

Bioinformatika – Genetikai betegségek megismerése és kimutatása

Dr. Ari Eszter, egyetemi tanársegéd

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

A gyakorlatok célja és menete

Szakirodalmi publikációk keresésének és kezelésének megismerése. Két konkrét betegség megismerése szakirodalom és bioinformatikai adatbázisok alapján. A genetikai betegségek kimutatásának technikáinak megismerése. Örökletes betegségek kimutatásának megtervezése bioinformatikai eszközökkel.

1. gyakorlati előadás: *A kutatás első lépése: Az irodalmazás*

1. tantermi gyakorlat: *Az NCBI adatbázis bemutatása, szakirodalmak keresése és kezelése*

Információszerzés a kimutatni kívánt betegségekről az NCBI segítségével

Szakirodalmak keresése

Szakirodalmak nyilvántartása, beillesztése dokumentumba

2. gyakorlati előadás: *Genetikai betegségek kimutatásának lehetőségei*

A genetikai betegségek fajtái

Kimutatásuk PCR-rel

A gyakorlaton vizsgálni kívánt két konkrét betegség bemutatása

2. tantermi gyakorlat: *PCR primer tervezés*

A kutatás első lépése: Az irodalmazás

Ahhoz, hogy egy kutatást – legyen szó genetikai betegségek vizsgálatáról, vagy más jellegű munkáról, illetve szakdolgozatról – elkezdjünk, első lépésként a vonatkozó tudományos szakirodalmat kell megismernünk. Az irodalmazás fő célja, hogy megszerezzük a kutatómunkánkhoz szükséges ismereteket, megismerjük a korábbi eredményeket és azon módszerek részleteit, amelyeket alkalmazni fogunk. Továbbá az irodalmazás segít elkerülni a felesleges munkát, mert rámutathat arra, hogy valaki korábban már elvégezte azt a kísérletet vagy vizsgálatot, amit esetleg mi is tervezünk. Bármilyen tudományos írásos műben (TDK dolgozat, szakdolgozat, disszertáció, cikk, stb.), ha mások által közölt eredményeket,

állításokat vagy módszereket említünk, kötelező azok forrásának feltüntetése. A tudományos kutatás etikája megkívánja, hogy a hivatkozások esetében az érintett mű adatait pontosan és kellő részletezéssel közöljük.

A megfelelő bioinformatikai alkalmazások segítségével az irodalmazás több szakasza is könnyebbé tehető. Az interneten elérhető kereső-alkalmazások, cikk-gyűjtemények használata, a talált cikkek rendezését szolgáló web alapú vagy telepített programok alkalmazása, illetve ezek szövegszerkesztőbe beépülő moduljaival az elvárt formátumú idézések elkészítése mind azt hivatott szolgálni, hogy a felhasználó csak azzal töltsön időt, amit a számítógép helyette nem tud elvégezni.

A tudományos közlés formái

A tudományos közlésnek számos formája létezik. Vannak olyanok melyek segítségével a tudományos teljesítmény is mérhető. Ezek a következők:

- Folyóirat cikk
 - Impakt faktorral rendelkező vagy nem rendelkező folyóiratban
- Konferencia
 - Előadás vagy poszter
 - Van absztrakt-kötet vagy nincs
 - Cikk is megjelenik róla a konferenciakiadványban vagy nem
 - Hazai vagy nemzetközi konferencián
- Értekezés
 - TDK dolgozat
 - Szakdolgozat
 - PhD-disszertáció, doktori értekezés
 - Nagy-doktori disszertáció
- Szakkönyv

És vannak olyanok, melyek a tudományos ismeretterjesztés céljából készülnek:

- Tankönyv
- Ismeretterjesztő írások
- Publicisztikák
- Rádió és TV műsorok
- Blogok

Ha nem ismerjük az adott szakterületet, akkor célszerű először összefoglaló jellegű, ú.n. *review* cikkeket, illetve szakkönyveket olvasnunk, majd ezután térhetünk rá a kutatómunkákat leíró „*research*” publikációkra. A *review* cikkek egy-egy témát átfogóan dolgoznak fel és sok odavágó publikáció eredményeit összegzik.

A tudományos folyóiratok

A tudományos közlések leggyakoribb formája a tudományos folyóiratokban megjelenő cikkek. A folyóiratokban olvasható cikkek tudásanyaga csak több éves csúszással jelenik meg összefoglaló szakkönyvekben, és még később a tankönyvekben. A tudományos folyóiratoknak különböző fajtái léteznek. Vannak általános tudományos folyóiratok, mint pl. a [Nature](#) és a [Science](#) és áttekintő folyóiratok, pl. [Current Opinion in Biotechnology](#) és [Trends in Genetics](#). Léteznek tágabb

szakterületet lefedő szakfolyóiratok, mint pl. a [Molecular Systems Biology](#), illetve szűkebb szakterületet cikkeik közlő szakfolyóiratok, pl. [PLoS Neglected Tropical Diseases](#).

Impakt faktor

Azt, hogy egy folyóirat mennyire elismert az impakt faktor (IF) nevű mérőszámmal szokás mérni. Az IF-t az ISI (*Institute of Scientific Information*, a *Science Citation Index* kiadója) állapítja meg minden évben rengeteg – de nem az összes – tudományos folyóiraatra. Az IF nagysága a folyóiratban megjelent cikkek idézettségét tükrözi, vagyis azt, hogy hányan tartották idézésre, felhasználásra megfelelőnek az újságban közölt cikkeket.

A folyóiratok IF-át minden évben újraszámítják, a következő módon: Az előző két évben az adott folyóiratban publikált minden cikkre a tárgyévben kapott idézetek összege osztva az előző két évben a folyóiratban megjelent „idézhető cikkek” számával. Azaz az IF nem közvetlenül a cikk hatását, idézettségét mutatja, hanem annak a folyóiratnak a mérőszáma, amelyben a cikket leközlötték.

A kutatók általában arra törekednek, hogy minél magasabb IF-ral rendelkező folyóiratba publikáljanak. Ám meg kell jegyeznünk, hogy tudományterületenként erősen eltérnek az IF-ok. Általánosságban az orvosi, neurobiológiai, immunológiai és a kimagasló természettudományos eredményekkel foglalkozó ([Nature](#), [Science](#)) folyóiratoké nagyon magas (IF: 15-40), utána következnek a molekuláris biológiai folyóiratok (IF: 5-15), a rendszertannal és matematikával foglalkozó folyóiratoké pedig igen alacsony (sokszor 1 alatti). (A teljesség igénye nélkül.) Következésképp az IF-ok összevetése mindig csak az adott tudományterületen belül adhat a valósághoz közeli jelzést a kutatók munkájáról.

A tudományos cikkek

A tudományos cikkek formai tulajdonságai

A tudományos cikkek formailag általában hasonlóképpen épülnek fel. Az első oldal tetején (vagy az alján) olvasható a folyóirat neve, az évfolyam és szám, amiben a cikk megjelent, valamint az oldalszámok. Ezután következik a cikk **címe**. A cikkírók törekednek arra, hogy a cikkük címe kifejezze a cikk tartalmát, ugyanakkor rövid legyen, figyelemfelkeltő és ne túl általános. A cím egységet alkot az absztrakttal, de a szakirodalomban keresgélő olvasó számára ez az első szűrő.

A cím után, a **szerzők** felsorolása található. A biológia területén az a szokás, hogy a közleményben leírt kutatás legnagyobb részét az a szerző végezte, illetve a cikk szövegét is az a szerző írta, aki a felsorolás első helyén van – első szerző. Utána következnek a társszerzők, akik valamilyen részfeladatot végeztek a kutatás során – a sorrendjük többnyire a szakmai hozzájárulásuk mértékét tükrözi. Az első szerzőn kívül a másik kitüntetett az utolsó szerző, aki a kutatás szellemi vezetője, illetve a kutatócsoport vezetője. (Ettől eltérő gyakorlatot alkalmaznak a matematikusok, akik sokszor egyszerűen ABC sorrendben tüntetnek fel a szerzőket.) A szerzők közül valamelyiket (általában az első vagy az utolsó) kijelölik kapcsolattartónak (*corresponding author*), aki a folyóirat szerkesztőségével

történő – általában írásos – kommunikációt folytatja. Az ő elérhetősége a cikk első oldalán meg is jelenik.

A normál terjedelmű (nem *short communication*) tudományos cikkek egy rövid tartalmi összefoglalóval, az ú.n. **absztrakttal** kezdődnek. Az absztrakt röviden leírja a cikk tartalmát, vagyis ezt elolvasva el tudjuk dönteni, hogy érdemes-e a cikk teljes szövegét is áttanulmányoznunk. Többnyire még a fizetős folyóiratokban található absztraktok is ingyenesen elérhetők, a bennük található szavakat a publikációkat gyűjtő portálok kereshetővé teszik. A szöveges mellett egyre több folyóirat bevezeti a grafikus absztrakt használatát is, amely vizuálisan fejezi ki a cikk fő mondanivalóját.

A kutatásokat leíró tudományos cikkek tényleges szövege a következő fejezetekre tagolódik: Bevezetés (*Introduction*), Anyagok és módszerek (*Materials and Methods*), Eredmények (*Results*), Következtetések (*Discussion, Conclusion*), köszönetnyilvánítás (*Acknowledgments*) és Irodalomjegyzék (*References*). A **bevezető** fejezetben található a kutatás céljainak meghatározása, a témában megjelent szakirodalom áttekintése és a kutatással kapcsolatos kérdések megfogalmazása.

A tudományos közlemények **anyagok és módszerek** fejezete azért lényeges, hogy a cikkben foglaltakat más kutatók is reprodukálni tudják. Ezért annak minden vizsgálati eszközt, forrást és szoftvert tartalmaznia kell. A kísérlet körülményei, a reagensek típusa, stb. is felsorolásra kerülnek benne.

A **eredmények** leírása a cikk egyik legfontosabb fejezete. Sokszor szerepelnek benne **ábrák** (pl. grafikonok, folyamatábrák, fotók) és **táblázatok**, melyek az leírt szöveg megértését segítik elő, de a feliratukkal együtt önmagukban is értelmezhetőnek kell lenniük. Az eredmények alapján levont **következtetések** külön fejezetben kapnak helyet. A szerzők itt foglalják össze és értelmezik a bemutatott eredményeket, valamint levonják a következtetéseket és kitekintést nyújtanak a további szükséges vizsgálatok elvégzésére.

Az **irodalomjegyzék** fejezetben a tudományos cikk hivatkozásai szerepelnek. Egy cikk hivatkozásai nem tartalmazzák a téma teljes bibliográfiáját, csak az elsődlegesen használt forrásokat. A szövegközi idézet helyén számmal vagy „elsőszerző, évszám”-mal jelzik a citált közleményt, míg az irodalomjegyzékben részletesebb bibliográfiai adatok is helyet kapnak (további szerzők neve, cikk címe, folyóirat neve, száma, oldalszám). Az irodalomjegyzékben a folyóiratok nevei gyakran rövidített formában jelennek meg. Bizonyos folyóiratok – helytakarékosági okokból – a hivatkozott közleményeknek csak a szerzőit és elérését (folyóirat, évfolyam, oldalszám) adják meg, a címét nem.

A szakirodalom keresése

Manapság az egyetemek vagy kutatóintézetek könyvtárai mellett, és adott esetben helyett a kutatók az interneten lévő szabadon, vagy előfizetéssel elérhető gyűjteményekben és a folyóiratok online felületén keresik a számukra szükséges szakirodalmat. A releváns tudományos közleményhez a témára utaló keresőszavakkal, a szerzők vagy a tudományos folyóirat nevével keresve, esetleg egy

cikk hivatkozásait felhasználva juthatunk el. Ha természettudományos, biológiai témában kutatunk, akkor az alábbi *szakirodalom keresőkkel* célszerű megismerkednünk:

- **PubMed:** Az NCBI adatbázison¹ belül a leggyakrabban használt, biológiai és orvosi vonatkozású tudományos publikációk gyűjteménye. A PubMeden működik egy keresőszolgáltatás, amellyel (általában) elérhető a talált cikk *absztraktja*, a cikkel kapcsolatos közlemények listája, valamint a publikációt megjelentető folyóirat honlapján a teljes cikkre mutató link. Ennél a linknél külön megjelölik a teljes egészében ingyenesen elérhető publikációkat (*free full-text* vagy *open access* cikkek)².
 - **PubMed Central:** Az NCBI PubMed mellett üzemelő szolgáltatás, amely kizárólag a világ bármely pontjáról, előfizetés nélkül is ingyenesen elérhető közleményeket tartalmaz és azokat egységes felületen prezentálja.
- **Google Scholar vagy Google Tudós:** Hatékony és általános (nem csak orvosbiológiai) tudományos közleménykereső. Megtalálja a disszertációkat, konferencia kiadványokat, egyéb az interneten fent lévő tudományos anyagokat is (a PubMedmel szemben). Egy-egy találatnál megjeleníti, azt is, hogy hány publikációban hivatkoztak eddig rá (citáció, idézetek száma).
- **ScienceDirect, Scopus, SciVerse:**
 - **ScienceDirect:** Ingyenes tudományos publikáció kereső. A talált cikkeket meg is tudja jeleníteni, amennyiben azok ingyenesen elérhetők vagy az egyetem előfizetett rá.
 - **Scopus*:** Fizetős tudományos publikáció kereső. Megjeleníti a citációkat és statisztikákat is készíthetünk a találatokról a segítségével. Felhasználói felülete hasonlít a ScienceDirectére.
 - **SciVerse:** A ScienceDirect és a Scopus egyesített felhasználói felülete, mellyel mind a két adatbázisban egyszerre kereshetünk.
- **EISZ Elektronikus Információszoolgáltatás*:** Regisztráció után sok folyóirat elérhető ezen a portálon keresztül. Pl. ISI Web of Science (kereső), ScienceDirect (kereső), Science Magazine (folyóirat), Nature (folyóiratcsomag), SpringerLink (folyóirat kiadó), JSTOR (folyóirat kiadó).
- **További hasznos weboldalak:**
 - **ISI Web of Science*:** Tudományos közlemény kereső, melyet a citációk keresésére optimalizáltak. Lassabban frissül, mint az előző keresők (vagyis nem tartalmazza a legfrissebb publikációkat). A találatokról és citációkról különféle statisztikákat készíthetünk a segítségével.
 - **CiteseerX:** Publikáció és citáció kereső, ahol a teljes cikkek is elérhetők.
 - **iHOP:** Fehérjék kapcsolataira fókuszáló publikációk kereshetők vele.
 - **BioMed Search:** Biológiai és orvosi tudományos publikációkban megjelent ábrák között lehet ezen az oldalon keresni.
 - **Matarka:** Magyar folyóiratok tartalomjegyzékeinek kereshető adatbázisa. A cikkeket többnyire csak anyagi ellentételezés fejében lehet letölteni.
 - **MTMT Magyar Tudományos Művek Tára:** Egy-egy magyar szerző életművére tudunk itt rákeresni. Az adatbázis a szerzőknek köszönhetően folyamatosan bővül.

Némelyik cikket, folyóiratot vagy keresőszolgáltatást csak előfizetéssel lehet megtekinteni. Mivel az Eötvös Loránd Tudományegyetem is több ilyen előfizetéssel rendelkezik, célszerű ELTÉS IP címmel

¹ NCBI: National Center for Biotechnology Information vagyis Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ, www.ncbi.nlm.nih.gov, lásd: [Az NCBI adatbázis és honlap](#) fejezetben.

² Nem árt tudni, hogy valaki mindig fizet az adott publikációért: vagy a szerzők fizetnek a folyóiratnak azért, hogy a cikküket mindenki ingyenesen elérhesse (*free full-text* vagy *open access*), vagy az olvasó – illetve annak anyaintézménye – fizet a nem ingyenes cikk letöltéséért.

rendelkező számítógéppel végezni a keresést. A fenti felsorolásban az otthoni gépről nem, de ELTÉS IP címmel rendelkező számítógépről elérhető szolgáltatásokat *-gal jelöltük.

Ha a kereső vagy a folyóirat honlapjáról nem tudjuk ingyenesen letölteni a szükséges tudományos közleményt, akkor célszerű a [Google](#) keresőjével is rákeresnünk. Javaslat: a kereséshez tegyük idézőjelek közé a cikk címét, és írjuk elé, hogy [PDF](#). Ha így sem találjuk a cikket, akkor kérhetjük a könyvtárosok segítségét vagy írhatunk a cikk szerzőinek, hogy legyenek kedvesek küldjék el a cikket.

Attól függően, hogy egy témát szeretnénk körüljárni, vagy egy konkrét cikket szeretnénk elolvasni, a keresés történhet kulcsszavak, szerző neve, folyóirat, a cikk címe vagy a publikáció egyéni azonosítószáma alapján.

- A *kulcsszavak* olyan, az adott publikációra jellemző szavak, melyeket a szerző vagy a közleményt katalogizáló adott meg. A kulcsszavak kijelölik a közlemény témáját.
- A közleményt jegyző *szerző(k)* nevére kereshetünk teljes névvel (pl. Jack Peter Smith vagy Smith, Jack Peter) vagy a keresztnéve(ke)t lerövidítve (pl. JP Smith vagy Smith, JP). Az egyes kereső alkalmazásokban általában le van írva, hogy milyen formában várják a szerzők neveit.
- Ha tudjuk a keresett cikk *címét*, akkor ennek segítségével általában könnyen meg tudjuk találni a közleményt.
- Ha tudjuk, hogy a cikk melyik *folyóiratban* és annak melyik számában jelent meg, akkor a cikket a folyóirat online archívumában is megtaláljuk.
- Minden tudományos cikknek, folyóiratnak és könyvnek vannak *azonosító számai*, melyek alapján egyértelműen beazonosíthatók és megtalálhatók. A cikkek esetében ilyen azonosítószám a DOI (Digital Object Identifier; pl. 10.1007/BF01734359) vagy a PubMed ID (PMID), amely csak számokból áll (pl: 7288891). A folyóiratokat az ISSN (International Standard Serial Number) számuk, a könyveket pedig az ISBN (International Standard Book Number; pl: 0878931775) számuk alapján is azonosítják.

A különböző keresőszavakat ÉS (AND), VAGY (OR) vagy NEM (NOT) kapcsolatban össze is fűzhetjük. Erről egy hasznos leírás található az [EISZ](#) oldalán.

A közlemény címe, szerzője és absztraktja alapján eldöntjük, hogy a találat érdekes-e számunkra. Ezt követően pedig vagy letöltjük a teljes cikket PDF formátumban, vagy rögzítjük az elérhetőségeit. Rövid időn belül ki fog derülni, hogy a kereső-alkalmazások mellett szükségünk lesz egy másik informatikai segédletre, amely a nagyszámú publikációk kezelését biztosítja számunkra.

Szakirodalmak kezelése

Miután megtaláltuk a megfelelő tudományos közleményeket nem árt azokat átlátható és kereshető módon tárolni a számítógépünkön. Ehhez nyújtanak segítséget a bibliográfiája nyilvántartó szoftverek, melyek a nyilvántartáson kívül a dokumentumba (szakdolgozat, cikk) való hivatkozásbeillesztést is segítik.

A legnépszerűbbek fizetős szoftverek:

- [EndNote](#): Windows és Mac OSX operációs rendszereken fut, Microsoft Office alá beépülő plug-in-ja van.
- [Reference Manager](#): Windows operációs rendszereken fut. Együttműködik a Microsoft Office-szal.
- [RefWorks](#): Internet alapon („web-based”) működő multiplatform szoftver. Vagyis használható Windows, Mac és Linux operációs rendszereken is. Együttműködik a Microsoft Office-szal és az [Open Office](#) (vagy [Libre Office](#)) nevű ingyenes irodai szoftvercsomaggal is.

Ingyenes alternatíváik:

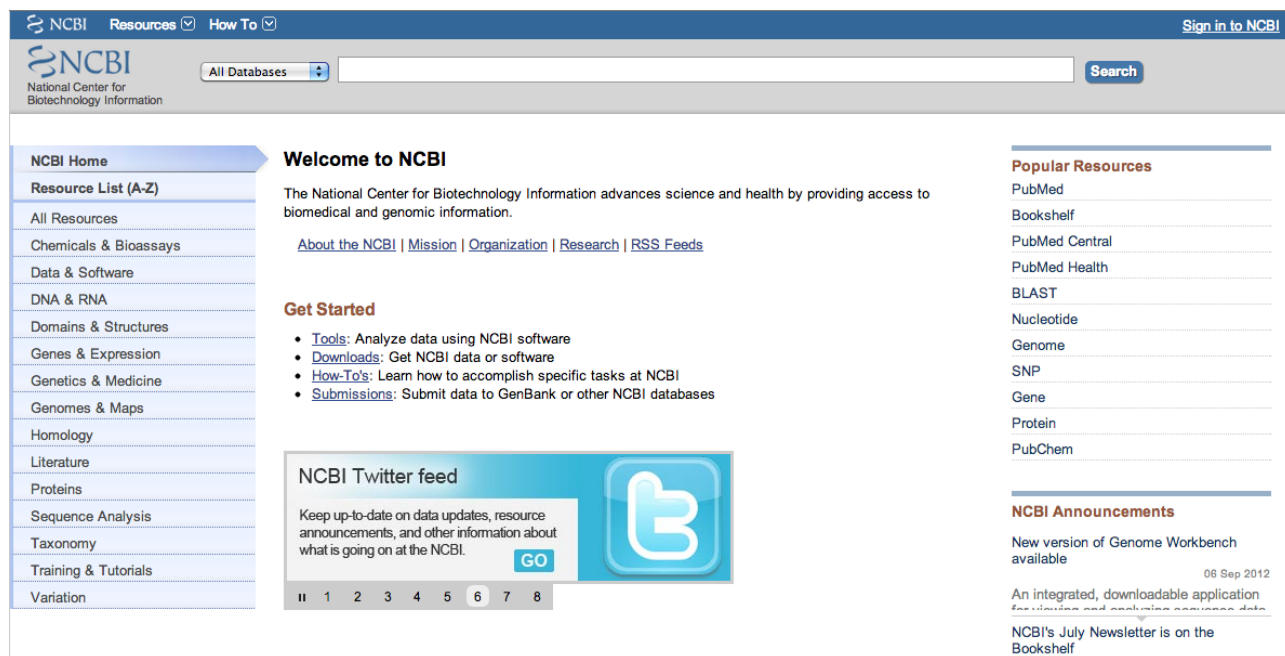
- [EndNoteWeb](#): Internet alapon (*web-based*) működő multiplatform szoftver. Csak korlátozott számú referenciát tud ingyenesen tárolni.
- [Zotero](#): Eredetileg a Firefox internetböngészőbe épülő multiplatform program, de elkészült a Google Chrome-mal és a Safarival alatt futó, valamint a „stand alone” vagyis böngésző nélkül is használható verziója is. Együttműködik a Microsoft Office-szal és az [Open Office](#)-szal, [Libre Office](#)-szal is. A saját gépünkön és egy internetes tárhelyen is tárolja az összegyűjtött referenciáink adatbázisát. Az éppen a böngészőben látott tudományos közlemény adatait (szerzők, cím, folyóirat, stb.) a böngésző URL címsor végén látható kis [szimbólumra](#) kattintva lehet a referencia adatbázisunkba menteni.
- [Mendeley](#): Multiplatform program. Beépített PDF olvasója is van, ahol a cikkekhez kommenteket is fűzhetünk, illetve kiemelhetünk bizonyos részeket. Együttműködik a Microsoft Office-szal és az [Open Office](#)-szal, [Libre Office](#)-szal is, melyekbe külön [plug-in](#)-ként épül be ([dokumentáció](#)). A saját gépünkön és egy internetes tárhelyen is tárolja az összegyűjtött referenciáink adatbázisát.

A felsorolt szoftverek használatakor a megtalált tudományos közleményeket előbb be kell vinnünk a program adatbázisába. Van olyan szoftver, amely közvetlenül tud csatlakozni bizonyos webes szakirodalmi adatbázisokhoz (pl. a PubMed-hez) majd ott a program segítségével kereshetünk (pl. EndNote), és van olyan, amely a böngészőbe integrálódva segíti a találatok importálását a saját referencia adatbázisunkba (pl. Zotero). Utána, mikor az éppen szövegezett dolgozatba be szeretnénk szúrni egy hivatkozást ugyanezt a programot tudjuk használni. A programok segítik a hivatkozások nyilvántartását – vagyis, amit a szövegbe beszúrtunk, az automatikusan megjelenik a szöveget követő bibliográfiában is, ha kitöröljük a hivatkozást, akkor azt a dokumentum irodalomjegyzékéből is törli. A szoftvereknek köszönhetően a bibliográfiát pár kattintással a szakdolgozat vagy a folyóirat követelményeinek megfelelő módon formázhatjuk. Valamint elkerülhetjük a hivatkozások kézi sorszámozásából, és azoknak átírásából, újraformázásából adódó kellemetlenségeket.

Az NCBI adatbázis és honlap

A DNS- és fehérjeszekvenálási módszerek elterjedésével párhuzamosan megjelentek a meghatározott szekvenciákat összegyűjtő, számítógépes elemzéseket is lehetővé tevő elektronikus adatbankok. Ezek a molekuláris biológiai adatbázisok különböző bioinformatikai intézetek honlapjain, bárki számára ingyenesen, online elérhető információforrások. Az [NCBI](#) (*National Center for Biotechnology Information* vagyis Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ, 1. ábra) is egy közülük, melynek angol nyelvű honlapján a molekuláris biológiai- és orvosi tudományok, a bioinformatika, és az ezekhez kapcsolódó publikációk adatbázis-gyűjteményét találjuk. Az 1988-ban alapított adatbázis központja az USA-ban, Maryland államban található Bethesda városban van, ahol a *National Library*

of Medicine (NLM) és a National Institute of Health (NIH) részeként üzemel. A kereszthivatkozásokkal teli, strukturált, kereshető adatbázisokat és honlapot folyamatosan fejlesztik, az adatbázisok tartalma napról-napra frissül, bővül. Az NCBI naponta összehangolja a szekvenciák leírását Európa (EMBL, European Molecular Biology Laboratory) és Japán (DDBJ, DNA Database of Japan) hasonló adatbázis-gyűjteményével, ezért a bennük található alap információk megegyeznek.



[Alternatív szöveg: 1. ábra: Az NCBI nyitólapja.]

[Képalírás: 1. ábra: Az NCBI nyitólapja. Ha a bal-felső sarokban lévő NCBI logóra kattintunk, bármely NCBI-os oldalról visszakerülünk a nyitólapra.]

Az adatbázisok építőkövei az úgynevezett *rekordok*, melyek a konkrét egy-egy dologra (pl. egy szekvenciára) vonatkozó adatokat és hivatkozásokat tartalmazzák (lásd [Nucleotide GenBank](#) fejezet). A rekordokhoz az adatokat a világ minden részén dolgozó kutatók szolgáltatják. A külön adatbázisok (szakirodalmi, nukleotid- és fehérjeszekvencia, gén, genom, taxonómiai, szerkezeti, expressziós, kémiai, etc.) egymáshoz tartozó elemei kereszthivatkozások (linkek) révén kapcsolódnak össze, így például egy mRNS szekvenciáról közvetlenül az általa kódolt fehérjére ugorhatunk.

Az NCBI-on található összes adatbázis összes rekordja között egy integrált keresőmotor, az [Entrez](#)³ (2. ábra) segítségével kereshetünk.

³ Az *entrez* franciául azt jelenti, hogy *bemenni*, és *antré*-nak ejtik. De az alkalmazást magyarul inkább *entrez*-nek ejtjük.



[Alternatív szöveg: 2. ábra: Az Entrez keresőmotor felülete]

[Képaláírás: 2. ábra: Az Entrez keresőmotor felülete]

Az NCBI-on található fontosabb adatbázisok és szolgáltatások

- [PubMed](#) és [PubMed Central](#): Lásd [A szakirodalom keresése](#) fejezetben.
- [Books](#) vagy [Bookshelf](#): Online elérhető tudományos könyvek, tankönyvek. A könyvek nem tölthetők le egy-az-egyben, csak az adott témában kiadott keresési találatokhoz tartozó részek olvashatók el belőlük. Az NCBI megismeréséhez hasznos lehet a [The NCBI Handbook](#) (NCBI kézikönyv), egy-egy ismeretlen tudományos témához való első közeledéshez pedig a [Coffee Break](#) (Kávészünet) című könyv.
- [OMIM](#): Az ember mendeli módon öröklődő génváltozatait leíró, rendezett gyűjtemény (*Online Mendelian Inheritance in Man*).
- [GenBank](#) vagy [Nucleotide](#) és [Protein](#): Minden eddig megszekvenált és publikált nukleinsav és protein szekvenciát tartalmazó adatbázisok. Gének, genomok, cDNS-ek (komplementer DNS:

az mRNS DNS-re átírt változata), nem kódoló régiók, RNS-ek, fehérjék, több, mint 160.000 fajból. Minden szekvenciához tartozik egy egyedi azonosító szám, az [Accession Number](#). A szekvencia adatbázisok:

- [Nucleotide](#): Nukleotid szekvenciák gyűjteménye.
- [Protein](#): cDNS-ből átírt vagy megszekvenált peptidek, fehérje szekvenciák adatbázisa.
- [RefSeq](#): Referencia szekvenciák átfogó, integrált, jól annotált⁴, nem redundáns⁵ adatbázisa. Ezekhez a szekvenciákhoz lehet viszonyítani pl. a különböző SNP-ket.
- [SNP](#): *Singel Nucleotide Polymorphism*, a populációkban fellelhető pontmutációk, illetve rövid szakaszokat érintő mutációk adatbázisa. A találati eredmények többféleképpen megjeleníthetők, (3. ábra) pl.:
 - **MapView**: (kék) az SNP helye a kromoszómán. Pl.: a [Az V véralvadási faktor Leiden-mutációja](#) fejezetben tárgyalt mutáció ([rs6025](#)) [MapView nézete](#).
 - **GeneView**: (rózsaszín) polimorfizmusok helye és formája az adott génben. Pl.: az V véralvadási faktor [GeneView nézete](#).
 - **SeqView**: (zöld) az SNP-k helye a szekvencia sematikus rajzán. Pl.: az V véralvadási faktor [SeqView nézete](#).

NCBI dbSNP Short Genetic Variations

Search SNP for rs6025 Go Clear Save Search

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Graphic Summary Show 20 Sort By Send to

All: 1 Cited in PubMed: 1 Clinical/LSDB Submissions: 1 Human (active): 1

1: rs6025 [Homo sapiens] Links

CTGTAAAGACGATCCCTGGACAGGC [A/G] AGGAATACAGGTATTTTGCCTTGA HGBASE, HUMANGENOME_JCVI, ILLUMINA-UK, SNP500CANCER, TSC-CSHL

MapView VarView PubMed GeneView SeqView Protein 3D OMIM

Allele Origin: G-Germline A-Germline
MAF/MinorAlleleCount: T=0.0055/12
Clinical Significance: probable-pathogenic
HGVS Names: [NC_000001.10:g.169519049T>C] [NG_011806.1:g.41721A>G] [NM_000130.4:c.1601A>G] [NP_000121.2:p.Arg534=]

Display Graphic Summary Show 20 Sort By Send to

[Alternatív szöveg: 3. ábra: Találat az SNP adatbázisban]

[Képaláírás: 3. ábra: Találat az SNP adatbázisban]

- [STS](#): *Sequence Tagged Site*-ok adatbázisa. (Lásd [A mutációk detektálása](#) fejezetben.)
- [EST](#): *Expressed Sequence Tag* rekordok. Olyan STS-szekvenciákat tartalmaz, amelyeket cDNS-ek részleges szekvenálásával nyertek. Felhasználhatóak egy gén azonosításához, térképezéséhez, klónozásához.
- [Genome](#): Teljes genom szekvenciák, kromoszómák (megjeleníteni az NCBI-ba integrált [MapView](#)-val lehet).
- [Gene](#): A megszekvenált genomokban lévő génekről összegyűjtött információk.

⁴ Annotáció: A szekvencia adatainak pontosítása, pl: hol helyezkedik el a genomban, hol az eleje-vége, exon-intron és egyéb szerkezeti elemek határai, funkciója, stb.

⁵ Nem redundáns: Ugyanaz a szekvencia nem szerepel többször, több azonosító számmal.

- [UniGene](#): Gén központú, a transzkriptom (teljes átíródnó mRNS szett) megjelenítésére szolgáló összesített gyűjtemény.
- [UniSTS](#): Markerek (pl. komplett előre megtervezett PCR reakciók) és genom térképezési adatok adatbázisa.
- [GEO](#): *Gene Expression Omnibus*, gén expressziós adatok gyűjteménye. Microarray, új-generációs szekvenálás és egyéb nagy áteresztőképességű (*high-throughput*) technikákkal nyert funkcionális genomi adatokat tartalmaz.
- [Taxonomy](#): Olyan rendszertani adatbázis, melyben minden a GenBankban megtalálható, a szekvenciák forrásául szolgáló élőlény, és annak rendszertani besorolása fel van tüntetve.⁶
- [Structure](#): Makromolekula (főleg fehérje) szerkezetek gyűjteménye.
- [Probe](#): Szekvencia specifikus próbák és reagenseik gyűjteménye. Pl.: PCR primerek, restrikciós enzimek RFLP-hez, stb.
- [BLAST](#): Szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Az itt felsoroltakon kívül még számos egyéb adatbázis, gyűjtemény és alkalmazás található az NCBI-on, és a kínálat évről-évre bővül. Az összes az NCBI-on elérhető adatbázis és alkalmazás strukturált nézetét megtalálhatjuk a [honlaptérképen](#), abc szerint rendezve pedig [itt](#). A [Database oldalon](#) további információkhoz juthatunk NCBI adatbázis rendszereit illetően, például megnézhetjük, hogy mely adatbázis rész melyik másikkal van összekötve, kereszthivatkozások útján. Az [NCBI ftp](#) oldaláról letölthetőek a szoftverek vagy akár az egész adatbázisok is, amelyből ezután – lokális kereséseket lehetővé tevő – új adatbázist építhetünk a saját számítógépünkön.

Nucleotide GenBank

Egy nukleotidszekvencia *GenBank* file-formátumú⁷ rekordjában a következő lényeges adatok találhatóak (példaként [] zárójelek között az emberi V véralvadási faktor [rekordjának](#) konkrét adatai szerepelnek):

- **LOCUS**: Rövid címke. A szekvencia belső azonosítójával kezdődik [NM_000130], mely az *Accession Number*-rel (lásd lejjebb) ellentétben csak az NCBI-on használatos, de azzal sokszor megegyezik. Majd a bázisok számával [9179 bp], a szekvencia forrásával [mRNA], szekciójával [PRI = főemlősök] és a beküldés dátumával [10-MAR-2012] folytatódik.
- **DEFINITION**: A szekvencia rövid leírása [Homo sapiens coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)(F5), mRNA], pl. milyen faj milyen génje, egész vagy töredék szekvencia, stb.
- **ACCESSION**: A szekvencia azonosítószáma [M90100]. Minden az adatbankokba bekerülő szekvencia kap egy egyedi azonosító számot vagy *Accession Number*-t (AC). Egy nemzetközi egyezmény⁸ értelmében adott Accession Number minden adatbázisban (nem csak NCBI-on) ugyanahhoz és csak ahhoz a szekvenciához tartozik.
- **VERSION**: Az azonosítószám után, ponttal elválasztva a verziószám található [NM_000130.4]. Ha a beküldött szekvenciában hibát észlelnek és kijavítják, akkor az Accession Number nem változik, csak a verziószám nő.
- **KEYWORDS**: A szekvenciát beküldő kutató által megadott, a szekvenciára

⁶ Adott *Taxonomy ID* minden (nem csak NCBI) adatbázisban ugyanahhoz a fajhoz tartozik.

⁷ Különböző szekvencia file-formátumok léteznek, melyek egyike a *GenBank* formátum. Az egyik legelterjedtebb, és a legtöbb bioinformatikai szoftver használt file-formátum neve *FASTA*.

⁸ International Nucleotide Sequence Database Collaboration

vonatkozó, nem szabványosított kulcsszavak.

- **SOURCE, ORGANISM:** A faj, amelyből a szekvencia származik, és annak rendszertani besorolása.
- **REFERENCE:** A szekvenciára vonatkozó szakirodalmi hivatkozások felsorolása standardizált formában.
- **FEATURES:** A *Feature table*-ben (tulajdonság táblázat) a szekvencia tulajdonságainak részletes leírását találjuk, szabványosított, a szekvenciákat kezelő szoftverek számára könnyen feldolgozható formában.
 - **source:** a szekvencia hossza, és forrása (faj, szövet, sejttípus, hivatkozás a taxonómiai adatbázisra).
 - **gene:** a gén hossza [1..9179], rövid neve [F5], szinonímái [FVL; PCCF; THPH2], kereszthivatkozások.
 - **5'UTR:** az 5' végi nem transzlálódó szakasz helye a szekvenciában.
 - **exon:** Exonok helye a szekvenciában [pl: 1..303; 304..395, ...].
 - **CDS:** a kódoló szekvencia (*coding sequence*) helye az egész szekvenciában [146..6820], kereszthivatkozások más, pl. fehérje adatbázisra [protein_id="NP_000121.2"], a lefordított fehérje szekvenciája.
 - **sig_peptide:** a szignálpeptid helye [146..229].
 - **mat_peptide:** az érett peptid (a szignálpeptid lehasadása után maradó rész) helye [230..6817].
 - **STS:** STS szekvenciák helye [pl: 947..1185, 2868..3085, ...].
 - **3'UTR:** a 3' végi nem transzlálódó szakasz helye.
 - **polyA_signal:** a poliadenilációs szakasz helye [pl: 6948..6953].
- **ORIGIN:** A szekvencia helye a genomon belül (ha ismert és közlik). Ez után következik maga a nukleotid szekvencia. Melyet a könnyebb eligazodás kedvéért 10 bázisonként tagolnak, és a sorok előtt számozzák a sor első bázisának pozícióját. A rekord végét a // jel jelöli.⁹

Összességében elmondható, hogy az NCBI az élettudományok területén dolgozó kutatók egyik leggyakrabban használt adatbázisa, amellyel minden kutatói pályára készülő diáknak ajánlott megismerkednie.

Genetikai betegségek, mutációk

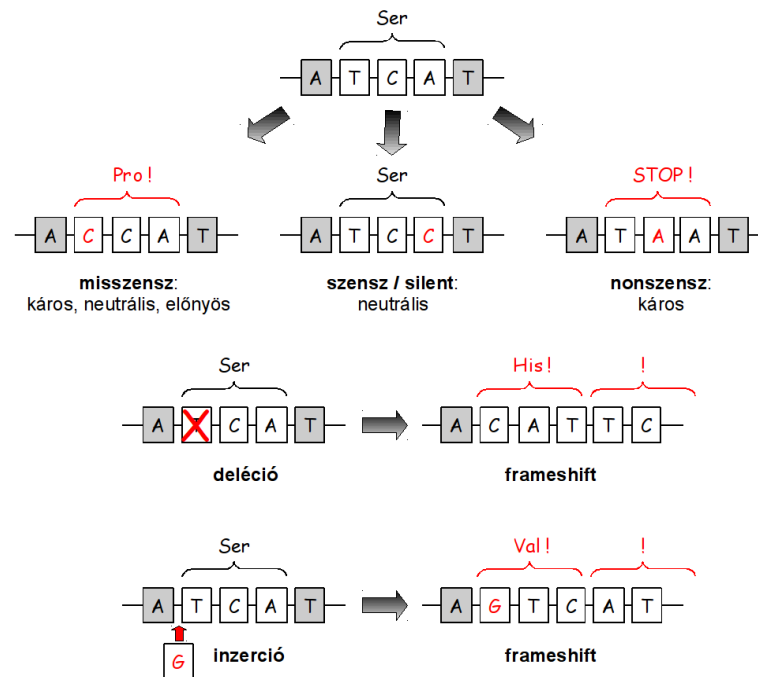
Az orvostudomány, a molekuláris biológia és a genetika ugrásszerű fejlődésével lehetővé vált, hogy az örökletes betegségeket konkrét genetikai mutációkhoz társítsuk, így módon klinikai fenotípushoz hozzá lehet rendelni a genotípust. Egy genetikai defektusnak számos oka lehet. A betegséget okozó genetikai mutáció érinthet csupán pár nukleotidot, ezek az úgynevezett „kis” *léptékű* változások; vagy lehet „nagy” *léptékű*, kromoszóma szinten is látható (vagy nem látható, de jelentős) rendellenesség is. A kis léptékű változások közé tartoznak a pontmutációk vagy SNP-k (*Single Nucleotide Polymorphism*, vagyis egy nukleotidot érintő polimorfizmus, 4. ábra). Megkülönböztetünk olyan SNP-eket, melyek egy-egy nukleotid *kicserélődése* révén jöttek létre, ezek a *misszensz*, *szensz* és *nonszensz* mutációk, illetve olyanokat, ahol egy bázis *kiesik* – ezt *deléciónak* – vagy *beékelődik* – ezt *inzerciónak* – nevezik. Ha a fehérjekódoló gén valamely exonjában olyan pontmutáció következik be, melynek

⁹ A felsoroltak nem minden GenBank rekordban találhatók meg maradéktalanul, valamint egyéb mezők is előfordulhatnak, itt csak a legfontosabbakat emeltük ki.

eredményeképp a transzlálódó fehérje egy aminosava megváltozik, akkor *misszensz* mutációról beszélünk. Attól függően, hogy az aminosav-csere hogyan befolyásolja a keletkezett fehérje térszerkezetét és kötőhelyeit a misszensz mutáció gyakran káros, néha neutrális (ha közel azonos fizikokémiai tulajdonságú aminosav épül be) vagy ritkén előnyös. *Szensz* vagy *silent* pontmutációnak azt nevezzük, ha olyan nukleotid szubsztitúció történik az exonban, amely nem befolyásolja a transzlációt. Vagyis a kódlőtyöngés miatt az átíródó aminosav, és ezáltal a kész fehérje szekvenciája is azonos marad. Ez a mutáció típus többnyire neutrális, de az izoakceptor tRNS-ek¹⁰ esetleges nem egyenletes eloszlásából fakadóan előfordulhatnak enyhén káros vagy előnyös formái is. A *nonszensz* mutáció pedig azt jelenti, hogy a bázis kicserélődés *stop* kodont hoz létre az exonban. Így a mutáció pozícióján leáll a fehérje átírása, és nagy valószínűséggel nem-, vagy csak korlátozottan működőképes proteint kapunk. A nonszensz mutációk szinte minden esetben káros hatásúak. Az exonban történt *deléció* vagy *inzerció* (közös elnevezésük: *in/del*) hatására eltolódhat a leolvasási keret. Ezt *frameshift* (frame = keret, shift = eltolódás) mutációnak nevezzük. A kereteltolódással járó *in/del* típusú mutációk nagyarányban káros hatásúak, mivel a mutációt követően teljesen más aminosavak épülnek be, mint a vad típusú gén átírása esetén, valamint valószínűsíthető egy korai stop kodon megjelenése is. Ha az *in/del* mutáció három (vagy három többszöröse számú) nukleotidot érint, akkor nem tolódik el a leolvasási keret.

A egy-, vagy pár nukleotidot érintő mutációkkal ellentétben a kromoszóma szinten látható (vagy nem látható, de jelentős) elváltozásokat „nagy” léptékű mutációknak nevezzük. Ide tartozik az egész kromoszóma darabot érintő *inzerció* és *deléció*, az *amplifikáció* (egyes szakaszok többszöröződése), a *transzlokáció* (egy kromoszóma darab áthelyeződése), a kromoszóma *törése* és az *aneuploidia* (egész kromoszómák, vagy genomok többszöröződése) is. Ezen elváltozások általában drasztikus hatással vannak a fenotípusra nézve, és sokszor letálisak, de olykor akár fajképződéshez is vezetnek.

¹⁰ Izoakceptorok: két vagy több különböző antikodonú tRNS ugyanazt az aminosavat képes megkötni és hordozni.



[Alternatív szöveg: 4. ábra: A pontmutációk típusai]

[Képaláírás: 4. ábra: A pontmutációk típusai]

A mutációk detektálása

A mutációk kimutatásához két alapvető megközelítést használhatunk: vagy közvetlenül (pl. szekvenálással) mutatjuk ki az elváltozást, vagy ismert *markerek* segítségével közvetett kimutatást alkalmazunk. Egy mutáció legbiztosabb, ám költséges kimutatása a szekvenálás. Ha gazdaságosabb módszert, vagy előzetes eredményt szeretnénk, akkor az ismert markerek kimutatására irányuló tesztekkel kell végeznünk. Markernek hívjuk a genom azon pontjait, amelyeket valamilyen módon azonosítani tudunk. Ilyen ismert markerek lehetnek a genom térképezési pontjai, vagyis az *STS*-ek (*Sequence Tagged Site*, azaz szekvenciával megjelölt helyek), melyeket általában *PCR* (*Polimerase Chain Reaction*, polimeráz láncreakció) segítségével mutathatók ki. Az STS egy viszonylag rövid (200-500 bázispár hosszú), ismert lokalizációval és bázissorrenddel rendelkező szakasz, amely a genomban csak egyszer fordul elő. Markerként használhatók az *EST*-k (*Expressed Sequence Tag*, jelölt átíródott szekvencia) is, melyek cDNS klón segítségével meghatározott részszekvenciák. Az EST-k egy adott mRNS jelenlétéről, egy gén működéséről, egy fehérjekódoló DNS szakasról adhatnak információt. Ezek mellett számos egyéb marker típus létezik, közéjük sorolhatjuk pl. a különböző hosszúságú mikroszatellitákat is. Ahhoz, hogy a markerek segítségével genetikai elváltozásokat kutassunk, nem feltétlenül kell ismernünk magát az esetleg mutációt szenvedett gént vagy a hatásmechanizmusát. Ha egy betegség kapcsán felmerül a genetikai mutáció gyanúja, akkor különböző molekuláris technikákkal győződhetünk meg arról, hogy mely génben és milyen mutáció történt.

Egy genetikai betegség kimutatásához a következő lépéseken célszerű végigmenni: *bioinformatikai* rész: a vonatkozó szakirodalom feldolgozása, az érintett gén és a konkrét mutáció azonosítása, a

megfelelő teszt kiválasztása; *laboratóriumi teszt*: a kimutatás végrehajtása, minőség-ellenőrzés. A továbbiakban a konkrét kimutatási technikákról lesz szó.

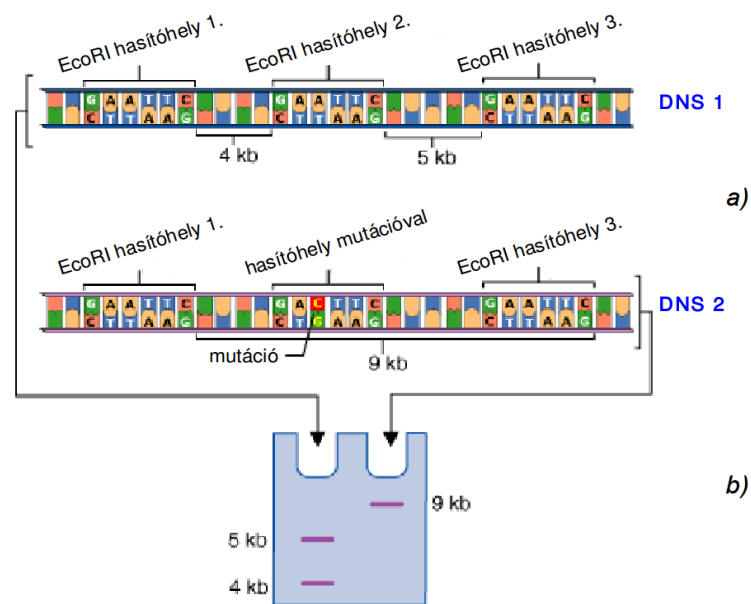
RFLP

Az *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, restrikciós fragment hossz polimorfizmus) a hagyományos mutáció kimutató technikák közé tartozik. Lényege, hogy a *vad típusú* és az *ismeretlen* DNS-t emésztik egy (vagy több) restrikciós endonukleáz enzimmel. A restrikciós endonukleázok a bakteriális „immunrendszer” részét képezik, és bizonyos 4-8 bázispár hosszúságú, palindrom¹¹ szekvenciájú DNS szakaszokat nagy pontossággal ismernek fel és hasítanak el. Ezeken a szakaszokon a DNS mindkét láncát hasítják. A baktériumokban betöltött biológiai szerepük a sejtidegen DNS (például a baktériumot megtámadó bakteriofág DNS-e) felismerése és megsemmisítése. Felfedezésük (W. Arber, H. Smith és D. Nathans: 1978-as Nobel-díj) tette lehetővé a géntechnológia megszületését. Az egyes restrikciós enzimek felismerő (és hasító) specifikitása különbözik, vagyis más-más szekvenciájú DNS szakaszokat ismernek fel. Több száz különböző baktériumokból származó és kereskedelmi forgalomban is kapható restrikciós enzim létezik, melyek felhasználása messze túlmutat az RFLP eljárason, például a gensebészet nélkülözhetetlen kellékei.

Az RFLP-vel történő mutáció-kimutatás akkor alkalmazható, ha a mutáció egy restrikciós endonukleáz hasítóhelyén van, ebben az esetben az adott enzim a mutáció helyén nem képes hasítani. Emiatt – a vad típushoz képest – megváltoznak a fragment-hosszak, ami jól látszik az emésztő enzim kezelés után elvégzett gélelektroforézisen. A módszer tehát olyan SNP-k, inzerciók, deléciók kimutatására alkalmas, melyek érintik az alkalmazott restrikciós enzimek hasítási helyeit. Az RFLP hátrányai közé tartozik, hogy a kis fragmentek elválasztása miatt radioaktív jelölést kell alkalmazni, ami rákkeltő hatású, valamint, hogy csak akkor használhatjuk, ha ismerjük a szekvenciát és mutációt.

Az *EcoRI* nevű, *Escherichia coli*-ból kivont restrikciós enzim a kettős szálú DNS-t minden olyan ponton hasítja, ahol a 5'-GAATTC-3' szekvencia (nem metilált formában) előfordul. Az 5. ábrán egy olyan mutáció RFLP-vel történő kimutatása látható, ahol az *EcoRI* második hasítóhelyén történt egy pontmutáció, ezáltal az enzim itt nem képes hasítani, így két rövidebb helyett egy hosszabb szakaszt mutat a gélelektroforézis.

¹¹ Olyan szó vagy mondatrészlet, amely visszafelé olvasva is ugyanaz, pl: „Géza, kék az ég”. Egy DNS szakasz akkor palindrom, ha a komplementer szálát olvasva is ugyanazt kapjuk.



[Alternatív szöveg: 5. ábra: RFLP]

[Képalírás: 5. ábra: RFLP: a) A vad típusú DNS lánc (DNS 1), három EcoRI hasítóhellyel, és a második EcoRI hasítóhelyen mutációt szenvedett DNS lánc (DNS 2). b) A két DNS lánc EcoRI-es emésztés utáni gélelektroforézisének eredménye.^{12]}

PCR

A *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*, polimeráz láncreakció) (Kary Mullis és Michael Smith, 1993-as Nobel díj) egy olyan molekuláris biológiai technológia, melynek célja egy előre definiált (*target*) DNS szakasz enzimatisz amplifikációja (sokszorozása). A *target* DNS szakasz általában nem hosszabb 10 000 bázisnál, lehet egy gén, génrészlet vagy nem kódoló régió is.

A PCR reakció-elegybe a következők kellene: templát DNS (pl. egy sejt maganyaga), nagy feleslegben primerek, Taq polimeráz enzim, dNTP mix és puffer-oldat. A *templát DNS* tartalmazza a sokszorozni kívánt *target* szakaszt. A két *primer* olyan rövid DNS lánc, amely meghatározza a *target* DNS szakaszt, ugyanis a primerek szekvenciája azonos a sokszorozni kívánt DNS szakasz elejével (5' vég) és végével (3' vég). Feladatuk, hogy specifikusan hozzákötődjenek az egyszálú DNS megfelelő szakaszához – így ezen a szakaszon ismét kétszálú lesz a nukleotidlánc –, ami elengedhetetlen a Taq DNS-polimeráz enzim bekötődéséhez, vagyis a komplementer DNS szál felépüléséhez. A *Taq DNS-polimeráz* egy hőstabil enzim, melyet a hőforrásokban élő *Thermus aquaticus* baktériumból vontak ki, feladata a DNS másolása magas hőmérsékleten. A *dNTP* (deoxiribonukleid trifoszfát) *mix* az új DNS szálak felépítéséhez szükséges ATP-t, TTP-t, GTP-t és CTP-t tartalmazza. A DNS-polimeráz számára megfelelő kémiai környezetet a *puffer-oldat* biztosítja.

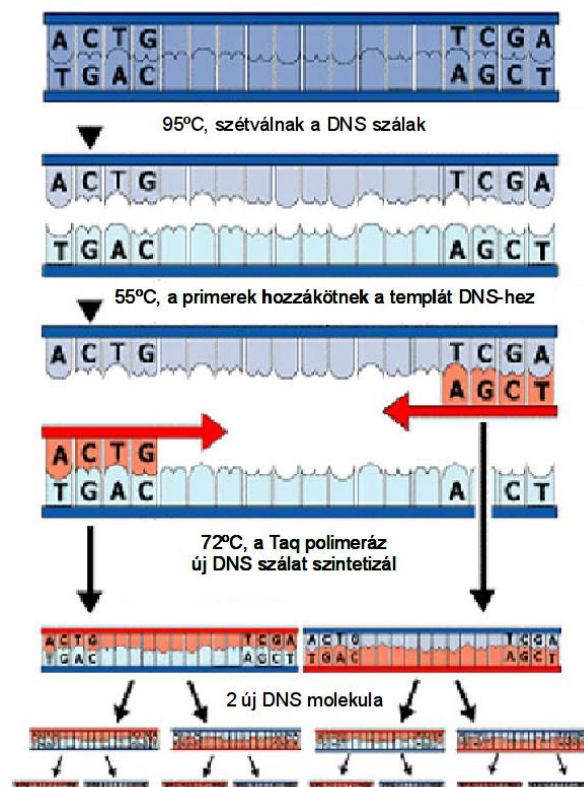
A reakció egy *PCR készülékben* zajlik, amely biztosítja a PCR folyamathoz szükséges változó hőmérsékleteket. Ugyanis a PCR reakció úgy zajlik, hogy a reakció-elegyet a készülék először 94-

¹² Az eredeti kép forrása: [National Biological Information Infrastructure](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1369999/)

96°C-ra felmelegíti, ekkor a templát DNS-ek egyszálúsodnak, vagyis a hidrogénhidak felbomlása által *denaturálódnak*. Ezután az elegyet a készülék 45-60°C-ra hűti, hogy a primerek hozzá tudjanak kapcsolódni a nekik megfelelő target DNS szálakhoz. A kapcsolódási hőmérséklet a primerek szekvenciájától függ és általában 5°C-kal van a primerek olvadási hőmérséklete alatt. Ezt a lépést *anellálásnak* vagy kapcsolódási lépésnek nevezzük. Ha a hőmérséklet túl magas, a primerek nem kötődnek a templáthoz, ha túl alacsony, akkor a nem specifikus helyekre is bekötődnek, esetleg fals termékeket hozva létre. Ezek után újra emeli a hőmérsékletet, 72°C-ra. Ezen a hőfokon kezdi szintetizálni a templát DNS komplementer szálait a Taq polimeráz. A szintézis a kapcsolódott primernél kezdődik, és végigmegy a DNS-szálon. A lépés neve *meghosszabbítás*, ami a szintetizálás alatt álló DNS meghosszabbítására utal. A szintetizálás során a szülő nukleinsavszál templátként szolgál a leány lánc létrehozásához. A leány szál egy perc alatt kb. 1000 bázissal hosszabbodik. Ezután a készülék újra 96°C-ra melegíti az elegyet és a ciklus kezdődik előlről (6. ábra). Egy-egy ciklus pár percig tart. A legelső kör előtt a DNS-t általában hosszabb ideig denaturálják, hogy a templát DNS és a primerek esetleges kettős szálai is teljesen szétváljanak. Elméletileg minden ciklusban megduplázódik a target DNS molekulák száma. 25-30 ismétléssel már megfelelő mennyiségű, gélelektroforézissel is kimutatható DNS képződik. A PCR reakció annyira érzékeny, hogy extrém esetben akár egyetlen DNS molekulát is meg lehet sokszorozni vele. Ha egyetlen DNS szálból indulunk ki és 25-ször ismétljük a reakciót, akkor a végén 2^{25} , azaz 33 554 432, vagyis kb. $3,36 \times 10^7$ darab target DNS-ünk lesz. A PCR-termékek gélelektroforézis segítségével a méretük alapján azonosíthatóak. A termék mérete egy, szintén a gélbe injektált, ismert hosszúságú DNS-szakaszokat tartalmazó *DNS-létrával* összehasonlítva határozható meg.

A PCR reakció menetének összefoglalása:

1. T↑, *denaturálás*: egyszálúsodnak a DNS-ek
2. T↓, *anellálás*: a primerek hozzákapcsolódnak a target szakaszokhoz
3. T↑, *meghosszabbítás*: a Taq polimeráz szintetizálja a komplementer szálát
4. vissza az 1. pontra (25-30 ismétlés)



[Alternatív szöveg: 6. ábra: A hagyományos PCR reakció menete]

[Képaláírás: 6. ábra: A hagyományos PCR reakció menete¹³]

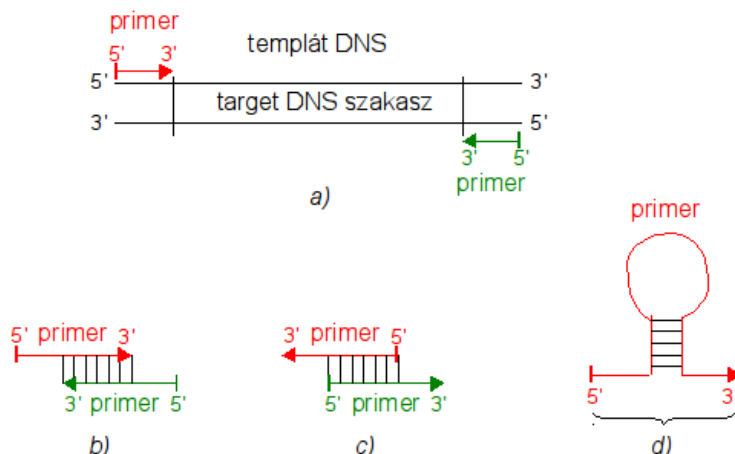
PCR primer tervezés

A primerek olyan rövid, egyszálú DNS darabok, melyek megegyeznek az amplifikálni kívánt templát DNS szakasz elejével és végével. E szakaszok kiválasztásánál (vagyis a primerek tervezésénél) több szempontot figyelembe kell venni, hogy a PCR reakció megfelelően menjen végbe:

- **Oladási hőmérséklet:** A primerek olvadáspontjának vagy olvadási hőmérsékletének (T_m , melting = oladás) közel ($^{\circ}\text{C}$ -ra pontosan) azonosnak kell lennie. Oladási hőmérséklet az a hőfok, ahol a primerek fele a DNS-hez kötöttek, fele pedig az elegyben szabadon van. Ez a hőmérséklet ideális esetben 60°C körül mozog. Ha a két primer olvadási hőmérséklete nem egyezik meg, előfordulhat, hogy bizonyos hőmérsékleten az egyik primer már hozzáköt a templát DNS-hez, a másik pedig még nem. Ha viszont addig csökkentjük a hőmérsékletet, amíg a másik primer is hozzáköthet a templáthoz, akkor az egyik primer már nem specifikus helyekre is betapad. Ugyanis az olvadáspontjánál alacsonyabb hőmérsékleten a DNS képes nem-specifikusan is kötődni. A primerek olvadáspontja a hosszuktól és a G-C arányuktól függ.
- **Hossz:** A megfelelő specificitás miatt a primerek ideális hossza 18-25 bázis. Egy kb. 20 bázis hosszú szakasról már elmondható, hogy egyedi szekvencia, a genomban nincs több vele azonos régió (kivéve, ha ismétlődő szakaszt tartalmaz). Ha a primerek lényegesen rövidebbek, akkor nem lesznek elég specifikusak, vagyis előfordulhat, hogy nem csak egyetlen helyre tudnak bekötni. Ha a targethez képest elég közel több helyre is be tud kötni a primer, akkor az fals termékek jöhetnek létre. Ha a DNS egy távolabbi szakaszára is bekötődik a primerünk, akkor nem képződik annyi megsokszorozott DNS szál, amennyi elméletileg lehetséges lenne (minden ciklusban megduplázva a számukat), mert ez a kötés elvonja a reakciótól a primereket.
- **G-C arány:** A G-C arány a DNS-ben lévő G és C bázisok A-T-hez viszonyított arányát jelenti. Minél több, egymással háromszoros hidrogénkötést kialakító G és C bázis található egy DNS szakaszon, annál magasabb lesz az olvadáspontja. Ugyanis a háromszoros hidrogénhidak magasabb hőmérsékleten válnak szét, mint az A és T között kialakuló kettős hidrogénkötések. Ha a primer kb. 20 bázis hosszúságú és 50% a G-C arány benne, akkor kb. az ideális, 60°C lesz az olvadáspontja. Ha azon a DNS szakaszon, ahova a primert tervezzük túl nagy a G-C arány, akkor jobb kicsit máshová tolni a primert, mint csökkenteni a primer hosszát. Ugyanis a rövidebb primer kevésbé specifikus. Ha az adott szakaszon alacsony a G-C arány, akkor viszont megtehetjük, hogy kicsit növeljük a primer hosszát, ám ezzel növeljük a komplementaritási problémák esélyét is. A jó primer elején több a G és C bázis, mert ezek segítségével jobban oda tud kötni a templáthoz; a végén pedig több az A és T, amihez viszont a Taq polimeráz enzim kötődik szívesebben.
- **Komplementaritás:** A primerek szekvenciái nem lehetnek egymás vagy önmaguk komplementerei (7. ábra). *3' komplementaritásnak* nevezzük, ha két primer a 3' végein képez dimért (párosodott DNS szálát). Mivel a Taq polimeráz az ilyen primer dimérhez is hozzá tud kötni, ezért fals termék keletkezik. Továbbá a dimér képzés elvonja a primereket a reakciótól, így a normál termék is kevesebb lesz. *5' komplementaritásnak* azt hívjuk, amikor a primer pár az 5' végein képes összetapadni. Az 5' komplementaritás esetében nem keletkezik fals termék, de a primereket a dimér szintén elvonja a reakciótól. További veszélyeket rejt az *önkomplementaritás*, amikor az egyik primer másodlagos szerkezetet alakít ki önmagában, pl.

¹³ Az eredeti kép forrása: [National Biological Information Infrastructure](#)

ha a primer elején lévő bázisok komplementerei a végén lévő bázisoknak, akkor a két vég összetapad. Ha egy önkomplementer primerben maradnak szabadon egyszálú részek is, akkor fals termék keletkezhet (mivel ekkor az egyszálú szakasz egy rövidebb primerként viselkedik, ami sok helyre beköthet a templát DNS-en). Továbbá az önkomplementaritás szintén elvonja a primereket a reakciótól, így kevesebb valós termék keletkezik.



[Alternatív szöveg: 7. ábra: Primer-tervezés és a komplementaritási problémák]

[Képaláírás: 7. ábra: Primer-tervezés és a komplementaritási problémák: a) A két primer kötőhelye; b) 3' komplementaritás; c) 5' komplementaritás; d) önkomplementaritás, a kapcsos zárójel azt a szakaszt jelöli, ami egy rövidebb primerként viselkedve sok helyre beköthet a templát DNS-en]

- **Bázis ismétlődés:** További kritérium, hogy a primerben ne legyen sok azonos bázis egymás után, mert a komplementer helyekre betapadva „megcsúszhat” a primer, ami által eltérő hosszúságú DNS szálak keletkezhetnek.

Összefoglalva a primer-tervezés lényegét: a target DNS szakasz elején és végén két olyan 18-25 bázis hosszúságú szakaszt kell találni, amelyekre a fenti feltételek mind teljesülnek. Hogy ezt a bonyolult műveletet ne kézzel, illetve szemmel kelljen megoldani, többféle primer-tervező szoftver áll a kutatók rendelkezésére.

A PCR reakció kontroll kísérletei

Mivel a PCR egy rendkívül érzékeny reakció (extrém esetben akár egyetlen DNS molekulát is meg lehet vele sokszorozni, vagyis ki lehet mutatni), ezért a reakció során nagyon körültekintően kell eljárni, és steril körülmények között dolgozni. A sterilitást többnyire a munkaterület UV fénnel történő besugárzásával érik el. Az UV fény hatására a DNS-ben timin-dimérek keletkeznek¹⁴, melyek a PCR reakció folyamán megállítják a DNS polimeráz enzimet. Vagyis azokat a DNS szálakat, melyeken timin-dimérek vannak nem sokszorozza a PCR reakció.

Hogy megbizonyosodhassunk arról, hogy a PCR reakció rendben végbemegy, a szóban forgó amplifikáción kívül egy *pozitív kontroll* kísérletet is el kell végeznünk. A pozitív kontroll PCR-t úgy

¹⁴ Gerjesztés hatására a DNS ugyanazon láncában egymás mellett elhelyezkedő két timin között kötések alakulnak ki.

állítjuk össze, hogy mindenképp teszünk bele egy olyan DNS templátot, melyet biztosan amplifikál az elegyben lévő primer pár és polimeráz enzim. Ezt a pozitív kontroll DNS templátot a primerekkel együtt lehet kapni. A pozitív kontroll amplifikációs termékei jelzik a rendszer megfelelő működését. Ha a pozitív kontroll kísérlet végén nem kapunk DNS termékeket, akkor valami hiba van a PCR reakcióban, pl.: megromlott a Taq polimeráz enzim, nem működött megfelelően a PCR készülék vagy kihagytunk valamit a reakció elegyből.

Hogy a steril körülmények felől megbizonyosodjunk egy *negatív kontroll* PCR reakciót is össze kell állítanunk. A negatív kontroll reakció elegyéhez hozzáadunk minden – a PCR reakcióhoz szükséges – összetevőt, kivéve a DNS templátot. Ha a negatív kontroll kísérlet végén is kapunk megsokszorozott DNS terméket, akkor valamilyen úton DNS szennyezés került a reakció elegybe (pl. valamelyik eszköz vagy reagens szennyezett volt).

Ha a pozitív kontroll kísérletben sikerült a DNS-t megsokszorozni, a negatív kontrollban pedig nem, akkor a kimutatási PCR reakció eredményét is jogosan értékelhetjük valósnak.

Mutációk detektálása hagyományos PCR-rel

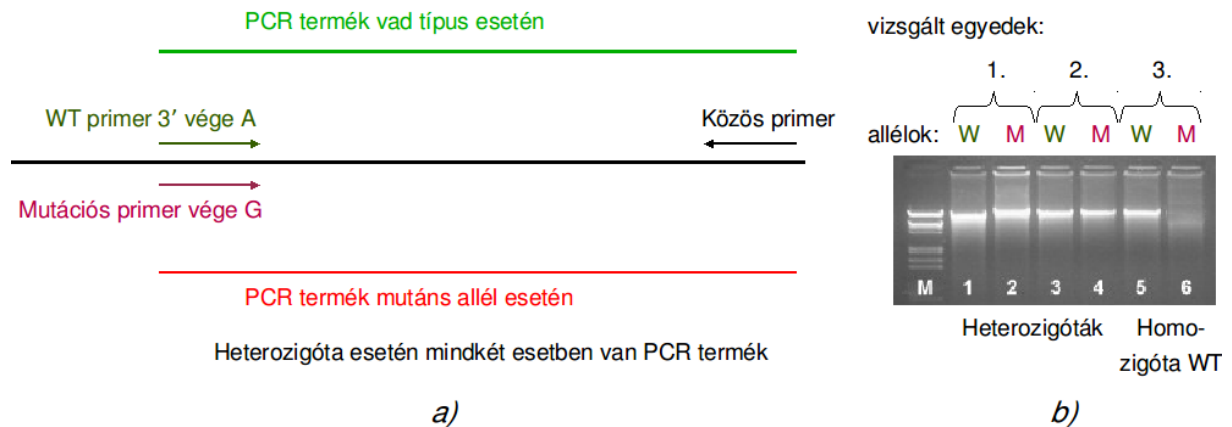
A hagyományos (vagyis az előzőekben tárgyalt) PCR reakció a target DNS amplifikációja által alkalmas lehet inzerció, delécio és pontmutáció kimutatására is. A kimutatás menete: az egyik primert a mutáció által érintett helyre, de a vad típusú DNS szakaszra tervezzük. Ha a PCR technikával történő kimutatásnak van megsokszorozott DNS terméke, akkor vad típusú, nem mutáns DNS volt a templátunk, ha nincs termék, akkor mutáns DNS volt a mintában. Hosszabb inzerciót és deléciót úgy is ki lehet mutatni, hogy a primereket az in/del szakasztól up- és downstream tervezzük. Ekkor minden esetben lesz DNS termék, de a PCR utáni gélelektroforézisben láthatóvá válik az amplifikált DNS-ek hossza. A hosszából pedig következtethetünk az inzercióra vagy delécióra.

STS-ek kimutatása már kész primerek állnak a kutatók rendelkezésére. Ha az adott PCR reakció nem adott eredményt, akkor a kimutatandó STS marker nincsen jelen a templát DNS-ben.

Speciális PCR technikák

Allélspecifikus PCR

Az allélspecifikus PCR homo- vagy heterozigóta állapotban lévő SNP-k kimutatására alkalmas (8. ábra). Az egyik primert arra a DNS szakaszra tervezzük, ahol az SNP van. Ebből a primerből készítünk egyet a vad (*WT*, *wild type*) és egyet a mutáns (*M*, *mutatnt*) típusra is, ahol e két primer között egyetlen nukleotidnyi eltérés lesz. Ezen kívül van még egy közös primer is, az SNP által nem érintett régióban. Minden DNS mintára két PCR reakciót kell kivitelezni, egyet a vad típusú + közös primer párral, és egyet a mutáns + közös primerpárral. Ha az amplifikált DNS-eket gélre visszük láthatóvá válik, hogy az egyed hordozza-e az adott SNP-t homo- vagy heterozigóta állapotban.



[Alternatív szöveg: 8. ábra: Allél specifikus PCR reakció]

[Képaláírás: 8. ábra: Allél specifikus PCR reakció: a) allélspecifikus primerek és a közös primerek; b) a gélelektroforézis eredménye]

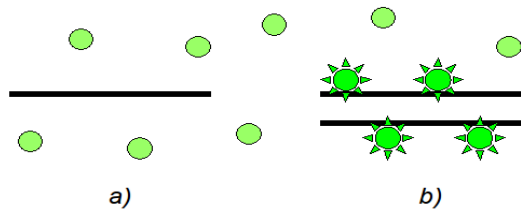
Multiplex PCR

Ha egy PCR reakcióban egyszerre több primerpárral dolgozunk, azt multiplex PCR-nek hívjuk. Segítségével egyszerre több DNS szakasz is amplifikálható adott templárról. Fontos, hogy a szakaszok hossza eltérő legyen. Ha több target DNS szakaszt is sikerül sokszorozni, akkor a gélen több sáv (*band*) lesz egymás alatt. A multiplex PCR nagyon gondos primer-tervezést igénylő feladat, hiszen itt nem csak kettő, hanem az összes primerre egyszerre kell, hogy igaz legyen, az azonos T_m , a komplementaritások hiánya és a többi kritérium.

