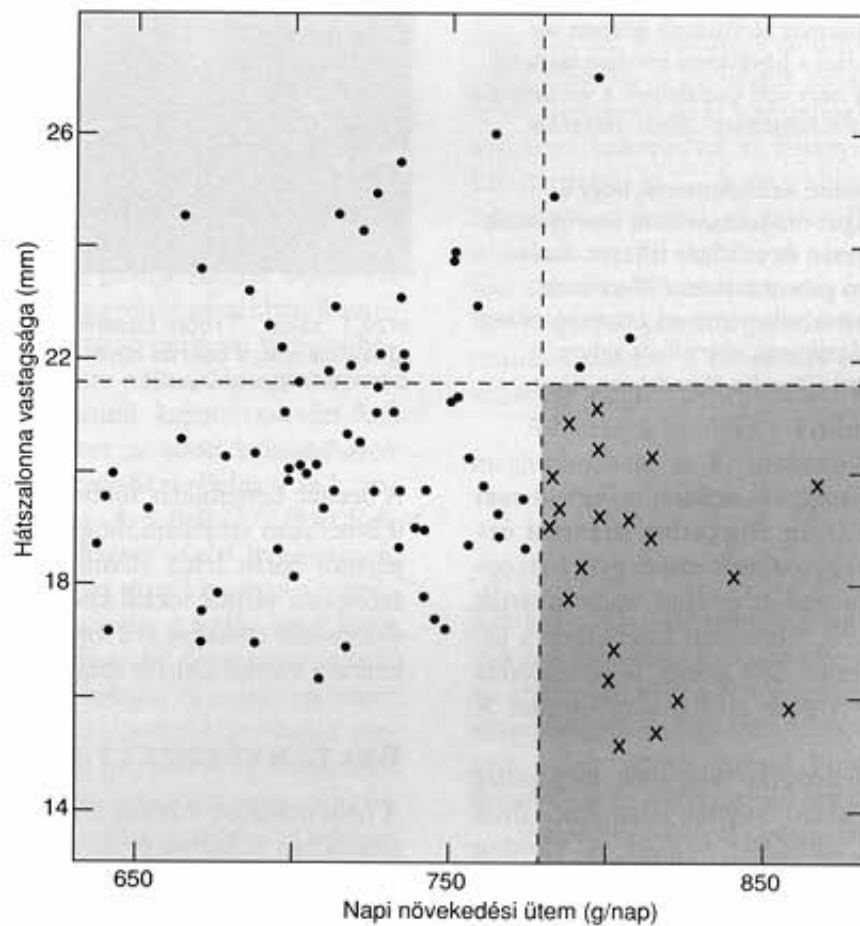
A szelekciós határ elérésének problémája megszűnik, ha új genetikai variabilitás lép fel. Például a kedvező irányba ható mutáció, vagy pedig a kedvező és kedvezőtlen gének közötti rekombináció lehetővé teheti, hogy a szelekció tovább működjék. Az egerek testsúlyára végzett szelekciós kísérletben a 30 grammos határról a 35 grammra való emelkedés valószínűleg mutáció, vagy rekombináció következménye (20.16. ábra).

Másik lehetőség, hogy új allélokat viszünk át egy másik tenyésztésből a kiválogatott populációba. Az így létrejövő mesterséges génáramlás rendszerint olyan új allélokat visz be, amelyek kezdetben csökkentik a fenotípusos értéket, de olyanokat is, amelyek növelik azt. Emiatt kezdetben csökkenés tapasztalható a fenotípusos értékekben, majd az új és a régi kedvező allélok együttesen kialakítják a jobb tulajdonságokkal rendelkező típust. A 15. fejezetben megismert molekuláris genetikai technikák lehetőséget adnak arra, hogy kizárólag a kedvező allélokat vigyék át a populációba.

Egy szelekciós programban gyakran több tulajdonság is gazdasági jelentőséggel bír. Egy sertés tenyésztési programban például mind az átlagos napi tömeggyarapodása, mind a hátszalonna vastagsága fontos tulajdonság (az utóbbi a test zsírtartalmát mutatja). A 20.17. ábra a két tulajdonság együttes megjelenését mutatja be 100 állat esetében. A tenyésztés célja a napi növekedési ütem emelése, a zsírtartalom csökkentése, ezért a „legjobb” egyed az ábra jobb alsó négyzetében található: a hátszalonna vastagsága 16 mm-nél kisebb, napi súlynövekedése 856 g. A tenyésztési program folytatásához a



20.16. ábra. Kétirányú szelekciós kísérlet egerek testtömegére. Az alsó vonal a 13 g-os határértéket tizenhét generáció után érte el, míg a felső vonal 32 g-os átmeneti platót produkált tizenhárom generáció után



20.17. ábra. Száz sertés napi növekedési rátájának és hátszalonna vastagságának együttes vizsgálata. A leggyorsabb növekedési rátájú és legvékonyabb hátszalonnájú húsz sertés jele X, a többi állaté pont

20.1. Lizenko, a szovjet antigenetikus

V alószínűleg nem volt még embernek olyan nagy hatása egy ország tudományára, mint Trofim Lizenkónak (1898–1976) a Szovjetunió és más szocialista országok tudományos életére. Lizenko parasztcsaládban született, tanulmányait gyenge eredménnyel kezdte, végül mégis fokozatot szerzett a Kijevi Mezőgazdasági Intézetben, levelező tagozaton. Ez a háttér tökéletesen beleillett Sztálin terveibe, hogy a cári idők koros specialistáit munkás- vagy parasztszármazású, újonnan képzett személyekkel helyettesítse.

Lizenko szakmai felkészültsége hiányos volt, és sok kísérleti eredménye a tudományos kalandorság nyilvánvaló példája. Első kísérletében takarmányborsót vetett télen azokba a táblákba, ahol tavasztól gyapotot akartak termesztetni. Ezt 1925–26-ban próbálta ki, és az ényhe tél miatt a termés viszonylag jó volt. A kísérletet nem ismételték meg átlagos években, amikor az eljárás teljesen használhatatlan lett volna.

Lizenko egyik „felfedezése” a vernalizáció volt, ami a magvak csíráztatás előtti kezelését jelentette, hogy érését meggyorsítsák. Javaslatára a búza és egyéb gabonafélék magjait több napig áztatták vetés előtt, hogy megvédjék a növényeket a későbbi aszály hatásától. A vernalizáció sok technikai problémát és többletmunkát jelentett, és gyakran csökkentette a terméseredményeket.

Sztálin személyi kultuszt alakított ki, és kész volt elpusztítani azokat, akik nem értettek vele egyet. Lizenko ezzel összhangban a tanai elleni kritikát a kommunizmus bírálatainak állította be. Egyik 1935-ös beszédében például a következő kérdést tette fel: „Mondjátok meg elvtársak, hát nem volt osztályharc a vernalizáció frontján?” A beszéd végén Sztálin felkiáltott: „Éljen, Lizenko elvtárs, éljen!”

Lizenko ennél is továbbment, és kijelentette, hogy a növények öröklődő tulajdonságait módosítani lehet környezetük megváltoztatásával. Természetesen ez az állítás teljesen összeegyeztethetetlen volt a modern genetikával és a 30-as évek kiemelkedő szovjet genetikusainak véleményével. Lizenko nézete viszont tökéletesen megfelelt Sztálinnak, mert illett ahhoz, ahogyan ő akarta megváltoztatni a szovjet társadalmat, és

megoldást ajánlott a kolhozok évek óta tartó gazdasági sikertelenségére. Lizenko gyorsan emelkedett a szovjet tudományos ranglétrán, bírálót a régi Mendel–Morgan-féle genetikai „eretnység” támogatóinak kiáltotta ki és üldözte őket. Mint a Szovjet Tudományos Akadémia Genetikai Kutatóintézetének igazgatója, még azt is elrendelte, hogy az összes *Drosophila*-tenyésztet forralással pusztítsák el!

Lizenko erőteljes befolyása 1964-ig, Hruscsov bukásáig tartott. Nemcsak a szovjet genetikát sikerült megsemmisítenie három évtizedre, hanem gátolta sok más tudományterület haladását is. Más szocialista országok, például Kína, szintén elszennvedtek a tudományos gondolkodás elnyomását. Ezekben az országokban mára már újraéledtek a genetikai kutatások, de lassú és nehéz a kilábalás a Lizenko-korszakból.



M20.1. ábra. Trofim Lizenko bemutatja a kolhozparasztoknak új találmányát, a bokros búzát
© SOVFOTO/Eastfoto Agency

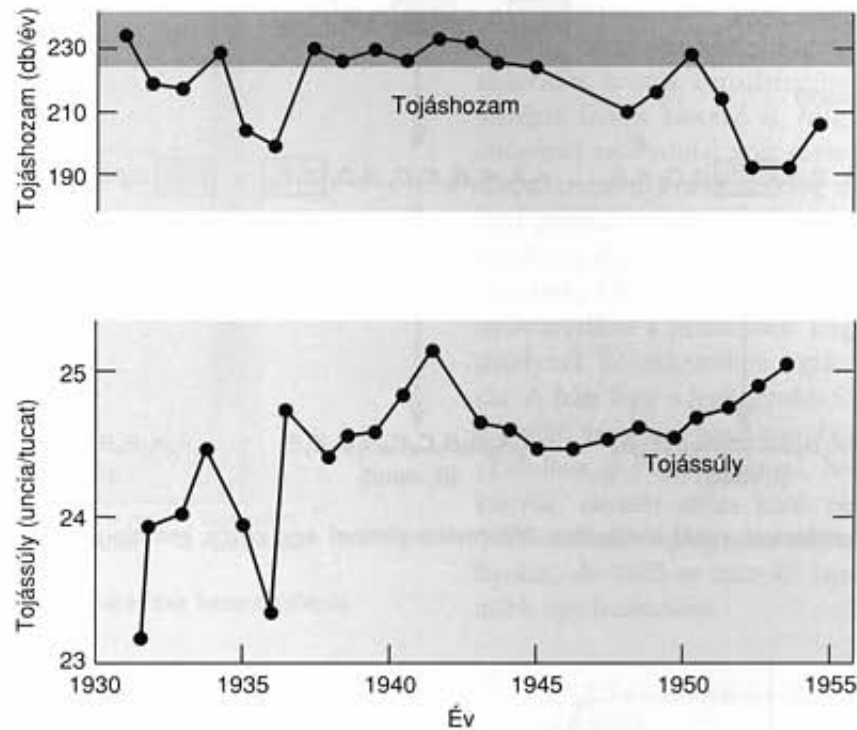
hús legjobb állatra van szükség. A szükséges egyedszám megállapításának egyik módja az ún. **független kizárási érték** megállapítása. Eszerint az egyedeknek mindegyik bélyegre nézve el kell érniük egy megadott értéket, vagy kizárják őket a további tenyésztésből. Az ismertetett kísérletben a kizárási érték a növekedési ütemre 780 g/nap, a hátszalonna vastagságára pedig 21,4 mm. A hús kiválasztott egyedek X jelöli a 20.17. ábrán.

Abban az esetben, ha a tenyésztés célja több tulajdonság bizonyos kombinációja, a szelekció nagyon lelassulhat. Ilyen hosszú időtartamú szelekciós kísérletet végzett el Gordon Dickerson, amikor Leghorn csirkék tizenegy tulajdonságát vizsgálta. Hús évén át szelektálta a csirkéket életképesség, tojáshozam, tojássúly, bevézésmentesség, és másik hét tulajdonságra.

A becsült heritabilitás több tulajdonság esetében nagyobb volt 0,2-nél, ami azt jelenti, hogy hosszú időn át végzett szelekcióval jelentős hatást lehet elérni. A szelekció hatására kapott válasz azonban a vártnál sokkal kisebb volt. A tojáshozam például a kísérlet során csökkent és a tojások súlya is kisebb mértékben emelkedett a vártnál (20.18. ábra).

BELTENYÉSZTETT VONALAK

A beltenyésztett vonalak a növénynevelésben, az orvosi kutatásokban és bizonyos mértékig az állattenyésztésben is hasznosak, mert az egyedek ismert tulajdonságaikra nézve genetikailag egyformák. Az új gyógyszerek és gyógyászati eljárások vizsgálatára beltenyésztett egér- és patkánytörzseket használ-



20.18. ábra. A tojáshozam és a tojás súlyának változása tizenegy bélyegre vonatkozó hosszú időtartamú szelekciós kísérletben

Forrás: Dickerson, G. E.: Genetic Slippage in Response to Selection for Multiple Objectives. in: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 20:213–244., 1955. © Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.

nak, amelyeket több mint száz generáción át testvérek közötti párosításokkal állítottak elő.

Mi a genetikai következmény, ha a növények ismételt öntermékenyítéssel szaporodnak, vagy az állatokat generációról generációra testvérek közötti párosításokkal szaporítják? Ahogy azt a 19. fejezetben tárgyaltuk, a folyamatos beltenyésztes következtében homozigócia lép fel a vizsgált lokuszokon. Tegyük fel, hogy egy $A_1A_2B_3B_3C_2C_2D_2D_2E_3E_3$ genotípusú egyed öntermékenyítés során létrejött három utódja három beltenyészített vonal kiindulási pontja (20.19. ábra). Az utódok már egy generáció után is nagyobb mértékben homozigóták, mint a szülők, és több generáció múltával teljesen homozigótákká válnak a vizsgált génekre nézve. Ha egy csoport, genetikailag azonos egyedeket akarunk kapni, csak azt kell tennünk, hogy kiemelünk egyedeket az adott beltenyészített vonalból, és egymás között szaporítjuk őket. Például az I. vonal esetében ezeknek a genotípusa $A_1A_1B_3B_3C_2C_2D_2D_2E_3E_3$ lesz. Az ábrán szereplő mindhárom vonal fenntartható, de a legtöbb esetben sok beltenyészített törzs kipusztul a termékenység vagy az életképesség csökkenése, a letális vagy káros allélok fixálódása miatt. Ha példánkban a C_2C_2 genotípus letális lenne, az I. vonal kipusztulna. Douglas Falconer egereken végzett kísérlettel vizsgálta ezt a jelenséget. Húsz vonalat tartott fenn testvérkeresztezésekkel. Öt generáció után már csak a vonalak fele maradt meg és tizenkét generáció után már csak egy túlélő vonal volt (20.20. ábra). Húsz generáció elteltével (amikor a kísérletet befejeződött), ez a vonal még létezett, és az alom mérete, a beltenyésztes kezdete előtti értéknek megfelelően, nyolc körül volt.

A HETERÓZIS

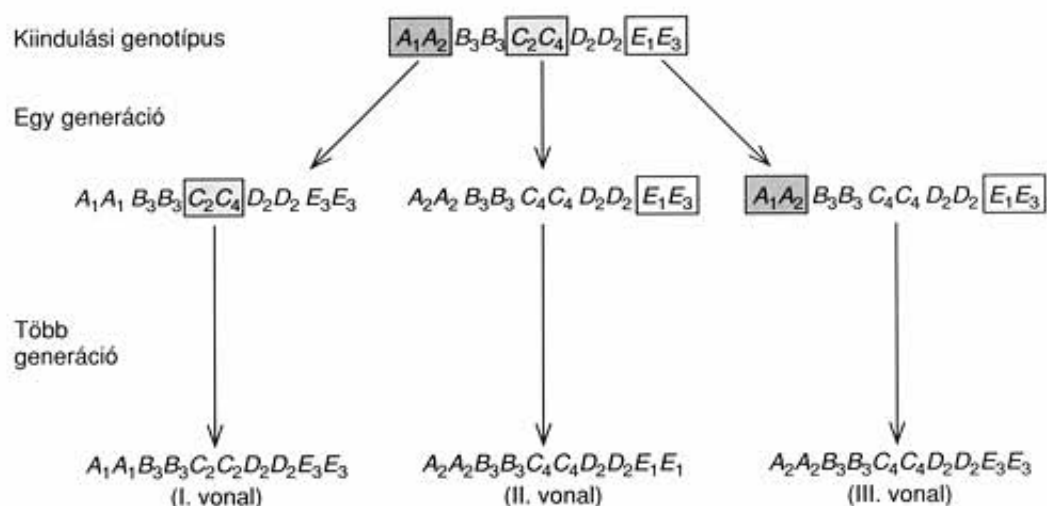
Már Mendel munkássága előtt hosszú idővel sokan észrevették, hogy különböző változatok keresztezésekor növekszik a növények életképessége és terméshozama. Darwin is végzett néhány kísérletet kukoricával és feljegyezte: „Az első és legfontosabb következtetés az ..., hogy a kölcsönös megtermékenyítés általában jótékony hatású, az öntermékenyítés pedig káros.” Két, főként kukoricával foglalkozó genetikus, George Shull és Edward East szintén a beltenyésztes súlyos következményeit és a kölcsönös megtermékenyítés pozitív hatásait figyelte meg a kukorica terméshozamára. A **heterózis** az F_1 generáció hozamának növekedése a szülői beltenyészített vonalakéhoz képest.

A heterózis mértéke – a **hibrid vigor** közeli szinonimája – meghatározható az F_1 nemzedék és a szülők termésátlagának vagy más tulajdonságának különbségéből:

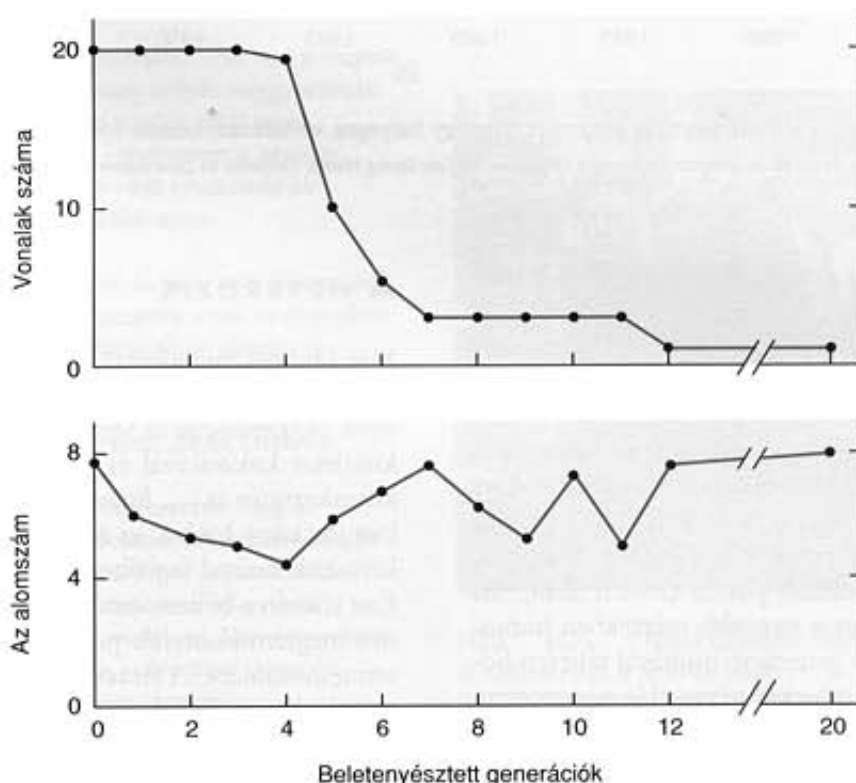
$$H = F_1 - \frac{1}{2}(P_1 + P_2)$$

Két kukoricavonal terméshozamának átlaga például 1742 liter volt hektáronként, az F_1 -é pedig mintegy 8797 l. A heterózishatás eredményeként a terméshozam növekedése kb. 7055 l hektáronként. Ma az Egyesült Államok kukoricatermelésének csaknem teljes egésze hibrid kukoricából származik, hogy a heterózishatást a legnagyobb mértékben kihasználhassák.

Az utóbbi években a piacra tenyésztett állatok is inkább hibridok, mintsem fajtatiszták. Bár az ún. törzsek nem tökéletes beltenyészített vonalak, a szelekció miatt elég nagy a homozigóták aránya. Ha például megvizsgáljuk a borjak elválasztási súlyát a fajtiszta



20.19. ábra. Három beltenyésztett vonal kialakulása öntermékenyítéssel egy közös genotípusból. A heterozigóta lokuszok színekkel jelöltek

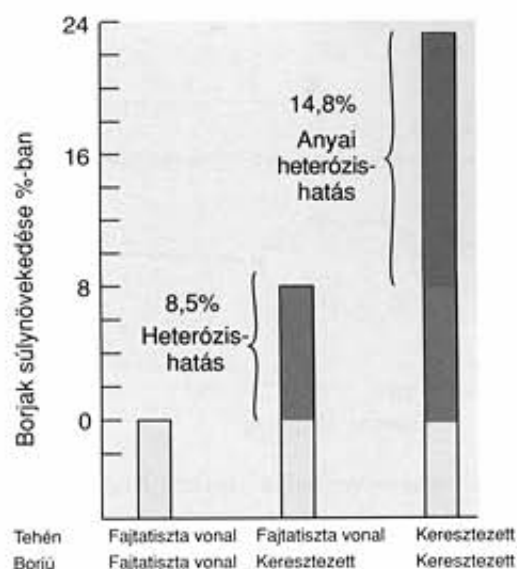


20.20. ábra. Hús egértörzzsel végzett beltenyésztési kísérlet. A grafikon a túlélő vonalak számát, illetve az alomszám alakulását mutatja folyamatos testvérpárosítás esetén

tenyésztésű Hereford, Angus és Shorthorn szarvasmarhák esetében, valamint hibridjeiknél, akkor 8,5% heterózishatás mutatható ki, ami viszonylag kicsi, de gazdaságilag fontos különbség (20.21. ábra).

Ha pedig két fajta keresztezéséből származik az anyaállat, és a borjak apja egy harmadik fajtához tartozik, még további 14,8%-os növekedés érhető el a (Hereford × Angus) × Shorthorn keresztezésben. Az anyai heterózishatás alapvetően fontos, mert a nagy termetű F_1 anyaállat képes igazán nagy termetű utódokat világra hozni.

Mi a heterózishatás genetikai háttere? A kérdés évtizedekig vitatott volt és csak az utóbbi időben körvonalazódik a megegyezés. Kezdetben sokan úgy vélték, hogy a heterózishatást egyes lokuszokon a heterozigóták előnye okozza. Ma már általánosan elfogadott, hogy a beltenyésztés (vagy a szelekció) a vonalak vagy törzsek szétválásához és bizonyos káros allélok véletlen fixálódásához vezet. Mivel a kedvező vagy vad típusú allélok általában dominánsak, és ezek más vonalakban jelen lehetnek, hatásuk érvényesül a különböző vonalak keresztezésekor az utódokban, ami heterózishatáshoz vezet.



20.21. ábra. Borjak súlyának növekedése heterózishatás következtében

Forrás: Cundiff, L. V., Gregory, K. E. és Koch R. M.: *Effects of Heterosis in Hereford, Angus, and Shorthorn Rotational Crosses*. Beef Research Program Progress Report No. 1 (ARM-NC-21), Hruska, Roman L., U.S. Meat Animal Research Center, Nebraska

A PESZTICIDREZISZTENCIA

A peszticidrezisztencia gyors kifejlődése a sárgalázat terjesztő szúnyogokban, a burgonyabogárban, a vándorpatkányban, a disznóparéjban és számos gyomnövényben a populációgenetika alapese. A rezisztenciát okozó géntípus mutációval keletkezik, majd elterjed más populációkban is a szelekció és a génáramlás révén. Ahhoz, hogy a különböző kártevőket peszticidekkel kordában tartjuk, ismernünk kell a populációgenetika alapjait, illetve, ha rezisztencia lép fel, számolni kell a védekezés sikertelenségével. (Remélhetőleg olyan módszereket is kifejlesztünk majd, amelyekkel megvédehetjük a környezetet a mérgező peszticidektől.)

A termesztett növényeket mindig is fenyegették rovarok és egyéb kártevők, de a modern agrotechnika olyan környezetet teremtett, amelyben a hatékony növényvédelem nélkülözhetlenné vált. A monokultúrák miatt a kártevők és a betegségek könnyen terjednek növényről növényre, vagy egyik tábláról a másikra. Egy-egy növényből csak néhány fajtát termesztünk, ami lecsökkenti a genetikai variabilitást, így a kártevők teret nyerhetnek. Hasonlóképpen a rovarok és más állati vektorok által terjesztett emberi fertőző betegségek is több problémát okoznak, mivel a városokban nagy tömegek élnek együtt.

A II. világháború után szintetikus szerves vegyületeket vettek be a mezőgazdasági kártevők és a betegségeket terjesztő rovarok ellen. A peszticidek erőteljesen fokozták a terméshozamokat, és sok betegséget visszaszorítottak. Emellett olcsók voltak, ezért gyorsan felváltották a többi védekező módszert. Mára azonban a peszticidek intenzív alkalmazása durván megváltoztatta a biológiai környezetet, nagymértékben megritkította, vagy akár ki is pusztította azokat a ragadozó vagy parazita fajokat, amelyek eredetileg segítettek a kártevők egyedszámának szabályozásában.

A peszticidekre adott evolúciós válasz tanulmányozása kimutatta, hogy sok kártevő igen gyorsan képes a rezisztencia kialakítására, köztük a maláriaszúnyog és sok, mezőgazdasági szempontból fontos kártevő is. Míg 1969-ben 15 maláriát terjesztő *Anopheles* szúnyogfaj volt rezisztens a DDT-re, 1976-ban már 43 rezisztens fajt találtak. Még szomorúbb az a tény, hogy a malária gyorsan terjed sok olyan területen, ahonnan korábban már majdnem eltűnt. 1977-ben Indiában huszonegy millió esetet jelentettek, 1969-ben pedig mindössze félmillió! Ez a tendencia nyilvánvalóan a peszticidek kiterjedt alkalmazásával függ össze, amelynek következtében ugrásszerűen növekedett a rezisztencia. A házi légy a legnagyobb földrajzi elterjedéssel rendelkező, többféle vegyi anyaggal szemben ellenálló faj, de a lisztbogarak (*Tribolium sp.*) egyik genusa, hét rágcsálófaj, köztük két patkányfaj, szintén széles körű peszticid rezisztenciát mutat. Az 1970-es évek végéig nem találtak a gyomirtó szerekre ellenálló fajokat, de 1985-re már 48 fajnál fejlődött ki rezisztencia legáltalább egy herbicidre.

A PESZTICIDREZISZTENCIA FONTOS TÉNYEZŐI

A peszticidrezisztencia evolúcióját számos tényező befolyásolja. Az egyik alapfeltétel, hogy a kérdéses szervezetnek legyen olyan élettani, anatómiai, vagy másféle mechanizmusa, amely képessé teszi a peszticidekkel szembeni védekezésre. Sok példát ismerünk arra, hogy ugyanazon faj különböző populációiban ugyanazzal a peszticiddel szemben gyakran különböző típusú rezisztencia alakul ki. Ha a rezisztencia kialakulásának megvan a feltételei, sok tényező játszik még szerepet abban, hogy a populáció valóban rezisztens lesz-e.

Először is, meg kell jelennie az új, genetikailag előnyös változatnak vagy mutáció vagy migráció révén. Ha az ellenálló típus megjelent, elterjedése attól függ, milyen mértékben domináns, mekkora a szelekciós előnye és a kezdeti gyakorisága. Például egy domináns változat (heterozigóta formában is kifejeződik), ha nagy a szelekciós előnye, gyorsan elterjedhet. A rezisztencia kialakulásában előnyt jelent, hogy sok kártevő generációs ideje rövid, egy évben több nemzedékük van és nagyon szaporák. A kemikáliákkal szembeni rezisztencia génjei előfordulhatnak a kloroplastszók vagy mitokondriumok DNS-ében, illetve plazmidokban (nem nukleoid jellegű kis DNS-darabok) is. A baktériumok antibiotikum rezisztencia génjei gyakran a plazmidokban találhatóak, és nemcsak ugyanazon faj egyedei között adhatók át, hanem különböző fajokhoz tartozó egyedek között is. Ezért vált az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia igen fontos gyógyászati problémává.

A rezisztencia kialakulásának bemutatására vizsgáljuk meg a juvenilis hormon mezőgazdasági alkalmazásának esetét. A juvenilis hormontól azt remélték, hogy egy csapásra megoldja a rovar-kártevőkkel szembeni védekezés problémáját. A kutatók azt gondolták, hogy nem alakulhat ki vele szemben ellenálló képesség, mert a rovarok egyedfejlődéséhez nélkülözhetetlen. Az elmúlt években azonban megjelentek a juvenilis hormont tartalmazó peszticidekre rezisztens rovar-kártevők.

20.7. táblázat. A vándorpatkány R_w (warfarinrezisztencia) lokuszának relatív rátermettsége

Warfarin	SS	RS	RR
Warfarin	Érzékeny	Rezisztens	Rezisztens
K-vitamin-függőség	Nincs	Közepes	Erős
Relatív rátermettség	0,68	1,00	0,37

Forrás: Greaves, J. H.: *Warfarin Resistance: A Balanced Polymorphism in the Nonsay Rat*. *Genet. Res.*, 30:257–263, 1977.

Sok baktérium esetén az antibiotikumokkal szembeni ellenálló képesség terjedését a preadaptáció jelensége fokozza. Az antibiotikumok felfedezése előtt eltett és az 1930-as évek óta tárolt baktériumminták vizsgálata során kiderült, hogy vannak köztük rezisztensek. Sőt a Földnek azon tájairól származó baktériumok között is találtak rezisztenseket, ahol sohasem alkalmaztak antibiotikumokat. Ezekben az esetekben az ellenálló képesség azért alakulhatott ki, mert valamilyen környezeti tényezővel szemben növeli a túlélés esélyét.

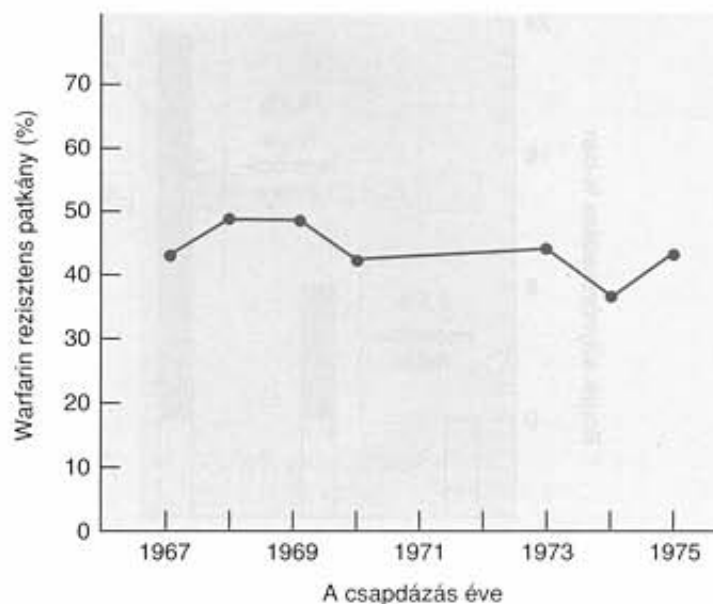
NÉHÁNY PÉLDA

A PESZTICIDREZISZTENCIÁRA

A peszticidrezisztencia genetikai alapjainak jobb megértése érdekében tanulmányozunk néhány ismert esetet. A vándorpatkányt (*Rattus norvegicus*), ezt a rendkívül elterjedt mezőgazdasági és házkörüli kártevőt mintegy tizenöt éven keresztül egy véralvadást gátló anyaggal, a warfarinnal irtották. A patkányméreggel szembeni rezisztencia azonban gyorsan kialakult, és ma már az Egyesült Államokban, valamint sok európai országban rezisztens állatok élnek. A rezisztenciát egy domináns autoszómás R allél okozza, amelyre a legtöbb rezisztens egyed heterozigóta. A homozigóta domináns RR genotípusok relatív rátermettsége nagyon kicsi (20.7. táblázat). Az RR egyedek csökkent életképességének oka, hogy K-vitamin-igényük a heterozigótáknak körülbelül 20-szorosa. A patkányméregre érzékeny r homozigóták ellen pedig szelekció hat.

A warfarin alkalmazásakor a heterozigóták mindkét másik genotípusét meghaladó túlélési előnye miatt kiegyensúlyozott polimorfizmus alakul ki. Ezt a következtetést az is megerősíti, hogy egy populációban, amelynek élőhelyén rendszeresen alkalmazták a warfarint, a rezisztencia alléljának gyakorisága éveken át állandó volt (20.22. ábra), és a Hardy–Weinberg egyensúlyi állapothoz képest nagy heterozigóta túlsúlyt mutatott. A három genotípus relatív rátermettsége $rr = 0,68$, $Rr = 1,00$ és $RR = 0,37$ volt, ami jelzi a heterozigóta jelentős fölényét. Egy másik populációban, ahol a warfarin alkalmazását beszüntették, a rezisztens allél gyakorisága nagyon gyorsan lecsökkent.

Két másik példánk genetikai hátterét részletesen ismerjük. Az atrazin egy gyomirtó szer, amellyel szemben sok



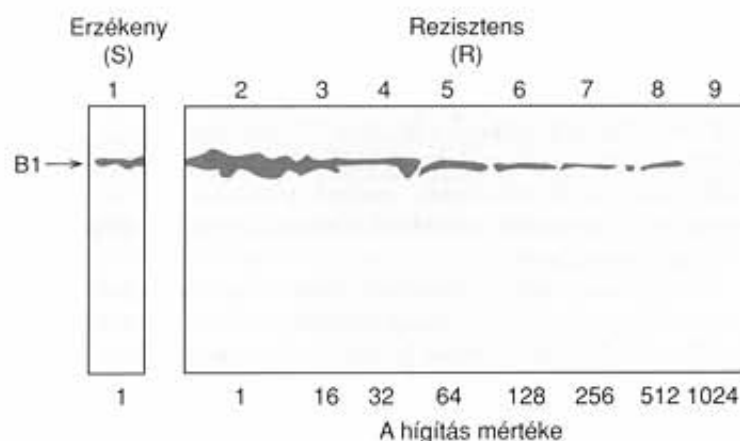
20.22. ábra. A warfarinra rezisztens patkányok gyakoriságának változása nyolc év alatt Anglia és Wales határán

Rezisztens	CAA	TAT	GCT	GGT	TTC	AAC
	Gln	Tyr	Ala	Gly	Phe	Asn
Érzékeny	CAA	TAT	GCT	AGT	TTC	AAC
	Gln	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asn
Az aminosav pozíciója	225	226	227	228	229	230

20.23. ábra. A DNS- és az aminosavszekvencia összehasonlítása disznóparéj pbsA-rezisztens és pbsA-érzékeny törzseiben. Az eltéréseket színek emelik ki, a legalsó sor jelzi az aminosav pozícióját a fehérjében

gyomnövényben alakult ki ellenálló képesség. A rezisztencia anyai ágon öröklődik, ami arra enged következtetni, hogy génje a kloroplasztisban vagy a mitokondriumban található. Kiderült, hogy a kloroplasztisban kódolt pbsA-fehérje szerepet játszik a fotoszintézisnek abban a szakaszában, amelyre az atrazin hat. Összehasonlították a rezisztens és érzékeny disznóparéj (*Amaranthus sp.*) aminosav- és nukleotidszekvenciáit. A nukleotidszekvenciában három eltérés volt, de ezek közül kettő nem okozott eltérést a fehérje aminosavsorrendjében. A harmadik eltérésnél egy adenin helyett guanin kerül a 682. pozícióba, és emiatt a polipeptidlánc 228. helyére glicin helyett szerin épül be (20.23. ábra). E csekély eltérés miatt szűnik meg a termelő pbsA atrazin iránti érzékenysége. A mutáció jelentőségét bizonyítja, hogy másik két faj esetében is a pbsA-fehérjének 228. pozíciójában találtak különbséget az atrazin rezisztens és szenzitív egyedek között.

A szerves foszfátokkal szemben ellenálló rovarok esetében kimutatták, hogy az ellenálló képesség nem új allél megjelenésén alapul, hanem azon, hogy nagyon nagy mennyiségű detoxifikáló észteráz enzim termelésére képesek. A rezisztens és az érzékeny



20.24. ábra. A B1 észteráz enzim mennyisége szerves foszfát-észterekre érzékeny és rezisztens szúnyogokban. A gél 1. oszlopában az érzékeny, a 2.-ban egy rezisztens állat B1 észterázát jelzi a színreakció. A 2. minta hígítatlan kivonat, a 3–9 minta ez utóbbi hígítási sora

szúnyogok észterázának mennyiségét immunológiai módszerekkel vizsgálták (20.24. ábra). Az elektroforetikus gél első oszlopa az érzékeny szúnyog B1 észteráz enzime, a 2–9 oszlopok pedig a rezisztens szúnyogból vett, különböző hígítású mintákat mutatják. A 2. minta hígítatlan kivonat, a 3–9 minta a kivonat hígítási sora. A hígítási sor alapján a rezisztens vonal észteráz szintje körülbelül 500-szor nagyobb, mint az érzékenyé, mivel az 1:512 hígítás mutat az 1. oszloppal megegyező képet. Az még nem ismert, hogy az észteráz túltermelésének oka a génműködés szabályozásának megváltozása, vagy pedig a gének számának megnövekedése.

A PESZTICIDREZISZTENCIA KONTROLLJA

A peszticidrezisztencia problémájának megoldásához az összes tárgyalt evolúciós tényezőt figyelembe kell venni. A warfarin elleni rezisztencia felderítése során megkísérelték az összes patkány kiirtását öt kilométer átmérőjű körzetben. A patkányoknál azonban a génáramlás olyan mértékű, hogy a rezisztens egyedek ennél távolabbi területekre is elmenekültek. Az atrazinnal szembeni ellenálló képességet azért nehéz vizsgálni, mert egymástól függetlenül különböző rezisztens típusok alakultak ki. Ennek oka vagy a mutáció (reális lehetőség van sok mutáns megjelenésére, mivel egyetlen növény akár 100 000 magot teremhet), vagy az, hogy az ellenálló variánsok már az atrazin alkalmazása előtt is jelen voltak a populációkban.

A rovarölő szerek nélküli védekezés egyik ígéretesnek látszó módja, hogy olyan növényfajtákat állítsanak elő, amelyeket mérgező voltak miatt a rovarok elkerülnek. Vannak azonban olyan rovarfajok, amelyek ehhez a stratégiához is képesek alkalmazkodni. A búza egyik kártevője, a hesszeni légy (*Mayetiola orientalis*), súlyos károkat okoz a fogékony fajtákban. A búza rezisztenciájának vannak olyan alléljai, amelyek a lárvák fejlődését gátló anyagok szintéziséért felelősek. Ezekkel szemben azonban a hesszeni légy virulenciát biztosító allélokkal rendelkezik. Szerencsére a legyek egyedfejlődése csak akkor normális, ha mindegyik rezisztencia allél ellen rendelkeznek virulencia alléllal.

20.8. táblázat. Két lenfajta érzékenysége (S) és ellenálló képessége (R) rozsdagomba törzsekkel szemben

	Lenfajta		
	Ottawa	Bombay	F_1 nemzedék
22	S	R	R
24	R	S	R

Forrás: Flor, H.: *The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust*. Adv. Genet., 8:29–54., 1956.

A rozsdagombák elleni genetikai ellenálló képességet illetően a len esetében végezték az első kísérleteket. Két lenfajta, az Ottawa és a Bombay érzékenységét (S) és rezisztenciáját (R) vizsgálták a 22-es és a 24-es rozsdagomba törzssel szemben. A 20.8. táblázatból leolvasható, hogy az Ottawa- a 24-es, a Bombay-fajta a 22-es törzssel szemben rezisztens. A keresztezésükkel kapott F_1 nemzedék mindkét gombatörzssel szemben ellenálló, ami azt jelenti, a rezisztencia alléljai dominánsak, az érzékenység alléljai pedig recesszívek.

Nyilvánvaló, hogy a peszticidek felhasználásának mérséklése lassítja a rezisztencia kifejlődését. A kártevőkkel szemben alkalmazott biológiai védekezési módok – a kártevőkkel szemben ellenálló fajták termesztése, a kártevők parazitáinak és természetes ellenségeinek felhasználása, az agrár ökoszisztémák megfelelő kezelése – és ezek kombinációja csökkenti a mezőgazdasági termelés vegyszerigényét. Ilyen módon lehetőség nyílik arra, hogy a peszticideket csak a legkritikusabb helyzetekben, de akkor hatékonyan alkalmazzák. A rezisztencia alléloknak gyakran negatív pleiotróp hatásuk van. Mint a warfarin esetében láttuk, a rezisztencia allélja csökkenti az egyed életképességét, ami peszticid hiányában az allél természetes szelekciójához vezet. Vagyis a peszticidek óvatos, nagyon megfontolt alkalmazása egyben hosszabb távú alkalmazásukat is elősegíti.

Sok mezőgazdasági kártevő és betegségeket terjesztő élőlény esetében kifejlődött a peszticidek elleni rezisztencia. Az ellenálló képesség gyorsan terjed azon fajok körében, ahol fellép a preadaptáció jelensége, amelyek populációi nagy létszámúak és ahol a génáramlás mértéke jelentős. A patkányok warfarinrezisztenciája, a disznóparéj ellenálló képessége atrazinnal szemben és a szúnyogfajok a szerves foszfátokkal szembeni rezisztenciája nemcsak a peszticidrezisztencia példái, hanem az evolúciós változások is. A rezisztencia problémája kézben tartható a kártevőkkel szemben ellenálló növényfajták termesztésével, vagy integrált növényvédelmi eljárások alkalmazásával.

KIDOLGOZOTT FELADATOK

1. FELADAT

Sok veszélyeztetett faj populációmérete túlságosan lecsökkent. Tételezzük fel, hogy egy fajnak csak tíz egyede van és a heterozigóták aránya 0,2. Hogyan változik a heterozigóták aránya egy generáció múltán? Hogyan alakul a heterozigóták aránya húsz nemzedék múlva? Indokolja válaszát!

MEGOLDÁS

A feladat szerint $H_0 = 0,2$ és $N = 10$. A fejezetben levezetett képlet alapján:

$$H_1 = \left(1 - \frac{1}{2N}\right) H_0$$

ahol $H_1 = (1 - 0,05)0,2 = 0,19$.

A 20. nemzedékre:

$$H_{20} = \left(1 - \frac{1}{2N}\right)^{20} H_0$$

amiből $H_{20} = 0,072$. Tehát egy generáció után a heterozigóták aránya alig változik, de húsz generáció után már csak az eredeti érték 36%-a.

2. FELADAT

A neutralitás elmélete szerint a heterozigóták szintje a genetikai sodródás és a mutáció egyensúlyától függ. Egy szigeten élő, szöcskep populáció egyedszámát 5000-re, mutációs rátáját 0,00001-re becsülték. Mekkora ebben a populációban a heterozigóták szintje? A heterozigóták szintjének megállapítására gélelektroforézist végeztek és 30 lokusz vizsgálata alapján 0,01-et kaptak. Megfelel-e ez a szám a neutralitás elmélete szerint várható értéknek? Milyen tényezők okozhatnak eltérést?

MEGOLDÁS

A számított egyensúlyi heterozigóták szintje:

$$H_e = (4 \times 5000 \times 0,00001) / (4 \times 5000 \times 0,00001 + 1) = 0,167$$

A kísérletben mért érték sokkal kisebb a számított értéknél. Az eltérésre többféle magyarázat lehetséges: akár a populációméret, akár a mutációs ráta becsült értéke lehet magas. Másik lehetséges magyarázat, hogy viszonylag fiatal populációról van szó, és az alapító hatás miatt kicsi a genetikai variabilitás. Vagyis nem telt még el elegendő idő az egyensúly kialakulásához.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az öröklődő emberi betegségek gyakorisága általában a mutáció és a szelekció egyensúlyával magyarázható. A mutáció növeli a betegséget okozó mutáns allél gyakoriságát, a szelekció pedig csökkenti. Ezen kívül a genetikai sodródás, a génáramlás és a beltenyésztés befolyásolhatja a betegséget okozó allélok gyakoriságát.

A molekuláris evolúció általában összeegyeztethető a neutralitás elméletével, amely a genetikai sodródás és a mutáció együttes hatásán alapul. A molekuláris órák alapja, hogy a DNS és a fehérjék szekvenciáiban bekövetkező változások általában bizonyos szabályossággal következnek be. A különböző fajok eltérései alapján molekuláris törzsfák rajzolhatók, amelyek tükrözik a fajok származási viszonyait. A származási kapcsolatok tisztázására a mitokondriális DNS is felhasználható.

A természetvédelmi genetikában a domesztikált, valamint a ritka és veszélyeztetett fajok genetikai változatosságának fenntartásával foglalkozik. A beltenyésztéses leromlás a populáció rátermettségének beltenyésztés következtében fellépő csökkenése. A fogságban tartott populációkban a genetikai sodródás hatása igen erős, amelynek következménye a genetikai változatosság elvesztése lehet. A peszticidrezisztencia sok mezőgazdasági kártevőben és betegségeket terjesztő fajokban kifejlődött. A rezisztencia gyorsan terjed preadaptáció, nagy populációméret és erős génáramlás esetén. A patkányok warfarinrezisztenciája, a disznóparéj ellenálló képessége atrazinnal szemben és a szúnyogfajok a szerves foszfátokkal szembeni rezisztenciája nemcsak a peszticidrezisztencia példái, hanem az evolúciós változásoké is. A rezisztencia problémája kártevőkkel szemben ellenálló fajták természetével és integrált biológiai védekezési módokkal tartható kézben.

KÉRDÉSEK ÉS FELADATOK

- Ha $u = 10^{-5}$, $v = 0,0$ és a szelekciós együttható a recesszív allél ellen $s = 0,6$, mekkora az A_1A_2 genotípus és az A_2 allél várható egyensúlyi gyakorisága? Ha u a kétszeresére nő, hogyan változik meg az egyensúlyi genotípus és allélgyakoriság?
- Egy recesszív letális allélra $u = 10^{-6}$. Mekkora az egyensúlyi genotípus gyakoriság? Tegyük fel, hogy a sikeres gyógykezelésnek köszönhetően a homozigóták hátránya kicsi, $s = 0,05$. Mekkora ebben az esetben az új egyensúlyi genotípus gyakoriság?
- Elemesse azokat a tényezőket, amelyek a sarlósejtes anémia alléljának gyakoriságát befolyásolták egykor az afrikai populációkban, és amelyek ma hatnak az allélgyakoriságra az afrikai eredetű amerikai népesség körében!
- A cisztás fibrózis recesszíven öröklődő betegség, amely egészen a közelmúltig már gyermekkorban halálos kimenetelű volt. Gyakorisága az európai népegekben magas, 2500 újszülött közül 1 beteg. A fenti információk alapján számítsa ki a mutációs rátát! Hasonlítsa össze ezt az értéket az ismert mutációs rátákkal, és adjon magyarázatot a betegség előfordulási gyakoriságára!
- Bizonyos esetekben az alapító hatás fontos szerepet játszhat a ritka, öröklődő betegségeket okozó allélok gyakoriságának kialakulásában. Gondolja végig, milyen populációkra vonatkozik ez elsősorban?
- Hasonlítsa össze a neutralitás elmélet és a szelekciós elmélet lényegét a genetikai változatosság mértékének alakulásában! Tervezzon olyan kísérletet, amelynek segítségével egy adott

lokusza esetében eldönthető, hogy a tapasztalt polimorfizmus melyik elmélettel magyarázható!

7. Definiálja a molekuláris óra és az aminosavszubsztitúciós ráta fogalmát! A nukleotidszubsztitúció rátája magasabb vagy alacsonyabb-e az aminosavszubsztitúciónál? Válaszát indokolja!
8. Tegyük fel, hogy a leopárdbéka két populációjában a fehérjék gélelektroforézisével vizsgálható két lokuszon a heterozigócia értéke 0,1, illetve 0,5 volt. Feltételezzük, hogy a mutációs ráta azonos, $u = 10^{-5}$ és nem hat szelekció. (a) Mi lehet az eltérő heterozigócia magyarázata? (b) a populációk milyen méretbeli különbsége indokolja ezt az eltérést?
9. Két rágcsálófaj esetében az egyik fehérje 90 aminosavból 40 helyen van eltérés, míg egy másik fehérjénél 20 helyben különbözik a 80 aminosavból álló lánc. Az aminosavhelyek hányad része különbözik az egyes fehérjékben? Miért térhet el a két fehérjére kapott érték?
10. Tegyük fel, hogy négy közeli rokon madárfaj (A, B, C és D) vizsgálata alapján genetikai távolságuk (a biokémiai jellemzők alapján kapott érték) a következő:

	b	c	d
a	0,2	0,12	0,55
b		0,3	0,7
c			0,65

Az adatok alapján állapítsa meg, melyik két faj áll a legközelebbi rokonságban és melyek a legtávolabbi rokonok!

11. A 20.3. táblázat adatai arra engednek következtetni, hogy a molekuláris eltérések vizsgálatai választ adhatnak a rokon fajok leszármazási kapcsolataira és a szétválás idejére. Hogyan használhatjuk fel ezeket az adatokat az evolúciós változások megértésére, beleszámítva a fajok morfológiai és élettani különbségeit is?
12. Miben különbözik a mitokondriális DNS populációgenetikai szempontból a nukleáris DNS-től? (A válasznál vegye figyelembe, hogy az mtDNS anyai ágon öröklődik és haploid.)
13. A beltenyésztéses leromlás mértékét az $sfpq$ összefüggés adja meg. Mekkora a beltenyésztéses leromlás, ha $f = 0,25$, $s = 0,5$ és $q = 0,01$? Mekkora ugyanez a mutató, ha $q = 0,5$? Miért nagyobb az egyik érték a másiknál?
14. Egy 100 egyedből álló, kezdetben Hardy–Weinberg-egyensúlyban lévő populációban $q = 0,4$. Mekkora H_1 és H_2 ? Hogyan alakul H_1 és H_2 , ha $N = 10$? Válaszát indokolja!

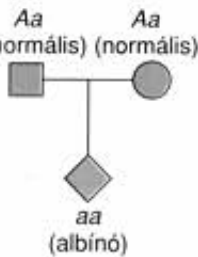
15. Egy fogságban tartott állat tenyésztési programjában azt a célt tűzték ki, hogy a kezdeti heterozigócia 75%-a ($H_T/H_0 = 0,75$) még 200 év fogságban való szaporítás után is megmaradjon. Mekkora populációméretre van ehhez szükség egy olyan fajnál, amelynek generációs ideje két év?
16. Milyen szempontokat venne figyelembe a rizs azon tájfajtáinak vagy vad változatainak kiválasztásánál, amelyeket későbbi nemesítési programokban szeretne felhasználni? Hogyan tartaná fenn a kiválasztott mintákat úgy, hogy a genetikai változatosság teljes mértékben megmaradjon?
17. A másodunokatestvérek házasságából származó utódgeneráció beltenyésztési koefficiense $1/16$. Mekkora a beteg gyermek születésének esélye egy olyan recesszíven öröklődő betegség esetében, amelynek allélgyakorisága 0,008? Hasonlítsa össze a beteg gyermek születésének valószínűségét a rokonházasságban és nem rokon egyének házasságában!
18. Néhány állatfaj, például a feketelábú nyest és az észak-amerikai kondor, már csak fogságban él. Javasoljon olyan tervet a fajok megőrzésére, amely figyelembe veszi a beltenyésztéses leromlást, a genetikai változatosság csökkenését, valamint a természetes környezetbe való visszatelepítés kérdését!
19. A 20.7. táblázat relatív rátermetség adatainak felhasználásával számítsa ki a patkányok warfarinnal szembeni rezisztencia alléljának várható egyensúlyi gyakoriságát! Egyes populációkban ez az allél hiányzik. A jelenségre kétféle magyarázat is adható. Melyek ezek?
20. A 20.8. táblázatból látszik, hogy a len rozsdagomba-rezisztenciája domináns tulajdonság. A 22-es törzssel szembeni rezisztencia allél relatív gyakorisága 0,1, a 24-es törzssel szembeni allélé pedig 0,2. A populáció hányad része ellenálló a 22-es törzssel szemben? És mindkét törzssel szemben?
21. Egyes fajok esetében a peszticidrezisztencia nagyon gyorsan kifejlődött. A maláriaszúnyogok például világszerte rezisztensek a DDT-re. Melyek azok a populációgenetikai tényezők, amelyek fontosak lehetnek a rezisztencia gyors elterjedésében?
22. Szép reményekkel kecsegtet, hogy genetikai manipulációval új természetű növényfajtákat lehet előállítani. A természetvédelmi genetikai és a peszticidrezisztencia alapjainak ismeretében több kérdés is felvetődik az így kialakított fajtákkal kapcsolatban. Melyek ezek?

A megoldások a könyv végén találhatók.

A) FÜGGELÉK A FEJEZETEK VÉGÉN TALÁLHATÓ FELADATOK MEGOLDÁSA

2. FEJEZET

- Mendel I. törvénye a hasadás, más néven szegregáció elve. Megfogalmazza, hogy a heterozigóták egyenlő számban termelik a kétféle, különböző allélt hordozó gamétákat. Mendel II. törvénye a független kombinálódás elve, amely szerint a különböző gének alléljai egymástól függetlenül öröklődnek.
- A borsónak egy sor jól elkülöníthető tulajdonsága van: öntermékenyítéssel szaporodik, virágai könnyen kezelhetők, utódgenerációi nagy létszámúak, kereskedelmi forgalomban is beszerezhetőek tiszta származéksorú, beltenyésztett változatai.
- Az ismeretlen genotípusú növényt keresztezni kell egy homozigóta *aa*, szögletes magvú növénnyel, vagyis tesztelő keresztezést kell végezni. Ha az összes utód gömbölyű magvú, akkor a kérdéses egyed genotípusa *AA*, az utódok *Aa* genotípusúak. Ha az utódok egy része gömbölyű magvú, másik része szögletes magvú, akkor a kérdéses genotípus *Aa*, és az utódok *Aa* és *aa* genotípusúak.
- (a) 0,5. (b) 0,5.
- A jelleg recesszíven öröklődik, mivel a szülők nem érintettek, de gyermekük beteg.
- 0,35, 0,61; a szabadságfok 1; megfelel a vártnak.
- 0,5; 0,33.
- 0,0625; 0,00391; a szorzat szabály alapján.
- (a)

(a)	<i>Aa</i> (normális)	<i>Aa</i> (normális)
		
	<i>aa</i> (albínó)	

(b) 0,25; 0,5; 0,667.

10. 0,25; 0,240.

11. (a) 0,25 mindegyik típusra. (b) 0,62; szabadságfok 3; megfelel a hipotézisnek.

12. 0,0625; 0,1875.

13. 0,0156; 0,1406.

14. Recesszív, l. a 2.7. táblázatot; *Aa*, *Aa*, *aa*; 0,5; 0,0.

15. Domináns; l. a 2.7. táblázatot; *bb*; *Bb*; *bb*; 0,0. A II-3 nem hordozza a domináns allélt, így a gyermeke nem lehet érintett. (A mutáció lehetőségét kizárjuk.)

16. A férj heterozigóta; 0,5.

17. 0,052; a szabadságfok 1, megfelel a hipotézisnek.

18. 0,429; a szabadságfok 1, megfelel a hipotézisnek.

19. 0,125; 0,75.

20. (a)

	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	<i>AABB</i>	<i>AABb</i>	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>
<i>Ab</i>	<i>AABb</i>	<i>AAbb</i>	<i>AaBb</i>	<i>Aabb</i>
<i>aB</i>	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>	<i>aaBB</i>	<i>aaBb</i>
<i>ab</i>	<i>AaBb</i>	<i>Aabb</i>	<i>aaBb</i>	<i>aabb</i>

(b) 0,5625; 0,1875; 0,1875; 0,0625
(másképpen: $\frac{1}{16}$; $\frac{3}{16}$; $\frac{3}{16}$; $\frac{1}{16}$).

21. 0,667; 0,25.

22. 0,333; 0,5.

23. Domináns; lásd a 2.7. táblázatot.

24. 22,25.

25. 0,00694; 0,0833.

26. (a) Szülők *AA* (magas) \times *aa* (alacsony); F_1 *Aa* (magas); F_2 153 *AA* vagy *Aa* (magas), 48 *aa* (alacsony). (b) 0,761 magas, 0,239 alacsony (3,18 : 1).

27. Szülők *Aa* (magas) \times *aa* (alacsony); $\frac{1}{2}$ *Aa* (magas) és $\frac{1}{2}$ *aa* (alacsony).

28. (a) Annak ellenére, hogy a szemek nem jól láthatók, megközelítőleg 27 lila és 12 sárga szem azonosítható. A megfigyelt

lila : sárga arány = 2,25 : 1. Az elméletileg várt számszám:
 $\frac{1}{4}(39) = 9,75$ lila és $\frac{3}{4}(39) = 29,25$ sárga. A khi-négyzet értéke 0,69;
 ez megfelel a várt értékeknek 1 szabadságfoknál. (b) A normál és
 a zsugorodott szemek száma 25, illetve 14, arányuk 1,79:1. A várt
 értékek az (a)-val azonosak. A khi-négyzet 2,47, ami szintén
 megfelel a hipotézisnek. (c) A megfigyelt számok 18 lila, normál;
 9 lila, zsugorodott; 7 sárga, normál; 5 sárga, zsugorodott. Arányuk
 3,6:1,78:1,4:1. A várt számok: $\frac{1}{4}(39) = 9,75$; $\frac{3}{4}(39) = 29,25$;
 $\frac{1}{4}(39) = 9,75$; $\frac{3}{4}(39) = 29,25$. A khi-négyzet 2,83; a szabadságfok
 3, a vártak megfelelnek a kapott egyedszámok.

29. 1,0, 0,5, 0,25.

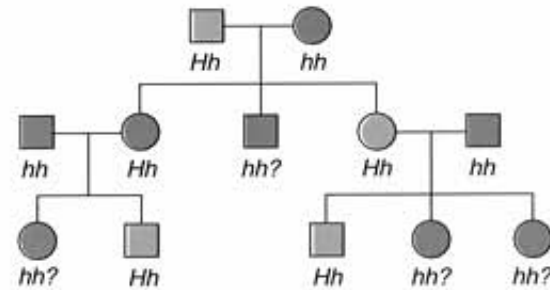
30. (a) $AB = \frac{1}{4}$; $Ab = \frac{1}{4}$; $aB = \frac{1}{4}$; $ab = \frac{1}{4}$. (b) $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{4}$; 0.

3. FEJEZET

1. A tulajdonságok, a Mendel által vizsgált tulajdonságokhoz hasonlóan, mutathatnak teljes dominanciát. Részleges vagy inkomplett dominancia esetén a heterozigóták fenotípusa átmenetet mutat a két homozigóta fenotípusa között, vagyis a jelleg intermedier (csodátölcsér virágszíne). Kodominancia esetén a heterozigótákban mindkét allél hatása egyformán megnyilvánul (MN-vércsoportú és AB-vércsoportú egyének).
2. A penetrancia az egy genotípusba tartozó egyedeknek azon hányada, amelyeknél az adott genotípusnak megfelelő fenotípus megjelenik. Az expresszivitás az a mérték, amellyel egy egyed az adott fenotípust mutatja. Egy betegség esetében például az enyhe fokozattól a súlyos állapotig terjedhet.
3. (a) 6. (b) 5, 10.
4. (a) Nemhez kapcsolt tulajdonságoknak nevezzük azokat, amelyek génjei az ivari kromoszómákon találhatóak, például emlősök esetében az X- és Y-kromoszómán. A nemre korlátozódó tulajdonság mindig csak az egyik ivaron nyilvánul meg. A nem által befolyásolt tulajdonság megjelenése a kérdéses egyed nemétől függ. Az ivarra korlátozódó és az ivar által befolyásolt tulajdonságoknál nem szükségeszerű, hogy génjük az ivari kromoszómákon legyen. (b) Ha a tulajdonság nemhez kapcsolt és nem ivarra korlátozódó, akkor a különböző fenotípusú egyedek keresztezéséből olyan utódok is származnak, amelyeknél a tulajdonság a nem várt ivaron jelenik meg. A nemre korlátozódó tulajdonságok esetében átfogó vizsgálattal sem találunk az adott fenotípust mutató egyedek között nem várt ivarút.
5. Ebben az esetben Mendel nagyszámú, a szülői fenotípusok között átmenetet mutató fenotípust figyelt volna meg. Nem tapasztalt volna két diszkrét fenotípus kategóriát, így minden bizonnyal nem jutott volna el az öröklődés elméletének kidolgozásához.
6. 0,26; a szabadsági fok 2; a hipotézisnek megfelel.
7. 0,28; a szabadsági fok 1; a hipotézisnek megfelel.

8. $A \times A$, $A \times B$, $A \times AB$, $A \times 0$, $B \times B$, $B \times AB$, $B \times 0$, $AB \times AB$, $AB \times 0$, 0×0 .
 $I^A I^A \times I^B I^B$ (mind AB); $I^A I^A \times I^B I^0$ ($\frac{1}{2}$ AB, $\frac{1}{2}$ A); $I^A I^0 \times I^B I^B$ ($\frac{1}{2}$ AB, $\frac{1}{2}$ B); $I^A I^0 \times I^B I^0$ ($\frac{1}{4}$ A, $\frac{1}{4}$ AB, $\frac{1}{4}$ B, $\frac{1}{4}$ 0).
9. 5,24 – statisztikailag szignifikáns (0,05 valószínűségi szint mellett), 1 szabadságfokkal; 0,21 – megfelel a 2 : 1 hipotézisnek.
10. (a) $\frac{1}{4}$. (b) $\frac{1}{4}$.
11. Az újonnan felfedezett öröklődő betegség pleiotróp hatásának igazolásához feltételezzük, hogy egy gén alakítja ki a jelleget. Ez esetben össze kell hasonlítani a beteg és az egészséges személyek sok tulajdonságát, különös tekintettel a betegséggel kapcsolatos bélyegekre (fenilketonuria esetén például a fenilalanin metabolizmusának zavaraira visszavezethető eltérések), valamint azokra, amelyek feltehetően az eltérés közvetlen következményei.

12.

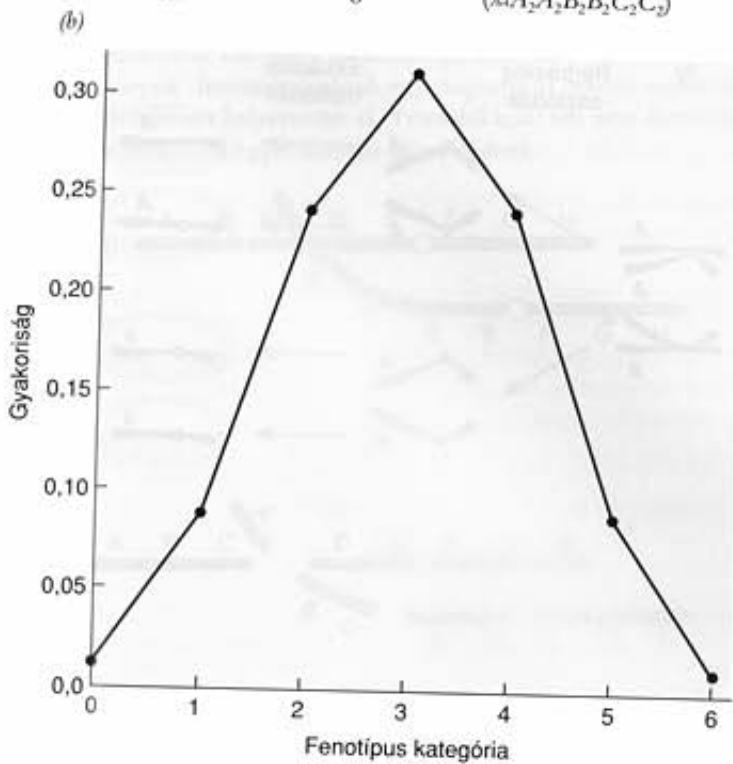


13. (a) Hasonlítsuk össze a különböző hőmérsékleten és tápanyagon nevelt állatok fenotípusát, gondosan elemezve a fenotípusos értékeket és a környezeti tényezőket. (b) Keresztezzük a mutáns különböző törzsekkel, és analizáljuk az utódnemzedékeket, hogy meghatározhassuk, a különböző keresztezések vajon más fenotípusokat adnak-e.
14. A 0-vércsoportú egyének általános donorok, az AB-vércsoportúak általános recipiensek. A 0-vércsoportúak vörösvértestein nincsenek AB0-vércsoportrendszerbe tartozó antigének. Az AB-vércsoportúak nem termelnek anti-A és anti-B ellenanyagokat, ezért kaphatnak vért más vércsoportúaktól is.
15. $MM' \times mm$.
16. (a) $\frac{1}{4} B_1 B_2$, $\frac{1}{4} B_2 B_3$, $\frac{1}{4} B_1 B_4$, $\frac{1}{4} B_4 B_5$. (b) $B_1 B_4 \times B_2 B_2$.
17. Asszony: $I^A I^0$, férfi: $I^B I^0$, gyermek: $I^A I^B$; 0,25; 0,25.
18. Férfi: $X^C Y$, asszony: $X^C X^c$, lánygyermek: $X^C X^c$; α 0,50.
19. Egészséges fiú ($X^A Y$): 0,25; beteg fiú ($X^A X^A$): 0,25; egészséges lány ($X^A X^a$): 0,25; beteg lány ($X^A X^A$): 0,25.
20. (a) $\frac{1}{2} X^w X^{w+}$ (piros szemű nőstények), $\frac{1}{2} X^w Y$ (fehér szemű hímek).
 (b) 0,36 – a szabadságfok 3; a hipotézisnek megfelel.

21. $\nearrow \frac{1}{2}B_1B_1$
 $\frac{1}{4}A_1A_1 \rightarrow \frac{1}{2}B_1B_2$
 $\searrow \frac{1}{4}B_2B_2$ $\frac{1}{16}$ vörös ($\frac{1}{16}A_1A_1B_1B_1$)
 $\nearrow \frac{1}{4}B_1B_1$ $\frac{1}{8}$ halványvörös ($\frac{1}{8}A_1A_1B_1B_2, \frac{1}{8}A_1A_2B_1B_1$)
 $\frac{1}{2}A_1A_2 \rightarrow \frac{1}{2}B_1B_2$ $\frac{1}{8}$ rózsaszín ($\frac{1}{8}A_1A_1B_2B_2, \frac{1}{8}A_1A_2B_1B_2, \frac{1}{8}A_2A_2B_1B_1$)
 $\searrow \frac{1}{4}B_2B_2$ $\frac{1}{8}$ halvány rózsaszín ($\frac{1}{8}A_1A_2B_2B_2, \frac{1}{8}A_2A_2B_1B_2$)
 $\nearrow \frac{1}{4}B_1B_1$ $\frac{1}{16}$ fehér ($\frac{1}{16}A_2A_2B_2B_2$)
 $\frac{1}{4}A_2A_2 \rightarrow \frac{1}{2}B_1B_2$
 $\searrow \frac{1}{4}B_2B_2$

22. (a)

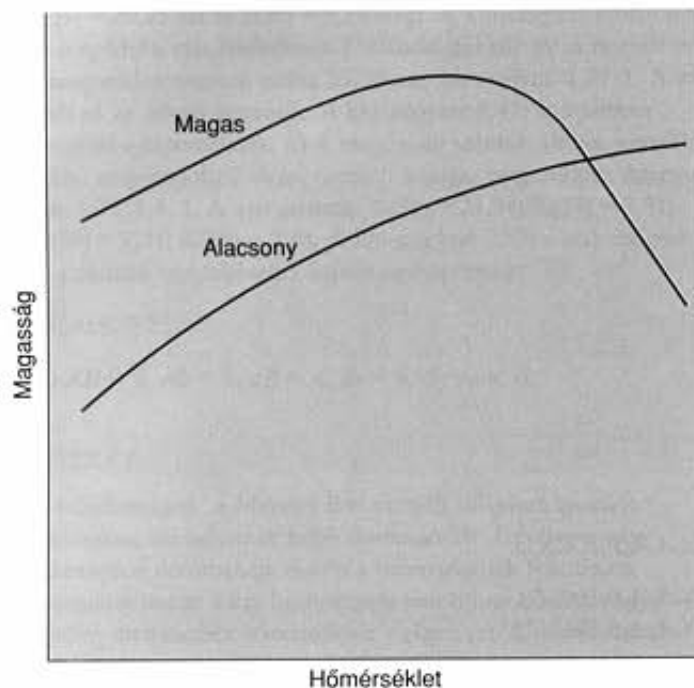
Gyakoriság	Kategória	Genotípusok
$\frac{1}{16}$	0	($\frac{1}{16}A_1A_1B_1B_1C_1C_1$)
$\frac{1}{8}$	1	($\frac{1}{8}A_1A_1B_1B_1C_1C_2, \frac{1}{8}A_1A_1B_1B_2C_1C_1, \frac{1}{8}A_1A_2B_1B_1C_1C_1$)
$\frac{3}{16}$	2	($\frac{1}{16}A_1A_1B_1B_1C_2C_2, \frac{1}{16}A_1A_1B_2B_2C_1C_1, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_1C_1C_1, \frac{1}{16}A_1A_1B_1B_2C_1C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_1B_1C_1C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_1B_2C_1C_1$)
$\frac{6}{16}$	3	($\frac{1}{16}A_1A_1B_1B_2C_2C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_1B_1C_2C_2, \frac{1}{16}A_1A_1B_2B_2C_1C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_2B_2C_1C_1, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_1C_1C_2, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_2C_1C_1, \frac{1}{16}A_1A_2B_1B_2C_1C_2$)
$\frac{7}{16}$	4	($\frac{1}{16}A_2A_2B_2B_2C_1C_1, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_1C_2C_2, \frac{1}{16}A_1A_1B_2B_2C_2C_2, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_2C_1C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_2B_2C_1C_2, \frac{1}{16}A_1A_2B_1B_2C_2C_2$)
$\frac{3}{16}$	5	($\frac{1}{16}A_1A_2B_2B_2C_2C_2, \frac{1}{16}A_2A_2B_1B_2C_2C_2, \frac{1}{16}A_2A_2B_2B_2C_1C_2$)
$\frac{1}{16}$	6	($\frac{1}{16}A_2A_2B_2B_2C_2C_2$)



(c) Három gén esetén magasabb a kategóriák száma, a fenotípus eloszlás közelít a haranggörbéhez.

23. A dominancia egy gén két alléljának kölcsönhatása a fenotípus kialakításában. Az episztázis két vagy több különböző gén interakciója. A Mendel által vizsgált tulajdonságok mindegyikét egy gén határozza meg.
24. 1,56; a szabadsági fok 1, a hipotézisnek megfelel.
25. 0,5.
26. (a) $BbCc$, fekete; (b) $\frac{1}{16}$ fekete: $BBCC, BB Cc, Bb CC, Bb Cc$; $\frac{1}{16}$ barna: $bb CC, bb Cc$; $\frac{1}{16}$ albinó: $BBcc, Bbcc$ és $bbcc$.
27. Kettős génhatás esetén a fehér virágú növények azonos genotípusúak ($aa bb$), ezért két fehér virágú egyed keresztezéséből csak fehér virágú utódok származnak. Komplementer génhatás esetén két olyan fehér virágú növény keresztezéséből, amelyek egyik génjükben eltérnek egymástól ($aaB-$ és $A-bb$), bíborvirágú utódok is várhatók (3.19. ábra).

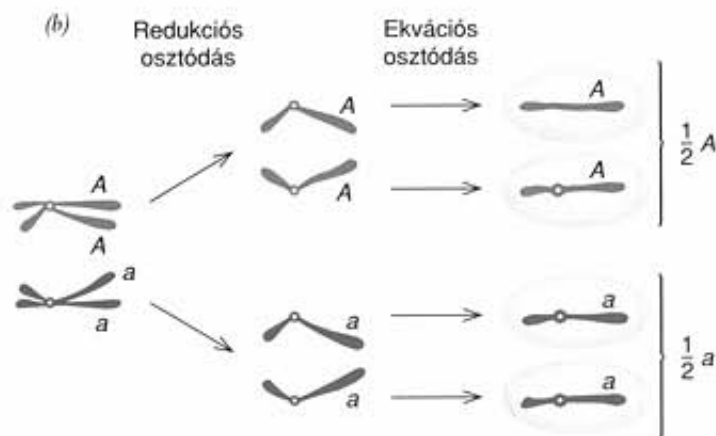
28.