Real-time PCR

A *real-time* vagy *valós idejű* PCR reakció lényege, hogy az eredmények a reakcióval egy időben, folyamatosan követhetők és nem csak a PCR reakció utáni gélelektroforézisből derül majd ki, hogy sikerült-e az adott amplifikáció. A real-time PCR-nél a fragmensek DNS olvadáspont elemzéssel válnak azonosíthatóvá. Ugyanis a DNS olvadáspontja arányos a nukleotid összetétellel (vagyis a G-C aránnyal) és a DNS hosszával. A real-time PCR reakcióhoz szükség van egy olyan festékre vagy próbára, amely jelzi, hogy éppen mennyi DNS szál van a reakció elegyben.

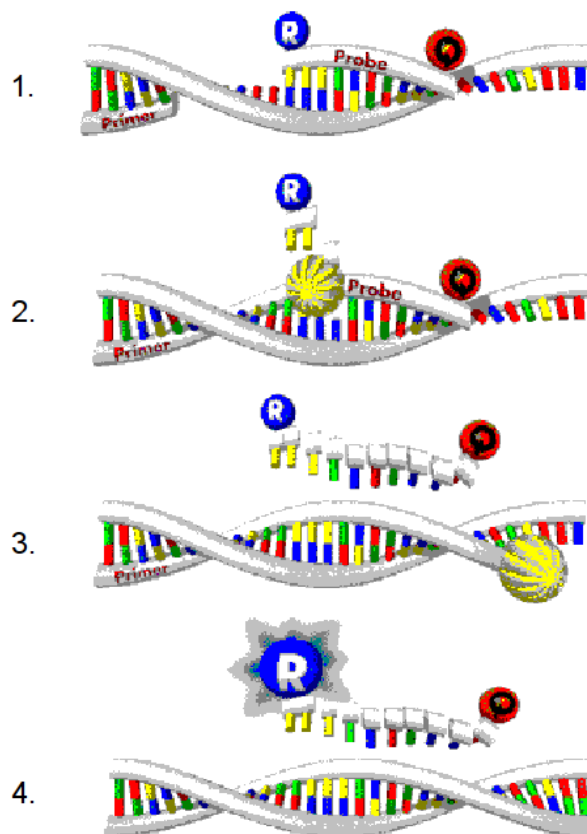
Az egyik ilyen jelölő a *SYBR® green* nevű festékanyag, ami – mint az etídium bromid – *interkalálódik* („beleül”) a duplaszálú DNS-be (*ds* vagyis *double stranded DNS*). Egyszálú DNS-hez (*ss* vagyis *single stranded DNS*) nem köt és nem is világít. Duplaszálú DNS-be kötődve, monokróm fénnel indukálva világít, vagyis 530 nm-s hullámhosszú fényt emittál (9. ábra). Az ebből keletkező mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán szaporodó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik.



[Alternatív szöveg: 9. ábra: A SYBR® green viselkedése egyszálú és duplaszálú DNS szekvenciával]

[Képaláírás: 9. ábra: A SYBR® green viselkedése egyszálú és duplaszálú DNS szekvenciával: a) egyszálú DNS mellett nem világít; b) duplaszálú DNS-be interkalálódva világít]

A real-time PCR-rel történő termék DNS mennyiségének mérésének másik módja az úgynevezett *TaqMan próba*, amely a hibridizációs próbák közé sorolható (10. ábra). A hibridizációs próbák lényege, hogy a két hagyományos primer mellett egy *hibridizáló* vagy *próba primert* is adunk a reakcióhoz. A hibridizáló primer a két eredeti primer között tapad a szimplaszálú DNS-en, a neki megfelelő szakaszra. A próba primer egyik végéhez egy *fluorokróm*, másik végéhez egy *kioltó* (*quencher*) molekulát kapcsolnak. Ezeket jelzéseknek hívjuk. Amikor a két jelzés közel helyezkedik el egymáshoz, vagyis ép a próba, akkor a fluorokróm által emittált fényt a kioltó képes elnyelni. Vagyis az ép próba primer nem világít. A 3' végén módosított TaqMan próba primert a Taq polimeráz enzim nem képes meghosszabbítani, hanem 3'→5' exonukleáz aktivitásával nukleotidokra bontja azt. Ezek után a kioltó elég messze kerül a fluorokrómtól, így nem gátolja tovább annak működését. Ezért monokróm fénnel történő besugárzás hatására bekövetkezik a fényreakció. A TaqMan próbás real-time PCR előnye, hogy nagyon specifikus.



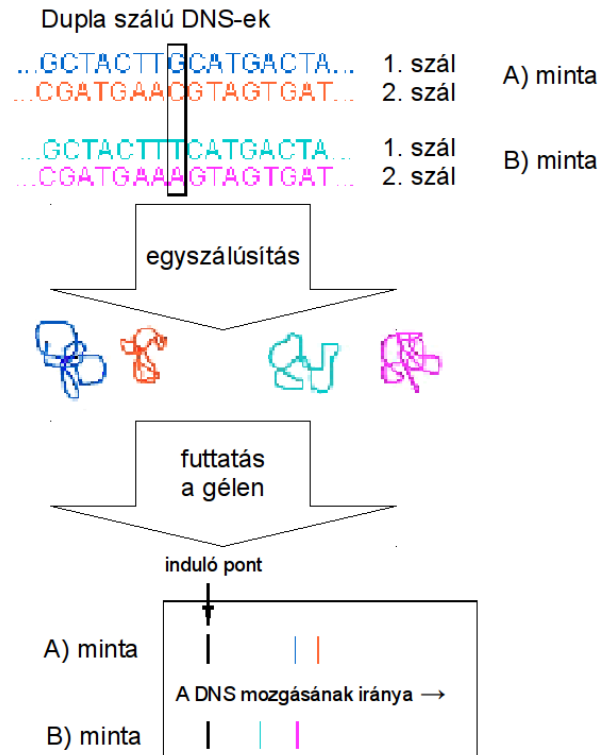
[Alternatív szöveg: 10. ábra: A TaqMan próba menete]

[Képaláírás: 10. ábra: A TaqMan próba menete: R: a fluorokróm, Q: a kioltó a próba primeren; sárga gömb: a Taq polimeráz enzim. 1.: a TaqMan próba primer betapad a vele komplementer ssDNS-re. 2.: A Taq polimeráz eléri a próba helyét. 3.: A Taq polimeráz lebontja a próbát. 4.: A szabad fluorokrómfénygerjesztés hatására világít.^{15]}

SSCP

Az *SSCP*, *Single Stranded Conformational Polymorphism*, vagyis „egyszálú konformációs polimorfizmus” szintén egy SNP kimutatásra alkalmas technika (11. ábra). Alapja, hogy az egyszálú DNS-lánc már egyetlen nukleotid eltérés miatt is más konformációt vesz fel, mint a vad típusú párja. Az elválasztást natív (nem denaturáló) körülmények között végzik, gélelektroforézissel. A gélben a vad típusú és az mutációt tartalmazó egyszálú DNS-ek, a konformációs eltérések miatt, különböző sebességgel vándorolnak. Az SSCP technika az SNP-k kimutatása mellett alkalmazható kisebb inzerciók és deléciók detektálására is. Előnye, hogy nem kell feltétlenül előre ismerni a mutációt, valamint, hogy az hetero- és homozigóta állapotban is kimutatható. Az eljárás technikailag viszonylag egyszerű (ha nem kell radioaktív jelölést alkalmazni) és gazdaságos. Hátránya, hogy csak arról szolgáltat információt, hogy van-e mutáció, arról nem melyik gén, melyik pozíciójában.

¹⁵ Az eredeti kép forrása: [Ruhr-Universität Bochum](http://www.ruhr-uni-bochum.de)

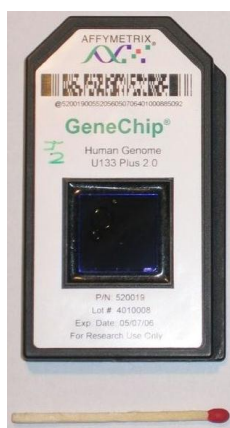


[Alternatív szöveg: 11. ábra: Az SSCP menete]

[Képalírás: 11. ábra: Az SSCP menete]

Microarray

Egy másik, egyelőre meglehetősen költséges és nem túl megbízható, de egyszerre sok vizsgálatra lehetőséget adó módja az SNP-k kimutatásának a *microarray* vagy *chip* technológia. A microarray gyűjtőneve több párhuzamos kimutatásokon alapuló technikának, mint a DNS alapú génexpressziós chip és oligonukleotid chip, az immuno-precipitációs chip, és a fehérje chip. A módszer lényege, hogy egy kisméretű üveg vagy műanyag lapra (12. ábra) négyzetrácsos elrendezésben biológiai mintákat visznek föl, minden pontba mást. A fluoreszcensen megjelölt vizsgálni kívánt biológiai anyagot kölcsönhatásba hozzák a pontokkal, és detektálják, hogy mely pontokban jött létre kölcsönhatás.



[Alternatív szöveg: 12. ábra: Egy microarray lap]

[Képaláírás: 12. ábra: Egy microarray lap]

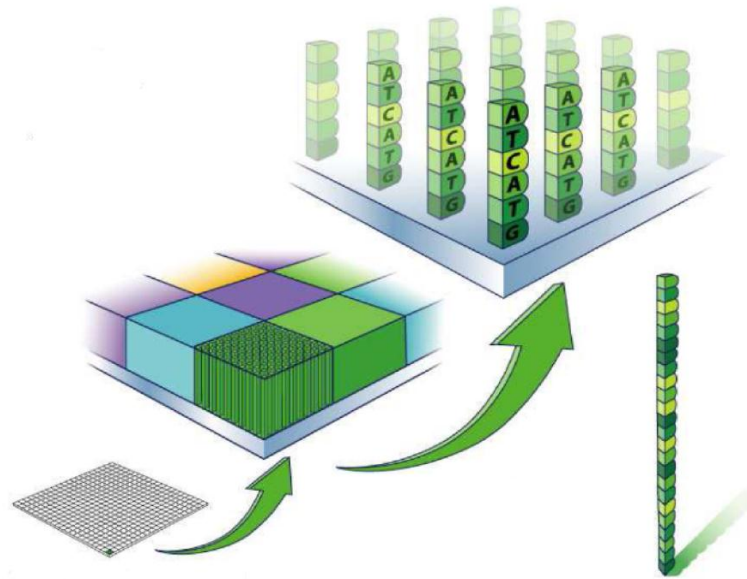
DNS microarray-ek

A DNS chipeket alkalmazásának két fő területe: az egész sejtek, szövetek génexpressziós mintázatának megfigyelése, és a genetikai különbségek (pl. SNP-k, inzerciók, deléciók) kimutatása a teljes genomról. Mi most ez utóbbi kimutatásra térünk ki bővebben:

A DNS chipek a DNS hibridizációs technikák csúcsát jelentik, ugyanis egy egy-négyzetcentiméteres lapocskán akár több tízezer¹⁶ – az egész genomra jellemző – SNP is vizsgálható egyszerre. A lapra szabályos rendben több tízezer különböző, mesterségesen szintetizált rövid, egyszálú DNS-t visznek fel. Egy pontban több példányban található meg ugyanaz az oligonukleotid szekvencia. A lemezkén a különböző oligonukleotidok több százezer pontban helyezkedhetnek el (13. ábra). Ha SNP-ket vizsgálnak, akkor az oligonukleotidok szekvenciái a populációra, fajra jellemző SNP-k komplementerei lesznek. Az oligonukleotidok 25mer hosszúak, egy gént kb. 20 oligonukleotid reprezentál, egy SNP detektáláshoz kb. 40 oligonukleotid szükséges. A chipen minden oligonukleotid típus helyét (koordinátáit) pontosan ismerik. A vizsgálandó genomot megfelelő méretű DNS darabokra bontják, egyszálúsítják és fluoreszcens festékkel jelölik. A vizsgálandó mintát ráviszik a chip felszínére. Ahol a jelölt DNS megtalálja a komplementerét a chipen, oda hibridizál vagyis betapad. A nem hibridizált DNS-t lemossák a chip felszínéről (14. ábra). Lézer besugárzás után egy nagy-felbontású szkennelvel olvassák le a chipen lévő fluoreszcens mintázatot. Ezután pontosan megállapítható, hogy mely ponton lévő, vagyis milyen SNP-re jellemző helyre hibridizált a vizsgált minta, és felállítható az egyén SNP mintázata.

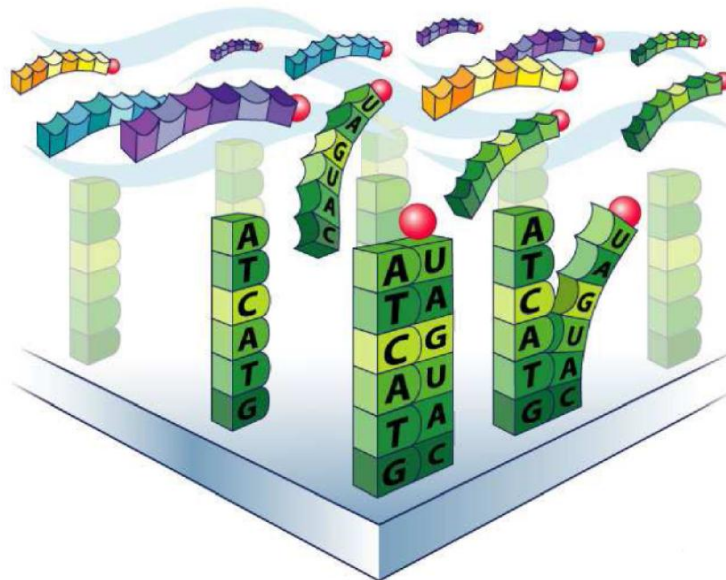
A DNS chip létrehozásának két alapvető módja létezik: az egyes oligonukleotidokat robot helyezi el a megfelelő pontra, vagy helyben szintetizálják a DNS szálakat. A helyben szintetizálás hasonlít a tintasugaras nyomtató technológiájára (15. ábra): a lemezre felvitt iniciátor molekulához ott tapad be a hozzáadott nukleotid, ahol azt előzőleg fénybesugárzás érte. A fénybesugárzás helyét pontokban kilyuggatott maszkkal kontrollálják.

¹⁶ SNP kimutatása chipen: Affymetrix 10K, 50K, 500K SNP genotyping kit: 10-, 50-, 500 ezer SNP kimutatása 2 db chipen



[Alternatív szöveg: 13. ábra: Oligonukleotidok a DNS chipen]

[Képaláírás: 13. ábra: Oligonukleotidok a DNS chipen¹⁷]

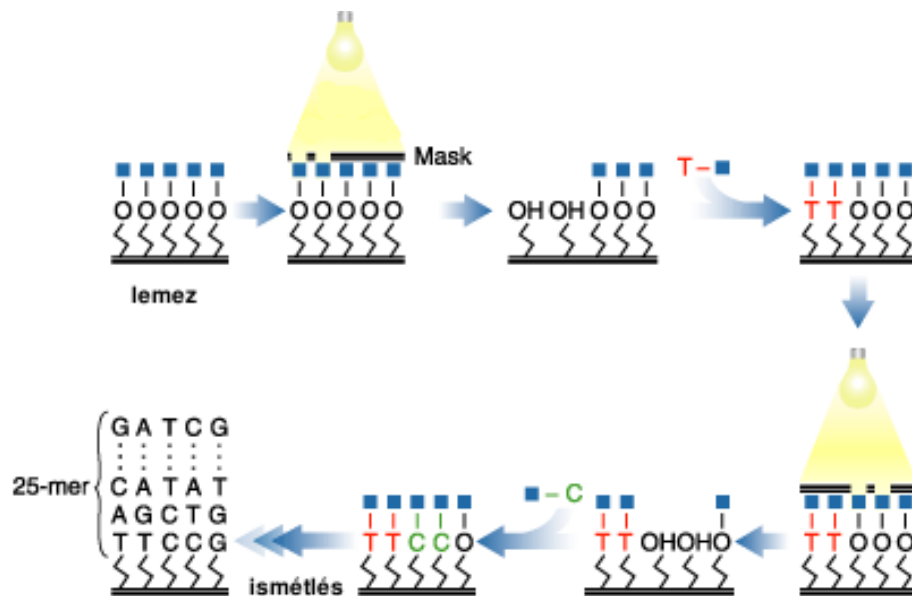


[Alternatív szöveg: 14. ábra: A jelölt DNS hibridizál a chipen lévő komplementerével]

[Képaláírás: 14. ábra: A jelölt DNS hibridizál a chipen lévő komplementerével¹⁸]

¹⁷ Az eredeti kép forrása: Affymetrix

¹⁸ Az eredeti kép forrása: Affymetrix



[Alternatív szöveg: 15. ábra: A DNS chip előállítása helyben szintetizált oligonukleotidokkal]

[Képaláírás: 15. árba: A DNS chip előállítása helyben szintetizált oligonukleotidokkal^{19]}

Már egyetlen microarray kísérlet is olyan sok eredménnyel szolgál, hogy bioinformatikai módszerek nélkül szinte lehetetlen lenne kiértékelni. A kiértékeléshez használhatjuk a chip gyártója által árusított szoftvert vagy az [R](#) programnyelvre írt ingyenes [Bioconductor](#) programot.

A microarray technológia elterjedését némiképp gátolja, hogy az eredmény – pl. a rengeteg egyszerre vizsgált tulajdonság miatt – nem minden esetben reprodukálható teljes mértékben.

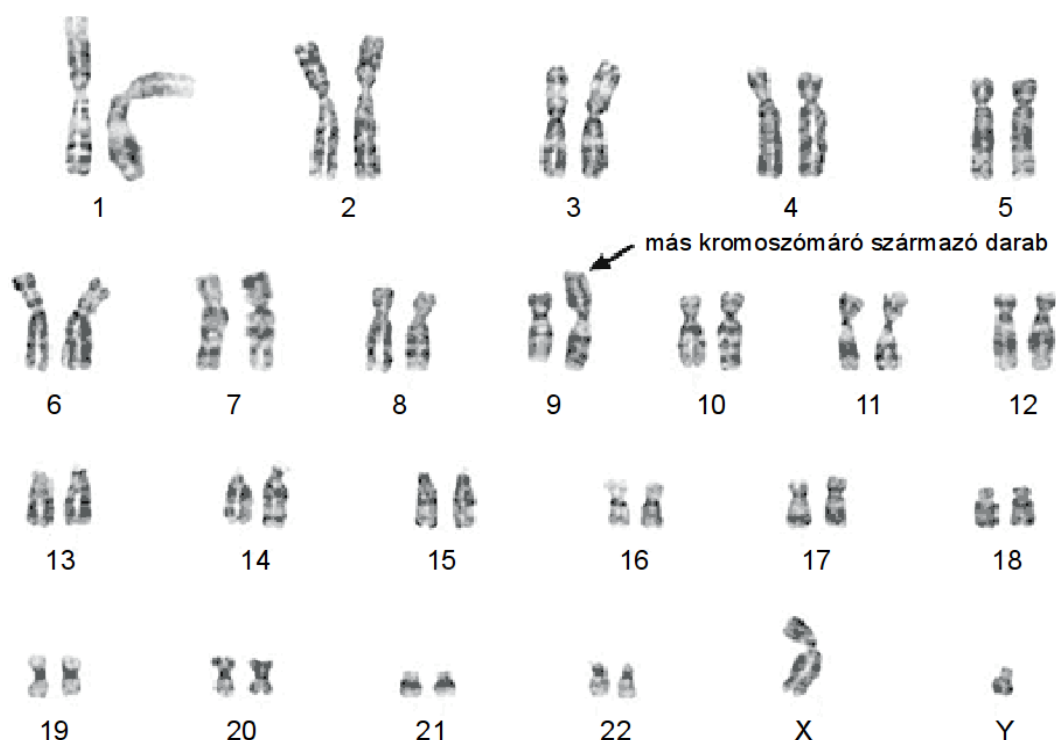
Kromoszóma vizsgálat

Ritkán ugyan, de előfordul, hogy sejtosztódás során hibás kromoszómák képződnek, és ezeket a javító mechanizmusok sem tudják helyrehozni. A kromoszóma rendellenességeknek nincs minden esetben fenotípusos megjelenésük. Léteznek ugyanis kiegyensúlyozott transzlokációk, amikor két kromoszóma szakasz kicserélődik egymással. Amennyiben a transzlokáció nem roncsolja a géneket és a szabályozási rendszerük sem sérül, ez az állapot semmilyen tünetet nem okoz, de termékenységügyi problémákhoz vezethet. Azonban gyakrabban fordul elő, hogy a transzlokáció vagy aneuploidia beteg fenotípust eredményez (pl. a 21. kromoszóma triszómiája okozza a Down-szindróma tünetegyüttesét). Amennyiben az egyik kromoszóma eltörik, és a letört rész elvész, súlyos fejlődési rendellenességek alakulnak ki, melyek nagy része a magzat elhalásához vezet.

¹⁹ Az eredeti kép forrása: [Affymetrix](#)

A kromoszómaszintű rendellenességeket kariotipizálással lehet kimutatni. A vizsgálat lényege, hogy speciális festési eljárásokkal láthatóvá és megkülönböztethetővé teszik a kromoszómákat. A kariotipizálás megmutatja a kromoszómák alaki és számbeli eltéréseit.

A **hagyományos kariotipizálást** egyszerű *Giemsa* festéssel végzik. Ez a DNS festék világosra és sötétre festődő, úgynevezett G-sávokból álló mintázatot hoz létre a kromoszómán. A mintázat jellemző a fajra. A mitózis metafázisában lévő teljes emberi kromoszóma készleten hozzávetőleg 850 sötét G-sáv azonosítható. A sávmintázatok – melyeket be is számoznak – szakaszokra osztják a kromoszómákat. A kromoszómák méret és sávmintázat alapján azonosíthatóak, csakúgy, mint a kromoszómák rendellenességei (16. ábra). A hagyományos kariotipizálás az esetleges inzerciákat, deléciókat, transzlokációkat 1000 kilobázis mérettől mutatja ki.

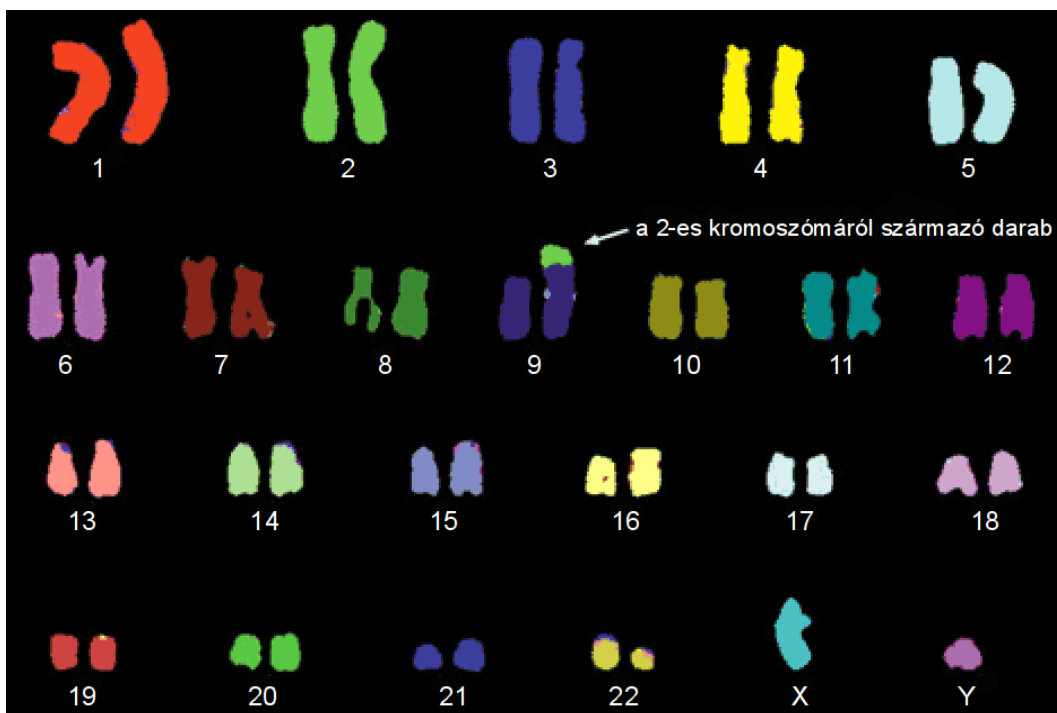


[Alternatív szöveg: 16. ábra: Kariotipizálás Giemsa festéssel]

[Képalírás: 16. árba: Kariotipizálás Giemsa festéssel: A 9. kromoszómán ismeretlen eredetű transzlokáció figyelhető meg.]

A kromoszóma rendellenességek vizsgálatának másik, pontosabb módja a **FISH**, vagyis a *Fluoreszcens In Situ Hibridizáció*. A FISH alapját a DNS azon tulajdonsága képezi, hogy a dupla szálú DNS-molekula szerkezete megfelelő körülmények között megbomlik és a meglazult kötések miatt a kettős spirál szétválik. Így az egyszálú DNS hozzáférhetővé válik az ugyancsak denaturált, fluoreszcens festékkel jelölt DNS-próbák számára. Ezek a DNS-próbák a genom egy-egy kis szakaszát jelölik meg. A target-DNS nemcsak tárgylemezre fixált kromoszómapreparátum lehet, de interfázisban lévő sejtek magjai, vagy akár szöveti metszetekben lévő sejtek magjai is. Attól függően, hogy mi a vizsgálat tárgya gén-, centromer- vagy kromoszómaspecifikus próbák állíthatók elő. Több színt alkalmazva, és keverve

multicolor FISH vizsgálatokat is végezhetünk, ahol UV fénnel megvilágítva minden kromoszómának más színe lesz (17. ábra). FISH-sel az inzerciók, deléciók, transzlokációk akár 1 kilobázis mérettől kimutathatók, ám az eljárás viszonylag bonyolult és drága: a metafázis, interfázis kenethez sejtenyészet kell, a detektáláshoz pedig speciális szűrőkkel ellátott mikroszkóp. Viszont diagnosztikailag megbízhatónak tekinthető a módszer.



[Alternatív szöveg: 17. ábra: Kariotipizálás multicolor FISH festéssel]

[Képaláírás: 17. ábra: Kariotipizálás multicolor FISH festéssel: A 9. kromoszómán 2-es kromoszóma eredetű transzlokáció figyelhető meg.]

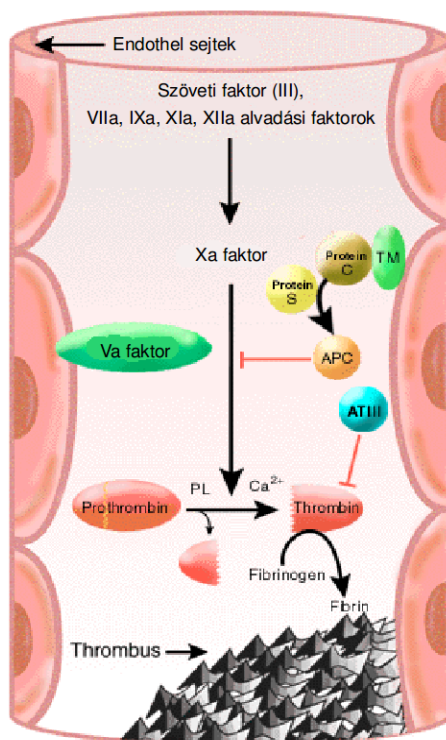
Példák öröklődő betegségekre

Az V véralvadási faktor Leiden-mutációja

A *V (ötös) faktor* (F5) a véralvadási kaszkád egyik fehérjéje, mely mind a belső- (*intrinsic*), mind a külső (*extrinsic*) úton beindult véralvadási láncban szerepet játszik. Ha a X faktor aktiválja az V faktort, akkor az beindítja a protrombin trombinná való alakulását, ami trombus képződéshez vezet. Hogy a trombus képződés kellő időben leálljon az aktivált V faktort az aktivált *C fehérje* (APC) hasítja.

Az V faktor trombofília, melyet a hollandiai Leiden városából írtak le először, egy genetikai eredetű véralvadási zavar. A véralvadási zavar kiváltó oka, hogy az aktivált V faktor ellenáll az aktivált C fehérje hasításnak (18. ábra). Az alvadási elősegítő faktorok bomlásának lassulása következtében a betegeknek fokozottan alvadásköny a vére, így trombózisra – azaz vérrögképződés okozta érelzáródásra – hajlamosak. A kórképet előidéző Leiden-mutáció egy G→A misszensz pontmutáció az

V faktor génjének 10. exonjában, amely Arg→Gln cserét eredményez az érett fehérje 506. aminosav pozícióján. A mutációt szenvedett aminosav pont a C fehérje hasítóhelyeinek egyikén található, így ezen a ponton a fehérje képtelen az V faktort bontani. Ezáltal a Leiden- mutációs V faktor bontása tízszerre lassabban megy végbe, mint a normál, vad típusú V faktor esetében. Ezért az V faktor mennyisége növekszik a keringésben. Így a magasabb trombin szint és egyéb aktivált koagulációs faktorok miatt előáll egy enyhe *hiperkoagulábilis* állapot. A betegnek pedig nagyobb valószínűséggel lesz mélyvénás trombózis.



[Alternatív szöveg: 18. ábra: Az V véralvadási faktor szerepe a véralvadásban]

[Képaláírás: 18. ábra: Az V véralvadási faktor szerepe a véralvadásban. Jelölések: fekete nyíl: aktiválás, piros vonal: inaktiválás, TM: trombomodulin, APC: aktivált protein C, PL: foszfolipid^{20]}

A Leiden-mutáció valószínűleg a XV. századi Európában jelent meg először. Elterjedésében segíthetett, hogy a középkorban még szelekciós előnyt is jelenthetett: az akkoriban nem ritka véres összecsapásokban, háborúkban a gyors véralvadás életet menthetett. Az Oszmán Birodalommal folytatott véres ütközetekre gondolva nem csoda, hogy a gén Magyarországon is gyakori, a mai magyar népesség 5-6%-a hordozza.

A Leiden-mutáció autoszómálikusan, recesszíven öröklődik²¹. Heterozigótia esetén – a vad típusú homozigótákhoz képest – 6-8-szor nagyobb a trombózisveszély. A Leiden-allélra homozigótáknál a

²⁰ Az eredeti kép forrása: NCBI, [Coffee Break](#) könyv [Mutations and blood clots](#) fejezete.

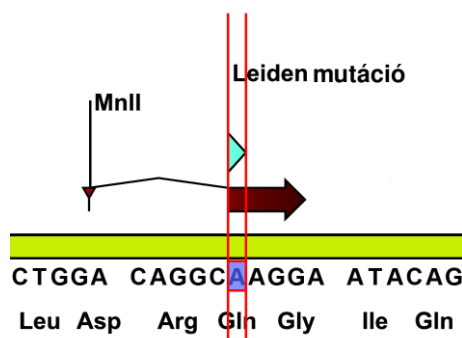
²¹ Ha a szülők egyike heterozigóta, akkor az utódok 50%-a heterozigóta. Ha a szülők egyike homozigóta, akkor az utódok 100%-a heterozigóta. Ha a szülők mindegyike heterozigóta, akkor 25% az esély, hogy a

trombózis veszély nyolcvanszor(!) magasabb, mint a vad típusú homozigótáknál. Mivel a Leiden-allél előfordulása elég gyakori a magyarországi populációkban – az öröklés lehetőségeinek kiértékeléséhez – a beteg egyén szűrése mellett, szükséges lehet a szülők tesztelése is. A trombózis veszélyt tovább növelheti a terhesség illetve a fogamzásgátlók alkalmazása is. A génhiba jelenleg nem gyógyítható. Leiden-mutáció esetén élethosszig tartó véralvadásgátló kezelésre lehet szükség.

A Leiden-mutáció kimutatása

Ha az embernek volt korábban mélyvénás trombózisa, embóliája vagy a családjában több trombózisos eset is előfordult, indokolt egy Leiden-mutációt kimutató tesztet csináltatnia. A mutációt genetikai és biokémiai tesztekkel is ki lehet mutatni. Biokémiai teszt segítségével kimutatható a nagyobb APC rezisztencia szint, de ezt egyéb mutációk is okozhatják. Genetikai teszttel pedig a konkrét mutáció is beazonosítható, így lehetővé válik a genetikai tanácsadás.

Az V faktor génje az ember 1. kromoszómájának *q* karján, a 23-as régiójában található. A kimutatásokat vérből vett mintából végzik, vagyis a komplett V faktor génnel dolgoznak, nem az mRNS-sel. Genetikai tesztet végezhetünk például RFLP-vel. Ugyanis a Leiden mutáció pont elrontja az V faktor génjében található *MnII* restrikciós enzim²² hasítóhelyét. A *MnII* egy érdekes restrikciós enzim, négy nukleotidot ismer fel: a CCTC-t vagy a GAGG-t, és ettől 7 bázispárra hasítja a DNS-t. A Leiden-mutáció pont egy *MnII* felismerőhelyen található. Ha mutáns a gén, akkor *MnII* emésztés után ez a hasítóhely egyben marad (19. ábra). Így a mutáció meglétét vagy hiányát a restrikciós enzimmel történő kezelés utáni gélelektroforézis egyértelműen mutatja.



[Alternatív szöveg: 19. ábra: A Leiden-mutáció helyén nem hasít az *MnII* restrikciós enzim]

[Képaláírás: 19. ábra: A Leiden-mutáció helyén nem hasít az *MnII* restrikciós enzim: A piros csíkokkal jelölt adenin a Leiden-mutáció (a vad típusban guanin lenne). A bordó nyíllal jelölt hely lenne a vad típusban az *MnII* restrikciós enzim felismerő helye, kis bordó háromszöggel jelölt pedig a hasító helye.]

Az V faktor Leiden mutációjának kimutatása allélspecifikus PCR reakcióval

A genetikai teszttel történő Leiden-mutáció kimutatásának másik lehetséges módja az allél specifikus PCR. Hogy a reakcióhoz primereket tervezzünk, meg kell találjuk a mutáció pontos helyét az V faktor génjében. A mutáció az érett fehérje 506. aminosavát érinti, mely pozíción a vad típusra jellemző

²² Leiden allélra homozigóta, 50%, hogy heterozigóta és 25%, hogy vad típusú homozigóta lesz az utód.
Az enzim a *Moraxella nonliquefaciens* baktériumból származik.

arginin helyett a Leiden-mutánsban glutamin található. Kodonok szintjén az arginint kódoló CGA-ból lesz glutamint kódoló CAA, vagyis a mutáció a második kodon pozíciót érinti.

A mutáció az V faktor génjének 10. exonjában található. Hogy megtudjuk, pontosan hányadik pozíción előbb célszerű az mRNS-ben megkeresnünk, hiszen ezt könnyebben össze tudjuk illeszteni a fehérje szinten rendelkezésünkre álló pozícionális információval. (Az NCBI [OMIM](#) adatbázisban megadott 1691. mRNS pozíció történeti okokból kifolyólag hibás. Vagyis egy régebben bekerült szekvencia pozíciójára vonatkozik, ám akkor még nem tudták pontosan, hogy hol kezdődik az átíródás.²³) Mivel az NCBI adatbankban lévő mRNS-nek nevezett szekvenciák az egész átíródó régiót tartalmazzák, ezért a GenBank-ben található [NM_000130-ös számú mRNS rekord](#) alapján következőképpen tudjuk kiszámolni a mutáció pozícióját:

$$230 + (505 \times 3) + 1 = 1746$$

A képletben a 230 az érett peptid kezdete (nukleinsavban megadva). Az 505 a mutáció előtti utolsó aminosav helye, ezt a tripletek miatt szorozzuk hárommal. A +1 pedig a 2. kodonpozíció miatt szükséges. A Leiden mutáció tehát az 1746. mRNS pozíción található.

Ha kimásoljuk az 1727-1746. pozícióig terjedő régiót – megjegyezve, hogy ennek a 20 hosszú oligonukleotid régiónak pont a végén található a Leiden-mutáció esetleges helye – és ezt az oligonukleotidot megpróbáljuk azonosítani (illeszteni) az emberi genomban található génszekvencián, akkor megtudhatjuk, hogy a Leiden-mutáció az V faktor *génjében* a 36722. pozíciót érintheti (lásd 20. ábra).

kivágott mRNS darab	1	agcagatccctggacaggc	20
gén részlet	36703	AGCAGATCCCTGGACAGGC	36722

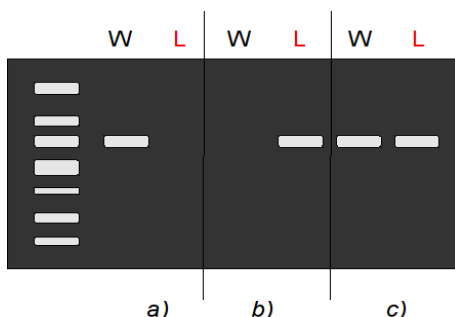
[Alternatív szöveg: 20. ábra: Leiden-mutáció az V faktor génjében]

[Képaláírás: 20. ábra: Leiden-mutáció az V faktor génjében]

Ezek után primereket kell tervezni az allélspecifikus PCR-hez erre a génrégióra. Az egyik primert úgy tervezzük, hogy a 36722. pozíció a primer 3' végén legyen (az 5' végen nem lenne annyira specifikus). Ebből a primerből kell egy vad és egy Leiden-mutáns típus is. A másik primer ettől tetszőleges, 150-

²³ Korábban a cDNS könyvtárt (pl. májból) izolált mRNS-ből készítették reverz transzkripcióval. Ehhez az mRNS-en lévő poliA szignált használták. Az oligo dT primer hozzákapcsolódik a poliA farokhoz. Ezt a részt (kettős szálú szakasz (mRNS és oligo dT)) felismeri a reverz transzkriptáz és másol egy DNS szálát, amiből a cDNS lesz. De az enzim nem biztos, hogy elér az mRNS "elejére" (5' végéhez), mert lehet, hogy nincs elég ideje. Emiatt a cDNS 5' vége bizonytalan. Az a cDNS (mRNS), amivel eredetileg kiszámolták a Leiden-mutáció helyét nem tartalmazta a valódi mRNS elejét. Ez volt az eredeti NCBI GenBank rekord, melynek az elejétől számolva a mutáció az 1691. pozícióban volt. Később, a Humán Genom Program (és az mRNS-ek alaposabb vizsgálata) miatt kiderült, hogy az igazi mRNS 56 nukleotiddal hosszabb, mint az első idevágó GenBank rekord. A helyes változat (amelyiket most már a genom program és más kísérletek is megerősítettek) esetében a mutáció az 1746-os pozícióban van.

1000 bázisnyira helyezkedik el. Az allélspecifikus PCR-t először a vad típusú, majd a mutáns primerrel (és azonos párjukkal) végezzük el. Az eredményt géltre visszük (21. ábra). Ha csak a vad típusú primerrel kaptunk eredményt, akkor a vizsgált személy erre a betegségre nézve egészséges volt; ha csak a mutáns primerrel, akkor homozigóta Leiden-mutáns; ha pedig mindkét primerrel, akkor heterozigóta.



[Alternatív szöveg: 21. ábra: A Leiden-mutáció kimutatása PCR-rel]

[Képaláírás: 21. ábra: A Leiden-mutáció kimutatása PCR-rel. A gélelekrtoforézis eredmény rajza: a) egészséges minta; b) Leiden homozigóta minta; c) heterozigóta minta. W: vad típusú primer; L: Leiden-mutációs primer]

Primer tervezés a Leiden-mutáció allélspecifikus PCR-rel történő kimutatásához

1. Internet böngésző programban nyissuk meg az NCBI oldalát: www.ncbi.nlm.nih.gov. Az NCBI GenBankban (Nucleotide) a *coagulation factor V* keresőszavak használatával és a Homo sapiens szűkítéssel (jobb oldalon: *Top organisms*) keressük meg a megfelelő mRNS és genomi DNS (gén) rekordokat, és és nyissuk meg őket külön lapokon:
Homo sapiens coagulation factor V (proaccelerin, labile factor) (F5), mRNA; [NM_000130](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclom/000130)
Homo sapiens coagulation factor V (proaccelerin, labile factor) (F5), RefSeqGene on chromosome 1, [NG_011806](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclom/011806)
2. Az mRNS-ben keressük meg az 1746. nukleotidot, jelöljük ki ezt, és az előtte lévő 19 bázist. Az oligonukleotidot másoljuk be egy text file-ba, és mentjük el *Mut_place.fasta* néven.
3. A lementett *Mut_place.fasta* file-ból hozzunk létre *fasta* szekvencia formátumot, úgy hogy az elejére írjunk egy fejléct: *>Mut_place*. Utána sortörés (enter), és mentjük le.
4. A gén szekvenciát is mentjük le *fasta* formátumban (jobbra fent: Download → FASTA), *VFactor_gene.fasta* néven.
5. Az [EMBOSS](http://emboss.bioinformatics.nl) bioinformatikai programcsomag segítségével keressük meg a génben azt a pozíciót, melyet a Leiden-mutáció érinthet: Nyissuk meg az EMBOSS online verzióját pl. a emboss.bioinformatics.nl honlapon. A bal oldali menüben található ALIGNMENT LOCAL csoportból kattintsunk a *wordmatch*-re. 1. szekvenciának töltsük fel a *Mut_place.fasta*-t, 2-nak a *VFactor_gene.fasta*-t. A kereső szó hosszát (*Word size*) állítsuk 20-ra. Az illesztés formájának (*Alignment format*) az *old EMBOSS format*-ot válasszuk. Nyomjuk meg a *run wordmatch* gombot. A kapott eredményből látszik, hogy a genomi szekvenciában a 36722. nukleotid a Leiden mutáció helye.
6. Nyissuk meg a Primer3Plus on-line primer-tervező programot a www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi webhelyről és töltsük be a *VFactor_gene.fasta* szekvenciát (22. ábra).

- 6.1. Bal oldali primernek adjuk meg a CAGATCCCTGGACAGGCCG szekvenciát (*Pick left primer or use left primer below*). Melynek az utolsó bázisa esik majd a gén 36722. nukleotidjára.
- 6.2. Az általános beállítások (*General Settings*) fülénél írunk be egy nagyobb – gélelektroforézissel könnyebben kimutatható – termék méretet (*Product Size Ranges: 501-600*). A primer-tervezés elindításához nyomjuk meg a *Pick Primers* gombot (zöld gomb, jobb oldalon felül).
- 6.3. A kapott alternatív eredmények közül a program a legjobbat jeleníti meg a lap tetején. Nézzük meg, hogy a két primer olvadáspontja mennyire tér el egymástól, illetve, hogy a megadott baloldali primer megfelelő-e. Az oldalt legörgetve a szoftver kékkel kiemelve jelzi a szekvenciában a bal- és sárgával a jobb primer helyét. További megfelelő primereket és statisztikát a lap alján találunk.
- 6.4. **Ctrl+C** billentyűkkel másoljuk ki a jobb primer szekvenciáját (*Right Primer 1*) a vágólapra. A **< Back** gombbal menjünk vissza, és menjünk a főablakba (*Main*). **Ctrl+V**-vel illesszük be a jobb primer szekvenciáját a jobb primer helyére (*Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand)*). **Ctrl+C**-vel másoljuk ki a bal primer szekvenciáját a **Ctrl+F**-fel előhívott böngésző-keresőablakba, és üssünk entert. Hogy a Leiden-mutációnak megfelelő primerek olvadási hőmérsékletét is megtudjuk, a gén szekvenciában megtalált oligonukleotid első bázisát és a bal primer első bázisát változtassuk G-ről, A-ra és nyomjuk meg a *Pick Primers* gombot.

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

Task: Detection Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. [Pick Primers](#) [Reset Form](#)

Main **General Settings** **Advanced Settings** **Internal Oligo** **Penalty Weights**
Sequence Quality

Sequence Id:

[Paste source sequence below](#) Or upload sequence file: [Tallózás...](#) [Upload File](#)

```
GCAAGAACTGCAGGGGAGGAGGACGCTGCCACCCACAGCCTCTAGAGCTCATTGCAGCTGGGACAGCCCG
GAGTGTGGTTAGCAGCTCGGCAAGCGCTGCCAGGTCCTGGGGTGGTGGCAGCCAGCGGGAGCAGGAAAG
GAAGCATGTTCCAGGCTGCCACGCTCTGGGTCCTGGTGGTCTTGGGCACCAAGCTGGGTAGGCTGGGG
GAGCCAAGGGACAGAAGCGGCACAGCTAAGGCAGTTCTACGTGGCTGCTCAGGGCATCAGTTGGAGCTAC
CGACCTGAGCCCAAACTCAAGTTTGAATCTTTCTGTAACCTCCTTTAAGAAAAATGTCTACAGAGAGT
ATGAACCATATTTAAGAAAGAAAAACCAATCTACCAATTTAGGACTTCTTGGGCTACTTTATATGC
TGAAGTCGGAGACATCATAAAAGTTCACTTTAAAAATAAGGCAGATAAGCCCTTGAGCATCCATCCTCAA
GGAATTAGGTACAGTAAATATCAGAAGGTGCTTCTTACCTTGACCACACATTCCCTGCGGAGAAGATGG
ACGACGCTGTGGCTCCAGGCCGAGAATACACCTATGAATGGAGTATCAGTGAGGACAGTGGACCCACCCA
TGATGACCCCTCATGCCACACACATCTATTACTCCATGAAAACTGATCGAGGATTTCAACTCGGGG
CTGATTGGGCCCTGCTTATCTGTAAAAAGGGACCCCTAAGTGGGTGGGACACAGAAGACGTTTGACA
AGCAATCGTGCTACTATTGCTGTGTTGATGAAAGCAAGAGCTGGAGCCAGTCATCATCCCTAATGTA
CACAGTCAATGGATATGTGAATGGGACAAATGCCAGATATAACAGTTTGTGCCATGACCACATCAGCTGG
```

Mark selected region:

Excluded Regions: < >
Targets: { }
Included Region: { }

☒ Pick left primer or use left primer below. ☐ Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below. ☒ Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand).

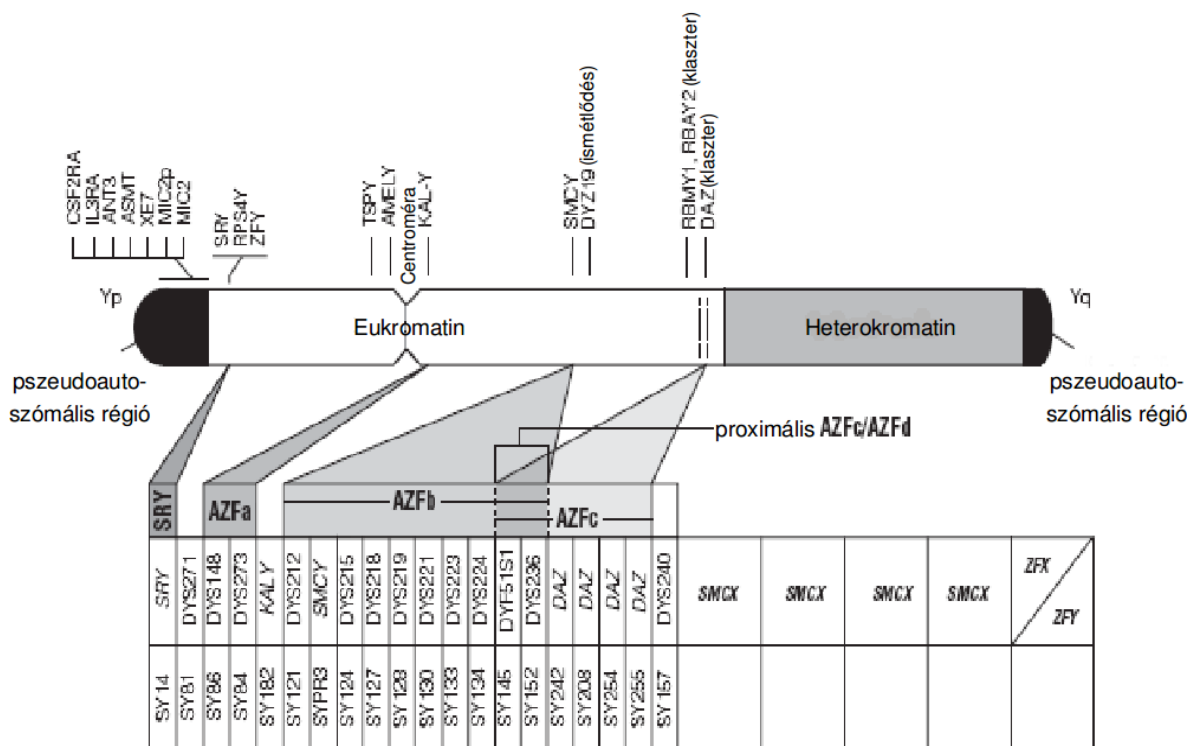
[Alternatív szöveg: 22. ábra: A Primer3Plus szoftver kezelőfelülete]

[Képaláírás: 22. ábra: A Primer3Plus szoftver kezelőfelülete]

Y kromoszóma mikrodéléció

A WHO²⁴ felmérése szerint a reprodukív korban lévő párok 15-20%-a meddőnek tekinthető, vagyis esetükben két évi próbálkozás után sem jön létre terhesség. A meddőség nem csak a nők betegsége, az esetek kb. 40-50%-ában a férfi felelős a gyermektelenségért. A kutatók minden ilyen esetben megpróbálják meghatározni a spermium képzés rendellenességének okát. Fiziológiai okok hiányában felmerül a genetikai rendellenesség lehetősége. A nemi kromoszómák számbeli eltérésén kívül, az Y kromoszóma szerkezeti rendellenességei is okozhatják a zavart. Az Y kromoszóma nem szerkezeti sajátosságából adódóan relatív gyakran fordulnak elő rajta hosszabb-rövidebb DNS szakaszt érintő deléciók. Amennyiben ezek a deléciók az úgynevezett AZF (AZF: Azoospermia²⁵ Faktor, 23. ábra) régiókra esnek, a hímivarsejt képzés zavart szenved. Az AZF régiókat *AZF_a*, *AZF_b*, *AZF_c* és *proximális AZF_c* vagy *AZF_d*-nek nevezik, melyek az Y kromoszóma hosszú karján, a 23. ábrán látható módon helyezkednek el. A spermatogenezisben fontos szerepet játszó géneket (pl. a *DAZ* = *Deleted in Azoospermia* gén) tartalmazó a AZF régiók részleges, vagy teljes hiánya következtében a hímivarsejtek termelődése és érése különböző mértékben károsodik. Ugyan az itt található gének pontos szerepe még nem ismert, az infertilis (meddő) férfiak 7-15%-ban, míg az azoospermias férfiak 70-80%-ban találtak deléciót valamely AZF régióban. Az *AZF_a* régió deléciója esetén a páciensek 75 %-ánál *Sertoli cell only* szindróma, 25 %-ánál parciális érési gátlás figyelhető meg. Az ilyen betegek nem, vagy csak csökkent mértékben képesek egészséges spermiumokat létrehozni. Az *AZF_b* és *AZF_c* régiók deléciója esetén azoospermia vagy oligozoospermia (csökkent a spermium termelés) figyelhető meg. Az *AZF_d* hiánya esetén az azoospermiaától kezdve az abnormális morfológiával társuló normospermias állapotig számos variáns kialakulhat. A több AZF régiót érintő deléciók súlyosabb tünetekkel járnak.

Az asszisztált reprodukciót igénybevevők betegeknél (vagyis a lombik-bébi programban résztvevőknél) a mutáció átörökökíthető. A nem mozaikos Y kromoszóma mikrodéléciót hordozó férfiak fiai a mutációt az esetek 100%-ában öröklék. A párnak ajánlatos genetikai tanácsadáson részt venni. Az Y mikrodéléciót hordozó apák, valamint a nem tisztázott okok miatt infertilis apák fiait is vizsgálni



kell.

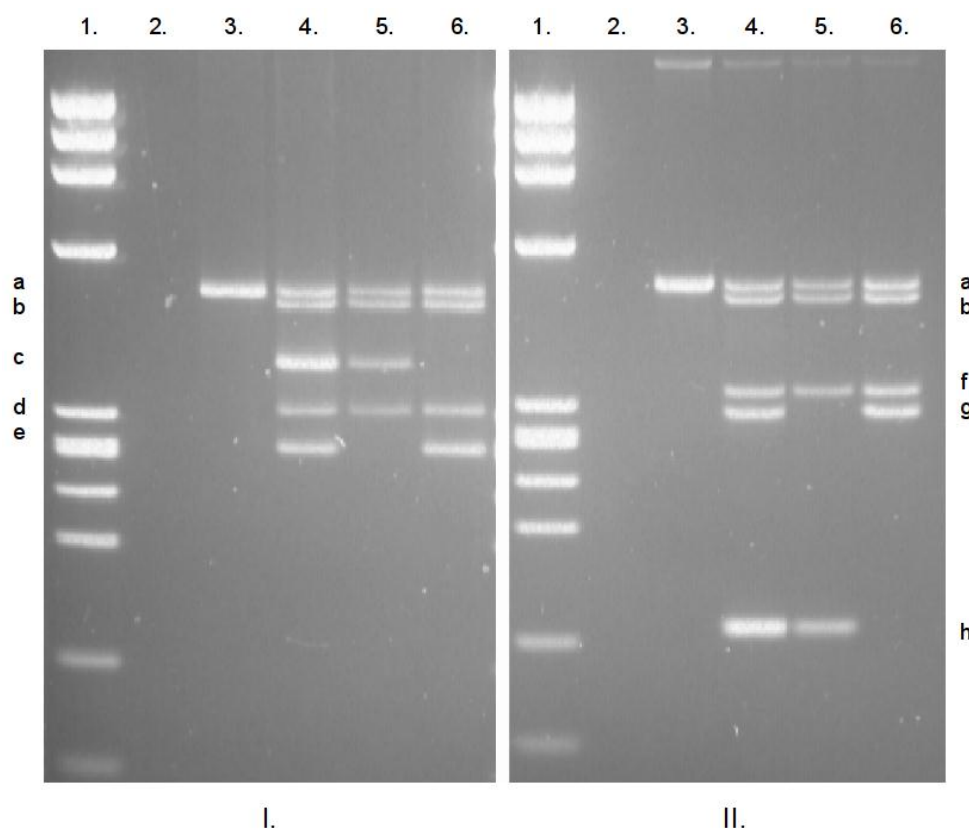
[Alternatív szöveg: 23. ábra: Az Y kromoszóma mikrodeléciói]

[Képaláírás: 23. ábra: Az Y kromoszóma mikrodeléciói]

Y kromoszóma mikrodeléció kimutatása

Az Y kromoszóma mikrodeléció vizsgálatát minden azoospermias beteg esetében, valamint a férfi infertilitása miatt *in vitro* fertilizációra jelentkező párok férfi tagjánál ajánlott elvégezni. A vizsgálat során szájnyalhártyából vett mintából az AZFa, -b és -c régiók ismert szekvenciájú részeit amplifikálják multiplex PCR módszerrel. Az ismert szekvenciákat több független STS hely jelenti. Az STS-ek jelenléte vagy hiánya egyértelműen bizonyítja a vizsgált régió épségét vagy delécióját. A PCR eredmény alapján megállapítható, hogy van-e olyan Y kromoszóma mikrodeléció, mely a meddőséget megmagyarázza, illetve ha van, akkor melyik AZF régiót érinti. Vagyis, ha az amplifikáció sikertelen, igazolható az adott régiót érintő mikrodeléció. Attól függően, hogy a deléció milyen terjedelmű, és melyik AZF régióra esik, a hímvarsejtképződés különböző mértékben lehet károsodott, s ennek megfelelően különféle megoldások léteznek arra, hogy a meddőséget orvosolják. Ha deléció kimutatható, elkerülhetők a felesleges műtéti beavatkozások, gyógyszeres kezelések.

A multiplex PCR reakciót úgy tervezzük meg, hogy azzal kimutatható legyen az AZFa, -b és -c régió, az SRY (tesztisz meghatározó faktor) és a ZFX (*Zink Finger* protein) gén. Az AZF régiókban a következő STS-eket vizsgálhatjuk: AZFa: SY84, SY86; AZFb: SY127, SY134; AZFc: SY254, SY255 (mindkettő a *DAZ*, *Deleted in Azoospermia* génben van). Ezen STS markerekkel, multiplex PCR segítségével a 3 régió valamelyikére szűkíthető a deléció és további STS markerek használhatók a régió belüli deléció térképezéséhez. Minden STS markerre primert tervezünk (vagy készen vesszük). Az SRY gén a három AZF régió kívül található, ezt belső DNS kontrollként alkalmazzuk, amely azt igazolja, hogy egyáltalán volt Y kromoszóma a mintában. A ZFX egy az X kromoszómára jellemző gén. Pozitív külső kontrollnak egy fertilis férfi DNS-ét analizáljuk. Negatív kontrollként pedig egy nő DNS-ét (melyen biztosan megtalálható a ZFX régió), illetve egy DNS nélküli mintát használunk. Egy minta akkor tekinthető pozitívnak egy adott STS-re nézve, ha a PCR termék – a rá jellemző méretnek megfelelő helyen – jelen van az agaróz gélen (24. ábra, 1. táblázat).



[Alternatív szöveg: 24. ábra: Y kromoszóma mikrodélécio két multiplex PCR vizsgálati eredményei]

[Képaláírás: 24. ábra: Y kromoszóma mikrodélécio két multiplex PCR vizsgálati eredményei: Minták: 1.: méret marker; 2.: víz; 3.: nő; 4.: egészséges férfi; 5.: férfi, hiányzó AZFb régióval; 6.: férfi, hiányzó AZFc régióval.²⁶ További magyarázatot lásd az 1. táblázatban.]

1. táblázat: Magyarázat a 24. ábrához

<i>Ábra</i>	<i>Régió</i>	<i>STS</i>	<i>hossz (NT)</i>
I. a, II. a	ZFX	4	495
I. b, II. b	SRY	GDB: 309125	472
I. c	AZFc	sY254	400
I. d	AZFa	sY84	320
I. e	AZFb	sY127	274
II. f	AZFa	sY86	326
II. g	AZFb	sY134	301
II. h	AZFc	sY255	126

²⁶ Az eredeti ábra forrása: Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Müller CR & Vogt PH (1999) [Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions](#). *Int. J. Androl.* **22**: 292–299.

***C. elegans* genetika – genetikai útvonalelemzés**

Dr. Vellai Tibor egyetemi docens és Kovácsné Dr. Sigmond Tímea egyetemi tanársegéd

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

A gyakorlat célja

A *Caenorhabditis elegans* fonalféreg, mint genetikai modellorganizmus bemutatása, hímnős (önmegtermékenyítő hermafrodita) és hím egyedek elkülönítése, valamint morfológiai mutánsok felismerése. Kiemelt szerepet kap a kettős mutáns (episztázis) analízis, amely során a hallgatók genetikai útvonalak komponensei között ható szabályozási kapcsolatokat („ki szabályoz és kit szabályoznak”, azaz mely komponens van *upstream* – „elől” az útvonalban – és mely komponens hat *downstream* – „hátral” – az útvonalban) határoznak meg.



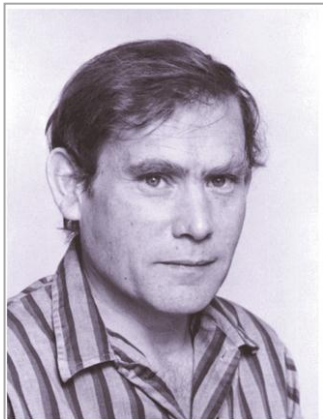
1. **ábra.** A *Caenorhabditis elegans* fonalféreg. Fénymikroszkópos felvétel egy hermafrodita (hímnős) felnőtt állatról (középen). Az állat feji (anterior) végén (alul) jól látható a garat két bulbusza és a szájnyílás. A poszterior vég (felül) cérnaszerűen elvékonyodik. A testen végighúzóódó sárga „szemcsék” a bél autofluoreszcens granulumai.

A *C. elegans* általános jellemzése

A *Caenorhabditis elegans* mérsékelt égövi, talajban szabadon élő, baktériumokat fogyasztó, 1,2 mm hosszúságú fonálféreg (**1. ábra**). 25°C-on a megtermékenyített petesejt 52 óra alatt fejlődik ki ivarérett felnőtté. A felnőtt állatok 4-6 napig képesek szaporodni, majd a reprodukzív időszak után még körülbelül 7-10 napig élnek. Egy hermafrodita állat viszonylag nagyszámú (közel 250) utódot képes létrehozni. Kis testméretnek köszönhetően a mikroorganizmusokhoz hasonlóan műanyag Petri lemezek, átlátszó agar felületen (NGM – *Nematode Growth Medium*) lehet laboratóriumi körülmények között nagy számban fenntartani (Brenner, 1974). A fenntartás során táplálékként *E. coli* OP50 baktérium törzset használnak.


A *C. elegans* fonálféreg faj az 1970-es évek közepétől vált a genetikai analízis egyik közkedvelt genetikai modell rendszerévé (Brenner, 1974). Sydney Brenner (**2. ábra**) eredetileg fejlődésgenetikai problémák megválaszolására és az idegrendszer működésének tanulmányozására választotta ki ezt az élőlényt (**3. ábra**).

2. **Ábra. Sydney Brenner (1963).** „*I would like to tame a small metazoan...*” (szeretnék megszelídíteni egy kicsi állati szervezetet). Brenner választotta a *C. elegans*-t genetikai modellszervezetnek. Ma több mint 1000 *C. elegans* laboratórium található a különböző országokban.



Brenner's letter to Max Perutz
(1963)

"Dear Max,
It is now widely realized that nearly all the "classical" problems of molecular biology have either been solved or will be solved in the next decade. The entry of large numbers of American biochemists into the field will ensure that all the chemical details of replication and transcription will be elucidated. Because of this, I have long felt that the future of molecular biology lies in the extension of research to other fields of biology, notably development and the nervous system."
....
-Sydney Brenner



Max Perutz

3. **Ábra. Brenner levele Max Perutz-hoz, az MRC (Medical Research Center, Cambridge, UK) akkori igazgatójához.**

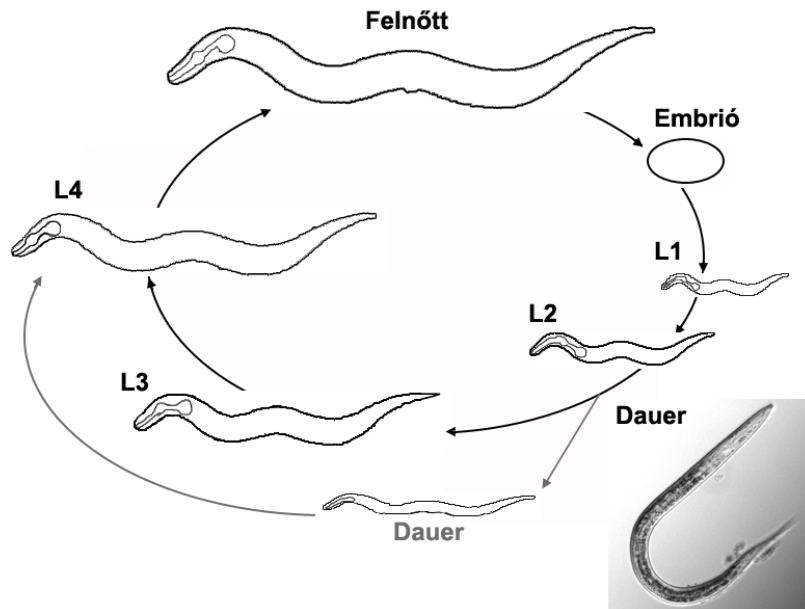
Az állat testét alkotó közel ezer szomatikus sejt közül

302 idegsejt, amelyek közel 5000 szinapszist hoznak létre (Ward és mtsai., 1975). Idegrendszere elég

komplex ahhoz, hogy az állat képes legyen a tanulásra, bonyolult mozgási folyamatokra, viselkedésre és érzékelésre. Ugyanakkor elegendően egyszerű ahhoz, hogy laboratóriumi körülmények között egyedi sejtszinten is tanulmányozhatóak legyenek ezek a biológiai folyamatok genetikai eszközökkel.

A *C. elegans* fejlődésmenete

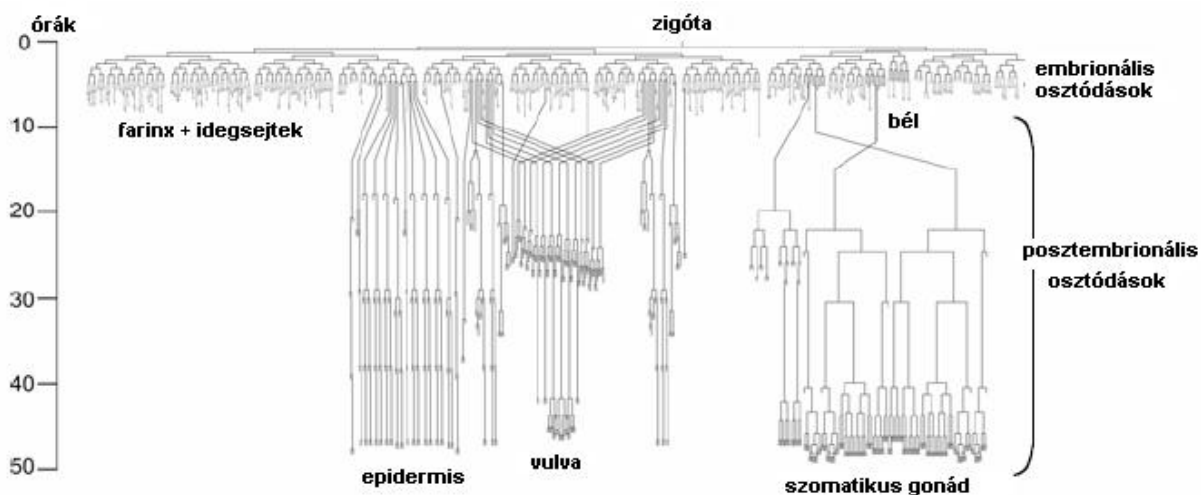
Az embriogenezist követően a *C. elegans* 4 lárvastádiumon (L1-L4) keresztül fejlődik felnőtt állapotba (4. ábra). A lárvastádiumok között az állat egy-egy vedlési (un. *lethargus*) stádiumon megy keresztül. Lethargus állapotban az állat nem mozog, nem táplálkozik, garatműködése leáll. Az új kutikula kialakulása után a feji részen megreped a régi kutikula, és az állat kicsúszik belőle. Nagy populáció sűrűség és/vagy táplálékhiány esetén az állatok egy alternatív „kitartó forma” (un. dauer) lárvastádiumba fejlődnek (4. ábra). A dauer lárvastádium az L1 stádiumban érzékelt ingerek, mint pl. a túlnépesedés (dauer feromon), táplálékhiány, vagy magas hőmérséklet hatására alakul ki (Riddle és Albert, 1997). A dauer fejlődést iniciáló ingereket az állat a fején lévő kemoreceptorokon keresztül érzékeli. A dauer lárvát a fejlődése során makroerg molekulákat halmoz fel, dauer lárvaként pedig nem táplálkozik, hanem tartaléktápanyagait égeti (szemianabiózis). Ez a fejlődési forma rendkívül ellenálló, kutikulája vastag, majdnem teljesen zárt. A dauer lárvák akár 6 hónapig is képesek életben maradni, miközben biológiai értelemben nem öregszik (*non-aging* fejlődési forma). Kedvező körülmények hatására a dauer lárvák L4 stádiumú lárvává alakulnak (*recovery*), majd folytatja a reprodukív egyedfejlődési ciklust.



1. Ábra. A *C. elegans* fejlődésmenete. Az embrionális fejlődést követően az állat 4 lárvastádiumon keresztül éri el a felnőtt kort. Kedvezőtlen körülmények egy alternatív larvaforma, az ún. dauer lárvát alakul ki, amely akár 6 hónapig is életképes, és a kedvezőtlen körülmények átvészelésére specializálódott (a dauer lárvát erős, detergentekkel szemben ellenálló kutikula védi; nem táplálkozik; alig mozog; nem növekszik és alig metabolizál). A kép alsó sarkában egy dauer lárvát fénymikroszkópos képe látható. Az állat kb. akkora, mint egy L3 stádiumú lárvát. A belében felhalmozódó lipidcseppek miatt a dauer lárvát sötét színű.

Sejtvonalak

A *C. elegans* sejtjeinek leszármazási sorsa invariáns és meghatározott (5. ábra). Áttetsző, fénymikroszkóp alatt transzpárens testfalának köszönhetően - máig egyedülként a soksejtűek körében - 1983-ra meghatározásra került az állat teljes sejtleszármazási térképe (*cell lineage*), azaz minden testi sejt születése, osztódási síkja, és további egyedfejlődési sorsa (Sulston és Horvitz, 1977). Ez a sejtors térkép adatbázisból elérhető.

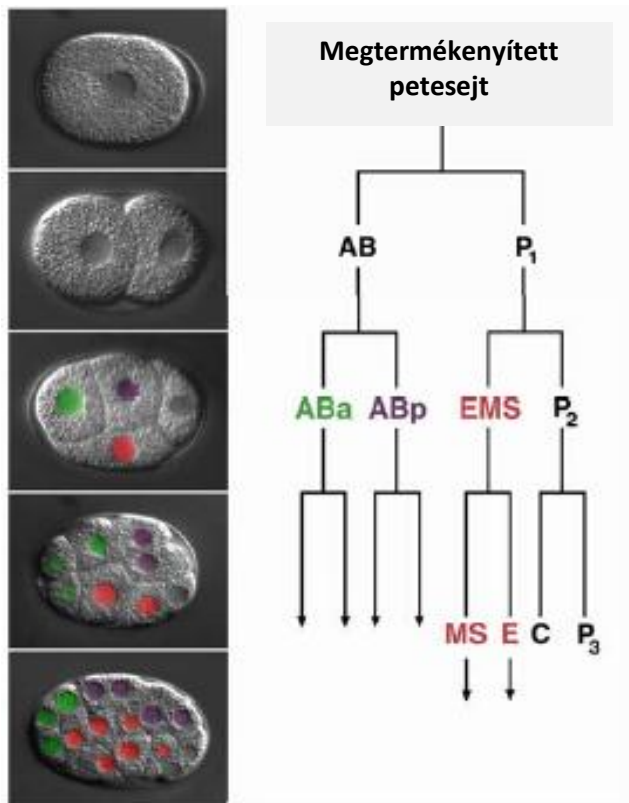


5. ábra. A *C. elegans* sejtors térképe. Baloldalon az egyedfejlődés órákban megadott stádiumai (25°C-on). Kis vonal jelzi a sejtleszármazási fa tetején a zigótát, majd alatta újabb vonalak jelzik a 2-sejtes, 4-sejtes ... stádiumokat. Számos szövet (pl. a vulva szövet) csak az későbbi lárva stádiumokban alakul ki.

Az állat egyedfejlődése egyedi sejtszinten meghatározott Nomarski (DIC, *differential interference contrast*) optikával felszerelt fénymikroszkópia segítségével (6. ábra). Ez alapján megállapították, hogy a szövetek egy része csak egy adott embrionális alapító sejtől (blasztéma) származnak, míg más szövettípusok kialakításában többféle alapító sejt vesz részt (7. ábra). A bélszövetet felépítő 20 sejt például mind az embrionális E sejt leszármazottai.



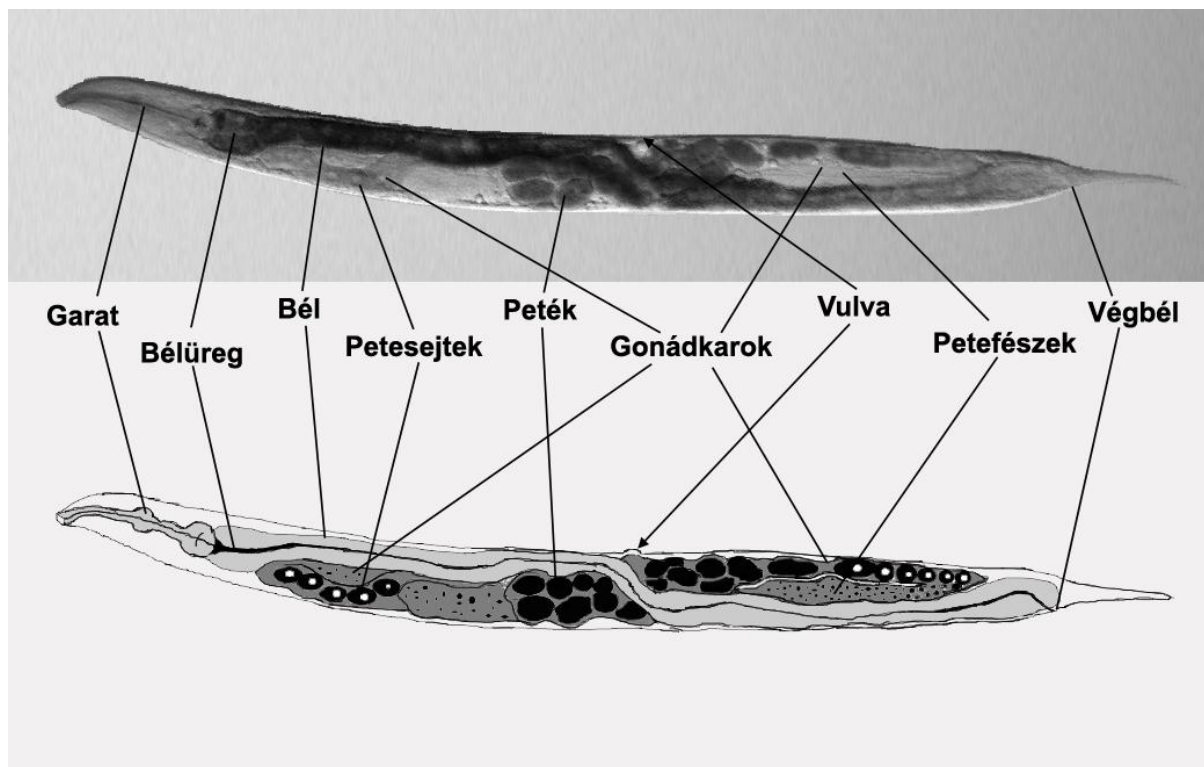
6. ábra. A *C. elegans* embrionális egyedfejlődésének diszkrét stádiumai. Bal oldalon a megtermékenyített petesejt, jobb oldalon pedig a peteburokból kikelő L1 lárva képe látható. Ezekben a stádiumokban minden egyes szomatikus sejt egyedileg azonosítható. Ez lehetővé tette, hogy az állat egyedfejlődése egyedi sejtszinten vizsgálható legyen.



7. ábra. A blasztomérák (alapító sejtek) kialakulása a *C. elegans* korai embriógenézise során. A zigóta osztódásával egy anterior AB és egy poszterior P_1 sejt képződik (2-sejtes embrió). A P_1 sejt további osztódásával jön létre a csíravonal (P sejt leszármazottak; P_2 , P_3 , ...). Az AB sejt osztódásával egy anterior Aba és egy poszterior ABp sejt képződik. A sejtek nevét a sejtmagok megfelelő színei jelölik. Az E sejt hozza létre a felnőtt állat 20 belsejtjét. A felnőtt idegrendszer kialakításában viszont többféle blasztéma (pl. Aba, ABp és MS) vesz részt.

A *C. elegans* anatómiája

A felnőtt állat testfelépítése a többi nematodához hasonlóan tagolatlan, henger alakú, a farki végen elkeskenyedő (**8. ábra**). A hermafrodita *C. elegans* egyedfejlődése során összesen 1090 testi sejt keletkezik, amelyből 131 apoptózissal (programozott sejthalál) elpusztul az embrionális vagy lárvális fejlődési szakaszokban (Sulston és Horvitz, 1977). A kifejlett hermafroditát végül 959 testi sejt alkotja. A hímek a hermafroditáknál fragilisabb felépítésűek, felnőtt korban 1031 testi sejtrel rendelkeznek.



8. ábra. A hermafrodita testfelépítése. A felnőtt állat testfelépítése a többi nematodához hasonlóan tagolatlan, henger alakú, a farki végen elkeskenyedő. Az emésztő rendszert az izmos garat, az

egyenes lefutású bélcső és a végbél alkotja. Az ivarszerv az „U” alakú gonádkarokból és a test középtáján nyíló vulvából áll.

Az állat emésztőrendszere kétnyílású. A szájnyílás az izmos falú garatban folytatódik, amit az egyenes lefutású bél követ. Hermafroditákban a végbél a farok előtt végződik, hímekben a spermavezetékkel együtt a pározászlóban végződik. A hermafroditák gonádja páros „U” alakú szerv. A petesejtek a spermatékában termékenyülnek meg, a peték lerakásig az uterusban tárolódnak. A vulva az állat hasának középtáján nyílik. Hímekben a gonád egykarú.

A *C. elegans* ivari dimorfizmusa

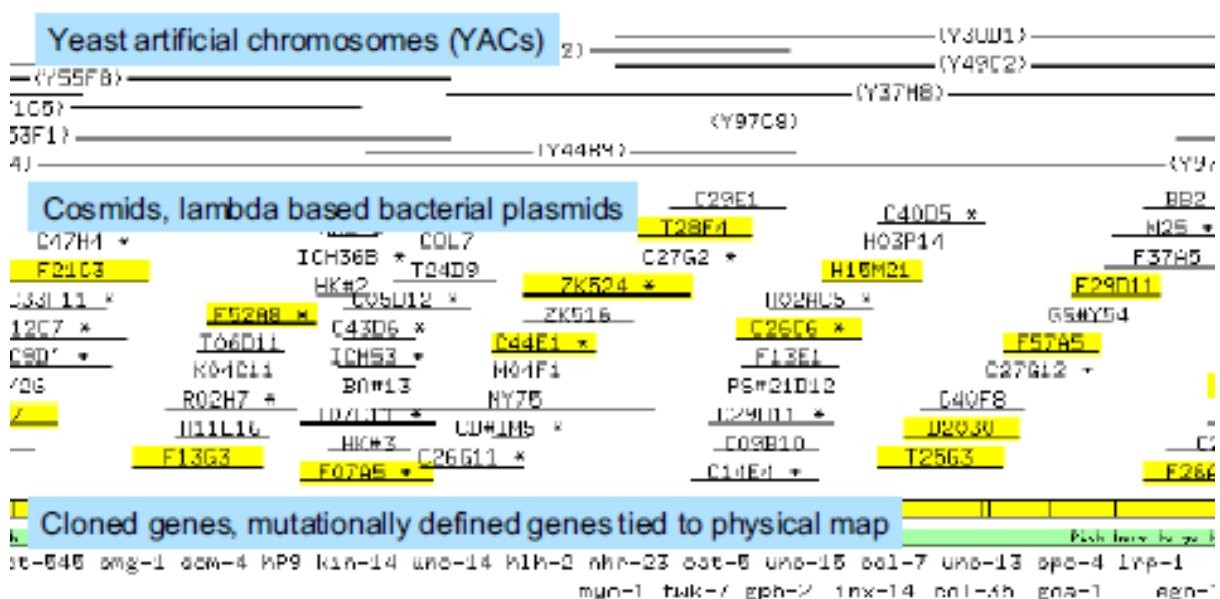
A *C. elegans* speciális ivari dimorfizmust mutat: két nemet – önmegtermékenyítő hermafroditákat, valamint hímeket – különböztethetünk meg (**9. ábra**) (Hodgkin, 1987). A hermafroditák a tiszta genetikai vonalak fenntartását, a hímek a genetikai vonalak kombinálását (keresztezést) teszik lehetővé. A hermafroditák öt pár testi és egy pár ivari kromoszómával rendelkeznek (XX kariotípus). Az L4 lárvastádiumban csak spermiumokat, felnőtt korban csak petesejteket termelnek, önmegtermékenyítéssel 200-300 utódot hoznak létre. A hímek csak egy darab X-kromoszómát hordoznak. Ez a XO kariotípus a meiotikus kromoszómák szét nem-válásának (*non-disjunction*) eredményeként jön létre. A természetes populációkban körülbelül 0,2 % arányban vannak hímek. Megtermékenyítéskor a hím spermiumainak szelekciós előnye van a hermafrodita spermiumokkal szemben. A megtermékenyített hermafrodita akár 1000 utódot is lerakhat. Keresztezés eredményeként a nemek aránya 1:1 lesz. Bizonyos X kromoszóma szegregációért felelős gének (például *him-8*) funkcióvesztéses mutációja következtében a hímek aránya akár a 37 %-ot is elérheti a populációban hímekkel történt megtermékenyítés nélkül is (Hodgkin, 1979).



9. ábra. *A C. elegans* ivari dimorfizmusa. Az önmegtermékenyítő hermafroditánál (A panel) a hím (B panel) kisebb és vékonyabb testfelépítésű, teste poszterior végén a zászlónak nevezett pározószerv található (C panel). Az A és B panelek azonos nagyítással készültek. A felnőtt állatok testén a gonádokat világos foltokként láthatóak.

A *C. elegans*, mint genetikai modellrendszer

A *C. elegans* genomja volt az első megszekvenálták metzoan genom (10. ábra) (Hodgkin és mtsai., 1998). Genetikai állománya kompakt, mindössze 100 Mb-nyi szekvencia kódolja a genomban található 19.700 nyitott leolvasási keretet (potenciális gén, ORF – *open reading frame*). Ezek 70%-ának van humán ortológja. A *C. elegans* genom 12 %-a transzpozázibilis eredetű, amelyek döntő többsége elvesztette mobilitását. A legjobban jellemzett transzpozonokat (Tc1-et és Mos1), mutáns allélek izolálásához használják fel (Johansen és Baillie, 1988). Kémiai és fizikai mutagenézist elsősorban EMS (etil-metán-szulfonát), psoralén és röntgensugárzás segítségével végeznek (Johnsen és Baillie, 1997). A mutáns törzsek egy törzsnévvel (pl. BC1370) rendelkeznek, és a mutáns alléleket is név alapján azonosítják (pl. *daf-2(e1370)*). Jelenleg közel 6000 *C. elegans* gént jellemeztek mutáns alléllal, és folyamatban van a szisztematikus (minden génre kiterjedő) deléciós mutánsok előállításának projektje (*gene knockout project*). A *C. elegans* kutatások eredményeit internetes adatbázisok foglalják össze. A genetikai információk a WormBase portálon (www.wormbase.org), az anatómiai adatbázis a „wormatlas.org” címen, a nemzetközi törzsgyűjtemény (CGC: *Caenorhabditis* Genetics Center) pedig a biosci.umn.edu/CGC/CGC honlapon érhető el.



10. ábra. A *C. elegans* genom egy részlete. Az adott kromoszómát hosszú YAC (yeast artificial chromosome) és rövidebb cosmid klónok fedik le. A kromoszóma szakaszt átfedő klónok sárga színnel vannak jelölve. Ezek alkotják a kontigot (klónokkal teljesen lefedett kromoszóma szakasz). A kromoszómát jelölő zöld vonal alatt azok a gének találhatóak, amelyeket az adott genomi régióba térképeztek vagy klónoztak.

Keresztezés

Kettős mutánsok előállításához az egyik törzs hermafroditáit keresztezzük a másik törzs hímjeivel. Laboratóriumi körülmények között hím egyedeket vad típusú állatok rendszeres keresztezésével,

him-8 mutánsok vagy *him-8* géncsendesítéssel (RNS interferencia, RNSi) használatával kapunk. A keresztezést úgy kell megtervezni, hogy mindig a normálisan mozgó mutánsból hozunk létre hím egyedeket. A hermafroditák késői L4 vagy fiatal felnőtt korúak legyenek, ellenkező esetben sok önmegtermékenyített petesejtet tartalmazhatnak. Bár a hím egyedek képesek megtermékenyíteni a hermafroditákat, a keresztezés különleges körülményeket igényel. A nőtények igyekeznek elkerülni a folyton partnert kereső hímekeket. Hogy csökkentjük a hermafroditák menekülési mozgásterét, az NGM lemez 4/5-öd részét eltávolítjuk, ügyelve, hogy a fennmaradó részen elegendő OP50 baktérium maradjon. A hímekeket nagy feleslegben alkalmazzuk. 3-4 L4 hermafrodita mellé 10-15 hím egyed tesztünk. Az állatokat egy éjszakán át 20°C-on tartjuk, majd másnap a hermafroditákat egyesével külön-külön lemezekre rakjuk. Akkor volt sikeres a megtermékenyítés, ha az F1 generáció nagyszámú hímeket tartalmaz. Az F1 nemzedékből a hermafroditákat még lárvaként egyesével külön lemezekre tesszük (meggátolva a hímekekkel történő keresztezést), majd az F2 nemzedéket teszteljük az adott mutáns fenotípusokra.

RNS interferencia a C. elegans-ban

A funkcionális vizsgálatokat mutáns allélek mellett RNSi alkalmazásával végzik (Timmons és Fire, 1998; Conte és Mello, 2003). Az RNSi jelenségét duplaszálú RNS (dsRNS) váltja ki, amely a vele homológ szekvenciájú mRNS degradációjához vagy transzlációs gátlásához vezet. Az RNSi használatával valójában „fenokópiát” kapunk (fenotípust kialakító mutáns allél nem található a genomban). *C. elegans*-ban a módszer igen nagy hatásfokkal működik. A hatás sejtről-sejtre és szövetről-szövetre terjed (szisztematikus), és az utódokba is átjut (Fire és mtsai, 1998; Conte és Mello, 2003).

A dsRNS az állat testébe közvetlenül injektálható. Újabban a táplálékként használt baktériumban expresszálják a kívánt dsRNS-t („etetéses módszer”; Alcazar és mtsai., 2008). A teljes genomsekvencia ismeretében elviekben bármely gén csendesíthető. A kísérletek tervezésénél különös gondossággal kell eljárni az ún. specifikus *off target* hatások elkerüléseért (csak az adott génre jellemző egyedi szekvenciára tervezzük az RNSi klónt).

Genetikai transzformáció

Az állatok transzformálásával lehetőség nyílik a gének expressziós mintázatának feltárására, fehérjék expresszálására, illetve DNS szabályzó elemek vizsgálatára (**11. ábra**). A transzformáció történhet injektálással, ami általában instabil extrakromoszómális DNS-t eredményez, vagy génpuska (*bombarding*) technikával, ami nagy valószínűséggel a transzgén integrációjához vezet ([Berezikov és mtsai., 2004](#)).



11. ábra Transzgénikus *C. elegans*. A *bec-1::gfp* transzgén expressziós mintázata egy L4 stádiumú lárvában. A *gfp* (green fluorescence protein – zöld fluoreszcens fehérje) riporter gén csak meghatározott sejtekben expresszálódik egy adott egyedfejlődési állapotban (expressziós mintázat). Az expresszáló (aktív) sejteket zöld szín jelöli.

A *C. elegans*-on végzett genetikai vizsgálatok vezettek el a programozott sejthalál genetikájának és

The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2002

"for their discoveries concerning genetic regulation of organ development and programmed cell death"



Sydney Brenner H. Robert Horvitz John E. Sulston

számos jelátviteli útvonal mechanizmusának megértéséhez. Sydney Brenner és két közvetlen tanítványát, John Sulstont és Robert H. Horvitzot 2002-ben élettani és orvosi Nobel-díjjal jutalmazták a szervfejlődés (az ebben szerepet játszó jelátviteli utak) és az apoptózis genetikai szabályozásának feltárásáért (**12. ábra**). 2006-ban Andrew Fire és Craig Mello szintén orvosi Nobel-díjban részesült az RNS interferencia folyamatának *C. elegans*-ban történt felfedezéséért (**13. ábra**). 2008-ban a kémiai Nobel díjat Martin Chalfie kapta a zöld fluoreszcens fehérjén (GFP) alapuló expressziós rendszerek kidolgozásáért, amelyhez szintén a *C. elegans*-t használta modell rendszerként.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2006

"for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"



Andrew Z. Fire



Craig C. Mello

12. ábra. A 2002-es orvosi Nobel díjasok. A képen látható három kutató *C. elegans*-on végzett kísérletekért részesült az elismerésben. Horvitz és Sulston Brenner egyik első tanítványai voltak. Az elismerésben így egy genetikai iskola részesült.

13. ábra. A 2006. évi orvosi Nobel díjasok. Fire és Mello *C. elegans*-ban fedezték fel a géncsendesítés (RNS interferencia) molekuláris mechanizmusát.

I. Munka a *C. elegans*-szal

A *C. elegans* gyakorlatra az általános tűz- és munkavédelmi szabályok érvényesek. A gyakorlaton a *C. elegans* törzseket Petri lemezekben vizsgálják. A lemezekben NGM agar található, amit csíkokban *E. coli* OP50 baktérium fed. Az agar felszínén láthatóak a közel 1 mm hosszú, fehérnek tűnő állatok. Az állatokat sztereómikroszkóppal vizsgáljuk alsó megvilágítással (**14. ábra**). A mikroszkópra a lemezeket fedővel lefelé helyezhetjük el. Ha így nem tudjuk a megfelelő fókusz távolságot beállítani, megfordíthatjuk a lemezt, és a vizsgálat idejére levehetjük a tetejét. Ügyeljünk arra, hogy a mikroszkóp ne szennyeződjön! A mikroszkópot mindig csak a vizsgálat idejére tartsuk bekapcsolva. Ez egyrészt fontos a mikroszkóp élettartama miatt. Másrészt a *C. elegans* érzékeny a melegre. Ha túlmelegedett mikroszkópon vizsgáljuk, az állatok elpusztulhatnak. Ne nyúljunk a táptalajba! Ezzel a lemez fertőződése is minimálisra csökkenthető. A *C. elegans* nem veszélyes az emberi szervezetre. A táplálékául használt *E. coli* OP50 törzs uracil auxotróf, a Petri lemezen kívül korlátozott a szaporodása. Ha a munka során mégis szennyeződne a kezünk alapos kézmosás javasolt.



14. ábra. *C. elegans* vizsgálata sztereómikroszkóppal. Bal oldali panel: NGM műanyag Petri lemezek, melyekben agar felszínén, baktérium pázsiton (táplálék; világos fehér folt a lemezeken) tenyésznek az állatok. Középső panel: az NGM agar felszínén látható különböző korú állatok. Jobb oldali panel: alul megvilágítás sztereómikroszkóp.

A gyakorlaton előforduló mutáns törzsek

A gyakorlat első felében a *C. elegans* mutáns törzsekkel fogunk megismerkedni (**15. és 16. ábrák**). A vad típusú állatot hasonlítjuk össze többféle mutáns fenotípussal. A kapott Petri csészéken megtaláljuk a vizsgálandó mutáns törzsek nevének hárombetűs rövidítését. Először a vad típust (*wild-type*, WT vagy N2) vizsgáljuk meg. Ennek az állatnak a fenotípusa, genotípusa megegyezik az eredetileg izolált *C. elegans*-éval. A lemezen a legnagyobb állatok, a felnőttek formáját, mozgását próbáljuk megfigyelni. Általában a fejük irányában haladnak, szinuszos (S-alakú) mozgással. A testükben kivehetőek az embriók. Az állatok körül lerakott embriók, valamint kisebb méretű, mozgékony lárvákat láthatunk (**14. ábra, középső panel**).

A gyakorlaton vizsgált morfológiai mutáns törzsek:

him-8: Him (*High incidence of males*) fenotípus. Egy kromoszóma-szétválási rendellenesség következtében magas százalékban jelennek meg XO kariotípusú hím egyedek. A hímek karcsúbbak és mozgékonyabbak. Figyeljük meg a hímek farkán a zászló nevű párzó képletet!

lon-2: Lon (Long), hosszú testméret fenotípus. Az állatok megnyúlt testhossza a sejtek méretének túlzott növekedése következtében alakul ki.

sma-6: Sma (Small) kicsi testméret fenotípus. A Lon mutánssal ellentétes fenotípus, kicsi sejt méret eredménye.

dpy-6: Dumpy (Dpy) tömzsi fenotípus. Ezek az állatok rövid és vastag testtel rendelkeznek.

rol-6: Rol (Roller) fenotípus. Az állatok bőrizomtömlője spirál irányban megcsavarodik a test mentén, ettől mozgás közben pörög az állat a hosszanti testtengely mentén. Domináns mutáció, ezért a mutáns allélt kotranszformációs markerként is használják.

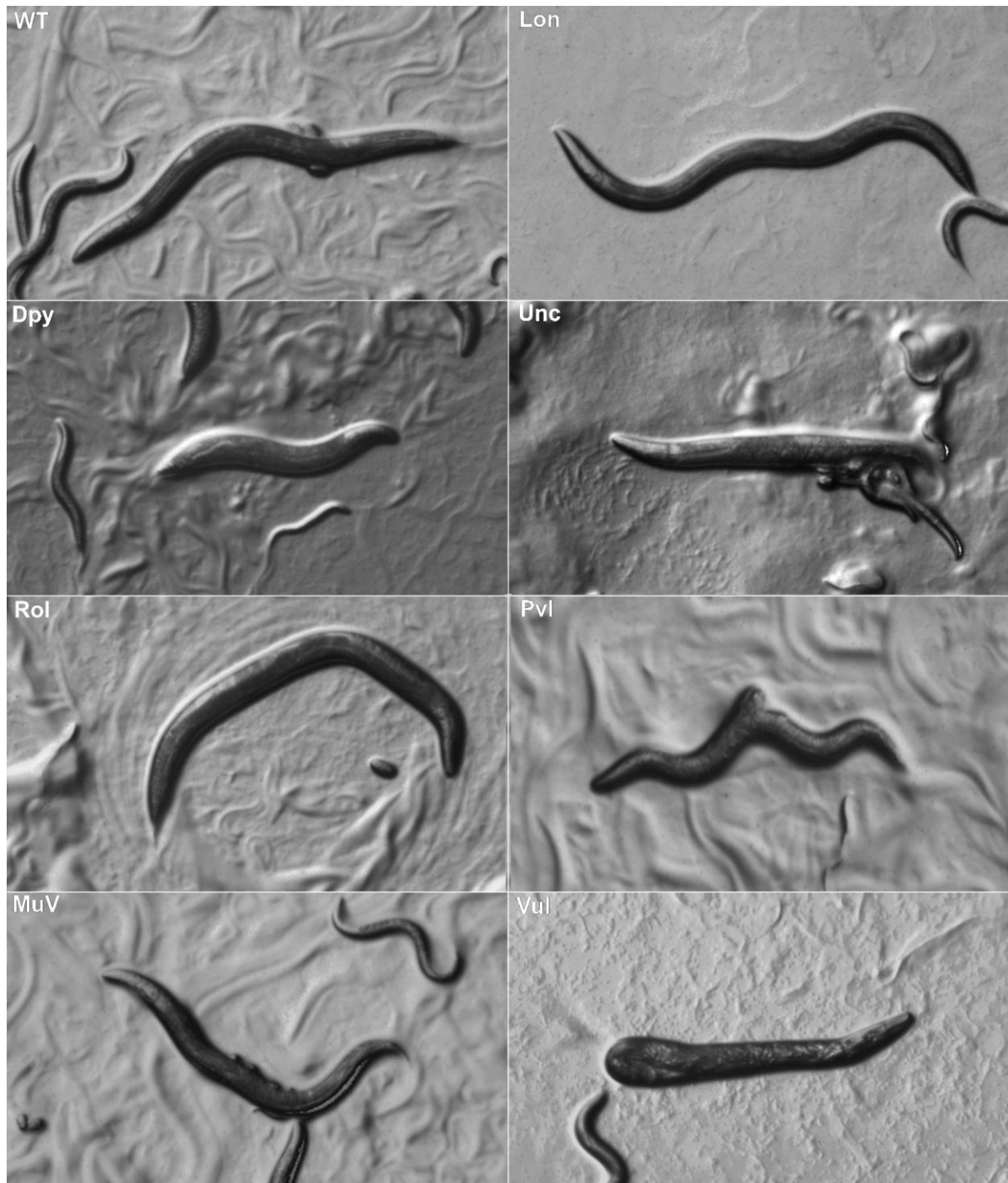
unc-2: Unc (Uncoordinated) fenotípus. Mozgásképtelen (béna, paralizált) állatok, az átlagosnál rövidebbek.

lin-28: Pvl (Prodruded vulva) fenotípus. A hermafroditák vulva szövete kifordul (kitüremkedik) a test ventrális síkjából.

unc-14; dpy-6: Kettős mutáns. Mivel a két gén működése független egymástól, a kettős mutáns mindkét törzs fenotípusát mutatja, azaz Unc és Dpy fenotípusú egyszerre.

let-60(gf): Muv (Multivulva) fenotípus. Domináns mutáció, a hermafrodita állatok ventrális testfalán több vulvakitüremkedés látható.

lin-39: Vul (Vulvaless) fenotípus. A hermafrodita állatokban nem fejlődik vulva szövet. Emiatt az utódok nem tudják elhagyni a mama ivarszervét, az anyában kelnek ki és kezdenek el fejlődni. Ez az anya pusztulásához vezet, amelyet *bag-of-worms* – egy zsáknyi féreg – fenotípusnak is nevezünk. A Vul mutáns törzsek nem raknak le embriókat az agar felszínére.



15. ábra. A gyakorlaton előforduló *C. elegans* mutáns fenotípusok. *WT* (wild-type – vad típus): vad típus; *Lon* (Long – hosszú): hosszú testméretű mutáns állat; *Dpy*: rövid, „köpcös” testalakú állat; *Unc*: bék, paralizált állat, amely nem képes mozogni; *Rol* (Roller - gördülő): körbe-körbe mozgó állat; *Pvl* (Protruded vulva): kitüremkedő vulva fenotípusú állat; *Muv* (Multivulva): több vulvaszövetet tartalmazó állat; *Vul* (Vulvaless): vulva szövetet nem fejlesztő állat. A fenotípusok részletesebb leírása a szövegben megtalálható.



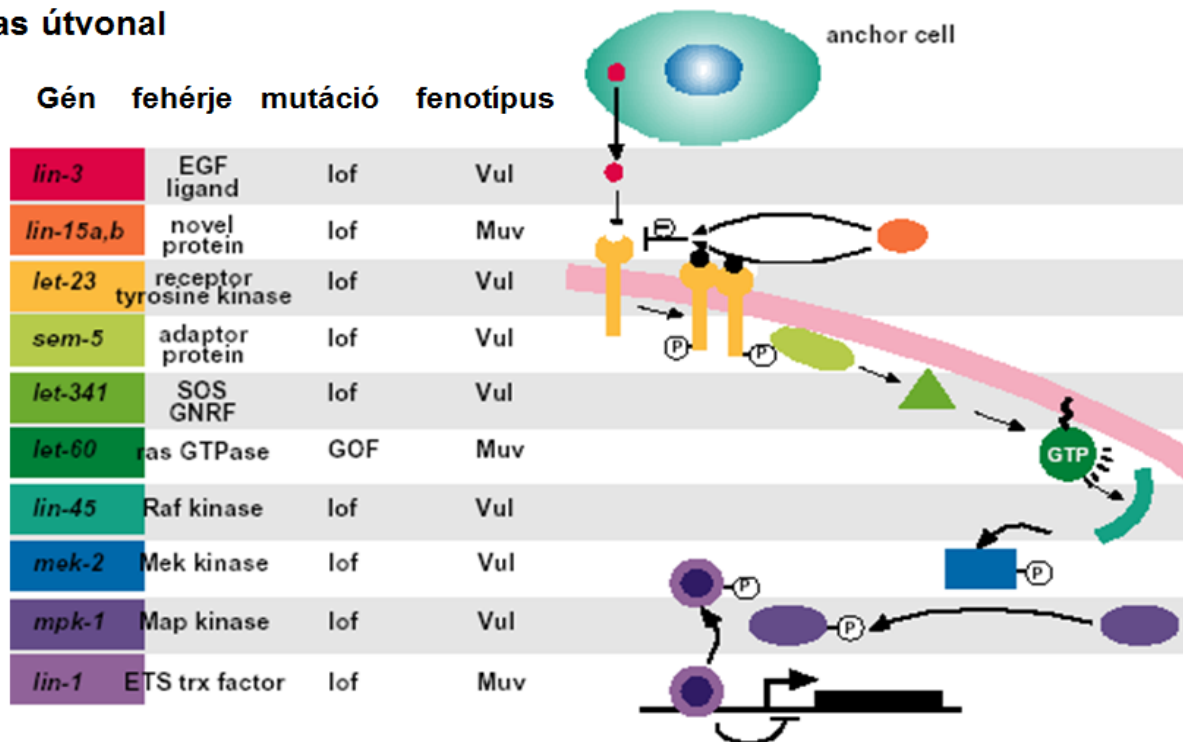
16. ábra Egy unc-14; dpy-6 kettős mutáns állat. Az állat egyszerre tömzsi, rövid és nem képes mozogni (béna, paralizált). A mendeli szegregáció az F2 nemzedékben 9:3:3:1 hasadási arányt mutat. Az „I” kategória a kettős mutánsok arányát mutatja, amelyek fenotípusa: Unc, Dpy.

II. A Ras jelátviteli útvonal vizsgálata

A gyakorlat második felében a vulva szövet kifejlődésében szerepet játszó Ras jelátviteli útvonal mutánsaival fogjuk az episztázis analízist gyakorolni. A Ras (RTK/Ras/MAPK, Receptor Tirozin Kináz/Ras/Mitogén Aktivált Protein Kináz) jelátviteli kaszkád egy tipikus genetikai útvonal, amelynek központi szerepe van a vulva szövet kialakításában (**17. ábra**). Az útvonal egy ligandum (EGF, *epidermal growth factor* - epidermális növekedési faktor) szekretálásával „kezdődik”, amely egy konzervált RTK receptort aktivál. A receptor aztán egy sor citoplazmás átvivő molekula (kinázok) aktivációját eredményezi, amelyek végül egy olyan transzkripció faktor szabályoznak, amely a vulva kifejlődéséhez szükséges célgének aktivitását határozza meg. Az útvonal normális működése teszi lehetővé a vulva indukcióját az L3 lárvastádium elején. Addig a stádiumig az állat középső része egy „zárt cső”. A vulva szövet kialakulásával egy nyílás (vulva) képződik az állat ventrális részén, amelyen keresztül az embriók elhagyják a hermafrodita ivarkészülékét, illetve a hím spermái a hermafroditába jutnak párosodáskor. A Ras útvonal hiperaktiválódása több vulva kifejlődését (Muv – *Multivulva* – fenotípus), csökkent működése a vulva indukció elmaradását (Vul – *Vulvaless* – fenotípus) eredményezi. Ezek az egyszeres mutánsok könnyen felismerhetők sztereómikroszkóp segítségével. A Vul és Muv fenotípusú egyszeres mutánsok keresztezésével kettős mutánsok állíthatók elő. Világos, hogy egy ilyen kettős mutáns nem lehet egyszerre Vul és Muv is, valamelyik egyszeres mutáns fenotípusa nyilvánul meg a kettős mutánsban (vagy Vul vagy Muv lesz a kettős mutáns fenotípusa). Ez azt mutatja, hogy a mutáns allélek által kijelölt gének nem függetlenül öröklődnek egymástól (nem a mendeli 9:3:3:1 hasadási arányt mutatják az F2 nemzedékben, ahol az 1 a kettős mutánsok aránya), hanem **genetikai interakciót** mutatnak. Érdemes megjegyezni, hogy a Ras útvonal számos egyedfejlődési lépést szabályoz. A Ras útvonalban deficiens mutáns állatok fenotípusa ezért pleiotróp. Az útvonal teljes hiánya korai lárvá életképtelenséget okozhat, de számos más szerv és szövettípus kialakulásáért felelős.

17. ábra. A Ras útvonal komponensei *C. elegans*-ban. A Ras jelátvitelt a szomatikus gonád egyik speciális sejtje, az ún. horgonysejt (anchor cell, AC) generálja. Az AC szekretálja a LIN-3 (lineage defective-3; hiányában nem alakul ki a vulva szövet sejtvonala) növekedési faktort, amely egy EGF

Ras útvonal



(epidermális növekedési faktor) ligandum. A LIN-3 (piros kör) a vulva elősejtek membránjában (rózsaszín vonal) található LET-23 RTK receptorhoz (sárga vonal) kapcsolódik, azt dimerizálja (aktiválja). Az aktivált receptor aztán foszforiláció (P) révén egy sor citoplazmás jelátvivő molekulát aktivál (zöld és kék színnel jelölve), amelyek végül a LIN-1 transzkripciós faktort szabályozzák. Ha a LIN-1 aktiválódik, bejut a sejtmagba és ott a vulva kifejlődéshez szükséges gének expresszióját határozza meg. A nyilak aktivációt, a talpas nyilak gátlást jelölnek. lof: *loss-of-function* (funkcióvesztéses mutáció); GOF: *gain-of-function* (funkciónyeréses mutáció); Vul: Vulvaless (vulva nélküli) fenotípus; Muv: Multivulva (több vulva) fenotípus.

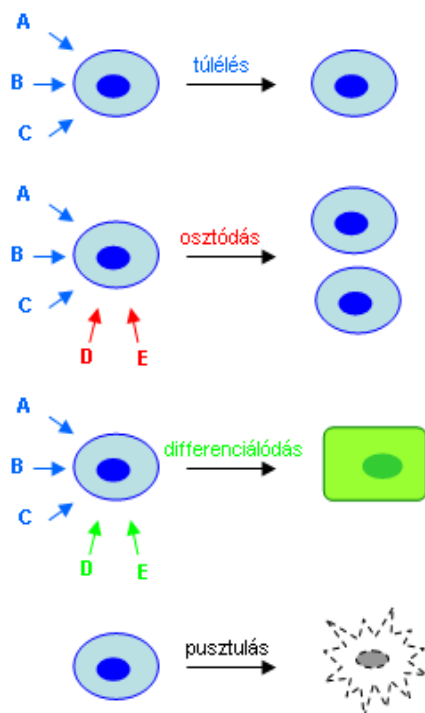
A jelátviteli rendszerekről általánosságban

Jelátviteli útvonalak és szerepük az egyedfejlődésben

Hogyan fejlődik ki a felnőtt test egy megtermékenyített petesejtéből, a zigótából? Mi mondja meg sejteknek, hogy mikor osztódjanak és meddig éljenek? Hogyan tudják az újonnan keletkező sejtek, hogy az egyedfejlődés egy adott pillanatában és a test egy meghatározott pontján milyen sejttypussá kell differenciálódniuk? Milyen molekuláris mechanizmusok biztosítják a sejtek homeosztázisát (stabil működését) az állandóan változó körülmények között? E mechanizmusok hibás működése hogyan vezet patológiás folyamatokhoz? A felvetett kérdések biológiai megismerésünk frontvonalába tartoznak, orvosbiológiai vonatkozásuk jelentős. A fenti kérdésekre adandó válaszok, legalábbis részben, a differenciált génexpresszióban (génaktivitásban) keresendők. Egy élőlény sejtjei ugyanis

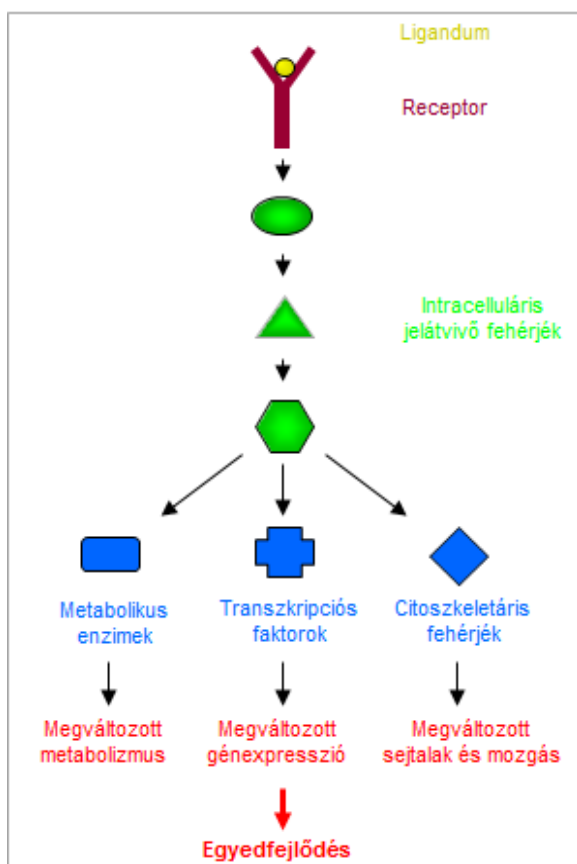
azonos génkészlettel rendelkeznek, de sejtípustól és fiziológiai állapottól függően ebből a készletből csak bizonyos géneket működtetnek. A génexpresszió – transzkripció – szabályozása tehát az egyedfejlődés egyik kulcsfontosságú molekuláris színtere. Ha meg tudnánk határozni az egyedfejlődés során keletkező egyedi sejtekben, hogy mely gének milyen mértékben fejeződnek ki, elviekben leírható lenne az egyedfejlődés genetikai programja. Ma még nem vagyunk erre technikailag képesek, és kétséges, hogy valaha is egyáltalán képesek leszünk. Amit ma ismerünk azonban, az sem kevés: a génexpressziót specifikus transzkripciós faktorok szabályozzák, amelyek viszont meghatározott jelátviteli (szabályozó) útvonalak hatására aktiválódnak. Ezeket az útvonalakat genetikai útvonalaknak is nevezik.

A jelátviteli útvonalak központi szerepet játszanak az egyedfejlődés szabályozásában. Lehetővé teszik a sejsors meghatározást, a szöveti mintázatképződést és a szervek, testtájak elrendeződését. Olyan egyedfejlődés szempontból kulcsfontosságú – ún. „mester” – gének, mint pl. a *Hox* gének is jelátviteli pályák hatására expresszálódnak, és hatásuk gyakran jelátviteli komponensek transzkripciós szabályozásában nyilvánul meg. A jelátviteli rendszereknek alapvető szerepük van továbbá a sejtek működésének szabályozásában. Aktivitásuk befolyásolja a makromolekulák *turnover*-ét (pl. a fehérjék szintézisét és lebontását), és ezen keresztül a sejtek növekedését, osztódását és túlélését (**18. ábra**). A jelátviteli útvonalak abnormalis működése emberben súlyos fejlődési rendellenességek, valamint számos patológiás elváltozás (pl. különböző ráktípusok, neurodegeneratív folyamatok, intracelluláris patogének által okozott fertőzések, diabétesz stb.) kialakulásával kapcsolható össze.

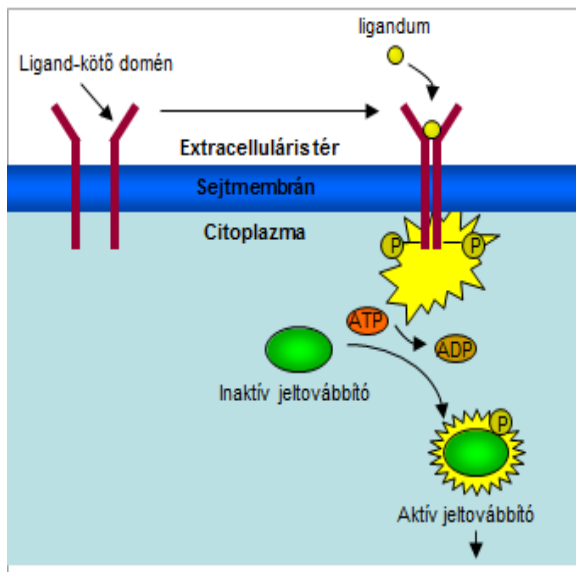


18. Ábra. Jelátviteli rendszerek állati sejtekre gyakorolt hatása. A sejtek felszínén lévő specifikus receptorok (nincsenek ábrázolva) teszik lehetővé, hogy a sejtek válaszolni tudjanak a külvilágból érkező (extracelluláris) jelekre. Ezek hatására túlélnek (működnek), osztódnak, differenciálódnak vagy elpusztulnak.

A jelátviteli rendszerek – eltérően a biokémiai útvonalaktól, amelyekben a szubsztrát konverzió valamilyen biológiai termék közvetlen előállítását eredményezi; ilyen pl. a triptofán szintézisben résztvevő enzimek biokémiai útvonala – alapvetően egy adott biológiai információt processzálnak (19. ábra). Az üzenet (jel) továbbítása fehérjék aktiválásán (*on* állapot) vagy gátlásán (*off* állapot) keresztül valósul meg (20. ábra). A jelátvitel végső hatása gyakran differenciált génexpressziós változást eredményez (a genomban kódolt gének egy részének aktivitását). Ezért is nevezik a jelátviteli rendszereket, pontosabban a rendszerek komponenseit kódoló gének hierarchikus láncolatát, másképpen genetikai útvonalaknak.



19. Ábra. Egy intracelluláris jelátviteli rendszer modellje. Az útvonal egy ligandum (*sárga*) révén aktiválódik, amely a fogadó sejt felszínén található receptorhoz (*lila*) specifikusan képes kötődni. A ligandum-receptor kötődés hatására a receptor aktiválódik. Az így keletkezett biológiai üzenet intracelluláris jelátvivő fehérjék (*zöld*) kaszkádján keresztül jut el a célfehérjékhez (*kék*), amelyek végül módosítják a sejt viselkedését. A génexpresszió megváltozása teszi lehetővé az egyedfejlődéshez szükséges sejtes differenciációt (sejtsors meghatározást). Az egyszerűség kedvéért az útvonal csak aktiválási kölcsönhatásokat – nyilak – tartalmaz.

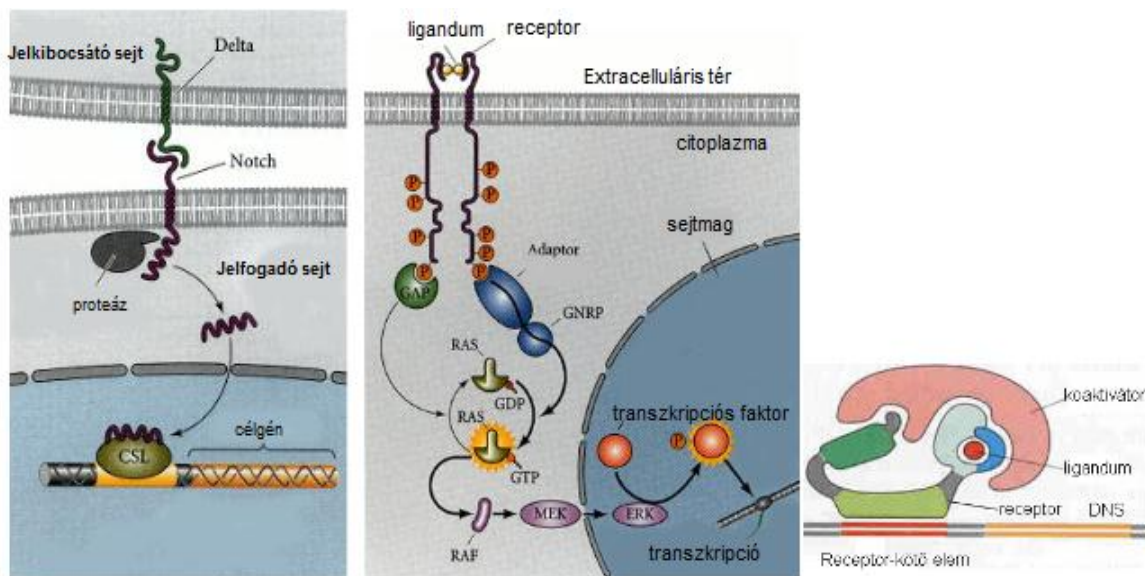


20. Ábra. Biológiai jel keletkezése és továbbítása egy jelátviteli kaszkádban. Jelen példában a sejtmembránba ágyazott inaktív receptor (*lila*) a ligandum (*sárga*) kötődés hatására dimerizálódik, majd citoplazmatikus doménje foszforilálódik (P). Az így aktiválódott receptor komplex aztán képes aktiválni egy citoplazmatikus jeltovábbítót (*zöld*): a receptor foszforilálja az inaktív jeltovábbító molekulát. A folyamatban az ATP szolgáltatja a foszfát csoportot és az energiát. Így működnek pl. a receptor tirozin kinázok (RTK), amelyek adott célfehérjék tirozin oldalláncait képesek foszforilálni. Ligandumaik között növekedési faktorokat (*growth factors*) találunk.

A génexpressziós változást végső soron transzkripció faktorok közvetítik. Egyedfejlődési szempontból azok a transzkripció faktorok jelentősek, amelyek jelátviteli kaszkádok hatására aktiválódnak. Biológiai funkciójuk lenyűgözően változatos, az egyedfejlődés különböző lépéseit (sejtsors meghatározás, sejtsztódás, az osztódás sík irányának meghatározása, sejtpusztulás, szöveti mintázatképződés, stb.) kontrollálják. Természetesen ezek a funkciók a transzkripció faktorok által szabályozott célgének működésén keresztül valósulnak meg.

Főbb jelátviteli rendszerek

A jelátvitel (vagy szignál transzdukció) biológiai jelentése: információs anyagcsere (*information metabolism*), pontosabban az információ anyagcseréje. Azt a molekuláris eseménysort jelenti, amely során a sejt érzékeli és processzálja (feldolgozza és közvetíti) a környezetből érkező információt. A jelátviteli rendszereket sokféleképpen osztályozzák. Egyrészt lehet a környezetből érkező jel minősége alapján csoportosítani; ez alapján megkülönböztetünk *juxtacrine*, *paracrine* és *endocrine* jelátviteli rendszereket. A *juxtacrine* rendszerben a ligandumot kibocsátó és a receptort tartalmazó sejtek közvetlenül érintkeznek egymással. Ebben az esetben tehát a ligandum is a sejtmembránban van kihorgonyozva. Ilyen rendszer pl. a Notch jelátviteli út vonal (**21. ábra**).



21. Ábra. Juxtacrine, paracrine és endocrine jelátviteli rendszerek. Bal oldali panel: *juxtacrine* jelátviteli rendszer – Notch útvonal. Delta: ligandum; Notch: receptor; CSL: transzkripciós faktor. A receptor-ligandum kötődés hatására a receptor citoplazmás doménje hasítódik, majd a magba jut, ahol egy transzkripciós faktort aktivál. Középső panel: *paracrine* jelátvitel – RTK/Ras útvonal. Ras: (monomerikus) GTP-kötő (G) fehérje; GNRP: *guanine nucleotide releasing factor*; GAP: GTP-áz aktiváló fehérje; GTP: guanozin-trifoszfát; GDP: guanozin-difoszfát. Jobb oldali panel: *endocrine* jelátviteli rendszer – egy nukleáris receptor modellje.

A *paracrine* jelátviteli rendszerben a jelkibocsátó sejt az extracelluláris térbe szekretálja a ligandumot. A ligandum egy koncentráció gradiens mentén aktiválja a közelben elhelyezkedő kompetens, tehát a ligandumra specifikus receptorral rendelkező jelfogadó sejteket. Tipikus *paracrine* rendszer az RTK/Ras jelátviteli útvonal (**21. ábra**). Az *endocrine* jelátviteli rendszerben az endokrin sejtek által termelt ligandum – hormon – a véráramon keresztül jut el a test távolabbi pontjaira, ahol a megfelelő receptorral rendelkező célsejteket aktiválja. Ide tartoznak a nukleáris hormon receptor útvonalak (**21. ábra**). A hidrofób molekulák (pl. szteroid és thyroid hormonok, retinoidok, D vitamin) átjutnak a sejtmembránon, majd hozzákötődnek intracelluláris receptoraikhoz. Az így aktivált receptorok aztán specifikus DNS szekvenciákhoz kötődve szabályozzák a célgének expresszióját.

Egy másik csoportosítási szempont a sejtfelszíni receptorok funkcióját veszi alapul. E megközelítés alapján a jelátviteli rendszerek osztályozását az **1. táblázat** mutatja.

1. Táblázat. Jelátviteli útvonalak
Korai egyedfejlődés és később
1. Wnt útvonal

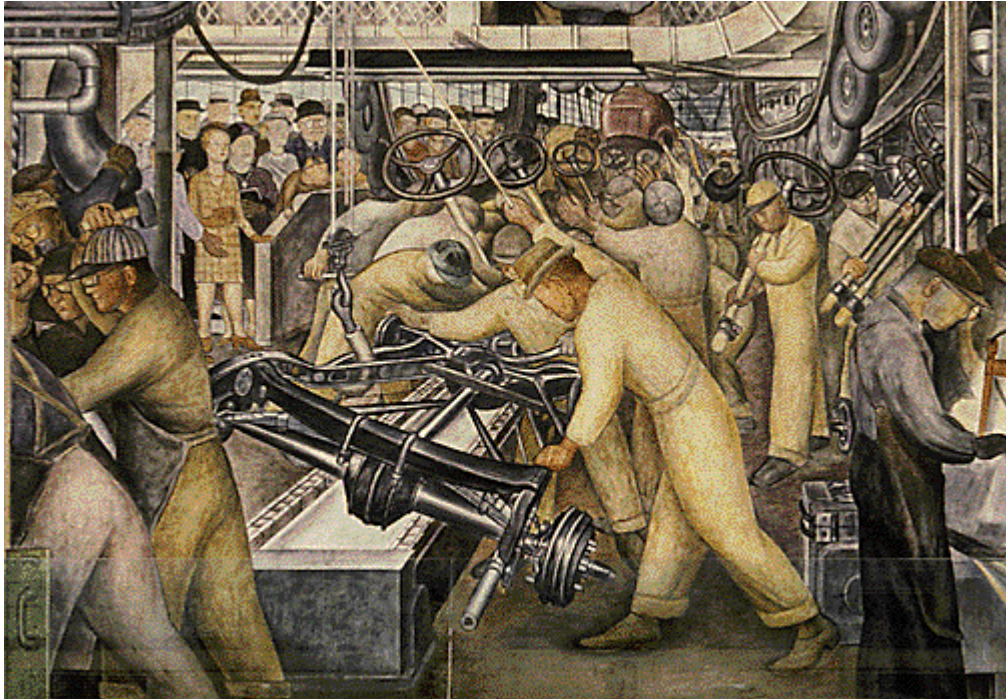
2. TGF-β (szerin/threonin kináz; <i>transforming growth factor-beta</i>) útvonal
3. Hh (Hedgehog) útvonal
4. RTK/Ras (kis – monomerikus – G fehérje) útvonal
5. Notch útvonal
<i>Egyedfejlődés középső szakasza és később</i>
6. Citokin receptor (citoplazmikus tirozin kináz) útvonal
7. IL1/Toll NF-κB (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>) útvonal
8. Nukleáris hormon receptor útvonal
9. Apoptotikus útvonal
10. Receptor foszfortirozin foszfatáz útvonal
<i>Lárvális és késői egyedfejlődés</i>
11. Receptor guanilát cikláz útvonal
12. Nitrát oxid receptor útvonal
13. G fehérje-kötött receptor (nagy – trimerikus – G fehérjék) útvonal
14. Integrin útvonal
15. Cadherin útvonal
16. <i>Gap junction</i> útvonal
17. Ligand-kötött kation csatorna útvonal

Ezeknek a jelátviteli rendszereknek az egyedfejlődési és fiziológiai jelentőségét mutatja többek között a következő tény: a *C. elegans* genomban található gének (~19.700) mintegy 11%-a (~2200) jelátviteli komponens kódol.

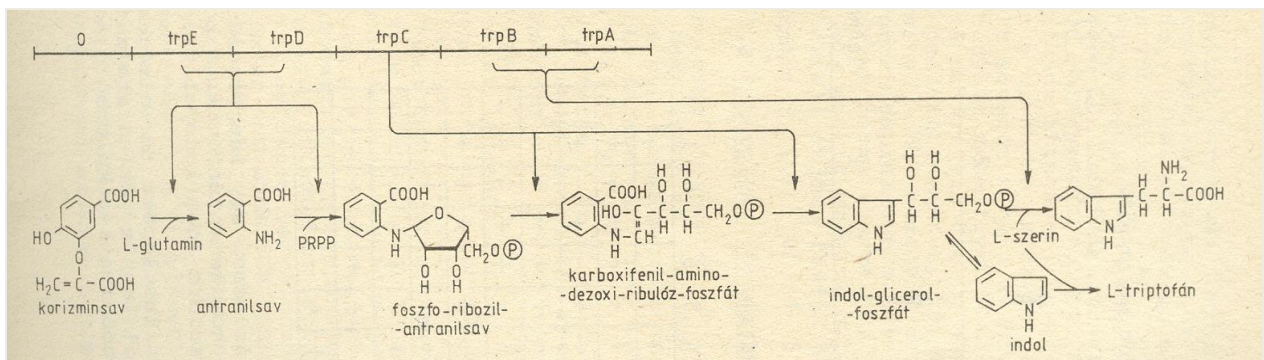
Jelátviteli rendszerek genetikai logikája

Az egyedi jelátviteli rendszerek komponensei funkcionálisan lineáris „útvonalakba” rendeződnek. Hogy egy adott útvonalban melyik komponens található elől (*upstream*) és melyik hátul (*downstream*), azaz ki szabályoz és kit szabályoznak, episztázis (kettős mutáns) elemzéssel lehet hatékonyan feltárni. A jelátviteli rendszerek genetikai logikájának bemutatása előtt – mintegy ellenpéldaként – a biokémiai útvonalak szabályozási logikáját tekintsük át.

Egy biokémiai útvonalban a komponensek adott szubsztrátok átalakítását végzik. Olyan ez, mint egy autó összeszerelő üzem, ahol a futószalagon készülő termékhez minden munkás (enzim) hozzátesz valamit (**22. és 23. ábrák**).



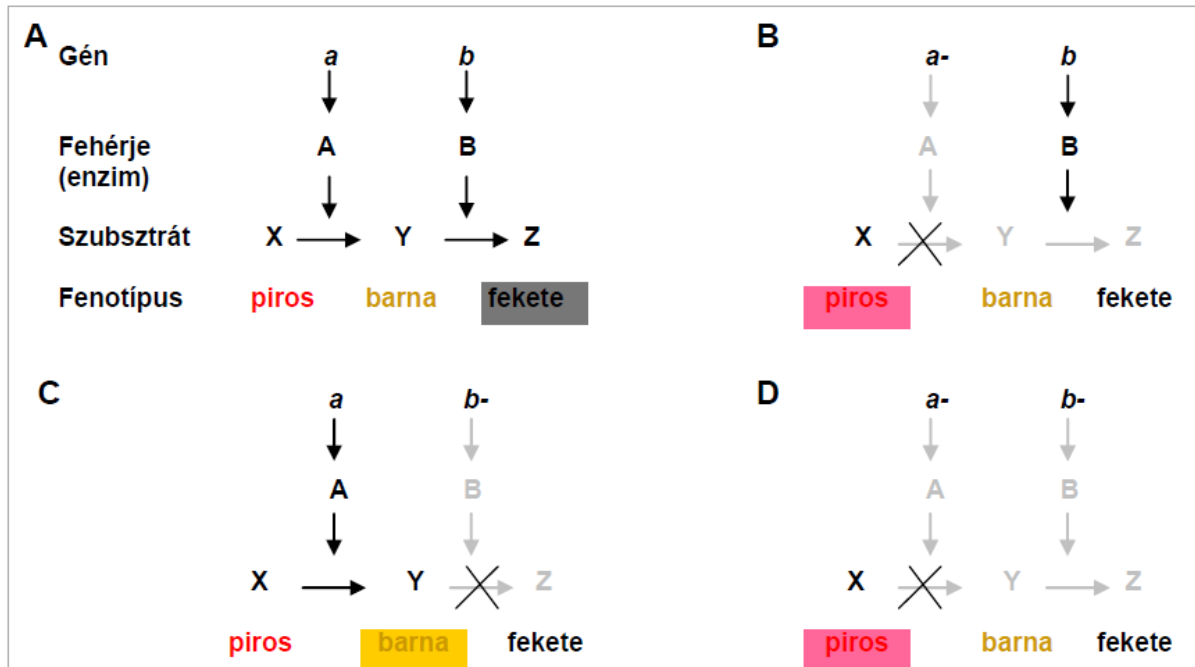
22. ábra. Egy autó összeszerelő üzem, mint a biokémiai útvonal modellje. Az enzimeket munkások, a szubsztrát konverziót egy-egy munkaállomás reprezentálják. A végtermék egy kész „alkatrész” vagy maga az összeszerelt autó.



23. ábra. A triptofán bioszintézis biokémiai útvonala. A kiindulási szubsztrát a korizminsav, amely számos átalakulási lépésen keresztül L-triptofánná alakul. Az egyes átalakulási lépéseket enzimek katalizálják, amelyeket gének *trpE*, *trpD*, ..., *trpA* kódolnak.

Vegyünk egy hipotetikus biokémiai útvonalat, amelyben 2 enzim („A” és „B”) végzi a szubsztrátok (X és Y) átalakítását (**24. ábra**). Az „A” enzim katalizálja az X-ből Y-ba, a „B” enzim az Y-ból Z-be történő konverziót. A végtermék Z, amely pl. egy festékanyagot, tehát egy színt határoz meg. Ez a szín példánkban legyen a fekete. Az X szubsztrát piros, az Y szubsztrát pedig barna színt határozzon meg. Az „A” enzimet kódoló *a* gén funkcióvesztéses (lf) mutációja felfüggeszti az X konverzióját: a homozigóta *a* mutáns egyedek (*a/a*) piros színűek lesznek (csak X színanyag lesz a sejtekben, mert

nem tud Y-ná konvertálódni és természetesen Z-vé sem). A „B” enzimet kódoló *b* gén *lf* mutációja meggátolja az Y konverzióját Z-vé. A homozigóta *b* mutánsok (*b⁻/b⁻*) barna színűek lesznek (zömében Y lesz a sejtekben, mert az X-ből Y-ba történő konverziót az A enzim lehetővé teszi). Az *ab* kettős mutánsokban (*a⁻/a⁻*; *b⁻/b⁻*) sem az X-ből Y-ba, sem Y-ból Z-be történő konverzió nem megy végbe.



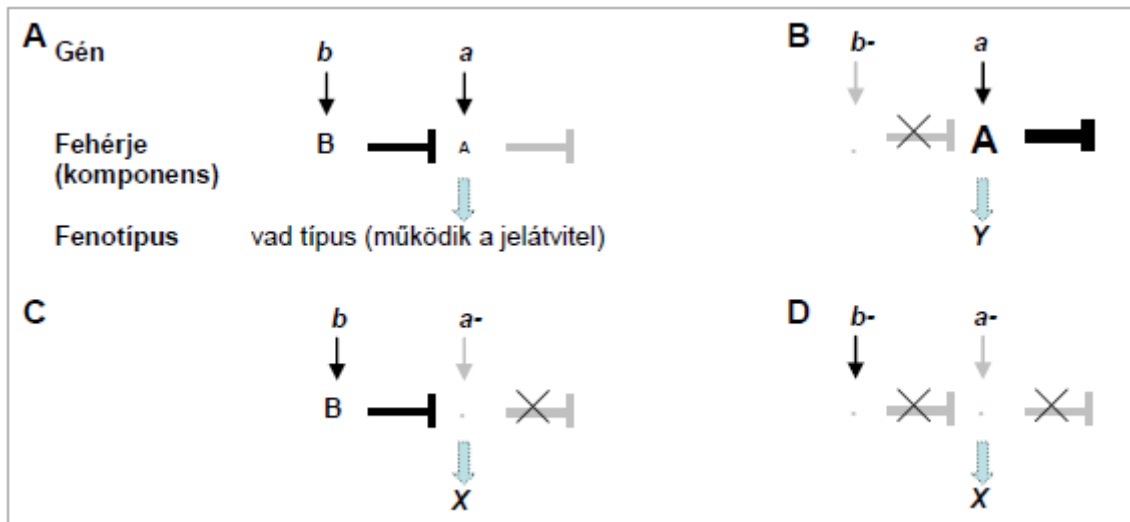
24. Ábra. Egy biokémiai útvonalban az *upstream* komponens hat episztatikusan. A, Egy hipotetikus vad típusú rendszer, amelyben a végtermék (Z) határozza meg a fenotípust (fekete szín). „A” és „B” az útvonal két komponense. B, *a* egyszeres mutáns (*a⁻*) fenotípusa piros. Hiába van „B”, nincs szubsztrát (Y), amit átalakítson. C, *b* egyszeres mutáns (*b⁻*) fenotípusa barna. D, *ab* kettős mutáns fenotípusa piros. A fekete nyilak működő, a szürke nyilak nem működő folyamatokat jelölnek.

Mivel a folyamat az útvonal elején akad el, a kettős mutáns sejtekben csak kiindulási X szubsztrát lesz. Ezért az *a⁻b⁻* kettős mutánsok fenotípusa piros, vagyis megegyezik az *a⁻* egyszeres mutánsok fenotípusával. Egy biokémiai útvonalban tehát az *upstream* komponens mutáns fenotípusa nyilvánul meg (episztatikus) a kettős mutánsban.

Egy jelátviteli – genetikai – útvonalban nincs termékkészítés (hacsak a differenciált génexpressziót nem tekintjük terméknek), „csupán” információ (szabályozási jel) továbbítás történik. Az útvonal komponensei között kétféle kölcsönhatás létezhet: aktiválás vagy gátlás. Gátlás esetén a két egyszeres mutáns fenotípusa eltérő, legyen pl. X és Y. A megfelelő fenotípusokat kialakító géneket nevezzük *a*-nak és *b*-nek, az általuk kódolt fehérjéket „A”-nak és „B”-nek. Az *a⁻* egyszeres mutáns fenotípusa X, a *b⁻* egyszeres mutáns fenotípusa Y. Ha az *a⁻b⁻* kettős mutáns fenotípusa X, akkor az alábbi szabályozási kapcsolat írható fel:



Ez azt jelenti, hogy az „A” és „B” fehérjék egy útvonalban hatnak, és „B” gátolja az „A”-t. Más szavakkal, „A” episztatikus „B” felett, „közelebb” van a kivitelezéshez, vagyis a génszabályozáshoz. **Egy jelátviteli útvonalban a *downstream* komponens mutáns fenotípusa nyilvánul meg (episztatikus) a kettős mutánsban.** Miért is írható fel egy ilyen összefüggés? Vegyünk egy hipotetikus jelátviteli rendszert, amelyben két gén terméke ilyen relációt mutat, azaz a „B” fehérje gátolja az „A” fehérje működését (25. ábra).



25. Ábra. Egy jelátviteli útvonalban a *downstream* komponens hat episztatikusán. **A,** Vad típusú rendszerben a „B” gátolja az „A” aktivitását, de nem teljesen („kicsi A”). **B,** b^- mutánsban nincs „B” fehérje (pont jelzi), így a gátlás hiányában az „A” hiperaktiválódik („nagy A”). Hiperaktív „A” Y fenotípusban nyilvánul meg. **C,** a^- mutánsban nincs „A” fehérje (pont jelzi), ez X fenotípusban nyilvánul meg. **D,** $a^- b^-$ kettős mutánsban nincs „B” és nincs „A” (két pont jelzi). Az „A” hiánya megint X fenotípusban nyilvánul meg. Az „A” és „B” fehérjék egy jelátviteli útvonal két tetszőleges komponense, „B” *upstream*, „A” *downstream* helyezkedik el az útvonalban. Az útvonal aktivitását „A” aktivitása határozza meg. A fekete nyilak és talpas nyilak működő, a szürke nyilak és talpas nyilak redukáltan működő folyamatokat jelölnek. A kétszer áthúzott talpas nyilak nem működő folyamatokat jelölnek.

Vad típusú rendszerekben gyakori, hogy mindkét fehérje bazális aktivitást mutat (vegyük észre, ezért létezhet két egyszeres mutáns fenotípus!). „B” aktivitása tehát gátolja az „A”-ét, de a gátlás nem teljes. (Egy ellenpélda az inzulin/IGF-1 útvonal, amelynek *upstream* komponensei teljesen represszálják az útvonal „végén” elhelyezkedő *forkhead* FoxO transzkripciós faktort, ezért a *FoxO* If mutánsok közel vad fenotípusúak.) b^- egyszeres mutánsokban nem érvényesül a „B” fehérje gátló funkciója, ezért „A” hiperaktiválódik. Valójában ez nyilvánul meg az Y mutáns fenotípusban. a^- egyszeres mutánsokban „B” működik, és gátolná az „A”-t, de nincs mit gátolnia az a^- mutáció miatt (nincs „A” fehérje). Ebben az esetben „A” funkciója **teljesen** eltűnik, így alakul ki az X mutáns fenotípus. Az Y fenotípust tehát „A” hiperaktiválódása, az X fenotípust „A” (teljes) hiánya okozza. Az $a^- b^-$ kettős mutánsokban nincs meg a „B” gátló funkciója, de nincs ami hiperaktiválódjon, mert az „A” funkció is hiányzik. Mivel nincs „A”, ezért a fenotípus továbbra is X (25. ábra).

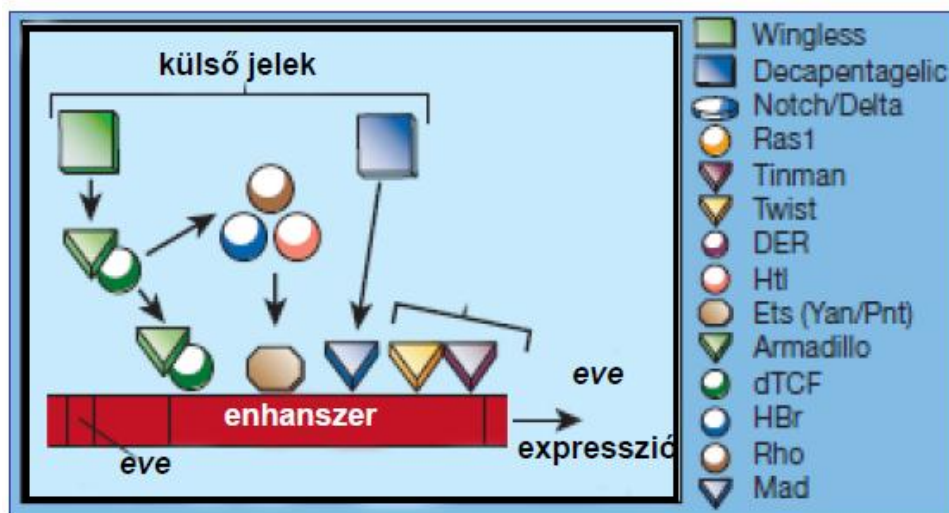
Összefoglalva, ha a^- egyszeres mutáns fenotípusa X , b^- egyszeres mutáns fenotípusa Y , és a^-b^- kettős mutáns fenotípusa X , akkor az „A” és „B” fehérjék egy útvonalban hatnak, melyben „B” gátolja az „A” aktivitását. „B” az útvonal *upstream* (gátló), „A” az útvonal *downstream* (gátolt) komponense. A b^- mutáns fenotípus (Y) kifejeződése tehát az „A” funkciójának függvénye: a és b gének szintén genetikai interakciót mutatnak.

Aktiválási reláció esetén a két egyszeres mutáns fenotípusa megegyezik; b^- egyszeres mutáns és a^- egyszeres mutáns legyen pl. egyaránt X fenotípusú (a két fehérje funkciója egy irányba hat). Ebben az esetben nem lehet lf mutánsokkal (gén)sorrendet meghatározni. Helyette a kettős mutánsokban az egyik gén lf mutáns alléljét kombináljuk a másik gén funkciónyeréses (gf) alléljével (vagy más módon hiperaktivált, pl. túlexpresszált formájával) és *vice versa*. E kombinációkban is a megnyilvánuló (episztatikus) egyszeres mutáns (lf vagy gf) fenotípus határozza meg, melyik jelátviteli komponens van *downstream* az útvonalban.

Jelátviteli kapcsolatok

Az egyedi fő jelátviteli útvonalak száma viszonylag limitált (**1. táblázat**). Az általuk meghatározott sejtípusok azonban figyelemreméltó sokféleséget mutatnak. A *C. elegans* hermafrodita állat kifejlett testét például 959 különböző szomatikus sejt alkotja. Ezek mindegyike egyedi, külön elnevezéssel illetik, különböző funkciókra specializálódnak. Ha továbbá figyelembe vesszük a jelátviteli rendszerek nagyfokú konzerváltságát, akkor nyilvánvaló annak a kérdésnek a felvetése, hogyan fordítódnak le a meglehetősen általános jelátviteli üzenetek nagyszámú specifikus génexpressziós mintázattá.

A felvetett kérdésre adott válaszok nagyrészt a jelátviteli útvonalak szövevényes kapcsolatában keresendők. Jelátviteli kapcsolatok – *signalling crosstalk* – alapvetően három szinten valósulhatnak meg. Egyrészt az útvonalak „végén”, vagyis célgénnek szabályozó régiójában. A promóterek (az átíródó DNS szakaszokat szabályozó *upstream* régiók) ui. molekuláris komputerként működnek; érzékelik és integrálják a bejövő jelátviteli impulzusokat, azaz meghatározzák a bejövő jelek minőségét és mennyiségét, és ennek függvényében állítják be a szabályozott gén expressziós szintjét egy sejtben. Mivel egyetlen célgén expressziós szintje elviekben tetszőlegesen sokféle lehet, ez a mechanizmus már önmagában is nagyszámú sejtípust tud meghatározni. Példaként a *Drosophila even-skipped* (*eve*) gén expresszióját említhetjük. Az *eve* először azokban a progenitor sejtekben expresszálódik, amelyekből a *Drosophila* dorzális izomzata fejlődik ki. Az *eve* expresszióját számos jelátviteli útvonal befolyásolja: a Ras, Dpp (*Decapentaplegic*) és Wg (*Wingless*) útvonalak kombinált aktivitása alakítja ki a megfelelő *Eve* szintet (**26. ábra**).



26. Ábra. A génexpresszió kombinatorikus szabályozása. Az *eve* gén szabályozó (enhanszer) régiójához számos jelátviteli útvonal transzkripciós faktora (TF) (kép jobb oldalán felsorolva) kötődik specifikusan. A kötődő TF-ok minőségének és számának (hány kötőhely van) integrációja dönti el végső soron az *eve* expressziós szintjét egy adott sejtben. A kialakult *Eve* szint egy adott sejtípust határoz meg.

Az útvonal keresztbeszélgetések második szintje a génexpresszió feletti *upstream* szakasz. Az itt funkcionáló fehérjék (ligandumok, receptorok, kinázok, foszfatázok, *scaffold* fehérjék, stb.) képesek egy másik jelátviteli pálya komponensének aktivitását közvetlenül (pl. fizikai interakcióval) vagy közvetve (genetikai interakcióval) befolyásolni. Erre kitűnő példa a Ras monomerikus G-fehérje működése, amely – a kanonikus MAP kináz-kináz-kinázon túl – az inzulin/IGF-1 útvonalba tartozó foszfatidil-inozitol 3-kinázt (PI3-kináz) is aktiválhatja.