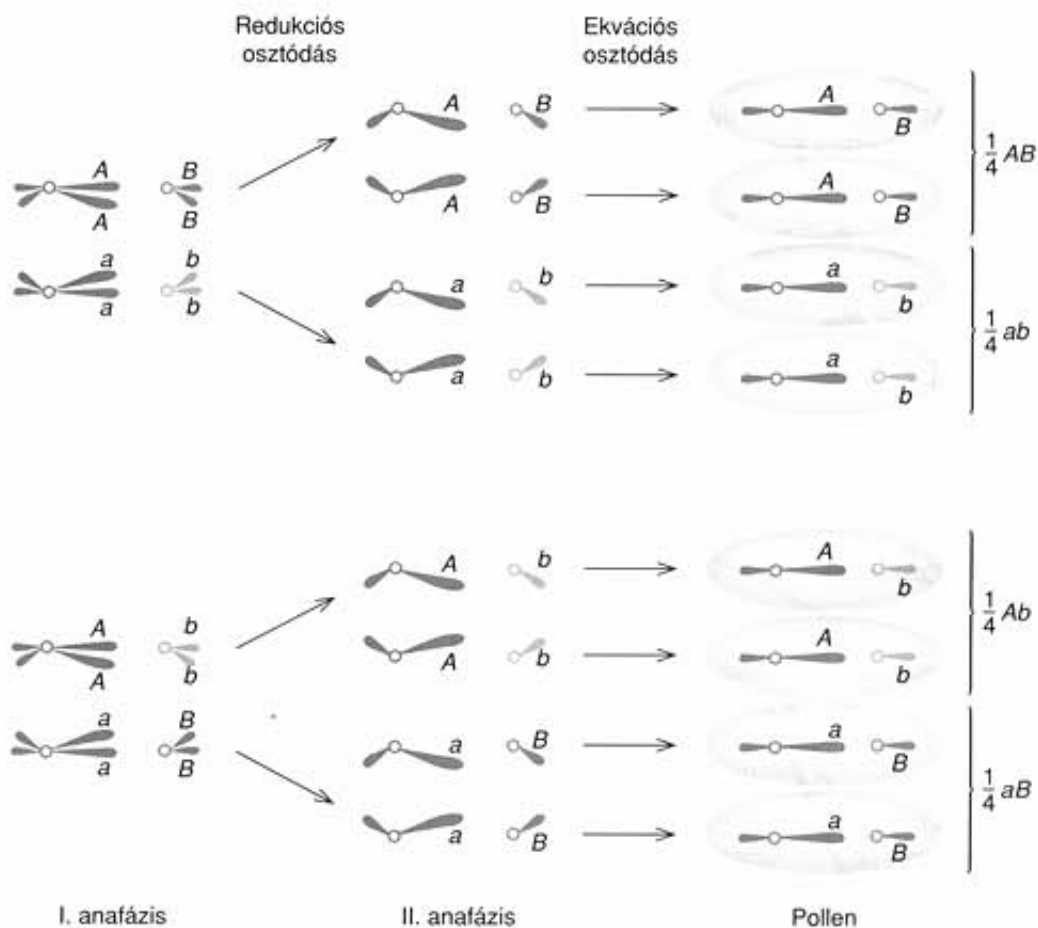
29. Poligénes öröklődés esetén a kérdéses tulajdonság mögött sok gén hatása áll. A kvantitatív jelleg pedig azt jelenti, hogy a tulajdonság egy kontinuos skálán mérhető, folyamatos eloszlást mutat. Egyes esetekben a poligénes sajátságok nem mutatnak kontinuos eloszlást, míg a kvantitatív jellegeknek nincs poligénes genetikai bázisuk. Ezek a jellegek egygéneseek vagy poligénesek is lehetnek, genetikai hátterük eldöntéséhez családfaelemzés szükséges.
30. A válasz meglehetősen gyors is lehet, mert csaknem az egész fenotípusos variancia az additív genetikai komponensből adódik.
31. 0,4375; 0,0.
32. (a) Nem. (b) Igen. A gyermek a férfinak egyik AB0 lokuszon lévő allélját sem hordozza.

4. FEJEZET

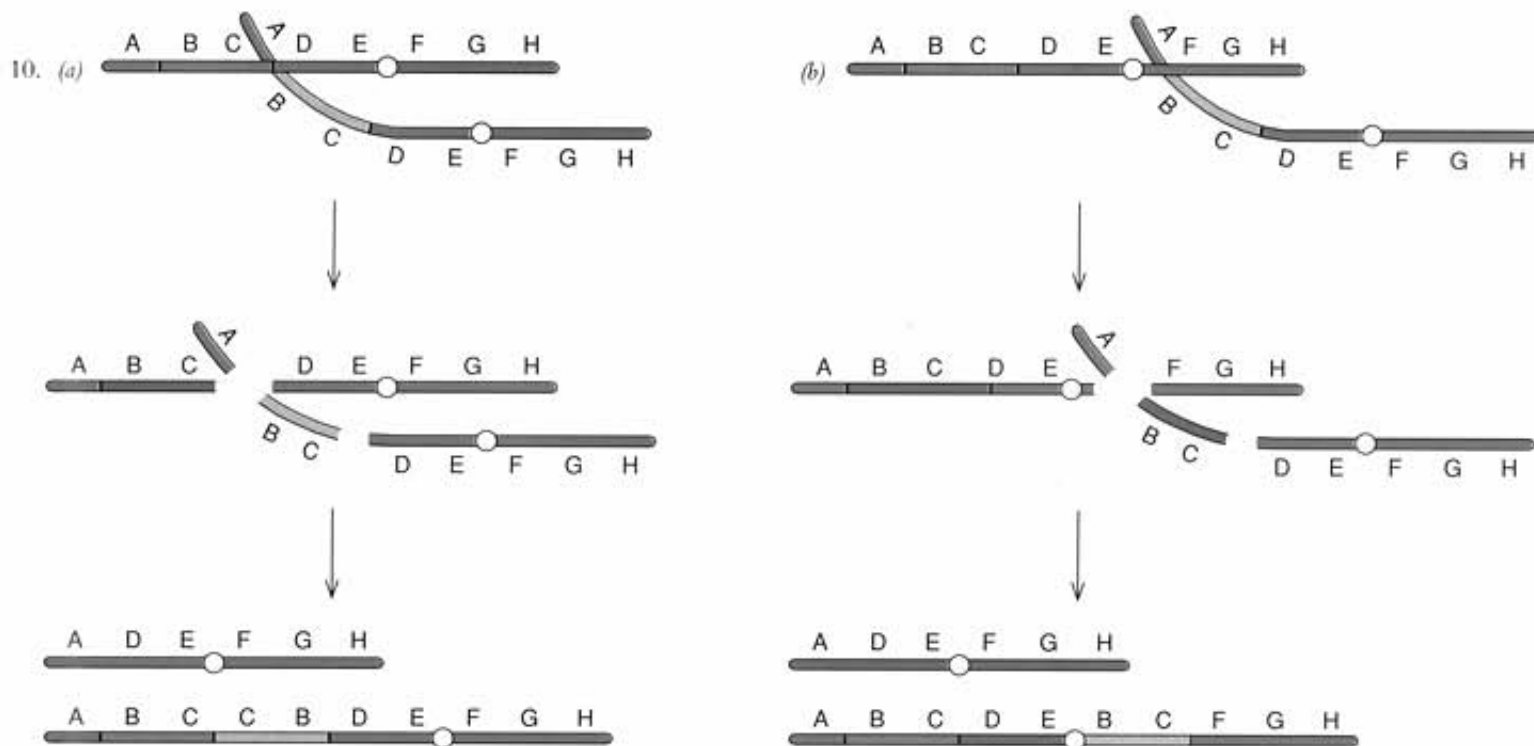
1. Metacentrikus, amelynek a centromerona a középtájon található; akrocentrikus, amelyen a centromeron a rövidebb kar vége felé található; telocentrikus, amelynek centromerona a kar csúcsánál található.
2. S, G₂, mitózis, G₁. A DNS szintézise az S fázisban történik.
3. 0,04; a szabadsági fok 1, a hipotézisnek megfelel. 2,19; a szabadsági fok 2, a vártnak megfelel.
4. 0,00118.
5. A DNS-szintézis és a kromoszomális események nem azonos időben zajlanak. Részletesebben l. a 4.10. ábrán.
6. Az oogenezis során mindegyik oogoniumból csak egy gaméta (petesejt) származik és három poláris test; a spermatogenezis négy gamétát (spermium) hoz létre mindegyik spermatogoniumból. Embernél az ivarérettség elérésétől a spermatogenezis folyamatosan zajlik és sok millió spermiumot termel; az oogenezis a magzati életben kezdődik, a sejtek az ovulációig megrekednek a meiózis diplotén szakaszában. A női szervezetben körülbelül 500 érett petesejt alakul ki az élet során.
7. A mitózis során a kromoszómák úgy helyezkednek el, hogy a testvérkromatidák a metafázis középsíkjának ellenkező oldalára kerüljenek. A meiózis I. fázisában a homológ kromoszómák párba állnak, és azok helyezkednek el az egyenlítői sík két oldalán. A meiózis II. fázisában hasonló a mitózishoz, eltekintve attól, hogy az osztódó sejtek már haploidok.
8. (a) 0,5 A és 0,5 a.



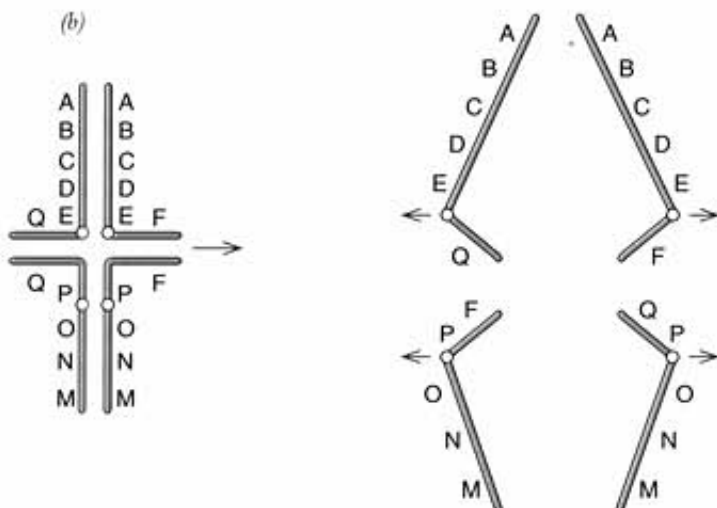
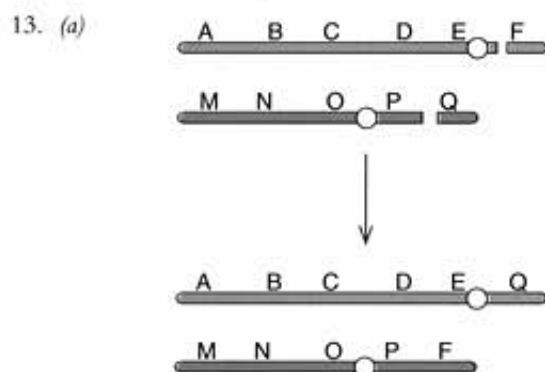
(c) 0,25 AB, 0,25 Ab, 0,25 aB, 0,25 ab.



9. Duplikáció: egy adott kromoszómaszakasz egynél több példányban van jelen. Deléció: egy adott kromoszómaszakasz hiányzik. Inverzió: a gének egy csoportja az eredeti sorrenddel ellentétesen helyezkedik el. Transzlokáció: két nem-homológ kromoszóma egyes darabjai kicserélődnek.



11. Az *e* és az *f* gének.
12. A pericentrikus inverzió tartalmazza a centromeront, a paracentrikus nem. A paracentrikus inverzió révén acentrikus kromoszómadarab és egy dicentrikus kromoszómahíd keletkezik, a pericentrikus esetén nem. Mindegyik esetben duplikációkat és deléciókat hordoznak a kromoszómák; a paracentrikus inverziók hatásai általában súlyosabbak.



14. Lásd a 4.4. táblázatot.
15. Lásd a 4.29. ábrát. Sok Down-szindrómás magzat születése előtt meghal.
16. (a) Lásd a 4.33. ábrát! (b) Lásd a 4.5. táblázatot! XXY, X0.
(c) A várható genotípusok a hím ivarsejtek képződésekor bekövetkező nondiszjunkció miatt: XXX, XYY, X0, XX, XY.

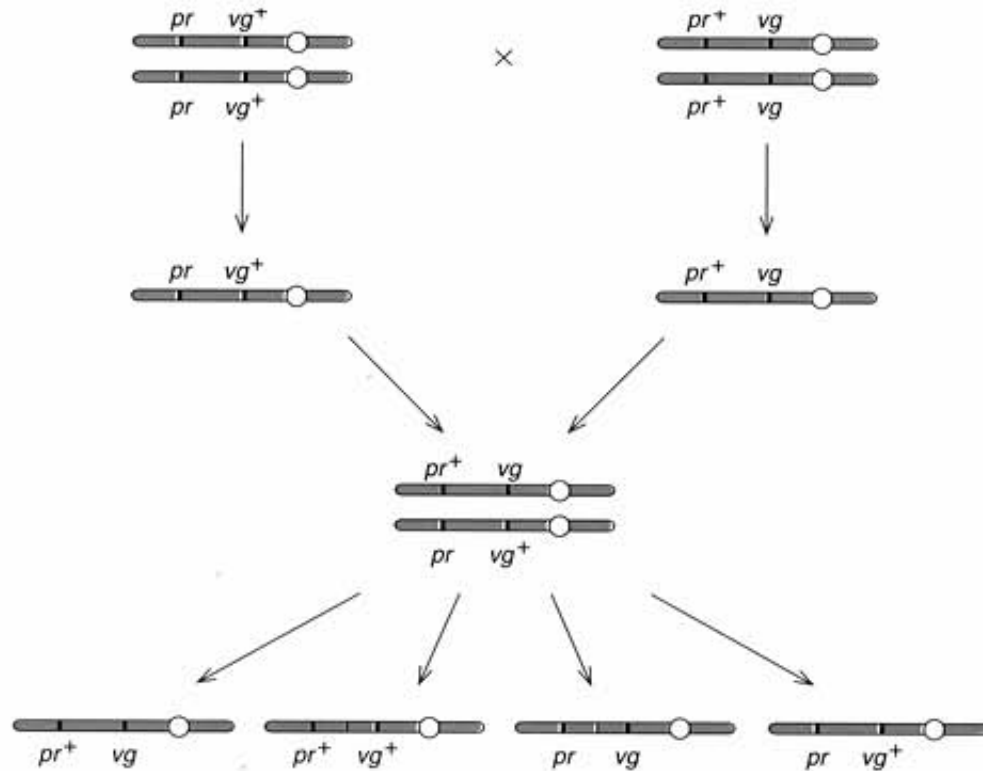
A várható genotípusok a női ivarsejtek képződésekor bekövetkező nondiszjunkció miatt: XXX, XXY, X0, Y0 (életképtelen), XY, XX.

17. A 6. kromoszómán.
18. 4 példányban; AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa, aaaa; 2 fenotípus.
19. 0,0625; 0,0625.
20. A kisebb inverzió pontosan a nagyobb alatt található (hat sáv hosszúságú; nyilakkal jelölve). A pericentrikus inverzió a csúctól számítva a harmadik sáv alatt kezdődik az emberi kromoszómán és a nyolcadik sáv alatt van a másik vége.
21. 0,25 Z^1Z^1 kakas, 0,25 Z^1Z^2 kakas, 0,25 Z^1W tyúk, 0,25 Z^2W tyúk.
22. Normális nőstény, illetve normális hím; egyenlő számú X és autoszómakészlet nőstényt eredményez; a második esetben pedig az X/A arány 0,5, és ez hímekeket eredményez.
23. Lásd a 4.7. és a 4.9. ábrákat!
24. A két szülő genomja a másik féltől származó, esetleg káros allélok hatását kiküszöbölheti. Igen, lehetséges normális meiózis.
25. Három kromoszóma hasadása.

5. FEJEZET

- A független kombinálódás törvényével. A kapcsolt gének alléljai nagyobb valószínűséggel jutnak együtt az utódokba az apai vagy anyai elrendeződéssel, mint az a független kombinálódás alapján várható.
- 139,0; a szabadsági fok 3, az eltérés szignifikáns a hipotézistől 0,01 valószínűségi értéken.
- PL (0,443), Pl (0,057), pL (0,057), pl (0,443).
- $P-L-$ (0,696), $P-ll$ (0,054), $ppL-$ (0,054), $ppll$ (0,196); 1,42 és a szabadsági fok 3; a hipotézisnek meg felel (l. 4. fejezet).
- Szerencsés módon az általa tanulmányozott tulajdonságok génjei különböző kromoszómákon voltak, illetve azonos kromoszómán, de annyira távol egymástól, hogy nem tűntek kapcsoltak. Kísérleteiben nem tanulmányozta azt a tulajdonságpárt, amelynek génjei szorosan kapcsoltak voltak.
- 0,130. Az első tesztelő keresztezésre a becslés 0,107 volt. A rekombináció becslült értéke alacsonyabb.

7.



8. A gének sorrendje $a-c-b$. $0,3 > 0,27$, mert néhány kettős crossing over is előfordult.

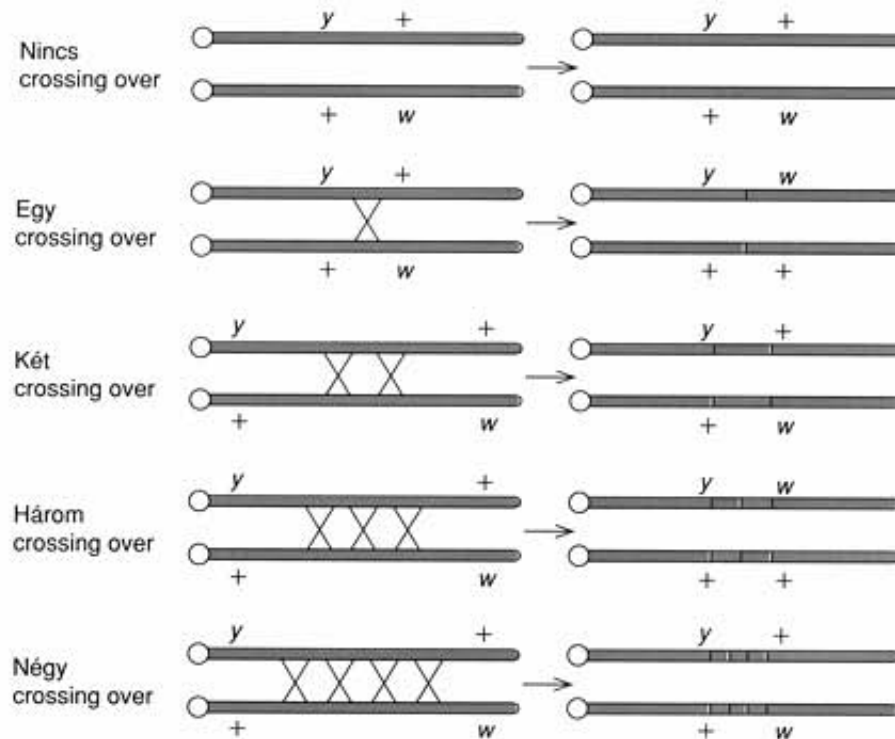
9. A génsorrend $a-c-d-b$. $bcd/+ + \times bcd/bcd$.

10. A hárompontos keresztezések eredményei megerősítették azt, a kétpontos keresztezések eredménye alapján várt feltételezést, hogy a gének a kromoszómákon lineárisan helyezkednek el. Ráadásul, a hárompontos keresztezések további információt is adnak a gének sorrendjéről.

11. $k=0,141-m=0,083-l$.

12. $0,0117$. $I = 1 - 0,00636/0,0117 = 0,46$. Az interferencia miatt a kétszeres crossing overek száma körülbelül a fele a vártnak.

13.






14. Embernél nincs mód irányított keresztezések kivitelezésére, emellett rendszerint az utódok száma is nagyságrendekkel alacsonyabb, mint az akár száz utódot is produkáló fajknál.
15. $2 h C/Y, 2 H c/Y, 1 H C/Y; 0,2$.
16. 0,214. Azok a családok, amelyekben nincs rekombináns fiúgyermek (itt elhagytuk), torzulást okoznak az adatokban.
17. $0,5 A_1A_2, 0,5 A_2^-$; mindegyik A_1A_2 lenne.
18. A 11. kromoszómán.
19. A négyfonalas állapotban fellépő crossing overnél minden egyes átkereszteződésben két fonál vesz részt. Kétfonalas crossing over esetén mindkét fonál szerepelne a folyamatban. Ezért a négyfonalas crossing over során általában szülői és nem-szülői típusú gaméták is keletkeznek, míg a kétfonalas crossing over, vagy csak szülői (crossing over nélküli), vagy csak rekombináns gamétákat eredményezne.
20. X^*Y, X^*X^*Y ; vad típusú hím és nőtény; a *white* recesszív allél.
21. $DDDDdddd; DdDDDDd, DDdddDD, ddDDDDd$ vagy $ddDDddDD$.
22. Centromeron–F–E.
23. 0,028; 0,0045.
24. A rekombináció bizonyos régiókban lokalizálódhat.
25. Mendel egyáltalán nem fogalmazhatta volna meg a független kombinálódás törvényét.

6. FEJEZET

1. A döntő megfigyelés az volt, hogy a hővel előlt virulens *Streptococcus pneumoniae* törzs sejtjei átalakították, transzformálták az avirulens törzs sejtjeit virulensekké. Mivel a gének felelősek az öröklődésért, ennek a transzformációnak az öröklődő volta valószínűvé tette, hogy a transzformáló anyag egy gén vagy gének.
2. Averynek és munkatársainak a kísérlete megbízhatóbban igazolta, hogy a DNS az örökítő anyag. A transzformációhoz gondosan tisztított DNS-t használtak. A Hershey–Chase-kísérletben a fág fehérjéjének mintegy 10%-a került be a gazdasejtbe a fág-DNS-sel. Elvben ez a fehérje is lehetett volna az örökítő anyag.
3. Nem. Mind a fehérje, mind a DNS tartalmaz C-t és H-t. Ezzel ellentétben a Hershey–Chase-kísérletben radioaktív jelölésre használt ^{32}P és ^{35}S specifikus volt a DNS-re, illetve a fehérjékre. Ezért tették még egyértelműbbé a vírusrészek azonosítását.
4. $5'-CGAATGCT-3'; 3'-TCGTAAGC-5'$.
5. ATGTCCAGTCC
TACAGGTCAGC
6. 30% timin; 20% citozin. A timin és az adenin mennyisége azonos, ugyanígy a citoziné és a guaniné is.
7. (a) 12 000 teljes csavarulat (120 000 bázispár/10 bázispár/fordulat); (b) 40,8 mikron (12 000 fordulat \times 34×10^{-4} mikron/fordulat); (c) $79,2 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^5$ bázispár \times 660/bázispár); (d) 240 000 foszforatom (120 000 mindegyik szálon).
8. Mivel a fág-DNS $C_{\theta 1/2}$ -je 200-ad része az *E. coli* DNS-ének, mérete is 200-ad része, vagyis 21 000 bázispár.
9. A fág-DNS $1/2$ -ad része a baktérium DNS-ének, ezért a C_{θ} értéke is $1/2$ -ada a baktérium DNS-ének.
10. 550 bp.
11. Avery és munkatársai az (S) virulens sejtek sejtmentes kivonatát használták transzformáló anyagként. Mivel nem keverték virulens sejteket az avirulensekhez, nem volt arra lehetőség, hogy a virulens sejtek újraledjenek.
12. Körülbelül 53%. Mivel a T3 mRNS-ek a T3 DNS-ről íródnak át, komplementerek annak egyik szálával; G + C tartalmuknak közel azonosnak kell lennie a T3 DNS templát szálával. Nézzük a következő példát:

DNS: GAGCTACGGC
CTCGATGCCG
↓ Transzkripció
mRNS: GAGCUACGGC

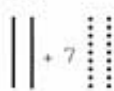
A DNS G + C tartalma: $1/2$ bázis, 70%; a mRNS G + C tartalma $1/2$, 70%.
13. A transzkriptum purin bázis tartalmát nem lehet előre megmondani, ha csak a kétfonalas DNS purin bázis tartalmát ismerjük. Ez ugyanis attól függ, hogy melyik DNS-szál íródik át. Ha például egy GGGCTA szál íródik át, az mRNS CCCGAU lesz, $1/2$, azaz 33,3% purin bázissal. A komplementer szál átírása a GGGCUA mRNS-t eredményez, és itt $1/2$ vagyis 66,7% purin bázis lesz.
14. (a) 
(b) 
(c) 
15. (a) $5'-GTCAATCGTAGCGGCCATAT-3'$
 $3'-CAGTTAGCATCGCCGGTATA-5'$
(b) $5'-AUAUGGCCGCUACGAUUGAC-3'$
16. 100 fehérje (120 000/1200 = 100).

7. FEJEZET

1. (a) Diszperzív:



(b) Konzervatív:

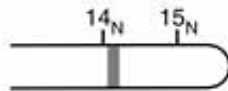


(c) Szemikonzervatív:

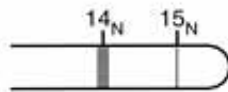


A 8 DNS-molekula 3 egymást követő diszperzív típusú megkettőződés után heterogén keveréke lenne a ¹⁵N és ¹⁴N jelölt DNS-nek, a jelölés 1/8-a ¹⁴N lenne.

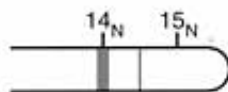
2. (a) Diszperzív:



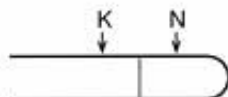
(b) Konzervatív:



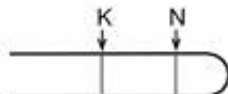
(c) Szemikonzervatív:



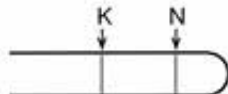
3. (a) Diszperzív:



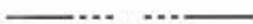
(b) Konzervatív:



(c) Szemikonzervatív:

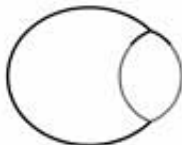


4. A középső részen található jelöletlen szakasz azt a DNS-darabot jelenti, amelyik még a radioaktív timidin hozzáadása előtt megkettőződött. A szaggatott vonal a beépült kis specifikus aktivitású timidint jelöli. A folyamatos vonal a beépült nagy specifikus aktivitású timidin helye:



5. Két replikon van, az egyik előbb kezdi a replikációt, mint a másik. A később működésbe lépő replikonok eredményezik azokat a fonalpaárokat, amelyek közepén nagyobb a rés.

6.



— = Kis specifikus aktivitás
 — = Nagy specifikus aktivitás

7. (a) A pulzusszerűen jelölt DNS sűrűséggradiens centrifugálásakor csak egy, nagy DNS-eket tartalmazó csúcs jelentkezne. Nem lennének Okazaki-fragmentumok, függetlenül attól, milyen rövid a jelölés

időtartama. (b) A DNS-polimeráznak mindkét irányban képesnek kellene lennie a szintézisre, 3' → 5', illetve 3' → 5' irányban is.

8. A helikázok elválasztják egymástól a két DNS-fonalat a replikációs villa előtt. A folyamathoz energia szükséges, és ez ATP hidrolíziséből származik. Ez indokolja az ATPáz-aktivitást.

9. A helikázok széttekerik a DNS-t, míg a topoisomerezók megváltoztatják a DNS topológiáját a szupercsavarulatok számának növelésével vagy csökkentésével. A helikázok nem törnek el a DNS-fonalakat, a topoisomerezók működésének azonban szükségszerű eleme egy időleges, átmeneti törés kialakítása.

10. Az egyfonalas DNS-t kötő fehérjék (SSB) kooperatívan kötődnek az egyfonalas DNS-re, a kétfonalasra viszont nem. Ez azt jelenti, hogyha egy molekula már bekötődött, akkor ez nagymértékben elősegíti további molekula kötődését is. A kétfonalas molekulán ez nem következik be.

11. Pozitív szupercsavarulatok.

12. A primoszóma a késlekedő szál templátjához kötődik. Ennek van értelme, hiszen a késlekedő szálnak mindegyik Okazaki-fragmentumhoz új primerre van szüksége. A vezető szál többé-kevésbé folyamatosan replikálódik, csak ritkán szükséges hozzá újabb primer.

13. A két polimeráz centrummal rendelkező repliszóma képes a két fonál többé-kevésbé egyidejű replikálására, folyamatosan a replikációs villa irányában haladva. Nem jár idővesztéssel a leválás és a DNS-sel való újabb kötődés.

14. A primer szintézise nem igényel nagy pontosságot a bázispárok kialakulásakor. Ezért nincs leolvasáshelyességet ellenőrző rendszere. Ha hibás nukleotid épül be egy primerbe, akkor az ott is marad.

15. Az RNS-genomokat RNS-szintetizáló enzimek kettőzik meg. Ezeknek nincs szükségük primerre, és a javító funkció sem működik. A nagy RNS-genomok ezért túl sok hibát halmoznak fel. Ezenfelül, az RNS jóval kisebb stabilitású a DNS-nél, így a nagyméretű RNS-genomok hajlamosak a lebomlásra.

16. Az ismétlődő szakaszok közötti DNS delécióra kerül.

17. Az ismétlődő szakaszok közötti DNS inverziós lesz.

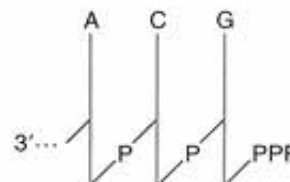
18. (a) 6 A és 2 a; (b) 4 A és 4 a.

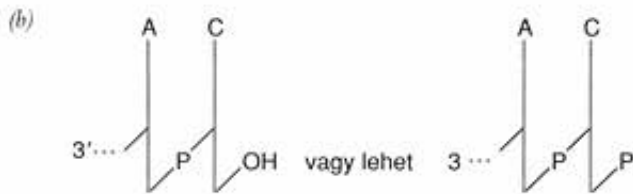
19. (a) $2,1 \times 10^3$ másodperc vagy 35 perc. Tekintettel arra, hogy a DNS két irányban replikálódik és 1000 nukleotid/másodperc sebességgel:

$$\frac{4,2 \times 10^6}{1 \times 10^3} \times \frac{1}{2}$$

20. 40,8 mikron. Mindkét irányba 1000 bp/s sebességet feltételezve, a két repliszómán $60 \times 2000 \text{ bp} = 120\,000 \text{ bp}$ replikálódik egy perc alatt. Tehát $120\,000 \text{ bp} \times 3,4 \times 10^{-4} \mu\text{m}/\text{bp} = 40,8 \mu\text{m}$.

21. (a)





(c) A DNS 5' végéről elveszett a trifoszfátcsoport. Mivel a földi DNS-szintézisnél a foszfodiészter-kötés kialakulásához szükség van erre a trifoszfátcsoportra, a hiány gátolja a szintézist mindaddig, amíg a helyreállítás nem történik meg. A Zorb élőlényei valószínűleg rendelkeznek olyan mechanizmussal, amely megoldja ezt a problémát.

8. FEJEZET

1. Az RNS-polimeráz holoenzim *in vitro* aktívan átírja a rést (nick) nem tartalmazó T4 DNS-t. A transzkripció specifikus (csak a közvetlen korai génekre) és aszimmetrikus. A templátot a core-enzim csak gyengén írja át. A transzkripció nem specifikus és szimmetrikus.
2. (a) Fokozó hatású. A C → T mutáció az első pozícióban TATAGT szekvenciájú -10 boxot eredményez, és ez közelebb áll a konszenzus szekvenciához. (b) Gyengítő hatású. A T → A mutáció az utolsó pozícióban CATAGA szekvenciát ad, amely kevésbé hasonlít a -10 box konszenzus szekvenciájához.
3. Az operon génjei együtt íródnak át, egyetlen promotertől kiindulva. Ezért erről a promoterről történő transzkripció szabályozása mindegyik gént érvényesül.
4. (a) A *lac* operon mindig bekapcsolt állapotban van, mert a represszor csak akkor tudná leállítani, ha kötődne a *lac* operátorhoz. (b) Ugyanaz, mint az (a) esetben. (c) Az operont nem lehet indukálni. A represszor induktor jelenlétében is kötődik az operátorhoz. (d) Csak gyengén íródik át az operon. A CAP-cAMP komplex még glükóz hiányában sem serkenti a polimeráz kötődését a *lac* promoterhez.

5. β -galaktozidáz termelésére

vonatkozó fenotípusok

Nincs induktor	Van induktor	Indoklás
-	+	Vad típusú
-	+	Z^+ domináns
-	+	I^+ domináns
-	-	I^s domináns
+	+	O^c domináns
-	+	O^c csak <i>cisz</i> -domináns
+	+	O^c domináns, még az I^s represszor jelenlétében is, mivel az O^c operátor nem képes megkötni az I^s represszort.

6. (a) Mivel a mutáns fenotípusa konstitutív, genotípusában hordoznia kell egy mutációt. Ezért I^s az I^- .

- (b) Mivel az I mutációja gátolja a *lac* működését, és domináns, az I^s az I^- .
- (c) Mivel a részleges diploid vad típusként viselkedik, az I^s vagy az I^+ , vagy I^- (I^- recesszív).
- (d) Mivel a mutáns konstitutív, az I^s az I^- .
- (e) Mivel a mutáns konstitutív, az O^c az O^+ .
- (f) A részleges diploid vad fenotípusú, így O^s az O^+ .
- (g) A részleges diploid nem szintetizál β -galaktozidázt, még a szabályozó lokuszok vad típusa ($I^+ O^+$) mellett sem, a Z^s biztosan Z^- .

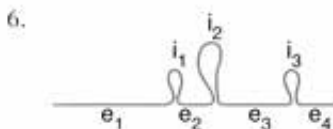
7. Nincs induktor Van induktor

- (a) - + P^+ domináns. A *lac* operon a vad típusú promoterral működik, még akkor is, ha a másik nem. Ezért vad fenotípus alakul ki.
- (b) - - Egyik promotor sem képes az RNS-polimeráz megkötésére, egyik *lac* operon sem működik.
- (c) - - A vad típusú Z gént hordozó operon promotere nem működőképes, a vad típusú promoterral bíró operonnak pedig a Z génje nem működik. Működőképes promotor nélkül még aktív represszor hiányában sem működhet *lac* operon.
8. Az enzimek közül kettő két különböző polipeptidet tartalmaz. Ezért öt gén öt eltérő polipeptidet határoz meg, amelyek három enzimet építenek fel.
9. (a) 700-szoros; 70-szeres a derepresszió miatt és 10-szeres az attenuáció megszűnése miatt. (b) 70-szeres; az attenuáció 10-szeres erősítő hatása elvész, mert az új UGA stoppjel miatt a riboszóma leválik az RNS-molekuláról. (c) 70-szeres; mivel a vezérszekvenciából eltűnnek a triptofán kodonok, így a riboszómák nem állnak le az aminosav hiányában, vagyis az attenuáció nem érvényesül. (d) 70-szeres; az attenuáció nem működhet, mert a G-fűzér nem szerepelhet a megfelelő terminátor részeként.
10. (a) Csak a korai gének, mert a 28. gén terméke szükséges a középső szakasz génjeire való átváltáshoz. (b) és (c). A korai és a középső szakasz génjei, mert mind a 33., mind a 34. gén terméke szükséges a késői gének transzkripciójának bekapcsolásához.
11. Csak a korai gének (I. csoport) íródnának át, hiszen az 1. gén kódolja a T7 RNS-polimerázát, amely átírja a későbbi géneket.
12. A sejtek nem lennének képesek sporulációra, mert a σ^C és σ^E faktorok szükségesek ahhoz, hogy a *B. subtilis* polimerázának transzkripció specifikitása átváltson a vegetatív génekről a sporuláció génjeire.
13. A represszor génje (cf).
14. Mindegyik, a represszor gént kivéve.