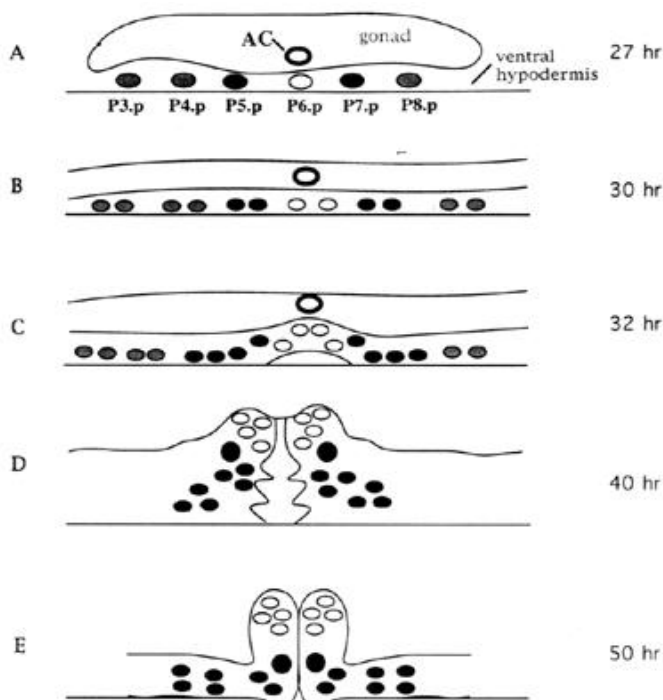
Végül a harmadik jelkommunikációs szintet azok a (cél)transzkripciós faktorok képezik, melyek miután aktiválódtak egy jelátviteli input hatására, egy másik jelátviteli pálya *upstream* komponensének expresszióját kontrollálják. Így jönnek létre a „lineáris” útvonal kapcsolatok.

A vulva szövet kifejlődése *C. elegans*-ban

A *C. elegans* vulva szöve (26 és 27. ábrák) 6 db [P(3-8).p] vulva elősejtből (VPC; *Vulval Precursor Cell*) alakulhat ki az L3-L4 stádiumokban.



26. ábra. Egy *C. elegans* hermafrodita pásztázó elektronmikroszkópos képe. A piros nyíl mutatja a vulva szövet pozícióját az állat ventrális részén (az állat az oldalán fekszik).

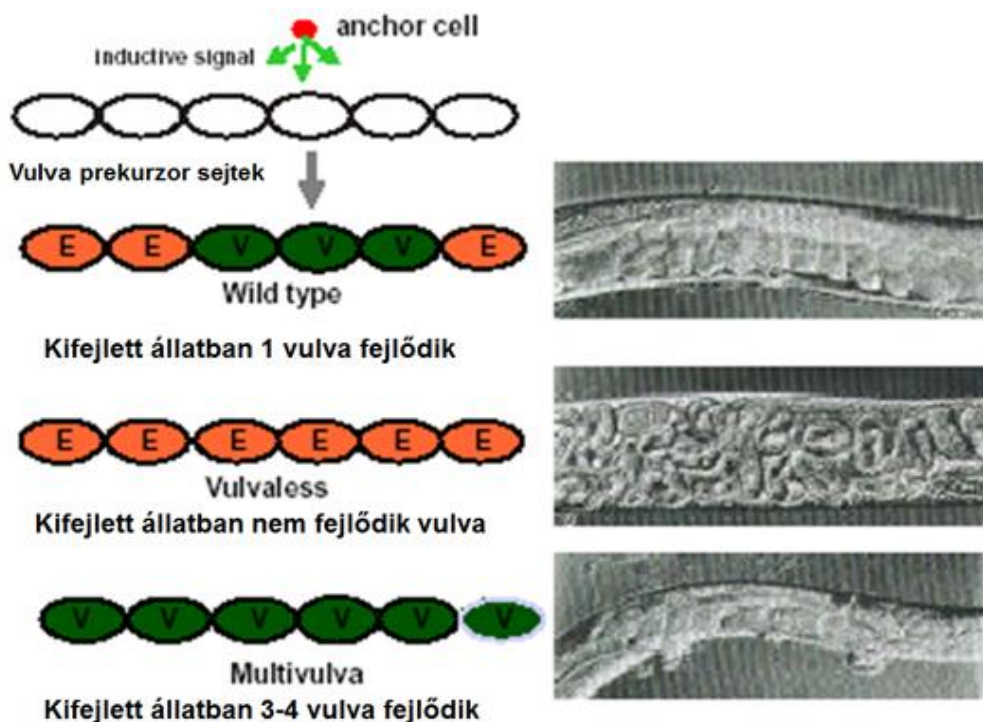


27. ábra. A vulvaszövet kilakulásának anatómiája. Az L3 lárvastádiumban a gonadális horgony sejtéből (AC) egy konzervált aktiváló jel érkezik (Ras szignál), amelynek hatására a 3 legközelebbi vulva prekursor sejt VPC [P(5-7).p] sorozatosan osztódik és létrehozzák a kifejlett állat 22 sejtéből álló vulva szövetét. Az összes többi VPC [P(3,4,8).p] egyszer osztódik, majd fuzionálnak a ventrális hipodermisszel.

A differenciációt a gonádban található horgony sejtéből és a hipodermiszből érkező jelek iniciálják. A kezdetben azonos fejlődési potenciájú VPC-k közül a három középső VPC [P(5-7).p] leszármazottai

vesznek csak részt a vulva kialakításában. A horgony sejthez legközelebb található P6.p alakítja ki a vulva fő szövetét. Ez az elsődleges vulva sejtors (1°). A P6.p két szomszádja a P5.p és P7.p sejteket másféle hatás éri el, hatásukra másodlagos vulva sejtors (2°) irányba fejlődnek. Ezek utódsejtjei a vulva támasztó szövetét képezik. Ennek hiányában a vulva kilóg a testfalból, úgynevezett protruded vulva (Pvl) alakul ki. A többi VPC a hipodermiszbe olvad, ez a harmadlagos vulva sejtors (3°). Amennyiben a sejtek károsodnak a vulva szövetének kialakulása előtt a távolabbi VPC-ék képesek átvenni a hiányzó sejt szerepét (Sulston és Horvitz, 1977).

A vulva fejlődés rendellenességei többféle mutáns fenotípust eredményezhetnek. A VPC-k hiánya vagy a szignalizációs útvonalak hibája további fenotípusokat eredményeznek. A vulva teljes hiányát vulva hiányos (*Vulvaless*; Vul) fenotípusnak nevezzük (28. ábra). Vulva hiányában az állat képtelen lerakni a petéket, azok benne kelnek ki. A kikelő lárvák az „anya” nedveit fogyasztják, míg végül annak csak kutikulája marad, ekkor a kikelő lárvák kitörnek belőle. Ezt „egy zsák féregnek”, *bag of worms* fenotípusnak hívjuk. Érdekes, hogy táplálék hiányában a vulva fejlődése gátolt, az anya így javítja az utódok túlélési esélyét. A Vul fenotípusú hermafroditák természetesen nem keresztezhetőek. Ezzel a fenotípussal ellentétes fenotípus, mikor több, akár az összes VPC elsődleges sejtorsává válik. Ekkor 2-6 vulva is kialakulhat a testfalban. Ez a sokvulvás (*Multivulva*, Muv) fenotípus. A kialakult vulvák közül csak 1 funkcionális.



28. ábra. Különböző vulva fenotípusok. A vad típusú vulva a 3 középső VPC-ből [P(5-7).p] alakul ki. A Vul (Vulvaless) vulva az induktív jel (Ras szignál) hiánya következtében alakul ki; egyik VPC sem indukálódik vulva sejtorsrá. A Muv (Multivulva) fenotípus az induktív jel hiperaktiválódásának eredménye, melynek következtében a tartalék VPC-k [P(3,4,8)p] is aktiválódnak.

Első lépésként vizsgáljuk meg az útvonal egyszeres mutánsainak fenotípusát: *lin-45*, *let-23*, *lin-1*, *let-60* és *lin-15* egyszeres mutánsokat vizsgálunk. A Ras útvonal génjeinek mutációi Vul vagy Muv fenotípust eredményeznek (**28. ábra**). Figyeljük meg a lemezeket, hogy azokon előfordulnak-e „*bag of worms*” (Vul) vagy több apró kitüremkedő vulvákcal (Muv) rendelkező állatok? Jegyezzük fel a fenotípusokat:

lin-45

→ Vul

let-23

lin-1

let-60

→ MuV

lin-15

Második lépésben vizsgáljuk meg a kettős mutánsok fenotípusát (ezekben mindig egy Muv egyszeres mutánst kombinálunk egy Vul egyszeres mutánssal). Sötéttel emeljük ki, melyik egyszeres mutáns fenotípusát látjuk a kettős mutánsban (egy állat nem lehet egyszerre Muv és Vul is !).

lin-45; let-60

lin-45; lin-15

→ Vul

let-23; lin-15

lin-45; lin-1

let-23; lin-1

→ Muv

let-23; let-60

A kapott eredményeket az átláthatóság kedvéért a következő táblázatba rendezhetjük

Muv	<i>lin-1</i>	<i>let-60</i>	<i>lin-15</i>
Vul			
<i>lin-45</i>	Muv	Vul	Vul
<i>let-23</i>	Muv	Muv	Vul

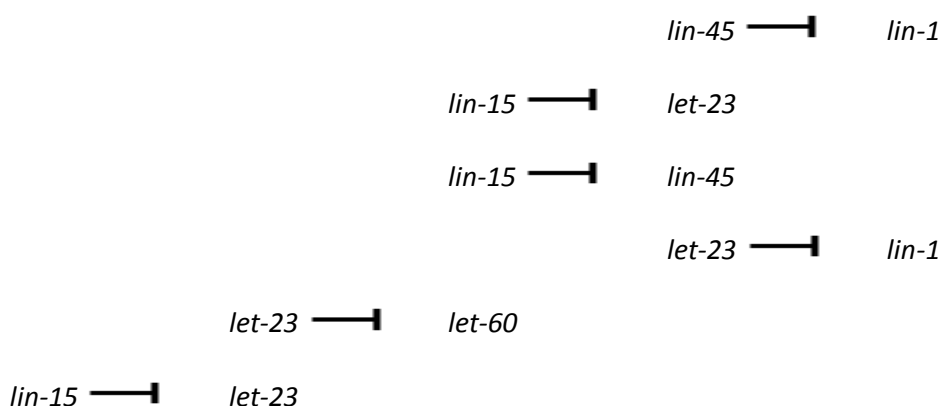
Most az episztázis analízis logikáját követve vázoljuk fel a Ras jelátviteli útvonalat. Vegyük figyelembe, hogy az ellentétes fenotípus a két komponens közötti gátlásra utal, és hogy a kettős mutáns fenotípusa az „*downstream*” komponens fenotípusát mutatja. Haladjunk sorban a kettős mutánsok vizsgálatával:

Pl. a *lin-45; let-60* kettős mutáns fenotípusa Vul. Mivel az egyszeres mutánsok közül a *lin-45* mutatja ezt a fenotípust, a két gén között a következő kapcsolatot írhatjuk fel:

let-60 —| *lin-45*

Tehát a *lin-45* van *downstream*, és az negatívan szabályozott (gátolt). A kapott eredmény nem jelenti, hogy a két gén között közvetlen kapcsolat van. Az episztázis eredményét nem befolyásolja, hogy szomszédos vagy távolabbi génekről van-e szó.

Végezzük el az analízist a többi kettősmutánssal is.



Végül állítsuk össze a teljes útvonalat:



Most korrigáljuk a kapott eredményt annak figyelembe vételével, hogy a *let-60* egy „*gain-of-function*” (gf), azaz funkciónyeréses mutáns. Ez a fajta mutáció a gén túlműködését eredményezi.

Ennek hatása, hogy a kapott fenotípus az ellentéte a gén „*loss-of-function*”, vagyis funkcióvesztéses mutánshoz képest. Tehát a *let-60(lf)* mutáns elvileg Muv fenotípusú. Ha két gén mutációja azonos fenotípust eredményez, a köztük lévő kapcsolat aktiváció.

Tehát a tényleges episztatikus (szabályozási) kapcsolat:

lin-15 —| *let-23* —| *let-60* —| *lin-45* —| *lin-1*

Ezeket a genetikai interakciókat episztázisnak nevezzük. Ide tartoznak a recesszív episztázis (hasadási arány 9:3:4 vagy 9:4:3 – vad:egyik egyszeres mutáns:másik egyszeres mutáns), amelyben a kettős mutáns fenotípusa beleolvad az egyik egyszeres mutáns fenotípus kategóriába (a gének recesszíven öröklődnek). A vulva elemzés példa egy tipikus recesszív episztázis. A domináns episztázis hasadási aránya 12:3:1 (domináns mutáns:vad:másik egyszeres mutáns). Itt az egyik gén öröklődése domináns. Ebben az esetben sem látható önálló kettős mutáns fenotípus kategória.

Irodalom

[Alcazar RM](#), [Lin R](#), [Fire AZ](#) (2008). Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNS in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **180** (3): 1275-88.

Berezikov E, Bargmann CI, Plasterk RH (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res.* **32**: e40.

Brenner S (1974). [The genetics of *Caenorhabditis elegans*](#). *Genetics* **77** (1): 71-94.

[Fire A](#), [Xu S](#), [Montgomery MK](#), [Kostas SA](#), [Driver SE](#), [Mello CC](#) (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNS in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** (6669): 744-5.

Hodgkin J (1979). Nondisjunction mutants of the Nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS* *Genetics* **91** (1): 67-94.

Hodgkin J (1987). [Sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*](#). *Annu Rev Genet.* **21**: 133-54.

Johnsen RC, Baillie DL (1988). Formaldehyde mutagenesis of the *eT1* balanced region in *Caenorhabditis elegans*: dose-response curve and the analysis of mutational events. *Mutat. Res.* **201**: 137–47.

Johnsen RC, Baillie DL (1997). [Mutation](#), *C. elegans* II book (edited Donald L. Riddle Thomas Blumenthal Barbara J. Meyer James R. Priess) Cold Spring Harbor Laboratory Press Ebook.

Riddle DL, Albert PS (1979). Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development. In *C. elegans* II, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, and J.R. Priess, eds. (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 739–768.

Sulston JE, Horvitz HR. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* **56** (1): 110-56.

Timmons L, Fire A (1998). Specific interference by ingested dsRNS. *Nature* **395**: 854.

Ward S, Thomson N, White JG, Brenner S (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol.* **160** (3): 313-37.

Citogenetika

Dr. Barna János, tudományos munkatárs

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

A citogenetika a kromoszómák tudománya. Története a XIX. század második feléig nyúlik vissza, amikor Walter Flemming elsőként írta le a kromoszómákat és viselkedésüket a mitózis során. A kromoszómák vizsgálatának jelentősége az után nőtt meg, hogy a XX. század elején Walter Sutton és Theodor Boveri egymástól függetlenül megfogalmazták az öröklődés kromoszóma elméletét, mely szerint a mendeli faktorok, vagyis a gének, a kromoszómák részei.

○ **A kromoszómák vizsgálati módszerei**

▪ **A kariotípus**

Egy élőlény teljes kromoszómakészletét **kariotípusnak** nevezzük. A kariotípust általában úgy ábrázoljuk, hogy egy élőlény metafázisos kromoszómáinak képét párokba állítjuk és méretük szerint csökkenő sorrendbe rendezzük. Ez a **kariogram** (1. ábra).



2. ábra. Az emberi kariotípus. (A) Egy férfikromoszóma készlete (kariotípusa). (B) Egy férfi kromoszóma készletének rendezett ábrázolása, a kariogram

[Alternatív szöveg: 3. ábra. Az emberi kariotípus]

[Képaláírás: (A) Egy férfikromoszóma készlete (kariotípusa). (B) Egy férfi kromoszóma készletének rendezett ábrázolása, a kariogram]

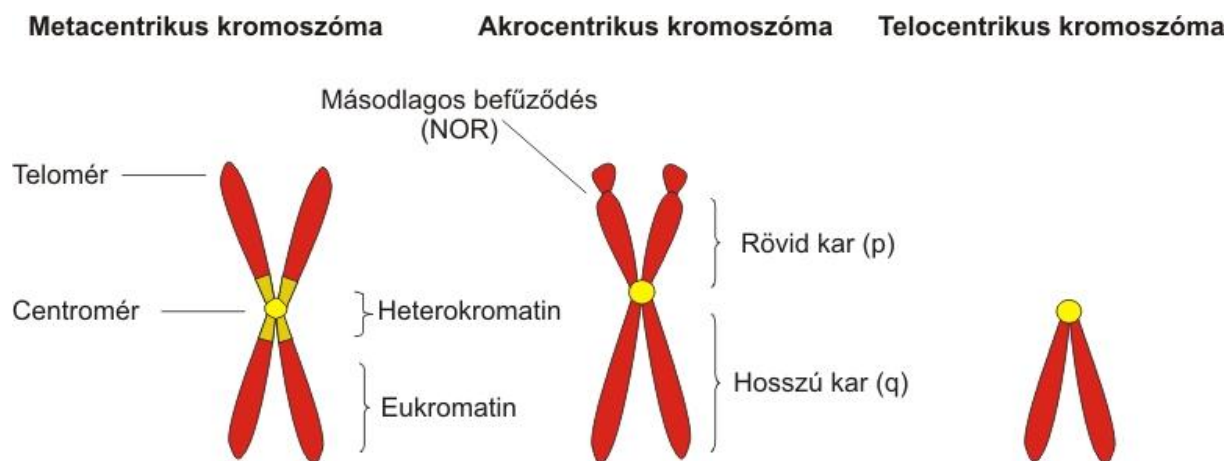
A metafázisos kromoszómákat célszerű intenzíven osztódó szövetekből preparálni. Ez az állatok esetében legtöbbször vér vagy csontvelő, míg a növényeknél valamelyik merisztéma szöve. Az osztódó sejteket általában olyan anyaggal kezelik, amely a sejtosztódást metafázisban megakasztja, így a mintában a metafázisos sejtek aránya megnő. Ilyen anyag a kolhicin is, amelynek hatását az első gyakorlat során mutatjuk be. Ezt követően a mintákat rögzítik, megfestik a kromoszómákat, majd mikroszkópos felvételt készítenek róluk. A felvételt kinagyítják és az egyes kromoszómák képét kivágják és kariogramba rendezik. Ma a kariogram készítését már számítógéppel vezérelt mikroszkópos technika segíti.

▪ A kromoszómák morfológiai jegyei

Kezdetben, a sávozási technikák hiányában, a kromoszómákat csak alakjuk és méretük alapján lehetett elkülöníteni egymástól. További problémát jelentett az, hogy a kromoszómákat szövettani metszeteken vizsgálták és a metszési síkba ritkán esett bele az összes kromoszóma. Ezzel magyarázható, hogy az ember kariotípusát csupán 1956-ban határozta meg Joe Hin Tjio és Albert Levant.

A metafázisos kromoszómákon megkülönböztethetjük a karokat, a centromert és a telomereket (2. ábra). A telomerek a kromoszómák végei, más morfológiai jellegzetesség nem figyelhető meg rajtuk. A centromer a metafázisos kromoszómán a karok közti befűződésnek jelenik meg ezért elsődleges befűződésnek is nevezzük. Egyes kromoszómákon úgynevezett másodlagos befűződés is megfigyelhető. Ez a nukleólusz organizátor régió (NOR). A NOR a riboszómális RNS-ket kódoló gének helye a kromoszómán, köré szerveződik interfázisban a nukleólusz. Általában csak egy vagy néhány kromoszómán van jelen. Azt a rövid kromoszóma részlete, amelyet a másodlagos befűződés választ le a kromoszóma karjáról szatellitának nevezzük. A szatellita ez esetben nem összekeverendő a genom rövid repetitív szekvenciáival.

A kromoszóma két karja közül a hosszabbik a hosszú (*q=queue*), a rövidebbik a rövid (*p=petit*) kar. A centromer elhelyezkedése alapján megkülönböztethetünk meta-, telo- illetve akrocentrikus kromoszómákat (2. ábra). A centromer helyzete jellemezhető a hosszú és a rövid kar egymáshoz viszonyított százalékos arányával is. Ez az úgynevezett centromer index.



4. ábra: A kromoszómák három alapvető típusa és morfológiai jegyei. A karok egymáshoz viszonyított hosszúsága szerint megkülönböztetünk metacentrikus, akrocentrikus és telocentrikus kromoszómákat. Másodlagos befűződés bármelyik típuson előfordulhat.

[Alternatív szöveg: 5. ábra: A kromoszómák három alapvető típusa és morfológiai jegyei.]

[Képaláírás: A karok egymáshoz viszonyított hosszúsága szerint megkülönböztetünk metacentrikus, akrocentrikus és telocentrikus kromoszómákat. Másodlagos befűződés bármelyik típuson előfordulhat.]

Az emberi kromoszómák egységes osztályozását 1960-ban, egy Denverben rendezett konferencián dolgozták ki. A 23 pár emberi kromoszómát autoszómákra és szex-kromoszómákra osztották fel. A szex kromoszómákat X és Y karakterrel, míg az autoszómákat 1-22-ig arab számokkal jelölték. Az autoszómákat méretük, a centromeron helyzete és a másodlagos befűződések alapján hét csoportba osztották. A csoportokat latin betűkkel (A-G) vagy római számokkal (I-VII) jelölték (1. táblázat).

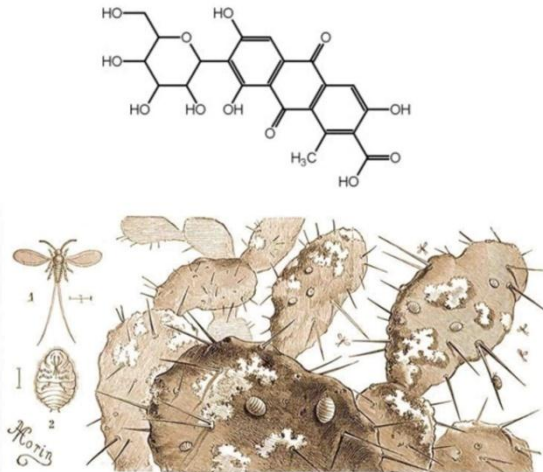
1. táblázat: Az emberi kromoszómák osztályozása

Csoport	Jellemzők	Kromoszómák száma	Centromeron index	Relatív hossz
I. vagy A	Nagyméretű metacentrikus	1	48	8,4
		2	39	8,0
		3	47	6,8
II. vagy B	Nagyméretű, szubmetacentrikus	4	29	6,3
		5	29	6,1
III. vagy C	Közepes nagyságú, szubmetacentrikus	6	39	5,9
		7	39	5,4
		8	34	4,9
		9	35	4,8
		10	34	4,6
		11	40	4,6
IV. vagy D	Közepes nagyságú, akrocentrikus, szatellitákkal	12	30	4,7
		13	17	3,7
		14	19	3,6
V. vagy E	Kisméretű, szubmetacentrikus	15	20	3,5
		16	41	3,4
		17	34	3,3
VI. vagy F	Kisméretű, metacentrikus	18	31	2,9
		19	47	2,7
VII. vagy G	Kisméretű, akrocentrikus	20	45	2,6
		21	31	1,9
X		22	30	2,0
		23	40	5,1
Y		24	27	2,2

▪ Kromoszómafestési eljárások

A kromoszómák festés nélkül csak fáziskontraszt vagy fluoreszcens mikroszkópos technikával láthatóak, ezért a kromoszómák fénymikroszkópos vizsgálatának érdekében számos kromoszómafestési technikát dolgoztak ki. Walter Flemminget például a bázikus anilin festék alkalmazása segítette a mikózis folyamatának tanulmányozásában. A *Drosophila melanogaster* óriás kromoszómái pedig orcein-ecetsavas festéssel tehetőek láthatóvá.

Széles körben elterjedt a kromoszómák kármin-ecetsavas festése. A kármin az amerikai kontinens trópusi vidékein és a Kanári szigeteken élő fügekaktuszon (*Opuntia coccinellifera*) élősködő bíbortetű (*Coccus cacti*) nőtényéből vonják ki (3. ábra). A kárminecetsav a kármin ecetsavas oldata. A citoplazmát rózsaszínűre, míg a kromoszómákat kékes-vöröses színűre festi.



6. ábra: A kármin. A kármint (jobbra fent) a fügekaktuszon (balra) élősködő bíortetű (jobbra lent) nőstény egyedeiből vonják ki.

[Alternatív szöveg: 3. ábra: A kármin]

[Képaláírás: A kármint (jobbra fent) a fügekaktuszon (balra) élősködő bíortetű (jobbra lent) nőstény egyedeiből vonják ki.]

■

■ Kromoszómasávozási technikák

A hasonló méretű és alakú kromoszómák megkülönböztetése nem egyszerű feladat. Ezért a citogenetikát forradalmasította a sávozási technikák megjelenése. Kiderült, hogy minden kromoszómának egyedi sávozási mintázata van. Ez jelentősen megkönnyítette az egyes kromoszómák azonosítását, illetve a kromoszóma rendellenességek kimutatását.

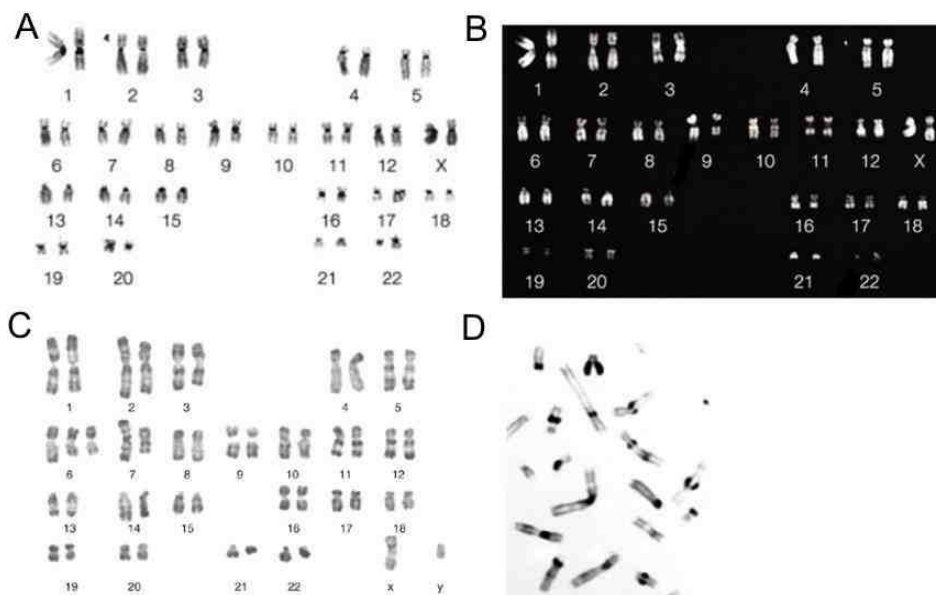
Az első kromoszómasávozási eljárást, a Q-sávozást Torbjorn Caspersson és munkatársai írták le 1970-ben. A Q-sávozás során egy fluoreszcens festékkel, a quinacrindihidro-kloriddal az adott kromoszómára jellemző, jól reprodukálható festődési mintázatot lehet kialakítani.

Azóta számos más sávozási eljárást kidolgoztak (4. ábra). Ilyenek a C-, az R- valamint a legelterjedtebb és a legnagyobb felbontást biztosító technika, a G-sávozás. A Q sávozástól eltérően a G-sávozás során a kromoszómákat a festés előtt valamilyen sóval vagy proteolitikus enzimmel, például tripszinnel kezelik. Ezt követően a kromoszómákat a Giemsa festék (a metilén kék és az eozin festékek keveréke) segítségével teszik láthatóvá.

Az R-sávozás segítségével a G mintázat negatívját kapjuk meg. Az R- sávozás során forró sóoldattal kezeljük a kromoszómákat, és ennek következtében az AT gazdag DNS régiók denaturálódnak. A kromoszómákat ezután festik meg Giemsa festékkel. Az R-sávozással különösen az kromoszómavégek

tanulmányozhatóak jól, mivel ezek általában gyengébben festődnek a G-sávozás során. A C-sávozás során a kromoszómákat savval vagy bázissal kezeljük elő. Ez az eljárás különösen a heterokromatikus régiók megfestésére alkalmas.

A sávok kialakulásának molekuláris oka a DNS bázisösszetételében és a helyi kromatinszerkezeti különbségekben rejlik. Általában a heterokromatikus, génben szegény, AT gazdag régiók sokkal sötétebben festődnek, míg a kevésbé kondenzált GC gazdag DNS-t tartalmazó eukromatikus régiókhoz a festék kisebb affinitással kötődik. Ezért fénymikroszkóposan a heterokromatin sötét, míg az eukromatin világos sávként jelenik meg (4. ábra) Az általánosan elterjedt G-sávozási technikák segítségével 400-600 sávot különböztethetünk meg egy metafázisos kromoszómán.



7. ábra: Különböző sávozási technikákkal létrehozott emberi kariogramok. G sávozással (A) és Q sávozással (B) létrehozott női kariogram. (C) R sávozási technikával készült férfi kariogramja. (D) C sávozással megjelenített emberi kromoszómák.

[Alternatív szöveg: 4. ábra: Különböző sávozási technikákkal létrehozott emberi kariogramok.]

[Képaláírás: G sávozással (A) és Q sávozással (B) létrehozott női kariogram. (C) R sávozási technikával készült férfi kariogramja. (D) C sávozással megjelenített emberi kromoszómák.]

▪ Tájékozódás a kromoszómán

A kromoszómák belüli tájékozódás megkönnyítése érdekében létre hozták a régiók és sávok elnevezésére szolgáló standard nevezéktant(ISCN= *International System for Human Cytogenetical*

Nomenclature). A kromoszóma karokat régiókra osztják. A régiók jellegzetes morfológiájú kromoszómaterületek. Számozásuk a centromertől kezdődik. A régiókat sávok tagolják. A sávok számozása egy régió belül szintén a centromer felől indul. A sávok alsávokra (*subband*) bonthatóak. Az X kromoszóma rövid karjának 2. régiójának 2. sávján belüli 3. alsáv jelölése a következőképpen alakul: Xp22.3.

A sávozási technikák segítségével azonosított kromoszóma rendellenességeket a 2. táblázatban feltüntetett módon nevezzük el. Az átrendeződés megnevezése után (például t = transzlokáció; del = deléció; dup = duplikáció; inv = inverzió) zárójelben tüntetjük fel az érintett kromoszóma területet.

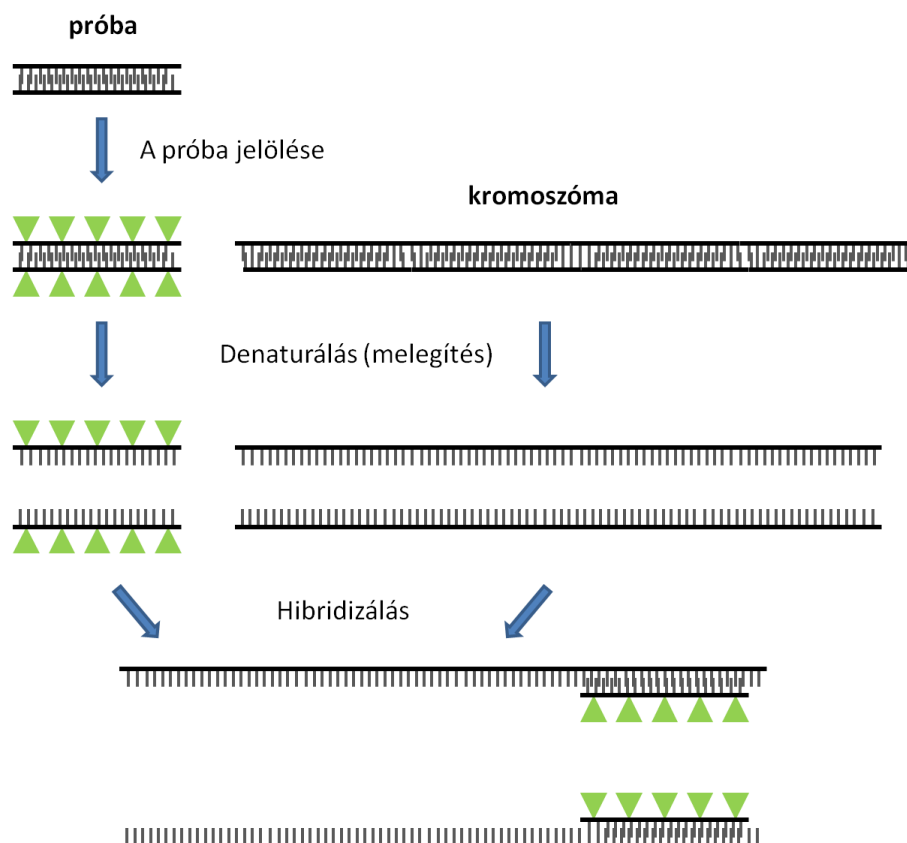
2. táblázat: Néhány gyakoribb kromoszóma átrendeződés elnevezése

Rövidítés	Jelentés	Példa	Leírás
		46, XX	Normális női kariotípus
		46, XY	Normális férfi kariotípus
cen	centromér		
del	deléció	46,XX,del(5p)	Macskasírás (<i>cri du chat</i>) szindrómás nő. Az 5-ös kromoszóma rövid karjának egy része hiányzik.
der	származtatott kromoszóma	der(1)	Az 1-es kromoszómából származó transzlokációval létrejött kromoszóma, amely az 1-es kromoszóma centromerjét tartalmazza.
dic	dientrikus kromoszóma	dic(X;Y)	Transzlokációval létrejött kromoszóma, amely az X és az Y kromoszóma centromerjét is tartalmazza.
dup	duplikáció		
inv	inverzió	inv(3)(p25;q21)	a 3-as kromoszóma pericentrikus inverziója.
mat	anyai eredetű	47,XY,der(1)mat	Férfi, aki az anyjától egy transzlokációs kromoszómát (der(1)) örökölt.
p	A kromoszóma rövid karja		
pat	apai eredetű		

q	A kromoszóma hosszú karja		
r	gyűrű kromoszóma	46,X,r(X)	Gyűrű X kromoszómával rendelkező nő
rcp	reciprok transzlokáció		
rob	Robertsoni transzlokáció		
t	transzlokáció	46,XX,t(2;8)(q21;p13)	Kiegyensúlyozott transzlokációs kromoszómával rendelkező nő. A 2-es kromoszóma rövid karja és 8-as kromoszóma hosszú karja cserélődött ki. A transzlokáció töréspontjai: 2q21 és 8p13.
+	<i>gain of</i>	47,XX,+21	A 21. kromoszómából 3 példányt hordozó (trisómia) Down kóros nő.
-	<i>loss of</i>	45,XX,-14,-21,+t(14q21q)	Normális nő. A 14-es és a 21-es kromoszómából Robertsoni transzlokációval létrejött kromoszómát hordoz. Egy-egy normális 14-es és 21-es kromoszómája hiányzik.

▪ Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

Az elmúlt néhány évtizedben egy forradalmian új módszer, a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika jelent meg a citogenetikában. A FISH lényege az, hogy egy fluoreszcens festékkel jelölt DNS vagy RNS próbát a vele komplementer DNS szekvenciához hibridizáltatnak a kromoszómán. Így a kromoszómákat fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva az adott DNS szekvencia elhelyezkedését a fluoreszcens jel mutatja (5. ábra).

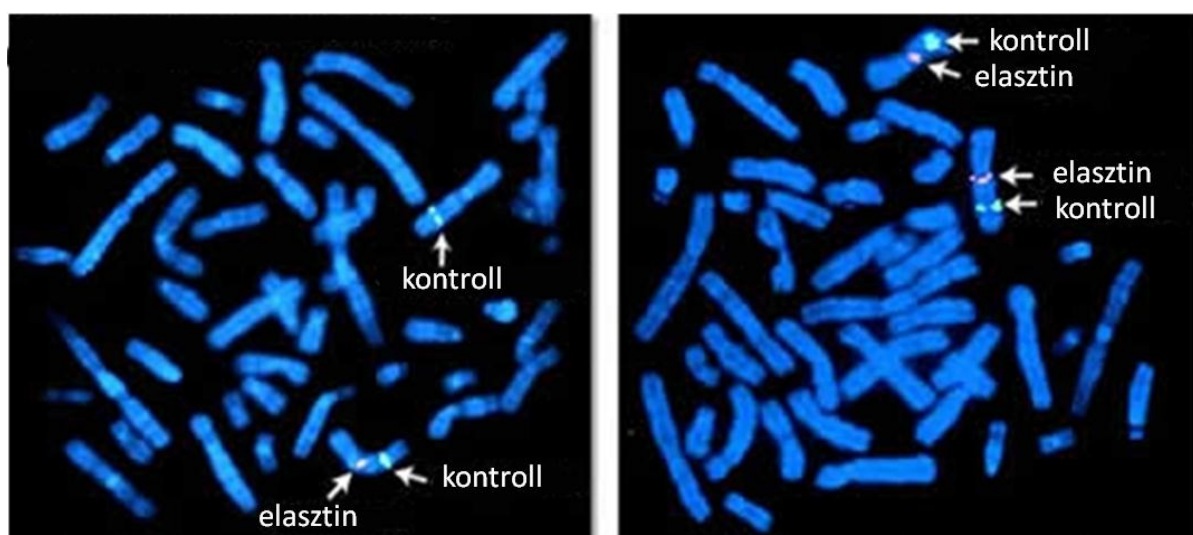


8. ábra: A fluoreszcens *in situ* hibridizáció elve. A próbát fluoreszcensen vagy más módon jelölik. A kettős szálú próbát és a vizsgált DNS-t hő segítségével denaturálják. A denaturált próbát és a vizsgált DNS-t összekeverik, és a renaturáció (hűtés) során a jelölt egyszálú próbák a velük komplementer DNS-hez hibridizálnak. Így az adott szekvencia megléte illetve elhelyezkedése a kromoszómán fluoreszcens mikroszkópiával detektálható.

[Alternatív szöveg: 9. ábra: A fluoreszcens *in situ* hibridizáció elve.]

[Képaláírás: A próbát fluoreszcensen vagy más módon jelölik. A kettős szálú próbát és a vizsgált DNS-t hő segítségével denaturálják. A denaturált próbát és a vizsgált DNS-t összekeverik, és a renaturáció (hűtés) során a jelölt egyszálú próbák a velük komplementer DNS-hez hibridizálnak. Így az adott szekvencia megléte illetve elhelyezkedése a kromoszómán fluoreszcens mikroszkópiával detektálható.]

A FISH technika lehetővé tette a kromoszóma átrendeződések egyszerűbb és finomabb vizsgálatát. Segítségével akár kisebb kromoszóma régiókat érintő kromoszómális átrendeződések is kimutathatóak (6. ábra).



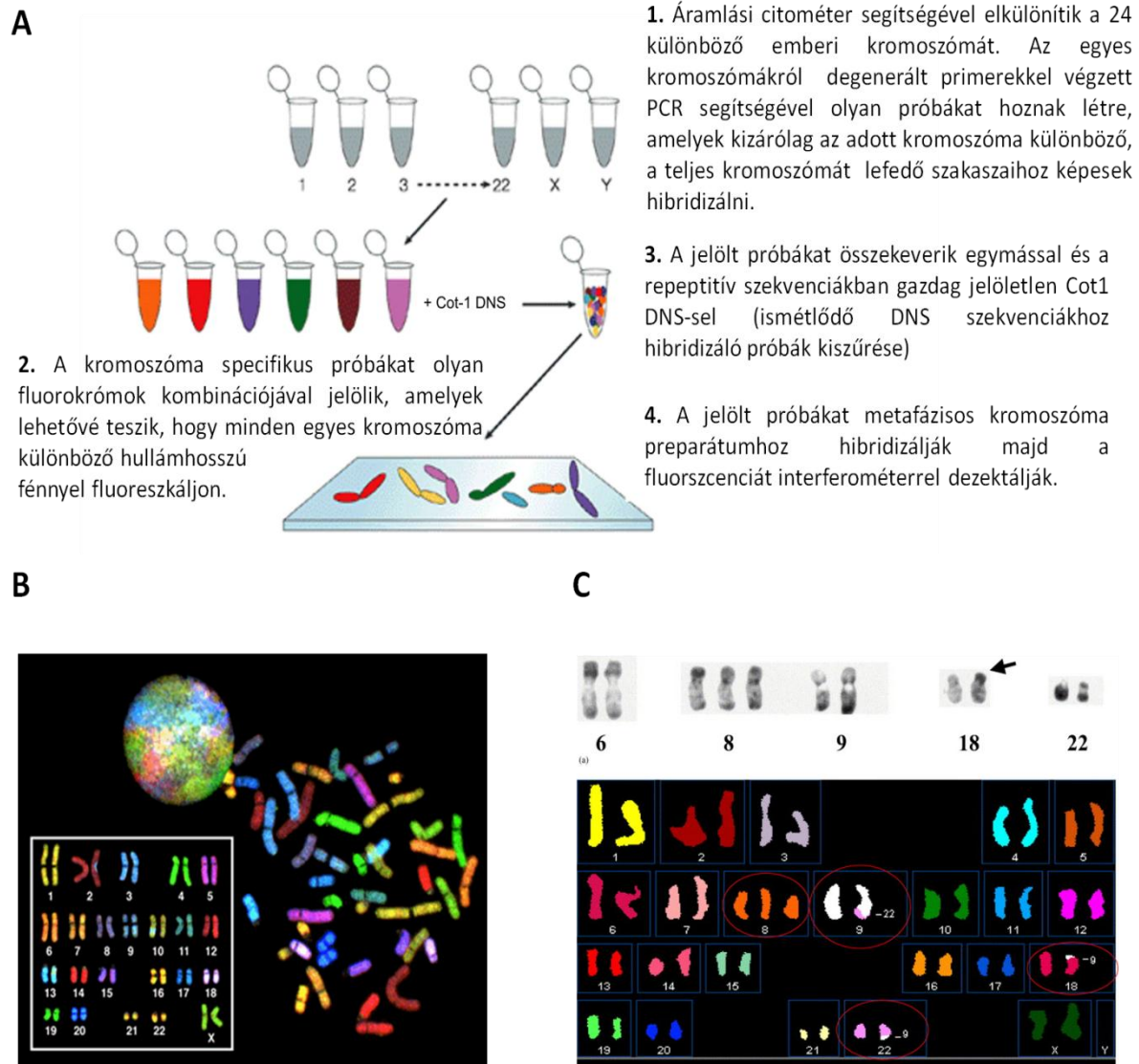
6. ábra: A Williams szindróma kimutatása FISH segítségével. A Williams szindrómás betegekben a 7. kromoszóma hosszú karján egy körülbelül 26 gént érintő deléció található. A hiányzó gének egyike az elastint kódolja. (A) Williams szindrómás beteg esetében a 7. kromoszómát kijelölő kontroll és az elastin génjére tervezett fluoreszcens próba csak az egyik 7. kromoszómán található meg együttesen. Az elastin próba a deléciós kromoszómához nem hibridizál. (B) Egészséges egyedekben a kontroll és az elastin génjére tervezett próba mindkét homológ kromoszómához hibridizál.

[Alternatív szöveg: 6. ábra: A Williams szindróma kimutatása FISH segítségével.]

[Képaláírás: A Williams szindrómás betegekben a 7. kromoszóma hosszú karján egy körülbelül 26 gént érintő deléció található. A hiányzó gének egyike az elastint kódolja. (A) Williams szindrómás beteg esetében a 7. kromoszómát kijelölő kontroll és az elastin génjére tervezett fluoreszcens próba csak az egyik 7. kromoszómán található meg együttesen. Az elastin próba a deléciós kromoszómához nem hibridizál. (B) Egészséges egyedekben a kontroll és az elastin génjére tervezett próba mindkét homológ kromoszómához hibridizál.]

A spektrális kariotipizálás segítségével akár az ember 24különböző kromoszómája külön-külön színben jeleníthető meg. A módszer során olyan jelölt DNS próbákat használnak, amelyek kizárólag egy adott kromoszómához képesek hibridizálni. Ilyen próbák előállításához az egyes kromoszómákat áramlási citométer segítségével szétválasztják, majd a rövid degenerált oligonukleotid primereket

felhasználva az egyes kromoszómákra specifikus DNS szakaszokat szaporítanak fel PCR reakcióval. Az adott kromoszóma-specifikus próbákat egy vagy több fluorokrómmal jelölik. Így a különböző módon jelölt kromoszómák eltérő hullámhosszú fénnel fluoreszkálnak. (7. ábraA és B).



7. ábra:A spektrális kariotipizálás. (A) A spektrális kariotipizálás elve. (B) Az ember spektrális kariotípusa. (C) Egy leukémiás beteg sejtjeinek R-sávozással készült részleges kariotípusa (fent) és ugyanezen beteg spektrális kariotípusa(lent). Az R sávozás segítségével a 18. kromoszómán található idegen kromoszóma részlet (nyíl) eredete nem határozható meg. A spektrális kariotípus alapján azonban megállapítható, hogy ez a kromoszóma részlet a 9. kromoszómáról származik. A további nagyobb kromoszóma rendellenességeket karikák jelölik.

[Alternatív szöveg: 7. ábra:A spektrális kariotipizálás.]

[Képaláírás: (A) A spektrális kariotipizálás elve. (B) Az ember spektrális kariotípusa. (C) Egy leukémiás beteg sejtjeinek R-sávozással készült részleges kariotípusa (fent) és ugyanezen beteg spektrális kariotípusa(lent). Az R sávozás segítségével a 18. kromoszómán található idegen kromoszóma részlet (nyíl) eredete nem határozható meg. A spektrális kariotípus

alapján azonban megállapítható, hogy ez a kromoszóma részlet a 9. kromoszómáról származik. A további nagyobb kromoszóma rendellenességeket karikák jelölik.]

A FISH technikát ma már rutinszerűen használják a klinikai diagnosztikában. Gén specifikus próbák használatával meg lehet határozni azokat a géneket, amelyeket az adott kromoszóma átrendeződés érint. A spektrális kariotipizálás lehetőséget nyújt arra, hogy néhány óra alatt ki lehessen mutatni a kromoszóma átrendeződéseket és kromoszóma számban bekövetkező változásokat (7. ábra C).

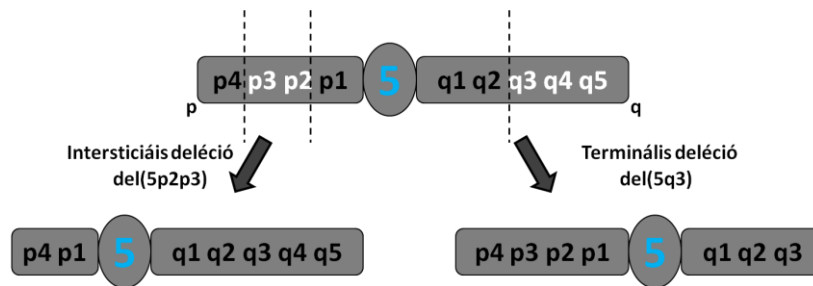
○ **A kromoszóma mutációk**

A kromoszómák száma és szerkezete fajra jellemző tulajdonság. Egy fajon belül az ettől való eltérést kromoszóma mutációnak nevezzük. A kromoszóma mutációknak alapvetően két típusát különböztetjük meg. A kromoszóma átrendeződések a kromoszómák szerkezetét érintik. Ilyenek például a kromoszómán belüli duplikációk és deléciók. Ha a fajra jellemző kromoszómaszámban történik változás, akkor kromoszómaszám változással járó mutációkról beszélünk. Az aneuploidia esetén az adott egyed a fajra jellemző kromoszómakészlettel eltérő számú - kevesebb vagy több - kromoszómával rendelkezik. Poliploidia esetén teljes kromoszóma készletmegtöbbszöröződése figyelhető meg.

▪ **Kromoszómaátrendeződések**

A kromoszóma átrendeződések olyan változásokat okoznak a kromoszómák szerkezetében, amelyek a citogenetika eszköztárával tetten érhetőek. Általában egynél több gént érintenek és hatásukra a fenotípus is megváltozik. Négyféle kromoszóma átrendeződést különböztetünk meg. Ezek a deléció, a duplikáció, az inverzió valamint a transzlokáció.

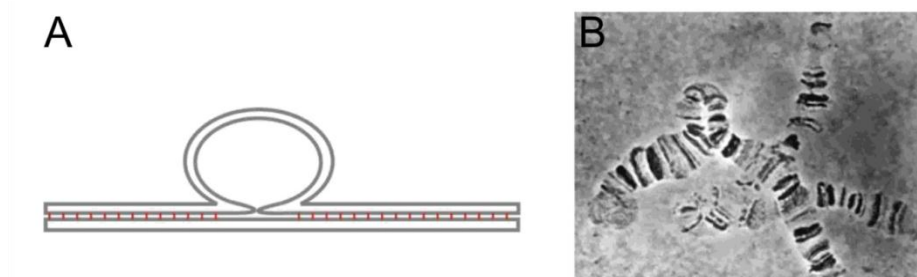
A **deléció** alatt egy kromoszóma régió kiesését értjük (8. ábra). Az általa okozott mutáció nem revertálható és sok esetben letális. A delécióra heterozigóta egyedek meiózisének profázisában a homológ kromoszómák párosodása során a vad típusú kromoszóma azon szakasza, amely a deléciót hordozó kromoszómából hiányzik, kihurkolódik. Ez az úgynevezett deléciós hurok jól megfigyelhető a *Drosophila melanogaster* politén óriás kromoszómáin is (9. ábra).



8. ábra: A deléció a kromoszómatörés következtében jön létre. Egy töréspont (szaggatott vonal) esetén terminális, míg két töréspont esetén intersticiális delécióról beszélünk. p1-p4 és q1-q5: kromoszóma régiók. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli.

[Alternatív szöveg: 8. ábra: deléció a kromoszómatörés következtében jön létre.]

[Képaláírás: Egy töréspont (szaggatott vonal) esetén terminális, míg két töréspont esetén intersticiális delécióról beszélünk. p1-p4 és q1-q5: kromoszóma régiók. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli.]

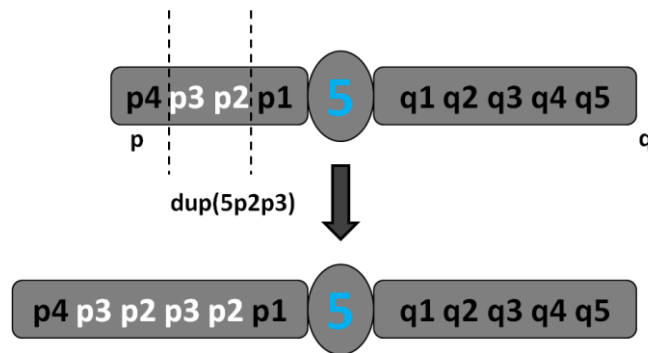


9. ábra: A deléció citológiai megjelenése a deléciós hurok. (A) Egy delécióra heterozigóta egyed meiózisa során a vad típusú kromoszóma megfelelő szakasza kihurkolódik, deléciós hurok alakul ki. (B) Deléciós hurok *Drosophila melanogaster* politén kromoszómán.

[Alternatív szöveg: 9. ábra A deléció citológiai megjelenése a deléciós hurok.]

[Képaláírás: (A) Egy delécióra heterozigóta egyed meiózisa során a vad típusú kromoszóma megfelelő szakasza kihurkolódik, deléciós hurok alakul ki. (B) Deléciós hurok *Drosophila melanogaster* politén kromoszómán.]

A **duplikáció** esetében egy kromoszóma régió megkétszereződik. Hasonlóan a delécióhoz a duplikációs heterozigóták a meiózisában is megfigyelhetünk duplikációs hurkot, de ebben az esetben a duplikációt hordozó kromoszóma megkettőződött szakaszainak egyike hurkolódik ki (10. ábra).

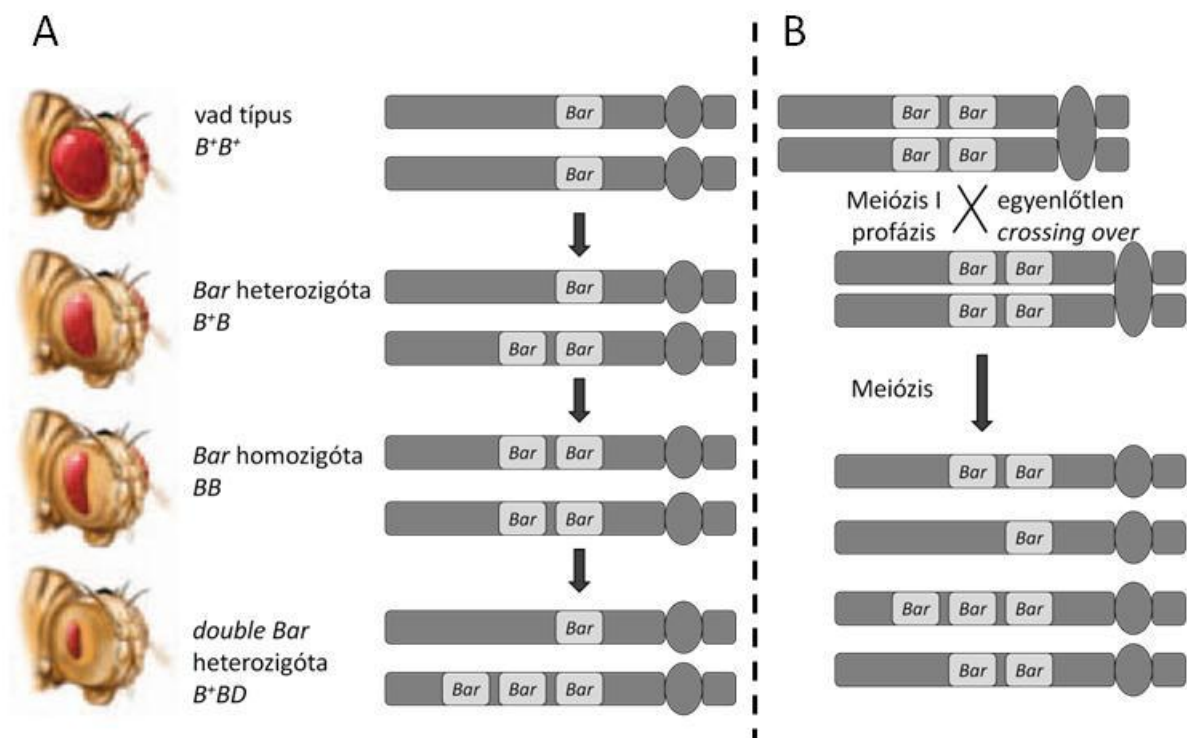


10. ábra: A duplikáció kromoszómatörés következtében jön létre. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p4 és q1-q5: kromoszóma régiók. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli.

[Alternatív szöveg: 10. ábra: A duplikáció kromoszómatörés következtében jön létre.]

[Képaláírás: Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p4 és q1-q5: kromoszóma régiók. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli.)

A duplikáció következtében általában nem alakul ki fenotípusos változás. Ha viszont igen, akkor ez könnyen revertálódhat. Jó példa erre a muslica résszemű mutációja a *Bar* (11. ábra).

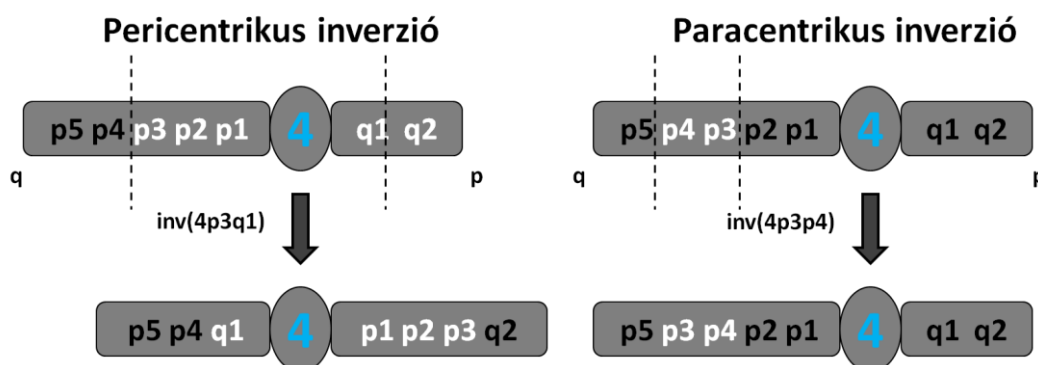


11. ábra: A duplikációk fenotípusos változásokat okozhatnak. (A) Az egyedfejlődés során bizonyos fehérjék egymáshoz viszonyított arányának megváltozása fejlődési rendellenességek kialakulásához vezethet. Egy adott fehérje mennyisége gyakorta arányos a fehérjét kódoló gén példányszámával. A *D. melanogaster* résszemű (Bar) fenotípus kialakulásának hátterében az X kromoszóma 16 A régiójának duplikációja áll. A 16 A régióban található gének példányszámának növekedésével arányosan nő a Bar fenotípus súlyossága. (B) A Bar (BB) állatok meiózisa során a homológ kromoszómák közötti egyenlőtlen *crossing-over* következtében vad típusú illetve triplikációs X kromoszómák is képződhetnek. BB legyek tenyésztésében ezért időnként megjelenhetnek vad típusú és Ultrabar legyek is. A Bar mutáció tehát revertálódhat.

[Alternatív szöveg: 11. ábra: A duplikációk fenotípusos változásokat okozhatnak.]

[Képalírás: (A) Az egyedfejlődés során bizonyos fehérjék egymáshoz viszonyított arányának megváltozása fejlődési rendellenességek kialakulásához vezethet. Egy adott fehérje mennyisége gyakorta arányos a fehérjét kódoló gén példányszámával. A *D. melanogaster* résszemű (Bar) fenotípus kialakulásának hátterében az X kromoszóma 16 A régiójának duplikációja áll. A 16 A régióban található gének példányszámának növekedésével arányosan nő a Bar fenotípus súlyossága. (B) A Bar (BB) állatok meiózisa során a homológ kromoszómák közötti egyenlőtlen *crossing-over* következtében vad típusú illetve triplikációs X kromoszómák is képződhetnek. BB legyek tenyésztésében ezért időnként megjelenhetnek vad típusú és Ultrabar legyek is. A Bar mutáció tehát revertálódhat.]

Az **inverzió**ál egy kromoszóma szakasz 180 fokal fordulása történik meg egy kromoszómán belül. Ha az inverzió töréspontjai a centomert fogják közre, akkor az inverzió pericentrikus. Ha az inverzió nem érinti a centromert akkor paracentrikus inverzióról beszélünk. A delécióval és duplikációval ellentétben az inverzió következtében nem történik mennyiségi változás a genetikai anyagban.



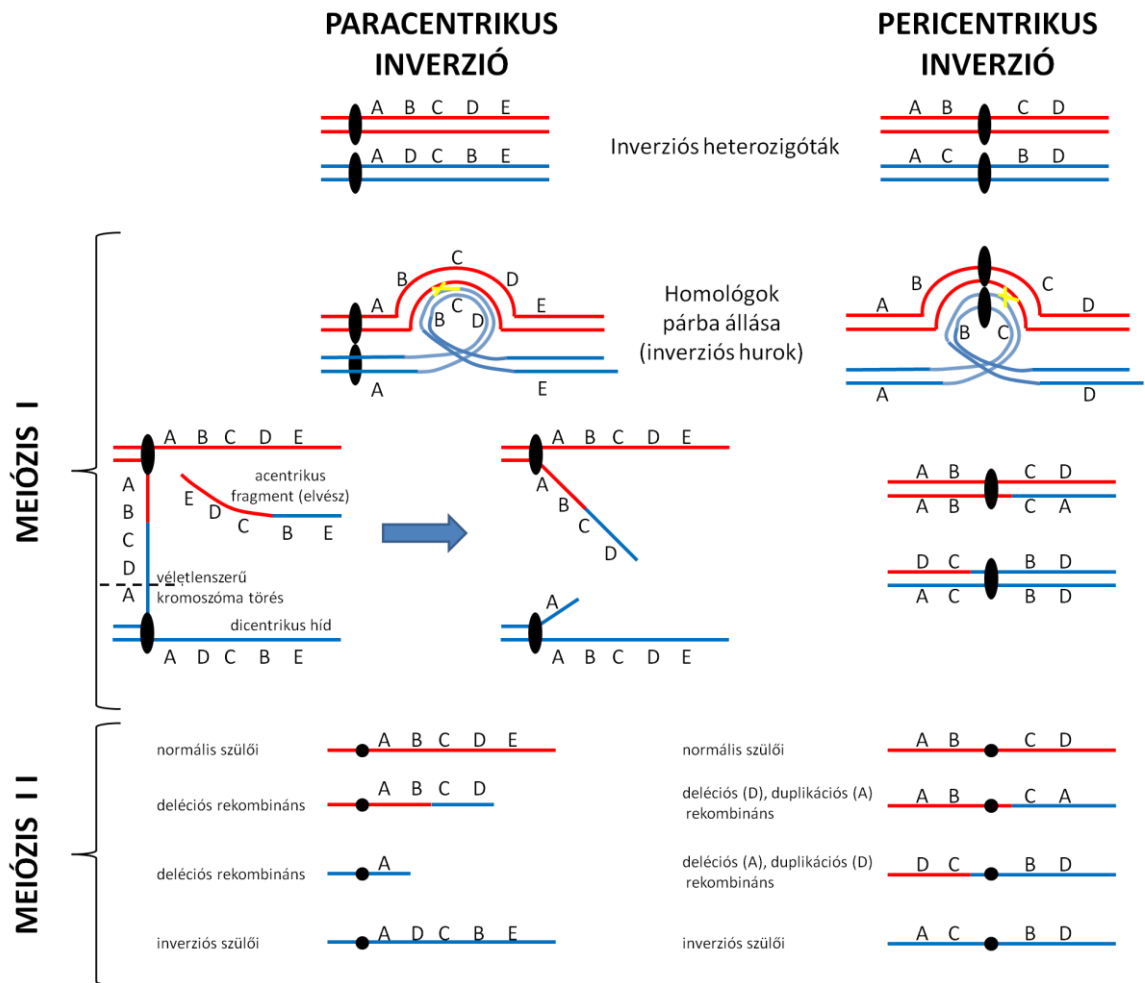
12. ábra: Inverziók. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p5 és q1-q5: kromoszóma régiók).

[Alternatív szöveg: 12. ábra: Inverziók.]

[Képalírás: Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p5 és q1-q5: kromoszóma régiók.)

Az inverziós mutánsok gyakran életképesek és nem mutatnak fenotípust kivéve, ha az inverziós töréspont egy génen belül van, vagy ha a töréspont közelében elhelyezkedő gén megváltozott genomi környezetbe kerül és a cisz szabályozó elemek összetétele és így a gén kifejeződésének szabályozása megváltozik. Ez az úgynevezett **pozíciós hatás**.

Az inverziós heterozigótákban a homológok párosodása során a meiózis profázisában, illetve a *Drosophila* óriás kromoszómáin jellegzetes képződmény, az úgynevezett **inverziós hurok** figyelhető meg. Inverziós heterozigótákban a homológ kromoszómák párosodása akadályozott ezért az inverzió kívüli, de ahhoz közel eső szakaszokban az átkereszteződések aránya elmarad a kromoszóma más régióiban tapasztalható értékektől. Ezért az inverziós heterozigóták igen kevés a rekombináns ivarsejtet képeznek. Ennek okait a 13. ábra szemlélteti. A balanszer kromoszómák is inverziók rekombinációt gátló hatását használják ki.



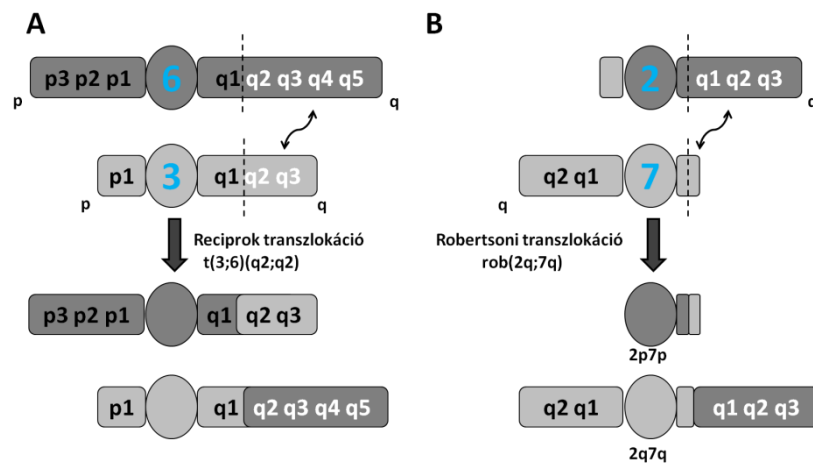
13. ábra: Inverziós heterozigóták meiózisa. Para- és pericentrikus inverziós heterozigóta meiózisa során egyaránt inverziós hurok alakul ki a homológok párosodásakor. Az inverziós hurkon belül bekövetkező átkereszteződések mindkét esetben kiegyensúlyozatlan rekombináns gaméták képződéséhez vezetnek. Az inverziók tehát meggátolják a rekombináns egyedek kialakulását.

[Alternatív szöveg: 13. ábra: Inverziós heterozigóták meiózisa.]

[Képaláírás: Para- és pericentrikus inverziós heterozigóta meiózisa során egyaránt inverziós hurok alakul ki a homológok párosodásakor. Az inverziós hurkon belül bekövetkező átkereszteződések mindkét esetben kiegyensúlyozatlan rekombináns gaméták képződéséhez vezetnek. Az inverziók tehát meggátolják a rekombináns egyedek kialakulását.]

Transzlokáció során egy kromoszóma részlete egy másik kromoszómára helyeződik át, vagyis az információ tartalom nem változik. Kivételt jelentenek azok az esetek, ahol a töréspont egy génen belül található vagy a már említett pozíciós hatás érvényesül. A nem reciprok transzlokáció esetén a

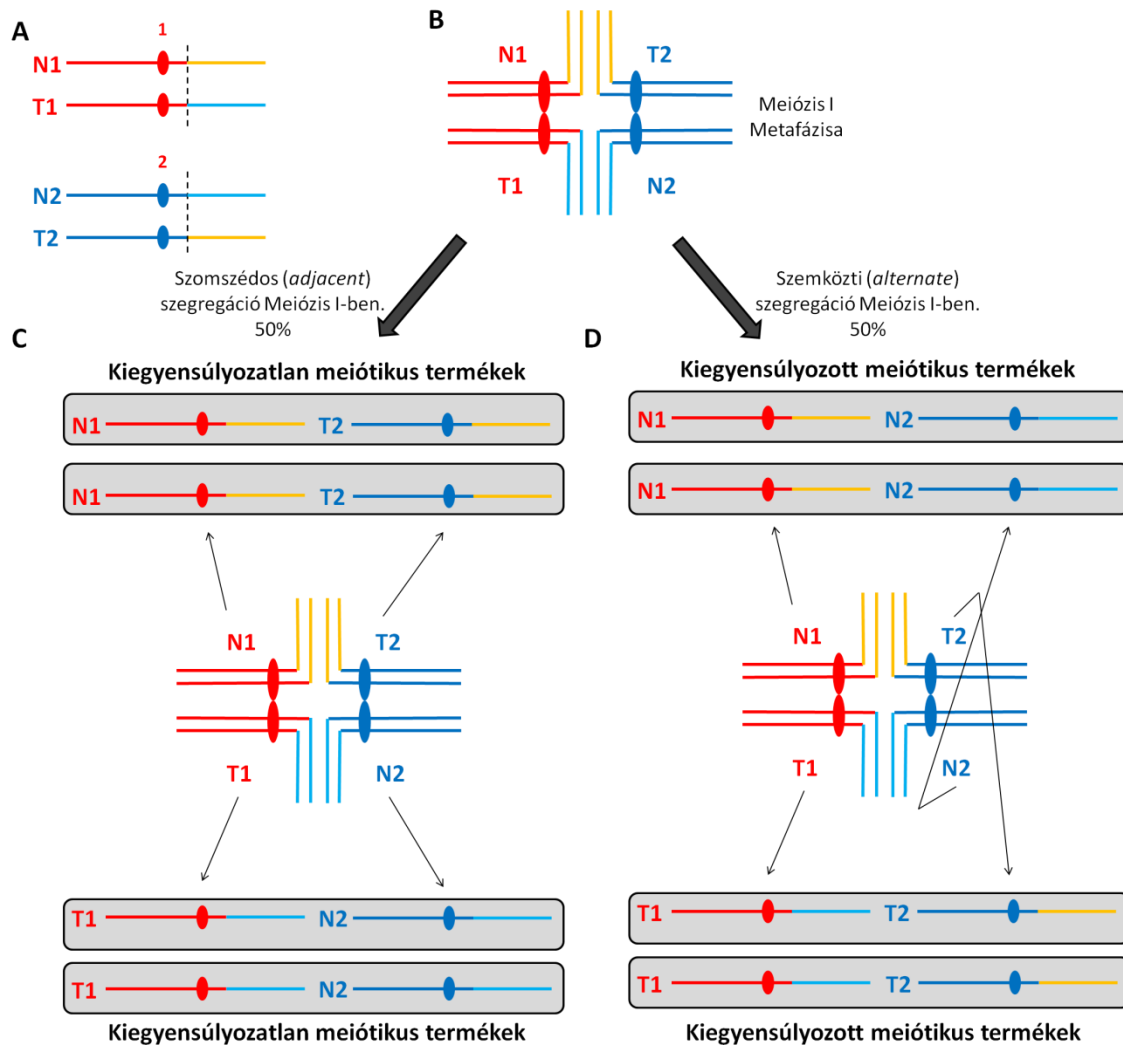
genetikai anyag mozgása egyirányú. Reciprok transzlokáció esetén azonban a két nem homolog kromoszóma között a genetikai anyag kölcsönösen kicserélődik.



14. ábra: Transzlokációk. (A) reciprok transzlokáció. (B) Roberstsoni transzlokáció. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p3 és q1-q5: kromoszóma régiók.

[Alternatív szöveg: 14. ábra: Transzlokációk.]

[Képalírás: (A) reciprok transzlokáció. (B) Roberstsoni transzlokáció. Az ellipszis a centromeront, a benne lévő kék szám a kromoszóma számát jelöli. (töréspont: szaggatott vonal; p1-p3 és q1-q5: kromoszóma régiók.)



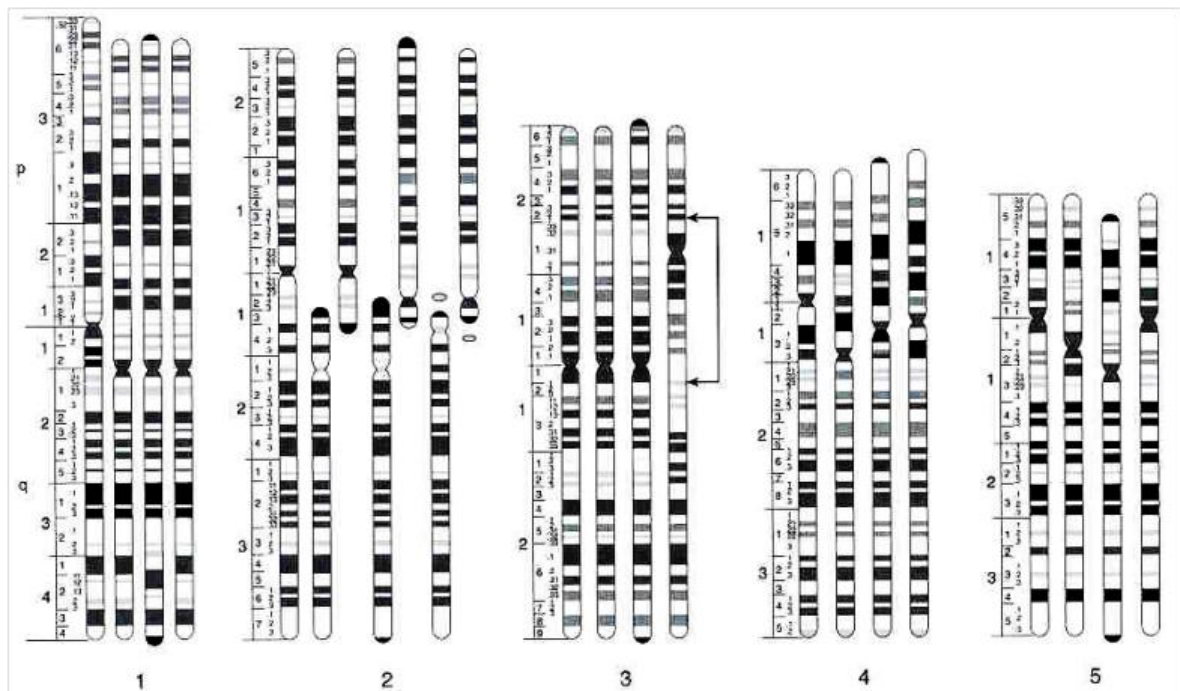
15. ábra: Egy reciprok transzlokációs heterozigóta meiózisa. (A) reciprok transzlokáció úgy jön létre, hogy két nem homológ kromoszómán (N1. és N2.) egy-egy törés keletkezik és az acentrikus kromoszóma részletek a másik, nem homológ kromoszómával forrnak össze (T1 és T2). Az ilyen egyed általában életképes, benne a genetikai információ mennyisége és tartalma általában változatlan marad. (B) Meiózis I-ben jellegzetes kereszt alakban párosodik a két vad típusú nem-homológ (N1 és N2) és a két transzlokációs kromoszóma (T1 és T2). (C) Szomszédos szegregáció esetén anafázis I-ben egy vad típusú és egy transzlokációs kromoszóma szegregál együtt (N1 és T2 illetve T1 és N2). Az így létrejött meiótikus termékek kiegyensúlyozatlanok, és legtöbbször életképtelen utód képződéséhez vezetnek. (D) Váltakozó szegregáció esetén két vad típusú (N1 és N2) illetve két transzlokációs kromoszóma (T1 és T2) szegregál együtt. Mivel az így létrejött ivarsejtek kiegyensúlyozottak, belőlük általában egészséges utód fejlődik. Az ábrán nincs feltüntetve, de ritkán (>1%) a homológ centromeronnal rendelkező kromoszómák (N1 és T1, illetve N2 és T2) szegregálnak együtt. Ez a II-es típusú szomszédos szegregáció. Ebben az esetben is kiegyensúlyozatlan gaméták keletkeznek.

[Alternatív szöveg: 15. ábra: reciprok transzlokációs heterozigóta meiózisa.]

[Képaláírás: (A) reciprok transzlokáció úgy jön létre, hogy két nem homológ kromoszómán (N1. és N2.) egy-egy törés keletkezik és az acentrikus kromoszóma részletek a másik, nem homológ kromoszómával forrnak össze (T1 és T2). Az ilyen egyed általában életképes, benne a genetikai információ mennyisége és tartalma általában változatlan marad. (B) Meiózis I-ben jellegzetes kereszt

alakban párosodik a két vad típusú nem-homológ (N1 és N2) és a két transzlokációs kromoszóma (T1 és T2). (C) Szomszédos szegregáció esetén anafázis I-ben egy vad típusú és egy transzlokációs kromoszóma szegregál együtt (N1 és T2 illetve T1 és N2). Az így létrejött meiótikus termékek kiegyensúlyozatlanok, és legtöbbször életképtelen utód képződéséhez vezetnek. (D) Váltakozó szegregáció esetén két vad típusú (N1 és N2) illetve két transzlokációs kromoszóma (T1 és T2) szegregál együtt. Mivel az így létrejött ivarsejtek kiegyensúlyozottak, belőlük általában egészséges utód fejlődik. Az ábrán nincs feltüntetve, de ritkán (>1%) a homológ centromeronnal rendelkező kromoszómák (N1 és T1, illetve N2 és T2) szegregálnak együtt. Ez a II-es típusú szomszédos szegregáció. Ebben az esetben is kiegyensúlyozatlan gaméták keletkeznek.]

A transzlokációk eredményeképpen jelentősen megváltozhat a kromoszómák morfológiája. A **Robertsoni transzlokáció** során egy akrocentrikus kromoszóma hosszú karját és egy másik akrocentrikus kromoszóma rövid karját alkotó kromoszóma részlet cserélődik ki kölcsönösen. Az eredmény egy nagy metacentrikus és egy apró metacentrikus kromoszóma. A kisebb kromoszóma gyakran elveszhet, mert szegregálódik megfelelően a meiózis során. Összességében tehát a Robertsoni transzlokáció a kromoszómaszám csökkenéséhez vezethet. A transzlokációknak fontos szerepe van a kariotípusok evolúciójában. A főemlősök közül a csimpánzok, a gorillák és az orángutánok diploid kromoszómaszáma, $2n = 48$. Az ember diploid kromoszómaszáma $2n = 46$. Ha a kromoszómák sávozási mintázatát gondosan tanulmányozzuk, akkor látható, hogy a humán 2. nagy metacentrikus kromoszóma két ősi akrocentrikus kromoszóma Robertsoni transzlokációjával jött létre. A kis metacentrikus kromoszóma pedig elveszett az idők folyamán (16. ábra).



16. ábra: A transzlokációk a kromoszómaszám megváltozásához vezethetnek. Az ember diploid kromoszómaszáma ($2n = 46$) valószínűleg egy Robertsoni transzlokáció és egy kromoszóma elvesztése következtében alakult ki.

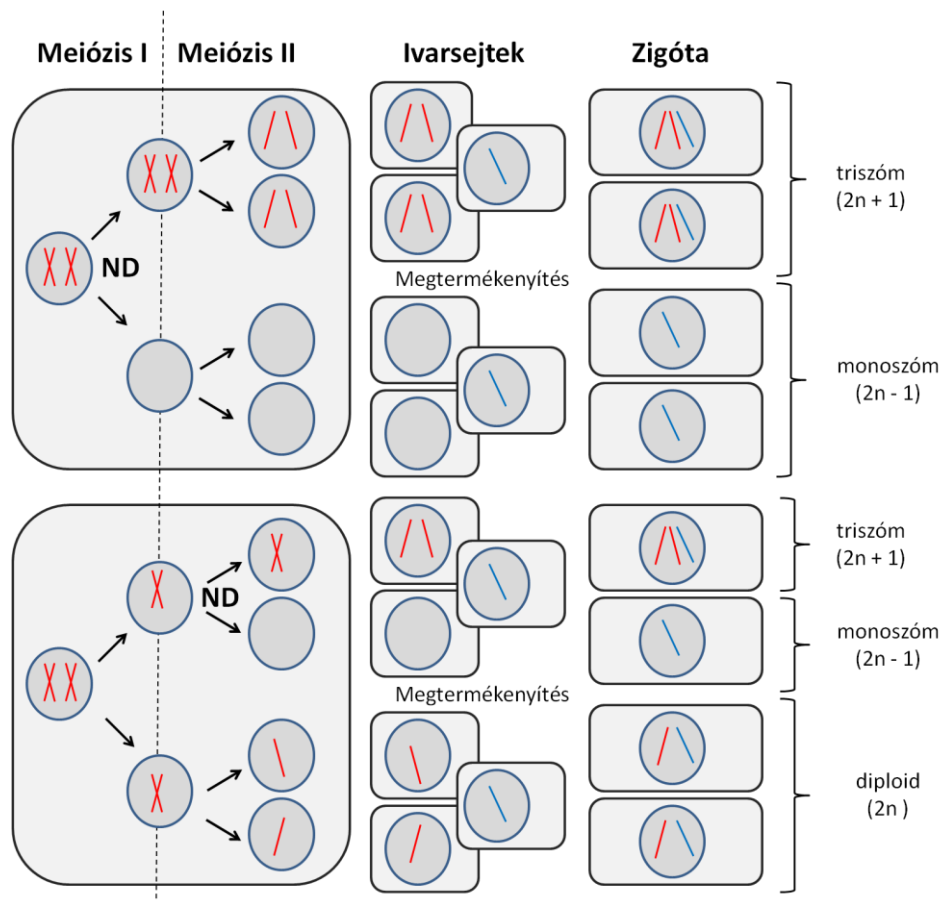
[Alternatív szöveg: 16. ábra: A transzlokációk a kromoszómaszám megváltozásához vezethetnek.]

[Képaláírás: Az ember diploid kromoszómaszáma ($2n = 46$) valószínűleg egy Robertsoni transzlokáció és egy kromoszóma elvesztése következtében alakult ki.]

▪ A kromoszómák számában bekövetkező változások

• *Aneuploídia*

Egy többsejtű eukarióta szervezet euploid ha az alap kromoszómaszám egész számú többszörösével rendelkezik testi sejtjeiben (pl.: haploid, diploid, vagy poliploid). Ha azonban egy egyed az alap kromoszóma készlethez képest egy vagy több kromoszómával kevesebb vagy több kromoszómával rendelkezik, akkor az **aneuploid**. Az aneuploídia kialakulhat egy Robertsoni transzlokációt követő kromoszómavesztéssel, vagy a meiózis illetve a mitózis során **kromoszóma nondiszjunkció** következtében(17. ábra).



17. ábra: Az aneuploidia kromoszóma non diszjunkcióval jön létre. A kromoszóma non diszjunkció attól függően, hogy a meiózis I. vagy a Meiózis II. során is következik be, eltérő meiótikus termékek keletkezéséhez vezethet.

[Alternatív szöveg: 17. ábra: Az aneuploidia kromoszóma non diszjunkcióval jön létre.]

[Képaláírás: A kromoszóma non diszjunkció attól függően, hogy a meiózis I. vagy a Meiózis II. során is következik be, eltérő meiótikus termékek keletkezéséhez vezethet.]

Diploid szervezetekben a leggyakoribb aneuploidok a **nullizómok**. Az ilyen egyedek mindkét homológ kromoszómájukat elvesztették. Kromoszómakészletüket $2n-2$, ahol n a haploid kromoszómaszám. A **monoszómok** egyetlen kromoszómát vesztek el. Jelölésük $2n-1$. **Triszómia** ($2n+1$) akkor alakul, ki ha az egyed egy kromoszómával többel rendelkezik a normálisnál. **Tetraszómiáról** akkor beszélünk, ha két extra homológ kromoszómára tett szert az egyed. Egy egyedben egyszerre több aneuploidiát eredményező mutációs esemény is bekövetkezhet. Ilyenek például a dupla triszómiások, amelyek két nem homológ kromoszómából is egy-egy extra példányt hordoznak ($2n+1+1$).

Az aneuploidia következtében egyes gének példányszáma és dózisa megváltozik, így a géntermékek közötti egyensúly felborul. Ez pedig általában összeegyeztethetetlen a normális egyedfejlődéssel. Ez az oka annak, hogy az ember esetében az aneuploid embriók mindössze két százaléka születik meg. Az élve született aneuploidokban általában az ivari kromoszómák száma tér el a normálistól (3. táblázat). Az autoszómális aneuploidok túlnyomó többsége spontán elvetél, kizárólag néhány kisebb autoszóma számának megváltozása esetén születnek meg élve. Ennek oka valószínűleg az, hogy akisebb kromoszómákon kevesebb gén található, vagyis a géntermékek egyensúlyában is kisebb mértékű a zavar. Emberben a legelterjedtebb autoszómális aneuploidia a 21. kromoszóma triszómiája, amely a **Down kórt** okozza.

3. táblázat: Néhány gyakoribb emberi aneuploidia

Betegség	Jelölés	Tünetek
Turner szindróma	45, X (monoszómia)	Normális szellemi képességű steril nő. Sokszor alacsony növésűek.
Down kór	47, XX vagy XY, +21 (triszmia)	Általában szellemileg enyhén visszamaradottak. Az ízületek nagyon lazák, a testmagasság alacsony, a mozgás esetlen. Megnövekedett hajlamuk van a leukémiára.
Edwards szindróma	47, XX vagy XY, +18 (triszmia)	Súlyos szív rendellenességek, általában kis méretű orr és száj, abnormális fülek. Szellemileg súlyosan visszamaradottak.
Patau szindróma	47, XX vagy XY, +13 (triszmia)	Szemük kicsi vagy hiányzik. Néha egyetlen összeolvadt szemmel rendelkeznek az arcuk közepén. Szellemileg súlyosan visszamaradottak. Ritkán élnek meg az egyéves kort.
Klinefelter szindróma	47, XXY	Alulfejlett herék, terméketlenség, nőies testalkat, gyakran pszichés zavarok.
Tripla-X szindróma	47, XXX	Többségük az átlagosnál magasabb, fogamzóképes nő. A női nemi szervek lehetnek szabályosak vagy gyengén fejlettek. Gyakoribbak a tanulási nehézségek, gyengébb izomtónus, és viselkedési problémák.
Szuperférfi vagy XYY szindróma	47, XYY	Gyakorta magasabb növésű, sokszor alacsonyabb intelligenciájú férfi.

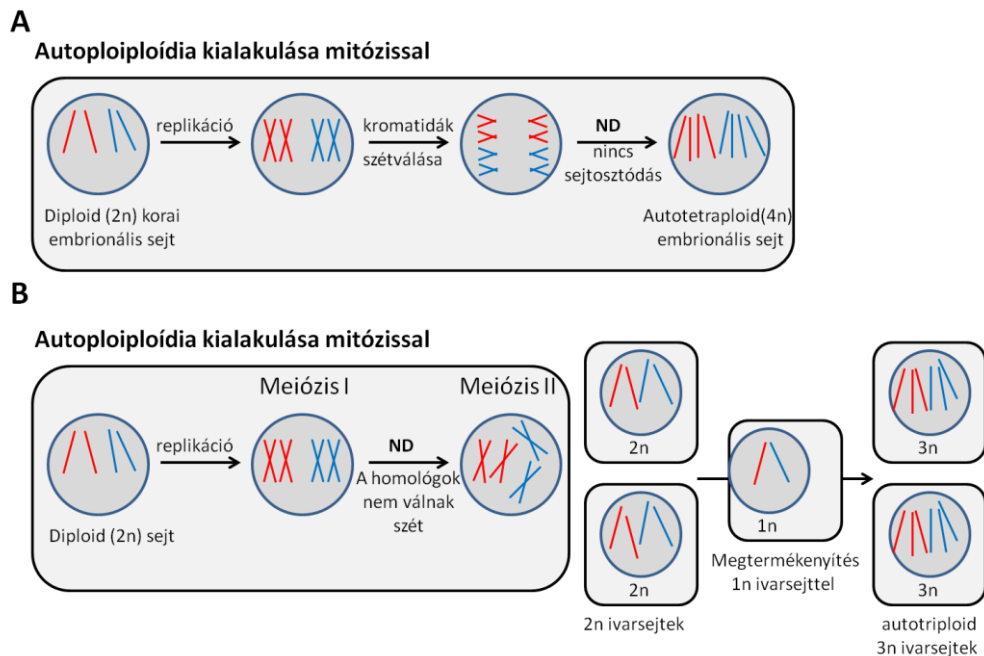
• **Poliploidia**

Az eukarióta szervezetek többsége életciklusa nagyobbik részében diploid ($2n$). A diploidokban minden kromoszóma két homológ példányban van jelen, vagyis kétszeres kromoszóma készlettel

rendelkeznek. A kromoszóma készletük egyik felét az apától a másikat az anyától öröklék. A soksejtű eukarióták ivarsejtjeiben és a haploid élőlények testi sejtjeiben azonban minden kromoszóma csak egyetlen példányban van jelen. A kromoszóma készlet többszörös vagyis poliploid ha a kromoszóma készletek száma az alap kromoszóma számnak (x) kettőnél nagyobb számú többszöröse. Például: $3x$ = triploid, $4x$ = tetraploid, $5x$ = pentaploid, $6x$ = hexaploid. A poliploidia a növények körében a legelterjedtebb. A fajképződés igen gyakori módja ez. A virágos növények 40 a fűvek 70 százaléka poliploid (4. táblázat). Az állatvilágban a poliploidia ritka jelenség. Egyes halak, békák és szalamandrák esetében fordul elő.

Aszerint, hogy a poliploidok egyetlen faj kromoszóma készletét, vagy több különböző faj kromoszóma készletét tartalmazzák több példányban, megkülönböztetünk **autopoliploid** illetve **alloploid** szervezeteket.

Az **autopoliploidok** létrejöhetnek úgy, hogy egy korai diploid ($2n$) embrió mitózisában az egyik testvér kromatida sem válik szét az anafázis során és így a diploid szervezetből tetraploid ($4n$) szervezet jön létre (18. ábra A). Ha egy diploid szervezetben meiótikus nondisjunkció következtében $2n$ kromoszómakészletű ivarsejt képződik és ez egy normális haploid (n) ivarsejttel képez zigótát akkor autotriploidia alakulhat ki (18. ábra B).

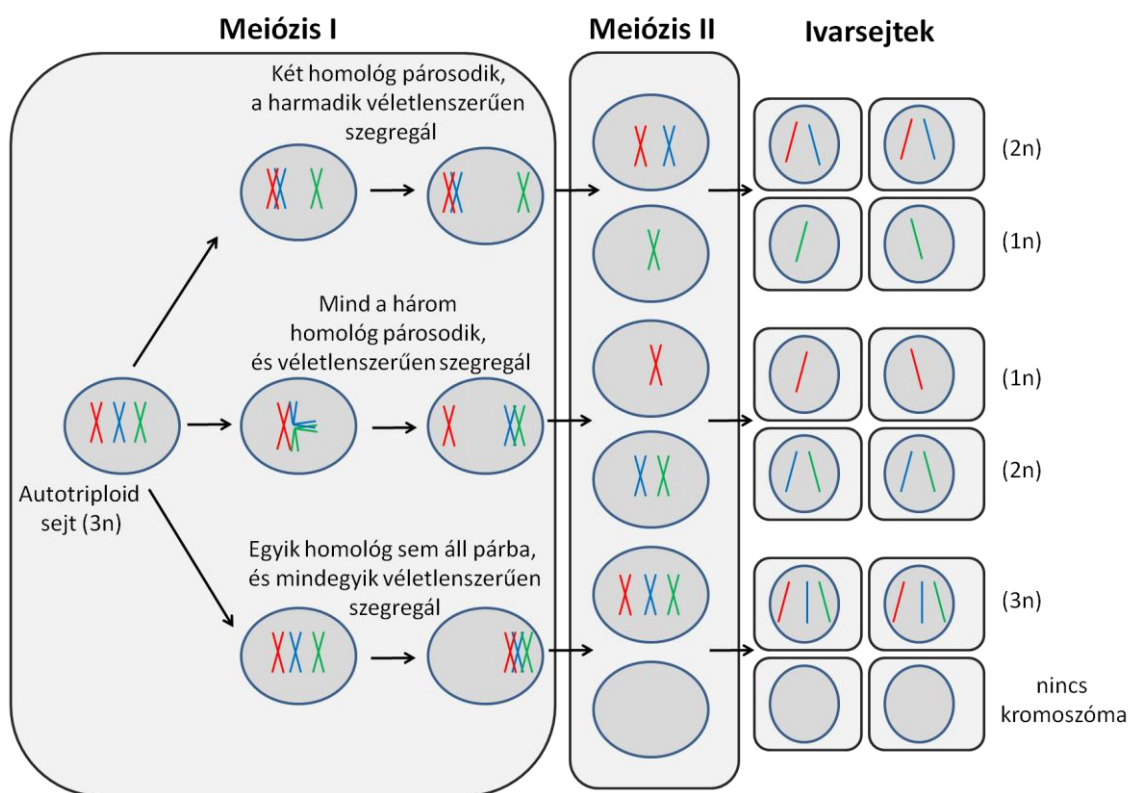


18. ábra: Az autopoliploidia kialakulása. Autopoliploidia kialakulhat mitózis kromoszóma non diszjunkció attól függően, hogy a meiózis I. vagy a Meiózis II. során is következik be, eltérő meiótikus termékek keletkezéséhez vezethet.

[Alternatív szöveg: 18. ábra: Az autoploiploídia kialakulása.]

[Képalírás: Autoploiploídia kialakulhat mitózis kromoszóma non diszjunkció attól függően, hogy a meiózis I. vagy a Meiózis II. során is következik be, eltérő meiótikus termékek keletkezéséhez vezethet.]

Mivel az autoploiploidok kromoszómakészletei közös eredetűek, a homológok meiózis I profázisában párosodni próbálnak. Olyan autoploiploidoknál, amelyek az alap kromoszómakészlet páratlan számú többszörösét tartalmazzák, az egyik homológoknak nem jut pár ezért az véletlenszerűen szegregál anafázis I-ben. Ennek következtében az ivarsejtek és belőlük kialakuló zigóták túlnyomó része több vagy kevesebb kromoszómával rendelkezik a normálnál (19. ábra). Ez általában sterilitáshoz vezet. Azon autoploiploidok esetében, amelyek az alap kromoszómakészlet páros számú többszörösét tartalmazzák, elméletben minden homológ megtalálhatja párját és normálisan osztódhatnak, ez mégis ritka esemény. Ezért ezek a szervezetek is kiegyensúlyozatlan ivarsejteket képeznek.



19. ábra: Az autotriploid szervezetek sterilek. Az autotriploid szervezetek háromszoros kromoszóma készlettel rendelkeznek ($3x = 2n$). Ennek következtében Meiózis I-ben legalább az egyik homológ kromoszóma véletlenszerűen szegregál. Ezért csak kis valószínűséggel keletkeznek normális, kiegyensúlyozott ivarsejtek.

[Alternatív szöveg: 19. ábra: Az autotriploid szervezetek sterilek.]

[Képalírás: Az autotriploid szervezetek háromszoros kromoszóma készlettel rendelkeznek ($3x = 2n$). Ennek következtében Meiózis I-ben legalább az egyik homológ kromoszóma véletlenszerűen szegregál. Ezért csak kis valószínűséggel keletkeznek normális, kiegyensúlyozott ivarsejtek.]

Az **allopoliploidok** két faj keresztezésével jönnek létre. A hibrid olyan poliploid lesz, amely két vagy több faj kromoszómakészletét hordozza. A hibrid minden kromoszómát csak egy példányban tartalmaz ezért a gaméta képzése során meiózis I profázisában nincsenek homológok, amelyek párosodhatnak. Ennek következtében anafázis I-ben a kromoszómák véletlenszerűen szegregálnak és kiegyensúlyozatlan, aneuploid gaméták képződnek (ábra). Vagyis a hibrid steril lesz, de vegetatívan szaporítható. Ritkán előfordul, hogy a hibrid korai embrionális korában mitotikus nondiszjunkció következik be. Ennek következtében megduplázódik a kromoszóma száma és egy allotetraploid egyed jön létre. Az allotetraploid meiózisa esetében már minden egyes kromoszóma megtalálja homológját és így kiegyensúlyozott euploid gaméták képződhetnek. A növénynemesítők sejtosztódást gátló kolhicin segítségével végeredményben ugyanezt érik el. Ha ugyanis a kolhicines kezelés az osztódó sejtet a mitózis profázisában éri, akkor a már megduplázódott kromoszómakészlettel rendelkező sejt visszakerülhet interfázisba és így egy mesterséges allotetraploid növény jöhet létre.

Közele rokon fajok kereszteződésével előállt hibridek esetén a két faj kromoszómái még nagyfokú hasonlóságot mutathatnak egymással. Ekkor a hibrid meiózisa során profázis I-ben kialakulhatnak olyan homológ párok, amelyek egyik tagja az egyik másik tagja a másik faj kromoszómáját tartalmazza. Ez felhasználható a egyes növények rokonsági viszonyainak megállapítására.

A legtöbb élőlényben a sejttérfogat a sejtmagtérfogatának, vagyis a genomméretének függvénye. Tehát a poliploidok általában nagyobb sejttérfogattal és sokszor nagyobb testmérettel is rendelkeznek. A növénynemesítők így állítanak elő nagyobb virágú vagy gyümölcsű növényeket. Ez a helyzet a legtöbb termesztett növény esetében is (4. táblázat).

4. táblázat: Termesztett növényeink általában poliploidok

Termesztett növény	Ploidia foka	Kromoszóma szám
Burgonya	4n (autopoliploid)	48
Banán	3n (autopoliploid)	33
Édesburgonya	6n (autopoliploid)	90
Dohány	4n (allopoliploid)	48
Búza	6n (allopoliploid)	42
Szamóca	8n (allopoliploid)	56
Cukornád	8n (allopoliploid)	80

Az előzőekben röviden összefoglaltam, hogy megszületése óta milyen új technikákkal bővült a citogenetika eszköztára illetve a kromoszómák mutációit. A citogenetika gyakorlatokon pedig megismerkedünk a mitózis és a meiózis folyamatával, egy egyszerű kromoszómafestési módszerrel illetve a citogenetikai preparátumok széles körben elterjedt elkészítési módjával.

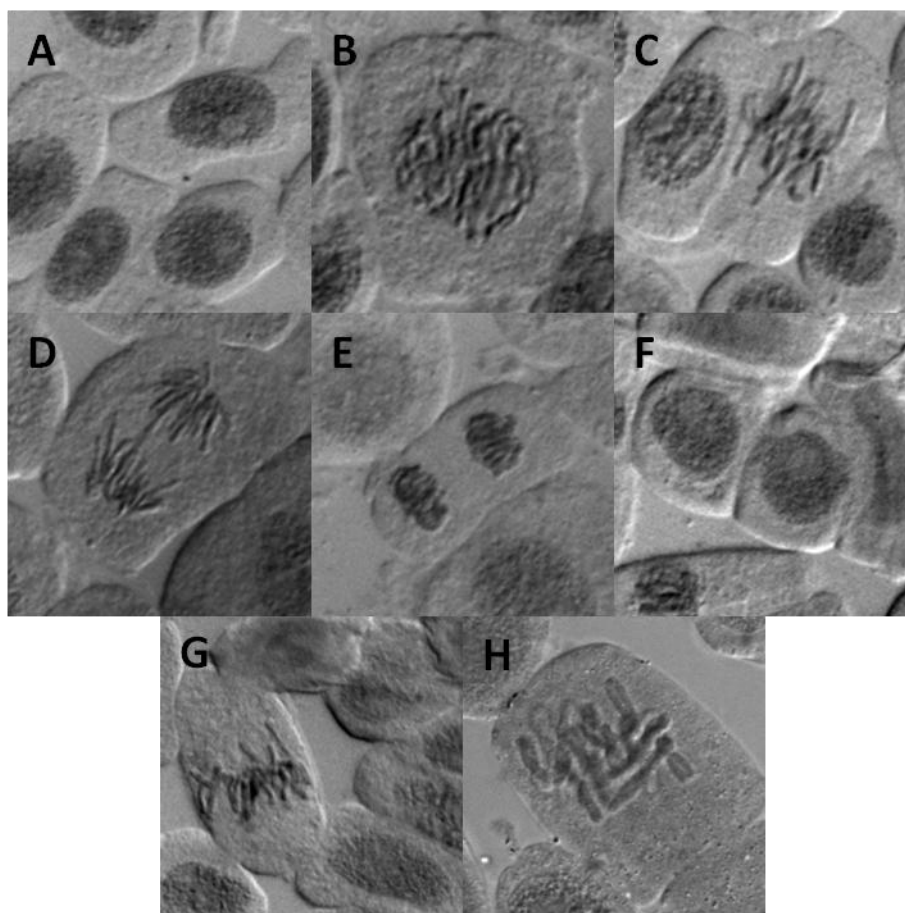
I. gyakorlat:

A mitózis tanulmányozása és a kolhicin hatásának megfigyelése a vöröshagyma gyökércsúcs merisztémájában

A gyakorlat során kolhicinnel kezelt és kezeletlen hagyma (*Allium cepa*) gyökércsúcsból szélesztett preparátumot készítünk. A preparátumokon azonosítjuk a mitózis fázisait és megfigyeljük a kolhicin sejtosztódásra gyakorolt hatását.

○ A mitózis

A mitózis a sejtek számtartó osztódása, melynek során a sejt genetikai állománya megkettőződik és két, az anyasejttel megegyező kromoszómaszámú, leánysejt jön létre. A mitózis sejttanilag négy szakaszra bontható: profázis, metafázis, anafázis és telofázis (8. ábra).



20. ábra: A mitózis folyamata vöröshagyma (*Allium cepa*) gyökércsúcs merisztéma sejtjeiből készült szélesztett preparátumon (A) interfázis; (B) profázis; (C) metafázis; (D) anafázis; (E) telofázis; (F) utódsejtek; (G) normális metafázis; (H) kromoszómák „C mitózisban”

[Alternatív szöveg: 20. ábra: A mitózis folyamata vöröshagyma (*Allium cepa*) gyökércsúcs merisztéma sejtjeiből készült szélesztett preparátumon]

[Képaláírás: (A) interfázis; (B) profázis; (C) metafázis; (D) anafázis; (E) telofázis; (F) utódsejtek; (G) normális metafázis; (H) kromoszómák „C mitózisban”.]

■

■ A profázis (20. ábra B):

A profázis a mitózis bevezető szakasza. A kromoszómák kondenzálódnak és már fénymikroszkóppal is meg lehet figyelni őket. Ezek a kromoszómák már két, genetikai információ tartalmukat tekintve azonos testvérkromatidából állnak, amelyek a centromeronnál kapcsolódnak össze. Ez a kromoszóma kétkromatidás állapota.

A kései profázisban a sejtmagvacska (nucleolus) eltűnik és megkezdődik sejtmag (nucleus) membránjának lebomlása. Kialakul az osztódási orsó, amelynek fonalai a sejt pólusaihoz illetve a kinetochoron keresztül a centromerekhez kapcsolódnak.

▪ **A metafázis (20. ábra C):**

A metafázisban a maghártya már teljesen lebomlott. A kromoszómákat a magorsó fonalak a sejt egyenlítői síkjába rendezik. A kromoszómák kondenzációja fokozódik, szerkezetük ebben a fázisban a legtömörebb. A citogenetikai vizsgálatokat is többnyire metafázisos kromoszómákon végzik. Ekkor figyelhető meg leginkább a kromoszómák alakja valamint ebben a fázisban célszerű meghatározni a fajra jellemző kromoszómaszámot. Ez az állapot tehát a legmegfelelőbb a kariotípus elkészítéséhez.

▪ **Az anafázis (20. ábra D):**

Az anafázis során a testvérkromatidák centromeronjai elválnak egymástól és a kétkromatidás kromoszómából két, egykromatidás leánykromoszóma jön létre. Az egykromatidás leánykromoszómákat a magorsó fonalak a sejt két ellentétes pólusára húzzák.

▪ **A telofázis (20. ábra E):**

A mitózis a telofázissal zárul. A leánykromoszómák már a sejt ellentétes pólusain találhatóak. A kromoszómák szerkezete fellazul. Új sejtmaghártya kialakulása kezdődik meg a kromoszómák körül, újra megjelenik a sejtmagvacska, végül a sejtplazma is osztódik.

▪ **A kolhicin hatása a sejtosztódásra**

A kolhicin az őszi kikericsből (*Colchicum autumnale*) és más *Colchicum* fajokból izolálható alkaloida, mely a magorsó fonalakat bénítja. Hatására a leánykromoszómák a metafázisban nem képesek szétválni és a sejt ellentétes pólusaira vándorolni. Ezt használják ki a növénynemesítők. Segítségével poliploid növényi szöveteket lehet létrehozni, ez pedig alkalmas olyan fajhibridek sterilizálásának leküzdésére, ahol a terméketlenség oka az, hogy a két faj kromoszómái nem képesek egymással párosodni ezért véletlenszerűen szegregálódnak a meiózis során. A kolhicin hatása attól függően, hogy milyen sejtosztódási fázisban végezzük, a kezelést eltérő lehet. A profázisból a sejtek visszakerülhetnek az interfázisba. A profázis megrövidül és a sejtek hosszabb ideig tartózkodhatnak metafázisban, ez pedig a metafázisok gyakoriságának megnövekedését eredményezi. Ennek megfelelően az ana- és telofázisok ritkábbak. A kolhicinnel kezelt szövetben a kromoszómák tömörebbek, méretük kisebb. Megfelelő kolhicines kezeléssel kariotípus meghatározására alkalmas preparátumot kapunk.

○ **A gyakorlat menete**

Anyagok:

- 1kg dughagyma
- Carnoy rögzítő: abszolút alkohol és jégcet 3:1 elegye
- 1N sósav
- papírvatta
- szűrőpapír
- 0,1%-os kolhicin oldat
- 5%-os kármínecetsav 45%-os ecetsavban oldva
- tárgylemez
- fedőlemez

▪ **Előkészítés**

• **A dughagyma gyökereztetés (2-5 nap):**

A hagymák gyökerét megtisztítjuk az elszáradt részekről majd vigyázva, hogy csak a tönkjük érjen a vízbe, gyökereztető edénybe helyezzük. A gyökereztetés során a vizet az edényben naponta cseréljük és a gyökerek állapotát ellenőrizzük. A preparátum készítésére a néhány centiméter hosszú, még nem barna gyökér alkalmas. A gyökércsúcs porcelánszerű. Az intenzíven osztódó zóna sárgásfehér, mögötte a gyökér áttetsző.

• **Kolhicinezés (4-5 óra):**

A kezelendő gyökereket 1-2 ml 0,1%-os kolhicin oldatba helyezzük, majd 4-5 óra elteltével, szűrőpapír segítségével leitatjuk róluk a kolhicin oldatot és rögzítjük.

• **Rögzítés Carnoy rögzítőben (1 nap):**

A gyökereket ún. Carnoy oldatban (abszolút alkohol és jégcet 3:1 arányú elegye) áztatjuk. A rögzítés 24 órája alatt a Carnoy oldatot egyszer cserélni kell. Az így rögzített minta mélyhűtőben illetve 70%-os alkoholban szobahőmérsékleten is sokáig, akár évtizedekig is eláll.

• **Alternatív rögzítés:**

Jobb minőségű, de nem annyira tartós preparátumot kapunk, ha Carnoy oldat helyett a gyökereket 45%-os ecetsavban áztatjuk 20 percen keresztül.

- ***Puhítás***

A szélesztett preparátum készítése során arra törekszünk, hogy a mintánk egy sejtsor vastagságú legyen. A rögzítést követően a gyökércsúcsok azonban még több sejtsor vastagok és a sejteket a sejtfalak tartják össze. Annak érdekében, hogy megfelelő minőségű preparátumot tudjunk készíteni a sejtfalakat alkotó poliszacharidokat el kell hidrolizálnunk.

A gyökereket a rögzítőből kivéve vízzel mossuk, leitatjuk, majd 1N hideg sósavval átöblítjük, hogy a maradék vizet eltávolítsuk. Ezután a gyökereket 60°C-on 1N sósav oldatban inkubáljuk 5 percig – vigyázzunk, mert ha tovább főzzük benne a sejtmag is károsulhat. A puhítást követően a gyökereket desztillált vízzel mossuk, majd a vizet leitatjuk. Az így kapott puhított gyökeret 70%-os alkoholban tároljuk.



21. ábra: a hagyma gyökércsúcs előkészítésének és festésének fázisai

[Alternatív szöveg: 21. ábra: a hagyma gyökércsúcs előkészítésének és festésének fázisai.]

-

- **Festés**

A hagyma gyökeret egy tárgylemezre helyezük, megállapítjuk, hogy melyik a csúcsa (sárgásfehér vég, alatta az áttetsző állandósult szövetek) és 5%-os kármínecetsavat cseppentünk rá (21. ábra). A

tárgylemezt nyílt láng felett óvatosan melegítjük egy-két percig. Ügyeljünk arra, hogy a festék ne forrjon fel! A festődés akkor jó, ha a gyökércsúcsok sötétbarnás-vörössé válnak. Ha a preparátumot túlfestjük, akkor a színe feketésen vörös.

A festést követően a felesleges kárminecetsavat felitatjuk szűrőpapírral és a gyökeret új, tiszta tárgylemezre helyezzük, a gyökércsúcs mögötti állandósult szöveteket eltávolítjuk. Ezután gyorsan egy csepp kárminecetsavat rakunk rá és befedjük a fedőlemezzel. Ha a minta elég puha, akkor már a fedőlemez súlya hatására is szétterül a szövet. A tárgylemezt még 1-2 percig melegítjük, néha egy-egy csepp kárminecetsavat hozzáadásával.

- **A sejtek szélesztése**

A fedőlemezre szűrőpapírt helyezünk, leszorítjuk és a ceruza végével vagy más tompa végű tárggyal finoman kopogtatjuk, majd „firkáljuk” a mintát. Ha ekkor mikroszkóppal megnézzük a preparátumot, akkor látjuk, hogy a sejtek még gömbölyűek. Ezért van szükség a preparátum kilapítására. A szűrőpapírt rászorítjuk a fedőlemezre és egy határozott mozdulattal, hüvelykujjunkkal ránehezedünk a mintára. Ezek utána a kész szélesztett preparátumot fénymikroszkóppal vizsgáljuk meg.

- **Feladatok**

1. Figyeljük meg a mitózis fázisait a kezelt és a kezeletlen preparátumon!
2. Készítsünk rajzot az egyes fázisokról!
3. Próbáljuk meg meghatározni a diploid a kromoszómaszámot. $2n=?$
4. Figyeljük meg, hogy milyen hatással van a kolhicin a kromoszómák elrendeződésére, méretére illetve az egyes fázisok gyakoriságára!

II. gyakorlat A meiózis vizsgálata a fás bazsarózsa pollenanyasejtjeiben

A gyakorlat során fás bazsarózsa (*Paeonia suffruticosa*) bimbók pollenanyasejtjeiből szélesztett preparátumot készítünk. A preparátumokon azonosítjuk a meiózis fázisait.

- **A meiózis**

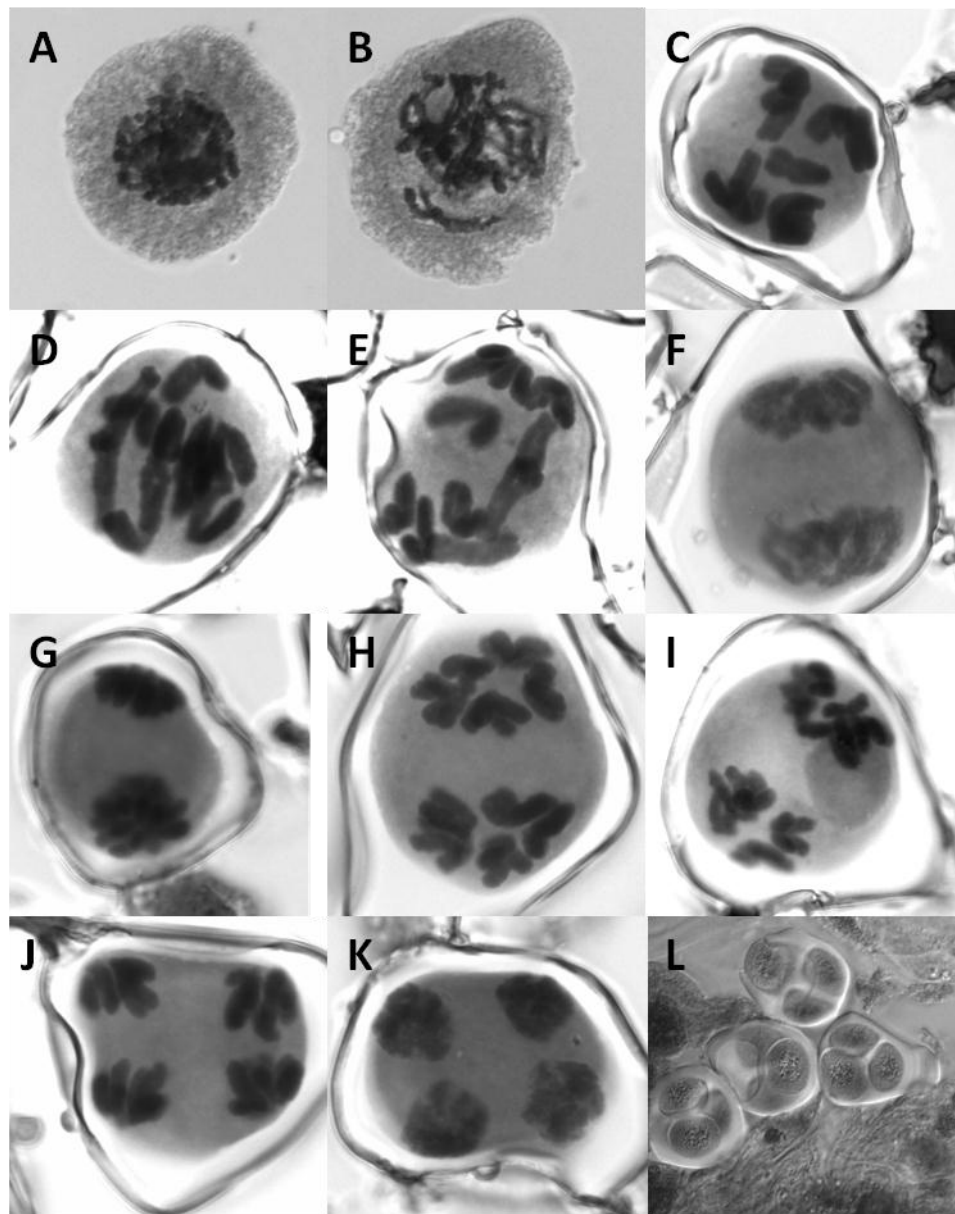
A meiózis a gaméták termelésére specializálódott sejtek osztódás típusa, melynek során egyetlen meiocita anyasejtből 4 utódsejt más néven meiótikus termék keletkezik. Egyetlen meiótikus termék

kromoszóma száma - ezáltal genetikai információ tartalma - pontosan fele az anyasejtének. A négy meiótikus termék információ tartalma egymástól különböző

A meiózis lényegében két egymást követő sejtosztódásból áll. Az első osztódási szakaszban a homológ kromoszómák - Mendel első törvényének megfelelően - szétválnak egymástól, és külön utódsejtbe kerülnek, mialatt a testvér kromatidák együtt maradnak.

A második osztódási szakaszban a testvér kromatidák válnak szét egymástól, így az utódsejtek egy DNS szálból álló, de az anyasejthez képest fele kromoszóma számú kromoszóma készlettel rendelkeznek.

A meiózis sejttanilag négy szakaszra bontható: profázis, metafázis, anafázis és telofázis (22. ábra).



22. ábra: A meiózis fázisai fás bazsarózsa (*Paeonia sufruticosa*) pollenanyasejtjeiben

(A), (B) és (C) Profázis I; (D) Metafázis I.; (E) Anafázis I; (F) Telofázis (G) Profázis II; (H) Metafázis II; (I) Anafázis II; (J) és (K) Telofázis II; (L) pollenek

[Alternatív szöveg: 22. ábra: A meiózis fázisai fás bazsarózsa (*Paeonia suffruticosa*) pollenanyasejtjeiben]

[Képaláírás: (A), (B) és (C) Profázis I; (D) Metafázis I.; (E) Anafázis I; (F) Telofázis (G) Profázis II; (H) Metafázis II; (I) Anafázis II; (J) és (K) Telofázis II; (L) pollenek]

▪ Profázis I (22.ábra A -C):

Leptotén (vékony fonalas): a kromoszómák hosszú vékonyfonalként láthatóvá válnak.

Zigotén (párosodó fonalas): homológ kromoszómák hossztengelyük mentén párosodnak, kialakul a bivalens kromoszóma, amit 4db. kromatida alkot.

Pahitén (vastag fonalas): a kromoszómák szálai megvastagodnak, megrövidülnek. Ebben a fázisban megy végbe a *crossing-over*.

Diplotén (dupla fonalas): a négy kromatid egymáshoz tapadása lazul, kiazmák (átkereszteződések) jelennek meg. A kiazma a *crossing-over* citológiai megjelenése.

Diakinézis: a kromoszómák tovább rövidülnek, a maghártya eltűnik.

▪ Metafázis I (22.ábra D):

A homológok az egyenlítői síkban rendeződnek, a testvér kromatidák nem válnak el, a homológok centromerei ellenkező pólushoz tartozó húzó fonalakhoz tapadnak

▪ Anafázis I (22.ábra E):

A homológ párok tagjai az ellenkező pólusra jutnak

▪ Telofázis I (22.ábra F):

Fajonként változó lehet. A második osztódás rögtön folytatódik, vagy kialakulhat a magmembrán, sőt a sejtmembrán is. Az első osztódás redukciós, mert a kromoszómák számát a felére, a haploid számra (n) csökkenti az utódsejtekben.

▪ Profázis II (22.ábra G):

Megrövidült, haploid kromoszómaszámot mutató kétkromatidás kromoszómák látszanak

▪ **Metafázis II (22.ábra H):**

A kromoszómák az egyenlítői síkba rendeződnek.

▪ **Anafázis II (22.ábra I):**

A centromerek elhasadnak, a húzófonalak az ellentétes pólusokra viszik a testvérkromatidákat.

▪ **Telofázis II (22. ábra J és K):**

Kialakul a magmembrán és létrejön a négy haploid meiótikus termék vagy tetrád.

○ **A gyakorlat menete:**

▪ **Anyagok:**

- bazsarózsa bimbók
- Carnoy rögzítő: abszolút alkohol : jégcet 3: 1 elegye
- papírvatta
- szűrőpapír
- 0,1 %-os kolhicin oldat
- kármecetsav
- tárgylemez
- fedőlemez

▪ **Előkészítés**

A bimbókat egy tavaszi reggelen érdemes begyűjtenünk az ELTE botanikus kertjéből. A közepes méretű bimbókat érdemes begyűjteni, a nagyon nagy illetve nagyon kicsi bimbó már vagy még nem jó. Egy bimbóban rengeteg portok található. Ha a portok sárga, akkor már nem alkalmas a vizsgálatra, mert már pollenek vannak benne. A begyűjtött bimbókról eltávolítjuk a takaróleveleket és Carnoy rögzítőbe áztatjuk 2 napon keresztül, a rögzítőt 12 óránként lecseréljük. A rögzített bimbók 70%-os alkoholban, mélyhűtőben tárolhatóak.

▪ **A festés**

A tárgylemezre egy porzószálat helyezünk. A portok végéből 1mm-t levágunk és lándzsátűvel felaprítjuk, mint a petrezselymet. Kármecetsavat cseppentünk rá, fedőlemezrel lefedjük és így melegítjük óvatosan néhány percig, majd szélesztett preparátumot készítünk (lásd mitózis gyakorlat).

▪ Feladatok

1. Figyeljük meg a meiózis fázisait a pollenanyasejtekben
2. Figyeljük meg a mitózis fázisait a portok szövetében!
3. Figyeljük meg a bivalenseket
4. Készítsünk rajzot az egyes fázisokról
5. Próbáljuk meg megszámolni a kromoszómákat. A meiózis mely fázisát érdemes kiválasztani erre a célra?

Drosophila genetika - géntérképezés

Dr. Vellainé Takács Krisztina egyetemi adjunktus és Billes Viktor PhD hallgató

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

-
-
- ***Drosophila melanogaster* mutánsok bemutatása és felismerése**

A gyakorlat célja: a *Drosophila melanogaster*, mint genetikai modellorganizmus bemutatása, hímek és nőstények elkülönítése valamint mutánsok felismerése

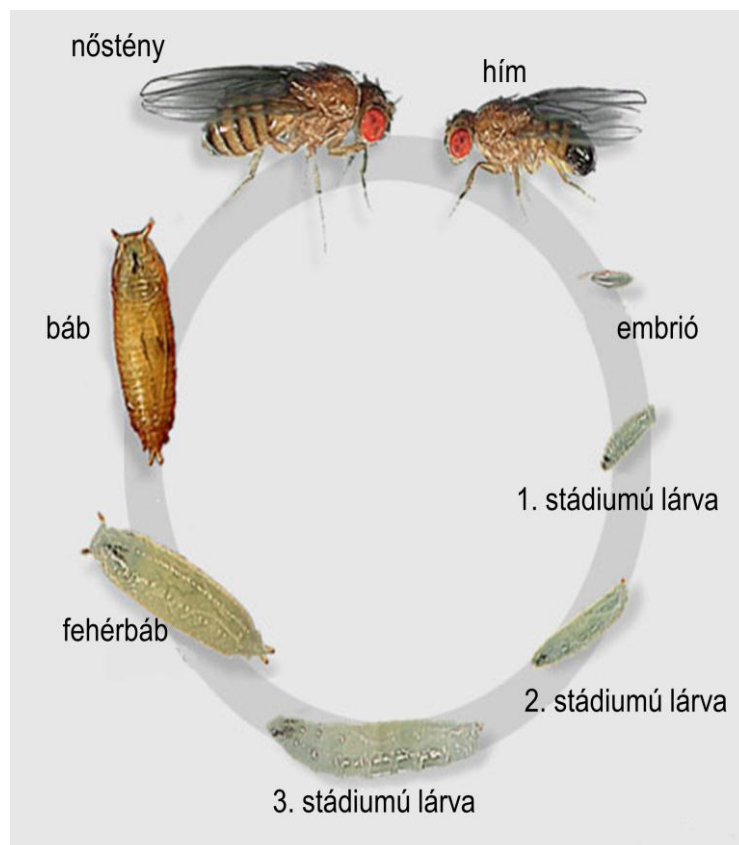
▪ **Az ecetmuslica életciklusa, a vad típus bemutatása, a nemek elkülönítése**

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) a genetikusok egyik elsőként alkalmazott modellállata. Az 1900-as évek elején Thomas Hunt Morgan és tanítványai használták először, és segítségével az öröklődés alapvető törvényszerűségeit (kromoszóma elmélet bizonyítása, nemhez kötött öröklődés, kapcsoltság) tárták fel. Morgan munkásságát 1933-ban orvosi Nobel-díjjal jutalmazták, első olyan kutatóként, akinek nem volt orvosi végzettsége.

Az ecetmuslica rendelkezik mindazokkal a tulajdonságokkal, amelyek a genetikai modellorganizmusokat, mint kísérleti objektumokat jellemzik: laboratóriumban könnyen fenntartható, tenyésztése rövid (25°C-on 10 nap), utódszáma nagy (egy szülőpárnak több száz utódja lehet), a hímek és a nőstények egyszerűen elkülöníthetők, vonalai jól keresztezhetők valamint a morfológiai sajátosságok jól jellemezhetők, és nagy következetességgel öröklődnek.

A *Dipterák* közé tartozó *Drosophila* teljes átalakulással fejlődő rovar, azaz Holometabola. A megtermékenyített petékből 25°C-on kb. 24 óra elteltével kelnek ki az első stádiumú (L1) lárvák, melyek szintén kb. egy nap elteltével vedlenek, és második stádiumú lárvákká (L2) fejlődnek. Az L2 stádiumot újabb 1 nap elteltével vedlés és az L3 stádium követi, amely hozzávetőleg két napig tart. Az L3 stádium végén az állatok bebáboznak, majd kb. öt nap múlva kelnek ki a kifejlett imágók (10. ábra). Ezek az adatok a 25°C-on történő tenyésztéskor érvényesek. A hőmérséklet csökkentése a tenyészidőt növeli. Egy nőstény imágó a 10 heti élettartam alatt 3000 petét képes lerakni.

A *Drosophila* genom mérete 180 Mbp, a teljes genom szekvenciáját 2000-ben határozták meg. A muslica genom jelenlegi becslések szerint kb. 14000 gént tartalmaz, ami az emberben található gének számának a fele (jelenleg annotálva 13601). Az ecetmuslica 4 kromoszómapárral bír, három autoszóma- és egy ivari kromoszómapárral. Az 1. kromoszóma a metacentrikus X kromoszóma, mellette 2 nagy metacentrikus (a 2. és a 3.), és 1 kis akrocentrikus autoszóma van (4.). Az XX egyedek nőstények, az XY egyedek hímek. Az Y kromoszómán nincsenek a túléléshez esszenciális gének, azaz az Y kromoszómát nélkülöző (X0 genotípusú) hím egyed is él, de terméketlen (az Y-kromoszómán a hímek fertilitásához szükséges gének lokalizálódnak).

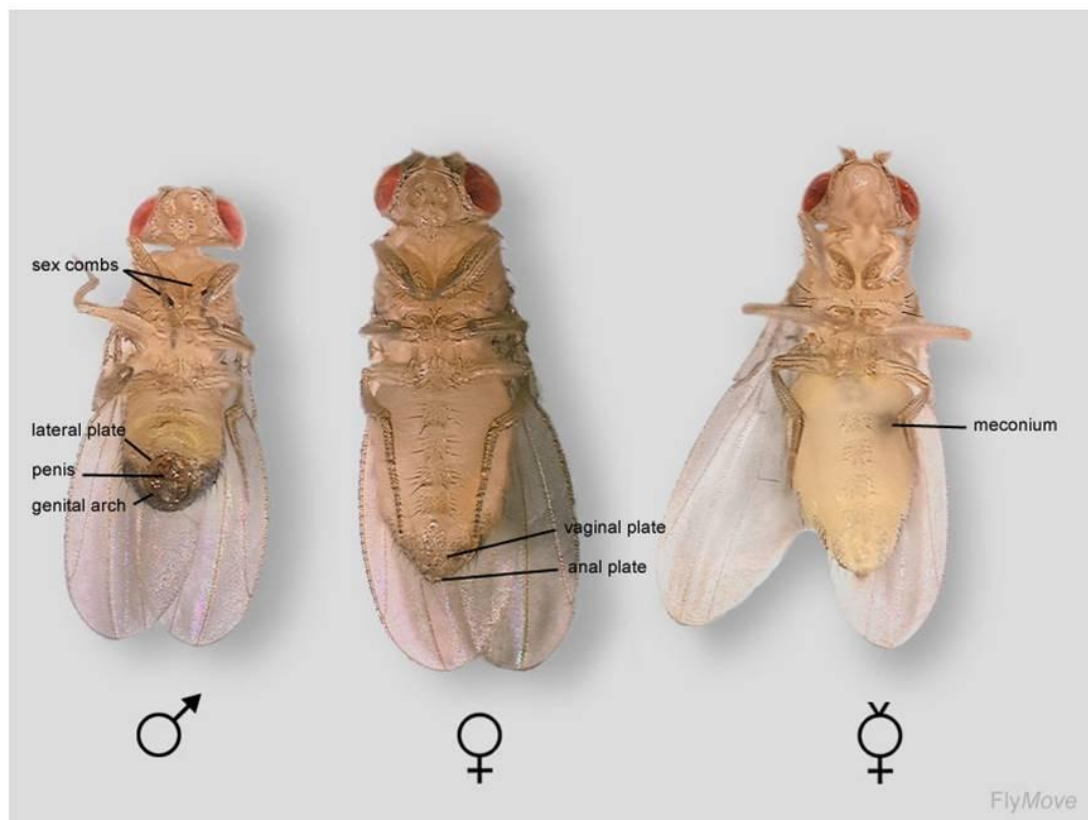


10. ábra: Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) életciklusa és fejlődési stádiumai

[Alternatív szöveg: Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) életciklusa és fejlődési stádiumai] A gyakorlaton bemutatott törzsek „tisztá vonalak”, amelyek nemzetközileg elismert törzsgyűjteményekből származnak. Vad típusként az Oregon vonalat használjuk (11.

ábra). A vad típusú musli(n)ca testszíne sárgás-barna, szeme kerek, téglavörös színű, szárnya egyenes lefutású, ép szélű, jellemző erezzel, fekete színű szőrzete testre simuló.

A *Drosophila* hím és nőstény imágók közötti legszembetűnőbb különbséget a külső genitáliák mutatják (elsődleges nemi bélyeg). Ezen kívül a két nem egyedei egymástól jól megkülönböztethetők a potroh alakja és pigmentáltsága alapján. A nőstény potroha kövérebb, felülnézetben kerekesebb, a végén kihegyesedő; a hím potroha keskenyebb, a vége pedig lekerekített. A hímek potrohának utolsó két háti lemeze teljesen fekete, ellentétben a nőstényekkel, ahol sötét pigmentációt csak a háti lemezek poszterior részén figyelhetünk meg. A hímek elkülönítésére használatos bélyeg a szexfésű is, amely a hímek első pár lábán található, kitin fogacskákból álló képlet; a nemek azonosítását sztereomikroszkóppal végezzük. A hímek és nőstények közötti különbségeket a 11. ábra foglalja össze.



11. ábra: Vad típusú (Oregon törzsből származó) hímek, nőstények és szüzek elkülönítése. A külső genitáliák mutatják a legszembetűnőbb különbséget a két nem között. A hímek potroha keskenyebb, a vége pedig lekerekített. A nőstény potroha kövérebb, a végén kihegyesedő. A hímek potrohának hat, a nőstényekének nyolc ize van. A hímek potrohának utolsó két háti lemeze erősen pigmentált. A hímek első pár lábán található a jellegzetes szexfésű. A keresztezésekhez feltétlenül szűz nőstényeket kell gyűjteni.

▪ **Mutánsok felismerése és jellemzése**

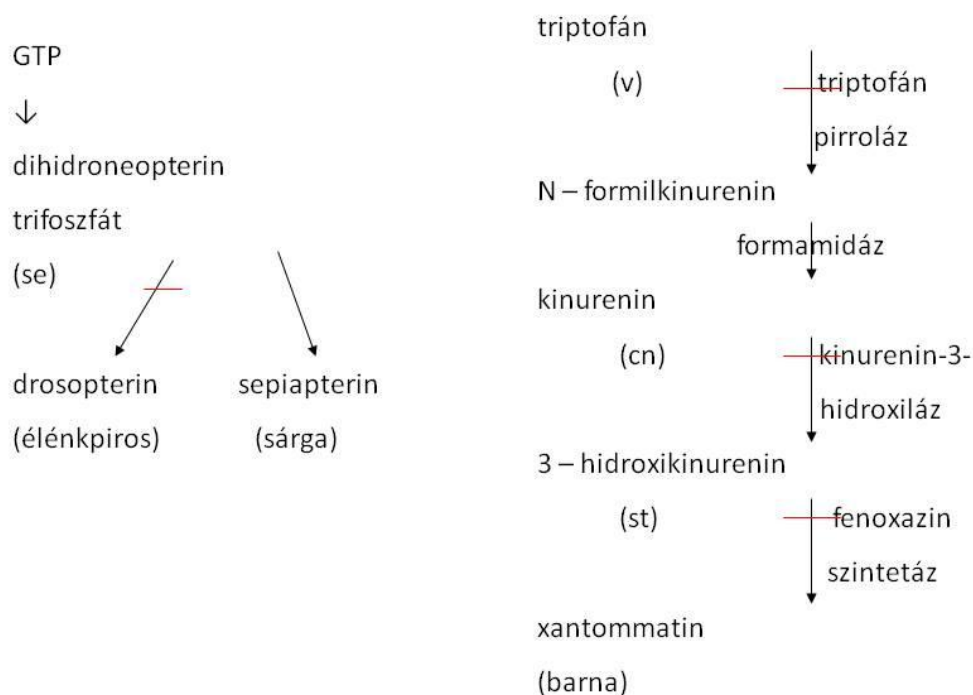
[Alternatív szöveg: típusú (Oregon törzsből származó) hímek, nőtények és szüzek elkülönítése] A *Drosophila* kutatása immár több mint 100 éves múlttal rendelkezik, ma a muslica az egyik legalaposabban elemzett modell rendszer. Hermann Joseph Muller, aki Morgan tanítványa volt, felfedezte és elsőként használta ki a Röntgen-sugár mutagén hatását: mesterségesen, laboratóriumi körülmények között mutánsok sorozatait állította elő (1946-ban e kutatásaiért Nobel-díjat kapott). Ezzel megteremtette annak a különösen gazdag *Drosophila* „mutáns parknak” az alapjait, amellyel ma világszerte kb. 15000 kutató dolgozik, és amelyeket különböző törzsgyűjteményekben tartanak fenn.

A gyakorlat során betekintést nyújtunk a muslica mutánsok morfológiai változatosságába. A bemutatott mutáns allélek többsége recesszíven öröklődő, funkcióvesztéses (*loss-of-function*) vagy csökkent funkciójú (*reduction-of-function*), azaz hipomorf allél. Néhány dominánsan öröklődő mutáns allélt is tárgyalunk. A mutáns alléleket az általuk okozott fenotípus alapján csoportosítjuk: eszerint találkozunk szemszín és szemalak mutánsokkal, testszín és testalak mutánsokkal, szárnymutánsokkal valamint szőrmutánsokkal.

• **Szemszín mutánsok**

A vad típusú *Drosophila* összetett szeme téglavörös színű, amelyet háromféle pigment anyag, a drosopterin, a xantommatin és a sepiapterin együttesen alakít ki. A gyakorlat keretében, látványosabb hatásuk miatt a drosopterin és a xantommatin szintézisének folyamatában résztvevő gének mutáns alléljaival foglalkozunk. A xantommatin barna színű szempigment, amelynek termelését enzimek sorozata végzi (12. ábra). Ha az említett enzimek valamelyike az őt kódoló gén funkciójának kiesése következtében nem működik, xantommatin nem termelődik, ezért ezekben a mutánsokban csak a másik két szempigment van jelen, így szemük élénkpiros színű. A *vermilion* (*v*), a *cinnabar* (*cn*) és a *scarlet* (*st*) gének tehát a xantommatin útvonal egyes enzimeit kódoló gének. A *vermilion* gén az 1. (azaz X) kromoszómán, a *cinnabar* a 2., a *scarlet* pedig a 3. autoszómán lokalizált. Mindhárom gén recesszíven öröklődő, a funkcióvesztéses mutánsai élénkpiros szemszínűek. Ezek a példák is mutatják, hogy a muslica gének elnevezése gyakran a funkcióvesztéses mutáns fenotípusára vezethető vissza.

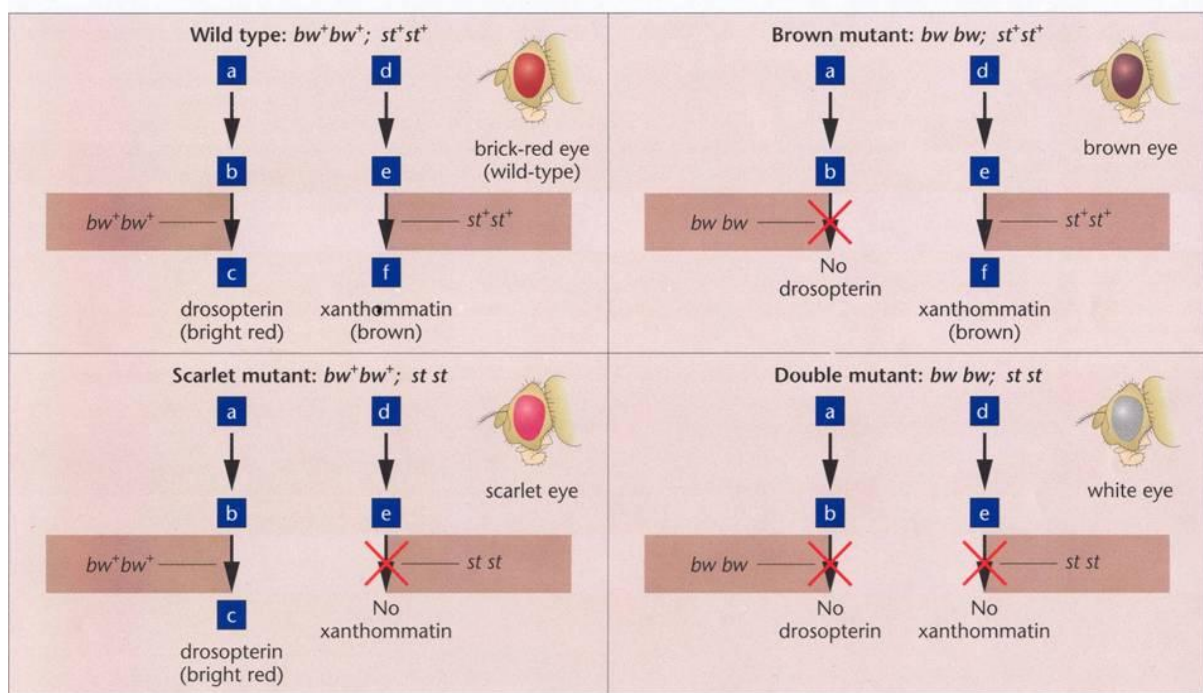
***Drosophila* szempigmentek szintézise**



12. ábra: A *Drosophila* szem pigmentjei és a szintézisükhöz kapcsolódó útvonalak. A *musica* összetett szemének téglavörös színét három szem pigment, a drosopterin, a sepiapterin és a xantommatin együttesen alakítja ki. A drosopterin útvonal egyik enzimjét kódolja a *sepia* (*se*) gén, a *vermilion* (*v*), a *cinnabar* (*cn*) és *scarlet* (*st*) gének pedig a xantommatin szintéziséhez szükséges enzimeket kódolják

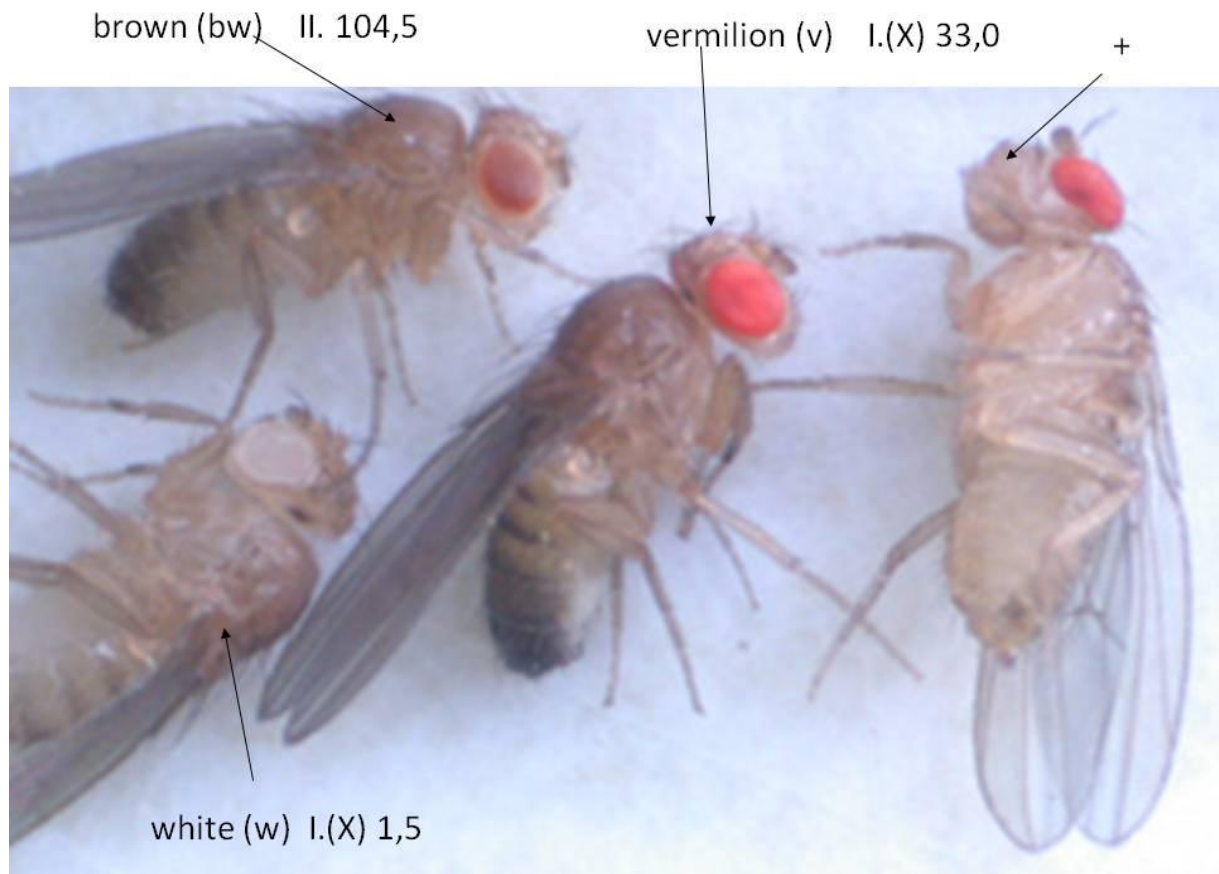
[Alternatív szöveg: A *Drosophila* szem pigmentjei és a szintézisükhöz kapcsolódó útvonalak] Ha a drosopterin szintézisében funkcionáló gének valamelyike nem működik, akkor a drosopterin hiánya barna szemszínű mutánst eredményez, amelynek szemében csak xantommatin van jelen (12. ábra). A drosopterin útvonalban funkcionáló gének a 2. kromoszómán elhelyezkedő *brown* (*bw*), illetve a 3. autoszómán található *sepia* (*se*). A *bw* gén recesszív, funkcióvesztéses allélje vörösesbarna, a *sepia* gén kiesése pedig csokibarna színű szemet okoz. Ha olyan kettős mutánsokat állítunk elő (például *st/st*; *bw/bw*), amelyekben mind a xantommatin mind a drosopterin szintézise gátolt, akkor fehér szemszínű állatokat kapunk, amelyeknek szemében egyáltalán nem található pigmentanyag (13. ábra).

Különböző *Drosophila* szemszín mutánsok



13. ábra: A drosopterin és a xantommatin útvonalakban funkcionáló gének kiesése következtében kialakuló mutánsok fenotípusai. A xantommatin útvonal génjeinek (pl. scarlet, st) funkcióvesztéses mutánsai élénkpiros szeműek. A drosopterin útvonalban működő brown (bw) gén kiesése barna szemhez vezet. Ha mindkét útvonal sérül (pl. mind a st mind a bw gén működésképtelen), akkor fehér szemű kettős mutánst kapunk.

[Alternatív szöveg: A drosopterin és a xantommatin útvonalakban funkcionáló gének kiesése következtében kialakuló mutánsok fenotípusai] Fehér szemszínt eredményez Morgan és tanítványa, Calvin Bridges híres génjének, a *white*-nak (*w*) a funkcióvesztése is. A *white* génnel folytatott kísérleteik szolgáltatották az első meggyőző bizonyítékokat az X kromoszómához kötött öröklődésre. Mai tudásunk szerint a *white* gén egy ABC transzportert kódol, amelynek esszenciális szerepe van a szem pigmentek transzportjában. A *w* mutáns fehér szemű fenotípusa annak köszönhető, hogy a szem pigmenteknek a szemsejtek pigment granulumjaiba történő transzportja sérül. Megismerkedünk a *white* gén egy másik, hipomorf alléljával is, a *white-apricottal* (w^a). A w^a mutánsok szemszíne barackszínhez hasonlít, ezt a fenotípust a *copia* nevű transzpozon *white* génbe való beépülése okozza, amely csökkent transzporter funkcióhoz vezet. Érdekes a különböző szemszín mutánsokat egymással és a vad típussal összehasonlítva vizsgálnunk, a köztük lévő különbség igazán így látványos (14. ábra).



14. ábra white, brown és vermilion mutánsok szemszíne összehasonlítva a vad (+) típussal

• Szemalak mutációk

Az X kromoszóma 16A régióban található Bar régióinak a duplikációja homozigóta formában egy jellegzetes szemalakot, résszemet eredményez (erről már volt szó a citogenetika blokkban, Citogenetika, 11. ábra). A homozigóta Bar nőtények összetett szemében a facetták száma akár a tizede is lehet a vad típusú állatok facetta számának (ehhez hasonló a hemizigóta Bar hímek résszeme is). A duplikációt hordozó Bar allél domináns a vad alléllal szemben, jöllehet a heterozigóta (B/B^+) nőtények szeme köztes fenotípust mutat (babalakú), és a facetta szám is a vad és a homozigótán megnyilvánuló résszem közé esik (15. ábra). Újabb kutatások szerint a Bar régióban a BarH1 gén duplikálódik, amely a fotoreceptor differenciációt gátló homeobox jellegű transzkripciós faktort kódol.