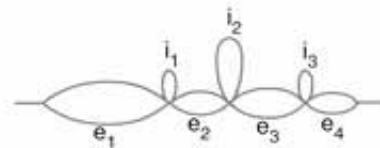
15. A fertőzés késleltetett korai fázisában készült transzkriptumok iniciálása a közvetlen korai promotereken történik. Ezért az összes ilyen közvetlen korai termék, beleértve a pN-t is, folyamatosan termelődik a késleltetett korai fázisban is.
16. Nem eredményezheti a σ működését, mivel a σ génnek a nem-templát szála íródik át, így antiszenz RNS képződik.
17. A P_{RE} -ről induló transzkripció a késleltetett korai gének, a cII és a $cIII$ termékeitől, míg a P_{RM} -ről induló transzkripció magától a represszortól függ. Ezért ezen promoterek egyike sem lehet aktív, mielőtt más λ -génnek nem működtek.
18. Pozitív. A késleltetett korai gének működése a pN nélkül leáll.
19. (a) Egyes sejtek a tarfolton belül lizogének, ezért immunisak a felülfertőzéssel szemben. Ezek növekednek és zavarossá teszik a plakkot. (b) Nem, a represszor mutáns képtelen a sejt lizogénné alakítására, így tarfolja tiszta.
20. Egyik sem. Mivel nem képződik aktív pN, nem történik antitermináció sem, a fág megreked a közvetlen korai fázisban. Mivel nincs cII , a cI gén sem aktiválódhat, nem jöhet létre a lizogén állapot.
21. A felismerő hélix.

9. FEJEZET

1. A klasszikus polimeráz III promotor a szabályozott gén kódoló régióján belül található. A promotor bármiféle változása ezért a kódoló rész bázissorrendjét is módosítja, és így a génterméket is.
2. Először is, minden eddig vizsgált eukarióta szervezetben találtak nukleoszómákat. Másodszor, a legtöbb hiszton szekvenciája rendkívül konzervatív, nem mutat változatosságot. Ha nem lennének létfontosságúak, evolúciójuk gyorsabb lett volna.
3. A 11 nm-es fonal lényegében egy nukleoszómafüzér. A nukleoszómákban szerepel mind az öt hiszton, de a H1 csak kívülről kötődik. Mivel a H1 nem fontos a nukleoszóma kialakításában, hiányában nem szűnne meg a 11 nm-es fonal, de átlagos átmérője kissé csökkenne. A H1-nek ugyanakkor aktív szerepe van a nukleoszómafüzér szolenoiddá (25 nm-es fonal) történő feltekeredésében. A H1 eltávolítása megakadályozza a szolenoid kialakulását.
4. Az eukromatikus kromoszóma, mivel a másik heterokromatikus X-kromoszóma nagymértékben kondenzált DNS-t tartalmaz, amelynek génjei hozzáférhetetlenek a transzkripciós gépezet számára, ezért inaktívak.
5. Hasonlóság: Mindkettő serkenti a gének transzkripcióját. Különbség: A σ -faktor szoroson köti a holoenzimet a promoterhez, de maga nem kötődik. Az eukarióták legtöbb transzkripciós faktora ugyanakkor az RNS-polimeráztól függetlenül kapcsolódik a promoterekhez.



7.

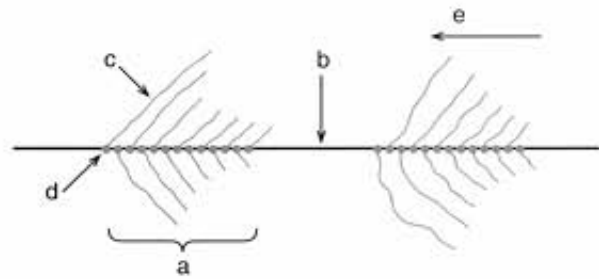


8.



9. A TATA-box (TATAAAT) második A-jától 27 bázissal lefele található a TTAGCT szekvencia. Ebben, a TATA box közepétől számított 29. és 30. pozícióban két purin bázis (A és G) található. A legnagyobb valószínűséggel ezek adják a kezdőpontot.

10.



11. GpppXpY . . .

12. Annak kimutatására, hogy van-e poli(A)-fárok az mRNS-en, emészteni kell RNáz A-val és T1-gyel. Ezután elektroforézissel szét kell választani a megmaradó RNS-t, annak kimutatására, hogy van-e benne poli(A)-fárok. (Az RNáz A a C és az U után hasítja az RNS-t, míg az RNáz T1 a G után. Így csak az egymáshoz kapcsolódó adeninek, például a poli(A)-fárok marad meg az emésztés után.) Annak igazolására, hogy a poli(A)-fárok a 3' végén helyezkedik el, rövid ideig emészteni kell az mRNS-t egy 3' specifikus RNázal. Ez esetben csak akkor következik be a poli(A)-szakasz gyors degradálódása, ha a 3' végnél található.
13. Először klónozzunk egy GAGA-boxot tartalmazó gént, majd vigyünk mutációkat a GAGA szekvenciába. Tegyük át a mutáns gént az algából származó *in vitro* vagy *in vivo* transzkripciós rendszerbe, és vizsgáljuk meg a mutációk hatását a transzkripcióra. Ha a GAGA-box az SV40 TATA-boxához hasonlóan viselkedik, akkor a mutációknak növelniük kell a transzkripciós kezdőpontok heterogenitását.
14. Az intron része lenne. A foszfátcsoport a lasszó elágazásában szerepel.
15. Az exonnal maradna. A foszfát része annak a foszfodiészter-kötésnek, amely a két exont kapcsolja össze az érett mRNS-ben.

10. FEJEZET

1. A tRNS-ek sokkal szorosabban kötődnének egymáshoz a szabad trinukleotidoknál, mert az antikodonok olyan helikális konformációt vesznek fel, ami kedvez a bázispárok kialakulásának.
2. Az alanin a metionin helyére épülne be, mert az antikodon, és nem az aminosav határozza meg egy adott kodonnal való kapcsolódást.
3. Az aminoacil-tRNS szintetázok kulcsfontosságúak a transláció pontosságában. Ha hibáznak, a translációs gépezet helytelen aminosavakat épít be.

4. Első reakció: aminoacil-AMP + pirofoszfát. Második reakció: aminoacil-tRNS.
5. (a) Átfedő 10 (AUG, UGG, GGC, ...); nem átfedő 4 (AUG, GCA, GUG, CCA). (b) Átfedő 3 (UGC, GCC, CCA); nem átfedő 1 (CCA).
6. (a) A leolvasási keret két bázissal csúszik el, és így a gén nem működne megfelelően. (b) A leolvasási keret nem változik, a gén működőképes maradna, kivéve, ha a fölös három bázis olyan aminosavat kódol, amely a génterméket inaktíválja. (c) A leolvasási keret nem változik, a gén működne, ha csak a két szomszédos kodon változása nem inaktíválja a génterméket.
7. A termék ismétlődő dipeptid lenne. A két kodon UUCGUU és CGUUCG lenne, ha feltételezzük, hogy a transláció az RNS kezdetétől indul.
8. A fehérjékben a fenilalaninok helyén argininnek lennének. A megváltozott elsődleges szerkezet miatt a legtöbb vagy akár mindegyik fehérje hibásan működne vagy működésképtelen lenne.
9. Nem történhetne meg az iniciáció annál a pontnál. A szekvencia következő AUG kodonja lehetne az iniciáció helye, a képződő fehérjéről azonban hiányozna az eredeti szekvencia N-terminálisának egy része.
10. (a) fMet-Phe-Lys-Met-Val-Thr-Trp. Az utolsó előtti UAA stopjel, ezért az utolsó AUC kodon nem fordítódik aminosavra. (b) fMet-Val-Thr-Trp. A bázis megváltozása módosítja a startjelet, ezért a negyedik kodon (AUG) lenne az iniciáció helye; a polipeptid lerövidülne, csak 4 aminosavból állna. (c) Nem változna az aminosavsorrend; az UUU és az UUC is fenilalanint kódol. (d) fMet-Leu-Lys-Met-Val-Thr-Trp. (e) fMet-Phe-Lys-Met-Val-Thr. A Trp kodon stopjellé változott.
11. AUG AAC CAC GAC UUA UAG(stop). A másik lehetséges változat AUG UUC UGA(stop) lenne, ami az 5' véghez közelebb kezdődik, de sokkal rövidebb.
12. (a) Leu, Ser és Arg. (b) Trp és Met.
13. 256 (4⁴).
14. CUU és CUC.
15. UAI.
16. A cloacin DF13 meggátolja a translációt, mert eltávolítja a 16S rRNS-nek azt a részét, amely az mRNS Shine-Dalgarno-szekvenciájával képez bázispárt, és az mRNS-t a riboszómához köti. Az erős riboszóma-mRNS kötődés nélkül a transláció gátlás alá kerül.
17. Gyengén translálódó mRNS. Főként azért, mert nincs vezérszekvencia, így Shine-Dalgarno-szekvencia sem, amelyhez a riboszómák könnyen kapcsolódhatnak.
18. A (b) mRNS kerülne legaktívabban translációra. Az (a) nem kötődne a 40S riboszóma alegységhez, mert a sapka közelében van a hajtű. (c) Nem kerülne translációra olyan aktívan, mint a (b), mert rövidebb a vezérszekvenciája. (d) Transzlációja nem lenne hatékony, mert nagy hajtű van a vezérszekvenciájában. (e) Nem lenne olyan kedvező a translációja, mint (b)-é, mert hiányzik róla a hajtű éppen az iniciációs kodontól lefelé (downstream).
19. (a) Transzlokáció során; (b) az aminoacil-tRNS és a riboszóma kapcsolat kialakulásakor; (c) a peptidkötés kialakulásakor.
20. fMet-tRNS. Az aminoacil-tRNS-nek a P helyre kell kerülnie, hogy az A hely szabaddá váljon a következő beérkező aminoacil-tRNS számára.
21. 402. Ha ez nem kézenfekvő, vegyünk egy dipeptidet. A dipeptidben csak egy peptidkötés kapcsolja össze az aminosavakat, így csak egy peptidil transzferáz reakciót igényel a szintézise. Vagyis a polipeptid kialakulásához szükséges peptidil transzferáz reakciók száma eggyel kevesebb a polipeptid tagjainak számánál.
22. A szuppresszor törzs összes QT fehérjeje extra tirozint tartalmazna a C-terminálisán, mert a szuppresszor tRNS mindegyik gén első stopjelét (UAG), mint tirozin kodont azonosítaná.
23. A vad típusú Gln antikodon 3'-GUU-5' (a Gln kodont, 5'-CAA-3' ismeri fel). Az ochre szuppresszor antikodon 3'-AUU-5', ami felismeri az 5'-UAA-3' ochre kodont. A változás egy G → A tranzíció volt az antikodon 3' terminális bázisánál.
24. Ki kell mutatni, hogy a mutáns növekszik *c*-vel, de a *b*-vel nem. Ez pedig azt jelenti, hogy a *b* → *c* reakciót katalizáló enzim, vagyis annak génje hibás.

11. FEJEZET

- Szomatikus mutáció. Ivarsejtet érintő mutáció esetén a szín egyöntetű lenne, vagy legalábbis valamilyen mintázat szerint alakulna. Az egyetlen fehér foltot valószínűleg egy olyan génmutáció okozta, amely egyetlen szomatikus sejtben következett be és a szín kialakulásáért felelős gént érintette. A mutáció az érintett sejtek osztódásával képződő sejtekben öröklődött.
- Tudjuk, hogy a sárga szín domináns, mert az utódok kétharmada sárga, vagyis a heterozigóták sárgák. A jelleg letális, mert az utódok egynegyede életképtelen. A sárga színt kialakító allél letalitása recesszív, mert csak a homozigóták pusztulnak el.
- Nem. A DNS polimeráz-III mutációi biztosan letálisak lennének, mert életfontosságú működést, a DNS replikációját érintik.
- Kondicionális letális mutációk. Vizsgálni lehetne a baktériumokat a kérdéses jellegre normál hőmérsékleten való tenyésztéssel, de azok csak alacsonyabb hőmérsékleten lennének életképesek.
- Nem, a génnek csak a terméke hőérzékeny, nem pedig maga a gén.
- Amikor bundájából egy foltot leborotvártak, bőrének az a része a többi területhez képest lehűlt, ezért a festékanyag szintézisét katalizáló hőérzékeny enzim aktiválódott, a szőrzet sötét színű lett. Amikor a kinőtt szőrzet megakadályozta a bőr lehűlését, az enzim inaktíválódott, és a sötét szín lassan kiféhéredett.
- Tranzícióhoz. A T tautomerizációja miatt bázispárképzési sajátsága a C-éhoz hasonló, ezért T → C tranzíció következik be.

8. (a) Pirimidin (speciálisan T) dimerek. (b) Ha a károsodás javíthatlan marad, akkor az leállíthatja a DNS-replikációt, vagy hibázásra hajlamos javítás történhet, ami mutációhoz vezethet.
9. (a) Töréseket a DNS-szálakban. (b) A kétfonális törések megfelelő javítása bonyolult, ezért ez a károsodás sokáig fennmarad.
10. Az mRNS bázissorrendje 5'-AUGGCCUAAAAGAGG-3' lesz. A leolvasási keret egy bázissal jobbra tolódik. Az mRNS az fMet-Ala dipeptidet kódolja, mert a harmadik kodon UAA, vagyis stopjel.
11. Egy bázis hozzáadása az mRNS-hez, lehetőleg az elején, ami kompenzálja az elveszett bázist, helyreállítja a leolvasási keretet.
12. A fotoreaktiváló enzim (DNS-fotoliáz) és az O⁶-metil-guanin metil transzferáz.
13. Az exonukleáz a polinukleotid-láncot (DNS-t vagy RNS-t) a szál végétől kezdve bontja, egyszerre egy bázist távolít el. Az endonukleáz pedig a láncon belül hasít.
14. Hosszú rés van az egyik szálon. Ilyeneket kimutattak az *E. coli* esetében, ami arra utal, hogy a baktérium a második, lépésenkénti javítási módot használja.
15. Azért, mert a károsodás tulajdonképpen megmarad, bár a DNS replikációja lezajlik.
16. (a) A vad típusú szekvencia TGG (az egyetlen Trp kodon), a mutáns szekvencia vagy TGT vagy TGC (mindkettő Cys kodon). (b) Mivel a kodon jelentése Trp-ről Cys-re változott, a változás misszensz mutáció (pontosabban transzverzió) volt.
17. (a) Egy C (vagy egy U) ékelődött be a második bázis mögé, aminek eredménye:

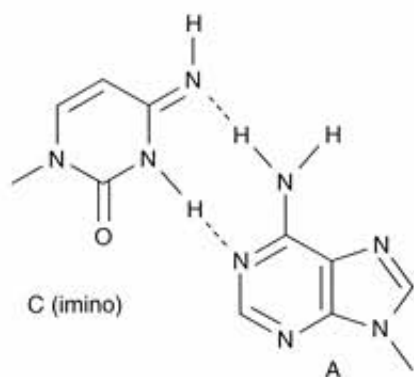
Asp	Ala	Stop
-----	-----	------

GAC	GCA	UAA	GC
-----	-----	-----	----

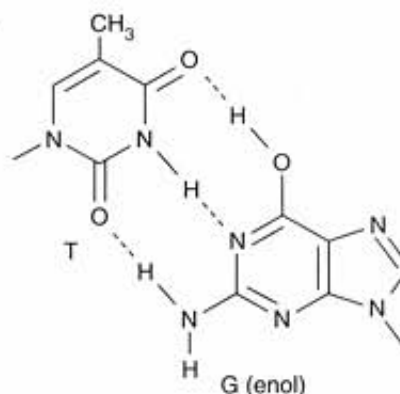
(b) A negyedik bázis (C) delécióra került, aminek eredménye:

Glu	Ile	Ser
GAG	AUA	AGC

18.



19.



20. (a) AUCGU AUG CAU GCA UCG UGA C. Ebben és más mRNS-szekvenciákban (alább) a kodonokat az első AUG-tól kezdve, szóköz választja el egymástól.
- (b) fMet-His-Ala-Ser
- (c) DNS: GTATCGTATACATGCATCGTGAC
CATAGCATATGTACGTAGCACTG
RNS: AUCGUAUAC AUG CAU CGU GAC
Fehérje: fMet-His-Arg-Asp
- (d) DNS: GTAC – a szakasz további része változatlan
CATG – ugyanaz
RNS: ACCGU AUG CAU GCA UCG UGA
Fehérje: fMet-His-Ala-Ser. Mivel a mutáció a kódoló régió kívül történt, a fehérje szekvenciájában nincs változás.
- (e) DNS: GTATCGTATGCATGCACCGTGAC
CATAGCATACTACGTGGCACTG
RNS: AUCGU AUG CAU GCA CCG UGA
Fehérje: fMet-His-Ala-Pro
- (f) DNS: GTATCGTATGCATGCATCATGAC
CATAGCATACTACGTAGTACTG
RNS: AUCGU AUG CAU GCA UCA UGA C
Fehérje: fMet-His-Ala-Ser. A mutáció nem módosította a kodon jelentését, ezért nem változott meg a fehérje szekvenciája sem.
- (g) DNS: GTATCGTATGCTGCATCGTGAC
CATAGCATACTGACGTAGCACTG
RNS: AUCGU AUG CUG CAU CGU GAC
Fehérje: fMet-Leu-His-Arg-Asp

12. FEJEZET

- (a) A transzpozáz génjeit és azokat az inverz ismétlődő szakaszokat, amelyeket a transzpozáz felismer. (b) Inverz terminális ismétlődéseket, amelyeket a másik transzpozon transzpozíziója felismer.
- Transzpozáz szükséges az áthelyeződéshez.
- A DNS nem minden esetben kerül át. A replikatív transzpozíció során a transzpozon nem hagyja el eredeti helyét. Ehelyett replikálódik és a kópiák egyike kerül az új helyre.

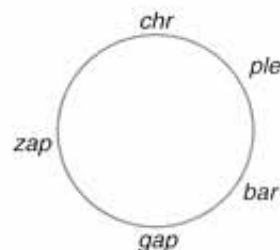
4. (a) A beépült transzpozont a gazda-DNS 5 bp direkt ismétlődő szekvenciái veszik körül. (b) Lásd a 12.3. ábrát. A hasítások 5 bp távolságra vannak egymástól, nem 9 bp-ra.
5. Megfelelő időt biztosítva a transzpozíció létrejöttéhez, izoláljuk a célplazmidot, és antibiotikumrezisztencia nélküli sejtek transzformálására használjuk. A transzformált sejteket klóramfenikolt és ampicillint is tartalmazó táptalajra szélesztjük. Csak azok a sejtek maradnak meg, amelyekbe bejutott a két antibiotikumrezisztencia génjét hordozó plazmid. A túlélő sejtek száma arányos azzal a gyakorisággal, amellyel a Tn3 áthelyeződött a célplazmidba.
6. Kevesebbre. A homológ rekombináció bizonyos homológiát feltételez a transzpozon és a célszekvencia között, ami automatikusan korlátozza a célhelyek számát. Az illegitim rekombinációhoz nem szükséges homológia, vagy csak igen kis mértékű, ezért az ilyen mechanizmussal működő transzpozon szabadon áthelyeződhet bárhová a cél-DNS-be.
7. (a) Replikon fúzió (kointegrátum kialakulása) és a feloldási lépés. (b) Egy kointegrátum.
8. (a) Nincs termék. A transzpozáz szükséges a köztes kointegrátum kialakulásához. (b) Egy kointegrátum.
9. (1) Az Mu DNS beépül a gazda-DNS-be a litikus replikációhoz, és (2) a DNS replikálódik az áthelyeződéskor.
10. Több, különféle antibiotikumrezisztenciát kódoló transzpozon helyeződhet át ugyanabba a plazmidba egy kórokozó baktériumban. A baktérium így rezisztenssé válhat mindegyik antibiotikummal szemben. Ráadásul, átadhatja a plazmidot más veszélyes kórokozóknak is, így azok is rezisztenssé válhatnak. Ha ezek a baktériumok okozzák a betegséget, nagyon nehéz védekezni ellenük, mert rezisztensek az alkalmazott gyógyszerekkel szemben.
11. Kettő. A két plazmid közötti határokon.
12. Nem, a Tn3 replikálódással helyeződik át, ezért nem hagyhatja el a C gént a transzpozíció során. A reverzió közel sem lenne ilyen gyakori.
13. (a) A kétszálú DNS replikációjának gátlói a leállítanak Tn3 transzpozícióját, de a Ty-ét nem, mivel a Tn3 transzpozíciója függ a replikációtól, a Ty retrotranszpozoné nem. (b és c) A transzkripció és a reverz transzkripció inhibitorai gátolják a Ty áthelyeződését, a Tn3-ét azonban nem, mivel a Ty áthelyeződéséhez és a retrovírusok replikációjához egyaránt szükségesek ezek a folyamatok. A Tn3-nak nem kell átíródnia, mert az áthelyeződéséhez szükséges összes géntermék jelen van a kivonatban. (d) A transláció inhibitorai egyikre sem hatnak, mivel a transzpozícióhoz szükséges összes fehérje megtalálható a kivonatban.
14. Az intron benne maradna a transzpozonban. Mivel a Tn3 áthelyeződésében nem szerepel RNS átmeneti forma, nem lenne lehetőség splicingre.
15. Az intron kivágódna.

13. FEJEZET

1. A genotípusok, illetve fenotípusok a következők: (a) lac^- , Lac^- ; (b) leu^+ , Leu^+ ; (c) thi^- , Thi^- ; (d) str^r , Str^r ; (e) pur^+ , Pur^+ ; (f) bio^+ , Bio^+ .

2. Prototrófok: (a), (b), (d), (e) és (f). Auxotróf: (c). A thi^- törzs az egyetlen, amelyik nem képes egy olyan anyag, a tiamin szintetizálására, amely szükséges a glükózt tartalmazó minimál táptalajon való növekedéshez.
3. Igen. Ha egyszeres mutánsokat használtak volna, akkor azok reverziós gyakorisága (egy a millióhoz) tízszer annyi prototrófot adott volna, mint a rekombinációs arány (egy a tízmillióhoz). Ezért a két mutáns törzset elkülönítetten nevelve majdnem annyi prototrófot figyeltek volna meg (egy a millióhoz), mint amikor együtt növesztették azokat (1,1 a millióhoz). Vagyis nem tudták volna eldönteni, hogy rekombinációt és reverziót figyeltek-e meg, vagy pedig csak reverziót.
4. Általában nem tartalmazza a donorsejt teljes genetikai anyagát, vagyis nem valódi diploid. Rekombináció előtt a sejt instabil merodiploid, rekombináció után haploid.
5. A Ton' fenotípust mutáció okozza. Ha adaptáció következménye lenne, akkor minden tenyészet körülbelül azonos mértékű rezisztenciát mutatna a fágra. (A megadott eredményeket kapta Luria és Delbrück 1943-ban.)
6. Az F plazmid beépülése a gazda kromoszómájába. Ennek hatására a gazdasejt kromoszómája mobilizálódik, és egy szabályos F plazmidhoz hasonlóan képes átjutni (általában csak részlegesen) a recipiens sejtbe.
7. A konjugáló sejtek közötti összeköttetés rendszerint még azelőtt megszakad, mielőtt az egész kromoszóma átjutna.

8.



9. A konjugáció valószínűleg megszakad, hasonlóan a földi baktériumokhoz. Ez lecsökkenti annak az esélyét, hogy a kromoszóma vége felé található gének is átjussanak. A konjugációnak vége szakad rendszerint még azelőtt, hogy ezek átadása megtörténne.
10. 25 perc. Először a *chr* marker jutna át, 50 perccel a konjugáció kezdete után. A következő a *ple*, 75 perccel a konjugáció indulása után. Az átadási idők közötti különbség így 25 perc.
11. *gap-bar-ple-chr-zap*
12. Rekombinációval juttassunk be egy mutáns *zap* operont egy F-*zap* plazmidba, amely $hisB^+$. Vigyük be ezt az F-*zap* plazmidot egy *X. gigantii* törzsbe, amely érzékeny a letalmicinre (let^r). Konjugáltassuk ezt a törzset egy F⁻ recipiens törzssel, amely *zap* egy másik mutáns *zap* operon miatt, ugyanakkor $hisB^-$ és let^r . Szelektáljunk $hisB^+$ és egyben let^r sejtekre, oly módon, hogy hisztidinmentes és letalmicint tartalmazó táptalajon növesztjük. Ez olyan F⁻ sejteket eredményez, amelyek konjugáción mentek keresztül és felvették az F-*zap* plazmidot. Ezzel mindkét mutáns *zap* operon egy sejtbe került – az egyik a kromoszómán, a másik az F⁻ plazmidon van. Vizsgáljuk meg ezeket a sejteket a Zap

fenotípusra. Ha a mutációk különböző génekben vannak, akkor komplementálják egymást, és nagyszámú Zap⁺ kolónia képződik. Ha a mutációk ugyanabban a génben vannak, nagyon kevés Zap⁺ sejt jelenik meg, ha egyáltalán megjelenik.

13. Származhatnak két DNS-molekula rekombinációjából, amelyek ugyanabban a génben tartalmazznak mutációkat (*zapA* és *zapB*). Történhetett intracisztronos komplementáció is, ahogyan azt az *E. coli lacZ* génjénél láttuk. Annak ellenére, hogy ez utóbbi mechanizmus viszonylag hatékony lehet, a rekombinációnak nagyobb a valószínűsége.
14. A λ -fág fejében mintegy 10%-nyi fölös DNS számára van hely. Ezért a λ -DNS csak a profág egyik oldaláról, vagy a *gal*, vagy a *bio* felőli részről vehet fel gazda eredetű géneket, mindkét helyről nem.
15. Igen, kotranszdukcióna is sor kerülhet, mert az *E. coli* genomjának 2,4%-ánál közelebb vannak egymáshoz, ez a DNS-mennyiség pedig befér a P1 fág fejébe. A képlet alkalmazásával: gyakoriság = $(1 - d/L)^2$ 2% kotranszdukciónak gyakoriságát jósolhatunk, ami nincs nagyon távol az 1% tényleges gyakoriságtól.
16. Először fertőzzük meg az első Zip⁻ törzset (genotípusa *zap⁺ zip₁⁻*) a Q2-vel, és gyűjtjük össze az utódfágokat. Használjuk fel ezeket a második Zip⁻ törzset (*zap⁻ zip₂⁻*) megfertőzésére; és szelektáljunk Zap⁺ transzdukánsokra. Minthogy ezek *zap* gént kaptak, nagy az esélye annak, hogy felvették a szorosan kapcsolt *zip* gént is. Tehát a Zap⁺ transzdukánsokat megvizsgálhatjuk a Zip⁻ transzdukánsokra is, amelyek a két *zip* mutáció (*zip₁⁻*, *zip₂⁻*) közötti rekombinációból származnak. Minél távolabb van egymástól a két mutáció a *zip* génben, annál nagyobb ezeknek a Zip⁺ transzdukánsoknak a gyakorisága.
17. *zip-zap-bop*. Ha a sorrend a *zip-bop-zap* lenne, akkor a Bop⁺ Zip⁻ transzdukánsok sokkal ritkábbak lennének, mint a Bop⁺ Zip⁺ típusúak.
18. A markerek sorrendje *auk-nrd-kat*. Az Awk⁺ Kat⁺ Nrd⁻ transzdukánsok a legritkábbak (1 az 1063-ból); tehát ezek jönnek létre 4 crossing overrel. Ez csak a fenti sorrend esetén lehetséges. Az *auk* és a *kat* közötti kotranszdukciónak gyakorisága: $(1 + 115)/1063 = 0,11$. Az *auk* és az *nrd* közötti kotranszdukciónak $(309 + 115)/1063 = 0,40$.
19. $(250 \text{ tarfolt}/0,05 \text{ ml}) \times 10^6 \text{ hígítás} = 5 \times 10^9 \text{ pke/ml}$.
20. A görbe korábban kezd emelkedni, és meredeksége fokozatosabb. A háttérben az áll, hogy a fertőző fágok még a lízis előtt megjelennek a sejtekben. Ezt mutatjuk ki a sejtek felszakításával.
21. K M L (vagy L M K).

14. FEJEZET

1. A vörösvérsejtek életképesek hemoglobinnélkül, de a szervezet nem. A hemoglobin minden szövet oxigén-ellátásához nélkülözhetetlen.
2. (a) Csak determinált. (b) Determinált és differenciált.
3. Két sejtosztódás után a sejtek száma csak négy, ami egyetértéjű négyes ikrek kialakulásához vezethet, ha a sejtek elválnak

ahelyett, hogy együtt maradnának egy embrióban. Ötös ikrek így nem alakulhatnak ki. Még egy sejtosztódással nyolc blastoméra keletkezik, ami bőven elegendő az ötös ikrek kialakulásához, ha a sejtek totipotensek. Ha már vesztettek genetikai potenciájukból, nem fejlődhetnek teljes egyedde.

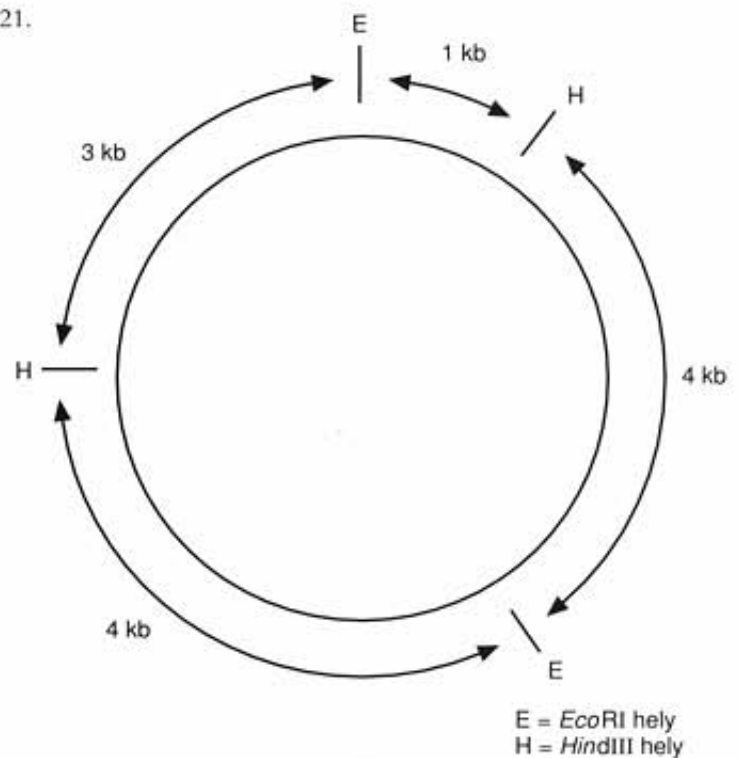
4. Sem DNáz-hiperszenzitivitást, sem -aktivitást nem figyelhetnénk meg. Azért, mert az először hozzáadott hisztonok rákötődnek a génre és annak 5' határoló régiójára, kialakítva a nukleoszóákat. A tizennégy napos kivonatban található faktorok várhatóan nem távolítják el ezeket a nukleoszóákat.
5. Egy klónozott génnel pontosan meghatározott méretű és lokalizációjú deléciók juttathatók be, majd vizsgálható a módosított gén fényérzékenysége. Klónozott gének nélkül a deléciókat csak bizonytalan genetikai módszerrel lehetne bejuttatni, és sem helyük, sem méretük nem lenne egyértelműen meghatározott.
6. Az 5' határoló régiójában mutációt hordozó gén működésének megkülönböztethetőnek kell lennie a vad típusúétól. Ha a mutáns rubisco gént borsóba juttatnánk vissza, expresszióját nem lehetne egyszerűen elkülöníteni a borsó eredeti, már meglévő rubisco génjének működésétől.
7. A gén aktív lesz, mert nincs jelen HI hiszton, amely összekapcsolná a nukleoszóákat.
8. A korai embrionális sejtek gyorsan osztódnak, ezért sok fehérjére van szükségük, és sokat is termelnek. Az 5S rRNS a fehérjeszintézisben szereplő riboszómák egyik alkotóeleme.
9. (a) A vitellogenin gén (ovalbumin nem termelődik a májban). (b) Egyik sem.
10. A citoplazma mRNS-szintje nemcsak a transzkripcióval függ össze. Befolyásolja a sapkaképződés, a poliadeniláció, a splicing, a transzport és az RNS-ek lebomlása is.
11. Radioaktív RNS-prekurzorokkal történő pulzusjelöléssel, majd jelöletlen prekurzorok hozzáadásával. Különböző időtartamú jelölés után a jelölt teljes mRNS-t (poliadenilált RNS) hibridizálni kell a vizsgált mRNS-sel komplementer cDNS-sel. Minél több jelölt RNS tud hibridizálódni egy adott idő után, annál stabilabb a kérdéses mRNS.
12. Az első huszonegy aminosav alkotja a szignálpeptidet, amely a fehérje érése során eltávolításra kerül.
13. A mutáns géneket hordozó egyedek fejlődése rendellenes.

15. FEJEZET

1. *XglI* (*Xenobacterium giganticus*).
2. GATATC.
3. Minden 4⁵ = 1024-edik bázis.
4. *Bam*HI és *Bg*III. 5'-GATC-3'.
5. Nem. A két DNS összekapcsolása után kialakuló hely (GGATCT) hibrid – az egyik végén lévő szekvencia a *Bam*HI-re hasonlít, a másik végén lévő a *Bg*III-re. Ezért egyik enzim sem ismeri fel ezt a szekvenciát.

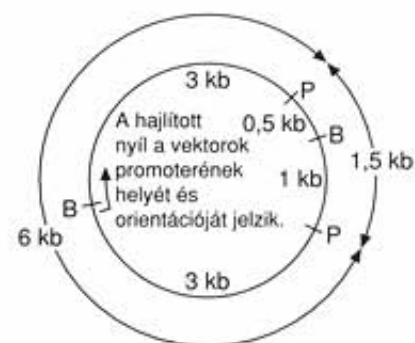
6. Összefüggő baktériumpázsit alakulna ki egyedi telepek helyett, mivel minden sejt növekedhet, nemcsak azok, amelyek antibiotikumrezisztencia géneket hordozó plazmidot tartalmaznak.
7. Tetraciklin. A pBR322 *Bam*HI helyére beépült szakaszok inaktiválják a tetraciklinrezisztencia génjét.
8. Nem. A pBR322 *Eco*RI helye kívül esik mind az ampicillin-, mind a tetraciklinrezisztencia géneken.
9. Nem. Az *E. coli*-sejtek szelektíven replikálják a kis inszerteket hordozó pUC plazmidokat. Ezért pUC klónok milliói kellenének a teljes genomális könyvtár elkészítéséhez egy összetett genom esetében.
10. Igen. A pUC plazmidok nagyon jól használhatók, és mivel a klónozott DNS teljes mennyisége nem túlságosan nagy, nem okoz gondot, hogy minden klónban csak korlátozott DNS-mennyiség van.
11. Mivel a dohányból származó próba és a borsó rubisco génje csaknem biztosan tartalmaz eltérő szekvenciákat, alacsonyabb hőmérsékletet kell alkalmazni, hogy stabil hibrid molekula képződhessen a két hasonló, de nem azonos szekvenciájú DNS között.
12. (a) Tyr-Met-Cys-Trp-Ile. (Az Ile kodonnak csak az első két bázisát használva.) (b) $2 \times 1 \times 2 \times 1 \times 1 = 4$,
(c) $6 \times 2 \times 1 \times 2 \times 1 = 24$.
13. Amikor a vektor és a beépített szakasz elég hosszú véget hordoz (megközelítőleg 12 bázis) a stabil hibrid kialakításához. Ezután a gazdasejtben, a transzformálás után lejátszódik a ligálási lépés.
14. Megakadályozza a klónozott gén fehérjetermékének idő előtti korai szintézisét, ami káros lehet a gazdasejtre.
15. Egy hatod. A fele lesz megfelelő orientációban, és ezek egy harmada pedig a helyes leolvasási keretben, mivel a lehetséges leolvasási keretek száma három; ($\frac{1}{2} \times \frac{1}{3} = \frac{1}{6}$).
16. Thr Asp Ser Val Gly
ACC GAT TCA GTG GGC
- A vastagon szedett betű jelöli azt a báziscserét, amelyik módosítja az Ala kodonját Ser kodonra.
17. A vírus DNS-ét hasítani kell *Eco*RI-vel, majd elektroforézissel el kell választani a keletkező öt fragmentumot. Ezután Southern-blotot kell készíteni, és azt hibridizálni a klónozott cDNS-ből származó radioaktív próbával. Az autoradiogramon látható a kérdéses öt fragmentum közül a megfelelő.
18. Mind az öt szövetből mRNS-t kell preparálni, majd elektroforézissel történő szétválasztás után Northern-blotot kell készíteni. Ezután a klónozott petúnia génről előállított radioaktív próbával hibridizálni kell a lenyomatot, és előhívni az autoradiogramot. A specifikus mRNS-t legnagyobb mennyiségben tartalmazó szövet adja a legerősebb sávot az autoradiogramon, mert annak mRNS-ével hibridizál legjobban a próba.
19. A génről készült mRNS(ek) méretét.
20. ATGAGTTGGCCAGCAGAGCGAGCATGGATGTAA

21.

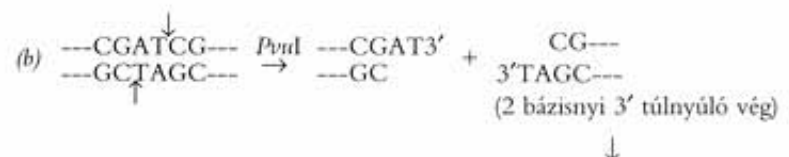
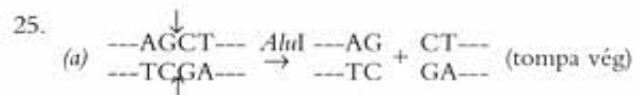


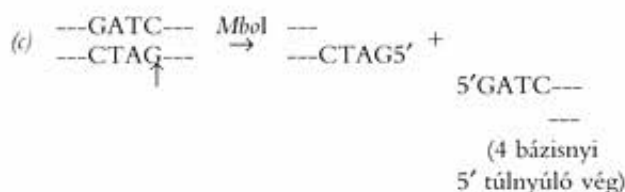
22. (a) *Pst*I. (b) A két *Pst*I fragmentum 1,5, illetve 6 kb lenne, ha az inszert orientációja megfelelő. (c) A két *Pst*I fragmentum mérete 3, illetve 4,5 kb lenne, ha az inszert orientációja nem megfelelő. (d) Lásd az alábbi ábrát:

(a)



23. (a) 9 és 6 kb. (b) 9 kb.
24. (a) 12 és 8 kb; (b) 7 és 3 kb; (c) 12 és 7 kb; (d) 8 kb.





26. (a) és (c) palindromok. A szimmetria-középpont a (c) esetén a középső AT párnál van. (b) és (d) tükörképek.

16. FEJEZET

- Ha a vírusok közül akár egyetlenegy nem inaktiválódna, AIDS alakulhatna ki.
- A fehérje sejtekből származna, például a klónozott gént tartalmazó baktériumokból vagy élesztőből, de nem magából a HIV-ből. Így nem okozhatna AIDS-t.
- (1) A β -globin gén működése rendszeresen szigorúan szabályozott, és ilyen típusú szabályozásra egy bevitt gén esetében nincs biztosíték; (2) A betegség gyógyításához az összegetek kellene transzformálni, és ez mind a mai napig túlságosan bonyolult.
- Az ép génnel korrigált sejtek képesek lennének DNS-szintézisre, így gyorsabban növekednének, mint a mutáns sejtek.
-

Vektor	Rák indukálásának		
	DNS beépítése	veszélye	képessége
Retrovírus	+	viszonylag nagy	viszonylag nagy
Adenovírus	-	viszonylag kicsi	viszonylag nagy
AAV	+	viszonylag kicsi	viszonylag kicsi

- (1) Azért, hogy a szervezetekben előnyösebb tulajdonságokat alakítsanak ki; (2) A transzgenek termékeinek kinyerésére.
- (1) A idegen gén klónozása egy Ti plazmidba, beépítése *Agrobacterium tumefaciens*-be, majd a növény fertőzése a baktériummal; (2) DNS-sel bevont parányi fémgyöngyök belövésével.
- Haplotípus Fragmentumok mérete (kb)**

A	2, 3 és 1
B	2 és 4
C	5 és 1
D	6
- A mikroszatellitek viszonylag egyenletesen elosztva találhatók meg a genomban, a miniszatellitek azonban a kromoszómavégeken csoportosulnak.
- Két telomera (mindkét végén egy-egy), egy centromeron, és természetesen legalább egy restrikciós hely, ahová az idegen DNS beépíthető.
- (a) Nem, csak az exonok csapdázhatók.
(b) Nem, csak a teljes exonok csapdázhatók.
(c) Igen, egy exon két végénél az intronokkal tartalmazza azokat

a splice-helyeket, amelyek biztosítják, hogy az exon a COS sejtekben bekerüljön az érett transzkriptumba.

- (d) Nem. Bár az exon teljes, nincs splice-helye az intron nélküli végén, ezért nem kerülhet bele az érett transzkriptumba.

- (1) Exoncsapdázással. (2) CG-szigetek keresésével. (3) Konzervatív, más szervezetek DNS-ével homológ DNS-szakaszok felkutatásával.
- (a) A mutáció következtében nő a CAG tripletek ismétlődéseinek száma, a normális 11–34 kópiáról 38 kópia fölé. (b) A betegek HD génjében mindig azonosítható a CAG tripletek szám fölötti ismétlődése. A sokszorozódás mértéke összefüggést mutat a tünetek jelentkezésének időpontjával. Két olyan beteg is ismert – azonosított szám fölötti CAG ismétlődésekkel –, akiknek szülei egészségesek voltak, és kromoszómaikon nem tartalmaztak szám fölötti CAG ismétlődéseket.
- A génnek az 5. kromoszómán kell lennie. Csak az a kromoszóma található meg mindegyik sejtvonalban, amelynek a DNS-e hibridizál a kérdéses próbával.
- (a) A leggyakoribb CF mutáció egy három bázispáros deléció, melynek következménye egy fenilalanin hiánya a CFTR fehérjében. (b) A következők bizonyítják, hogy a CFTR-t kódoló gén a CF: (1) Northern-blotokkal kimutatták, hogy ez a gén mindegyik, a CF által érintett szövetben átíródik; (2) Tudjuk, hogy a CFTR egy klorid-csatorna, mert mesterséges membránokban ezt a funkciót mutatja; (3) A CF páciensek mindegyike mutációt hordoz ebben a génjében; (4) A CFTR vad típusú génjével a CF sejtek hibás klorid-transzportja korrigálható.
- (a) $1,2 \times 10^{-10}$ ($0,03 \times 0,02 \times 0,01 \times 0,005 \times 0,04 \times 0,1$),
(b) $4,32 \times 10^{-6}$ ($2[0,06 \times 0,05^*] \times 2[0,2 \times 0,09] \times 2[0,1 \times 0,1]$).
*A 4%-ot 5%-ra kell emelni a korrigált érték számolásakor.

17. FEJEZET

- A Xeroderma pigmentosumban szenvedő betegek hibás DNS-javító mechanizmusa nem képes az UV-sugárzás által okozott károsodások megfelelő korrekciójára. Ezért az érintett emberekben UV-sugárzás hatására bőrrák alakul ki.
- Vegyszerek, sugárzások és vírusok.
- Átszűrte a szarkómából készített kivonatot, hogy a baktériumokat, illetve az azoknál nagyobb részecskéket eltávolítsa. A szűrőn átjutott kórokozó még mindig képes volt szarkóma kialakítására, ha csirkékbe injektálta.
- A transzformáció jelentése ez esetben: egy sejtben olyan változások történnek, amelyek miatt a normális sejt rákossá alakul.
- (a) Igen; (b) nem.
- A *gag* gén elsődleges terméke egyetlen polipeptid. A molekula szintézise után kisebb egységekre hasad, ezek a gén végtermékei.
- Mindkettő a gázdasejt DNS-ébe épült vírus eredetű DNS.

8. Az onkogének valószínűleg a sejtekben alakultak ki először. A celluláris onkogénekben általában vannak intronok is, a virális onkogénekben azonban nincsenek. Könnyebb magyarázni az intronok elvesztését a transzkripció, a splicing, a reverz transzkripció során, majd a vírusba való beépülést, mint a másik lehetőséget, azaz intronok szerzését valamilyen ismeretlen mechanizmussal.
9. Provirusaik celluláris onkogének közelébe épülhetnek be, majd aktiválhatják azokat, mivel LTR szekvenciáikban erős enhancerek vannak.
10. Az NIH 3T3 sejtek nem normál sejtek. Tulajdonképpen már halhatatlanok, és a transzformáltsági állapot határán vannak, már csak egy lökés hiányzik teljes transzformációjukhoz. A végső lökést a *Ha-ras* gén adja meg.
11. Szomatikus mutáció. A beteg rákos sejteiben kimutatható a mutáns *Ha-ras* gén, míg normál szöveteiben csak normál gének vannak.
12. A tüdőrák sejteiből és normál sejtekből DNS-t vonnak ki, restriktációs enzimmal hasítják, és elektroforézissel elválasztják a fragmentumokat. A fragmentumokról készült Southern-blotot hibridizálják radioaktív *aal* próbával (a *v-aal* az aardvark leukémia vírus DNS-ében található). Az autoradiogramon összehasonlítják a rákos és a normál sejtek sávjainak intenzitását. Ha a rákos sejtekből származó sáv kifejezettebb, akkor a *c-aal* onkogén amplifikálódott.
13. A rákos és a normál emberi májsejtekből RNS-kivonatot készítenek, elektroforézissel elválasztják, és Northern-blotra viszik a fragmentumokat. Hibridizálják radioaktív *bas* próbával (a *v-bas* a denevér-szarkómavírus DNS-éből származik). Autoradiogramon összevetik a rákos és a normál sejtek sávjainak intenzitását. Ha a rákos sejtekben a sáv erősebb, akkor a *c-bas* onkogén fokozottan íródik át bennük.
14. A *was* gén kódolja a protein-tirozin-kinázt.
15. (a) Egy olyan mutáció hatására, ami fokozza a Ras és a GAP GTPáz-aktivitását, a sejt növekedése lassul, mert a mutáns p21 sokkal gyorsabban kivédi a GTP stimuláló hatását – lebontja GDP-vé. (b) A Ras és a GAP GTPáz-aktivitását csökkentő mutáció következtében a sejt növekedése gyorsul, sőt elősegítheti a sejt a transzformálását is, mivel a mutáns p21 hosszabb ideig fenntartja a GTP-t serkentő hatását, mielőtt az GDP-vé bomlana.
16. Normális, mert a normál sejt adná a retinoblasztóma sejt hiányzó szabályozó faktorát, ami a sejtosztódást szabályozás alatt tartaná.
17. Egy normál és egy retinoblasztóma génnel születő emberen kezdetben nem jelentkezik a malignus elváltozás, hasonlóan a normál és rákos sejtekből előállított hibrid sejtekhez. Az elváltozás később alakul ki, amikor a normál gén szomatikus mutáció következtében károsodik. Egy idő után a hibrid sejtekben is felszaporodnának ilyen mutációk, és azok is transzformált sejtekké válnának. A fő különbség ezekben a kísérletekben az időbeli eltérés.

18. Normál Sejt	Rákos sejt
Korlátozott élettartam	Halhatatlanság
Csak szilárd felületen nő	Folyékony/lágy közegben is nő
Szérumfaktorokat igényel	Szérumtól független
Kontakt gátlás	Nincs kontakt gátlás
Szabálytalan (általában)	Lekerekített
Normális növekedés	Abnormális növekedés
Hasonlít arra a szövetre, amelyből származik	Nem hasonlít arra a szövetre, amelyből származik
Diploid	Rendszerint aneuploid
Nem képez metasztázist	Metasztázist képez

18. FEJEZET

- Mert nincsenek bennük működő kloroplasztiszok, ezért nem képesek fotoszintézisre. A fotoszintézis nélkülözhetetlen a magasabb rendű növények életben maradásához.
- (a) *Sima*; (b) *zsugorodott*. Az anyai öröklődésnél az utód fenotípusát csak az anya genotípusa határozza meg.
- A *sima* vagy a *zsugorodott* kloroplasztiszért felelős gént maga a kloroplasztisz tartalmazza. Mivel a zigóta kloroplasztiszi a petesejt citoplazmájából származnak, az utódok kloroplasztisz típusát csak az anyai genotípus határozza meg.
- A tarka levelű növényből származó petesejt tartalmazhat csupa fehér kloroplasztiszt, ilyenkor az utódok fehérek. Csak zöld kloroplasztiszt is tartalmazhat, ekkor az utódok is zöldek. Végül, ha keverten tartalmazza a kloroplasztiszokat, az utódok tarka levelűek.
- Mivel a vegetatív algasejtek haploidok. A diploid zigóták ezek összeolvadásával keletkeznek, a redukciós osztódás csak ezután játszódhat le.
- Mivel az *mt⁺* szülő adja az utódok kloroplasztisz génjeit, éppúgy, mint az anyai partner a magasabb rendű növényeknél.
- Nem, anyai hatás is lehet. A harmadik generációig kell kiterjeszteni a megfigyelést, hogy bizonyítható legyen a mendeli (anyai hatású) vagy a nem-mendeli (anyai öröklődésű) öröklődés.
- A mitokondrium legtöbb fehérjéjét nem a mitokondriális, hanem a sejtmagban levő gének kódolják. A géntermékek a citoplazmából transzportálódnak a mitokondriumba. Ezek a fehérjék még megtalálhatók a neutrális petite mutánsban.
- Fuzionáltassuk a *cap⁻ leu⁺ bio⁺* hifákat a *cap⁺ leu⁺ és bio⁻* hifákkal, és később keressünk olyan hifarészeket, amelyek *cap⁺ leu⁺ bio⁻* típusúak. Ha találunk ilyeneket, akkor jelenlétük azt bizonyítja, hogy az ismert nukleáris gének (*leu⁺ és bio⁻*) függetlenül öröklődnek a *cap⁺*-től. Ez pedig azt jelenti, hogy a *cap⁺* kódja nincs a sejtmagban, hanem valószínűleg a mitokondriumban van.
- (a) A *cap⁻*-ről ki kell mutatni, hogy anyai öröklődésű.
(b) Ki kellene mutatni, hogy a *cap⁺*-ből kivont mitokondriumokat a *cap⁻*-be injektálva az *cap⁺*-ré válik.

11. *twi*—*frd*—*zig*—*spa*. Tudjuk, hogy az *frd* a *twi* és a *zig* között van, mert együtt kerülnek delécióra. Azt is tudjuk, hogy *zig* az *frd* és a *spa* között van, mert együtt kerülnek delécióra. A gének távolságát a kodeléziós gyakoriságból becsülhetjük. A *zig* sokkal gyakrabban esik ki például az *frd*-vel, mint a *spa*-val. Ezért a *zig* sokkal közelebb van az *frd*-hez, mint a *spa*-hoz.
12. 35 DNS-egység. A *twi* és a *zig* 40 egységnyire vannak egymástól egy 40 egységnyi fragmentumon. Ezért az A1 két végén helyezkednek el, a *twi* van a bal végén. Mivel az A1 és a B2 25 egységnyi szakaszon átfedő és a B2 teljes hossza 60 egység, a pap és a *twi* maximális távolsága $60 - 25 = 35$ egység.
13. A kloroplasztiszok poliploidok. Viszonylag kisméretű genomjukat több kópiában tartalmazzák, ezért összesített DNS-tartalmuk meghaladhatja az *E. coli*-ét. Ugyanakkor sokkal kevesebb a gén van bennük, mint a bakteriális genomban, ami nagyon kevés ismétlődő gént tartalmaz.
14. R24', R01 és R25.
15. R25.
16. A radioaktív rRNS hibridizálásával az *EcoRI*-blothoz, majd az R07 és az R24 kimutatásával az autoradiogramon.
17. A Ba15 a restrikciós fragmentumon belül.
18. Az élesztő mitokondriális génjei között sokkal nagyobb a távolság, hosszabbak a nem-kódoló régiók, emellett intronokat is tartalmaz.
19. Ha valódi endoszimbionták lennének, elegendő génjük lenne az önálló élethez. Ehhez azonban túlságosan kevés a DNS-ük.
20. Olyan DNS, amely a sejtmagból került az organellumba, vagy éppen fordítva, esetleg az egyik organellumból a másikba.

19. FEJEZET

1.	p	q	p²	2pq	q²
a	0,4	0,6	0,16	0,48	0,36
b	0,68	0,32	0,462	0,435	0,102
c	0,467	0,533	0,218	0,498	0,284
	p²N	2pqN	q²N	χ²	
a	16	48	36	2,78	
b	23,1	21,8	5,1	20,1	
c	62,1	141,9	80,9	5,63	

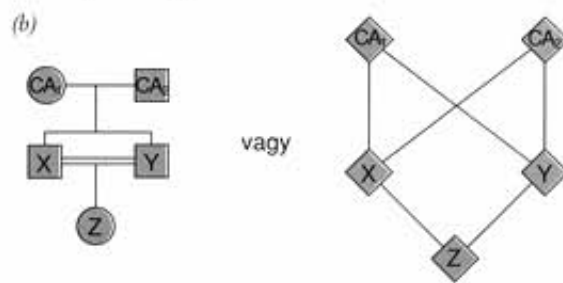
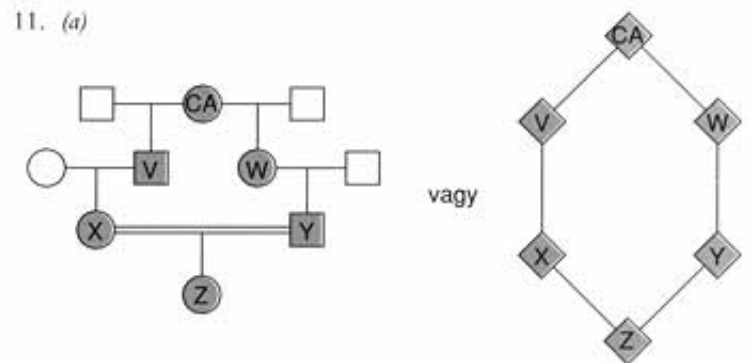
1 szabadsági foknál *a* nem szignifikáns, *b* szignifikáns (0,01), *c* szignifikáns (0,05).

2. A várt egyedszámok az egyes genotípusokra: $A_1A_1 = 18$, $A_1A_2 = 84$, $A_2A_2 = 98$. 0,45 1 szabadsági foknál ez megfelel az egyensúlyi állapotnak.
3. $A_1A_1 = 0,49$; $A_2A_2 = 0,09$.
4. 0,1; 0,18.
5. (a) AR: 0,6; PP: 0,32 és ST: 0,08; (b) AR AR: 18; AR PP: 19,2; AR ST: 4,8; PP PP: 5,12; PP ST: 2,56 és ST ST: 0,32.

6.	A₁	A₂	A₃	χ²		
a	0,35	0,3	0,35	2,27		
b	0,2	0,2	0,6	400		
Várt genotípusarányok						
	A₁A₁	A₁A₂	A₁A₃	A₂A₂	A₂A₃	A₃A₃
a	0,1225	0,21	0,245	0,09	0,210	0,1225
b	0,04	0,08	0,24	0,04	0,24	0,36

Három szabadsági foknál *a* nem szignifikáns, *b* szignifikáns (0,01).

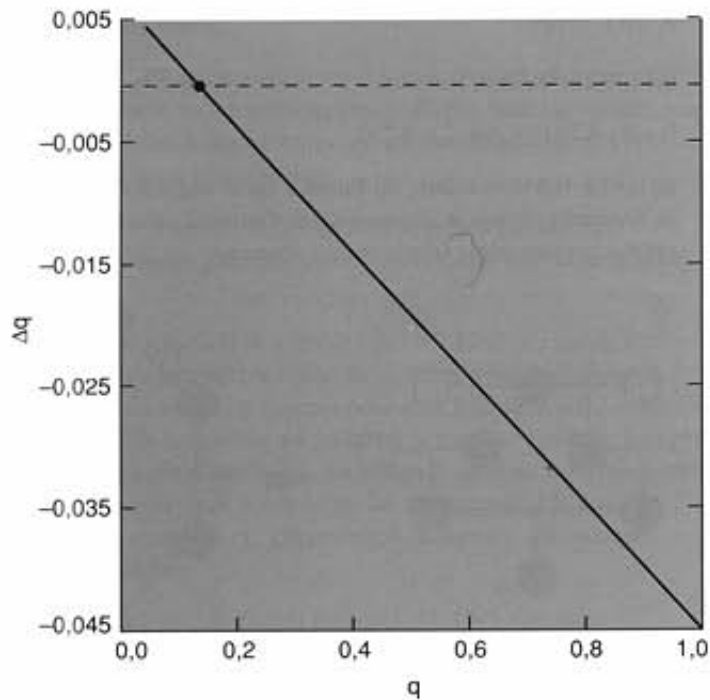
7. 0,0064; 0,147.
8. 0,12; 0,16; 0,72; 0,01.
9. 0,408; 0,384; 0,208; $f = 0,792$.
10. (a) 0,878; 0,841 és 0,906. (b) Ennél a fajnál nagyon magas az öntermékenyítés és alacsony a véletlenszerű párosodás aránya, ezért a heterozigótia szintje is elég alacsony.



12. 10^{-6} , $7,25 \times 10^{-7}$, $4,5 \times 10^{-7}$, $1,75 \times 10^{-7}$, 10^{-7} . Δq akkor a legnagyobb, ha $p = 1$, mert ekkor $q = 0$, és a populációban csak vad típusú allél van.
13. A kis populációméret genetikai sodródáshoz vezet, amely növeli az allélok fixálódásának esélyét és csökkenti a heterozigóták arányát.
14. 0,3; 0,7. Egy allél fixálódásának valószínűsége kezdeti gyakoriságától függ. Tehát a kis gyakoriságú allél fixálódásának esélye kicsi, mert kevésbé valószínű, hogy relatív gyakorisága eléri az egyet.
15. 0,0012; 0,035. A várt érték sokkal nagyobb.

16. A génáramlás többféleképpen befolyásolhatja a populációk allélgyakoriságát. Ha egy allél hiányzik egy populációból, akkor génáramlással bekerülhet, és ezzel nő a populáció variabilitása. Ha a populáció polimorf, akkor a monomorf egyedek bevándorlása csökkentheti a genetikai variabilitást. A nagymértékű génáramlás felgyorsíthatja ezeket a változásokat, míg a lassú génáramlás hatása csak több generáció múlva érezhető.

17. (a)

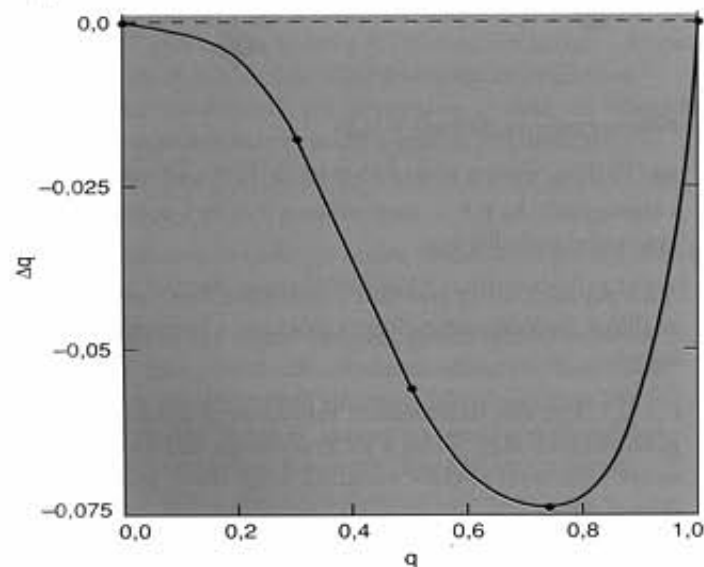


(b) 0,1.

18. 0,13. Feltételezzük, hogy sem szelekció, sem genetikai sodródás nem történik, és az allélgyakoriság becslült értéke megfelelő volt.

19. (a) 0,0; -0,019; -0,056; -0,073; 0,0.

(b)



(c) 0,1968, 0,1937.

20. Sötét alapszínű, melanisztikus 1, világos alapszínű 0,771; 0,4.

21. 0,2; 0,011; -0,2; az egyensúlyi gyakoriság $q = 0,2$.

22. 0,585; 0,585 és 1,0; feltéve, hogy a szelekció a három tenyészetben azonos mértékű, a különbségek a véletlenek, például a genetikai sodródásnak köszönhetőek.

23. A szelekció és a genetikai sodródás okozza a legnagyobb változást az allélgyakoriságban, a mutáció a legkisebbet. A genetikai sodródás kis populációméret esetén hatékony, és növelheti vagy csökkentheti is az allélgyakoriságot, míg a többi hatás egyirányú.

24. A beltenyésztés növeli a homozigóták és csökkenti a heterozigóták gyakoriságát. Meghatározhatjuk a populáció genotípus gyakorisági értékeit, és összehasonlíthatjuk a Hardy-Weinberg-egyensúly esetén várható értékekkel. A beltenyésztés a szelekcióval együtt eredményezheti a kívánt homozigóta genotípus fixálódását.

25. A csigákat különböző háttér elé helyezve megállapíthatjuk a predáció mértékét. Megfigyeljük, hogyan változik az allélgyakoriság nemzedékről nemzedékre, és megállapítjuk, van-e különbség a kis és a nagy létszámú populációk allélgyakoriságának változásában.

20. FEJEZET

1. 0,0000167, illetve 0,0041. Az új gyakoriságok 0,0000333, illetve 0,0058. Ha u a duplájára nő, az egyensúlyi genotípus gyakoriság is lényegében megkétszereződik. Ez nem igaz az egyensúlyi allélgyakoriságra, ahol u kétszeres növekedése csak 1,4-szeres allélgyakoriság növekedést okoz. A genotípus gyakoriságok különbsége 0,0000166; az allélgyakoriságoké 0,0017.

2. 0,000001, illetve 0,00002.

3. A malária növelte a sarlósejtes vérszegénység alléljának gyakoriságát Afrikában. Jelenleg az Egyesült Államokban a génáramlás és a szelekció is ellene hat. A limitáló faktor a mutáció lehet.

4. $u = sq^2 = 0,0004$. Ez az érték sokkal magasabb az ismert mutációs rátáknál, amelyek 10^{-5} és 10^{-7} között vannak. Genetikai sodródás, heterozigóta fölény, a múltban lejátszódott szelekció állhat a háttérben.

5. Olyan populációkra, ahol az alapító népesség nagyon kicsi és amelyekben a betegségeket okozó allélok nagyobb gyakorisággal vannak jelen, mint másokban. A jelenség a genetikai sodródás szélsőséges példája, ahol egy allél gyakorisága a kis egyedszám miatt egyetlen generáció alatt is drámaian megváltozhat.

6. A neutralitás elmélete az allélgyakoriság megváltozását a mutáció és a genetikai sodródás együttes hatásával magyarázza. Feltételezi, hogy a kis létszámú populációkban az allélok átmenetiek és számuk csökken. A szelekciós elmélet a kis populációkban az allélok állandóságát és nagyobb változatosságot feltételez. A fejezetben található erre vonatkozó kísérletet, amelyben a *D. melanogaster* egyik polimorf lokuszának allélgyakoriság változásait vizsgálták különböző környezeti feltételek és tápanyagellátás mellett (561–563. oldal).

7. A molekuláris óra azon a feltevésen alapul, hogy a nukleinsavak és a fehérjék szekvenciájának változásai időben állandó gyakorisággal következnek be. Az aminosavszubsztitúció rátája az aminosavsorrend időegység alatt bekövetkező változásait jelenti. A nukleotidszubsztitúció ennél nagyobb mértékű, mert kevesebb megszorítás érvényes rá, és a triplet 3. helye gyorsan változik.

8. (a) Az első populáció mérete nagyobb, tehát kisebb benne a genetikai sodródás hatása, amely csökkentené a heterozigóták arányát. (b) Populációméret (N) 2778, illetve 1316.
9. 0,444, illetve 0,25. A második fehérje szerkezete szigorúbban meghatározott.
10. a és c a legközelebbi, d a legtávolabbi rokon.
11. Amennyiben a molekuláris vizsgálatokkal kapott adatok a valóságot tükrözik, megvizsgálhatjuk a morfológiai és élettani sajátosságokat, hiszen ismerjük a leszármazás útját és a szétválás idejét.
12. A szelekció közvetlenül a genotípusra hat, mert a mitokondriumok DNS-állománya haploid, nincsenek dominanciaviszonyok. Az egy kópia következtében a genetikai sodródás is sokkal valószínűbb, szemben a diploid szervezetek négy kópiájával (apai és anyai).
13. 0,00124, illetve 0,03125. A második érték nagyobb, mert a homozigóta recesszív egyedek nagyobb arányban vannak kitéve a szelekció hatásának.
14. 0,478, illetve 0,475 és 0,456, illetve 0,433. A heterozigóták arányának csökkenése a nagyobb populációban minimális, de a kisebbben sem túl nagy.
15. 167.
16. A morfológiai és természetesi tulajdonságok mellett a betegségekkel és kártevőkkel szembeni rezisztenciát kell figyelembe venni. Eredeti élőhelyén, elkülönítve kell nevelni, és kerülni kell a mesterséges szelekciót.
17. 0,000312, illetve 0,000064. A rokonházasságban született utódok betegségének valószínűsége mintegy ötszöröse a nem rokon házasságokból származó gyerekekének.
18. Kerülni kell a beltenyésztést és a mesterséges szelekciót, lehetőleg népes populációt kell fenntartani.
19. 0,337. Sem génáramlással, sem mutációval nem jutottak be ezek az allélok a népességbe és/vagy nincs szelekciós hatás.
20. 0,81, illetve 0,518 (lásd 19. fejezet).
21. A maláriaszúnyog sok utódot hoz létre, generációs ideje rövid, és nagyon gyorsan képes elterjedni. Ráadásul a DDT-rezisztencia többféle típusával rendelkezik.
22. Az egyedek genetikailag azonosak, tehát nincs variabilitás és egyformán érzékenyek bizonyos károsító hatásokra (pl. betegségek).

NÉV- ÉS TÁRGYMUTATÓ

- A**
A lásd adenin
AAV lásd adeno-asszociált vírus
AB0-vércsoportrendszer 44, 48, 49
 alleljai 48
 antigének 49
 antitestek 49
 fenotípusok 48
 genotípusok 48
 Hardy-Weinberg-törvény alkalmazása 541
 kapcsoltsága a köröm-térdfalics-kórral 113
 vértömlesztés 49
A-box 229
acentrikus kromatida 120
Acetabularia, kloroplasztisz DNS 519
ADA lásd adenozin dezamináz
adenin (A) 13, 134–136,
 aminóforma 302
 dezaminálás 304
 iminóforma 302
 tautomer alakok 302
adeno-asszociált vírus (AAV),
 vektor alap 452
adenovírus 232
 génterápiás vektor 452
 rákkeltő a rágszűkítőben 486
adenozin 135
adenozin-dezamináz (ADA) hiány,
 génterápia 450–452
 adjacens szegregáció 92
 agar 341, 342
Agrobacterium tumefaciens 455, 456
 aguti szőrszín 56
A-hely (aminoacil-hely) 281
AIDS lásd szerzett immunhiányos
 tünetegyüttes
Akam, Michael 393
akceptorszár 267
A-komplex 244
akondroplázia 37, 38, 43
akridinfestékek 307, 308
 aktivált aminosav 269
alanin, szerkezet 257
 alapító hatás 560–561
albinizmus 36, 297, 559
Alderber, E. H. 351
1-antitripszin termelődés, transzgenikus
 állatokban 454
alkalikus foszfatáz (AP), alkalmazása a nem-
 radioaktív próbákban 435
alkaptonuria 12, 259
alkalília 307, 308
alkilálószerek 307
alkilcsoportok 307
 állatok
 hasadási arány 25
 tenyésztés 570–574
 transzgenikus 452
allél(ok) 3, 22
 jelölésük 32
 letűlő 45
allélgyakoriság
 genetikai sodródás hatása 546–547
 Hardy-Weinberg-szabály
 esetén 538, 539
 allélszubstitúció ráta, generációként 563
allokátör 192
 laktóz átalakulása zj 192, 193
allopoliploidok 94, 95
alloszterikus fehérje 192
alotetraploidok 94
általános transzkripció faktorok 225
alternatív szegregáció 92
Alu szekvenciák 337
ALV lásd madár leukózis vírus
amber (borostyán) mutáció 286, 287, 289
amber szuppresszor 286
Ames-teszt 317–318
aminoacil-AMP 269
aminoacil-tRNS 269
aminoacil-tRNS szintetázok 266
 aktivitás 268, 269
 lehetséges hibák és hatásaik 269, 270
 specifitás 269, 270
aminosav(ak) 13, 256, 257
 aktivált 269
 kapcsolódása a tRNS-hez 268–269
 amino-terminális (N-terminális)
 lánccév 379
Amish szekta, örökítő betegség
 560–561
amniocentézis 98
anabolikus enzimek 197
anafázis 6, 7, 79, 80, 81
anafízis 9, 10, 82
anafízisII 9, 11, 83
Anderson, W. French 15, 450, 451
Andrewes, F. W. 329
aneuploidia 93, 95–99, 296
 rákos sejtekben 483
Angelman-szindróma 411
Angstrom (Å) 138
animális pólus 372, 374
antibiotikumrezisztencia 330
 gén(ek) 330
 plazmid 330
 terjedés 576
antibiotikum(ok)
 és a DNS replikáció 170
 fehérjeszintézis gátlása 283
 kölcsönhatás a riboszómákkal 284
antigének 49
AB0-vércsoportrendszerben 49
antikodon 266
antikodon-hurok 267
antiparalel szálak 138
antirepresszor 209
antitermináció 209
antiterminátor 209
antitestek 49 lásd még immunoglobulin
AB0-vércsoportrendszer 49
 gének, átrendeződés 408–409
 könnyű láncot kódoló
 gén 408, 409, 410
 nehéz láncot kódoló gén 408, 409, 410
 szerkezet 408
 termelés, transzgenikus növényekkel 455
 változatosság forrásai 408–409
antivirális gének, transzgenikus
 halakban 454
antociánok 54
anyagcsere érintő mutációk 297–298
 anyai hatás
 definíció 513
 gének 389–390
 és az anyai örökítés 512–513
 anyai örökítés 506
 anyai üzenetek (mRNS-ek) 378
AP endonukleázok 312
AP hely, lásd apirimidin hely
AP lásd alkalikus foszfatáz
apaság kizárása 67
APC-gén 502
apirimidin hely (AP hely) 312
apoptózis 501
aporepresszor 197
apurin hely, lásd apirimidin hely
ara operon 342
áramlókezes elektroforézis
 (PFGE) 146, 149
Arber, Werner 416
arginin, szerkezet 257
arpa, genetikai variabilitás 537
árszénnyog (Chinonoma), poliszómák 265
Aspergillus nidulans
 kromoszómaszám 75
Aspergillus, drogerezisztencia 512
ASV lásd madár szarkóma vírus
aszparagin, szerkezet 257
aszparaginsav, szerkezet 257
aszortatív párosodás
 negatív 542
 pozitív 542
 át nem íródó köztes szakaszok 248
áthelyeződés (transzpozíció),
 lásd még Ty transzpozíció
 konzervatív 326, 328
 mechanizmusai 326–328
 replikatív 326
 közegészségügyi következményei 330
áthelyeződő genetikai
 elemek 332–333, 334
A-típusú részecskék 335, 336
átródo köztes szakaszok 248
átlag (x) 59–61
átlagos rátermetség (w) 550
 beltenyésztetben 558
atlanti törfarkú, genetikai variabilitás 537
ATPáz 167
atrazin rezisztencia 576
att B 354
Attardi, Guiseppe 525
attenuáció 198, 200
trp operon szabályozása 198–199
 kiküszöbölése 199–200, 202
autopoliploidok 94, 95
autoradiográfia 163
 alkalmazása *Bacillus*
*subtilis*ben 164, 165, 166
 muscicán 164, 165, 166f
 götén 165, 166, 166f
 autoszómák 4, 51
 autotetraploidok 94, 95
auxotróf mutánsok 297, 342
Avery, Oswald 12, 15, 131
avirulens 12
 sejtek 131
Avise, John 565
B
B-kromoszómák 75
B1-komplex 244
B2-komplex 244
Bacillus subtilis
 génexpresszió, módosulásai 204–205
 és a replikáció vizsgálata 164, 165f
 sporogenezis 206, 207
 vegetatív fázis 206, 207
backmutáció 296, lásd valódi reverz
 mutáció
backmutációs ráta (v) 545
baculovírus, mint vektor
 az eukariótákban 431
bakteriofág(ok) 133
 Charon 421, 422
 DNS 358, 359
 felépítésük az *E. coli*-ben 358, 359
 fenotípus 360–362
 genetikai 360–362
 lízis 360
 kitűzési vírusszám (burst size) 360
 meghatározás 358
 replikáció 358–360
 T1-T7 fágok 358
 vektorok 421–424
baktérium(ok)
 genetikai kísérletek 341
 replika teszt 342
 szaporodási görbe 341
 transzformáció 131, 132
 Ballou, John 568
 Baltimore, David 334
BamHI restrikciós enzim, alkalmazása a
 fizikai térképezésben 441–442, 444
Bang, O. 485
Barbacid, Mariano 490
Barnett, Leslie 272
Barr-test 98, 99, 385
Barr, Murray 98, 385
Bateson, William 54, 105
Baur, Erwin 505
bázis excíziós reparáció 312
bázis(ok) 134
 a DNS-ben 13
 alkilezős, kialakuló mutációk 306–308
bázisanalógok hatására bekövetkező
 mutációk 306
B-box 229, 232
Beadle, George 12, 13, 15, 259
beékelődés 306
beékelődő szekvenciák (IVS) 239
belső kontroll régió (ICR) 229
beltenyésztés 542–545
 genotípus gyakoriságok 543, 544
beltenyésztési együtttható (f) 543
 számítás 543–545
Benzer, Seymour 286, 353, 364
deléziós térképezés 363, 364
III térképezés 362–364
benzo[*a*]pirén, mint rákkeltő 483–485
Berg, Paul 15
Bernstein, Harris 286
-galaktozidáz 191, 352–353
 gén klónozása, pUC
 plazmidban 419–421
-galaktozidáz reakció 191, 192
-globin gén
 genotípusok 534, 536
 fenotípusok 534, 536
 gélelektroforézis vizsgálata 534, 536
-laktamáz 326
binomiális
 általános egyenlet 30
 együtttható 30
 eloszlás 29–31
biotin, alkalmazása az autoradiográfias
 vizsgálatokban 435, 436
Bishop, Michael 493
Biston betularia lásd szürke nyírfaaraszoló
 bivalensek 82
B-kromoszómák 75
Blackburn, Elisabeth 174
Blakeslee, Alfred 96
blasztoméra 371
blasztula 372
blasztoderma, *ecetmuslica* 387
Blattner, Fred 421
Bloom-szindróma 315
blotolás 433, 434
boró (*Pisum sativum*) 54
áthelyeződő elemek 333
 dihibrid keresztezéssel kapott utódok
 vizsgálata villás elágazás
 módszerrel 31–32
 diploid kromoszómaszám 75
 fenotípusok 54
 kloroplasztisz DNS, térkép 522
 megismételt keresztezések
 eredményei 25
 Mendel kísérletei 19–26
 öntermékenyítés 19
 pigment szintézis 54–55
 tiszta vonalak 19
Bos taurus, lásd szarvasmarha
Bourgeois, Suzanne 194
Boveri, Theodor 15, 74
Boyer, Herbert 15, 416, 417
Brenner, Sydney 15, 186, 271, 400, 407
Bridges, Calvin 15, 86, 101
Brinster, Ralph 452
Britten, R. J. 144
Brown, Donald 228, 231, 384, 385
Buckler, Alan 464
Burges, Richard 189, 207
Burkitt-limfoma 488
 Epstein-Barr-vírussal való
 kapcsolata 491, 492
 my protoonkogén
 transzlokációja 491, 492
buokfehérje (retrovírus) 487, 488
búza (*Triticum aestivum*) 95
 fenotípusok 58, 59
 DNS kloroplasztisz 519
bZIP domének 237
 és célszekvenciájának kölcsönhatása 238
C
C lásd citozin
C lokusz 334
C1 komplex 244