Szemalak mutánsok



Genotypes and Phenotypes

Genotype	Facet Number	Phenotype	Normal = 16A segments
B^+ / B^+	779		
B / B^+	358		
B / B	68		
B^D / B^+	45		

15. ábra: Az X kromoszóma Bar régiójának duplikációja résszemet hoz létre. A homozigóta Bar (B/B) nőstények szemének facetta száma átlagosan közel a tizedére csökken a vad típusú (B^+/B^+) állatok szemében található 7-800 facettához képest. Heterozigóta (B/B^+) nőstények szeme babalakú, facetta száma a vad és a homozigóta mutáns közé esik. Az Ultra-Bar mutáns nőstények (B^D/B^+) egyik X kromoszómáján a Bar régió normális dózisban található, a másik homológon viszont megháromszorozódott.

[Alternatív szöveg: Az X kromoszóma Bar régiójának duplikációja résszemet hoz létre] Az első, H. J. Muller által előállított **balanszer** kromoszóma az ún. Muller-5 balanszer (M5) volt (a balanszereket lásd alább). Az M5 homozigóták w^a és B fenotípusúak, azaz résszeműek és a szemük barackszínű. Az M5 törzsben az X kromoszóma inverziók sorozatát hordozza, ezáltal gátolja a rekombinációt az X kromoszóma mentén. Azóta minden kromoszómának elkészültek a balanszeres változatai (kivételek a 4., az annyira kicsi, hogy alig kell rekombinációjától tartani). X-kromoszómás balanszeres kromoszóma az FM (*First Multiple*) család tagjai, 2. kromoszómás a CyO és az SM (*Second Multiple*) család tagjai. 3. kromoszómások a TM-sorozat tagjai, melyek közül a leggyakrabban a TM3-t, és a TM6-t használják a kutatók. A balanszer kromoszómák sajátja, hogy azon a kromoszómán (vagy kromoszóma szakaszon), ahol genomi átrendeződést (inverziót, transzlokációt, stb.) tartalmaznak, elnyomják a crossing overt (pontosabban nem magát a crossing overt akadályozzák meg, hanem a crossing over után létrejött meiotikus termékek életképtelenek). Ezért a balanszer kromoszómák jól felhasználhatók letális mutációk (vagyis a csak heterozigóta formában életképes törzsek) fenntartására, hiszen balanszert alkalmazva a

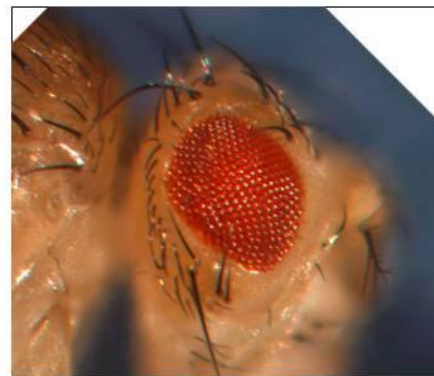
letális mutáció nem „veszhet el” a rekombináció során. Emellett a balanszer kromoszómák néhány kivételtől eltekintve (pl M5) homozigóta letálisak, és legtöbbször domináns marker mutációjuk (vagy mutációik) révén a balanszert hordozó egyedek azonosíthatóak. A M5 esetében a Bar marker mutáció az, ami megkönnyíti a balanszert hordozó (balanszírozott) egyedek felismerését és szelektálását.

Szemalak mutációk közé tartozik a Glazed domináns mutáció, ami tulajdonképpen a wingless/Wnt jelátviteli útvonal ligandumát kódoló génnek, a 2. autoszómán lokalizálódó *wingless*-nek egy domináns, funkciónyeréses allélja (wg^{Gla-1}). A Glazed mutánsok szemalakja ovális, a szem mérete a vad típusnál valamivel kisebb (a facetta szám is alacsonyabb), a szemfelszín fényesnek tűnik az ommatídiumok összeolvadása miatt. A Glazed mutáció csak heterozigótaként tartható fenn, mivel ez a domináns mutáció homozigóta formában letális.

A *Drosophila* legkisebb méretű, 4. autoszómáján helyezkedik el a szemfejlődés egyik mestergénje, az *eyeless*. Az *eyeless* gén funkciójának teljes kiesése embrionális letalitást okoz, mivel a gén nemcsak a szemfejlődéshez, hanem az embriogenezis folyamán zajló más folyamatokhoz is szükséges. Szemfejlődésben betöltött szerepét a vad típushoz képest szemméret csökkenést okozó hipomorf, azaz funkciócsökkenéses alléljának vizsgálatával érhetjük tetten (16. ábra).



oregon



eyeless (*ey*) IV. 2,0

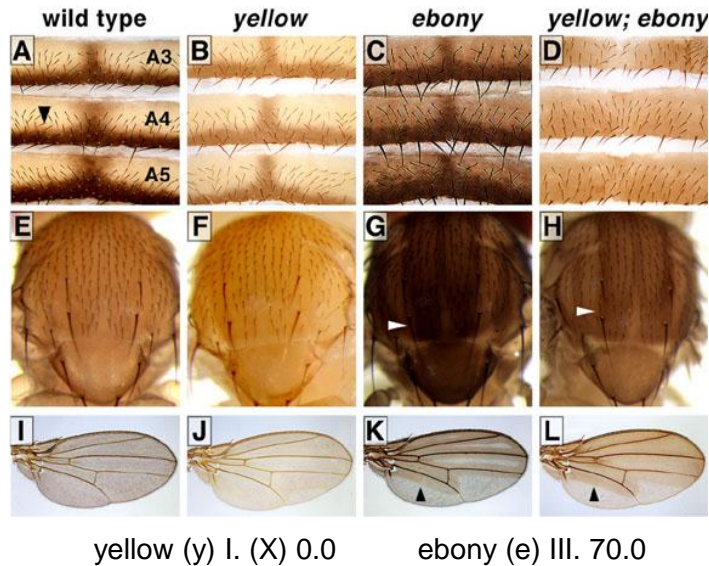
ey^2

16. ábra: Az *eyeless* gén egyik hipomorf allélja (ey^2) az Oregonhoz viszonyítva kisebb szemet eredményez.

• **Testszín mutációk**

[Alternatív szöveg: Az *eyeless* gén egyik hipomorf allélja (ey^2) az Oregonhoz viszonyítva kisebb szemet eredményez] A muslica testszíne, pigmentációja alapvetően összefügg a melanin termelésével. Három melanin szintézist befolyásoló gén recesszíven öröklődő, funkcióvesztéses mutánsát vizsgáljuk a gyakorlaton (17. ábra). Az X kromoszómán elhelyezkedő *yellow* (*y*) gén terméke **segíti a melanin** kialakulását, kifejeződési szintje és mintázata korrelál a sötét pigmentációval. Funkcióvesztéses mutációja melanin hiányhoz vezet és sárga testű állatokat eredményez. A melanin szintézis gátló faktorait termelik a 2. autoszómán lokalizálódó *black* (*b*) és a 3. autoszómán található *ebony* (*e*) gének,

amelyek funkcióvesztése következtében sötét testű mutánsok alakulnak ki. Különösen sötétén pigmentáltak az ebony mutánsok (nemcsak a test, hanem a szárnyak is feketék).



17. ábra: Testszín mutációk: melanin hiány mutatkozik a yellow funkcióvesztéses mutánsokban (sárga test és sárgás szárny), míg az ebony mutánsok a melanin túltermelés miatt feketék.

• Szárny mutációk

[Alternatív szöveg: Testszín mutációk: melanin hiány mutatkozik a yellow funkcióvesztéses mutánsokban (sárga test és sárgás szárny), míg az ebony mutánsok a melanin túltermelés miatt feketék] Számos gén befolyásolja a szárny fejlődését. A 2. autoszómán található *vestigial* (*vg*) gén funkciójának kiesése csökevényes szárnyakat eredményez. A homozigóta recesszív *vg* mutáns legyek nem tudnak repülni. A szintén 2. kromoszómás domináns *Curly* (*Cy*) mutáció felkunkorodó szárnyakat okoz. (A *Curly* gén első azonosított mutáns allélja domináns volt, ezért a gén neve nagy kezdőbetűvel írandó.) A *Curly* mutáns legyek heterozigóták, mivel a *Curly* mutáció homozigóta formában letális. A 3. kromoszómás domináns *Dichaete* mutáció -hasonlóan a *Curly*-hez- csak heterozigótákban tartható fenn, homozigótán pedig letális. A *Dichaete* mutánsok szárnytartása tér el a vad típustól, szárnyaikat 45°-ban széttárják.

• Szőrmutációk

A 3. kromoszómán lokalizált *Stubble* (*Sb*) gén mutációi homozigóta állapotban embrionális illetve lárvális életképtelenséget eredményeznek. A mutációra heterozigóta muslicák szőrei (a fejen és a toron) rövidebbek és vastagabbak a vad típusnál megfigyelhetőhöz képest.

A Humeral (Hu) mutáns állatok jellegzetessége, hogy a humerusukon nagy számban található szőrök. A mutáns bélyeg az *Antp* gén *Antp^{Hu}* alléljának köszönhető (az *Antp* 3. kromoszómás gén).

A Sternopleural (Sp) mutánsokban a tor egy részén, a sternopleuriton több illetve hosszabb szőr található, mint a vad típusban. A Sp mutáció a *wingless* génben következik be (*wg^{Sp-1}*), a mutációra homozigóta egyedek nem életképesek. A *wingless* gén a második kromoszómán található.

A vad típusú állatok torpajzsán (scutellumán), négy hosszú szőrszál található. Vannak olyan mutánsok, amelyekben négynél kevesebb szőr van jelen, ilyen Scutoid (Sco) mutáns, mely a *snail* gén egy allélja (*sna^{Sco}*). A szőrfenotípus heterozigótákban figyelhető meg, a mutáció homozigóta állapotban letális. A *snail* a második kromoszómán lokalizált.

• **Testalak**

A *Tubby* (*Tb*) génben bekövetkezett mutáció rövidebb és vaskosabb állatokat eredményez a vad típusnál. Ez különösen L3-as lárvastádiumban és bábkorban szembetűnő. A *Tb* a harmadik kromoszóma jobb karján helyezkedik el.

Az eddig tárgyalt különböző mutációkhoz kapcsolódó gének genomi (adott kromoszómán történő) lokalizációját a **1. táblázat** foglalja össze.

szimbólum	név	Krom. lokalizáció	fenotípus
y	<i>yellow</i>	I(X) 0,0	sárga test
w	<i>white</i>	I(X) 1,5	fehér szem
w^a	<i>white-apricot</i>	I(X) 1,5	narancssárga szem
v	<i>vermilion</i>	I(X) 33,0	élénkpiros szem
B	<i>BarH1</i>	I(X) 57,0	résalakú szem
Cy	<i>Curly</i>	II. 6,1	felkunkorodó szárny
Gla vagy wg^{Gla-1}	<i>Glazed</i>	II. 21,9	sima szemfelszín
Sp vagy wg^{Sp-1}	<i>Sternopleural</i>	II. 21,9	szőrösebb sternopleurit
b	<i>black</i>	II. 48,5	szürkés test
Sco vagy sna^{Sco}	<i>Scutoid</i>	II. 51,0	kevesebb szőr a scutellumon
vg	<i>vestigial</i>	II. 67,0	csökevényes szárny
cn	<i>cinnabar</i>	II. 57,5	élénkpiros szem
bw	<i>brown</i>	II. 104,5	vörösesbarna szem
se	<i>sepia</i>	III. 26,0	csokibarna szem
D	<i>Dichaete</i>	III. 40,7	széttárt szárny
Hu vagy Antp^{Hu}	<i>Humeral</i>	III. 47,5	szőrösebb humerus
Sb	<i>Stubble</i>	III. 58,22	rövid, vastag szőrök
e	<i>ebony</i>	III. 70,7	fekete test
Tb	<i>Tubby</i>	III. 90,6	tömzsi testalkat
ez	<i>eyeless</i>	IV. 2,0	kisebb szem

1. táblázat Néhány eddig tárgyalt gén genomi lokalizációja, valamint mutáns allélja által homozigóta vagy heterozigóta formában okozott fenotípus. A mutáció domináns vagy recesszív voltát nagy illetve kis betűvel jelzik.

▪ A gyakorlat kivitelezése

Vad típusú (+) imágókat és az említett mutánsokat tartalmazó egy-egy kémcső áll mindenki rendelkezésére. Minden kémcsőben egy pár állat, egy hím és egy nőstény található. Néhányszor ütögetssük puha felülethez érintve a kémcsöveket, hogy a muslicák a cső aljára kerüljenek. Közben csepegtessünk néhány csepp étert a kémcső vattadugójára (annak a belső, a kémcső alja felé néző oldalára), így altassuk el az állatokat, majd csempére téve vizsgáljuk meg őket sztereomikroszkóp alatt. Az elkábított muslicákat ecsettel tudjuk mozgatni, megfordítani. Különítsük el a nőstényeket a hímeiktől. Figyeljük meg a külső genitáliákat, a potroh eltérő alakját és pigmentációját a két nemben, valamint azonosítsuk a szextüskét a hímek első pár lábán. Figyeljük meg az említett morfológiai bélyegeket az egyes mutánsokon.

Ezt követően egy több egyedből álló kevert tenyészetet kap mindenki. Éteres altatás után meg kell határozni az egyedek fenotípusát, (ahol lehet: pontos, ahol nem: potenciális) genotípusát és nemét.

○ **Mendeli monohibrid, dihibrid öröklésmenetek, ivari kromoszómán lokalizált gének öröklődése, kapcsoltság és hárompontos térképezés vizsgálata *Drosophila melanogaster*en**

▪ **F2 analízis: mendeli monohibrid, dihibrid öröklésmenetek, ivari kromoszómán lokalizált gének öröklődése**

A gyakorlat célja: nagy egyedszámú F2 (2. filiális) nemzedék fenotípusos megoszlásának vizsgálatán keresztül következtetni tudunk az F1 (1. filiális), majd a P (parentális) nemzedék genotípusára és fenotípusára. Ezáltal javaslatot tudunk tenni az adott mutációk öröklésmenetére és a háttérben álló gének autoszómális vagy ivari kromoszómán való lokalizációjára. A gyakorlat során az előző *Drosophila* gyakorlaton megismert mutánsokkal dolgozunk.

• **Elméleti bevezető: mendeli egygénés (monohibrid) öröklésmenetek**

Keresztezzünk vörösesbarna szemszínű homozigóta recesszív *brown* (*bw*) mutáns nőstényeket vad típusú hímeikkel (*bw*⁺). Tudjuk, hogy a *brown* gén a 2. autoszómán lokalizált. Ismert az is, hogy a vad típusú allél (*bw*⁺) 100%-osan domináns a recesszív mutáns allél (*bw*) felett. Vizsgáljuk meg az F1 és F2 nemzedék feno- és genotípusos megoszlását.

$$P: \quad \text{♀} \frac{bw}{bw} \times \text{♂} \frac{bw^+}{bw^+}$$

$$F1: \quad \frac{bw^+}{bw}$$

Az F1 nemzedék egységesen heterozigóta egyedekből áll (uniformitás törvénye), amelyek vad fenotípusúak. Az F2 utódnemzedék a véletlenszerűen párba állított F1 egyedek egymás közötti, azaz *inter se* keresztezéséből jön létre. A hímek és a nőtények által termelt ivarsejtek genotípusát, az egyedek véletlenszerű párosításával létrehozott utódok (F2 generáció) genotípusát és fenotípusát az alábbi Punnett-tábla szemlélteti:

F2:

nőtény \ hím	bw^+	bw
bw^+	$\frac{bw^+}{bw^+}$ vad típus	$\frac{bw^+}{bw}$ vad típus
bw	$\frac{bw^+}{bw}$ vad típus	$\frac{bw}{bw}$ vörösesbarna szem

2. táblázat

Látjuk, hogy F2-ben az utódok $\frac{3}{4}$ -e vad fenotípusú lesz (téglavörös szem), $\frac{1}{4}$ arányban pedig megjelenik a mutáns fenotípus (vörösesbarna szemszínű állatok), vagyis a híres mendeli 3:1-es hasadási arányt kaptuk, amely a genotípusokat tekintve 1:2:1-es aránynak felel meg ($\frac{1}{4}$ homozigóta vad: $\frac{1}{2}$ heterozigóta: $\frac{1}{4}$ homozigóta recesszív). A fenti öröklésmenet tehát egy mendeli egygénés vagy monohibrid öröklésmenet. A reciprok keresztezés (vad típusú nőtény keresztezése bw mutáns hímekkel) ugyanerre az eredményre vezet.

• Mendeli kétgénés (dihibrid) öröklésmenetek

Keresztezzünk *vestigial* (vg) mutáns, azaz csökevényes szárnyú nőtényeket *ebony* (e), vagyis fekete testű hímekkel. Ezúttal két tulajdonság öröklődését vizsgáljuk. Tudjuk, hogy a *vestigial* gén a 2. autoszómán, az *ebony* pedig a 3. autoszómán helyezkedik el, tehát a két tulajdonság egymástól függetlenül öröklődik. Vizsgáljuk meg az F1 és F2 nemzedék feno- és genotípusos megoszlását.

$$P: \text{♀ } \frac{vg}{vg}; \frac{e^+}{e^+} \times \text{♂ } \frac{vg^+}{vg^+}; \frac{e}{e}$$

$$F1 \frac{vg}{vg^+}; \frac{e^+}{e}:$$

Az F1 egyedek mindkét mutációra heterozigóták, de vad fenotípusúak; egymás közötti kereszteződésük adja az F2 nemzedéket. Mivel a két gén egymástól függetlenül öröklődik, a két gén alléljai a gaméták képződésekor szabadon kombinálódnak, ezért a négy különböző gaméta azonos valószínűséggel képződik mindkét nemből, $\frac{1}{4}$ arányban. A Punnett tábla mutatja, hogy a négyféle ivarsejt 16 féleképpen kombinálódhat, azonban a kombináció eredményeképpen azonos genotípusú egyedek is létrejöhetnek. Ezeket az azonos genotípusú párokat szimmetrikusan a Punnett tábla átlója alatt és felett találjuk. A balról

jobbra haladó átló által metszett cellában vannak az egy vagy két lokuszukon homozigóta genotípusok, míg a mindkét lokuszukon heterozigóta típusok a másik átló mentén találhatóak. A vizsgált mutációk domináns-recesszív öröklésmenete következtében azonban a 9-féle genotípus csak 4 féle fenotípust eredményez.

F2:

nőstény \ hím	$vg^+; e^+$	$vg^+; e$	$vg; e^+$	$vg; e$
$vg^+; e^+$	$\frac{vg^+}{vg^+}; \frac{e^+}{e^+}$ vad típus	$\frac{vg^+}{vg^+}; \frac{e}{e^+}$ vad típus	$\frac{vg}{vg^+}; \frac{e^+}{e^+}$ vad típus	$\frac{vg}{vg^+}; \frac{e}{e^+}$ vad típus
$vg^+; e$	$\frac{vg^+}{vg^+}; \frac{e^+}{e}$ vad típus	$\frac{vg^+}{vg^+}; \frac{e}{e}$ fekete test	$\frac{vg}{vg^+}; \frac{e^+}{e}$ vad típus	$\frac{vg}{vg^+}; \frac{e}{e}$ fekete test
$vg; e^+$	$\frac{vg^+}{vg}; \frac{e^+}{e^+}$ vad típus	$\frac{vg^+}{vg}; \frac{e}{e^+}$ vad típus	$\frac{vg}{vg}; \frac{e^+}{e^+}$ csökevényes szárny	$\frac{vg}{vg}; \frac{e}{e^+}$ csökevényes szárny
$vg; e$	$\frac{vg^+}{vg}; \frac{e^+}{e}$ vad típus	$\frac{vg^+}{vg}; \frac{e}{e}$ fekete test	$\frac{vg}{vg}; \frac{e^+}{e}$ csökevényes szárny	$\frac{vg}{vg}; \frac{e}{e}$ csökevényes szárny, fekete test

3. táblázat

A cellák összeszámlálásával belátható, hogy 9/16 arányban vad fenotípusú állatokat, 3/16 arányban csökevényes szárnyú (*vg*) egyszeres mutánsokat, további 3/16 arányban fekete testű (*e*) egyszeres mutánsokat valamint 1/16 arányban csökevényes szárnyú és fekete testű kettős mutánsokat kapunk. Tehát a hasadási arány 9:3:3:1-es, ami a mendeli kétgénese (dihibrid), domináns-recesszív öröklésmenetek jellemző hasadása. A reciprok keresztezés elvégzése (*ebony* mutáns nőstény keresztezve *vestigial* hímmel), ugyanehhez az eredményhez vezet, ami alátámasztja, hogy egyik gén sem lokalizálódik az ivari kromoszómán.

• **Ivari kromoszómán lokalizált gének öröklődése**

Keresztezzünk *white* (*w*) mutáns nőstényeket vad típusú hímekkel. Ismert, hogy a *white* gén az X kromoszómán lokalizált. Azt is tudjuk, hogy a *white* mutáció recesszíven öröklődik.

$$P: \text{♀ } \frac{w}{w} \times \text{♂ } \frac{w^+}{Y}$$

$$F1: \text{♀ } \frac{w^+}{w} \text{ és } \text{♂ } \frac{w}{Y}$$

Az F1 nőstények heterozigóták (vad fenotípusúak), míg a hímek fehér szeműek (w), mivel X kromoszómájukat az anyjuktól öröklik (cikk-cakk öröklésment). Már itt látjuk az első eltérést a Mendel-szabályoktól, mivel az F1 nemzedék nem egységes (az uniformitás törvénye sérül). Az F2 nemzedék az F1 *inter se* keresztezésből jön létre.

nőstény \ hím	w	Y
w^+	$\frac{w}{w^+}$ vad típusú nőstény	$\frac{w^+}{Y}$ vad típusú hím
w	$\frac{w}{w}$ fehér szemű nőstény	$\frac{w}{Y}$ fehér szemű hím

4. táblázat

Az F2 generáció 1:1 arányban tartalmaz vad típusú egyedeket és fehér szemű mutánsokat. Ez a megoszlás mindkét nemben megfigyelhető.

Ezután végezzük el a reciprok keresztezést, vagyis keresztezzünk vad típusú nőstényeket hemizigóta *white* (w) hímekkel.

$$P: \text{♀ } \frac{w^+}{w^+} \times \text{♂ } \frac{w}{Y}$$

$$F1: \text{♀ } \frac{w^+}{w} \text{ és } \text{♂ } \frac{w^+}{Y}$$

Az F1 nemzedék tagjai mindkét nemben vad fenotípusúak, ami eltér az előző keresztezés F1 generációjának összetételétől.

nőstény \ hím	w^+	Y
w^+	$\frac{w^+}{w^+}$ vad típusú nőstény	$\frac{w^+}{Y}$ vad típusú hím
w	$\frac{w^+}{w}$ vad típusú nőstény	$\frac{w}{Y}$ fehér szemű hím

5. táblázat

Az F2 nemzedék is eltér az előző keresztezés F2 generációjának fenotípusos megoszlásától. Itt a nőstények mind vad fenotípusúak (bár heterozigóták), a hímek fele vad, másik fele pedig fehér szemű mutáns. Vegyük észre, hogy az F2 populáció egészére vonatkoztatva 3:1-es hasadási arány figyelhető meg a vad típusú állatok és a fehér szemű mutánsok között, de

a nemekben a megoszlás különböző, s ez az eltérés az autoszómás lokuszokra vonatkozó mendeli monohibrid keresztezésektől. A fehér szemszín csak a hímekben (pontosan a hímek felében) jelenik meg.

Összefoglalva, az ivari kromoszómán lokalizált gének öröklésmenete eltér az autoszómás génekétől (a reciprocitás, uniformitás szabályai nem érvényesek, és az F2 hasadási arányok is különbözők). Az F2 nemzedékben 1:1-es hasadási arányt kapunk mindkét nemben vad fenotípusú és mutáns egyedekre vonatkoztatva, ha a szülők (P) közül a nőstény homozigóta recesszív mutáns volt az adott X kromoszómában lokalizált génre nézve, a hím pedig vad típusú volt. A reciprok keresztezés esetében (szülők (P) közül a hím hemizigóta formában hordozza az X-hez kötött mutációt, a nőstény pedig vad típusú) az F2 nemzedékben a vad és mutáns fenotípusok aránya 3:1, ahol csak a hímek, azok fele mutatja a mutáns fenotípust.

Az F2 nemzedék fenotípusos megoszlásának statisztikai vizsgálata

Ahhoz, hogy egy tulajdonság öröklésmenetét az ismertetett klasszikus módszerekkel felderíthessük meg kell állapítanunk, hogy a különböző fenotípus kategóriák milyen arányban vannak jelen az F2 nemzedékben. Ehhez statisztikai elemzésre van szükség, mert ha egy keresztezés kevés utódot eredményez illetve viszonylag kevés keresztezést csinálunk, akkor az adatok szórnak, nem pontosan egyeznek a kapott arányok a feltételezett öröklésmenetek alapján várt arányokkal. Mint látni fogjuk, a különböző genotípusú (bármely életszakaszban levő) egyedeknél hallgatólagosan feltételezett azonos életképesség sem teljesül. Különösen a kapcsoltság vizsgálatánál fontos megállapítanunk, hogy a független öröklődés hipotézise alapján várt arányoktól való eltérés vajon pusztán mintavételi hiba - azaz kis minta elemszám - eredménye-e. Az alkalmazandó módszer teljesen általános, ezért egy történetileg érdekes, egyszerű példán mutatjuk be. Morgan 1910-ben a Science folyóiratban publikálta, hogy a *Drosophila* fehér szemszínt okozó mutációja valószínűleg egy olyan faktorhoz kapcsolódik, amiből a hímekben egy kell, hogy legyen, a nőstényekben viszont kettő. A publikáció különleges tudománytörténeti jelentősége, hogy ez volt az első cikk, ami a Mendel-féle géneket nem pusztán absztrakcióként, hanem valamilyen faktorhoz rendelhetőként kezelte. Így ezt a cikket a modern genetika elindítójának is tekintik.

(<http://www.redli.esp.org/foundations/genetics/classical/thm-10a.pdf>)

Morgan és munkatársai egy éve beltenyésztett tenyészetben egy fehér szemű hímét találták. Ezt az egyetlen hímét keresztezték vad szemszínű testvéreivel, ami 1237 vörös szemű egyedet és 3 fehér szemű hím utódot eredményezett. A továbbiakban a 3 fehér szemű utódtól eltekintettek. Az F1 generáció egyedeit egymás között keresztezve a következő utódszámokat kapták:

Vad szemű nőstény	2459 darab
Vad szemű hím	1011 darab
Fehér szemű hím	782 darab
Összesen	4252 darab

6. táblázat

Az F1 egyedek keresztezése ebben az esetben a második fent felírt keresztezésnek felelhet meg, tehát feltételezve, hogy a nőstények heterozigóták, a hímek pedig a vad allélre hemizigóták az eredményeket így is írhatjuk:

nőstény \ hím	w ⁺	Y
	w ⁺	w ⁺ :1011 db vad típusú hím
w	2459 db vad típusú nőstény	w ⁺ :782 db fehér szemű hím

7. táblázat

Ha a hím fehér szemszínét okozó mutáció az X kromoszómán öröklődik, akkor nem várunk fehér szemszínű nőstényeket, azt várjuk, hogy a hímek egyik fele vad típusú másik fele pedig fehér szemű legyen, s azt is várjuk, hogy az összes utód negyede legyen mutáns. A keresztezésből valóban nem származtak fehér szemű nőstények, az arányok egyezése a várttal pedig illeszkedés vizsgálattal ellenőrizhető. A cikk publikálásakor a hipotézis vizsgálat statisztikai eszközei még nem álltak rendelkezésre. Természetesen mindkét arányra vonatkozó hipotézisünket ellenőrizhetjük.

A hímek közti 1:1 megoszlás ellenőrzése:

megfigyelt esetszám (O)	várt esetszám (E)	χ^2 tagjai ((O-E) ² /E)
1011	896,5	14,63
782	896,5	14,63
2459	2126	52,16

8. táblázat

E táblázatban a megfigyelt esetszámot a kísérlet szolgáltatja, a várt esetszámot pedig a 7. táblázatból és az 5. táblázatból számítjuk: a 7. táblázat szolgáltatja az összes egyedszámot, melyet az ötödik táblázatnak megfelelően osztjuk súlyozva (azaz az összes egyed száma 2459 a fele vad típusú nőstény, negyede vad típusú hím, negyede mutáns hím).

A várt esetszámok és a tényleges adatok közti különbséget a várt esetszámhoz viszonyítva a következőképpen számoljuk:

$$\chi^2 \approx \sum_1^n \frac{(O - E)^2}{E} = 14,63 + 14,63 + 52,16 = 81,4$$

Esetünkben n=3-al, mert három kategóriánk van. Bebizonyítható, hogy az így kapott összeg jól közelíti a megfelelő paraméterű χ^2 eloszlást, ha az adatok megfigyelt eloszlása és a várt eloszlás egyezik. Mivel a várt esetszámokat a kísérlettől független ismeretek alapján határoztuk meg, az eloszlás paramétere az ún. szabadsági fok, a kategóriák száma -1 -el egyenlő, azaz 3-1=2. A kapott 81,4-es χ^2 érték óriási, p=0,001-nél is kisebb a valószínűsége, hogy az 1:1 arányra vonatkozó null hipotézisünk teljesülése esetén ekkora vagy ennél is

nagyobb különbséget kapunk az empirikus és a várt eloszlás között. Megismételve az eljárást a 3:1 arányra, szintén szignifikáns eltérést kapunk a null hipotézistől, 0.001-es szignifikancia szinten is. Az alkalmazott eljárást a statisztikusok tiszta illeszkedés vizsgálatnak nevezik. A tiszta jelző arra utal, hogy a várt arányokat nem a vizsgált adatok alapján becsüljük, hanem elméleti megfontolások vagy más adatok alapján tudjuk.

Ezen adatok alapján tehát a *white* lokusz öröklődésére vonatkozó ivari kromoszómás hipotézist el kellene vetnünk! Miért bizonyulhatott mégis igaznak az ivari kromoszómás hipotézis? Vegyük észre, hogy az egész eljárás kimondatlanul feltételezi, hogy a *white* mutáció nem hat az egyedek életképességére. Ugyanakkor láttuk, hogy a *white* mutáns egy ABC transzporter funkcióvesztéses mutációja, ami megváltoztatja a hímek udvarló viselkedését, s ezen keresztül utódaik számát. Ezért van kevesebb mutáns hím a vártnál. A túlélési rátákat kimérve az arányok korrigálhatóak és a hipotézis igazolható. Egyetlen kérdés maradt hátra. Miért nem zavarta Morgant és a kortársakat ez a statisztikai teszt nélkül is érzékelhető eltérés a várt arányoktól? Miért publikálhatta ezeket az eredményeket Morgan a korszak vezető tudományos lapjában? A durva egyezés valószínűleg azért volt elegendő, mert az F2-től független teszt-keresztezésekből adódó arányok is durván alátámasztották az új hipotézist, ami ráadásul összhangban volt a Mendel által feltételezett alapmechanizmussal, aminek az alkalmazási körét nagymértékben kiterjesztette. Ez elég volt ahhoz, hogy se a szerző, se a kortársak ne aggódjanak az eltérések miatt.

• A gyakorlat kivitelezése

Ezután nézzük végig két konkrét példán, hogy az eddigi ismeretek alapján az F2 generáció fenotípusos megoszlásából hogyan következtethető ki az F1 nemzedék, majd a szülői (P) törzsek genotípusa, és hogyan tehetünk javaslatot a háttérben álló gének számára és az öröklés módjára, azaz a tulajdonság öröklésmenetére. Fontos megjegyezni, hogy a gyakorlaton megoldandó példákban minden esetben tiszta szülői vonalakból (azaz homozigóta [vagy X kromoszómán öröklődő tulajdonság esetén hemizigóta] mutánsokból) indulunk ki.

1. Rendelkezésünkre áll az alábbi F2 nemzedék:

F2	nőstények (♀)	hímek (♂)
Vad	61	59
barna szem, vad test	20	21
vad szem, sárga test	59	58
barna szem, sárga test	22	22
egyedszám összesen	162	160

9. táblázat

Első lépésben a két tulajdonság öröklésmenetét külön-külön vizsgáljuk. Ehhez adatainkat átrendezve, úgynevezett *kontingencia táblában*, *nemenként külön-külön* ábrázoljuk:

nőstények	Testszín	
♀	vad	sárga

	vad	61	59	120
	barna	20	22	42
		81	81	162

10. táblázat

A tábla alján, illetve jobb szélén feltüntetett értékek, amiket a megfelelő cellákban álló darabszámok összeadásával kaptunk a *marginálisok*. E szerint a 162 nőstény közül 120 darab vad szemszínű, tehát $120/162=0,74$ a nőstények között a vad szemszínűek aránya. Mivel 81 darab vad testszínű nőstényt találtak $81/162=0,5$ a vad testszínűek aránya. Ugyanez a táblázat a hímekre azt mutatja, hogy a fenti arányok közöttük is hasonlóak.

hímek		testszín		
szemszín		vad	sárga	
	vad	59	58	120
	barna	21	22	42
		80	80	160

11. táblázat

Látjuk tehát, hogy mindkét nemből körülbelül 1:3 hasadási arányt tapasztalunk a szemszínre. Ezért feltételezhetjük, hogy a barna szemszínt okozó mutáció recesszív és mendeli öröklésmentet mutat. Így öröklődik például a 3. autoszómán elhelyezkedő *sepia* gén funkcióvesztéses mutációja (*se*). A testszín öröklődését hasonlóan vizsgálhatjuk. A sárga testszínű mutánsok aránya a vad testszínt mutatókhoz képest mindkét nemből 1:1. Ez arra utal, hogy a sárga testszín X kromoszómán lokalizálódhat, és mivel a mutáns fenotípus az F2 generációban mindkét nemből 1:1-es arányban jelenik meg, feltételezhető, hogy a P generáció nősténye hordozta az X-hez kötött mutációt homozigóta formában. Az előző gyakorlaton megismert mutációk közül így öröklődik az X-hez kötött *yellow* (*y*) mutáció. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a P generációban a nőstény homozigóta recesszív *y* mutáns volt, a hím pedig homozigóta recesszív *se* mutáns.

Ugyanakkor vegyük észre, hogy a *se* mendeli öröklődést mutat, tehát igaz rá a reciprocitás szabálya, s így azt is feltételezhetnénk, hogy a P nőstény *y; se* kettős mutáns, a hím pedig vad típusú volt. E feltevés alapján a keresztezések a következők:

$$P: \text{♀ } \frac{y}{y}; \frac{se^+}{se^+} \times \text{♂ } \frac{y^+}{Y}; \frac{se}{se}$$

$$F1: \text{♀ } \frac{y}{y^+}; \frac{se^+}{se} \text{ és } \text{♂ } \frac{y}{Y}; \frac{se^+}{se}$$

F1-ben vad típusú nőstényeket és sárga testű hímeket kapunk, amelyek *inter se* keresztezése az alábbi F2 nemzedéket hozza létre.

nőstény \ hím	<i>y; se⁺</i>	<i>y; se</i>	<i>Y; se⁺</i>	<i>Y; se</i>

$y^+; se^+$	$\frac{y}{y^+}; \frac{se^+}{se^+}$ vad típusú nőstény	$\frac{y}{y^+}; \frac{se}{se^+}$ vad típusú nőstény	$\frac{y^+}{Y}; \frac{se^+}{se^+}$ vad típusú hím	$\frac{y^+}{Y}; \frac{se}{se^+}$ vad típusú hím
$y^+; se$	$\frac{y}{y^+}; \frac{se^+}{se}$ vad típusú nőstény	$\frac{y}{y^+}; \frac{se}{se}$ barna szemű nőstény	$\frac{y^+}{Y}; \frac{se^+}{se}$ vad típusú hím	$\frac{y^+}{Y}; \frac{se}{se}$ barna szemű hím
$y; se^+$	$\frac{y}{y}; \frac{se^+}{se^+}$ sárga testű nőstény	$\frac{y}{y}; \frac{se}{se^+}$ sárga testű nőstény	$\frac{y}{Y}; \frac{se^+}{se^+}$ sárga testű hím	$\frac{y}{Y}; \frac{se}{se^+}$ sárga testű hím
$y; se$	$\frac{y}{y}; \frac{se^+}{se}$ sárga testű nőstény	$\frac{y}{y}; \frac{se}{se}$ sárga testű, barna szemű nőstény	$\frac{y}{Y}; \frac{se^+}{se}$ sárga testű hím	$\frac{y}{Y}; \frac{se}{se}$ sárga testű, barna szemű hím

12. táblázat

A Punnett-tábla bal oldalán az F2 nőstényeket, jobb oldalán pedig az F2 hímekeket látjuk. A nőstények 3/8-a vad típusú, további 3/8-a sárga testű, 1/8 arányban kapunk barna szemű mutánsokat és további 1/8 arányban pedig sárga testű és barna szemű kettős mutánsokat. Az F2 hímegekben ugyanezt a várható fenotípusos megoszlást mutatja a Punnett-tábla.

A feladat eredeti F2 adatai jól egyeznek az itt kapott arányokkal. A bemutatott hipotetikus adatok mellett nincs szükség statisztikai elemzésre, azonban valóságos esetekben az arányokra vonatkozó hipotézisünket statisztikailag igazolni kell, amire a fentiekben mutatott illeszkedés vizsgálat chi-négyzet próbával kiválóan alkalmas.

1. Rendelkezésünkre állnak az alábbi F2 nemzedék adatai, határozzuk meg a P és F1 generációkat, vezessük le az F2 generációt, és határozzuk meg, hogy az adott gének ivari kromoszómán vagy autoszómán helyezkednek-e el.

F2	nőstények (♀)	hímek (♂)
vad	0	92
babalakú szem	88	0
résszem	93	90
babalakú szem, fekete test	28	0
résszem, fekete test	31	31
fe fekete test	0	29
összesen	240	242

13. táblázat

Ismét válasszuk szét a két morfológiai bélyeg öröklődését és ábrázoljuk adatainkat kontingencia táblában.

nőstények		testszín		
szem		vad	fekete	
	bab	88	28	116
	rés	93	31	114
		181	59	240

hímek		testszín		
szem		vad	fekete	
	vad	92	29	121
	rés	90	31	121
		182	60	242

Ha a fekete testszín vad testszínhez viszonyított arányát vizsgáljuk, látjuk, hogy mindkét nemben körülbelül 1:3 hasadási arányt tapasztalunk (nőstények: 59 fekete testű: 181 vad testszínű; hímek: 60 fekete testű: 182 vad testszínű). Ezért feltételezhetjük, hogy a fekete testszínt okozó mutáció recesszív és mendeli öröklésmenetet mutat. Így öröklődik például a 3. autoszómán elhelyezkedő *ebony* gén funkcióvesztéses mutációja (*e*). A szemalak mutánsok mindkét nemben megfigyelhetők az F2 nemzedékben. A hímek fele résszemű (121 egyed), a másik fele vad szemalakot mutat (121). Az F2 nőstények mind szemalak mutánsok, fele-fele arányban bab- illetve résszeműek. Valószínű, hogy a szemalak mutáció az X kromoszómán lokalizált, és a mutációt a szülők (P) közül a nőstény hordozta, mivel a mutáns bélyeg mindkét nemben megjelenik az F2-ben. Ráadásul a mutáció domináns, mivel minden F2 nőstény szemalak mutáns, a babalak és résszem pedig a mutáns allél heterozigóta valamint homozigóta formában való megnyilvánulása. Ez a szemalak mutáció az előző gyakorlaton tárgyalt *Bar* mutáció, amely homozigótán résszemet, heterozigótán pedig babalakú szemet eredményez. Ezek alapján feltételezzük, hogy a P generáció nősténye homozigóta domináns *Bar* mutáns, a hím pedig homozigóta recesszív *ebony* mutáns volt.

Természetesen az *ebony* mutációt a nőstény is hordozhatta, tehát az a feltevés is megállja a helyét, miszerint a P nőstény *B; e* kettős mutáns volt, a hím pedig vad típusú:

$$P: \text{♀ } \frac{B}{B}; \frac{e^+}{e^+} \times \text{♂ } \frac{B^+}{Y}; \frac{e}{e}$$

$$F1: \text{♀ } \frac{B}{B^+}; \frac{e^+}{e} \text{ és } \text{♂ } \frac{B}{Y}; \frac{e^+}{e}$$

F1-ben babalakú szemű nőstényeket és résszemű hímekeket kapunk, amelyek *inter se* keresztezése az alábbi F2 nemzedéket hozza létre.

nőstény \ hím	$B; e^+$	$B; e$	$Y; e^+$	$Y; e$
$B^+; e^+$	$\frac{B}{B^+}; \frac{e^+}{e^+}$ babszemű nőstény	$\frac{B}{B^+}; \frac{e}{e^+}$ babszemű nőstény	$\frac{B^+}{Y}; \frac{e^+}{e^+}$ vad típusú hím	$\frac{B^+}{Y}; \frac{e}{e^+}$ vad típusú hím

$B^+; e$	$\frac{B}{B^+}; \frac{e^+}{e}$ babszemű nőstény	$\frac{B}{B^+}; \frac{e}{e}$ babszemű, fekete testű nőstény	$\frac{B^+}{Y}; \frac{e^+}{e}$ vad típusú hím	$\frac{B^+}{Y}; \frac{e}{e}$ fekete testű hím
$B; e^+$	$\frac{B}{B}; \frac{e^+}{e^+}$ résszemű nőstény	$\frac{B}{B}; \frac{e}{e^+}$ résszemű nőstény	$\frac{B}{Y}; \frac{e^+}{e^+}$ résszemű hím	$\frac{B}{Y}; \frac{e}{e^+}$ résszemű hím
$B; e$	$\frac{B}{B}; \frac{e^+}{e}$ résszemű nőstény	$\frac{B}{B}; \frac{e}{e}$ résszemű, fekete testű nőstény	$\frac{B}{Y}; \frac{e^+}{e}$ résszemű hím	$\frac{B}{Y}; \frac{e}{e}$ résszemű, fekete testű hím

14. táblázat

A Punnett-tábla bal oldalán az F2 nőstényeket, jobb oldalán pedig az F2 hímekeket látjuk. A nőstények 3/8-a babalakú szemű, további 3/8-a résszemű, 1/8-1/8 arányban kapunk fekete testű, résszemű valamint fekete testű, babalakú szemű kettős mutánsokat. Az F2 hímek 3/8-a vad típusú, 3/8-a résszemű, 1/8-a fekete testű, további 1/8-a pedig résszemű és fekete testű. A feladat eredeti F2 adatai jól egyeznek az itt kapott adatokkal.

▪ 2.B rész: Kapcsoltság és hárompontos térképezés

Eddig láthattuk, hogy milyen öröklésmenetet mutat egy autoszómán lokalizált recesszív mutáció, milyen egy X kromoszómán levő, milyen hasadási arányok jellemzőek a mendeli dihibrid öröklésmenetben, és milyen akkor, hogyha két olyan gén öröklésmenetét vizsgáljuk, amelyek közül az egyik autoszómán a másik pedig X kromoszómán lokalizált.

A XX. század első éveiben Bateson és a Punnett a szagos bükköny két tulajdonságának öröklődését vizsgálták, és az F2-ben tapasztalt hasadási arány nagymértékben eltért a várt 9:3:3:1-es hasadási aránytól, oly módon, hogy két fenotípusos kategóriába tartozó utódok jóval többen voltak a vártnál, míg a másik két kategóriába tartozók jóval kevesebben. Már e két kutató úgy gondolta, hogy fizikailag kapcsolatosak ezek a gének, de nem ismerték a kapcsoltság természetét.

A hipotézis igazolása *Drosophila* genetika alkalmazásával történt. Morgan hasonló eltéréseket talált a mendeli öröklődéshez képest, amikor két autoszómás gén öröklődését vizsgálta. Az egyik gén a *purple* (*pr*) volt, melynek recesszív mutáns allélja homozigóta formában bíbor szemszínt okoz, a másik a *vestigial* (*vg*), amely homozigóta állapotban csökevényes szárnyat eredményez.

Kettősmutáns nőstényeket keresztezett vad típusú hímekekkel, majd az F1 nőstényeket tesztelő keresztezésbe vitte, azaz a mindkét lokuszra recesszív homozigóta hímmel keresztezte.

$$P: \frac{pr}{pr}, \frac{vg}{vg} \times \frac{pr^+}{pr^+}, \frac{vg^+}{vg^+}$$

$$\frac{pr^+}{pr}, \frac{vg^+}{vg} \times \frac{pr}{pr}, \frac{vg}{vg}$$

E keresztezésből az alábbi fenotípusú muslincákat figyelte meg:

nőstény	hím	<i>pr vg</i>
<i>pr⁺vg⁺</i>	<i>pr⁺vg⁺ / pr vg</i>	1339 darab
<i>pr⁺vg</i>	<i>pr⁺vg / pr vg</i>	151 darab
<i>pr vg⁺</i>	<i>pr vg⁺ / pr vg</i>	1195 darab
<i>pr vg</i>	<i>pr vg / pr vg</i>	154 darab

15. táblázat

Ha e gének mendelien öröklődnének, akkor 1:1:1:1-es hasadási arányt kellene kapni. A két nagylétszámú kategória a kiindulási, szülői fenotípusokkal egyezik meg (ún. parentális típus). A parentális típustól eltérő fenotípusú utódok a rekombináns kategóriákat alkotják.

Az egyazon kromoszómán levő gének fizikailag kapcsoltak, az ő öröklődésük nem mendeli módon, hanem a crossing over, az átkereszteződés szabályszerűségeit követve öröklődnek.

Minél távolabb van egymástól a két vizsgált lokusz, annál nagyobb eséllyel következik be átkereszteződés közöttük, annál több rekombináns utód lesz jelen az utódnemzedékben.

Így a rekombinánsok arányából következtetni lehet a vizsgált lokuszok távolságára (ld. *Sordaria* gyakorlat, Haldane-függvény; kis távolságok esetén egyenes illeszthető a függvény kezdeti szakaszára, azaz a rekombináció gyakoriságát és a távolságot számértékileg megegyezőnek tekinthetjük). A kapcsolt génekkel végzett kísérletek éppen ezért lehetővé tették és teszik ezen ún. kapcsolsági logikán alapuló genetikai térképek elkészítését.

A *Drosophila*-ban csak a nőstényekben történhet rekombináció meiosis során, a hímekben nem. Ezért mindig a nőstényben (annak ivarsejtképzése során) lejátszódó rekombinációkat monitorozzuk.

A gyakorlat során hárompontos térképezéseket fogunk végezni: három kapcsolt gén öröklésmenetét fogjuk vizsgálni, amelynek során meghatározzuk a (vizsgált) gének relatív sorrendjét, és a vizsgált lokuszok közötti távolságokat, valamint a crossing over interferenciát is.

A fentiekkel összhangban az első lépés az utódnemzedékben a parentális típusok azonosítása. Mivel relatíve közel elhelyezkedő lokuszok öröklésmenetét vizsgáljuk, így annak a valószínűsége, hogy nem történik rekombináció jóval nagyobb, minthogy történik, ezért a nem rekombináns, a parentális típusba tartozó utódok képviseltetik magukat nagy számban. Figyeljük meg, illetve gondoljuk végig a következőket!

- A rekombináció vizsgálatához a kérdéses lokuszokra heterozigóta nőstényekre van szükség.
- A heterozigóta nőstények kétféleképpen lehetnek. Vagy azonos kromoszómán hordozzák a két mutációt, ezek a cisz heterozigóták vagy különböző kromoszómákon hordozzák azokat, ezek a transz heterozigóták.

- A nőstényben lejátszódó rekombinációs eseményeket csak akkor látjuk az utódnemzedékben, ha a hímekből származó allélek ezt lehetővé teszik (azaz az apától öröklött allél nem domináns az anyától örökölttel szemben). Ebben az esetben a vizsgált utódnemzedék, az ún. térképező populáció egyedeinek fenotípusát a petesejt haplotípusa határozza meg.
- Két parentális típus van, amelyek rekombináció hiányában keletkeznek, és megfeleltethetők a nőstény két homológ kromoszómájának. A két parentális típus egymásnak a „reciproka” a heterozigócia miatt.

Két gén távolságát a vizsgált lokuszok rekombinációs gyakorisága alapján határozzuk meg:

$$r = \frac{\text{rekombinánsok száma}}{\text{az összes utód száma}}$$

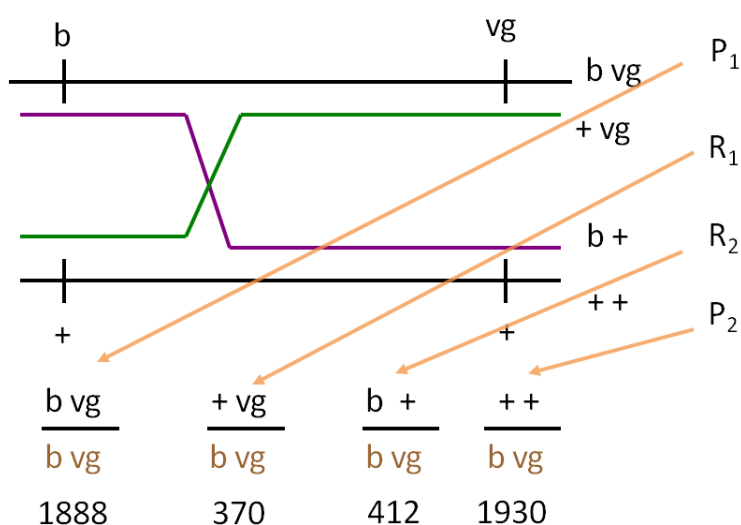
1/a feladat. *Drosophila*-ban két recesszív gén, a *black* (*b*, melynek recesszív mutációja szürkés testszínhez vezet) és a *vestigial* (*vg* - csökevényes szárny) a 2. kromoszómán helyezkedik el. F1 dihibrid, azaz mindkét vizsgált génre heterozigóta nőstényeket tesztelő keresztezésbe vitték és 1930 vad típusú, 1888 szürke testű, csökevényes szárnyú, 412 szürke testű és 370 csökevényes szárnyú utódot kaptak.

Számítsuk ki a *b* és *vg* közti távolságot!

Az utódnemzedék négyféle fenotípusos kategóriája közül két parentális és két rekombináns van. A két parentális jelen esetben a vad típus (1930) és a kettősmutáns (szürke testű, csökevényes szárnyú, 1888), mivel e típusok gyakorisága magas. A dihibrid nőstény genotípusa tehát:

$$\frac{b^+ vg^+}{b vg}$$

A szürke testű (412) illetve a csökevényes szárnyú (370) egyedek a rekombinánsok, a *b* és *vg* locusok közti rekombináció eredményeként jöttek létre (18. ábra).



18. ábra

A *b* és a *vg* locusok közti rekombinációs gyakoriság – r_{b-vg} – meghatározása:

$$r_{b-vg} = \frac{R_1 + R_2}{\text{az összes utód}} = \frac{370 + 412}{1888 + 1930 + 370 + 410} = 0,17$$

A r_{b-vg} rekombinációs gyakoriság 0,17, azaz a d_{b-vg} távolság $0,17M = 17cM$. (Mivel ez az érték nagyobb 5cM-nél, ezért valójában korrigálni kellene a Haldane-függvénnyel, de mi ettől eltekintünk a *Drosophila* gyakorlat során.)

Nézzük meg, mi történik egy harmadik pont bevonása esetén!

1/b feladat Egy másik recesszív gén a *cinnabar* (*cn* - élénkpiros szemszín) szintén a 2. kromoszómában lokalizált. Az F1 trihibrid nőstényekkel tesztelő keresztezést végeztek és 664 vad típusú

652 szürke testű, élénkpiros szemű, csökevényes szárnyú

72 szürke testű, élénkpiros szemű

68 csökevényes szárnyú

70 szürke testű

61 élénkpiros szemű, csökevényes szárnyú

4 szürke testű, csökevényes szárnyú

8 élénkpiros szemű

egyedet kaptak.

Ugyancsak két parentális típus van, de nem kettő, hanem hat rekombináns kategóriát figyelhetünk meg. A két parentális típus:

P1: vad típusú (664)

P2: szürke testű, élénkpiros szemű, csökevényes szárnyú (652)

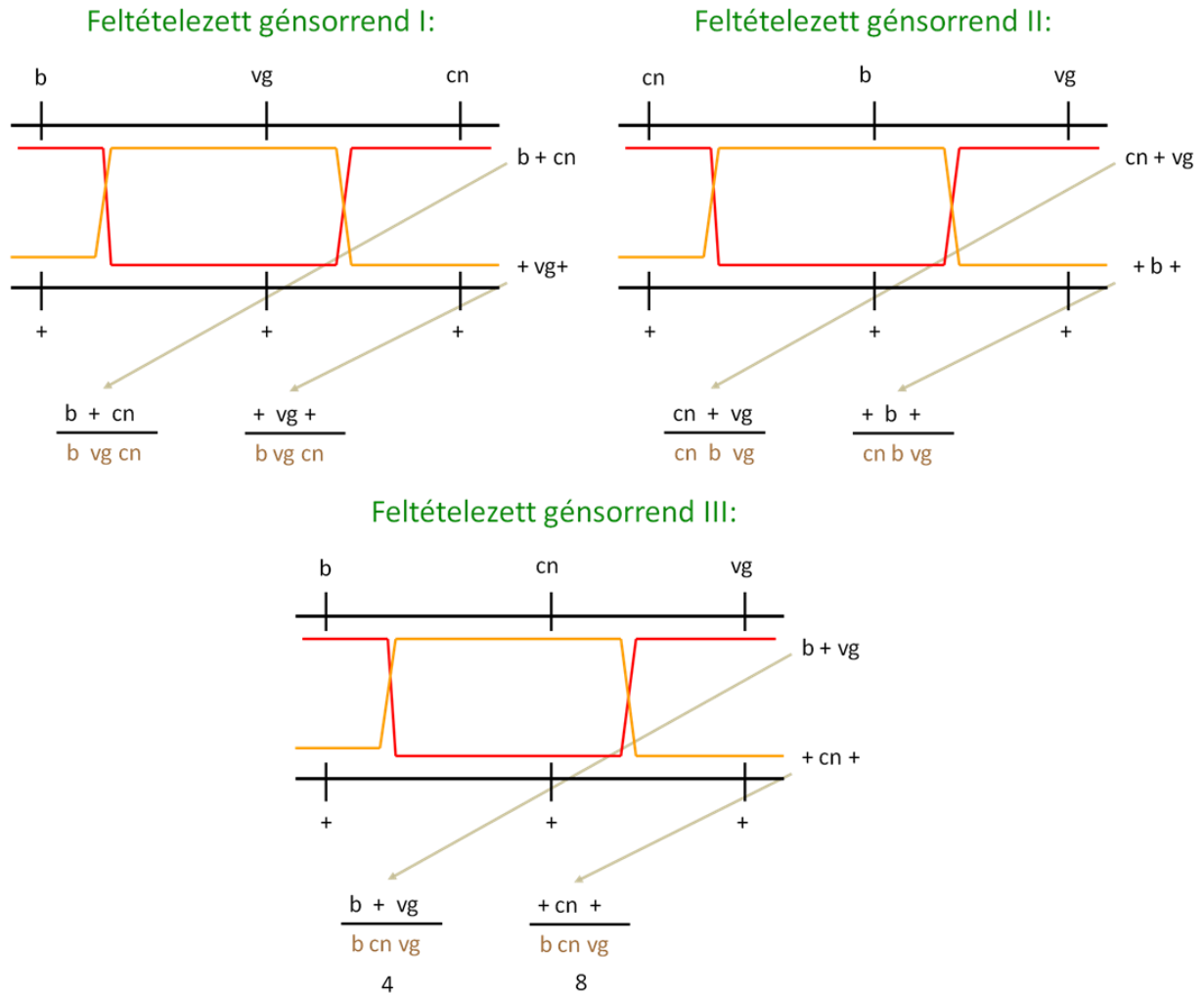
Állapítsuk meg a gének közötti távolságokat, a génsorrendet és a crossing over interferencia értékét. Azonosak az a) és b) kérdésben a *b* és *vg* lokuszok közötti távolságok?

Nem evidencia, hogy a harmadik pont az előbbi kettő között van, meg kell határoznunk a génsorrendet! Csak a relatív génsorrend meghatározására van lehetőségünk (azaz arra, hogy a három pont közül „melyik van középen”), nem nyerünk információt arról, hogy melyik lokusz található a centromerhez ill. a telomerhez közelebb.

A génsorrend meghatározása a ritka osztály segítségével lehetséges. A ritka osztály az a két fenotípusos kategória, amelybe tartozó egyedek a legkisebb arányban képviseltetik magukat. Három pont vizsgálata lehetőséget ad arra, hogy azokat az utódokat is azonosítsuk, melyek kettős crossing overrel jöttek létre. Az egyik crossing over az egyik külső és a belső pont között, míg a másik crossing over a belső pont és a másik külső pont között történt. Két crossing over egyidejű bekövetkeztének, tehát a kétszeres crossing overnek a gyakorisága sokkal kisebb még az egyszeres crossing overénél is, ez a magyarázata a nagyon alacsony egyedszámnak a térképező populációban.

A génsorrend meghatározásához a ritka osztályt úgy használjuk föl, hogy tudjuk a parentális típusoknak köszönhetően a nőstény homológ kromoszómáinak genotípusát és azt is tudjuk, hogy a kétszeres crossing overnek milyen haplotípusú gamétákat kell eredményeznie. (ábra)

A génsorrend meghatározásnál kiindulunk egy feltételezett génsorrendből és megnézzük, hogy e hipotetikus génsorrend esetén kettős crossing overrel keletkező gaméták a ritka osztályt hozzák-e létre. Az 19. ábraán látható, hogy az I. és a II. feltételezett génsorrend nem a ritka osztályba tartozó egyedekhez vezet, míg a III. feltételezett génsorrend az, ami a 4 illetve 8 egyedszámú kategóriához, a tényleges ritka osztályhoz vezet.

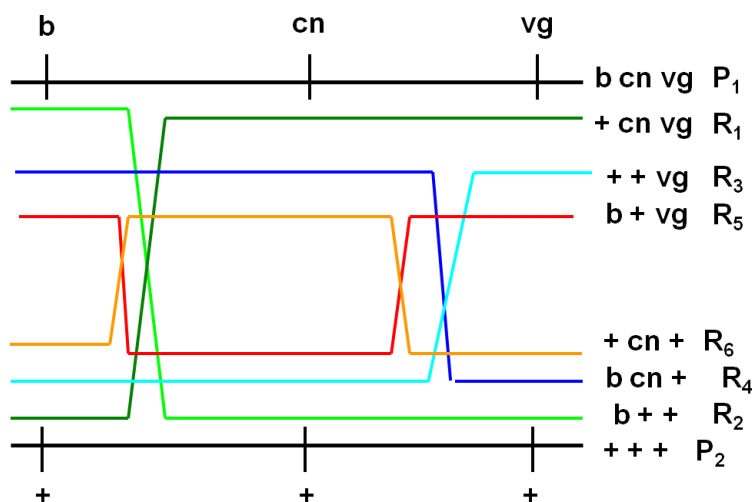


19. ábra

[10. ábra] Megvan tehát a gének relatív sorrendje: $b - cn - vg$.

A távolságok kiszámítása során először a b - cn távolságot határozzuk meg!

Ehhez minden olyan rekombináns egyedet össze kell adni a számlálóban, amely kialakulásához a b és a cn locusok között történt rekombináció. A 20. ábrán láthatjuk, hogy ezek egyrészt az egyszeres rekombinánsok egyik csoportja (R1 és R2, az ábrán az őket létrehozó rekombinációs eseményt a zöld vonalak szimbolizálják), valamint a kétszeres átkereszteződéssel létrejövő R5 és R6. (Az utódok száma összesen 1599.)



20. ábra

$$r_{b-cn} = \frac{R_1 + R_2 + R_5 + R_6}{\text{az összes utód}} = \frac{61 + 70 + 4 + 8}{1599} = 0,0894 \Rightarrow d_{b-cn} = 8,94\text{cM}$$

Hasonlóképpen járunk el a *cn* és *vg* locusok közötti távolság meghatározásánál, az ábrán az R3 és R4 rekombinánsokat létrehozó átkereszteződéseket a kék vonalak jelzik.

$$r_{cn-vg} = \frac{R_3 + R_4 + R_5 + R_6}{\text{az összes utód}} = \frac{68 + 72 + 4 + 8}{1599} = 0,0950 \Rightarrow d_{cn-vg} = 9,50\text{cM}$$

E térképező populáció felhasználásával is meghatározhatjuk a d_{b-vg} távolságot. Minden egyes rekombinációs eseményt összegezni kell. Ez jelenti az összes egyszeres rekombináns, valamint a kétszeres rekombinánsokat, ráadásul az utóbbiakat kétszeresen, hiszen egy kétszeres rekombinációval létrejött egyed két rekombinációs eseményt jelent.

$$r_{b-vg} = \frac{R_1 + R_2 + R_3 + R_4 + 2x(R_5 + R_6)}{\text{az összes utód}} = \frac{61 + 70 + 68 + 72 + 2x(4 + 8)}{1599} = 0,1844$$

$$d_{b-vg} = 18,44\text{cM}$$

Természetesen ezt a távolságértéket kapjuk akkor is, hogyha a már korábban kiszámolt d_{b-cn} és d_{cn-vg} távolságokat egyszerűen összeadjuk. Ugyanakkor az így kapott 18,44cM nem egyezik meg az 1/a feladatban meghatározott 17cM-nal! A különbség fő oka abban keresendő, hogy 'beiktattunk egy belső pontot', így láthatóvá lettek a kétszeres crossing overek a *b* és a *vg* locusok között. Ez magyarázza azt a tényt, hogy mennél több pont áll a rendelkezésünkre a géntérképezés során, annál pontosabban lesz a lokuszok közötti távolság becslése.

A térképezésnél a kiindulási hipotézisünk az volt, hogy az átkereszteződések bármely bázispárnál azonos valószínűséggel történhetnek és egymástól függetlenül következnek be egy-egy kromoszóma szakaszon, azaz nem befolyásolják egymás előfordulását. Ez a hipotézis azonban nem teljesen igaz. A megfigyelt és a várt kétszeres átkereszteződések gyakoriságának hányadosa az ún. incidencia koefficiens (rövidítése cc).

$$cc = \frac{\text{kapott kétszeres crossing overek gyakorisága}}{\text{várt kétszeres crossing overek gyakorisága}}$$

A függetlenségtől való eltérés mértéke meghatározható a crossing over interferencia (jele: I) segítségével. I azt fejezi ki, hogy ha valahol crossing over történik, az milyen hatással van egy második crossing over kialakulására. A koincidencia koefficiensét egyből kivonva kapjuk meg az interferencia értékét. Mivel arányszámról van szó, mértékegysége nincs.

$$I = 1 - cc$$

Ha $I = 1$, akkor komplett interferenciáról, teljes mértékű gátlásról beszélünk, a kialakult crossing over nem teszi lehetővé egy másik crossing over létrejöttét (nincs kétszeres crossing over).

Ha $0 < I < 1$, akkor inkomplett, (pozitív) interferencia van, a már kialakult crossing over valamilyen (de nem teljes) mértékben gátolja az újabb crossing over létrejöttét.

Ha $I < 0$, az a negatív interferencia jelensége, ez akkor következik be, hogyha a már kialakult crossing over serkentően hat egy másik crossing over létrejöttére. (E területek a rekombinációs forrópontok.)

Határozzuk meg az 1/b feladatban az I-t!

A valószínűségszámítás tanulmányainkból tudjuk, hogy két független esemény együttes bekövetkezésének valószínűsége a két esemény külön-külön vett bekövetkezési valószínűségének a szorzata. A kétszeres átkeresztződés várt gyakoriságát tehát az egyik és a másik lokuszpár közötti rekombinációs gyakoriság szorzataként kapjuk meg.

$$cc = \frac{\frac{4}{1599} + \frac{8}{1599}}{\frac{61 + 70 + 4 + 8}{1599} \times \frac{68 + 72 + 4 + 8}{1599}} = 0,88 \Rightarrow I = 1 - 0,88 = 0,12$$

Az interferencia mértéke tehát 0,12, azaz gátlás van.

Mikrobiális genetika – I. fejezet

Dr. Varga Máté egyetemi tanársegéd és Dr. Lengyel Katalin egyetemi tanársegéd

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

○ 1. Bevezetés

Furcsa belegondolni, hogy a globális biomassza egyik legfontosabb csoportjának, az ismert földi fajok elsöprő többségét adó prokariótáknak a létezéséről egészen a 17. század végéig fogalmunk sem volt. Ekkor, Antony von Leeuwenhoek úttörő munkájának köszönhetően, derült fény a mikroszkópikus méretű, különleges alakú, egysejtű élőlények létezésére. Ugyanakkor még több száz évnek kellett eltelnie, amíg Louis Pasteur és Robert Koch munkája rávilágított arra is, hogy milyen fontos szerepük lehet ezeknek az egyszerű szerveződésű szervezeteknek más élőlények életében is, milyen relevánsak számos fertőző emberi betegség szempontjából.

Ma már persze tudjuk, hogy a prokarióták hihetelen faj- és egyedszámmal rendelkeznek; a felépítésükhöz használt szén-atomok száma egyes becslések szerint meghaladja a növények és állatok összefelépítéséhez szükséges szén-atomokét. A tengerek biomasszájának közel 90%-át mikroorganizmusok adják, amelyek hasonló nagyságrendű bakteriofágnak a gazdái is egyben. Mindez egy komplex mikrobiális ökoszisztéma létezésére utal, ami a tengerek élővilága számára nélkülözhetetlen.

Az utóbbi években arra is fény derült, hogy a bőrünkön és emésztőrendszerünkben élő mikrobiális közösség, az úgynevezett humán mikrobiomot alkotó bakteriális sejtek szintén fontos résztvevői életünknek. Ezeknek a prokarióta sejteknek a száma közel nagyságrendnyivel nagyobb, mint saját sejtjeink száma. Figyelembe véve, hogy számos megfigyelés és kísérletes eredmény alátámasztja, hogy a mikrobiom összetétele, illetve annak változása kiváltója lehet számos, korábban más okra visszavezetett emberi betegségnek, egészségügyi szempontból is releváns, hogy megértsük, milyen törvényszerűségek vezetnek a mikrobiom összetételének kialakulását.

A fent említett szempontok már önmagukban is komoly indokot képeznének, hogy a ezeknek a mikrobáknak a genetikáját jobban megismerjük, de említést igényel még egy ok, ami a kezdetektől fogva ideális modellorganizmusokká tette a fágokat és baktériumokat: genetikai anyaguk szerveződése relatíve egyszerű, aminek köszönhetően számos a génműködés számos, később univerzálisnak bizonyuló szabályszerűségét először fágokban illetve baktériumokban írtak le.

A teljesség igénye nélkül említést érdemelnek Oswald Avery, valamint Alfred Hershey és Martha Chase kísérletei, amiben *Pneumococcus* baktérium törzsek, illetve T2 fágok felhasználásával igazolták,

hogy a sejtek genetikai örökítőanyaga a DNS-ben található; Seymour Benzer a T4 fág *rII* mutánsai segítségével feltárta a gének felépítését; illetve François Jacob és Jacques Monod, akiknek a *lac* operonon végzett kísérletei hosszú időre megszabták a génműködés szabályozásáról kialakított elméleteket.

Az elmúlt években a baktériumok továbbra is fontos inspirációs forrásként szolgáltak evolúciós vizsgálatokban, a génműködés-szabályozás magasabb szintjeinek megértésében és a genetikai hálózatok szabályszerűségeinek feltárásában. Mindez, az említett egészségügyi relevancián túl, sokban hozzájárult a szintetikus biológia térnyeréséhez is. Igény szerint „programozott”, genetikailag módosított mikroorganizmusokat használhatunk egyszerű bioszenzorként, bioüzemanyagok és gyógyszerek termelésére, terápiás ágensként, bonyolultabb biológiai folyamatok modellezésére, a felhasználásnak szinte csak a képzelet szab határt (lásd bővebben: <http://igem.org>).

Végül, de nem utolsó sorban, a baktériumok genetikájának jobb megértése hatékony eszközöket adott a kezünkbe, hogy eukarióta genomokat is megváltoztassunk: például a *Xanthomonas* fajok TALE (Transcription Activator-Like Effector) nukleázai, és a bakteriális immunrendszerként működő CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) rendszer működési logikáját felhasználva az utóbbi években nagy hatékonyságú genom-editáló eljárások születtek.

A gyakorlat során, néhány klasszikus kísérletet is felelevenítve, egy rövid bemutatót kívánunk adni arra, hogy miképp használható a mikrobiális genetika a komplementáció fogalmának megértésére, a génműködés szabályozásának, a sejtekre ható evolúciós erőknek, valamint a bakteriális kommunikációnak a megértésére.

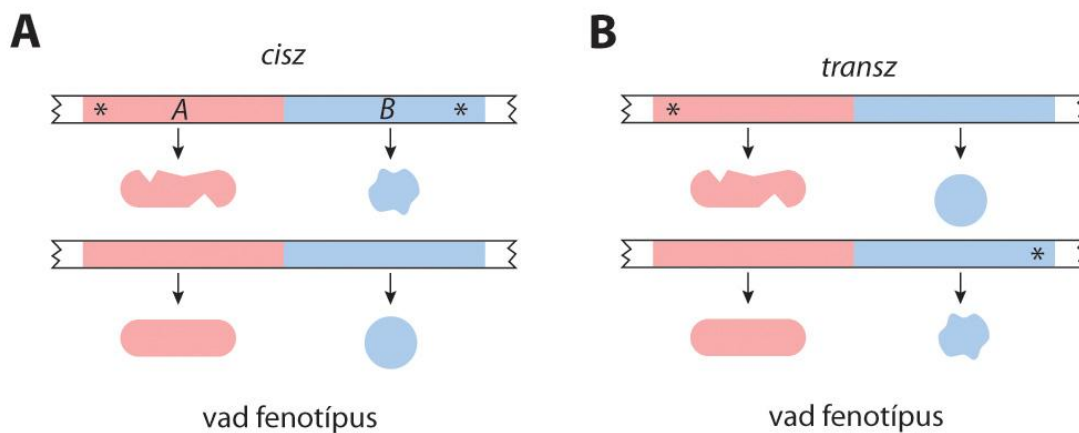
A gyakorlat során a következő kísérletek végezzük el:

1. Komplementációs analízis T4 *rII* fágok segítségével
2. A génműködés szabályozásának vizsgálata és komplementációs analízis különböző *lac* operon mutánsok felhasználásával.
3. A kvórum érzékelés jelenségének bemutatása egy biolumineszcens baktériumfaj viselkedésén keresztül.
4. A baktériumokra ható, genomméret- és energiafelhasználás-optimalizálást okozó szelekciós erők bemutatása egy erős GFP-expressziót biztosító baktérium mutációin keresztül.

○ 2. Komplementáció

A klasszikus genetika egyik fontos eszköze a mutánsok előállítása és vizsgálata. Azonos fenotípust mutató mutánsokról a **komplementációs (más néven cisz-transz) teszttel** határozhatjuk meg, hogy azonos vagy különböző génekben történtek-e a mutációk. Az egy génen belüli a mutációk egymás allélikus változatai. Fontos megjegyezni, hogy komplementációs vizsgálatot csak recesszív mutációkkal, allélekkel tudunk végezni.