- C2 komplex 244
Caenorhabditis elegans
 determináció 407
 fejlődésgenetika 407
 lin-12 mutáció 407
 Cairns „csavaró szerkezet” elmélete 168
 Cairns, John 163, 168
 Callan, H. G. 165, 166
 cAMP lásd ciklikus-AMP
Canis familiaris lásd kutya
 CAP lásd katabolit aktivátor fehérje
Capra hircus lásd kecske
 Castle, William 25, 537, 538
 Cattanauch, Bruce 411
 C-box 229
 CC lásd elkötelezettségi komplex
 CCAAT-box 226
 és a promotor aktivitás 227
 CCAAT-box transzkripció
 faktor (CTF) 232
 cDNS lásd kópia DNS
 Cech, Thomas 246
 centrikus fúzió 94
 centrikus hasadás 94
 centriolum 4, 5, 7, 80,
 centromeron 7, 10, 75, 80
 C-értékek 149
 C-érték paradoxon 149
 cézium-kloridos sűrűséggradiens
 centrifugálás 159, 160
 alkalmazása a DNS-elválasztásban 160
 CF lásd cisztás fibrózis
 CFTR (cystic fibrosis transmembrane
 conductance regulator) 474–475
 CG-szigetek 464
 Chamberlin, Michael 190
 Chambon, Pierre 226, 242
 Chargaff, Erwin 133, 137
 Chargaff-szabály 137–138
 Charon4, klónozás 421, 422
 Chase, Martha 133
Chironomus lásd árvaszúnyog
Chlamydomonas reinhardtii
 kloroplasztisz DNS 519
 kloroplasztisz gének 507, 508
Chlamydomonas
 cytohet 519
 életciklus 509
 Golgi-apparátus 508
 kloroplasztisz 508
 kloroplasztisz DNS 519
 mitokondriumok 508
 nukleáris öröklődés 507
 sejtlelépítés 508
 sm2 507, 508
 uniparentális öröklődés 507
 CHLC lásd Cooperative Human
 Linkage Center
 Chua, Nam-Hai 381
cl 207
 autoregulációja a lizogénia
 során 210–211
 vetélkedése a *cro* génnel 212
 promoterei 210
 cianelumok 527
 cikloheximid 283
 fehérjeszintézis gátlás 283
 kölcsönhatás a riboszómákkal 284
 ciklikus-AMP (cAMP) 196
 cinkujak 234–235, 236
 cisz elemek 354
 cisz helyzet 194
 meghatározás 353, 354
 cisz-domináns 194
 cisztás fibrózis (CF)
 (mukoviszcidózis) 36, 298
 alléljainak gyakorisága különböző
 populációkban 558
 gén 471–475
 genetikai szűrés, problémák 471
 járványtan 472
 klinikai jellemzők 472
 dajkasejtek 390
 Dalgarno, L. 279
 dAMP lásd deoxiade
 nozin-5'-monofoszfát
 Darmell, James 249
 Darwin, Charles 15, 549, 573
A fajok eredete 533
 dATP lásd deoxiadenozin-5'-trifoszfát
 DCC gén 501
 dATP lásd dideoxi-ATP
 DDT 575
 BI észteráz, rezisztens és szenzitív
 szűnyogok 577
 Delbrück, Max 345
 mint onkogének termékei 489
 citoplazmatikus riboszómák 512
 citoplazmatikus szabályozó anyagok,
 mint onkogén termékek 489
 citoszol 5
 citozin (C) 13, 134, 135
 dezaminálás 302, 304
 dezaminált, javítás 305
 metiláció 305
 tautomerizáció 302, 303
 Clal klónozási hely 427, 428
 Clark, A. J. 454
 Clarke, Cedrik 551
 Clegg, Michael 462, 552
Clodium fragile, kloroplasztisz DNS 519
c-myc gén 488, 489
 Cockayne-szindróma 316
 Cohen, Stanley 15, 324, 416, 417, 494
 Cohn, Melvin 192, 194
 colE1 plazmid, replikáció 166, 167, 167
 Collins, Francis 15, 472, 473
 Conklin, E. G. 371
 Conneally, Michael 468, 471
 Contergan 48
 contig, definíció 460
 Cooperative Human Linkage
 Center (CHLC) 457
 Core-enzim 189
 transzkripció 189
 Correns, Carl 15, 23, 43, 515
cor gén 209
Cor 144
Cor görbék 144
 egyedi szekvenciájú (nem-repetitív) és
 ismétlődő DNS szekvenciák 144, 145
 Cot1/2 144
 coupling 105
 CPEO lásd krónikus progresszív
 szemizombénulás
 Creighton, Harriet 9, 15
 Crichton, Michael, *Jurassic Park*, 462
 Crick, Francis 13, 15, 133, 137, 138,
 140, 186, 266, 272, 274
cro gén 200, 210
 hélix-fordulat-hélix elemek 214
 vetélkedése *cl* génnel 212
 Cro fehérje 210
 crossing over 8, 9, 81, 82, 107
 egyenlőtlen 88, 120–123
 kétfonális állapotban 116, 117
 két mutáció között 357
 négyfonális 116,
 négyfonális állapotban 116, 117
 szabályos, következményei 122
 Cuénot, Lucien 25, 44, 45
Cyanophora paradoxa 527
Cypinus carpio lásd ponty
 családfák
 egy vagy két recesszív gén
 okozta betegségeknél 55
 csattanó maszlág (*Datura stramonium*)
 triszómák 96, 97
 csendes mutációk 309
 csigák (*Lymnaea*) csavarodásának
 öröklődése 513
 csimpánz (*Pan troglodytes*)
 kromoszómái 99, 100
 diploid kromoszómaszáma 75
 törzsféjlődés 564–565
 csírsejt- vagy maggyüttermények,
 természetű növényeknél 567
 csírvonal-mutációk 296
 csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*)
 levélszínének nem-mendeli
 öröklődése 506–508
 citoplazmatikus öröklése 505–506
- D**
 d'Herelle, F. 358
 dADP lásd deoxiadenozin-5'-difoszfát
 DAI (kétfonális RNS által aktivált
 inhibitor) 290
 dajkasejtek 390
 Dalgarno, L. 279
 dAMP lásd deoxiade
 nozin-5'-monofoszfát
 Darmell, James 249
 Darwin, Charles 15, 549, 573
A fajok eredete 533
 dATP lásd deoxiadenozin-5'-trifoszfát
 DCC gén 501
 dATP lásd dideoxi-ATP
 DDT 575
 BI észteráz, rezisztens és szenzitív
 szűnyogok 577
 Delbrück, Max 345
 deléció 89
 intersticiális 89
 terminális 89
 deléció hurok 89, 90
 delécióis térképezés 114, 363, 364
 delta ismétlődések 333
 denaturáció, fehérje 298
 dentikulumok 396
 determináció 382–386
 sejt 372
Caenorhabditis elegans-ban 407
 determinánsok 372–374
 eloszlás a petesejtben 372, 374
 gradiens 372, 374
 dezamináció 304
 spontán mutációk 302–304
 deoxiadenozin-5'-difoszfát (dADP) 136
 deoxiadenozin-5'-monofoszfát
 (dAMP) 136
 deoxiadenozin-5'-trifoszfát (dATP) 136
 deoxinukleozidok 135
 deoxiribonukleinsav lásd DNS
 deoxiribóz 134, 135, 136
 deoxitimidin 135
 D-hurok lásd dihidouracil hurok
 diakinesis 10, 82
 dicentrikus kromatida 120
 Dickerson, Gordon 572
 dideoxi-ATP (ddATP) alkalmazása
 a gének bázisrendjének
 meghatározásában 436
 dideoxi-ribonukleotidok, alkalmazása
 a gének bázisrendjének
 meghatározásában 436
 diffúzibilis géntermékek 352
 diffúzió 352
 dihibrid keresztezés(ek) 26
 F2 nemzedékek között 105
 mendeli 26
 különböző genotípusok valószínűsége 28
 dihidouracil hurok (D-hurok) 181, 267
 dimetil-szulfid, és a DNS
 denaturáció 143
 dinamikus mutáció 306
 diploid (2n) kromoszómaszám 3, 74, 75
 emberi kromoszómák 75, 76
 diplotén 82
 diszkontinuous eloszlású bélyegek 61
 diszkontinuous replikáció 156
 diszkrét öröklődés 19
 diszkriminátor bázis 270
 diszperzív replikáció 156, 160, 161
 DM lásd dupla miniatur kromoszómák
 DMD lásd Duchenne-féle izomdisztrofia
 DNáz érzékenység 382
 DNáz túlérzékeny helyek 382, 383
 DNáz túlérzékenység 382
 DNS (deoxiribonukleinsav) 4, 6, 9,
 12–15, 131–150
 A-forma 141, 142
 amplifikáció, polimeráz láncreakcióval
 459–460, 461, 462, 463
 autoradiográfia 146–147
 bakteriális DNS-átadás 343–345
 bakteriofágok 358, 359
 bázisai 13
 bázispárok 138
 B-forma 141, 142
 denaturáció 142, 143
 egyedi szekvenciájú 144
 egyszerűsített szerkezet 137
 elválasztása cézium klorid sűrűség-
 gradiens centrifugálással 159–160
 excíziós reparáció 312
 felfedezése 9–12
 formái 145–146
 G+C tartalom, különböző
 szervezetekben 142
 genetikai kapacitás 147–149
 gyűrű alakú, replikációja 173
 hibridizáció 145, 146
 ismétlődő szekvenciájú 144
 javítás (reparáció) 311
 kettős hélix 13, 138–140
 kloroplasztisz 518, 519
 koncentrációja és a renaturáció
 hatékonysága 143
 kondenzálódása
 a nukleoszómákban 221, 222
 kölcsönhatások fehérjékkel 213–215
 közös 528
 különböző fragmentumainak
 összekapcsolása 157, 158
 megoldás 142–143
 mérete 147
 mérgező régiók 473
 metiláció 385–386
 metilált 385–386
 nagymértékben ismétlődő
 szekvenciájú 144
 negatív töltésű pontjainak kapcsolódása
 az elektroforézis csoportokhoz 307, 308
 önző 325
 összetétele 137
 rekombináció 323, 341
 pericentrikus 224
 replikáció 13, 140
 röntgendiffrakciós kép 137, 138
 szatellit 145
 szerkezete 13, 137–140
 szintézis 155–159, 168
 Z-forma 141, 142
 DNS-DNS hibridizáció, alkalmazása a
 mitokondriális gének térképezésére 515
 DNS-fotolízis 311
 DNS-gráz 168, 169
 DNS-glükoziláz 312
 DNS-kötő domének 234
 és a transzkripció aktiváló domének 238
 DNS-ligáz 158, 312, 313
 DNS polimeráz I 157, 158
 DNS polimeráz III holoenzim 171
 DNS polimeráz(ok) 156, 312, 313
 és az eukarióta DNS
 megkettőződés 172, 173
 polimeráz láncreakcióban 459, 461, 463
 szerepük az emlődobban 172
 DNS-próbkák
 gének számának meghatározására 433
 gének lokalizálására
 a kromoszómákon 435–436
 génaktivitás meghatározására 433–435
 DNS tipizálás, kriminalisztikai
 alkalmazás 477–478
 DNS-ujlenyomat (fingerprint) 69,
 475–476, 477
 kriminalisztikai alkalmazás 477–478
 Dobzhansky, Theodosius 534
 dohány (*Nicotiana tabacum*)
 dioid kromoszómaszám 75
 glibozát rezisztens 455, 457–458
 kártevő rezisztencia 455
 szentjánosbogár luciferáz génjével
 transzformált 455, 459
 transzgenikus, fehérje termelés 455
 vírus rezisztens 455
 domén 256
 dominancia 43
 teljes 43
 részleges 43, 44
 domináns 19
 allél 3
 domináns betegségek gyakorisága 37
 domináns jelleg 37
 domináns lokuszok, embernél 37
 domináns negatív mutációk 196
 Down kór (21-es triszómia) 96, 97, 98
 előfordulása 98
 genetikai tanácsadásokban 92
 gyakorisága és az anya életkora 98
 kialakulása transzlokációs
 heterozigótákból 92
 kromoszómális alapjai 96
Drosophila melanogaster (muslica)
 AdhF allél gyakoriságának
 változása különböző
 alkoholok hatása az
 allélgyakoriságra 562, 563
Antennapedia komplex (ANT-C) 397
Antennapedia (*Antp*) mutánsok 396, 397
Antp gén 396, 397
 anyai hatású gének 389–390
 autoradiográfias vizsgálata 164–166
bicoid fehérje 379, 390, 391–392
bicoid gén 379, 390, 391, 394–395
Bithorax komplex (BX-C) 397
bss („bride of sevenless”) gén 404
 diploid kromoszómaszám 75
 egyenlőtlen crossing-over 120–123
 embriogenezis 386–389
eygald gén 396
even-skipped (*eve*) gén 394–396
eyless gén 399
 fejlődésgenetika 386–406
fushi tarazu (*ftz*) gén 394–396
 gap gének 390–394
 genetikai kísérletek 4
 géntérképe 111, 112
 giant gén 392–393, 394–395
Glial mutáns 552–553
 hasadási arányok 25
hedgehog gén 374

- hibrid diszgenézis 337
 homozigóta *Bar*-szemű 117
huckebair (hbk) gén 393, 394
hunchback gén 391–393, 395
 ivari fenotípus 101
 ivarmeghatározás 244, 246
 jelvitel 400–404, 405
 kapcsoltsági kísérletek 105, 106–108
 kapcsolt-X kromoszóma 116
 kivétel genetikai kód 276
knips gén 392, 393
Knippel gén 392, 393, 394–395
 M (anyai – maternális) törzs 337
 meiózis termékeinek azonosítása 116
 morfológiai mutációk
 (látható mutációk) 297
 mutások 8, 47
nanos gén 390
 P (apai – paternális) törzs 337
 P elemek, mint mutagének 337
 pair rule gének 394–396
 parazgenomok 387, 389
 P-M rendszer 337
 rekombináció 8
 sávmintázata 99
sevenless gén 400–403, 404
 szegmentumpolaritási gének 396
 szelektor gének 396–400
 szem 400
tailless (tll) 393, 394
Toll gén 390
torso gén 390
 transzpozonok 333
Ultrabithorax (Ubx) gén 397
 vad típus 8
wingless gén 396, 397
 X-hez kapcsolt öröklődés 85, 86, 87, 108, 109
 X-kromoszóma 76, 77, 78
Drosophila pseudoobscura
 inverziós heterokariotípusok 91
 inverzió gyakoriság a harmadik
 kromoszómán 534
Drosophila simulans, sávmintázat 99
 Duchenne-féle izomdisztrofia (DMD) 475
 géntérképezés 475
 Dulbecco, Renato 311
 dupla miniatűr kromoszómák (DM) 493
 duplikációk 88
 elmozdult 88
 kromoszómális 88, 89
 megfordult (reverz) 88
 tandem 88
 dystrophin 475
- E, É**
 East, Edward 573
EcoRI
 génlklónozásban 417, 418, 421–422
 fizikai térképezésben 441–442, 444
 Edward kór 97
 Edwards, P. R. 331
 egér
 genomikus bevéődés 410, 411
 knock-out 465–468
 szórszín 44–45, 56, 298
 transzgenikus 452
 egér-ember hibrid sejtek 498
 EGF *lásd* epidermális növekedési faktor
 egy gén – egy enzim hipotézis 13
 egy gén – egy polipeptid elmélet 260
 egyedi szekvenciájú (nem-repetitív)
 DNS 144, 145
 egyenlítői sík *lásd* metafízis sík
 egyensúlyi heterozigótia (He) 562
 egyfonalú szakaszokat kötő fehérje
 (SSB) 167, 168
 egyirányú replikáció 157, 158, 166, 167
 egymást kizáró események 28
 ektoderma 374
 ekvációs osztódás 81
 elektrofil anyagok 306–307
 elektroforézis, alkalmazása a DNS
 vizsgálatokban 132
 élesztő(k)
 ingázó vektor 431
 közös DNS 528
 drogerezisztencia 512
 mitokondriális DNS térkép 524
 mitokondriális genom, főlöleges
 szekvenciák 526
 mitokondriális genom rekombináció 514
 mitokondrium, genetikai térképezés 515
 Ellerman, V. 485
 Ellis-van Creveld szindróma 558, 561
 elkötelezettségi komplex (CC) 243–244
- elongáció
 a replikációban 171–173
 a transzkripcióban 187–188
 a translációban 280–285
 elongációs faktor (EF) 281
 eloszlási görbe 59, 61
 előremutató mutáció
 (forward mutáció) 310
 első utódnemzedék (F1) 3, 19
 elsődleges szerkezet
 (primer struktúra), fehérjéké 256
 ember (*Homo sapiens*)
 citogenetikája 76
 génterápia, problémák 451, 452
 géntérkép 124
 diploid kromoszómaszáma 75, 76
 domináns lokuszok 37
 kapcsoltsági 113–115
 kromoszómái 76–77, 79
 mendeli öröklődés 35–38
 mitokondriális DNS 524, 565–566
 mitokondriális genom 522, 523
 papillomavírusa 488
 törzsejlődés 564, 565, 566
 transzgenikus 454
 ember-egér hibridsejtek 498
 emberi genom térképezése 457–468
 eszközei 458–468
 emberi T-sejt leukémia vírusok
 HTLV-I és HTLV-II 488
 embriogenezis 372
 embriionális induktorok 374
 endoplazmatikus retikulum (ER) 4, 5,
 379, 380
 szemcsés (RER) 4, 5
 sima (SER) 4, 5
 endospórák 206, 207
 endoszimbionta elmélet 527
 endoszimbiosis 527
 enhancer (erősítő) régiók 225, 229–230
 kapcsolatba lépő transzkripció
 faktorok 232–234
 enterokináz, és a fúziós fehérje
 termelődés 430
 enukleált petyeséket 372, 373
env gén 453, 487, 488
 enzimek 12
 Ephrussi, Boris 510
 epidermális növekedési faktor (EGF) 494
 funkciói 494
 receptorai 494
 epigenetikus változások 372
 epigenézis 370
 episztázis 54–56,
 definíció 54
 és a fejlődés 404–406
 típusai 55
 Epstein, Richard 286
 Epstein-Barr-vírus 488
 szerepe a Burkitt-lymfómában 491, 492
Equus asinus *lásd* szamár
Equus caballus *lásd* ló
 ER, *lásd* endoplazmatikus hálózat
 erb-B onkogén 494
 érett pszeudogének 336–337
 eRF 288
 eritromicin
 fehérjeszintézis gátlás 283
 kötődés a riboszómákhoz 284
 erős promotor, expressziós
 vektorokban 427
 értelmes szál 150
Escherichia coli
 alkalmazása a genetikai
 kísérletekben 341
bio mutáns 297
 DNS 341
 F pilus 344
 F– sejtek 344–345
 F+ sejtek 344–345
 fertőzés fűggel 207–209, 354
 genetikai térkép 347–349
 genetikai térképezés 350–358
 Hfr törzsek 345–346
 30S riboszóma alegység 263, 264
 konjugáció 344
 konjugációs idő 348
 kromoszómájának és replikációjának
 autoradiográfiai vizsgálata 163, 164
 Lacv fenotípus 350
 mismatch reparáció 313, 314
 mutátor mutációk 301–302
 növekedés 341
 primérek szintézise 170, 171
 promotereinek közös bázisszekvenciái
 190–191
- replikon 166
 repliszómája 171, 172
 riboszómái 260, 262, 263
 riboszóma felépítés, szétválasztás 263
 sex pilus 344
 szupresszor törzs 286
 transláció iniciációja 277, 278
 északi elefántfóka 547
 genetikai variabilitás 537
 etil-metán-szulfonát (EMS) 308
Englena gracilis, kloroplasztis DNS,
 térkép 522
 eukarióta 505
 definíció 9
 expressziós rendszerek 431
 génextpresszió 219–254
 gének felépítése 219–254
 iniciációs faktorok 278–279
 mRNS, sapkaképződés 251, 252
 vektorok 424, 425
 eukromatin 76, 223
 euploidia 93
 Éva 565
 evolúció, ember 565, 566
 evolúciós tényezők, és az öröklődő
 betegségek megjelenése 560
ex vivo terápia 450
 excimukleázok 312, 313
 exciziós reparáció 312
 nukleotid 312, 313
 bázis 312, 313
 exon 239
 exonsapdák 464–465
 expressziós helyek 410
 expressziós vektorok 427–431 *lásd még*
 bakteriofág
 erős promotert tartalmazó 427
 fúziós fehérjéket termelő 429–431
 indukálható 427–428
 g11 430
 expresszivitás 46, 47
 változásai 46
- F**
 F– baktérium törzsek 344
 F faktor 344–345
 F pilus 344, 346
 F plazmid 344, 345
 beépülés a gazda kromoszómájába
 346, 347
 F' plazmidok 351–352
 F+ baktérium törzsek 344
 F2-screen 390
 fág *lásd* bakteriofág
 fágmidok 423–424
 faj 2
 fajnév 2
 Fanconi-féle vérszegénység 315
 fázisvariáció 329
 molekuláris alapok 332
 fd bakteriofág, felépítés 359
 F–dukción 351
 Fedoroff, Nina 333
 fehérjék 12
 alloszterikus 192
 denaturált 298
 előállítás klónozott génekkel 431–433
 elsődleges szerkezet (primer
 struktúra) 256
 és a gének 256–260
 felhasználás a gyógyszerterápiában 449
 funkciói 256–260
 szerkezete 256, 261
 szintézis, riboszómákon 260–264
 termelődése 13–14, 371
 ujjlenyomat 299, 300
 fehérjeszekvenálás, Sanger-féle 299
 fél kiazma 179, 180
 felezési idő 378
Felis catus *lásd* macska
 felismerési elemek 270
 felismerő hélix 213
 Felsenfeld, Gary 382, 383
 feltételes valószínűség 29
 feltöltődött tRNS 268
 felülfehérítés 212
 fenilalanin
 lebontási folyamat 259, 261
 szerkezet 257
 fenilketonuria (PKU) 46
 allélgyakorisága különböző
 populációkban 558
 pleiotropia hatása 46
 fenokópia 48
 fenotípus 3
 definíciója 3, 19
- fenyő (*Pinus* fajok) diploid
 kromoszómaszám 75
 fenyleparáció 311
 Fink, Gerald 335
 finomszerkezet térképezése 362–363
 FISH *lásd* fluoreszcens in situ hibridizáció
 X174 bakteriofág
 felépítés 359
 genetikai térkép 440
 primer szintézis 170, 171
 fizikai távolság, és térképtávolság 123–125
 fizikai térképezés 441–443
 kísérletek 442
 F-lac transzfer, F– Lac– sejté 351
 flagellin 329, 331
 Fletcher, Garth 454
 fluktuációs teszt 345
 fluoreszcens in situ hibridizáció
 (FISH) 436
 fokozó hatású mutációk 191
 fonalak kicserélődése 177
 fordított genetika 457
 formamid, és a DNS denaturáció 143
 forró pontok 363
 Fos fehérje 496, 497, 498
 foszfátidilinozitol-3-kináz (PI-3-K) 495
 foszfolázster-kötés 136
 foszforosav 134, 135
 fotoreaktiváció 311
 fotoreaktív enzim 311
 F-plazmid 345
 fragmentum reakció 285
 frameshift mutációk 271, 272, 301, 304
 helyreállítás 301, 311
 mechanizmus 304
 replikáció során kialakuló spontán 302
 Frankel-Conrat H. 271
 Franklin, Rosalind 13, 15, 137
 Frelinger, Jeffrey 554
 fuzidinsav 284
 fúziós fehérjék
 et termelő expressziós vektorok 429–431
 képződése klónozással 427
 független kombinálódás elve 26, 27
 kromoszómális alapjai 86
 független kombinálódás törvénye, a gének
 a kromoszómákon helyezkednek el 105
- G**
 G *lásd* guanin
 G4 fág, primer szintézis 170
 gag gén 453, 487, 488
 GAL4 234
 DNS-kötő és transzkripció aktiváló
 domén 238
 működése 234
 galaktozid permeáz 191
 galaktozid transzacetiláz 191
 galaktozid, felhalmozódás, *lacY* hatása 194
 galambok, hasadási arány 26
Gallus domesticus *lásd* házi tyúk
 gaméták (ivarsejtek) 3, 9, 74
 keletkezése 83–85
 állatokban 75
 növényekben 75
 véletlenszerű egyesülés 538
 gametogenezis 75
 gametasugárzás, hatása a DNS
 molekulára 309
 gap gének, *Drosophila* 390–394
 Garen, Alan 286
 Garrod, Archibald 12, 15, 256–259
 Garsell, Mary 374
 gazdaspecificitást (host-range) 361
 GC box 227
 GC tartalom
 és a Tin 143
 különféle szervezetben 142
 Gehring, Walter 399
 gélelektroforézis 146, 534
 alkalmazása a hisztonok
 elválasztásában 221
 berendezés 536
 gének) 3, 19
 aktiválás, hormonokkal 379–381
 aktivitás 149–150
 alulmetilált 385
 anyai hatású 389
 átrendeződés 407–410
 bizsorsrendjének meghatározása
 436–439
 biokémiája 130–153
 enzimek kapcsolata a génekkel 12, 13
 kromoszómákon 85–88
 expresszió 239–252
 fehérjék kapcsolata a génekkel 256–260

- fehérjeszintézis kapcsolata
a génekkel 13–14
felépítés 12
fényindukált, növényi 381
háztartási (housekeeping) 371
kapcsolt 107
kémia 130–153
klónozott, *lásd* génlónozás
komponensek 12
luxus 371
megszakított 239
pair rule, *Drosophila* 394, 396
replikáció 13
riporter 392
RNS- \rightarrow 140–141
sejtautonóm 400, 401
sorrend meghatározás, két- vagy
hárompontos keresztezéssel 357–358
szegmentumpolaritási, *Drosophila* 396
szelektor, *Drosophila* 396–400
zigotikus 390
génaktivátorok 225
génáramlás 547–549
kétirányú 548
következtében fellépő allélgyakorosság
változás egy nemzedéken belül 548
mesterséges 569
szárazföldi populációból a szigetlakó
felé 548
generalizált rekombináció 178
genetika
meghatározása 2
jelentősége 14, 15
három ága
kutatói 15
osztályozása 2
genetikai kód 13–14, 271–277
átfedésmentes 271
degenerált 273
eltérések 275–277
hibák 271, 272
megfejtése 273, 274
veszélymentes 271
genetikai manipuláció
etikai problémák 454
termesztett növényeken 455–456
genetikai rendszer 141
genetikai sodródás 537, 545–547
genetikai szűrés 470
árvoldalai 471
genetikai tanácsadás 66, 67, 560
genetikai távolság 564
genetikai térkép 108, 109
Drosophila melanogaster 111, 112
ember 114, 115, 124
fűg 207–209
genetikai térképezés *lásd* géntérképezés
genetikai variabilitás 533–534
mérése 535–537
típusai 533–535
genetikai variancia, becslés 63–66
génexpressió *lásd* génműködés
génkéslet 533
génlónozás 14, 416–426
alkalmazása 448–481
cDNS 425–426
céljai 416, 426
etikai problémák 454
idegen DNS 419
rekombináns DNS 417, 418
vektorok 417–425
génkonnekció 182
génkönyvtárak 421
gémütációk 296
típusok 296–299
géműködés (expresszió) 149–150
ektópikus 399
eukariótákban, szabályozás 375–376
génszerkezet és a kapcsolata 239–252
kromatin szerkezetével összefüggése
223–224
operonokban 191–200
szabályozásának szintjei 375–379
genom 94
genomikus bevéődés (imprinting)
410–412
genotípus(ok) 8, 23
becsült gyakoriságuk a populációban 536
–fenotípus kölcsönhatások 62
–környezet kölcsönhatás 56, 57, 62
génspecifikus transzkripciós faktorok 225
génterápia 450–451
emberi, problémák 451–452
etikai kérdések 454
sarlósejtes vérszegénységben 450
géntérképezés 8,9
DNS-szekvenálás 440–441
kloroplasztiszokban 514–517
mitokondriumokban 514–517
genus 2
gepárd, genetikai variabilitás 537
Gey, George 233
G-fehérjék
funkciója 495, 496
onkogén termékek 489
gibbon, kromozómák 79
Gilbert, Walter 15, 239, 436
glicin, szerkezet 257
glózfát rezisztencia gén
transzfer a dohányba 455, 457, 458
transzfer a petúniába 455
globin gén, szabályozás 376–377
glutamil-tRNS szintézis kötődése a
a tRNSGlu-hez 270,
271
glutamin, szerkezet 257
glutaminban gazdag transzkripció
aktiváló domének 237
glükokortikoidok, hatásmechanizmus 234,
235
glükóz 191
Golgi-készülék 4, 5, 379
gombafonál 511
gorilla
kromozómái 99, 100
törzsfelbontása 564, 565, 566
gördülő gyűrű replikációs modell 173
Hfr kromozómán 346
gp28 205
gp33 205
gp34 205
gránium 505
GRB-2 496, 497
Griffith, Frederic 12
transzformációs kísérletei 131, 132
guanin (G) 13, 134, 135
Gurdon, John 372, 416
Gusella, James 468, 470, 472
gyengítő hatású mutációk 191
gyomorkapu-szűkület (*stenosis pylori*) 67
gyökérgolyva 455, 456
Gyurasits, Elizabeth 164
H
H1 220
H1 gén 331–332
H2 gén 331–332
H2A 220
H2B 220
H3 220
H4 220
Harmophilus influenzae 416
bázissorrend 440
Haig, David 411
hajtók 202
hal, transzgenikus 454
Haldane, J. B. S. 114
HAP *lásd* huntingtin-asszociált fehérje
haplodiploid 75
haploid (n) kromozómszám 3, 74, 75, 94
haplotípus(ok) 468
Ha-ras gén termék 495, 496, 497
Ha-ras onkogén 489–491
Hardy, G. H. 15
Hardy, Godfrey 537
Hardy-Weinberg-szabály 537–542
ABO-vércsoportrendszer, alkalmazás 541
kettőnél több allél esetén 540–541
véletlenszerű párosodás és normál
hasadás mellett 539
X-kromozómákhoz kapcsolt
génre 541
luzmadlagos szerkezet 256, 259
–35 box 191
hárompontos keresztezések 109–111
3' vég 136
Harris, Harry 537
Harrison, Steve 214
Harvey-fele patkány szarkóma vírus
onkogén 489
hasnyálmirigy β -sejtek 370, 371
HAT-táptalaj 498
Hayden, Michael 470
Hayes, William 344, 345
Hayflick határ 176
Hayflick, Leonard 176
házi egér (*Mus domesticus*)
diploid kromozómszám 75
hasadási arány 26
letális mutációk 298
small eye gén 400
házi macska (*Felis catus*), *lásd* még
Man-szigeti macska, számi macska
diploid kromozómszám 75
gének által meghatározott szőrszín 30–31
kariotípus 76
szőrzet színe 385
házi tyúk (*Gallus domesticus*)
diploid kromozómszám 75
ivar meghatározása 100
Rous-szarkóma vírusa 485, 486
tojáshozam és a tojás súlyának változása
hosszú időtartamú szelekciós
kísérletben 572, 573
házlégy, peszticid rezisztencia 575
háztartási gének 371
szabályozás 376
HCR *lásd* hem által szabályozott
represszor
HD *lásd* Huntington-kór
HD gén, térképezés 468–472
HeLa sejtek 233
jellemzőik 483
kloramfenikol rezisztenciája 512
héla zab (*Avena fatua*)
beltenyésztési együttható 544
öntermékenyítés 544
helikázok 167, 168
hélix-fordulat-hélix motívum 213
av génben 214
represszorokban 214
helper fűg 355
helyvírusok 488
helyettesítéses vektorok (replacement
vektorok) 421
helyspecifikus rekombináció 178, 332
baktériumoknál 329–332
hem által szabályozott represszor,
HCR 290, 291
hemoglobin 299
sarlósejtes vérszegénység (anémia) 299
ujjlenyomat (fingerprint) 300
herbicid rezisztencia gén, transzfer a
dohányba 455, 457, 458
herék 83
heritabilitás (h²) 63
becslése 63
értékei öt különböző élőlényben 65
hennafrodita *lásd* himnős
Hershey, A. D. 133, 361–362
Hershey-Chase-kísérlet 133, 134, 361
heteroduplex 179
heterogamétis nem 100
heterogén nukleáris RNS, (hnRNS) 240
heterokarion(ok) 498, 511
heterokariotípusos egyedek 89
heterokromatin 76, 223, 224
fakultatív 76
konstitutív 76
heterozigócia
átlagos 536–537
emberi enzimlokuszokban 537
heterozigóta 8
heterozigóta előny 553–554
heterozigóták 3, 23
heterózis 573
7S RNS 337
72-bázispárnyi ismétlődő
szekvencia 229–230
Hfr sejtek, 345
gazdasajt génejek áttele 345–346
hGH *lásd* növekedési hormon
HGPR *lásd* hipoxantin-guanin
foszforibozil transzferáz
hibázásra hajlamos reparáció 313–315, 350
hibrid 145
hibrid diszgenézis 337
Drosophilában 337
speciációs következmény 337
hibrid sejtek 498
malignus fenotípus recesszív
viselkedése 498, 499
hibridizációs vizsgálatok, speciális
transzkriptumokkal 376, 377
hibridizáció 19, 21, 145, 146, 376
definíció 433
plakk 423
telep 426
hibridpopuláció 549
hífa 511
himnős (hennafrodita) 407
HindII 416, 417
HindIII, fizikai térképezésben 442
hiperkómi hatás 143
hipofízis törpesség, kezelés
génlónozással 449
hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz
(HGPR) hiány gyógyítása
génterápiával 450
hisztidin, szerkezet 257
hiszton mRNS, hiányzó
poli(A)-vég 249
hisztonok 220
hibridizáció gélelektroforézissel 221
HIV *lásd* humán immundeficiencia vírus
HLA gének 50
és a szervátültetés 50
lehetséges geontípusok 50
HLA haplotípusok és az apaság
kizárhatósága 69
HLA régió, térképtávolság és fizikai
távolság kapcsolata 124
HLA-A2 fehérje, szerkezet 261
HNPC, *lásd* örökítő vastagbélrák
Holiday szerkezet 181
Holmberg, Scott A. 330, 331
holoenzim, transzkripciós képesség 189
homeobox 391
homeodomének (HD) 235, 391
homeológ kromozómák 94
homeotikus gének 123, 396–399, 407
Homo sapiens *lásd* ember
homogamétis nem 100
homogén festődésű régiók (HSR) 493
homológ kromozómák 8, 74
homológ rekombináció 178
modelljei 178, 179, 180
homozigóta 3, 8, 23
szelekció, ellene ható 550–552
homunculus 370
hordozó 29
hordozók relatív gyakorisága
a populációban 540
Horvitz, Robert 407
hosszú időtartamú szelekciós
kísérlet 64, 65
hosszú terminális ismétlődések (LTR) 334,
335, 336
retrovírusokban 453, 488
Hotchkiss, Rollin 133, 385
HoxA gén 399
HoxB gén 399
HoxC gén 399
HoxD gén 399
hőérzékeny mutások 298
hőlygmál, Mendel kísérletei 23
hőmérséklet
hatása a fenotípusra 47
és a renaució hatékonysága 143
hősokk gének 207
HSV timidin kináz gén
promoter 227, 228
transzkripciós faktorok 233
H-szegmentum 331
HTF-szitek 464
Huberman, J. 164
húgyhólyagrak, protoonkogének 489–491
Humán Genom Projekt (HGP) 457, 463
humán immundeficiencia vírus (HIV),
lásd még retrovírusok
AIDS terápia 451
génlónozás és 449
szerkezet 486
huntingtin 472
huntingtin-asszociált fehérje (HAP) 472
Huntington-kór (HD) 37–38, 44, 298,
305, 306
gén, térképezés 468–472
hurok-szár-hurok szerkezet 324
21-es triszómia *lásd* Down-kór
I
intronszoportok 246
ICR *lásd* belső kontroll régió
ICR *lásd* közös elem
idegtermékenyülés 542
idegi növekedési faktor (NGF) 494
időpontok a genetikai térképen 348
I-komplex 244
ikrek 63
DNS-ujjlenyomata 476–477
illegitim rekombináció 178, 328
illeszkedés vizsgálat 33–35
imaginális korongok 387
immunoglobulin,
gének átrendeződése 408–409
globuláris domének 260
immunitás 212
immunitás régió 212
imprinting *lásd* genomikus bevéődés
in situ hibridizáció, a gének kromozómán
való lokalizálására 436
indukálható expresszió vektorok 427–428
indukált mutációk 545

- induktor(ok) 192
 embrionális 374
 ingázó vektor 431
 Ingram, Vernon 299, 300
 iniciációs faktorok, eukariótákban 278, 279
 iniciátor, lokalizálása eukarióta mRNS-ben 280
 inozin (I) 274
 inszerciós szekvenciák (IS) 324–325
 meghatározás 323
 intelligencia és a rasszok 66
 intelligencia hiányos *lásd* IQ-pontszám
 interfázis 6, 7, 10, 79
 interferencia (I) 111
 interferonok 290
 intergenikus szuppresszió 310
 interkínézis 83
 intersexek 101
 intersticiális deléción 89
 intersticiális transzlóció 91
 intracisztronos komplementáció 352
 intragenikus szuppresszió 310
 intron(ok) 239
 csendes mutációkban 309
 felfedezés 239
 transzkripció 241
 inverz ismétlődések 202
 transzpozonok végein 324
 inverziók 90, 91
 és rekombináció 117–120, 121
 inverziós hurok 91
 inzulin
 emberi, genklónozás 449
 és a transzláció szabályozása 290, 292
 gén expresszió szabályozása 379, 380
 sertés 449
 termelés 371
 ipari melanizmus 551
 IQ pontszám, szocioemocionális háttér 66
 irányított klónozás 421
 irányított mutagenézis 226,
 helyspecifikus 432–433
 kémiai mutagenézissel való
 összehasonlítás 433
 ismétlődési kockázat 66
 empirikus 67
 ismétlődés szkeletjének DNS 144
 ismétlődő tripletek 305–306
 ivar által befolyásolt jellegek 53
 ivar kromoszómák 4, 50, 51, 79, 100
lásd még X-kromoszóma, Y-kromoszóma
 nondisjunkció, megkötés
 ivar meghatározás 100, 101
 ivaros szaporodás 74, 75
 definíció 74
 kaeszlábú rákok 74
 ivarsejtmutációk 296
 ivartalan szaporodás 74
 IVS *lásd* beékelődő szekvenciák
 izoakceptor típus 274
 izoláció, szerkezet 257
 izoszkizomerek 416
- J**
 Jacob, François 15, 186, 192, 194, 345–348
 Jacobs, W. 131
 Jeffries, Alec 475, 476
 jelvitel kapcsolat 400
Drosophila fejlődése során 400–404, 405
 jelvitel fehérjék, mint onkogén
 termékek 489
 juh (*Ovis aries*)
 kariotípus 76
 nem által befolyásolt tulajdonságok 53
 transzgenikus, fehérje termékek 454
 Jun fehérje 496, 497, 498
 Jurassic Park 462
- K**
 kapcsoló régió (J) 408–409
 kapcsoltság 27, 107
 embriónál 113, 114, 115
 kapcsoltsági térkép 108, 109
 kapcsoltság 116
 kapcsoltság-X 116
 karcinogén(ek)
 meghatározás 483
 mint mutagének 483–485
 végső 484
 karcinogenezis, meghatározás 483
 kariotípus 75
 Karpechenko, G. 95
 katabolikus enzimek 197
 katabolizáló faktorok (CAP) 196, 197
 katabolizáló represszió 196
 kazein mRNS, felezési idő, a prolaktin
 hatása 378
 Kearns-Sayres-szindróma (KSS) 525
 kecske (*Capra hircus*), kariotípus 76
 kékbaktériumok 505
 Kerner, Albert 311
 kémiai mutagenézis 306–308
 és az irányított helyspecifikus
 mutagenézis 433
 késlekedő szál 156
 kétfonális crossing over,
 következményei 116
 kétfonális RNS által inaktív inhibitor
 (DAI), felhárítás 290
 kétirányú replikáció 157, 158, 163–166,
 165f–166
 kétszeres coupling heterozigóták 107
 kétszeres repulziós heterozigóták 107
 kettős crossing over
 nem-tesztvérmutációk között 117, 120
 hatásai 111, 113
 kettős génhatás 55
 kettős hélix, DNS 13
 fonalak szétválasztása 143, 167–170
 visszatérő szálak 143–145
 kettős rekombinánsok gyakorisága 111
 keveredés 549
 kfi-hely 180
 kfi-négyzet próba 33–34
 kfi-szerkezet 180
 Khorana, Har Gobind 14, 15, 272, 273
 kizama 10, 82, 107
 kizsnavándorlás 178
 Kidwell, Margaret 337
 kilobázispár (kbp, kb) 146
 kimerák 238
 Kimura, Motoo 561
 kinetochor 76
 King, Samuel 561
 Ki-nv gén 493
 katórés víruszám (burst size) 360
 klasztogén (törést kiváltó) 309
 Klenow-fragmentum, cDNS
 klónozásában 425
 Klinefelter kór 97, 101
 klón(ok) 416, *lásd még* klónozás,
 gének klónozás
 definíció 372
 azonosítása 425
 klónozás
 pozicionális 457
 mesterséges élesztőkromoszómákban
 460–463, 464
 kloramfenikol 281
 fehérjeszintézis gátlása 283
 kölcsönhatása a riboszómákkal 284
 szerkezet 283
 kloroplastisz (szintest) 44, 505
 DNS 506, 507, 510, 518, 519, 522
 gének öröklődése 505, 507
 géntérképezés 514–517
 eredet 526–528
 prokarióta eredet 521
 RNS polimeráz 521
 rRNS 519
 szegregáció a petesejtben 506, 507
 Klug, Aaron 222
 knock-out(ok) 465–468
 kódoló régió *lásd még* nyitott leolvasási
 keret
 azonosítás 440
 kodominancia 44
 kodon(ok) 14, 150, 266
 átfedésmentes 271
 kodon-antikodon illeszkedés 266, 267
 Kohne, D. E. 144
 kointegrátum, 326, 327
 felbomlása 328
 komplementáció 352
 cisztronos 352
 intracisztronos 352
 komplementációs csoport 364
 komplementaritás 13
 komplementer 140
 komplementer DNS 376–377
 komplementer génhatás 54
 kondicionális letális mutációk 47, 298
 kondicionális mutációk 298–299
 konjugáció, baktériális 343–350
 klasszikus kísérletek 343
 megszakított, térképezés 346–349
 egyirányú DNS átadás 344
 időpontok, géntranszfer alatt 348
 Hfr törzsek géntípusi sorrendje 348
 rekombináció 350
 teljessé válás 350
 konkatemerek 173
 konstans régiók 408–409
 konstitutív mutációk 194
 konstitutív operátor 194
 konszenzus szekvenciák 191
 jelentőségük 242
 kontinuu replikáció 156
 konzervatív áthelyeződés *lásd* konzervatív
 transzpozíció
 konzervatív replikáció 156, 160, 161,
 konzervatív szubsztitúció 220
 konzervatív transzpozíció (áthelyeződés)
 326, 328
 kopaszág 53, 54
 kópia DNS (cDNS) 376–377
 klónozás 425–426
 kópiához hasonló elemek 333
 korepressor 198
 Kornberg, Arthur 157, 170
 korrektor aktivitás 176, 177
 korreláció, különböző bélégekre,
 egyedek között 63
 kozregációs analízis 518
 kotranszdukció 355
 közvetlen térképezés 357–358
 két marker s gyakoriságának (x)
 kiszámítására 357
 kotranszdukciós tesztelés (sreen) 356
 Kozak, Marylin 280
 kozmidok 423
 környezet hatása a fenotípusra 57, 58
 köröm-térdfalhas kór, ABO
 vércsoportok kapcsolat 113
 követő szál 156
 közepes mértékben ismétlődő DNS
 szekvenciák 144
 közönséges levestermés, mtDNS
 vizsgálatok 565, 566
 közös DNS 528
 közös kert kísérlet 62
 központi (core-) elem 227
 köztes elem (ICR) 229
 köztes termékek 12
 közvetlen korai gén 234
 kriptikus mutáció(ok), és a galaktózid
 felhalmozódás 194
 kromatida
 acentrikus 120
 dicentrikus 20
 testvér- 7, 10, 80, 81, 83
 nem-tesztvérs-, kétszeres crossing over
 117, 120
 kromatin 4, 5, 7, 131
 kondenzálódás 224
 szerkezet 220
 kromoszóma 7–8, *lásd még* ivari
 kromoszóma
 akrocéntrikus 75, 76
 B-kromoszóma 75
 dupla miniatűr (DM) 493
 centromerem régió 77
 diploid párok 8
 emberi 77, 79
 eukromatikus régió 76
 fehérjétől megfosztott,
 hurokképződése 223
 felépítés 75
 festődő és nem festődő régiók 77
 füzis 94
 gének 85–88
 gibbon 79
 hisadás 94
 heterokromatikus régiók 76, 77
 homeológ 94
 homológ festődésű régiók (HSR) 493
 homológ 8, 74
 -inverziók 90
 -karok 75, 76
 kicserélődés 88, 90–93
 különböző fajokban 99, 100
 leány- 81
 másodlagos befűződése 76
 metacéntrikus 75, 76
 méret 75
 sávok 76–77
 sávzási mintázat 76–77
 szám feletti (B-) 75
 szerkezeti változások 88–93
 szubmetacéntrikus 75
 telocéntrikus 75, 76
 transzlóció 88, 90–93
 kromoszóma deléciónok 89, 90, 363
 kromoszómális füzis 94
 kromoszómális hasadás 94
 kromoszómaséta, alkalmazása
 a térképezésben 473
- kromoszómaszám 9, 74, 75
 haploid 74, 75
 változások 88, 93, 94
 diploid 74, 75
 meióziban 83,
 mitózisban 83
 ivaros szaporodás élőlényekben 81
 kromoszómaugrás, alkalmazása
 a térképezésben 473, 474
 krónikus progresszív szemizombénulás
 (CPEO) 525
 KSS *lásd* Kearns-Sayres-szindróma
 kukorica (*Zea mays*)
 áthelyező mutációkai elemek 332–333,
 334
 C-génmutáció 332
 C-locusz 332, 333
 diploid kromoszómaszám 75
 kölcsönös megtermékenyítés 573
 közös DNS 528
 kutyá (*Canis familiaris*)
 diploid kromoszómaszám 75
 kariotípus 76
 csípőzületi diszplázia 61
 különös bázispárok, a kodon és az
 antikodon között 274, 275
 kvantitatív jellegek 58
- L**
 lac operon 191–192, 342
 negatív szabályozása 191
 és a szabályozott mutációk 194, 197
 pozitív szabályozás 196–197
 lac repressor 192
 lacA 192
 lacI gén 192
 Lacv fenotípus 350
 lacY 192
 és a galaktózid felhalmozódás 194
 lacZ 192
 lag periódus, bakteriofágok növekedése
 során 360
 lag-fázis (lassú növekedési szakasz),
 baktériumok növekedése során 341
 Laks, Henrietta 233
 laktóz 191
 általuk által lakozó 192, 193
 lamblá- () füzis 421, 422
 cDNS klónozás 426
Escherichia coli fertőzés 207–209, 354
 füzis fehérje képződése 430
 genetikai mutációk hordozója 354, 355
 genetikai térképe 207–209
 pho 355
 gal 355
 litikus fertőzés 207–208, 354
 litikus reprodukciója 207–209
 lizogén fertőzés 207–208, 354
 mutáció inszerciósval 323
 replikációja 173,
 szerkezete 359
 transzdukáló füzis 354, 355
 lamblá repressor 207
 és operátor 214
 láncszámlálás eljárás, beltenyésztési
 együtthalás megadására 545
 Lane, D. 508
 lasszó-modell, mRNS splicing 243–245
 látszólagos, bakteriofágok növekedése
 során 360
 látható mutációk 297
 Lawrence, Peter 392, 393
 leánykromoszómák 81
 Lebers-féle öröklődő litóideg neuropátia
 (LHON) 525
 Leder, Philips 241
 Lederberg, Joshua 331, 343, 344
 Lejeune-kór 89
 len, rozsda gomba rezisztencia 577
 leolvasási keret 272
 leptotén szakasz 82
 Lesch-Nyhan szindróma 450
 letális mutációk 44–45, 298
 domináns 298
 kondicionális 47, 298
 recesszív 298
 letalitás 44
 leu operon 342
 leucin cipár 237
 modell 237
 szerkezet 237
 leucin, szerkezet 257
 leukémia, génterápia 450
 leválasztó faktor-1 (RF-1) 288
 leválasztó faktorok-2 (RF-2) 288

- Levan, Albert 76
Levene, P. 131
Levi-Montalcini Rita 494
Lewis, Ed 390
Lewontin, Richard 537
LexA fehérje 314
lexA gén 314
LHON *lúd* Lebers-féle öröklődő látóideg neuropátia
Li-Fraumeni szindróma 501
ligeti csiga (*Cepaea nemoralis*)
házimintázata 533
Linn, Stewart 416
Linnane, Anthony 514, 515
Lis, John 403
Liszenkó, Trofim 572
lisztbogár (*Tribolium*)
multigén családok 123
pesticid rezisztencia 575
litikus fertőzés, *Escherichia coli* -fág által 207, 208
és a transzkripció időbeli szabályozása 209
lizin, szerkezet 257
lizis 207
összehasonlítása lizogéniával 211–212
lizogén 207
indukció 213
lizogén fertőzés, *Escherichia coli* -fág által 207, 208
lizogénia
l gén autoregulációja 210, 211
kialakítása 210
kapcsolata a lizissel 211, 212
fenntartása 210–212
ló (*Equus caballus*)
diploid kromoszómaszám 75
kariotípus 76
Logares, Paula Eva 68
log-fázis, baktériumok növekedése során 341
lokusz 8, 22
Lovett, Michael 167
lötyögő bázis párok, 274, 275
lötyögő kód hipotézis 274
lötyögő pozíció, 276, 309
LTR *lúd* hosszú terminális ismétlődések
L11 operon, transzlokáció gátlás 288, 290
luciferáz gén, transzfer dohánynövénybe 455, 459
Luria, Salvador 345
luxogének 371
Lyon, Mary 385
Lyon-hipotézis 385, 386
- M**
M13 fág
DNS klónozás 424
primer szintézis 170
vektorok 423
MacLeod, Colin 131
madár leukózis vírus (ALV) 488, 490
madárszarkóma vírus (ASV) 486
májmooha (*Marchantia polymorpha*)
kloroplaszt DNS 521
kloroplaszt genom 523
Mal de Meleda 558
rokon házasságok 560
malária
földrajzi elterjedés 535
sarlósejtes vérszegénység allélgyakoriság, kapcsolat 534, 535
pesticid rezisztencia 575
maligánusz transzformáció 483
Manszgeti macska, farkatlanság 45, 47
MAP kináz (MAPK) 290, 496, 497
Margulis, Lynn 527
markerek 357
második helyen bekövetkező reverzió 310
második utódnemzedék (F2) 3, 19
másodlagos szerkezet 256, 258
Matthaei, Johann Henrich 272
Maxam, Alan 436
McCarty, Maclyn 15, 132
McClintock, Barbara 9, 15, 332, 333
McGrady, Pat 483
McKusick Victor, *Mendeli öröklődés* embelen 35
McLeod, Colin 15
MCS *lúd* sokszoros klónozó hely megabázis (Mb) 146
megaszenzitivitás 84, 84
megfordult (reverz) duplikációk 88
megszakított gének 239–243
megtermékenyítés 75
meiózis 8–11, 27, 75, 81–83
I. meiózis 9, 10, 81, 82
II. meiózis 9, 11, 81–83
MEK 496, 497
melanizmus, ipari 551
Mendel törvényei 3
első 24
második 26
Mendel, Gregor 2, 3, 15, 19, 23
borsó kísérletei 19–26
mendeli genetika 2
Mendeli öröklődés emberi jellegekre 35–38
mennyiségi jellegek 58–63
azonosítás 61
genetikai modell 62, 63
környezet hatása 62
normál eloszlása a populációban 60–61
poligén jelleg 58–60
szelekció hatása 63, 64
mennyiségi jellegeket meghatározó lokusz (QTL) 58
merodiploidok 194, 344
lac operonja és a regulációs mutációk hatása 194, 195
kialakítására komplementációs tesztekhez 354–355
merozigóták 344
MERF 525
Meselson, Matthew 15, 159–160, 186
Messing, Joachim 423
mesterséges élesztőkromoszómák (YAC) 460–564
mesterséges szelekció 570–572
metafázis 6–7, 79–81
I. metafázis 9, 10, 82
II. metafázis 9, 11, 83
metafázis sik 80
metahim 101
metanósteny 101
metasztázis, definíció 483
metil transferáz 251
metilációs mintázat, citozin 305
metiláció, folyamat 252, 252
metionin, szerkezet 257
metrikus tulajdonságok 61
mezoderma 374
mezőgazdaság, klónozott gének alkalmazása 452–457
Michael Crichton, „Jurassic Park” 462
Mimococcus nukleáz 220
Miescher, Friedrich 9, 12, 15, 131
mikrokromoszómák 75
mikroorganizmusok, morfológiai mutációk 297
mikrosporogenezis 84
mikroszatellit(ek) 460
instabilitás 316
Miller, Lois 431
minőségi kémiai analízis, alkalmazása a DNS vizsgálatában 133
miotóniás disztrofia (miotóm-kínáz) 305
miotóm-kínáz *lúd* miotóniás disztrofia
Mimabilis jalapa *lúd* csodatölcsér mismatch reparáció 313, hibája 316
mikroszatellit instabilitás 316
miszensz mutáció 271, 299
Mitchel, H. K. 510
Mitchel, M. B. 510
mitogén-aktivált protein(ek) (MAP) 496
mitokondriális DNS
emberi 524, 565–566
emlős, térképezés 522–526
élesztő 524
mitokondriális gének és a drogrezisztencia 512
öröklődése 509–512
térképezése 515
élesztőben, rekombinációs gyakoriságok 514
mitokondriális genom
emberi 522–523
molekuláris térképezés 522–526
élesztő, főleges szekvenciák 526
mitokondriális mutációk, és az emberi betegségek 525
mitokondriális riboszómák 505
mitokondrium 4, 5, 505
anyai öröklődés 565
belső membrán 505
crista 505
eredet 526–528
genetikája 505
külső membrán 505
mitotikus rekombináció, *Drosophila* 402, 403
mitózis 4, 6, 7, 74, 75, 78–81
szakaszai 79–81
MN vércsoportrendszer 44
kizárható apai genotípusok 67
molekuláris genetika 15
definíció 2
kutatók 9
sejtorganellumoké 518–526
tumorvírusoké 486–488
molekuláris paleontológia 462
molekuláris térképezés, mitokondriális genomé 522–526
Monod, Jacques 192, 194
monohibrid keresztezés, definíció 19
monomorf lokusz 536
monozómia 95, 96
morfogének 374–375
morfológiai mutációk 297
Morgan, Thomas Hunt 4, 8, 15, 85, 86, 105
kapcsoltsági kísérletei 105–108
mozaikus embrió 371
mozaikus fejlődés 371
mozgó genetikai elemek 296, 332, 334
lúd még áthelyeződő genetikai elemek
mRNS (messenger RNS) 14, 150
anyai üzenetek 378
cDNS klónozásában 425
felfedezése 186
hipotézisek 186, 187
másodlagos szerkezet, és a transzlokációja 280, 281
mesterséges -k, és a kodonok felépítése 272, 273
riboszóma kötő helyek, transzlációban 279
saplaképződés, eukariótákban 251
szabályozás a transzláció szintjén 378, 379
transzláció szabályozása 288, 289
MS2 bakteriofág, szerkezet 359
RNS-ének másodlagos szerkezete és hatása a transzlációra 289
Mu bakteriofág, 328–329, 337
G-szegmentum inverzió 332
genetikai térképe 329
lizogén fázis 328
litikus fázis 329
profág 328–329
transzpozitív elem 328–329
multiplex alléla *lúd* többszörös alléla
Muller, H. J. 15
Mullis, Kary 495
multigén családok 123, 566
multiplicitás, fertőzése (m.o.i.) 361
Mus domesticus *lúd* házi eger
muskáthi (*Pelagomimus*)
citoplazmatikus öröklés 505, 506
tarka levelű 506
muslica *lúd* *Drosophila*
mutáció(k) 14, 296
amber (borostyán) 286
anyagcsere érintő 297–298
back- 310
ész-domináns 194
csendes 309
csírvonal 296
dinamikus 306
domináns negatív 196
előremutató 310, 545
fokozó hatású 191
forward 310
frameshift 271, 272, 301, 304
gén 296
gyengítő hatású 191
hatása a DNS-re 299
hőérzékeny 298
indukált 545
intronokban 309
ivarsejt 296
kialakulása a DNS replikációs mechanizmusa miatt 301–302
két crossing over között 357
kondicionális 298–299
konstitutív operátor 194
kromoszómális 88, 296
látható 297
letális 298
miszensz 271, 299
mitokondriális, és a betegségek 525
morfológiai 297
pleiotróp 352
pont 299
populációgenetikai hatása 545
sarlósejtes vérszegénységet okozó 299–300, 301
spontán 301–306, 545
sugárzások által indukált 308–309
szomatikus 296, 297
szupresszor 310
térképezés 357
valódi reverz 309–310
mutációs ráta 306, 545
különböző szervezeteké 306, 307
mutagének 12, 301
karcinogén anyagok 483–485
kimutatásuk 316–318
mutáns(ok) 8
genetikai kutatásokban 2
konstitutív 194
kriptikus -ok hatása a galaktózid felhalmozódására 194
ochre (okker) 286
mutátor(ok) 301
Myc fehérje 497
myc gén
szabályozás 493
termék 497
myc protoonkogén
transzláció a Burkitt lymphómában 491, 492
Mycoplasma capricolum, genetikai kód kivételek 276
- N, NY**
nagyértékben ismétlődő szekvenciájú DNS 144
nagyszűlőség kizárása 68
negatív szabályozás, *lac* operoné 192
negyedleges szerkezet (quaterner struktúra) 256
négyfonalás crossing over 116
négyzetes crossing over és hatásai 111, 113
nem által befolyásolt jellegek 54
nem rekombináns kromoszóma típus 107
nem szülői kromoszómatípus 106
néma szál 150
nemhez kapcsolt gének 50
nemhez kötött öröklődés 4–8, 50–54
nem-radioaktív jelölt próba 435
nemre korlátozó tulajdonság 53
nem-repetitív DNS *lúd* egyedi szekvenciájú
nem-szülői kromoszómatípus 106
nem-templát szál 150
nemtestvér kromatidok, kettős crossing-over 117, 120
nemzetiség 2
Neurospora crassa 12
anyai öröklődés 510
aszospórák sorrendje 117–120
crossing over nélkül 117, 119
diploid kromoszómaszám 75
életciklus 119, 511
gén-felhérje kapcsolat, kísérletek 259–260, 262
génkonverzió 182
heterokarion 511
heterokarion teszt alkalmazása 511, 512
hífk 511
két nem-testvér kromatida, kettős crossing over 117, 120
négyfonalás crossing over 117
pantoténsav hiány és a mutánsok 297
párosodás 511
poky fenotípus 510
protoperitécium 510
N-formil-metionin (fMet) 277
N-gén 209
NGF *lúd* idegi növekedési faktor
nick 158, 313, 314
nick transzláció 157
Nicotiana tabacum *lúd* dohány
Nilsson-Ehle, Herman, 58
Nirenberg, Marshall 14, 15, 272, 273
nitrocellulóz
füzős fehérje kimutatásának 430–431
plakkhibridizációs eljárásban 423
Nomura, Masayasu 261
nondisjunction 86, 87, 95, 96
ivari kromoszómák 96–98
nonpermisszív hőérzékeny 298
nonszensz kodon 286, 301
Northern-blot 433, 435
génaktivitás meghatározása 434–435
Nörd 416, 417
növekedési faktor receptor(ok), onkogén termékek 489, 498
növekedési hormon, emberi (hGH), génklónozás 449
növekedési hormon gén, transzgenikus

- állatokban 452, 454
növekedési periódus bakteriofágoknál 360
növény(ek)
 transzgenikus 381
 i gének fényindukciója 381
 növénynevelés 570
N-terminális (amino-terminális) vég 379
nukleinsav(ak) 131
 fizikai kémiája 141–149
 cukrai 135
 5'-vég 136
 3'-vég 136
nuklein 131
nukleoid 505
nukleolusz 5, 7, 76, 80
nukleolusz organizátor régió (NOR) 76
nukleoszóma fűzér 222
 kondenzáció 222–223
nukleoszómák 220–221
 kondenzálódása a DNS-ben 221–222
 felépítés 220–221
nukleotid exciziós reparáció 312, 313
nukleotidok 13, 135, 136
nukleozidok 135
Nüsslein-Volhard, Christiane 390
nyitott promotor komplex 190
nyírfaaraszoló (*Biston betularia*) 551
 színváltozatok 49, 50
nyitott leolvási keret (ORF) 288, 440.
 lisd még kódoló régió
- O**
ochre (okker) mutánsok 286
Okazaki, Reiji 156, 161
Okazaki, Tuneko 163
Okazaki fragmentumok 162, 163
 RNS primerjei 163
oligohisztidin expressziós vektor (pTrcHis) 429
oligomer fehérje 352
oligonukleotid(ok) 163, 425. *lisd még*
 polinukleotid próbák
 irányított helyspecifikus mutagenézisben 452
oltóanyagok, előállítás klónozott génekkel 449
olvadási hőmérséklet (T_m) 142
 és a GC tartalom 143
O'Malley, Bert 377
O₆-metil-guanin metil transferáz 311–312
onmatidium 400
onkogén vírusok 485
onkogén(ek)
 celluláris ~ 485, *lisd még* protoonkogének
 protoonkogének átalakulása
 onkogénekké 489–493
 növekedésszabályozása 498
 virális 485, 487, 488, 489
onkogenezis 489
 colorectalis tumoré 501
oocya 84
oocya SS rRNS-gének 384
oogenezis 83–85, 378
oogonium 84
ootida 84
opál kodon 286
operátor 192
operon(ok) 191–200
 felfedezése 192–196
 kloroplasztisz géiben 521
opinok 455
orangután
 kromoszómái 99, 100
 törzsféjlődése 564, 565, 566
ORF *lisd* nyitott leolvási keret
orsófonalak 80
osteocalcin gén 381
osteosarcoma 499
osztódási orsó 10, 80
ovalbumin, mRNS szintézise különböző
 szövetekben 377, 378
Ovis aries lisd juh
ózonréteg 308
- Ö**
öngyilkos enzim 312
önmagától összeszerelődő rendszer 263
öntermékenyítés 19, 20, 542, 543
 három beltenyészett vonal kialakulása 573, 574
 hetero- és homozigóták gyakoriságának
 alakulása 542–543
 szülőök és az utódok relatív
 gyakorisága 543
özön DNS 325
öregedés és a mitokondriális mutációk 525
örökítő anyag, természete 131–137
öröklődés kromoszóma elmélete 4–8
öröklődő betegségek
 előfordulási gyakoriság, befolyásoló
 egyéb tényezők 558–561
 genetikai hajlam 60, 61
 génjeik térképezése 468–475
 jövőbeli előfordulás előrejelzése
 a mutáció és a szelekció alapján 559
 kialakulása mitokondriális
 mutációkkal 525
 valószínűsége recesszívítás esetén 66
öröklődő vastagbélrák (HNPCC) 316
örökzöld mamutfenyő (*Sequoia
 sempervirens*) genetikája 506, 507
összegzési szabály 28
 genetika példák 28
összegzési szabály 28
5-bróm-uracil (5Bu) 306
 mutagenézis 306
 szerkezet 307
5Bu *lisd* 5-bróm-uracil
5-metil-citozin, dezaminálódás 304, 305
5' vég 136
- P**
P elemek 337
 mint mutagének a *Drosophila*
 kísérletekben 337
P1 fág, általános transzdukciónál 355–357
p21 fehérje 490
P22 fágok, hélix-fordulat-hélix
 motivumok 214
Pabo, Carl 234
pachitén 82
pair rule gének, *Drosophilában* 394–396
palindromok 417
Palmiter, Richard 452
Pan troglodytes lisd csimpánz
pángenezis elmélet 19
pantoténsav (B₅-vitamin), szintézis 259,
 262
papillomavírus 488
papucsállatka (*Paramecium*)
 drogerezisztencia 512
 genetikai kód, eltérések 276
paracentrikus inverzió 90, 91
paracentrikus inverziós hurok 118–121
paradicsom 567–568
 Flavr Savr 455
paraszegmentumok, embrionális,
 muskulában 387, 389
Pardee, Arthur 194, 493
Pascal-háromszög 30
Pastan, Ira 196
páztázó modell 280
Patau kör 97
Pauling, Linus 137
pBluescript (pBS) 423–424
PCR, *lisd* polimeráz láncreakció
Pearson-szindróma 525
Platagonium, lisd muskátli
penetrancia 46
 inkomplet 46
peptidkötés(ek) 256, 258
peptidok 299
peptidil transferáz 281
peptidil-puromicin 283
Pereyra, Liliana 68
pericentrikus DNS 224
pericentrikus inverzió 90, 91
pericentrikus inverziós hurok 120, 121
permisszív hőmérséklet 298
Pero, Jan 204
peszticid rezisztencia 61, 575
 példák 576–577
 szabályozás 577
 tényezői 575–576
 terjedése 576
pete (tojás) 83–84
petefészek 83
PHAS-I, foszforilálása és a transzláció
 szabályozása 290, 292
P-hely (peptidil-hely) 281
Pima fajok *lisd* fenyő
pirimidinek 135
Pisum sativum lisd borsó
pKC30 indukálható expressziós vektor 428
plakk(ok) 211
 baktériumpáriszon 354, 358, 360
 plakkhibridizációs eljárás 423
 plakk-képző egységek 360
 plakk-vizsgálat 358, 360
plazmid(ok) 324
 F faktorok 345
 2-mikromor 431
pBR322, génlónozás 417, 418
pBS *lisd* pBluescript
pSCI01 417, 418
pUC, génlónozás 419–421, 427
pSPL1 464
replikáció 166, 167
szerepük a baktériumok genetikájában 351
plazmid vektorok 417–421
pleiotróp mutációk 352
pleiotropia 45
P-M rendszer 337
pN 209
pN gén(ek) 453, 488
 retrovírusoké 335
poláris testek 83
polarizáló aktivitású zóna (ZPA) 374–375
poli(A) 249
poli(A)-polimeráz 249
poli(A)-végek 249–250
poliadeniláció 249–251
policisztronos mRNS 192
poligénis tulajdonságok 58
polimeráz láncreakció (PCR) 459–460,
 461, 463
 érzékenysége 462
 korlátai 462
polimorf lokusz 536
polimorfizmus és heterozigócia 536–537
polinukleotid láncok, hibridizáció 145,
 146
polinukleotid próbák 425
polinukleotid(ok), kémiai szerkezet
 134–137
polipeptidlánc 256
poliploidia 94
poliszómák 5, 265–266
politén kromoszómák 77, 90
pólussejtek 386
pontmutáció(k) 299
 protoonkogénekben 489–491
ponty (*Cyprinus carpio*)
 diploid kromoszómaszám 75
populáció, definíció 535
populációgenetika 533–556
 definíció 2
 alkalmazás 533
 posztreplikációs reparáció 313
 posztranszkripció fázis 376
 posztranszkripció szabályozás 378
 posztranszlációs módosulások, fehérjéké 376
 posztranszlációs szabályozás 379
Pott, Percival 483
POU domén 236
POU-box 235
pozicionális klónozás 457
pozitív fonális fágok 288
pozitív szabályozás, *lac operoné* 196, 197
p53 501
pp60src 494, 495
pQ 209
Prader-Willi-szindróma 411
PRM 210
PRE 210
preiniciációs komplex 230
 klasszikus polimeráz III promoterek 232
 polimeráz I 231
 polimeráz II, szerveződés 231
preproinzulin, proteolitikus
 feldolgozás 379
Prinow box 191
Prinow, David 190, 191
primázok 170
primer(ek) 157
 *E. coli*ban 170, 171
 eltávolításukkal keletkező hiány pótlása
 173, 174
 és templát különbsége 159
 szintézis 170, 171
primoszóma 170
PRM 210
probandus 37
processzállódás 246
processzivitás 173
profág 207
profázis 6, 7, 79–80
 I. profázis 9, 10, 82
 II. profázis 9, 11, 83
 proflavin, szerkezet 307
programozott sejtihal 501
proinzulin 379
prokarióta sejtek, eukarióta génekkel 431
prokarióták 505
 definíció 9
 proliferáló sejtmagi antigén (PCNA) 173
prolin, szerkezet 257
prolinban gazdag transzkripció aktiváló
 domének 238
promoter felő (upstream) szakaszához
 kötődő faktor (UBF) 231
promoter(ek) 186, 187, 191, 225–229
 azonosítás polimerázII-el 227–228
 azonosítás polimerázII-vel 225
 azonosítás polimerázIII-al 228–229
 közös báziszekvenciái az *E. coli*ban
 190–191
 RNS-polimeráz kötődése 190
propidium jodid 81
protein tirozin kináz 494, 495
 mint onkogén termék 489
Protos, kromoszómális
 ivarmeghatározás 100
protoonkogének 485, 487, 488
 aktiválása 492
 amplifikációja 492, 493
 átalakulásuk onkogénné 489–493
 funkciói 493–498
 pontmutációk 489–491
 szabályozásuk megszűnése 493
 termékei 494
 transzlációik 491–492
protopentécium 510
prototrófok 297, 342
provírus 334, 488
 celluláris protoonkogén aktiválása 488,
 490
Psid 417–418
 idegen DNS klónozása 418, 419
pseudodominancia 90
pseudogének 336
 érett 336–337
pseudouridin () 267
Ptashne, Mark 214, 238
pTrcHis *lisd* oligohisztidin expressziós
 vektor 429
ptpL1 expressziós vektor 427
 alkalmazás 428
pulsusjelölés kísérlet 384
Punett tábla 26
Punnett, R. C. 26, 54, 105
purinok 135
puromicin 283
puromicin és a
 fehérjésztézis 283, 284
 riboszómák 284
- Q**
Q-gén 209
QTL *lisd* mennyiségi jellegeket
 meghatározó lokusz
- R**
Raf fehérje 496, 497
ragadós végek 417
rágcsálók
 peszticid rezisztencia 575
 tumor vírusaik 486
rák
 genetikai instabilitás 316
 Hayflick-határ 176
 mikroszatellit instabilitás 316
 okai 483–485
 protoonkogének 489–491
 szomatikus mutációk 296
 telomerák gátlása 176
 vírusok 485–493
rákos sejtek
 aneuploidia 483
 halhatatlanság 483
 jellegzetességeik 483, 484
 növekedés 483
 transzformált fenotípus 483
Ralls, Kathy 568
Rana pipiens
 diploid kromoszómaszám 75
RAR *lisd* retininsav receptor
RARE *lisd* retininsavra reagáló elem
Ras fehérje 490
 funkciói 495, 496
 jelátvitel 496, 497
 ras onkogének 490
 mutációk 491
 Ras cserélő 496, 497
 raszok és intelligencia 66
RB gén, térképezés 499, 500
reakciónorma 58
reakcióutak 12
realizált heritabilitás (h₂) 64
rc gének 350
recA gén 314
RecA koproteáz 314, 315