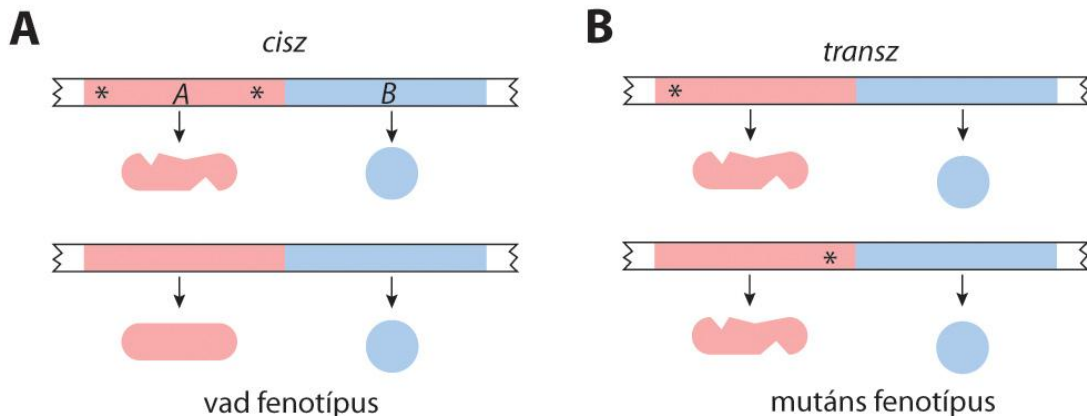
A komplementációs analízis lényege, hogy megállapítjuk a heterozigóták fenotípusát. Könnyű belátni, hogy ha a két mutáció cisz helyzetben helyezkedik el, akkor (1. és 2. ábrák) akár azonos akár különböző génekben történt a mutáció vad fenotípust tapasztalunk, hiszen az egyik kromoszómáról vad típusú géntermék keletkezik. A számunkra fontos információt a transz heterozigóták fenotípusa rejti. Ha a két mutáció azonos génben található a transz heterozigóta fenotípusa mutáns lesz, mindkét kromoszómáról hibás géntermék keletkezik. Ha a mutációk két különböző gént érintettek, a transzheterozigóta vad fenotípusú lesz, mindkét génből lesz vad allél az élőlényben.



[Alternatív szöveg: Komplementáció vizsgálat nem allélikus mutációknál]

[Képaláírás: **1. ábra Komplementáció vizsgálat nem allélikus mutációk esetén** Vad fenotípus alakul ki a heterozigótákban, ha a két mutáció különböző génekben található. Amikor cisz helyzetben találhatóak a mutációk az egyik kromoszómáról csak hibás fehérjetermék keletkezik mindkét génről (A, B), a másik kromoszómáról azonban mindkét génről vad típusú fehérje íródik át. Recesszív mutációk esetében tehát az élőlény vad fenotípusú lesz. Transz helyzetben szintén termelődik vad típusú fehérjetermék mindkét génről.]

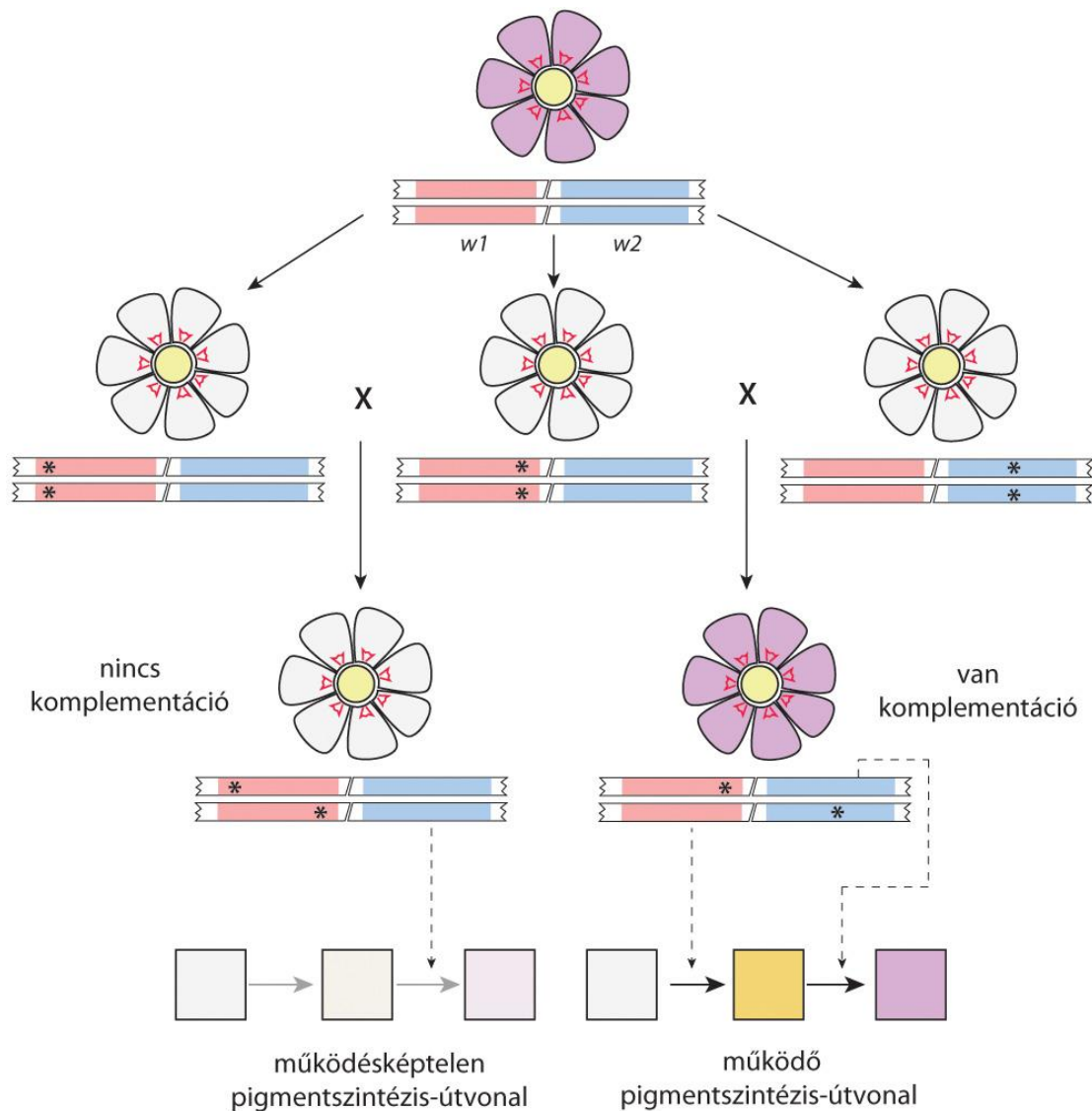
Vagyis megfordítva, ha létrehozuk a transz heterozigótát és az vad fenotípust mutat, a vizsgált mutációk két génben lokalizáltak, ha mutáns fenotípusú egyetlen gén allélikus változatai.



[Alternatív szöveg: *Komplementáció vizsgálat allélikus mutációknál*]

[Képalírás: **2. ábra Komplementáció vizsgálat allélikus mutációk esetén.** Ha a mutációk azonos génben találhatóak eltérő fenotípust kapunk cisz és transz heterozigóták esetében. Amikor cisz helyzetben találhatóak a mutációk az egyik kromoszómáról az érintett génről (A) hibás fehérjetermék keletkezik, a másik kromoszómáról azonban vad típusú fehérje íródik át. Recesszív mutációk esetében tehát az élőlény vad fenotípusú lesz. Transz helyzetben azonban az A génről mindkét kromoszóma mutáns allélt tartalmaz, vagyis csak mutáns fehérje keletkezik, az élőlény fenotípusa mutáns lesz.]

Miért alakulhat ki két gén mutációja esetén azonos fenotípus? A legegyszerűbb eset, ha a gének termékei egy útvonalon működnek, akár bioszintetikus, akár jelátviteli útvonal esetében. Bioszintetikus útvonal közül képzeljünk el egy útvonalat, melynek végterméke a lila pigment mely a növény virágjában megtalálható. Ha több fehér virágszínű növényt találunk a komplementációs analízissel megállapíthatjuk, hogy egy vagy több génben történt-e a mutáció (3. ábra). Ha két fehér virágú növény keresztezünk és az első generációban (F1) lila színű virágokat kapunk, a mutáció különböző génekben történt, ha az első generációban minden növény fehér virágú, azonos génben történt a mutáció. A bioszintetikus utaknál csak akkor kapunk azonos fenotípust különböző gének esetében, ha az előanyagból kialakuló köztes termék szintelen, illetve általánosabban, ha a köztes terméknek nincs önálló fenotípusa. Vegyük észre, ugyanezen mutációkkal végzett vizsgálat során, ha F1 után megvizsgáljuk F2 generációt is 9:7 hasadási arányt kapnánk, vagyis komplementer öröklésmentet.



[Alternatív szöveg: Virágszín öröklődés]

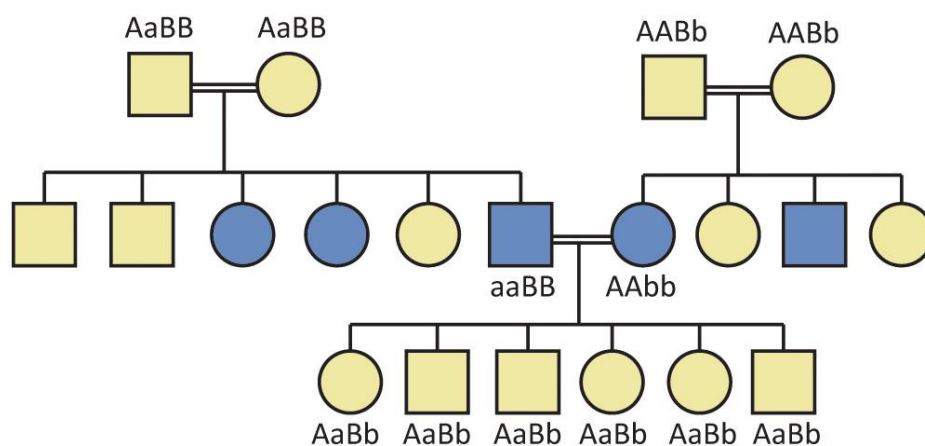
[Képaláírás: **3. ábra Egy virág színének öröklődése.** Egy kék/lila virágú növény esetében három független, fehér virágszínű mutánst találtak. A fehér virágú növények keresztezéséből egyik esetben fehér virágú növényeket kaptunk. Ebben a keresztezésben a mutációk nem komplementáltak egymást, tehát azonos génekben találhatóak. A másik keresztezés eredményeként vad/lila/kék virágú utódokat kaptunk. Ebben az esetben a mutációk komplementáltak egymást, a mutációk különböző génekben találhatóak. A feltételezett bioszintetikus útvonalon tehát két enzim található, melyek mutációi azonos (fehér) fenotípusú virágokat alakítanak ki. A komplementációs analízis önmagában nem alkalmas arra, hogy eldöntse mely enzim működik korábban az útvonalon.]

Másik lehetőség, ha nem két különböző lépés enzimei szenvednek mutációt, hanem valamely lépést egy heterodimer katalizál és a fehérjekomplex bármely tagjának mutációja esetében az nem működőképes.

Jelátviteli útvonalak között is találhatunk példát: emlékezzünk csak a *C. elegans* fejezetben megismert vulva fejlődés útvonalára. Több gén mutációja is vulvanélküli (vulvaless) fenotípust alakíthat ki, illetve természetesen egy-egy génnek is több mutáns allélja ismert.

A közös útvonalon kívül is elképzelhető, hogy két gén terméke azonos fenotípus kialakításában játszon szerepet. Gondoljunk csak arra, hogy a *C. elegans* genomjában száznál több *unc* gén ismert, amelyek mindegyikének mutációja mozgásképtelen állatokat eredményez. Az állatok igen eltérő okokból lehetnek bénultak, például: miozin mutációja, idegrendszerfejlődés szabályozása vagy ingerületátvivő anyagok hiánya.

Végül lássunk egy humán példát is. Az alábbi családfa a siketség öröklődését mutatja be. Látható, hogy a siketséget recesszív allélek alakítja ki, azonban a különböző gének mutációjára homozigóta siketek házasságából halló gyermekek születnek (4. ábra).

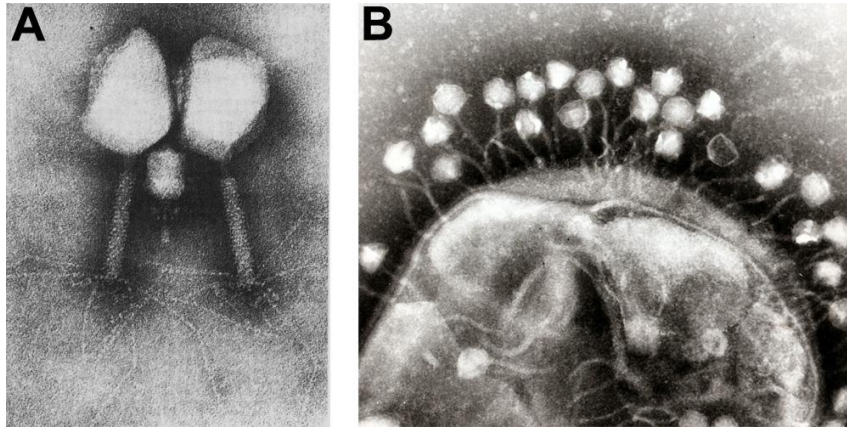


[Alternatív szöveg: Siketség öröklődése]

[Képaláírás: **4. ábra A siketség öröklése.** A vizsgált házaspár mindkét tagja siket. A siketség esetükben recesszív módon öröklődött (a szüleik, az ábrán az egyes generáció, hallók voltak). Gyermekeik mind hallók, ebből következtethetünk arra, hogy a szülők eltérő gének mutációi miatt voltak siketek.]

▪ T4 fág komplementációs vizsgálata

A gyakorlat során Seymour Benzer híres komplementációs analízisét mutatjuk be. Benzer elegáns kísérleteihez, melyben a gén fogalmát szerette volna pontosítani, a T4 fágot választotta alanyul. A T4 fág egy az *E. coli*-t elpusztítani (lízálni) képes vírus (5. ábra).



[Alternatív szöveg: *T4* bakteriofág]

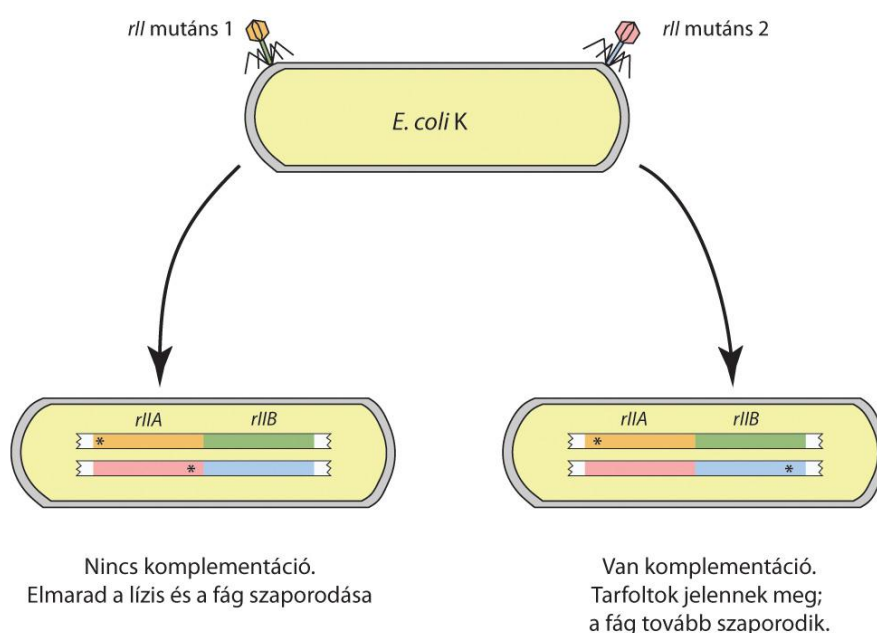
[Képaláírás: **5. ábra A T4 bakteriofág.** (A) Jól megfigyelhető a fágok struktúrája: a DNS-t tartalmazó feji rész (kapszid), a rövid nyaki rész, és a hosszú, rugalmas talprész, a jellegzetes fehérjeshálakkal. (B) T4 fágok baktérium sejtet fertőznek. (Források: http://www-physics.ucsd.edu/~des/Viral_DNA_Packaging.html és Wikipédia)]

A T4 fág mutánsokat vizsgálva találtak olyanokat mely a szokásosnál nagyobb tarfoltot (plakk) képeztek baktériumpázsiton. Ezeket a mutánsokat feltételezhetően gyorsabban pusztítják el a baktériumokat, mint vad fágok, ezért gyorsan lizálóknak nevezték el, amelynek rövidítése az angol **rapid lysis** kifejezésből az *r* lett.

Az *r* mutánsok a T4 fág genomjának három lókuszára térképeződtek (*rl*, *rII*, *rIII*). Benzer ezek közül az *rII*-t kiválasztva szeretne volna megvizsgálni, hogy funkcionálisan egy vagy több egység található-e a lókuszon. A komplementációs vizsgálatokhoz ezek a mutánsok különösen alkalmasak, mert *E. coli* K12(λ) törzsét nem képesek elpusztítani csak a B jelű törzset. Ezek a mutánsok kondicionális mutánsoknak tekinthetőek, a K12 törzs jelenti a restriktív körülményt, a B törzs a permisszív környezetet.

Benzer eredményei azt mutatták, hogy két funkcionális egység (gén) található az *rII* lókuszon belül, melyeket elnevezett *rIIA*-nak és *rIIB*-nek. Benzer nem a gén kifejezést használta a funkcionális egység megnevezésére, hanem megalkotta **cisztron** fogalmát. A cisztron, vagy komplementációs csoport az a funkcionális egység, amelyen belül a mutációk transz helyzetben nem komplementálják egymást. A cisztron kifejezés mára kikopott az általános használatból, tulajdonképpen a gén szinonímájaként alkalmazhatjuk.

Hogyan lehet komplementációs vizsgálatot végezni haploid organizmusokkal, mint amilyenek a bakteriofágok és baktériumok? Baktériumok esetében a lac operon fejezetben megismert parciális diploid előállítási módszerekkel. Fágok esetében a koinfektlás jelenti a megoldást. Koinfekció esetén egyetlen baktérium sejtet két eltérő genomú faggal fertőzünk meg egyszerre. Az *rII* lókuszt vizsgálatakor a koinfekciót *E. coli* K12(λ) törzsén végezzük, ha a mutációk képesek egymást komplementálni (különböző génekben, cisztronokban találhatóak) feltisztulást tapasztalunk, ha nem komplementálják egymást nem látunk feltisztulást (6. ábra).



[Alternatív szöveg: Komplementáció vizsgálat T4 fág *rII* lókuszában]

[Képaláírás: **6. ábra Komplementációs vizsgálat T4 fág *rII* lókuszában.** *Escherichia coli* sejteket koinfektlunk két különböző mutáns *rII* faggal. Ha mindkét mutáció azonos génben található (*rIIA*), a fágok nem képesek a baktériumot, elpusztítani, lizálni, újabb fágok nem szabadulnak ki a baktérium sejtéből, tehát nem keletkezik tarfolt. A második esetben, jobb oldalon, a mutációk különböző génekben találhatóak, komplementálni képesek egymást. A baktérium sejtet a fágok lizálják és újabb fágok keletkeznek, melyek aztán tarfoltot alakítanak ki a baktériumpázsiton.]

A koinfekció esetén lehetőség van az eltérő genomú fágok közti rekombináció vizsgálatára is. Gondoljuk végig a rekombináció és komplementáció közti különbséget az *rII* lókuszt tekintve! Rekombináció után új genotípusú fág utódok keletkeznének, míg komplementáció után csak az eredeti (szülői) genotípusú fágok jönnek létre. A fenti ábrán tehát a két mutáció közti rekombináció

esetén létrejöhet vad genotípusú utód fág, illetve a két mutációt cisz helyzetben tartalmazó, kettős mutáns fág is.

Benzer nem elégedett meg a komplementációs vizsgálatokkal. Elvégezte az *rII* lókuszt finomtérképezését is. Pont mutánsok, deléciós mutánsok térképezésével igazolta, hogy a gén nem oszthatatlan egység, (mint azt korábban a gyöngy modellben feltételezték), mutáció és a rekombináció egysége a bázispár.

▪ T4 *rII* bakteriofág-mutánsok komplementációjának vizsgálata

Felhasznált anyagok, eszközök

NA táptalajok

NAF (félfolyékony Nutrient agar)

Escherichia coli K12(λ) és B törzsének tenyésztete

hat, különböző T4 *rII* mutáns

automata pipetta

A gyakorlat menete

A gyakorlat során 6 darab *rII* mutánssal végzünk komplementációs vizsgálatot. Meghatározzuk, melyek tartoznak azonos cisztronba. A vizsgálat során cseppentéssel végzünk. Ebben a kísérletben tehát nem egyedi plakkokat fogunk látni, hanem a fágok felcseppentési helyén a feltisztulás jelzi a baktériumok lízisét.

A mutáns fágok fenotípusát megvizsgáljuk *E. coli* K12(λ) és B baktériumtörzsön is. Ezt a két lemezt használjuk kontrollként a komplementációs vizsgálatokhoz, csoportonként elegendő egy-egy lemezt elkészíteni. A lemezekhez összemérünk:

<u>1. tesztlemez</u>	<u>2. tesztlemez</u>
0,2 ml <i>E. coli</i> K12(λ) szuszpenzió	0,2 ml <i>E. coli</i> B szuszpenzió
3 ml 45°C-os NAF	3 ml 45°C-os NAF

A baktériumszuszpenziót is tartalmazó lágyagart(NAF) NA lemezekre öntjük és eloszlatjuk. A lemezeket 10 percig hagyjuk megszilárdulni. A tesztelendő **T4** fág szuszpenziójából 5 µl-t cseppentsünk a teszt-lemez felszínére (ügyelve arra, hogy a pipettahegyet ne nyomjuk bele az agarba, és a csepp ne folyjon szét túl nagy területre). Ezt megismételjük az összes vizsgálandó fág-szuszpenzióval. A lemezeket 37°C-on inkubáljuk egy éjszakán át.

Komplementáció vizsgálatához páronként egy-egy NA lemezre a következő fedőagart öntik:

0,2 ml *E. coli* K12(λ) szuszpenzió

3 ml 45°C-os NAF

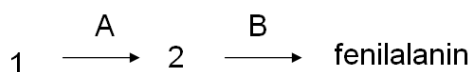
A lemezeket 10 percig hagyjuk megszilárdulni. A tesztelendő **T4** fág kevert szuszpenziójából 5 µl-t cseppentsünk a teszt-lemez felszínére. Ezt megismételjük az összes vizsgálandó fág-keverékkel. A lemezeket 37°C-on inkubáljuk egy éjszakán át.

Feladat:

1. Vizsgálja meg a lemezeket, hogy tapasztal-e tisztulást a felcseppentés helyén!
2. Sorolja be az egyes fágtörzseket komplementációs csoportokba!

▪ Példafeladatok

1. Tételezzük fel, hogy a fenilalanin bioszintézisét két enzim, *pheA* és *pheB* gének termékei végzik egy útvonalon. A enzim egy szubsztrátot (1) alakít át egy feltételezett köztes terméké (2). B enzim ezt a köztes terméket alakítja át fenilalaninná.



Öt fenilalanin auxotróf mutánst sikerült létrehozunk (*m1-m5*). A mutánsok azonos fenotípusúak, nem képesek fenilalanint szintetizálni, tehát képtelenek olyan tápközegben növekedni, mely nem tartalmazza ezt az aminosavat. Mind az öt mutáció recesszív.

Különböző vizsgálatokkal meghatározták hogy az *m1*, *m2* és *m4*-es mutációk a *pheA*, az *m3* és *m5* mutációk a *pheB* génben találhatók.

a, Létrehozzunk egy parciális diploid baktérium törzset, amely *m1*-es és *m2*-es mutációkat hordoz (mindkét génre heterozigóta a törzs). Milyen fenotípusú lesz a parciális diploid baktériumunk?

b, Létrehozzunk egy másik parciális diploid baktérium törzset, amely *m1* és *m3* mutációkat hordoz (heterozigóta). Milyen lesz ennek a törzsnek a fenotípusa?

c, Az előző két kérdésre alapozva tölts ki a következő táblázatot! Tegyen + jelet, ha a törzs képes fenilalanint szintetizálni (vad fenotípus) és - jelet, ha a törzs nem képes szintetizálni a fenilalanint (mutáns fenotípus)!

	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>m3</i>	<i>m4</i>	<i>m5</i>
<i>m1</i>					
<i>m2</i>					
<i>m3</i>					
<i>m4</i>					
<i>m5</i>					

d, Végül tételezzük fel, hogy létezik egy *m6*-os jelű mutáció, amely a *pheA* génben található, de domináns, vagyis a heterozigóták sem tudnak fenilalanint szintetizálni. Az előzőekben megadott módon tölts ki a következő táblázatot!

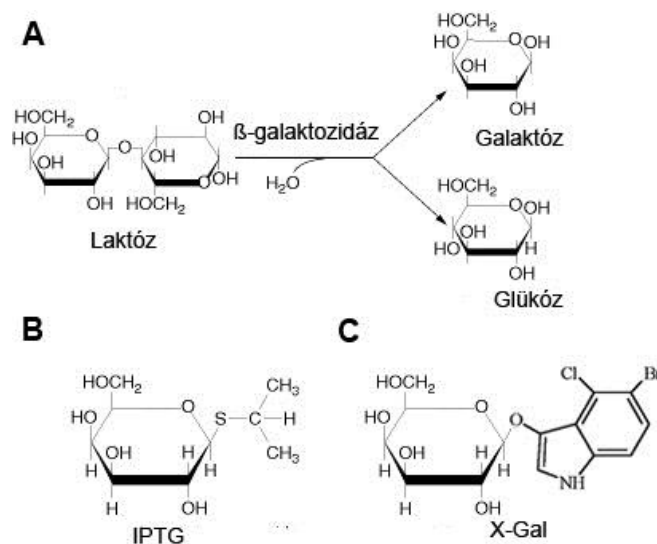
	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>m3</i>	<i>m4</i>	<i>m5</i>	<i>m6</i>
<i>m6</i>						

2, T4 fág *rII* régiójában mutáns fágok komplementációját vizsgálták meg. Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza. Mely mutációk tartalmaztak azonos cisztronba? (+ = a két mutáció komplementálta egymást, - = a két mutáció nem komplementált)

	a	b	c	d	e	f
a	-	+	-	+	-	-
b		-	+	-	+	+
c			-	+	-	-
d				-	+	+
e					-	-
f						-

○ 3. *Lac operon*

Az *Escherichia coli* többféle szénforrást képes hasznosítani. A ritkábban előforduló diszaharidok lebontását végző enzimeket azonban a sejt nem szintetizálja olyankor, amikor az adott cukorféleség nincs jelen a tápközegben, vagy könnyebben hasznosítható szénforrás is rendelkezésre áll. A standard körülmények között növekvő baktériumok számára a glükóz jelenti az elsődleges szénforrást, hiányában azonban a sejt képes laktózt is feldolgozni, azt galaktózzá és glükózzá bontva (7A. ábra). A folyamat hatékonyságát nagyban befolyásolja, hogy a baktérium termeli-e a laktóz transzportjához és bontásához szükséges specifikus fehérjéket. Utóbbiak szintézise közös (laktóz függő) szabályozás alatt van, vagyis egy operont képeznek.

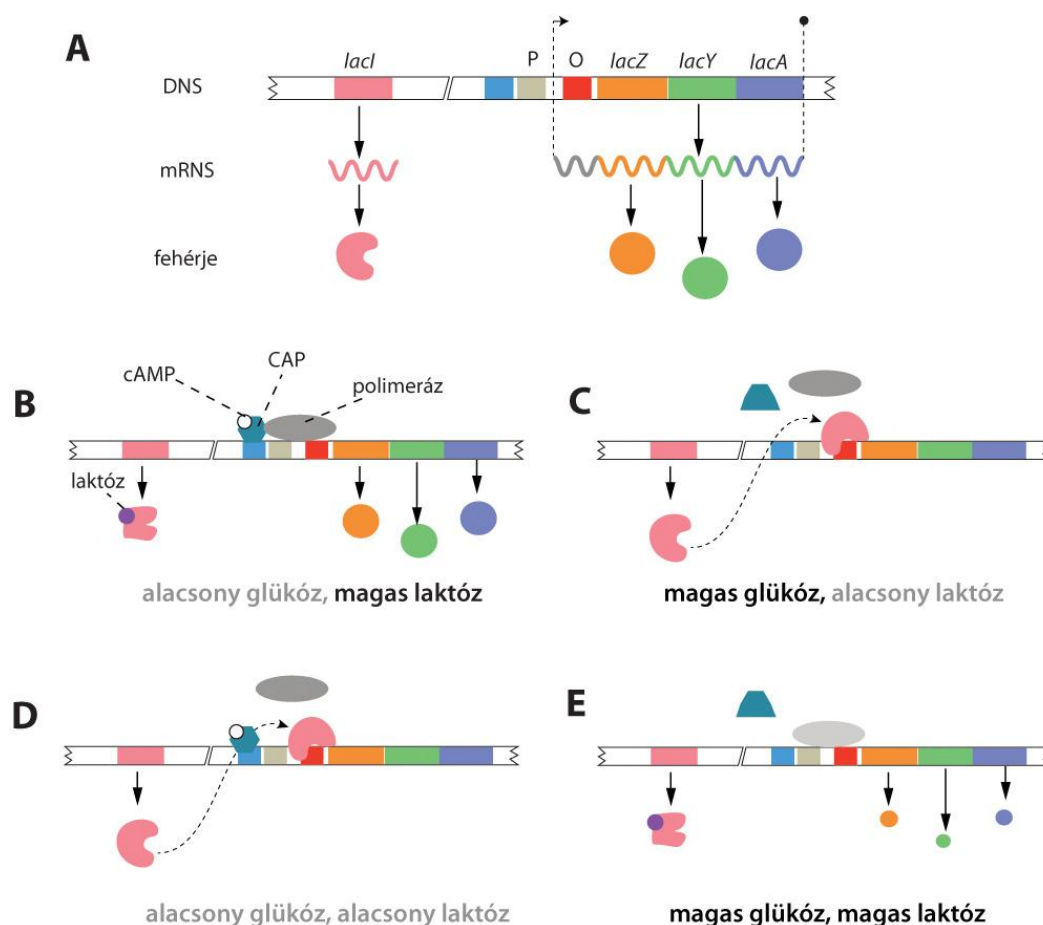


[Alternatív szöveg: *Laktóz anyagcsere, IPTG, X-Gal*]

[Képalírás: **7. ábra: A laktóz anyagcsere és a *lac* operon vizsgálatára használt szintetikus molekulák.** (A) Glükóz hiányában a sejt laktózt kezd hasznosítani szénforrásként, amelyet első lépésben a β -galaktozidáz enzime révén galaktózzá és glükózzá hasít. (B) A Lac-represszor gátlására használt szintetikus molekula, az izopropil- β -D-tiogalaktozid (IPTG). (C) A *lac*-operon működésének detektálására használt laktóz analóg X-Gal, melynek bomlása kék csapadékot hoz létre.]

A laktóz felhasználásáért felelős úgynevezett ***lac operon*** genetikai azonosítása és elemzése François Jacob és Jacques Monod nevéhez fűződik. Ők voltak akik különböző mutánsok (pl. laktóz bontásra képtelen, illetve laktózt még glükóz jelenlétében is bontó törzsek) segítségével meghatározták, hogy az operon három fehérjét kódol: egy, a laktóz bontásáért felelős β -galaktozidázt (Z), egy laktóz transzportért felelős permeázt (Y) és egy

transzacetilázt (A), amely egy acetyl-CoA molekuláról képes az acetyl csoportot a laktózza átvinni (8A. ábra). Az ezen fehérjéket kódoló gének meghibásodásai esetén az *E. coli* képtelennek bizonyult a laktózza feldolgozására.



[Alternatív szöveg: A lac operon]

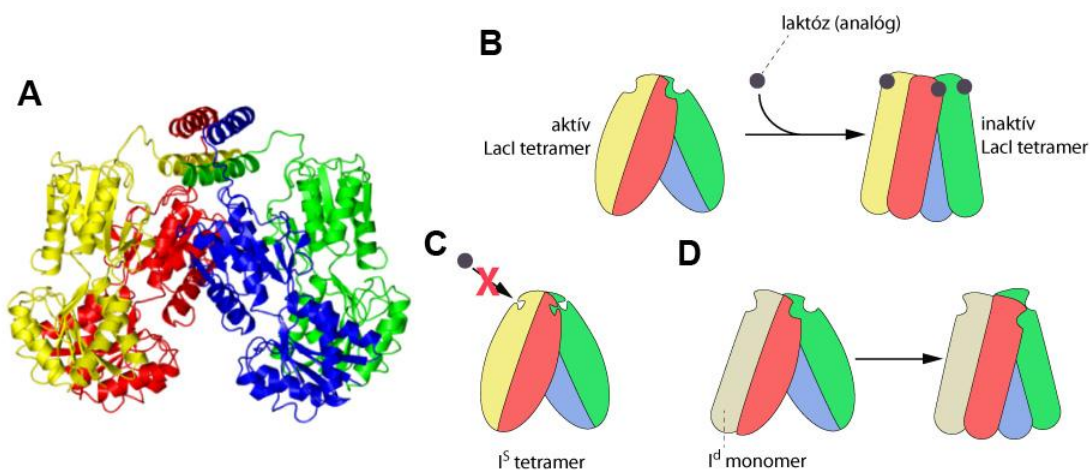
[Képaláírás: 8. ábra A lac operon felépítése és vázlatos működési elve. (A) Az operon három, a laktózza feldolgozásához nélkülözhetetlen kulcsenzimet kódol, ezek a β -galaktozidáz (Z), a permeáz (Y) és a transzacetiláz (A). Az operon megfelelő szabályozásához nélkülözhetetlen még a represszor, amelyet a *lacI* lokusz kódol, az ennek a megkötésére képes operátor régió (O), az operon promótere (P), amely tartalmazza az RNS polimeráz kódoló helyét, valamint az aktivátor CAP fehérje kötőhelyét. (B) Alacsony glükózza és magas laktózza szint esetén a represszorhoz kötődő laktózza inaktíválja azt, míg a glükózza hiányában termelődő cAMP a CAP-hoz kapcsolódva azt aktív konformációba kapcsolja. Így megtörténik az operon indukciója, létrejönnek a fehérjék. (C,D) Alacsony laktózza szint esetén, függetlenül a CAP fehérje állapotától, a Lac represszor aktív lesz, kötődik az operátor régióhoz és fizikailag meggátolja a polimeráz kapcsolódását. (E) Magas laktózza és magas glükózza szint esetében, mind a represszor, mind a CAP fehérje inaktív marad, így a polimeráz, bár kötődik, csak alacsony szintű expresszióra lesz képes.]

További kísérletek olyan mutációkat is azonosítottak, amelyekben a *lac* operon enzimjei folyamatosan termelődtek (**konstitutív mutáció**). Ezek a **szabályozó mutációk** tették lehetővé a *lac* represszort kódoló gén, a *lacI* meghatározását is (8A ábra).

A represszor laktóz (vagy egyéb laktózanalógok) (**induktorok**) hiányában az operon **operátor** régiójához kötődik, meggátolja az RNS-polimeráz kötődését a promoterhez, így a struktúrgének átírása nem történik meg (**represszált állapot**) (8B,D ábra). Laktóz vagy más induktor anyagok (pl. **IPTG**: izopropil- β -D-tiogalaktozid) a represszorhoz kapcsolódva, meggátolják annak kapcsolódását az operátorhoz, ezáltal lehetővé válik az RNS-polimeráz promoterhez való kötődése. Az mRNS-szintézis, majd az enzimszintézis is azonnal megindul (**indukció**), ha a tápközeg nem tartalmaz glükózt (8C ábra).

Ha a tápközeg glükózt tartalmaz az a **katabolit-represszió** jelensége révén gátolja a *lac* operon átíródását. Glükóz hiányában a sejtben megindul a cAMP szintézis és az így létrejövő molekulás a katabolit aktivátor fehérjéhez (Catabolite Activator Protein – CAP) kapcsolódhatnak. A cAMP-CAP komplex transzkripció **aktivátorként** működik, ami elősegíti az RNS-polimeráz promóterhez való kötődését, és a mRNS-szintézis megindulását. Aktív CAP hiányában még laktóz jelenlétében is csak gyengén lesz képes átíródni az operon – a baktérium így szabályozza, hogy a preferált szénforrás (glükóz) jelenléte esetében ne termelődjenek fölöslegesen azok az enzimek, amelyek az alternatív szénforrás (laktóz) feldolgozásához szükségesek.

Jacob és Monod a *lac* operon részletes mutációs analízise során még néhány említést érdemlő allélt izolált: az egyik az I^S , a **represszor egy konstitutív aktív mutációja**, amelynek eredményeként a LacI folyamatosan, laktóz jelenlétében is aktív formában van jelen. Ennek az oka feltehetőleg a laktóz kötő régió megváltozása, amelynek következményeként a represszor nem képes megkötni az indukátor molekulát (9C ábra), így annak jelenléte nem tudja kiváltani az inaktivációhoz szükséges konformáció változást. Szintén fontos az I^d **allél, amely domináns negatívként viselkedik**, vagyis ha jelen is van egy vad típusú I allél a rendszerben (lásd parciális diploidok, alább), az arról termelődő LacI molekulákat is működésképtelenné teszi az I^d jelenléte. (Ennek oka a feltételezések szerint abban kereshető, hogy a LacI tetramer formájában fejt ki hatását (9A és B ábrák), és egyetlen I^d jelenléte a tetramer többi tagjában inaktiválást okozó konformáció változásokat indukál (9D ábra).)



[Alternatív szöveg: A *LacI* szerkezete, mutációi]

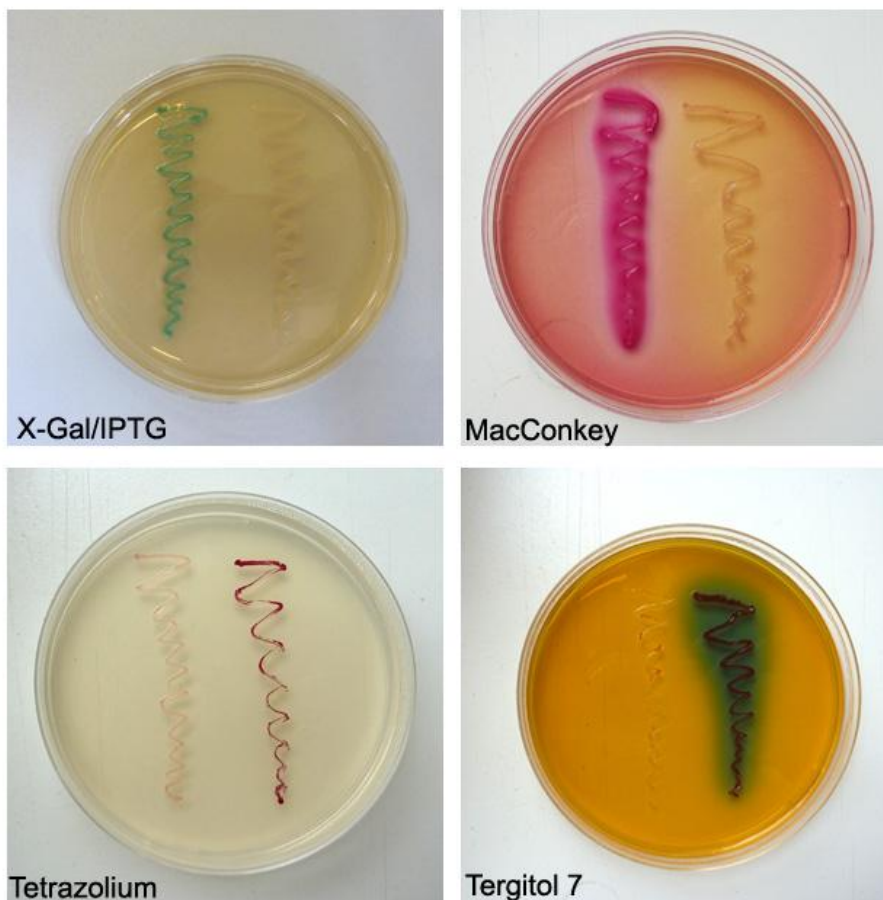
[Képaláírás: 9. ábra A *lac* represszor (*LacI*) szerkezete, működése és jellegzetes *LacI* mutánsok. (A) A fehérje háromdimenziós szerkezetén jól megfigyelhető a tetramer jelleg. (B) Vad típusú fehérjékben a tetramer laktóz (vagy laktóz analóg) hiányában aktív, DNS kötő konformációt vesz fel. Ha laktózt, vagy IPTG-t juttatunk a rendszerbe, az bekötődése révén a tetramer alegységeit inaktív konformációba kényszeríti. (C) Az I^S allél által kódolt konstitutívan aktív represszor forma induktór jelenlétében sem lesz működésképtelen, feltehetően azért, mert az induktór nem tud a mutáns fehérjéhez kötődni. (D) A domináns negatív $LacI^d$ monomer jelenlétében a vad típusú monomerek is inaktív konformációt vesznek fel, az induktór jelenlététől függetlenül. (Az EMBL-EBI képe alapján.)]

A gyakorlaton négy eltérő *E. coli* törzs fenotípusát vizsgáljuk meg különböző indikátor, differenciáló táptalajokra szélesztve. A felhasznált törzsek egy deléciót hordoznak a kromoszómájukon, a *lac* régióban, de egy olyan konjugációs F' plazmidot tartalmaz, amelyen megtalálhatóak a *lac* gének. A vad típusú kontroll törzs mellett használt kísérleti törzsek más-más *lac* mutációval rendelkeznek. A törzseket X-Gal, X-Gal/IPTG, MacConkey, Tetrazolium és Tergitol-7 táptalajokra fogjuk szélesztetni, amelyek közös jellemzője, hogy az operon működése esetében valamilyen színreakcióval jelzik az aktív β -galaktozidáz gén jelenlétét.

Indikátor táptalajok:

MacConkey: A **MacConkey agar** olyan táptalaj, amelyben epesavak gátolják a nem enterobaktériumok szaporodását (szelektív) és az intenzíven laktózt fermentáló törzs -

savasítva a környezetét - piros színű lesz, a jelen lévő fenolvörös pH indikátor miatt. A teszt más cukrok esetében is felhasználható.



[Alternatív szöveg: *Indikátor táptalajok*]

[Képalírás: **10. ábra A gyakorlaton használt lemez-típusok.** Részletes magyarázat a szövegben. A bal oldalon mindig egy vad típusú törzs látható, jobbra pedig egy β -galaktozidáz deficiens.]

Tetrazolium: A **tetrazolium lemez** olyan gazdag táptalaj, amely trifenil-tetrazolim-kloridot és a megfelelő cukrot is tartalmazza. A tetrazoliumot oldhatatlan *formazánná* (oldhatatlan, piros pigmentté) redukálják a baktériumok. Az extra cukrot (pl. laktóz) intenzíven fermentálni és ezáltal savasítani képes kolóniáknál azonban a formazán csapadék-képződés, így a színképződés is elmarad.

Tergitol 7: Összetételében hasonlít a tetrazolium lemezhez, de brómtimolkéket is tartalmaz. A cukrot fermentáló *E. coli* telepek sárgák, közepén narancssárga maggal. A nem fermentáló telepek pirosak, a táptalaj körülöttük kéké válik.

X-Gal: Az X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) indikátor festék a beta-galaktozidáz aktivitást jelzi. Nagyon érzékeny, a laktóz hasznosításra még nem képes (nincs növekedés laktóz minimál táptalajon) törzsek is halványkék telepeket formálhatnak. Általában az **IPTG**-vel kombinálva használjuk – utóbbi előnye, hogy bár potens induktor, a β -galaktozidáz nem mondja, így koncentrációja a táptalajban kvázi konstansnak vehető.

Törzsek

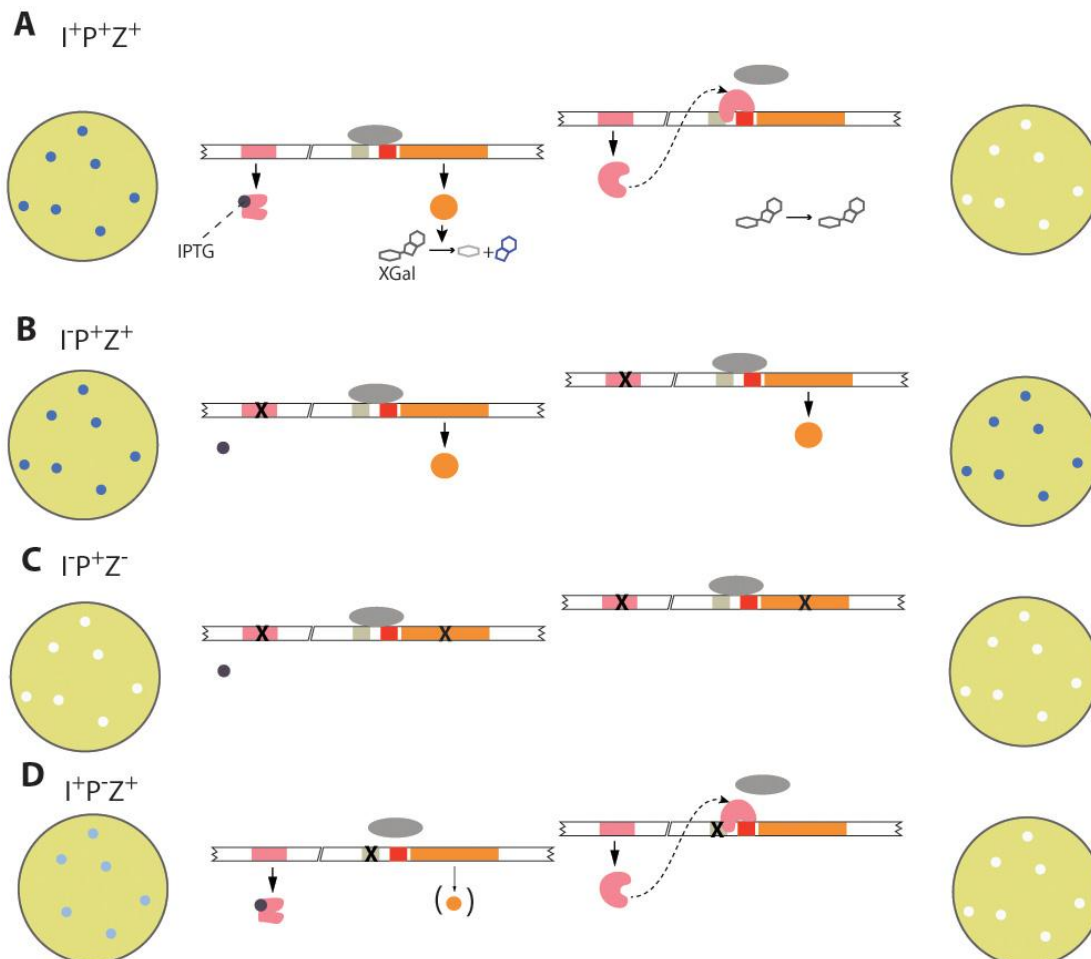
Minden törzs kromoszómáján deléción található a *lac* régióban, az F' után az F episzómán található géneket tüntettük fel.

	genotípus	Fontos tulajdonság
CSH100	<i>ara Δ (gpt-lac)5 F'lacproA⁺B⁺</i> (I ^o PL8 mutációt tartalmaz a lac régióban)	I ⁺ P ⁻ Z ⁺
CSH101	<i>ara Δ (gpt-lac)5 F'lacproA⁺B⁺</i> (mutációk I ⁻ , Z ⁻)	I ⁻ P ⁺ Z ⁻
CSH140	<i>ara Δ (gpt-lac)5 F'lacproA⁺B⁺</i> (mutáció I ⁻)	I ⁻ P ⁺ Z ⁺
CSH141	<i>ara Δ (gpt-lac)5 F'lacproA⁺B⁺</i>	I ⁺ P ⁺ Z ⁺

A kísérleti rendszerünk választ fog adni arra, hogy melyik törzs(ek) képes(ek) az aktív laktózfermentációra. (Az X-Gal/IPTG rendszer esetében az eredményeket az alábbi ábra foglalja össze.)

A gyakorlat menete

A gyakorlat során vizsgált törzseket „mester”-lemezeken bocsátjuk a csoport rendelkezésére. Ezekről kell átoltani őket az indikátor táptalajokat tartalmazó Petri csészékbe. Az átoltáshoz a Petri csészék felületét négy részre osztjuk, majd a törzseket steril fogpiszkálókkal önálló telepekké szélesztjük a táptalaj egy-egy negyedében. A lemezeket 37°C-on inkubáljuk egy éjszakán át, majd 4°C-on tároljuk.



[Alternatív szöveg: lac mutánsok X-Gal/IPTG lemezen]

[Képaláírás: 11. ábra A lac mutáns törzsek fenotípusa X-Gal/IPTG tartalmú közegben. (A) A vad típusúnak tekinthető $I^+P^+Z^+$ (CSH141) törzs IPTG jelenlétében (balra) β -galaktozidázt szintetizál, ami az X-Gal színreakciót okozó lebomlását katalizálja, ezért a telepek kék színűek. IPTG hiányában (jobbra) a represszor meggátolja a β -galaktozidáz átírását, így a színreakció elmarad, a telepek fehérek lesznek. (B) A represszor mutációja esetében ($I^-P^+Z^+$ - CSH140), az enzim az induktór jelenlététől függetlenül termelődik, így mindig kék telepeket kapunk. (C) A β -galaktozidáz mutációja episztatikus a szupresszor mutációjára ($I^-P^+Z^-$), az X-Gal bomlásának hiányában mindig fehér telepeket kapunk. (D) A promóter mutációja esetében ($I^+P^-Z^+$) a polimeráz elvileg nem tud kötni az enzim promóteréhez még a represszor szupresszált állapotában sem, így azt várjuk hogy az IPTG

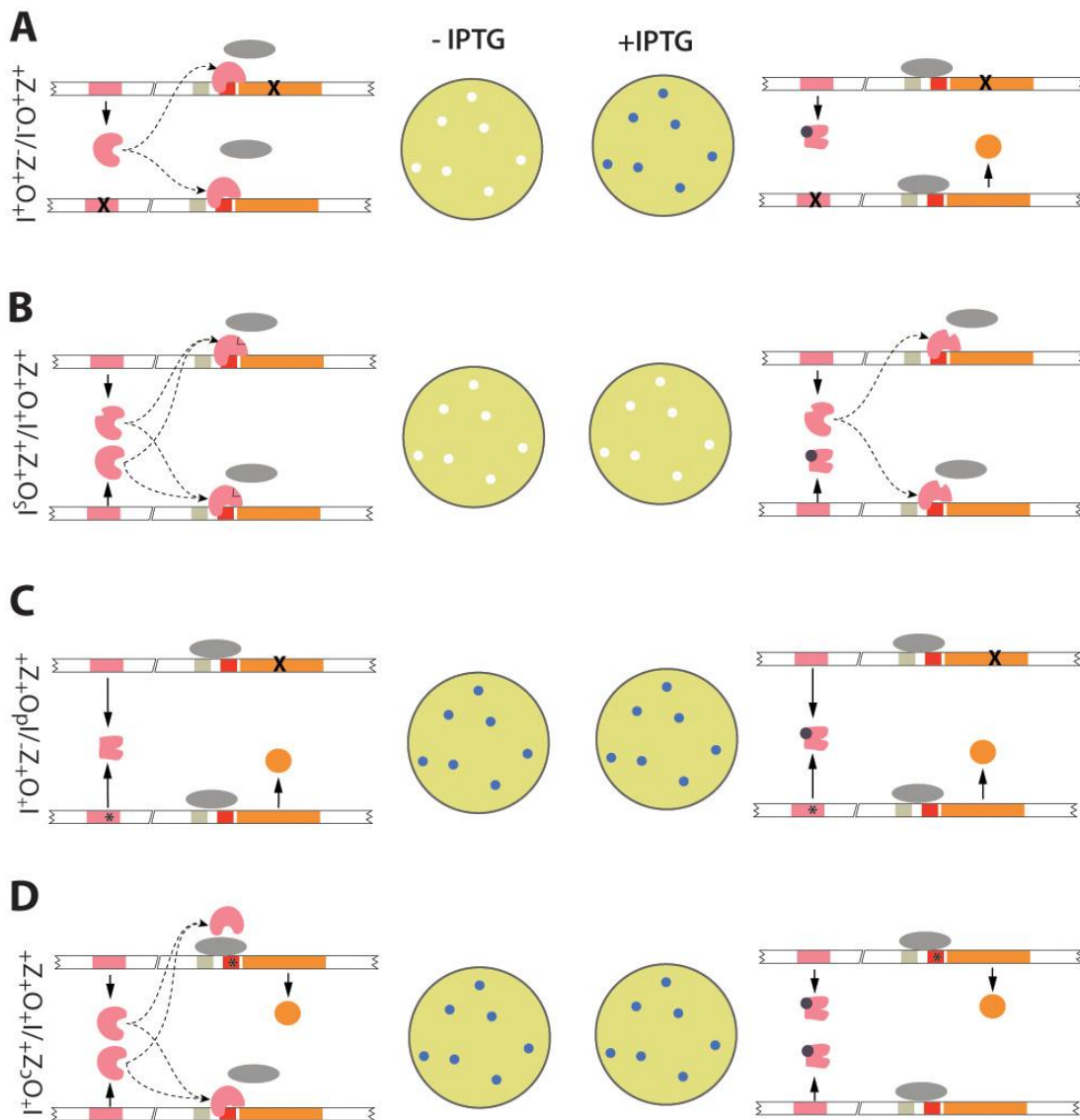
jelenlététől függetlenül fehér telepeket kapjunk. A valóságban a promótermutáció nem egy tökéletes null-allélt hoz létre, a polimeráz alacsony affinitással, de tud kötni, így minimális mennyiségű enzim létrejön. Ennek megfelelően a telepek indukátor hiányában halványkékek.]

▪ Feladatmegoldás

Bár a bakteriális sejtek eredendően haploid organizmusok, az F episzóma segítségével stabil parciális diploid egyedek hozhatók létre: olyan sejtek, amelyekben a kromoszómán található *lac* operon mellett egy második operon található az F' plazmidon. Ebben a rendszerben lehetőség nyílik arra, hogy különböző *lac* mutánsok komplementációs analízisét elvégezzük (nagyon hasonló logika alapján, mint amit az előző, fágokról szóló alfejezetben láttunk).

A parciális diploidokban könnyen kimutatható, hogy **a diffúzióra képes *lac* represszor transz helyzetben hat**, vagyis például a kromoszómán termelődő LacI az episzómán levő operon működését is képes gátolni (12A és B ábrák).

A korábbiakban nem esett szó az egyik jellegzetes szabályozó mutációról, az úgynevezett **konstitutív operátor (O^c) allélról**. Ennek érdekessége, hogy nem közvetlenül a represszorban található, annak működését mégis alapvetően befolyásolja. Az O^c allélt hordozó mutánsok IPTG hiányában is jelentős mennyiségű enzimet termelnek, mert a represszor nem tud hozzákötni az operátorhoz (vagyis nem képes szterikus gátlás révén az RNS polimeráz kötődését sem akadályozni). Ezt a típusú mutációt, amikor a genetikai változás a DNS-en a közelben található operon működését befolyásolja, **cisz-dominanciának** nevezzük (12D ábra).



[Alternatív szöveg: *lac* mutációk komplementációs analízise]

[Képalírás: **12. ábra Különböző *lac* mutációk komplementációs analízise X-Gal/IPTG lemezeken.** (A) A *lac* represszor transz helyzetben hat: ha az egyik *lac* operon működőképes I allélt hordoz és működésképtelen Z -t, a másik pedig pont fordítva, a rendszer végső soron a vad fenotípust mutatja (komplementáció figyelhető meg): a működőképes represszor mindkét operon operátor régiójához képes kötni, vagyis mind a működő, mind a nem működő *lacZ* allél átíródását befolyásolja. (B) Az induktorra (IPTG) érzéketlen, konstitutívan aktív I^S allél jelenlétében a β -galaktozidáz termelése folyamatosan gátolt, így mindig fehér telepeket kapunk. (C) Ha csak az egyik operon hordozza a domináns negatív represszort kódoló I^d allét, az elég ahhoz, hogy a represszort folyamatosan működésképtelen állapotban tartsa, induktór hozzáadása nélkül is. Domináns negatív monomerek beépülésakor a tetramer, függetlenül hány vad típusú, nem-mutáns monomert tartalmaz, inaktív konformációt vesz fel. Ennek eredményeként a β -galaktozidáz termelés folyamatos, a telepek mindig kékek lesznek. (D) Az előbbihez hasonló fenotípust figyelhetünk meg a konstitutív operátor (O^c) allél jelenlétében: mivel az aktív represszorok sem tudnak ilyenkor az operátorhoz kötni, IPTG

hiányában is bekövetkezik a lacZ átírása, vagyis jelen lesz az X-Gal hasításához szükséges β -galaktozidáz.]

▪ Példafeladatok

1. Határozza meg, hogy a következő táblázatban feltüntetett különböző genotípusú baktérium törzsek képesek-e β -galaktozidáz, illetve permeáz termelésére, indukálószer jelenlétében illetve hiányában!

Törzsek genotípusa	indukálószer nélkül		indukálószer jelenlétében	
	β -galaktozidáz	permeáz	β -galaktozidáz	permeáz
$I^+O^+Z^+Y^+$				
$I^+O^-Z^+Y^+$				
$I^+O^+Z^-Y^+$				
$I^-O^+Z^+Y^+$				
$I^SO^+Z^+Y^+$				
$I^+O^CZ^+Y^+$				
$I^SO^CZ^+Y^+$				
$I^+O^CZ^-Y^+$				

2. Határozza meg a következő parciális diploidok esetében, hogy termelnek-e β -galaktozidázt és permeázt! Képesek lennének-e ezek a törzsek laktózon, mint egyedüli energia/szén forráson növekedni?

Törzsek genotípusa	indukálószer nélkül		indukálószer jelenlétében	
	β -galaktozidáz	permeáz	β -galaktozidáz	permeáz
$I^+O^+Z^+Y^+/I^+O^+Z^-Y^-$				
$I^-O^+Z^+Y^+/I^+O^+Z^-Y^-$				
$I^+O^+Z^+Y^+/I^-O^+Z^-Y^-$				
$I^-O^+Z^+Y^+/I^+O^+Z^-Y^-$				
$I^S O^+Z^+Y^+/I^-O^+Z^+Y^+$				
$I^+O^C Z^+Y^+/I^+O^+Z^+Y^+$				
$I^S O^+Z^+Y^+/I^+O^C Z^+Y^+$				

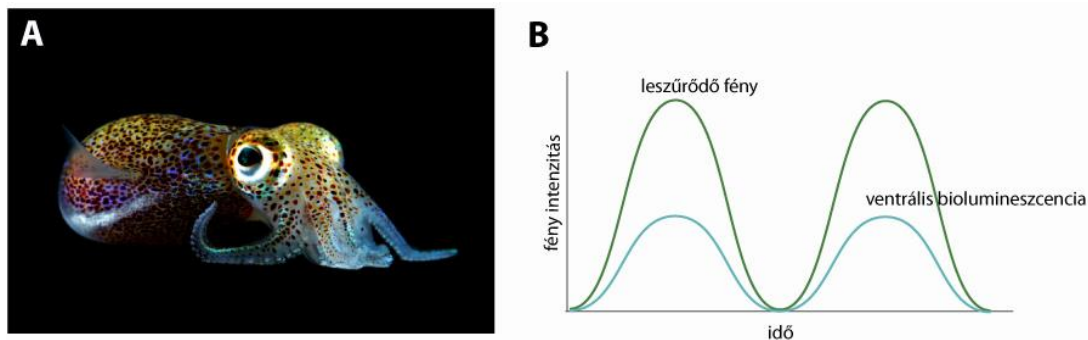
3. Határozza meg a *lac* operon átírásának aktivitását (magas/alacsony/nincs), a represszor illetve a katabolikus aktivátor fehérje helyzetét az alábbi táblázatban meghatározott körülmények esetében!

laktóz	glükóz	operon aktivitás (magas/alacsony/nincs)	represszor (kötött/szabad)	CAP (kötött/szabad)
nincs	nincs			
van	nincs			
nincs	van			
van	van			

--	--	--	--	--

○ 4. Kvórum érzékelés

A hawaii kurtafarkú tintahal (*Euprymna scolopes*) a hasi oldalán egy különleges, specilizált ún. "fény-szervet" hordoz, amivel biolumineszcens fényt állít elő. Ez a fényforrás a garanciája annak, hogy az állat hatékonyan tudjon a mélyben élő ragadozói ellen védekezni. Mivel a kibocsájtott fény intenzitását a tintahal a hátára érkező fény intenzitásának függvényében képes változtatni, a „fény-szerv” kompenzálja a tintahal árnyékát, kvázi láthatatlanná téve őt az alsóbb vízrétegekben levő élőlények számára (13. ábra).



[Alternatív szöveg: *Kurtafarkú tintahal biolumineszcenciája*]

[Képaláírás: **13. ábra:** (A) A hawaii kurtafarkú tintahal hasi oldalán levő speciális szervében olyan baktériumokat hordoz, amelyek biolumineszcenciát képesek létrehozni. (B) A tintahal képes a biolumineszcencia erősségét a ráeső fényhez igazítani, aminek azért van lehetősége, mert így „nem vet árnyékot” az alatta élő ragadozók felé.]

A rendszer érdekessége, hogy a biolumineszcens fényforrást nem a tintahal saját sejtjei, hanem a fény-szervben élő szimbióta Gram-negatív baktériumfaj, a *Vibrio fischeri* egyedei biztosítják.

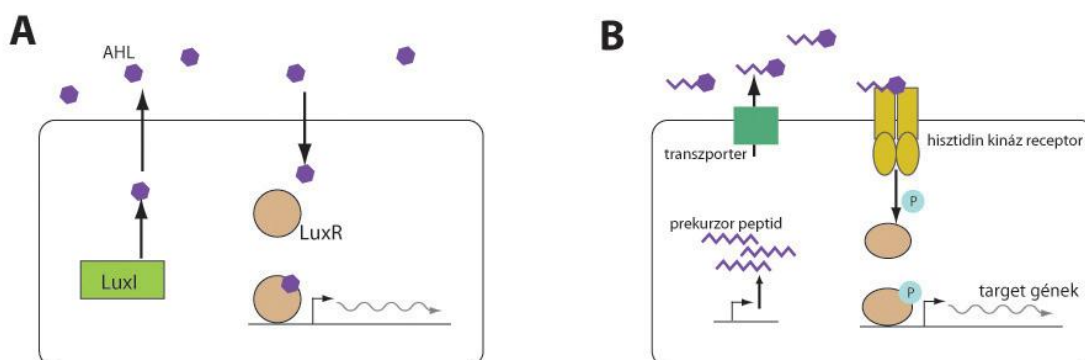
Ezek száma, vagyis egyedsűrűsége, azonban nem konstans, hanem ciklikusan változik a nap folyamán: éjjel, amikor fényt kell létrehozni sokan vannak, nappal azonban, amikor a tintahal a homokba húzódik, kevesen. (A változás annak köszönhető, hogy a hajnal közeledtével egy speciális nyíláson keresztül a tintahal a tengerbe pumpálja a fény-szerv bakteriális közösségének közel 95%-át. A maradék ugyanis épp elég ahhoz, hogy a nap leforgása alatt elszaporodva újratöltse a lakóhelyeül szolgáló kamrát.)

Mindez azért lényeges, mert a *V. fischeri* biolumineszcenciáját a bakteriális kommunikáció klasszikus példája teszi lehetővé. Ugyanis ezek a baktériumok nem folyamatosan hozzák létre a biolumineszcenciát, hanem csak akkor, ha elérnek egy kritikus tömeget.

Ezt a fajta kommunikációt, amikor a közösség az egyedsűrűségét igyekszik felmérni, **kvórum érzékelésnek (quorum-sensing)** nevezzük.

A folyamatnak, molekuláris komponenseit tekintve több különböző verziója létezik különböző baktérium fajokban, de lényegében mindegyik ugyanazon logika alapján működik: a baktériumok egy, szekretált szignál-molekulát, valamint annak a receptorát is termelik. Ha a receptorok telítettsége elér egy küszöbértéket (ami egyben azt jelenti, hogy a közegben rengeteg szignál-molekula, illetve azt előállító baktérium van), beindul a target-gének, például a biolumineszcenciát kialakítók átírása.

A *V. fischeri* esete annyiban különleges, hogy a szignál, melyet a LuxI fehérje hoz létre egy olyan acilált homoserin lakton (AHL) molekula, amely diffúzióval is képes keresztüljutni a sejtmembránon, így nincs szükség sem szekréción, sem transzportra a sejtből kijuttatásához, sem membrán-kötött receptorra az érzékeléséhez. Receptora citoplazmatikus és ha megköti az AHL-t akkor transzkripciósfaktorként génaktivációt indukál (14A ábra).

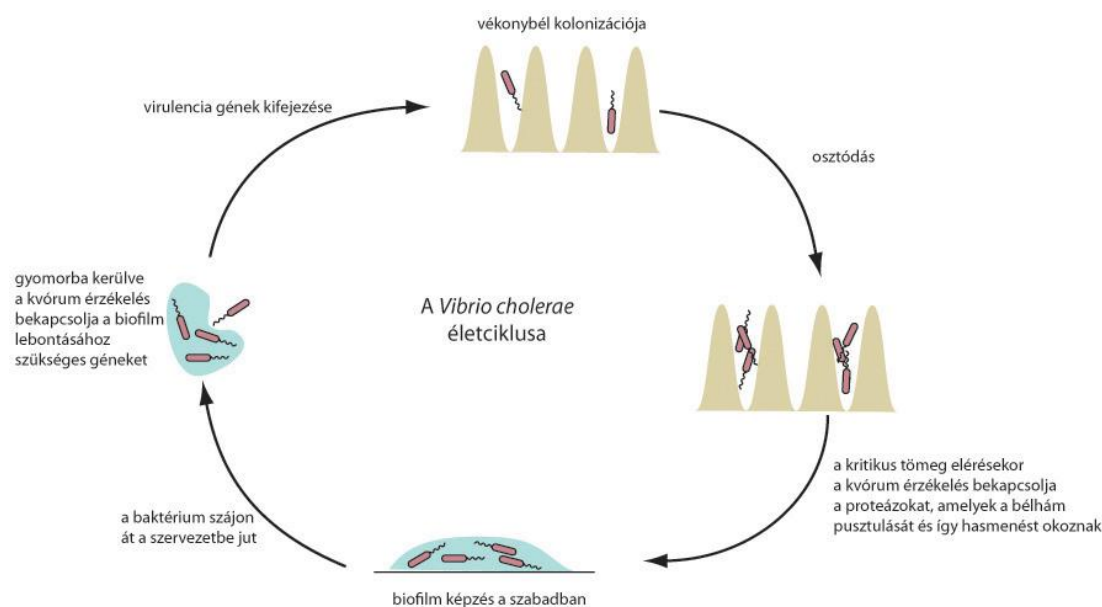


[Alternatív szöveg: *Bakteriális kvórum érzékelés*]

[Képaláírás: **14. ábra: Bakteriális kvórum érzékelő rendszerek.** (A) A *V. fischeri* kvórumérzékelő rendszere membránon átdiffundálódó ligandot (AHL) tartalmaz. Ezt a LuxI fehérje hozza létre és a LuxR intracelluláris receptor köti meg. A LuxR aktiválódása után bekapcsolja a biolumineszcencia gének átíródását. (B) A Gram-pozitív baktériumok kvórumérzékelő rendszere aktív transzportert és receptort tartalmaz a ligand környezetbe juttatására, illetve megkötésére. A ligand prekursor formában jön létre és csak a sejtközi térbe való kijuttatás után veszi fel az aktív konformációját. A receptor egy hisztidin kináz, amely ligand megkötés után képes a sejtben levő regulátor fehérjét foszforiláció révén aktiválni. Az aktivált regulátorok bekapcsolják a kvórumérzékelés válaszgénjeinek transzkripcióját.]

Az utóbbi évtized során egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a kvórum-érzékelés nem a *V. fischeri* különlegessége. Számos egyéb baktérium működtet analóg rendszereket. Például egy másik *Vibrio* faj, a *V. cholerae* is logikailag hasonló (bár elemeiben különböző) rendszert használ, hogy a kolera-fertőzés során előbb kolonizálja a szervezetet, majd, ha a populáció egy kritikus egyedsűrűséget ért el a bélrendszerben, eltávozzon onnan, új gazdát keresve (15. ábra).

A *V. cholerae* kvórum érzékelő rendszere, egy hisztidin-kináz receptor alapú ligandum megkötő rendszert alkalmaz. Ennek megfelelően a ligandum maga sem képes átjutni a membránon, semelyik irányba, így a külvilágba történő transzportjához is különleges fehérjékre van szüksége. A receptor aktiválása után egy citoplazmatikus receptor fehérje foszforilációját katalizálja, amely a célgénekhez kötve aktiválja azok átíródását. Ez a rendszer molekuláris komponenseit tekintve is sokban hasonlít a Gram-pozitív baktériumok kvórum érzékelő apparátusára (3.2B. ábra).



[Alternatív szöveg: *Vibrio cholerae* életciklusa]

[Képalírás: **15. ábra: A kolera kórokozójának az életciklusa.** A *V. cholerae* életciklusa során két alkalommal jut kitüntetett szerep a kvórumérzékelésnek. Először a külső forrásból gyomorba bejutó kórokozók körül levő biofilm lebontását segíti elő. Az így felszabaduló baktériumok képesek virulencia génjeik kifejezésére és kolonizálják a vékonybelet. Miután elérik a kritikus egyedszámot, a kvórum érzékelés hatására olyan proteázok átíródása kezdődik el, amelyek a környezetbe jutva elpusztítják a bélhám sejtjeit, így fájdalmas véres hasmenést okoznak, ami egyúttal a környezetbe juttatja vissza a kórokozót.]

A gyakorlat során a *Vibrio* fajokkal rokon *Photobacterium* fajt használunk, amely hasonlóan a *V. harveyi*-hez a kvórum érzékelés hatására fény bocsát ki. (A természetben a kardinálisalak fény szervében található.)

Egy hígítási sor segítségével megfigyelhetitek, miként kapcsol be a biolumineszcencia, amikor a populáció sűrűsége meghalad egy kritikus értéket.