- receptor tirozin kináz 400, 403
 recesszív 19
 allél 3
 betegségek gyakoriságának mutációs és szelekciós hatása 558, 559
 jellegek emberben 36
 jellegek öröklődése 36–37
 lokuszok emberben 36
 reciprok transzlokáció 91, 92
 reciprok rekombináció 178
 reciprokereztesztelés, definíció 19
reion 363
 redukciós osztódás 81
 regulatív embrió 372
 regulatív fejlődés 371, 372, 373
 rekombináció 8, 82, 107, 154–184
 általános transzdukció 355
Drosophilában 8
 fajtái 178
 inverziók és 117, 120, 121
 konjugációban 350
 közvetlen bizonyítéka 9
 mechanizmusa 177–182
 négyfonalas állapotban 117
 RecBCD mechanizmus 179–182
 rekombinációs hibajavítás 313, 314
 rekombinációs gyakoriság 108, 111
 hímekben és nőstényekben 113
 rekombináns DNS, 323, 341
 klónozási kísérletek 417, 418
 rekombináns kromoszómák 107
 rekombináz, Hin 331–332
 relatív rátermettség (relatív fitness, W) 550
 reaturáció 138
 ideje és hatékonysága 143
 replika teszt 342, 419
 replikáció 140, 154–184
 diszkontinuos 156
 diszperzív 156, 160, 161
 DNS- 13, 140
 DNS-bázisok miatt fellépő replikációs hibái 302
 egyirányú 157, 158, 166, 167
 enzimei 167–177
 gördülő gyűrű mechanizmus 173
 iniciációja 170, 171
 kétirányú 157, 158, 163–166
 kezdőpontja 164
 kontinuos 156
 konzervatív 156, 160, 161
 mechanizmusának bizonyítékai 159–167
 pontossága 176, 177
 RNS genomokban 177, 178
 szemidiszkontinuos 156, 157, 162, 163
 szemkonzervatív 13, 156
 szigma típusú 173
 terminációja 173–176
 replikációs kezdőpont 164
 replikációs villa 164
 replikatív transzpozíció 326
 replikon 166
 replizóma 171
E. coli-ban 171, 172
 represszió 192
 repulzió 105
re helyek 327, 328
 restrikciós endonukleáz(ok) 167
 klónozásban 416–417
 restrikciós enzimek elnevezés 416
 felismerési szekvencia és hasító hely 417
 gének számának meghatározása 433
 restrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus (RFLP) 123–125, 458–459, 460
 ciszta fibrózis génjének térképezése 472
 Huntington-kór génjének térképezése 468–469
 restrikciós hasítóhely 417
 elhelyezkedés a pBR322 plazmidon 417
 restrikciós térkép 441
 restrikatív hőmérséklet 298
 rezolváz gén 328
 retininsav receptor (RAR) 379–380, 381
 retininsav, morfogén hatás 374
 retininsavra reagáló elem (RARE) 379–381
 retinoblastóma 46, 499, 500
 géntérképezés 499, 500
 retropozon 335, 336
 retrotranszpozon 335–336
 retrovírus(ok) 333–337, 486, *Lásd még* humán immundeficiencia vírus genetikájuk 487–488 fertőzés 452, 453 replikáció 334, 335
- reverz transzkripció 334
 transzformáció 487, 488
 vektorok a génterápian 451, 452
 revertánsok 286
 reverz duplikáció 88
 reverz transzkripció 334, eukarióta genomok evolúciója 336–337
 reverz transzkriptáz 334, 335, 376, 377
 cDNS klónozás 425
 reverzió 286, 309–311
 második helyen bekövetkező 310
 valódi 309–310
 RF-1 *lásd* leválasztó faktor-1
 RF-2 *lásd* leválasztó faktor-2
 RF-3 288
 RFLP *lásd* restrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus
rhl gén 331–332
 R-hurok 239, 519, 521
 ribonukleáz H (RNáz H), cDNS klónozásában 425
 ribonukleinsav *lásd* RNS
 ribonukleozid-trifoszfátok 187
 riboszómák 4, 5, 14
E. coli-ban 260–263
 a fehérjeszintézis színhelyei 260–264
 összeszerelődése 261–264
 riboszómális fehérjék elrendeződés 263, 264
 felépítés 263
 funkció 264–266
 szétválasztás 263
 riboszómális RNS, *lásd* rRNS
 ribóz 134, 135
 ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz (rubisco) gén 381
 Riordan, John 15, 472, 473
 riporter gén 392
 RNáz H, *lásd* ribonukleáz H
 RNS (ribonukleinsav) 12, 131 *lásd még* hnRNS, mRNS, rRNS, tRNS
 -gének 134, 141
 hibridizáció 145, 146
 hidrolízis 178
 replikáció 177
 posztranszkripciósi periódus 247
 RNS polimeráz(ok) 186, 189, 225
 kötődése a promoterekhez 190
 kloroplasztisz 521
 mitokondriális 525
 RNS polimeráz-I promoterei 227–228
 transzkripciósi faktorai 231
 RNS polimeráz-II, 334, 335
 génspecifikus transzkripciósi faktorai 232–238
 promoterei 225
 transzkripciósi faktorai 230, 231
 RNS polimeráz-III, promoterei 228–229
 transzkripciósi faktorai 231, 232
 RNS primerek 162
 kimutatásuk 163
 méretük 163
 RNS-DNS hibridizáció 376
 kloroplasztisz genom térképezésben 519–520
 RNS-függő DNS-polimeráz 334
 Roberts, Richard 15, 239, 570
 Roचाix, D. J. 519, 520
 Roeder, Robert 231, 384
 rokonházasságok 35, 36
 beltenyésztési együttartó meghatározása 544, 545
 recesszíven öröklődő betegségek megjelenés 568
 Rous, Peyton 485, 486
 Rous-szarkóma vírus (RSV) 486, 494
 genetika 487, 488
 replikáció 488
 Roux, Wilhelm 371
 röntgensugárzás karcinogenitása 485
 hatása a DNS-láncra 309, 485
 rRNS (riboszómális RNS) 261
 kloroplasztisz 519
 mitokondriális 523
 5S rRNS-gének szabályozása 384–385
 prekursor, intron a 26S részben 246, 247
 RSF1101 417, 418
 rubisco gén *lásd* ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz gén
 RuvA 181
 RuvB 181
 RuvC 181
- S, SZ**
Saccharomyces cerevisiae *lásd* élesztő
 S-adenozil-metionin (SAM) 251
 Sager, Ruth 507, 508, 518
 saláta, kloroplasztisz DNS 518, 519
Salmonella neupoi 330, 331
Salmonella typhimurium 330
 fajisváriáció 329, 331
 SAM *lásd* S-adenozil-metionin
 Sanger, Frederick 15, 299, 436, 440
 Sanger-módszer a DNS-szakasz bázissorrendjének meghatározására 436–438
 sapkaképződés 251–252
 sarlósejtes vérszegénység (anémia) 14, 44, 299
 allél gyakoriság 560
 földrajzi elterjedés 535, 553t
 genetikai szárs, problémák 471
 génterápia 450
 maláriával való kapcsolat 535, 553
 mutációja 299–300, 301
 restrikciós fragmentek 560
 Saunders, John 374
 Schimmel, Paul 270
 Schmidke, Jorg 472
 screen *lásd* szűrés
 sejtdifferenciálódás definíció 371
 genetikai alapjai 370–375
 sejt felépítés 4, 5
 -ciklus 4, 6, 78
 sejtautónóm gén 400
 sejtfonalak (mikrofilamentumok) 5
 sejtfúzió 498
 malignus fenotípus, mint recesszív tulajdonság 498, 499
 sejtlárta 5
 sejtmag (nukleusz) 4, 5
 sejtmaglártá 5, 7
 sejtmag transzkripciósi faktorok mint onkogén termékek 489
 sejtmagi receptorok 234
 sejtmagvacská (nukleolusz) 5, 7, 76, 80
 sejtorganellum(ok) 505
 sejtosztódás 74, 75 *lásd még* meiózis, mitózis
 sejtranszformációs vizsgálat 486, 487
 selyemhernyó rekombinációs rátája 114
 Sendai vírus 115
 sejtfúziós alkalmazás 498
Sequoia sempervirens *lásd* örökzöld mamutfenyő
 sertés (*Sus scrofa*) kariotípus 76
 transzgenikus 452
 sex letális (sx) gén hatása a splicingre 244, 246
 szexdukción 351
 sexpilus 344
 SH2 domének 496, 497
 SH3 domének 496, 497
 Sharp, Philip 15, 239
 Sharpio, James 323
 Sheppard, Philip 551
 Shine, J. 279
 Shine-Dalgarno-szekvenciával (SD) 279
 Shull, George 573
 Sigler, Paul 215
 Simian vírus40 (SV40) 226, 486
 72 bázispár ismétlődő szekvencia 229–230
 promoterek hatása 227–228
 transzkripciósi faktorok 233
 minikromoszómák 382–383
 Simpson, O. J. 478
six onkogén, termék 494
Soal 416, 417
 Smuth, Hamilton 15, 416, 440
 sokszoros klónozó hely (MCS) 419
 pUC plazmidé 419–421
 Sonenshein, Gail 493
Smic helgehog gén 374–375
 Sos fehérje 496, 497
 SOS-válasz 213, 314, 351
 Souther, Edward 433
 Southern-blot 433, 434
 fizikai térképezésben 441–443, 444
 Söll, Dieter 270
 spenót, kloroplasztisz DNS 519
 térkép 522
 spermaticidák 83, 84
 spermaticiták 83, 84
 spermatogenezis 83–85
 spermatogonium 83, 84
- spermium (spermatozoa) 84
 spinális és bullális izomatófia 305
 SPO1, transzkripció időbeli kontrollja 204–205
 spontán mutációk 301–306, 545
 sporogenezis 75, 206, 207
 transzkripció kontrollja 206, 207
sr gén 488
 funkciója 494, 495
 termék 494, 495
sr onkogén, termék 494, 495
 SRY gén 101
 stabil egyensúlyi gyakoriság 548
 stacionárius fázis 341
 Stahl, Franklin 15, 159, 160
 Stalker, David 455
 standard eltérés (szórás) 60
 standard-típus 8
 Steinberg, Charles 286
 Steitz, John 279
 Steitz, Thomas 270
 Stern, C. 9
Streptococcus pneumoniae DNS-ének olvadási görbéje 142–143
 morfológiai mutációk 297
 változatai 131
 stressziós 61
 Struhl, Gary 391–393
 struktúrgének 191
 STS *lásd* szekvenciával jelölt helyek
 Sturtevant, Alfred H. 8, 15, 108, 109, 513
Styela embriók 371
 sugárirányú hurkok kialakulása a kromatin hajtogatódása révén 222, 223
 sugárzások, indukált mutációk 308
 karcinogén hatás 484
 Summers, Max 431
Sus scrofa *lásd* sertés
 Sutton, Walter 15, 74
 SV40 *lásd* Simian vírus40
 sxl gén *lásd* sex letális gén
 szabad gyökök 309
 szabadságok 34
 szalmonellózis 330–331
 antibiotikum rezisztencia 330–331
 számár (*Equus asinus*) diploid kromoszómaszáma 75
 kariotípusa 76
 szám feletti kromoszómák 75
 számolható tulajdonságok 61
 szarkóma (kötőszöveti tumor), definíció 486
 szarvasmarha (*Bos taurus*) kariotípusa 76
 szatellit DNS 145
 szatellit(ek), kromoszóma- 75, 76
 szedimentációs állandó 260
 szegmentumpolaritási gének, *Drosophilában* 396
 szegregáció (hasadás) alternált 92
 adjacens 92
 elve 19–25
 szekvenálás, DNS automatizált 438, 439
 genetikai térképezés 440–441
 Sanger-módszerrel 436–438
 szekvenáló film jellegzetes 438
 leolvasás 438
 vizsgálata 437
 szekvenciával jelölt helyek (STS) 457, 459–460, 463–464
 szelekció hatása a genetikai variabilitásra 550
 hatása a homozigotákra 550–552
 sejteké 342
 szűréssel 419
 szelekciós differenciál (S) 64
 szelekciós együttartó 550
 szelekciós előny 550
 szelekciós hátrány 570
 szelekciós hátrány 550
 szelekciós kísérletek 64, 65
 szelekciós válság (R) 64
 szelektor gének *Drosophilában* 396–400
 szemidiszkontinuos replikáció 156, 157, 161–163
 szemkonzervatív replikáció 13, 156
 bizonyítékai 159–161
 szemszín 4
 szerin, szerkezet 257
 szerves foszfátokkal szembeni rezisztencia 576–577
 szerzett immunhiányos tünetegyüttes

- (AIDS) *lásd* humán immundeficiencia vírus (HIV)
- génterápia 449, 451
- szex pilus 344
- szexdukción 351
- számi macska 47, 48, 298, 299
- szigma faktor () 189, 375
- szigma típusú replikáció 173
- szignálpeptid 379, 380
- definíció 379
- szimbózis 527
- szinapszis 82
- szinaptómás komplex 82
- szintetikus gének 109
- szintézisvesztés 51, 52
- X-hez kapcsolt 113
- szomatikus 5S rRNS-gének 384
- szomatikus mutációk 296–297, 409
- szomatikus sejt hibridizáció 115
- szonizációs hasadás 92 *lásd még* adjacent szegregáció
- szorzási szabály 28
- szőke oroszlánmajom, halandóság növekedése beltenyésztés hatására 568, 569
- sztráps (állandóság) 537
- sztreptavidin, nem-radioaktiv próbában 435
- sztreptomycin 264
- fehérjeszintézis gátlás 283
- kötődés a riboszómákhoz 284
- sztróma 505
- szubsztrát 12
- szuperegér 452
- szuperhalak 454
- szuperhélix 237
- szupersertés 452
- szupertekercs 146, 168, 169
- szupresszió, 310
- intergenikus 310
- intragénikus 310
- mechanizmus 286–287
- szupresszor mutáció 310
- szupresszor törzs(ek)
- E. coli* 286
- szülői kromoszómatípus 106
- szülők azonosítása, DNS-ujlenyomat vizsgálattal 477
- szűrés (screen) 342, 419
- gt11 430
- genetikai 470
- szürke nyírfaaraszoló (*Biston betularia*) 551
- színváltozatok 49, 50
- szűzmenü 74
- T**
- T2 űg
- fenotípusok elkülönítése 361–362
- mutások 361
- rekombináció 361–362
- T2h 361
- T4 űg
- rII mutások 362
- rII lokusz, szerkezet 358, 359, 362
- T5 űg, szerkezet 359
- T7 űg, szerkezet 359
- RNS polimeráz 205–206
- Tabin, Cliff 374
- tájfajta 566
- thalasszémiá 416, 566
- tandem duplikáció 88, 89
- Taq polimeráz 459
- tarajos göte (*Triturus cristatus*), autoradiográfias vizsgálatok 165, 166
- TATA-box 226–227
- TATA-box kötő fehérje (TBP) 230
- ta* gén 488
- Tatum, E. L. 12, 13, 15, 259, 343, 344
- tautomerek 302
- tautomerizáció, hatására kialakuló mutációk 302, 303
- Tautz, Diethard 393
- tax* gén 488
- Taylor, Austin 329
- Tay-Sachs-betegség, allélgyakoriság, okai különböző populációkban 558
- TBP *lásd* TATA-box kötő fehérje
- T-DNS 455, 456
- telehíbrizálás, klónok kimutatására 426
- telofázis 6, 7, 80, 81
- I. telofázis 9, 10, 83
- II. telofázis 9, 11, 83
- telomera 76
- kialakulás 174–176
- gátlások, rákos folyamatokban 176
- telomeráz 174
- Temin, Howard 334
- temperált űg(ok) 207, 354
- templát 187
- és primer közti különbség 156, 159
- templát szál 150
- tengeri süni
- him ivarsejtek 85
- pete 85
- térképezés 108, 362, 363
- térképezés
- deleciók 363, 364
- emberi betegségek génjeinek 468–475
- finomszerkezet 362–363
- sétáló kromoszómákkal 473
- térképtávolság 108
- és fizikai távolság 123–125
- természetes szelekció 45, 549–554
- természetvédelmi genetika 566–570
- termesztett növények
- genetikailag manipulált 455–456
- természetvédelmi genetika 566–568
- termináció (replikáció) 173–176
- terminális deleció 89
- terminális transzfer, cDNS
- klónozása 425
- terminátorok 188
- testi sejtek
- genetikája 498
- hibridizáció 115
- mutációk 296
- testvérkromatidok 7, 10, 80, 81, 83
- tesztelő keresztezés
- definíció 24,
- szegregáció elvének érvényesülése 25
- tesztikuláris feminizáció 101
- tetraciklin
- és a fehérjeszintézis 283
- és a riboszómák 284
- tetrád 117
- tetrád analízis 117–120
- Tetrahymena* (csillós egyszélű) telomerek kialakulása 174, 175
- tetramer 352
- Thermus aquaticus*, Taq polimeráz 459
- théta-szerkezet 163
- Thomas, D. Y. 514
- Ti plazmid (tumort indukáló) 455, 456
- tilakoid membránok 505
- timidin (T) 13, 135
- felépítése 307
- timidin kináz, kódoló gén 115
- timin 13, 135
- dimének 308, 309
- enol forma 302
- keto forma 302
- tirozin, szerkezet, 257
- tiszta vonal 19
- tisztító szelekció 550
- 10 box 191
- Tjio, Joe-Hin 76
- Tm *lásd* olvadási hőmérséklet
- Tn10 transzpozon 330
- Tn3 transzpozon 326
- felépítés 326
- replikatív transzpozíciója 326
- transzpozíció (áthelyeződés) 327
- Tn9 transzpozon 330
- tnpA*, géntermék 326
- tnpR*, géntermék 326, 328
- Tomizawa, J. 350
- tompa végék 417
- topoizomerek 167–170
- totipotens sejtek 372
- többszörös (multiplex) alléla 48, 50
- homo- és heterozigóták száma és a genotípusok 48, 49
- törékeny X szindróma 305–306
- törpesség
- hipotízis, kezelés, génklónozással 449
- pennsylvaniai Amish-ek között 561
- TC-hurok 267
- transz* [fogalom] 353–354
- transz*-domináns 194
- transzdukáló űg 354
- transzdukció 354–358
- általános 354–357
- specializált 354–355
- transz-elemek 354
- transzferrin, különböző genotípusú galambok fészekaljának vizsgálata 553
- transzformáció, baktériumokban 131, 132
- transzformált sejtek, jellemzők 483, 484
- transzformer (tn)* gén, splicing 246
- transzgen 381, 452
- transzgenikus állatok 452
- fehérje termelés 454
- transzgenikus emberek 454
- transzgenikus növények 381
- fehérjetermelés 455
- transz* helyzet 194
- transzkripció 150, 186–189
- alapfolyamatok 186–189
- aszimmetrikus 188
- időbeli szabályozás 204–213
- iniciáció 186, 187
- prokariótákban 185–218
- szabályozása 229–232
- sporogenezis alatt 206–207
- termináció 188, 189, 200–204
- transzkripcióaktiváló domének 237
- transzkripció faktorok 225
- AP-1 496, 497
- Fos 496–498
- génspecifikus Jun 496–498
- miut onkogén termékek 489, 497, 498
- Myc 497
- p110RB 500, 501
- TFIIH 316
- enhancer régiókkal kapcsolatba lépő 232–234
- promoter elemekkel kapcsolatba lépő 232
- transzkripciói rendszerek
- in vitro 226
- in vivo 226
- transzkripció szabályozás
- génexpresszió 376–378
- mechanizmus 379–381
- transzláció 150, 255–294
- elongációban 280–285
- iniciáció 277, 278
- mechanizmusa 277–288
- mRNS riboszómális kötőhelyei
- a -ban 279
- szabályozása 288–291
- terminációja 286–288
- transzlációs szabályozás 378–379
- transzlokáció 91–93, 282
- protoonkogén 491–492
- transzmembrán receptorok 400, 401
- transzmissziós genetika 2–9,
- definíció 2
- művelő 3
- transzpozális elemek 323 *lásd még* transzpozonok
- első példák 332–333
- eukariótákban 332–337
- transzpozonok 324–325
- transzpozíció *lásd* áthelyeződés
- transzpozon(ok) 323
- Ac* 333, 334
- bakteriális 323–332
- deleciók és inverziók okozói 329
- direkt ismétlődések kialakulása a gazda DNS-ben, beépülésük következtében 325
- Drosophila* 333
- Ds* 333, 334
- élesztő 333
- és a hibrid dszgenézis 337
- és a kromoszómák mutabilitása 337
- eukariótákban 332–337
- inszerció szekvenciák, mint a legegyszerűbb transzpozonok 324
- kópia 333
- mint mutagének 328, 329
- összetett 325–326, 330
- Ty 333, 334
- transzverziók 301
- transziók 301
- Travers, Andrew 189, 207
- treonin, szerkezet 257
- Tribolium* *lásd* lisztbogár
- trinukleotid 136
- triplek(ek) 272–273
- triptofán operon promoter *lásd* *trp* promoter
- triptofán
- szerkezet 257
- trp* operon 197–198
- trisómia 95, 96
- alkalmazása a genetikai gérképezésben 114
- Tritium aestivum* *lásd* búza
- Tritium vulgare* *lásd* tarajos göte
- tRNS (transzfer RNS) 266–270
- adapter funkció 266–267
- aminosavak kapcsolódása 268–269
- mitokondriális 523, 525
- szerkezet 267–268
- transzlációban 277
- tRNS punktuációs hipotézis 525
- tRNSMet 277
- tRNSiMet 277
- tRNSmMet 277
- trójai faló stratégia, retrovirus vektorok alkalmazása 451
- trp* attenuátor 198
- trp* operon 197, 198
- szabályozása attenuációval 198–199
- a triptofán szerepe a ~ negatív szabályozásban 197–198
- trp* promotor 427
- trp* repressor 215
- DNS-kötő eleme 215
- trp* vezérszekvencia 198
- Trypanosoma* 410
- burokfehérje gének átrendeződése 409–410
- Tsai, A. 164
- Tschermak, Erik von 15, 23
- Tsugita, A. 271
- Tsui, Lap-Che 15, 472, 473
- tumorfejlődő képesség (tumorigenitás) meghatározás 486
- tumor vírusoké 486
- tumorsuppresszor gének 498–502
- APC 502
- DCC 501
- tumor vírusok
- DNS replikáció 500
- emberi 488
- molekuláris genetika 486–488
- RNS 486
- tumorfejlődő képesség 486
- Turner szindróma 97, 101
- Twort, F. W. 358
- Ty transzpozíció
- élesztősejtekben 336
- modell 336
- retrovíruszerű 335–336
- U**
- U*, *lásd* uracil
- UAA kodon, 286
- UAG kodon, 286, 287
- UASG (upstream activating sequence a GAL génekre) 234
- UGA kodon, 286
- ugráló gének 326
- ujlenyomatok 65, 300
- ultracentrifugálás, DNS vizsgálatokban 132
- ultraibolya abszorpció spektrofotometriá, a DNS-vizsgálatokban 133
- ultraibolya sugárzás káros hatása a DNS-re 308
- uniparentális öröklődés *Chlamydomonas*ál 507
- upstream kontroll elem (UCE) 227
- uracil (U) 134, 135
- utódok geno- és fenotípusának becslése villás elágazás módszerrel 32, 33
- utódsejtek 9, 11
- V**
- vad típus
- fenotípus 8
- jelölése 32
- valin, szerkezet 257
- valódi reverz mutáció (backmutáció) 309, 310
- valószínűség 28–33
- definíció 28
- feltételes 29
- genetikai példák 28
- változó régiók 408–409
- változó számú tandem ismétlődések (VNTR-ek) 459
- vándorpatkány (*Rattus norvegicus*)
- warfarin rezisztencia 576
- variábilis hurok 267
- Varmus, Harold 493
- vastag- és végbélrák, onkogenézis 501
- vastagbélrák, *ras* mutációi 491
- vegetatív pólus 372, 374
- vegetatív stádium 206, 207
- végso karcinogén 484
- vektor(ok) 417–425
- űgök mint 421, 424
- plazmidok, mint 417–421
- veleszületett anyagcsere zavar 54–55, 66
- véletlenszerű párosodás 538–539
- lehetőségeinek relatív gyakorisága kétallélos rendszerben 133
- Venter, Craig 15, 440
- vérzadási faktor-IX előállítás, transzgenikus állatokkal 454
- vételezke eredetű növekedési faktor

- (PDGF) 494
 vernalizáció 572
 vérzékenység (hemofília) 52–53, 296, 541
 öröklődése Viktória királynő
 utódában 52, 296
 X-hez kapcsolt öröklődése 52–53, 113
 veszélyeztetett fajok, fennmaradás 568,
 569
 vezérszekvencia (leader) 240
 vezérszekvencia-attenuátor régió
 transzkriptum, lehetséges szerkezet 201
 vezető szakasz 202, 280
 szekvencia 202
 vezető szál 156
 villás elágazás módszere 31–33
 viroid 141
 virulencia 12
 virulens, sejtek 131
 fűgok 207
 vírus(ok), *lásd még* adenovírus, retrovírus
 helper 488
 morfológiai mutációk 297
 onkogén 485, *lásd még* tumorvírusok
 rák 485–493
 viselkedést meghatározó gének hatása
 a magatartásra 58
 visszakeresztetés, definíció 25
- VNTR, *lásd* változó számú tandem
 ismétlődések
 Vogelstein, B. 501
 vörösvérsejtek
 antigének 44
 felépítés 299, 370
 normál 299
 sarlósejtes 299
 Vries, Hugo de 15, 23
v-az gén 488
- W**
 Wake, R. B. 164
 Watson és Crick bázispárosodási
 elmélete 13
 Watson, James 13, 15, 133, 137, 138, 140
 Weigert, Martin 286
 Weinberg, Wilhelm 15, 537
 Weinberger, Robert 490
 Weintraub, Harold 385
 Weissenbach, Jean 460
 Weissmann, Charles 241
 Western-blot 433
 Westheimer, E. H. 15
 Wexler, Nancy 468
 White, Ray 472
 Wiegler, Michael 490
- Wieschaus, Eric 390
 Wilkie, D. 514
 Wilkins, Maurice 13, 15, 137, 140
 Williamson, Robert 472
 Wilson, J. E. 512
 Wollman, Elie 345–347
 Wu, T. T. 357
- X**
Xenopus laevis
 cinkujak 234, 236
 Gurdon kísérlete, regulatív fejlődés
 kísérlete 372, 373
 5S rRNS-gének szabályozása 384–385
Xeroderma pigmentosum 315, 316, 484, 485
 X-gal 421
 X-hez kapcsolt bélyegek 51
 domináns 52, 53
 recesszív 52, 53
 X-kromoszóma 4, 50, 51, 98
 lokuszok 51
 Lyonizált 385–386
 térképezése emberben 113, 114
 X-kromoszómához kapcsolt gének,
 és a Hardy–Weinberg-szabály 541
 X-kromoszómához kapcsolt öröklődés 53,
 108, 109
- XmaI 416, 417
 XX hímek 101
 XY nőstények 101
- Y**
 YAC *lásd* mesterséges
 élesztőkromoszómák
 Yanofsky, Charles 199
 Y-kromoszóma 51–52, 100
 aktív génjei 101
 Y-kromoszómához kapcsolt öröklődés 53
- Z**
 zárt promotor komplex 190
 Z-DNS 141, 142
Zea mays *lásd* kukorica
 Zif268 fehérje
 cinkujak 234, 236
 íves elhelyezkedés 234, 236
 zigóta 75, 372
 definíció 74
 zigotén szakasz 82
 zigotikus gének 390
 zoospórák 507
 Zubay, Geoffrey 196

Robert F. Weaver és Philip W. Hedrick *Genetika* című könyve hiánypótló munka a magyar tankönyvpiacon, hiszen hosszú évek óta nem jelent meg átfogó, a tudományág minden részterületével behatóan foglalkozó, magyar nyelven olvasható egyetemi és főiskolai tankönyv.

A szerzők egyetemi tanárok, akik hosszú évek óta tartanak előadásokat és vezetnek szemináriumokat. A genetika oktatásában szerzett tapasztalataiknak köszönhetően olyan tankönyvet sikerült alkotniuk, amely lehetővé teszi a tárgy alapjainak és magasabb szintű ismereteinek elsajátítását is. Eppen ezért jól használhatják azok is, akik először tanulják a tárgyat, és azok is, akik már részt vettek valamilyen alapképzésben.

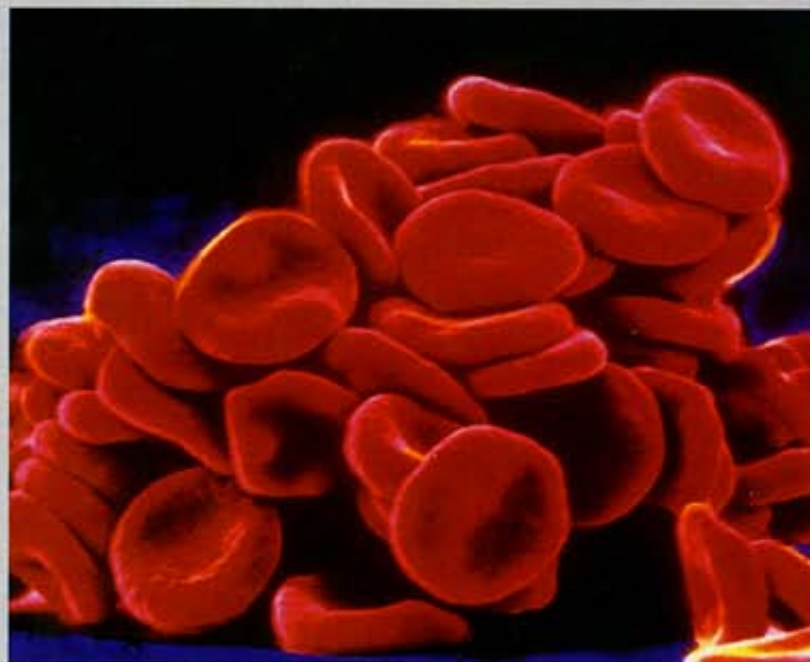
A tankönyv első része a ma már klasszikusnak számító örökléstani kérdésekkel, nevezetesen a mendeli genetikával és az öröklődés kromoszomális alapjaival foglalkozik. A második nagy rész korunk forradalmi változásokat élő tudományterületét, a molekuláris biológiát mutatja be a genetika nézőpontjából. A harmadik rész a populációgenetikai ismereteket foglalja össze.

A tankönyv külön érdeme, hogy minden egyes anyag-rész tárgyalásakor részletesen ismerteti a genetikai felfedezésekben mérföldköveknek számító hipotéziseket, az azokat igazoló kísérleteket és a belőlük levonható következtetéseket. Ezzel nagymértékben hozzájárul ahhoz, hogy a hallgatók megismerjék a természettudományos gondolkodás alapelveit és fejlődését, valamint a kutatómunka szellemi kihívásait és esetleges buktatóit.

Figyelemre méltó a könyv rendkívül gazdag ábra- és képanyaga, amely egyértelműen megkönnyíti a jelenségek, kísérletek, fogalmak megértését és tanulását. Mindezek mellett a fejezetek végén ellenőrző kérdések és feladatok is segítik a hallgatók felkészülését.

A szerzők figyelmet fordítottak arra is, hogy az alap-kutatások eredményei mellett minden egyes fejezetben bemutassák a téma esetleges orvosi, gazdasági (pl. gyógyszeripari, mezőgazdasági és állattenyésztési) és egyéb (pl. kriminalisztikai) vonatkozásait.

Mindezek alapján a tankönyvet ajánljuk a szakirányú egyetemi és főiskolai képzésben részt vevő hallgatóknak, a tárgyat oktató egyetemi és főiskolai tanároknak, a gimnáziumok biológia szakos tanárainak, az orvosoknak, valamint a témával foglalkozó vegyipari és agrár szakembereknek.



Mendeli genetika

- A mendeli genetika alapjai
- A mendeli genetika kiterjesztése és alkalmazásai
- A kromoszómák és az öröklődés
- A genetikai kapcsoltság

Molekuláris genetika

- A gének biokémiája
- A gének replikációja és rekombinációja
- A transzkripció és szabályozása prokariótákban
- Az eukarióta genom szerveződése és működése
- A transláció
- Génmutáció
- Mozgó genetikai elemek
- A baktériumok és a fágok genetikája
- Fejlődésgenetika
- Génklónozás és génmanipuláció
- A génklónozás gyakorlati alkalmazása és a genetikai térképezés
- A gének és a rák
- Extranukleáris öröklődés

Populációgenetika

- Bevezetés a populációgenetikába
- A populációgenetika gyakorlati alkalmazásai