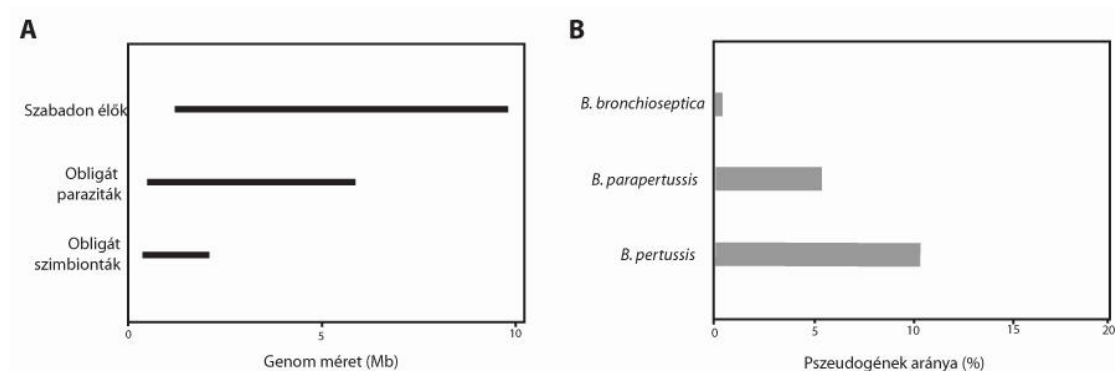
Táptalaj:

- LB + 2.5% NaCl

○ 5. Szelekciós nyomás genom-minimalizálásra

Az eukarióta és prokarióta sejtek közt természetesen számos fontos eltérés létezik, de az egyik lényeges különbség, a felhasználásra álló energia mennyisége. Hiszen az eukarióta sejtekben jelen levő mitokondriumok révén a bioenergetikai membránok (azon membrán felületek, ahol pl. proton gradiensek kémiai energiává alakulnak át) fajlagos felülete hatalmas, így az egyes sejtfunkciók végrehajtásához alényegesen több energia jut, mint a prokariótákban. Sokak szerint ennek az energetikai aszimmetriának köszönhető, hogy az eukarióta sejtek sokkal nagyobb genommal rendelkeznek, amelyben akár többségben is lehetnek a nem-kódoló szekvenciák.

Ezt a fajta „energetikai luxust” a baktériumok nem engedhetik meg, ami az egyik magyarázata lehet annak, hogy a baktérium genomok sokkal kisebbek és kevesebb méretbeli ingadozást mutatnak, mint eukarióta társaik. Általánosítva az is elmondható, hogy minél stabilabb környezetben él egy baktérium, annál kisebb genomja lesz, hiszen annál kevesebb génre van szüksége a túléléshez. Ennek megfelelően a parazita fajok genomja lényegesen kisebb, mint például a szabadban élő, talajlakó fajoké és az obligát endoszimbionta fajok genomja további redukciót mutat.



[Alternatív szöveg: *Életmód és genom redukció*]

[Képalírás: **16. ábra: A stabil élőhely a fölösleges gének elvesztését és genom redukciót okoz.**

(A) Minél stabilabb egy baktérium élőhelye, annál kisebb az átlagos genommérete. (B) Különböző *Bordetella* fajok genomját vizsgálva észrevehető, hogy a nagyon fajspecifikus patogének, mint a *B. pertussis* nagyobb számú pszeudogénnel rendelkeznek, mint a több faj megfertőzésére képes rokonaik. A kiszámíthatóbb környezet a fölöslegessé váló gének elsatnyulását okozza.]

Ha elfogadjuk, hogy az említett bioenergetikai korlátozás egy fontos szelekciós tényező a mikrobiális fajok élete során, akkor az is logikusan következik, hogy a nem használt gének

inaktivációja és delécióna révén bekövetkező genom-redukció egyfajta szelekciós előnyt biztosít, hiszen az említett fölösleges gének translációján illetve transzkripcióján megspórolt energia másra fordítható. (Fontos hangsúlyozni, hogy a kis bakteriális genom méretre léteznek más elméletek is. Például a „genetikai sodródás” szerepét kiemelő szerint, a természetes szelekció elsősorban a hasznos genetikai információ megőrzéséért felelős, a fölösleges gének deléciónának fixációja pedig véletlenszerű esemény, aminek a kis populáció méret miatt azonban nagy valószínűsége van.)

A gyakorlat során egy fehérje kódoló gén inaktivációját, illetve az ebből származó szelekciós előnyt fogjuk tanulmányozni. Ehhez egy olyan ampicillin rezisztencia gént is hordozó plazmidot (pUC19-GFP) használunk, ami egy erős promóterrel ellátott zöld fluoreszcens fehérje-gént hordoz.

Mivel a bakteriális sejt számára a GFP jelenléte (ellentétben az ampicillin rezisztencia kialakulásával) nem biztosít szelekciós előnyt, de sokba kerül a szintézise, a fent vázolt logika alapján azt várjuk, hogy a *gfp* gén nonsense mutációi viszonylag nagy gyakorisággal rögzülnek.

Az ampicillint tartalmazó lemezre (ami garantálja, hogy a pUC19 plazmid jelen legyen a sejtekben) kikent transzformált baktériumok csak igen kis százalékában lehet fluoreszcenciát detektálni, ami igazolja, hogy a *gfp* gén inaktivációja előnyös a populáció számára.

A mikrobiális genetika – II. fejezet

Dr. Horváth Péter egyetemi tanársegéd

ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

A mikrobiális genetika gyűjtő fogalom, bizonyos szempontból ide tartozik minden olyan ága a genetika tudományának, ami egysejtű eukariótákkal (pl. gombák, algák), prokariótákkal és vírusokkal foglalkozik. Éppen ezért nem beszélhetünk egységes mikrobiális genetikáról, hiszen ezeknek a szervezeteknek a felépítése, működése jelentősen eltér egymástól.

A gyakorlat során a bakteriális rendszerekre, illetve a hozzájuk erősen kapcsolódó bakteriofágokra és plazmidokra koncentrálunk. A baktériumok, mint modellszervezetek számos előnnyel bírnak (gyorsan szaporodnak, egyszerűen manipulálhatóak, de a segítségükkel levont következtetések sok esetben a magasabb rendű élőlényekre is igazak), ezért viszonylag régóta használják őket genetikai vizsgálatok céljára.

A baktériumok tehát genetikai szempontból az alábbi tulajdonságokkal bírnak:

- Haploid ($1n$) jellegű genom. Azaz még ha több kópia is van a genomi DNS-ből, azok egymásnak másolatai, nem pedig két szülőtől származó, eltérő genomok.
- Ennek ellenére léteznek allélikus különbségek, azaz ugyanannak a génnek, lokusznak több különböző változata is létezhet. A haploiditás miatt többnyire ezek nem jelennek meg egyszerre egy baktérium sejten belül, habár létezik példa arra, amikor a genom egy szakasza több példányban van jelen a sejten belül (parciális diploidia).
- A haploidia miatt könnyebb funkcióvesztéses (loss of function) allélokat azonosítani, mint eukariótákban, mivel azokat nem fedik el a vad típusú allélok.
- Aszexuális szaporodásúak, ezért a hagyományos keresztezés esetükben nem értelmezhető.
- Nincs sejtmag, így a transzkripció és a transláció térben nem különül el.
- Szaporodásuk igen gyors, 1 baktériumból 1 nap alatt 10^9 utódsejt is keletkezhet.

A markerek

A marker egy olyan genetikai elem, aminek jelenléte vagy hiánya valamilyen látható fenotípust okoz, így lehetővé teszi, hogy a markert hordozó szervezetet megkülönböztessük a nem hordozótól. A fent felsorolt okokból a mikrobiális rendszerek különösen alkalmasak arra, hogy markerekkel jelölhetőek legyenek, és nagyon sokféle marker áll rendelkezésünkre baktériumok esetében.

A marker bármilyen genetikai elem lehet, ami által megkülönböztethetővé válik két szervezet. Például ha egy génnek két allélja van, melyek közül az egyik kék festék termelését idézi elő, a másik nem, és a két allél közt csupán egy pontmutáció a különbség, akkor valójában ez a pontmutáció is tekinthető markernek, hiszen látjuk a jelenlétét/hiányát. Ilyen mutáció nem csak fehérjekódoló régiót érinthet. A jegyzet során markergénekről fog szó esni, azaz olyan markerekről, melyeknél egy egész gén jelenléte vagy hiánya okozza a különbséget.

A markereket tehát alapvetően arra használjuk, hogy megkülönböztessünk élőlényeket egymástól. Például előfordulhat, hogy két az *E. coli* baktérium két törzse közt összesen annyi különbség van, hogy az egyikből hiányzik a *lacZ* gén. Ha valahogy ezt a különbséget láthatóvá tudjuk tenni, akkor a *lacZ* egy markergén, melynek segítségével el tudjuk különíteni a két törzset. Ha nem tudjuk láthatóvá tenni, akkor nem tekintjük markernek. (Az, hogy valami markergén-e, egy kicsit mesterséges megközelítés. Ha egy nem-marker génről felfedezik, hogy valamilyen színreakcióért felelős egy bizonyos anyag jelenlétében, akkor attól fogva azt a gént markergénnek fogják tekinteni. Ugyanarról a génről beszélünk, az egyetlen ami változott, az a tudásunk az adott génről, vagyis hogy képesek vagyunk-e láthatóvá tenni.)

Szelektálhatóság: fontos kritérium

A markereknek alapvetően két nagy csoportja van: a szelektálható és a nem szelektálható marker. Szelektálható markerről akkor beszélünk, ha a marker hiánya egy adott környezetben lehetetlenné teszi az adott élőlény, esetünkben baktérium növekedését, és ezáltal csak azok a sejtek élnek túl, amelyek rendelkeznek az adott markergénnel. Ilyen szelektáló környezet lehet például egy

antibiotikum jelenléte vagy egy adott aminosav hiánya a táptalajban, ezekben az esetekben a szelektív marker gén az adott antibiotikum rezisztenciagénje, vagy az adott, hiányzó aminosav termelését lehetővé tevő gén. Természetesen a szelektálható marker csak a megfelelő környezetben számít előnynek, egyébként a fölösleges többlet DNS inkább hátrányt jelent, így a baktérium könnyen elvesztheti azt, ha nem szelektív (azaz például antibiotikum-mentes) tápközegbe helyezzük. A gyakorlaton használt szelektálható markerek az ampicillin, a zeocin és a kanamicin nevű antibiotikumok rezisztencia génjei.

Nem szelektálható markerről akkor beszélünk, ha valamilyen látható különbség van a markert tartalmazó és nem tartalmazó baktériumok között, de ez nincs hatással a baktérium növekedésére. Ez általában valamilyen színreakciót jelent. A mindennapi genetikai munka során leggyakrabban használatos és a legismertebb nem szelektálható marker a *lacZ* gén, ami a természetben a laktóz felhasználásáért felelős enzim. A laktóz egyik analógja, amit az enzim képes bontani, az X-Gal, azaz teljes nevén 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid, mely az enzim hiányában színtelen, jelenlétében azonban egy kék bomlásterméket eredményez. Azaz lényegében a laktóz bontásának képességét követjük nyomon egy másik, látható reakció által. A gyakorlaton használni fogunk X-Gal-t, és X-Gluc-ot (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-glükuronsav), ami hasonlóan működik, de egy másik enzim, a GUS jelenléte esetén keletkezik kék termék. Szintén nem szelektálható marker a GFP (green fluorescent protein), ami UV fénnel megvilágítva zölden fluoreszkáló telepeket eredményez.

Az egyes szénhidrátok bontásának képessége más módon is mérhető. A MacConkey agar – amit szintén használni fogunk – egy olyan indikátort (neutrálvörös) tartalmaz, ami savas környezetben vörösebb lesz. A táptalajba kevert szénhidrátot (például laktózt) csak azok a baktériumok tudják hasznosítani, amelyek ezt a képességet a plazmiddal felvették, így ezen baktériumok a szénhidrát bontás során termelt savak miatt kivörösödnek, míg a többi baktérium udvara kifehéredik, illetve maga a telep is világosabb lesz.

Lehetséges-e, hogy egy marker szelektálható és nem szelektálható is legyen? Természetesen elképzelhető, a környezettől függ. Például ha egy táptalaj nem csak laktózt tartalmaz tápanyagként, akkor a laktóz felhasználásának képessége csak egy lehetőség, de a többi baktérium is képes megélni a lemezen – így működik a MacConkey agar. Ha azonban *kizárólag* laktózt tartalmaz a táptalaj, akkor ez a képesség máris szelektálhatóvá lép elő.

Markerek több módon juthatnak a baktériumba. Előfordulhat, hogy spontán mutációval kialakul az adott marker, például számos antibiotikum-rezisztenciamarkert írtak le, ami így alakult ki. Ezen kívül a baktériumok nagymértékben képesek a sejten kívülről, úgynevezett horizontális géntranszferrel génekhez jutni, mely folyamatokról később lesz szó. A horizontális géntranszfer során a gének (köztük markergének) képesek a környezetből vagy más külső forrásból a baktériumsejtbe jutni. Arról, hogy egy baktérium rendelkezik-e eleve egy markerrel, az adott baktériummal való munka előtt meg kell győződni.

Néhány ismert modellrendszer

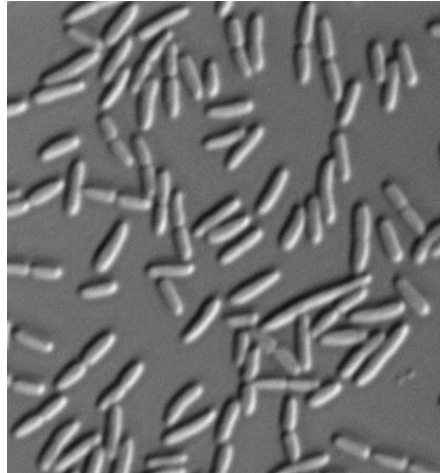
A tudomány számos mikrobiális szervezetet használ modellszervezetként. Ilyenek például az *Escherichia coli*, az *Agrobacterium tumefaciens*, a *Rhizobium meliloti* baktériumok, valamint ezek fágjai.

Baktérium modellek és genomjuk

Az *Escherichia coli* baktérium minden sejtje tartalmaz egy cirkuláris DNS-t, ami körülbelül 4-5 millió bázispárból (Mbp) áll, és amelyet általában a baktérium kromoszómájának neveznek. A bakteriális kromoszóma csak nevében egyezik az eukarióta kromoszómával, szerkezete, kondenzáltsága eltérő.

A kromoszóma mérete függ attól, hogy az *E. coli* melyik törzséről van szó: a K-12 egy nem patogén törzs, 4,6 Mbp méretű kromoszómával rendelkezik, rajta 4377 gént azonosítottak. Az O157:H7 nevű patogén törzs kromoszómája 5,4 Mbp, rajta 5416 génnel. A kromoszómán kívül az *E. coli* tartalmazhat plazmidokat (ld. később) is, bár a vad típusként nyilvántartott K-12 MG1655 nevű referenciatörzsben nincsenek plazmidok. A kromoszóma és a plazmidok együttesen jelentik a baktériumsejt genomját, habár a kromoszómát önmagában is szokták néha (és kicsit pontatlanul) genomi DNS-nek nevezni.

Az *E. coli*-ban a sejten belüli exonukleázok a lineáris DNS-eket lebontják, így a genom minden eleme cirkuláris (1. ábra). Az *E. coli* legismertebb, és a klasszikus genetikában a legnagyobb jelentőségű plazmidja az F plazmid, melyről bővebben a géntranszferről szóló részben lesz szó.



[Képaláírás: 1. Ábra *Escherichia coli* sejtek fáziskontraszt mikroszkópiával készült képe.]

Az *Agrobacterium tumefaciens* két kromoszómával rendelkezik, ezek közül az egyik cirkuláris, a másik lineáris (2,8 és 2,0 Mbp). Ezen kívül minden *A. tumefaciens* sejtben található két állandó plazmid, melyeket röviden „pAt” és „pTi” néven neveznek. Ez a két állandó plazmid általános szerkezetében hasonló, de konkrét szekvenciájában eltérhet, így a pontos plazmid elnevezése mindig tartalmazza az adott törzs nevét is. Például a C58 törzsben a pAt és a pTi teljes neve pAtC58 és pTiC58.

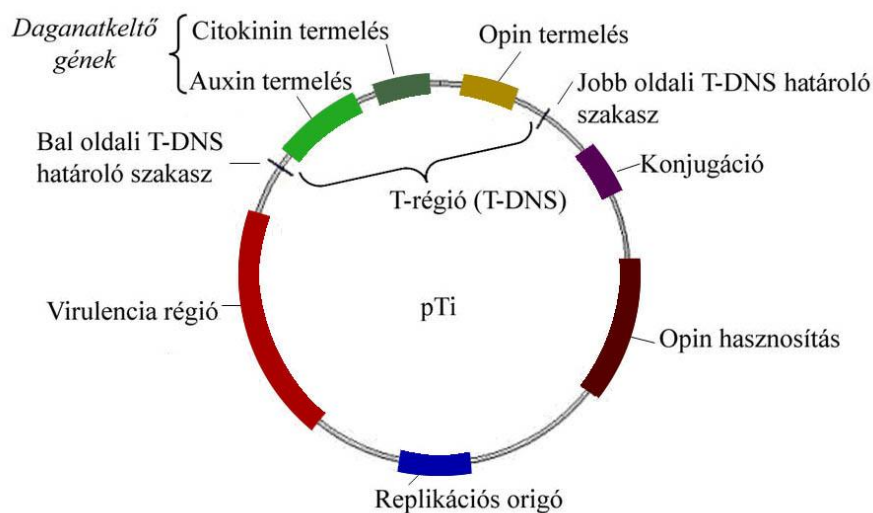
Ez a két plazmid minden sejtben jelen van, és a baktérium számára fontos gének vannak rajtuk, amelyek nélkül ugyan fenntartható mesterségesen, de eredeti környezetében nem él meg. Mivel általában a kromoszóma és a plazmid megkülönböztető definíciójába beleértik azt is, hogy a kromoszóma az a genetikai elem, amin a baktérium életben maradásához esszenciális gének vannak, ezért ezt a két plazmidot sokszor nevezik kromoszómának is.

Az *A. tumefaciens* Ti-plazmidjának neve a tumor indukáló (tumor inducing) tulajdonságból ered, amit a baktérium ezen plazmidja segítségével idéz elő (2. ábra). Az *A. tumefaciens* növényi élősködő

szervezet. A Ti plazmid segítségével géneket juttat a növény kromoszómájára (lényegében természetes úton transzgénikus növényt hoz létre), ezek a gének a baktérium táplálását segítik elő a növényi sejtekben, de jelenlétük egyidejűleg a növény tumoros elváltozásához vezet. A Ti plazmid a molekuláris növénygenetikának fontos eszköze, mert a mesterségesen létrehozott Ti plazmid alapú vektorokkal transzgénikus növényeket lehet előállítani.



[Képaláírás: 2. Ábra *Agrobacterium* okozta tumor. <http://www.sito.regione.campania.it>]



[Képaláírás: 3. Ábra A Ti plazmid szerkezete.]

A Ti plazmid (3. ábra) fontos eleme a T-régiónak nevezett szakasz, melyen egy auxin és egy citokinin termelésért felelős gén (ezek serkentik a növényi sejtek növekedését, azaz tumort indukálnak),

valamint egy opin termelésért felelős gén van jelen. Az opinok (többnyire oktopin vagy nopalin) aminosav származékok, melyek tápanyagul szolgálnak a baktérium számára.

A T-régiót két határoló szekvencia (border) veszi körül, aminek lényeges szerepe van abban, hogy a T-régió a növény kromoszómájára tudjon inszertálódni. A Ti-plazmid-alapú mesterséges rendszerekben a T-régió génjeit cserélik ki azokra a célgénekre, melyeket a növénybe, mint transzgén akarnak juttatni.

Plazmidok

A plazmidok extrakromoszómális, cirkuláris kettősszálú DNS darabok, melyek autonóm replikálódásra képesek, és többnyire valamilyen, a gazda számára előnyös genetikai információt (azaz szelektálható markert) hordoznak (leggyakrabban antibiotikum rezisztenciát). A gazdasejt lehet baktérium vagy eukarióta szervezet is, de a továbbiakban a gazda alatt bakteriális sejtet fogok érteni.

A definícióban az extrakromoszómális azt jelenti, hogy nem része a kromoszómának, azaz egy „különálló” DNS darab. Az autonóm (azaz független) replikáció azt jelenti, hogy a plazmidokról nem csak akkor készül másolat a sejtben, amikor a sejt osztódni készül, azaz a replikáció időpontja független a sejt kromoszómális DNS-ének replikációjától. Ebből viszont az következik, hogy a plazmid két osztódás közt is lemásolódik időnként, vagyis egyszerre egynél több kópia is jelen lehet a sejtben, ellentétben a kromoszómával, amiből csak közvetlenül az osztódás előtt van két darab a sejtben. A kópiaszám néhánytól akár több százig is terjedhet, ez a plazmid replikációs apparátusának típusától függ.

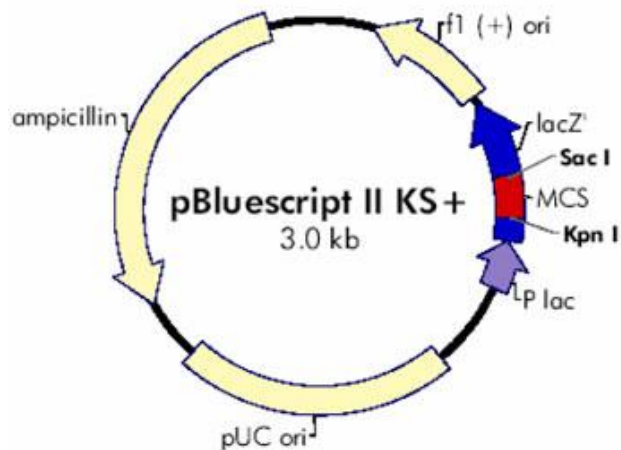
A plazmid nélkülözhetetlen része a replikációs origó (*ori*), a plazmid azon régiója, ahol a replikációért felelős fehérjék felismerik, és elindítják a másolását. A replikációs origó típusa meghatározza a plazmid lehetséges gazdakörét is, azaz azt, hogy milyen baktérium fajokban képes a plazmid fennmaradni (4. ábra).

Egy sejtben belül több különböző fajta plazmid is előfordulhat. Bizonyos fajta plazmidok azonban nem képesek együttesen fennmaradni ugyanazon sejtben belül. Azt, hogy két plazmid „megfér-e” együtt a sejtben belül, a replikációs origójuk határozza meg. A plazmidok origóit inkompatibilitási csoportokba osztjuk. Két eltérő plazmid közül, ha azonos csoportba tartozik az origójuk, akkor csak az egyiket lehet fenntartani a sejtben. Több különböző féle plazmid egy sejtben való fenntartásához ezen kívül az is szükséges, hogy a rajtuk kódolt szelektálható markerek eltérőek legyenek.

A plazmid vektorok

A plazmid vektorokban a vektor elnevezés arra utal, hogy a különböző mikrobiális genetikai eljárások során ezek a plazmid DNS-ek genetikai anyag célba juttatására vagy felszaporítására használatosak.

Éppen ezért azon kívül, hogy a plazmid voltak miatt minden igaz rájuk, ami a plazmidokra is igaz, rendelkezniük kell néhány olyan tulajdonsággal, ami a funkcionalitásukat elősegíti. A plazmid vektorok mindig tartalmaznak *szelektálható* markert, ami baktérium vektorok esetében a legtöbbször valamilyen antibiotikum rezisztencia gén. Ugyancsak általános jellemzőjük a klónozóhely (*multicloning site*, MCS) jelenléte, ami egyedi restrikciós enzim hasítóhelyeket tartalmaz. Közös jellemzőjük továbbá, hogy a lehető legkisebb méretűek, hogy minél nagyobb DNS-darab célba juttatására legyenek alkalmasak (minél nagyobb a teljes plazmid, általában annál nehezebb dolgozni vele). A plazmid vektorok egyik altípusa a klónozó vektor, aminek egyetlen célja, hogy a klónozóhelyre épített DNS darabot fenntartsa, sokszorozza a baktérium segítségével. A másik fontos altípus az expressziós vektor, ezek olyan plazmidok, amik a beléjük épített DNS-ről – amennyiben az kódoló szekvenciát hordoz – átírják a fehérjét, itt a cél a baktérium által termelt fehérje kinyerése valamilyen kísérletes célra. Éppen ezért az expresszós vektorokban az expresszió elindításáért, működéséért, szabályozásáért felelős szekvenciák (promóter, riboszóma kötő hely, terminátor) is találhatóak.

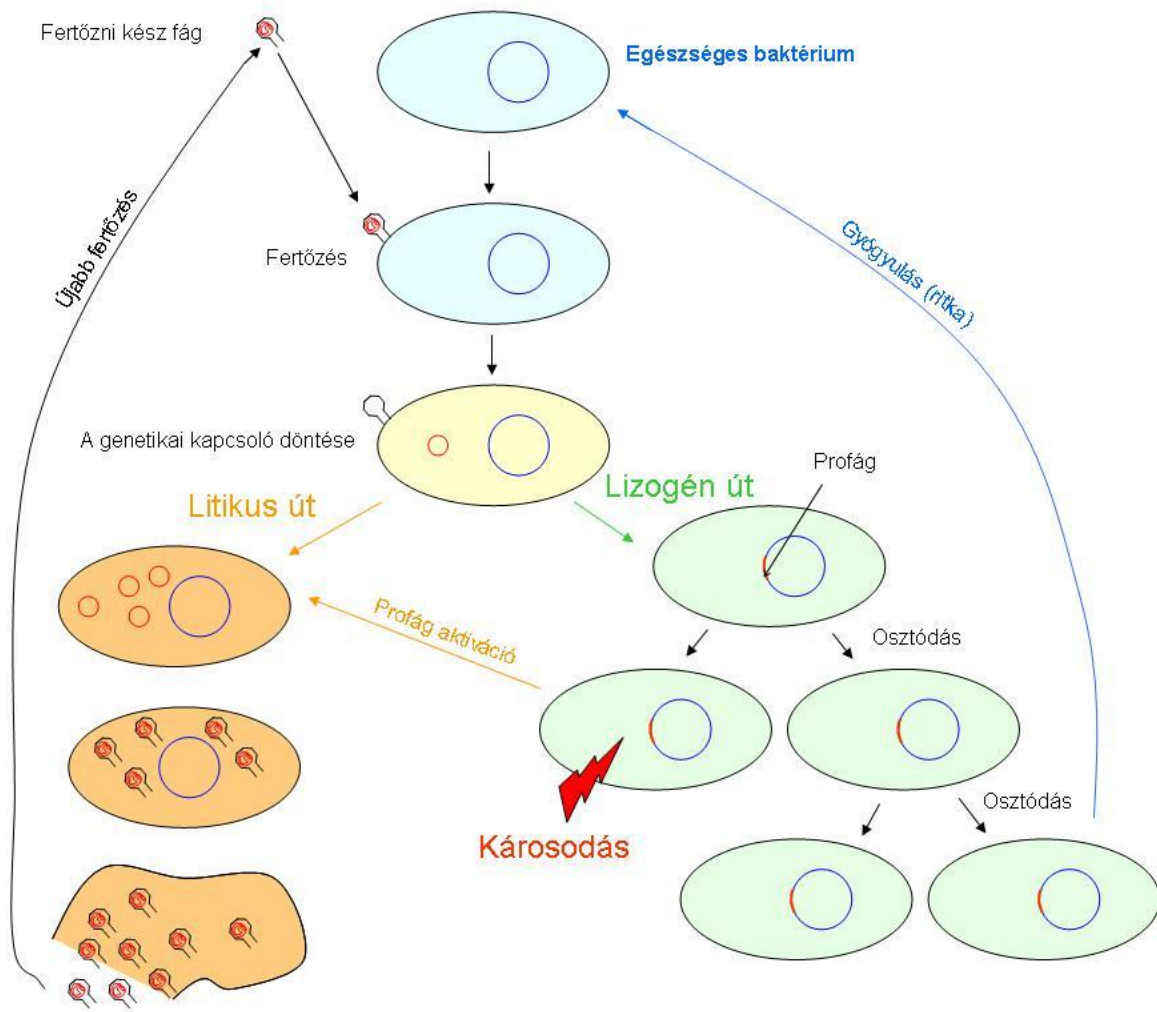


[Képaláírás: 4. Ábra Egy elterjedt klónozó vektor: a pBluescriptII KS+.]

A λ fág – a fágok egyik legismertebb modellszervezete

A λ fág – az *E. coli* bakteriofágja – a genetikai kapcsoló tankönyvi modellje. A fág az úgynevezett mérsékelt fágok közé tartozik, mivel kétféle életciklusra képes: a lítikus életciklus során, melyet minden ismert fág képes végrehajtani, a vírus önmaga nagymértékű sokszorozására készíti a gazdaszervezetet, majd felszakítva annak membránját, a sok újonnan keletkezett fág részecske kiszabadul, és újabb sejteket fertőz meg. A lizogén életciklus során a fág DNS-e helyspecifikus rekombinációval beépül a baktérium genomba, és a baktériummal együtt szaporodik, vagyis ahányszor a baktérium lemásolja a genomját, mindig lemásolja a kromoszómán található profágot is (a gazda genomjába beépült fág genomot profágnak nevezzük). A profág immunitást ad a baktériumnak az azonos fajhoz tartozó fágok ellen, azaz például a λ profágot tartalmazó baktériumokat a λ fág nem képes megfertőzni.

A profág bizonyos, a baktérium genomját károsító hatásokra képes aktiválódni, ekkor genomja kivágódik a baktérium genomjából, és megindul a fágészecskék képzése, azaz visszatér a lítikus ciklus. A λ fág esetében a baktérium fertőzés során a két útvonal közti választás egyrészt függ a sejt állapotától, másrészt pedig az alapján dől el, hogy mennyi a fágok és a baktériumok egymáshoz viszonyított aránya: minél nagyobb a fágok aránya, annál valószínűbb a lizogén útvonal (5. ábra). Az is előfordulhat, hogy a baktérium genomjából elvesz a fág, ezt gyógyulásnak (*curing*) nevezzük.



[Képaláírás: 5. Ábra A lambda fág szaporodási ciklusa.]

Egy fágoldat töménységét titernek nevezzük, ami azt jelenti, hogy 1 ml oldatban hány fertőzőképes fág van jelen (azaz egy egységes baktérium pázsiton hány plakk jön létre, mivel minden plakk egyetlen fág fertőzésének eredménye). Hasonló módon definiáljuk a baktériumok koncentrációját, amit a CFU/ml (CFU: colony forming unit) jellemez, ami azt mondja meg, hogy 1 ml baktérium tenyészet hány kolóniát képes létrehozni egy lemezen, tekintve, hogy egy adott kolónia egyetlen baktériumsejt leszármazottja. Mindkettő mennyiséget hígítási sor segítségével, és a kapott plakkok vagy kolóniák megszámlálásával lehet meghatározni.

A fágreszecskek és a baktériumsejtek arányát angol szakszóval multiplicity of infection (MOI) értéknek nevezzük. (Ez egy arány, tehát egy mértékegység nélküli szám.) Például az 1 MOI azt jelenti, hogy

minden baktériumra egy fág jut. A 0,2 MOI azt jelenti, hogy átlagosan 0,2 fág jut egy baktériumra, más szóval minden ötödik sejtre jut egy fág (azaz ötödannyi fág vesz részt a fertőzésben, mint baktérium). Az 1 fölötti MOI azt jelenti, hogy több fág van a rendszerben, mint baktériumsejt.

Mivel az ilyen fertőzésnél sosem egyenletes a fágok eloszlása, még 1-nél nagyobb MOI esetén is mindig lesz olyan baktérium, amit nem fertőzött meg fág, és mindig lesz olyan baktériumsejt, amit az átlagnál jóval több fág fertőz meg egyidejűleg. A Poisson-eloszlás alapján kiszámolható azon sejtek valószínűsége ($P(n)$), melyek m MOI esetén n darab faggal vannak megfertőzve:

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

Vagyis például 2 MOI esetében a meg nem fertőzött ($n = 0$) sejtek a teljes populáció 13,5%-át teszik ki ($P(0)=0,135$). Minderre szükség lehet akkor, ha például olyan kísérletet akarunk tervezni, aminél fontos, hogy a meg nem fertőzött sejtek száma minimális legyen, vagy éppen ellenkezőleg, a többszörösen fertőzött sejtek számát szeretnénk egy adott limit érték alatt tartani, például azt szeretnénk, hogy a sejtek maximum 1%-a legyen többszörösen fertőzve. Ilyen módon a megfelelő MOI beállítható.

(Tipp a tanuláshoz: Jelen sorok szerzője szerint a lítikus és a lizogén elnevezések elkülönítése, memorizálása gyakorta okoz gondot. Valójában mindkettő a „lízis” szóból ered, és a fág azon tulajdonságára utal, hogy képes lizálni a sejteket, azaz a sejtek kilyukadással járó pusztulását előidézni. A lizogén útvonalnál az az elnevezés logikája, hogy „lízisre képes” baktérium jön létre (általában a –génvégződés valami képességre, lehetőségre, létrehozó képességre utal, mint például az „onkogén”, azaz rákkeltő, rák „létrehozó” anyag). A lítikus fág tehát mindenképpen elvégzi a lízist, a lizogén azonban egy olyan baktériumot hoz létre, amiben később lejátszódhat a lízis, azaz megvan benne a lízis képessége. Ami tulajdonképpen nem más, mint a profág.)

Géntranszfer

A géntranszfer azt jelenti, hogy egy élőlényből gének jutnak egy másik élőlénybe. Ez a legáltalánosabb esetben a szülőből az utód felé történik, ez a vertikális géntranszfer. Amikor tehát egy baktérium osztódik, akkor az újonnan keletkezett sejtbe is jut az anyasejt minden génjéből, azaz beszélhetünk vertikális géntranszferről.

Ezzel szemben létezik a géntranszfernek egy másik útja, a horizontális géntranszfer. Ebben az esetben az egyed olyan genetikai információhoz jut, amivel a szülő nem rendelkezett. Baktériumok körében ez a jelenség már 1959 óta ismert, ám mára már tudjuk, hogy magasabb rendű eukarióta szervezetek, akár emlősök esetében is végbemehet horizontális géntranszfer, bár ennek mechanizmusa jóval összetettebb, mint a prokarióták esetében.

Fontos megemlíteni, hogy a géntranszfer nem minden esetben jelent előnyt az élőlényre nézve. Az előny-hátrány kérdése sok esetben a környezettől is függ, egy gén vagy génváltozat lehet előny egy adott környezetben, míg más esetben káros.

A horizontális géntranszfer típusai baktériumokban

A baktériumok alapvetően háromféle módon juthatnak genetikai információhoz a külvilágból: transzformáció által, transzdukció által és konjugáció által.

A transzformáció: DNS a környezetből

A transzformáció azt jelenti, hogy a baktérium a környezetéből vesz fel DNS-t (például egy elpusztult baktériumnak a környezetbe jutott genetikai anyagát), és az azon levő gének a baktériumban kifejeződnek. Nem számít transzformációnak, ha a sejt a felvett DNS-en levő genetikai információt nem hasznosítja, hanem a DNS-t, mint tápanyagot használja fel. Transzformációval a leghatékonyabban plazmidok tudnak terjedni, mivel ezek önálló replikációra képesek. Az önállóan replikálódni nem képes (pl. lineáris, vagy *ori* nélküli cirkuláris) DNS-ek rekombinációval válhatnak a baktérium genomjának részévé.

A transzformációhoz elengedhetetlenül szükséges az, hogy a baktérium sejt ún. kompetens állapotban legyen. A kompetencia azt jelenti, hogy az adott sejt képes DNS-t felvenni a környezetéből, de nem jelenti azt, hogy a felvett DNS-t a baktérium használni is képes, azaz a kompetencia nem feltétlenül vezet transzformációhoz. A baktérium fajok természetes kompetenciája eltérhet abban, hogy milyen feltételek közt vesznek fel DNS-t (csak bizonyos környezeti tényezők esetén, csak bizonyos növekedési fázisban); és abban, hogy milyen DNS-t képesek felvenni (pl. az adott DNS cirkuláris vagy lineáris legyen, egyszálú vagy dupla szálú legyen, hordozzon-e specifikus szekvencia elemeket vagy sem).

A transzformálás a mikrobiális genetikai kutatás során napi rendszerességgel végzett eljárás. Az *Escherichia coli* esetében a két legelterjedtebb transzformálási módszer a hősokk transzformálás és az elektroporáció.

A hősokk transzformálás és elektroporálás

A hősokk transzformáláshoz ún. kémiai kompetens sejteket használunk, melyek egy Ca^{2+} - és Mg^{2+} -ionos kezelés és hűtés során váltak kompetenssé. A transzformációs eljárás lényege az, hogy a kompetens sejtekhez adott DNS-t egy rövid hősokk (42 °C-ra történő melegítés) hatására felveszik a sejtek, majd a rajta levő genetikai információt hasznosítani kezdik. Ezzel az eljárással *plazmid DNS-t* lehet a sejtekbe transzformálni.

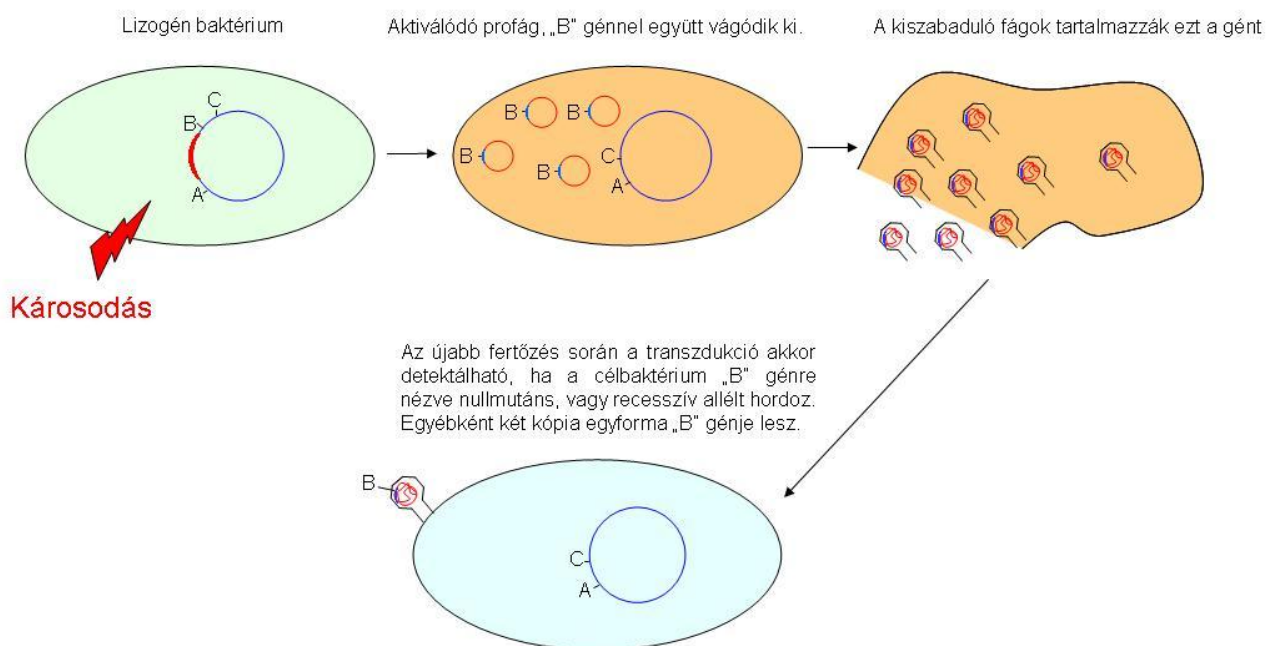
Az elektroporációs transzformálás (elektroporálás) során elektrokompetens sejteket használunk, melyeket úgy állítunk elő, hogy a baktériumokat tartalmazó oldatot (LB médium) ionmentes oldatra cseréljük, ami desztillált vízből és valamilyen nemionos krioprotektív anyagból, például glicerinnél áll. A nemionos jellegre azért van szükség, mert az eljárás során a DNS-t és a baktériumokat tartalmazó szuszpenziót egy több ezer voltos elektromos kisülésnek tesszük ki, ami pórusokat nyit a baktérium falán a DNS számára. Ha az oldatban elektromosan vezető komponensek (ionok) vannak, akkor rövidzárlat keletkezik, a transzformálás pedig sikertelen marad. (A krioprotektív pedig azt jelenti, hogy a sejteket megvédi a fagy okozta károsodástól, így fagyasztva, -70°C-on tárolhatóak.) Az elektroporációs eljárás során cirkuláris és lineáris DNS-t is be tudunk juttatni a sejtekbe, azaz plazmidokon kívül például PCR termék (lineáris DNS) is transzformálható, bár lineáris formában sokáig nem képes fennmaradni a sejtben.

A transzformáció során a baktériumok kompetenciájának mértéke nagyon fontos tényező. A kompetencia két tényezőtől függ: a sejtek sűrűségétől, és a rajtuk végrehajtott kezeléstől. Például ha 1000 sejtünk van, de 1%-uk vesz fel DNS-t a kísérlet során, az ugyanolyan, mintha 100 sejtünk lenne, de 10%-uk lenne kompetens. A transzformációs hatékonyságot az adja meg, hogy 1 μg plazmid DNS-sel végzett transzformáció mennyi, a plazmidot hordozó telepet eredményez (CFU/ μg).

A transzdukció: DNS fágoktól

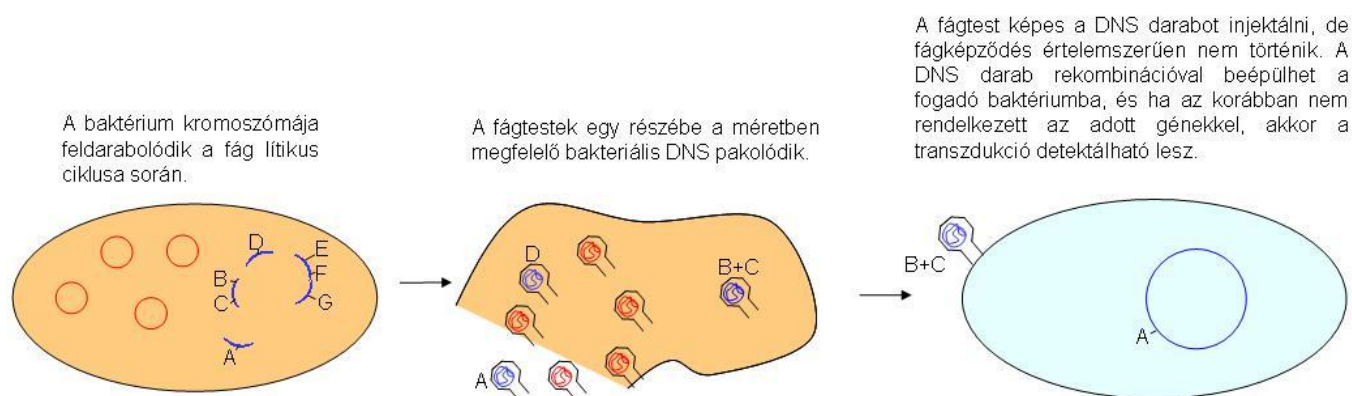
A transzdukció a horizontális géntranszfer azon típusa, amikor egy, a baktériumot fertőző fág az egyik baktériumból származó genetikai anyagot juttat egy másik baktériumba. Két típusát ismerjük, a speciális és az általános transzdukciót.

A speciális vagy specializált transzdukció megértéséhez szükség van a fentebb tárgyalt fág életciklusok ismeretére (6. ábra). Bizonyos mérsékelt fágok a gazda genomjának egy adott pontjára rekombinálódnak, így a profággal szomszédos gének mindig ugyanazok. A speciális transzdukció esetében a fág aktiválódásakor (azaz mikor a profág ismét lítikus ciklusba megy át) a fág DNS olykor hibásan vágódik ki a baktérium genomból, és a baktérium genomjának egy részét „magával viszi”, azaz a fág saját genomjának egyik szélén egy kis darab bakteriális eredetű DNS is elhelyezkedik – így csomagolódik be a fágfejbe, és így fertőzi meg a következő baktériumot. Az *E. coli* - λ fág rendszer esetében a rekombináció helye (*attB*) a galaktóz hasznosításért felelős *gal* operon és a biotin szintézisért felelős *bio* operon közé esik, így a transzdukáló fág ezek egyikének egy részletét viheti magával.



[Képaláírás: **6. Ábra A speciális transzdukció.**]

Az általános transzdukció a lítikus fázis során jöhet létre, ennek nem feltétele, hogy a fág korábban profágként jelen legyen a baktérium genomjában, tehát nem csak a mérsékelt fágok képesek rá (7. ábra). A fágtestek összeszerelődésével egyidejűleg, a gazdasejt pusztulásának részeként a baktérium genomja feldarabolódik, és a fágfejekbe bizonyos gyakorisággal a fág DNS helyett a baktérium hasonló méretű feldarabolódott DNS darabkái kerülnek, teljesen véletlenszerűen. Az így létrejött fág képes egy másik baktériumba injektálni ezt a DNS-darabot, azaz ilyen módon a fág közvetítésével létrejön a géntranszfer a két baktérium közt.



[Képaláírás: 7. Ábra Az általános transzdukció.]

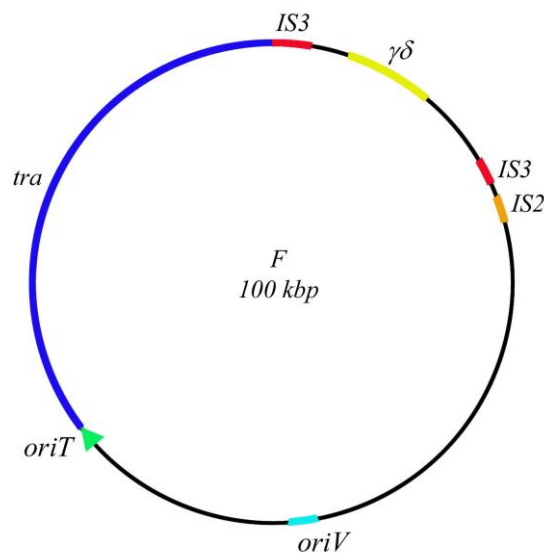
A konjugáció: DNS más baktériumsejtektől

A konjugáció a baktériumok ivaros folyamatának is tekinthető jelenség, melynek során két baktérium közt közvetlen kapcsolat (ún. pilus) létesül, melyen át genetikai anyag jut az egyik (donor) sejtől a másik (recipiens) sejtbe. Ehhez két feltétel szükséges, az egyik, hogy a két sejt képes legyen kapcsolatot teremteni, és hogy a donorban legyen mobilizálható DNS. Azokat a plazmidokat, amiken az összes szükséges gén megvan, ami szükséges a kapcsolat létrejöttéhez, konjugatív plazmidoknak nevezzük. Azokat a plazmidokat, melyek képesek lehetnek átjutni az egyik sejtől a másikba, mobilizálható plazmidoknak nevezzük. E két tulajdonság lehet egyazon plazmidon (ekkor önátvivő, self-transmissible) plazmidnak nevezzük, de lehet két eltérő plazmidon is, ekkor az egyik plazmidon található gének kellene a pilus kialakításához, de a másik plazmid jut át a piluson. (Emlékeztető: milyen feltételek kellene ahhoz, hogy két különböző plazmid fennmaradjon egy sejtben belül?)

Az *E. coli*-ban leírt legismertebb önátvivő plazmid az F-faktor vagy F-plazmid (8. ábra). Ez önmagában egy 100000 bp méretű plazmid, amin tehát minden szükséges gén megvan a pilus létrehozásához és önmaga átjutatásához a donorból a recipiensbe. Ezen kívül az F-plazmidon olyan szekvenciák is szerepelnek, melyek segítségével képes integrálódni a gazdabaktérium genomjába (inszerciós szekvencia, röviden IS), valamint onnan kivágódni is képes, és újra létrejön az F-plazmid forma. A kivágódás során időnként a vele szomszédos DNS darab is kivágódik vele együtt (hasonlóan a

speciális transzdukció esetében látottakhoz), ilyenkor az F-plazmid kiegészül egy kromoszómális eredetű szekvenciával. Azt a baktériumtörzset, aminek genomján beépülve megtalálható az F-plazmid, Hfr törzsnek nevezzük, míg azt az F-plazmidot, ami egy másik baktérium (hibásan kivágódott) génjeit hordozza, egy felső vesszővel jelöljük, azaz F' (F-prime) plazmidnak nevezzük.

A Hfr törzsek képesek az egész genomjukat konjugációval átvenni a recipiens baktériumba. (A Hfr elnevezés az angol high-frekvency recombination kifejezés rövidítése.) A konjugáció különböző időpontban való leállítása és az átjutott gének vizsgálata segítségével tudták a klasszikus genetika módszereivel meghatározni az *E. coli* géntérképét, ezt nevezzük perctérképnek is.



[Képaláírás: 8. Ábra Az F plazmid.]

A gyakorlat célja

A gyakorlaton minden hallgató egy plazmid keveréket transzformál hősokk eljárással *E. coli* DH5 α sejtekbe. A keverékben az alábbi plazmidok vannak:

Plazmid neve	szelektálható marker	nem szelektálható marker
pLG338	Kanamicin rezisztencia (Km ^R)	-
pLGlacZ	Kanamicin rezisztencia (Km ^R)	<i>lacZ</i>
pEM7/zeo	Ampicillin és Zeocin rezisztencia (Amp ^R , Zeo ^R)	-
pEM7gus	Ampicillin és Zeocin rezisztencia (Amp ^R , Zeo ^R)	<i>gus</i>
pEGFP	Ampicillin rezisztencia (Amp ^R)	<i>gfp</i>

A transzformánsokat mindenki az alábbi lemezek egyikére keni ki (a lemezek összetétele a fejezet végén megtalálható):

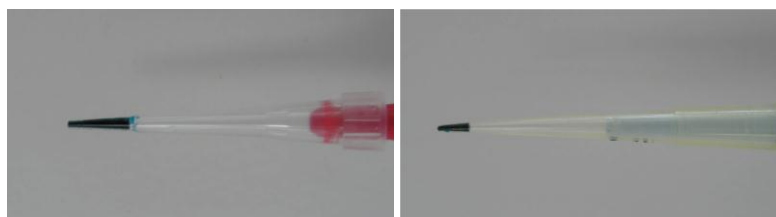
- LB + Ampicillin
- LB + Zeocin + Ampicillin + X-Gluc
- LB + Kanamicin + X-Gal
- MacConkey + Kanamicin + Laktóz.

Ezen a lemezekon a következő gyakorlati alkalommal szelektálható és nem szelektálható markereket kell felismerni.

Demókísérletként egy elektroporálást is bemutatunk, amit a gyakorlat vezetője ugyanezzel a plazmid keverékkel végez. Szintén demókísérletként létrehozunk egy lítikus és egy lizogén fágtenyészetet.

A transzformálási gyakorlat menete

- 1) A gyakorlatvezető a csoport létszámának megfelelő kompetens sejtet oszt ki. Fontos, hogy a sejtek közvetlenül a gyakorlat kezdete előtt kerüljenek ki a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hűtőből. A sejtek 10 percig állnak jégen, ezután lehet elkezdni a DNS-t hozzáadni. Ezalatt az idő alatt szükség esetén meg lehet ismerkedni a használt eszközökkel, valamint mindenki megjelöli a saját csövét, úgy, hogy közben ne vegye ki a jégről. Minden asztalon két pipetta van, egy „nagy” és egy „kicsi”. A „nagy” 40 és 200 μl közti mennyiséget tud kimérni (ez rá is van írva), és a gyakorlaton csak 200 μl kimérésére fogjuk használni, amit a gyakorlatvezető már beállított (ha valaki szerint a pipettája nem jól van beállítva, akkor szóljon, de kérjük, ne állítsa el). Erre a pipettára a sárga színű pipettahegy való. A „kicsi” pipetta lehet 1-10 μl -es, amire a kicsi fehér hegy való, vagy 2-20 μl -es, amire a „nagy” pipettával megegyező sárga hegy való. Mind a kettőt 2 μl mennyiség kimérésére fogjuk használni, amit szintén előre beállítunk. Alább a képen látható, hogy a hegyben hogyan néz ki a 2 μl mennyiség (9. ábra).



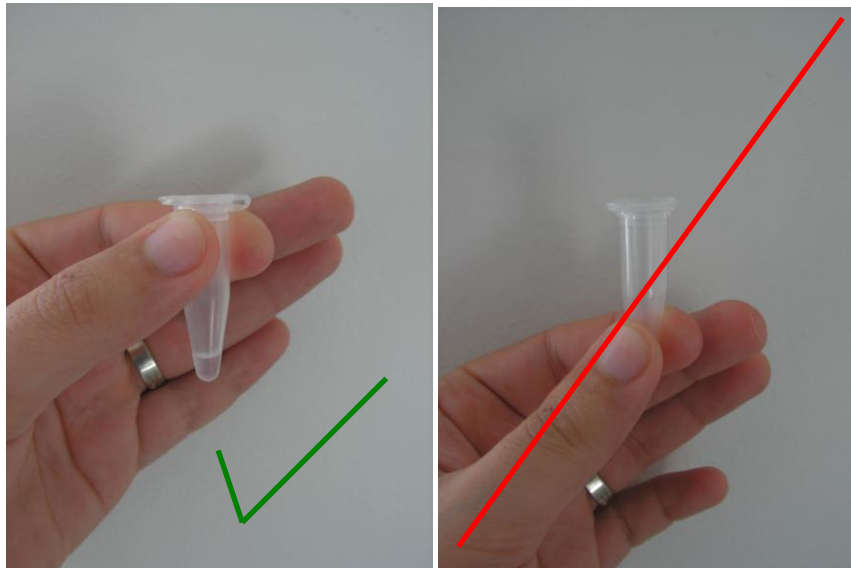
[Képaláírás: 9. Ábra Pipetta hegybe felszívott oldat.]

A saját csövéket jégen tartva ellátjuk a monogramunkal:



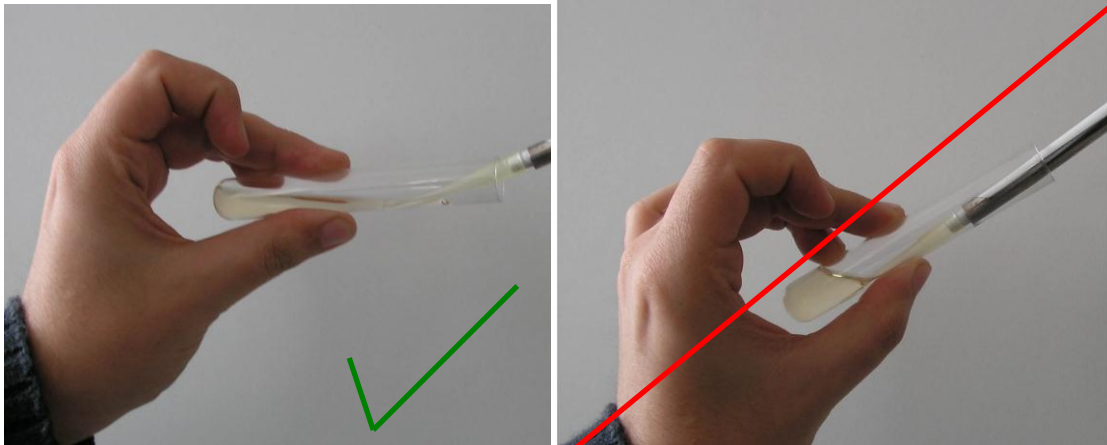
[Képaláírás: **10. Ábra** Jégen történő inkubáció.]

- 2) A 10 perc leteltével a „kicsi” pipetta segítségével mindenki hozzáad 2 μ l-t a DNS keverékből. Ha a DNS a pipettahegyben többnek látszik, mint ami a fenti képen a 2 μ l, akkor tegyük vissza a csőbe és ellenőrizzük, hogy a jó pipettát vettük-e fel. Fontos:
- gyorsan dolgozzunk,
 - ne az alján fogjuk meg az Eppendorf csövet, mert ezzel idő előtt felmelegítenénk a sejteket, ami a kompetencia elvesztéséhez vezet.
 - a sejteket egészen az utolsó pillanatig jégen kell tartani (vagyis akkor kivenni, amikor a DNS-t már felvettük a pipettával), és a DNS hozzáadása és egy gyors keverés után azonnal vissza is kell rakni jégre (10 ábra). Az elhasznált hegyeket az asztalon levő gyűjtőkbe helyezzük el.



[Képaláírás: 11. Ábra Az Eppendorf cső megfelelő és hibás tartása.]

- 3) Amikor mindenki végzett, 30 percig jégen állnak a sejtek. (Nem probléma, hogy egyes csövek hosszabban állnak jégen, az utolsó DNS beméréstől kell kezdeni a fél óra mérését.) Ez alatt az idő alatt a DNS molekulák a sejtek felszínéhez tapadnak.
- 4) 2 percre 42 °C-os termosztátba helyezzük a sejteket. A torlódás elkerülése érdekében 5 másodperces eltolással következnek egymás után a hallgatók. FONTOS: Addig nem szabad kivenni a sejteket a jégről, amíg nem fértünk oda a készülékhez (11 ábra).
- 5) A 2 perc leteltével a csöveket ismét jégre kell helyezni. (Ugyanúgy 5 másodperces eltolással lehet kivenni a sejteket, abban a sorrendben, ahogy a termosztátba kerültek.) Amikor az utolsót kivették, 4 percig állnak a sejtek jégen. Ez idő alatt meg lehet gyújtani a Bunsen-égők őrlángját.
- 6) A 4 perc leteltével az előkészített kémcsőből 200 µl LB tápoldatot adunk a sejtekhez. A művelet előtt és után a kémcső száját leégetjük. A tiszta munka érdekében a tápoldatot úgy vesszük ki a kémcsőből, hogy a kémcsövet addig döntjük, míg a folyadék elér a pipettahegyig, és nem a pipettát dugjuk le a kémcső aljára.



[Képaláírás: **12. Ábra A kémcső helyes és hibás tartása.**]

- 7) A mintákat 40 percre az előkészített 37 °C –os termosztátba helyezzük.
- 8) Minden hallgató kap egy lemezt a csoport számára előkészített lemezek közül, erre kell szélesztani. A lemezekre ráírjuk a nevünket, és a csoport számát. (Tanács: célszerű a lemeznek arra a felére írni, amiben a táptalaj van, mert egy esetleges felborulás vagy egyéb baleset során a lemezek fedele – a rajtuk levő felirattal együtt – összekeveredhet.) A lemezeket később is a táptalajjal felfelé tároljuk, hogy a képződő pára ne a baktériumokra csapódjon le, hanem a Petri-csésze fedelébe (12 ábra).



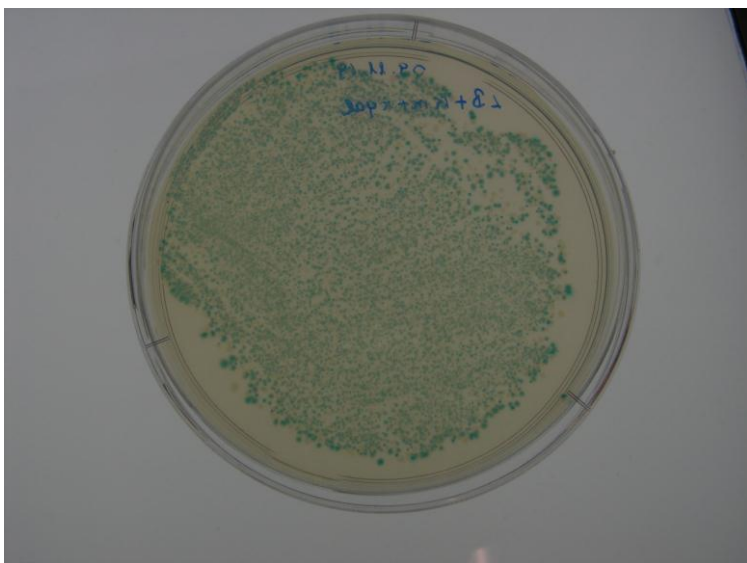
[Képaláírás: **12. Ábra A Petri csésze feliratozása.**]

A szélesztés úgy történik, hogy az alkoholban álló szélesztő pálcáról leégetjük az alkoholt, ezzel sterilizáljuk, majd a lemez felszínére letesszük, hogy lehűljön. Ezután a transzformált baktériumból 200 µl-t a lemezre csöppentünk, és a pálca segítségével körkörös mozdulatokkal elkenjük.

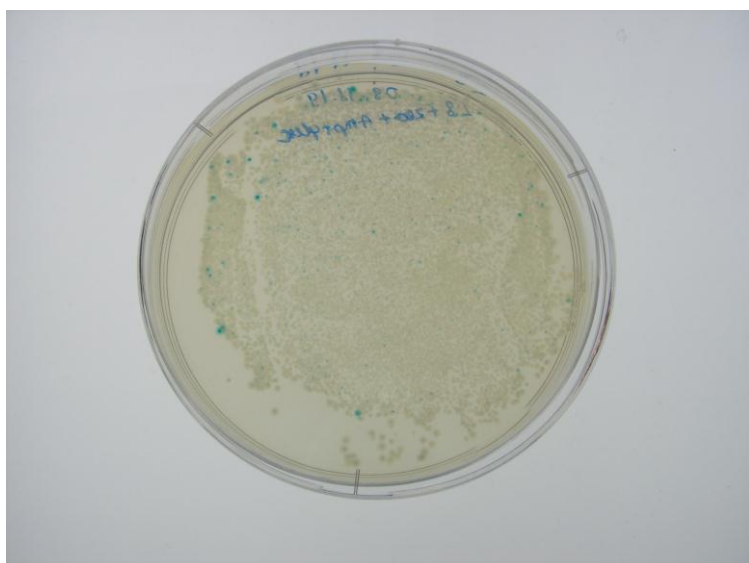
- 9) A lemezeket 37 °C-on növesztjük másnapig, és a következő gyakorlatig hűtőben tartjuk.
- 10) A következő héten elemezzük a lemezen látottakat.



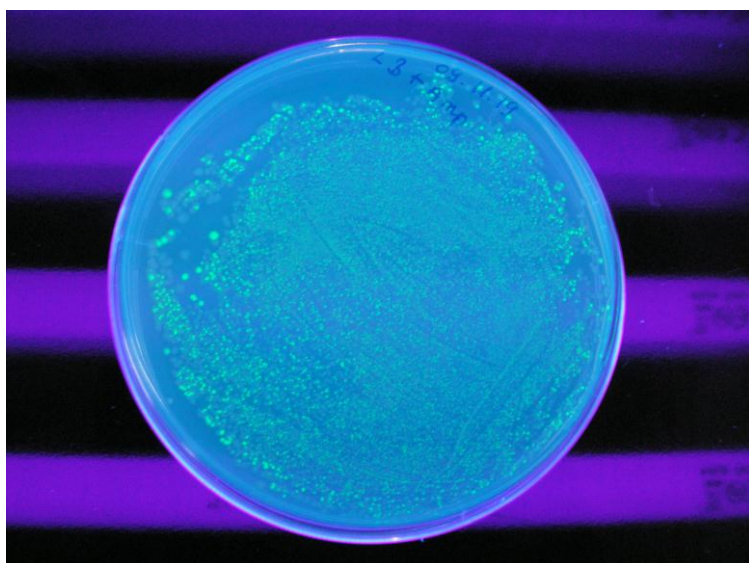
[Képaláírás: 13. Ábra A MacConkey + Kanamycin + Laktóz agaron a kanamycin tartalom miatt a pLG338 és a pLGLacZ nevű vektorokat tartalmazó baktériumok. A lemezen jól elkülönülnek a laktóz hasznosítására képes (pLGLacZ tartalmú) baktérium telepek, melyek vörösebbek a többi baktériumnál.]



[Képaláírás: 14. Ábra Az LB + Kanamicin + XGal lemezen az előzőhöz hasonlóan a pLG338 és a pLGLacZ vektorokkal transzformált baktériumok. Itt a laktóz hasznosítására képes (pLGLacZ tartalmú) baktérium telepek azok, melyek az X-Gal bontása során kék festéket termelnek. Ez a lemez ugyanazt a különbségtételt teszi lehetővé, mint a fenti MacConkey lemez, de az elve teljesen más.]



[Képaláírás: 15. Ábra Az LB + Ampicillin + Zeocin + X-Gluc agaron a zeocin és ampicillin rezisztenciát adó pEM7/Zeo és pEM7gus vektorok hordozói élnek túl. Itt a kék telepek a pEM7gus vektort jelzik.]

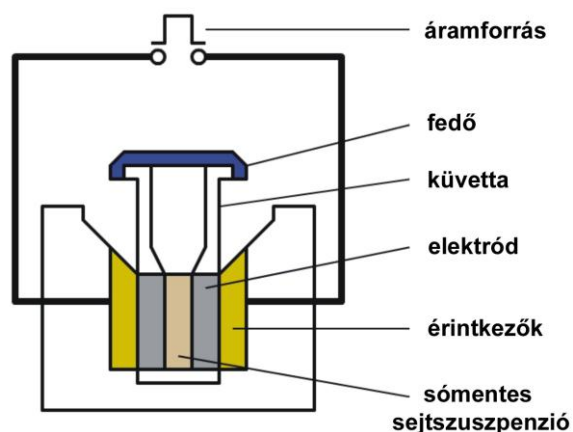
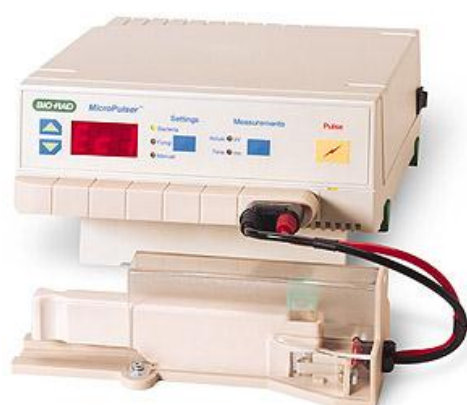


[Képaláírás: 16. Ábra Az LB + Ampicillin táplemezen a pEM7/Zeo és pEM7gus valamint a pEGFP vektort tartalmazó baktériumok nőnek. UV fénnel történő megvilágítással jól látszik, hogy melyek tartalmazzák a pEGFP vektorról termelődő GFP fehérjét. A másik két vektor egymástól ezen a lemezen nem elkülöníthető.]

Demókísérlet: elektroporálás

Az elektroporálás (latinus formában írva: elektroporáció) olyan transzformációs eljárás, melynek során a DNS-t egy nagyfeszültségű elektromos impulzus segítségével juttatjuk a sejtbe. A sejteket itt is elő kell készíteni, de ellentétben a kémiai kompetens sejt Ca^{2+} és Mg^{2+} ionos kezelésével, az elektroporáláshoz teljesen ionmentes közegre van szükség, hogy az oldat ne vezesse az elektromosságot. A hozzáadott DNS is ionmentes közegben kell, hogy legyen (17. ábra).

A transzformáláshoz szükség van még egy elektroporátor készülékre, és egy elektroporációs küvetta. A készülék a megfelelő mértékű elektromos töltés előállításáért felel, a küvette falai pedig, mivel fémből vannak, voltaképpen a két elektródként szolgálnak.



[Képaláírás: 17. Ábra Az elektroporátor készülék képe, valamint a kísérlet elvi felépítése.]

A kísérlet menete:

- 1) Jégben lehűtjük az elektroporációs küvétát és beállítjuk a készüléket. Az általunk használt készülék gyári beállításokat tartalmaz különböző baktériumokhoz és különböző küvetákhoz. Az *E. coli* transzformálása 1 milliméteres résvastagságú küvetában az EC1 nevű programmal történik.
- 2) A baktériumokhoz hozzáadjuk a 2 µl DNS oldatot, megkeverjük és gyorsan jégre helyezzük.
- 3) 5 perc várakozás után a sejteket átpipettázzuk a küvetába. Ügyelni kell arra, hogy a csepp a küvetta alján legyen, mindkét falához hozzáérjen és buborék mentes legyen.
- 4) A küvétát behelyezzük a készülékbe, ügyelve, hogy a fém lemezek a készülék elektródjaival érintkezzenek, majd megnyomjuk a „PULSE” gombot.
- 5) A készülék rövid elektromos impulzusa után a sejtekhez azonnal 1 ml LB tápoldatot adunk, majd egy eppendorf-csőben kb 40-50 percig 37°C-on állni hagyjuk őket.
- 6) 200 µl-nyit kiszélesztünk belőle, és másnapig 37°C-os inkubátorban növesztjük a sejteket.

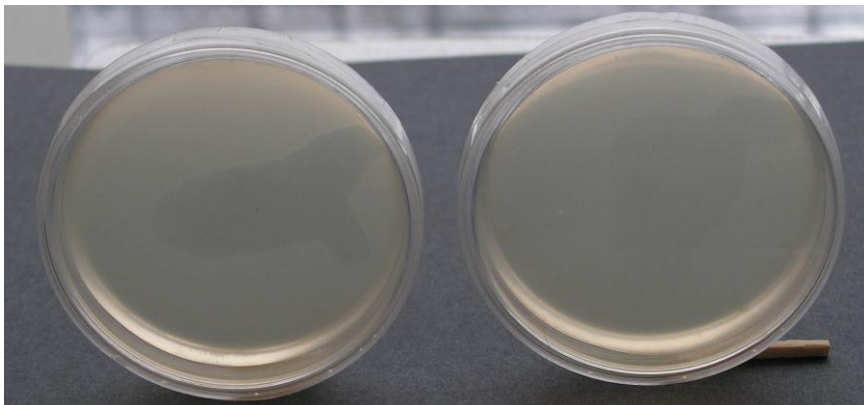
Demókísérlet: lítikus és lizogén fágtenyészet létrehozása

A kísérlet célja a lizogén és lítikus fág által képzett tarfoltok különbségének bemutatása, azaz a „tisztá” és „zavaros” tarfoltok létrehozása. A kísérlet során nem a korábban bemutatott *E. coli* - λ fág rendszert használjuk, hanem a *Rhizobium meliloti* baktériumot és annak fágját, a 16-3 fágot. A 16-3 fágnek ismert egy olyan mutánsa, melynek C represszora hőérzékeny, 37 °C fölött nem működik, azaz 37°C fölött a fág képtelen a lizogén utat fenntartani. 37 °C alatt annak megfelelően választ a két út közül, ahogy a vad típus is tenné: amíg kevés fág jut egy baktériumra, addig a lítikus út zajlik le, ha túl

nagy a fágok száma a baktériumokhoz képest, akkor a lizogén utat választja. A kísérlet során nagy fágtartalmú oldatot cseppentünk két táplemezen baktérium mezőre, majd az egyik lemezt 30 °C-on, a másikat 37 °C-on inkubáljuk. Az utóbbi lemezen a lítikus út által létrehozott tiszta tarfoltot tapasztaljuk, azaz mivel minden baktérium elpusztul, át lehet látni a lemezen. Az alacsony hőmérsékleten növesztett lemezen is látszik a fág nyoma, mivel a fágok a baktériumok egy részét elpusztítják, azonban itt növekedést tapasztalunk a fertőzött helyeken is.

A kísérlet menete:

1. Megolvasztott YTA fedő táptalajt („top agart”) 50 °C-ra termosztálunk. A top agar alacsonyabb agar tartalmának köszönhetően alacsonyabb hőmérsékleten is folyékony.
2. Sűrű *Rhizobium* kultúrából 30 µl-t 3 ml top agarba pipetázunk, egy gyors mozdulattal összerázzuk, és egy YTA táplemezre öntjük. Körkörös („palacsintasütés-szerű”) mozdulattal egyenletes réteget képzünk. A lemezt résznyire nyitva láng mellé tesszük.
3. Miután megszilárdult a top agar, 10^6 vagy magasabb titerű fágot cseppentünk rá, melyet tetszés szerint elkenhetünk nagyobb felszínen. Mindezt kétszer végrehajtjuk.
4. A létrehozott lemezek egyikét 30°C-on, a másikat 37°C-on inkubáljuk másnapig. A kapott eredményeket értékeljük.





[Képaláírás: **18. Ábra A bal oldali lemezen a tiszta tarfolt látható.** Áteső fényben (fent) látszik, hogy sokkal világosabb, mint a jobb oldali zavaros tarfolt. Felülről megvilágítva látszik, hogy a környékhez képest egy réteggel alacsonyabb a folt, itt a fágok minden sejtet elpusztítottak. A zavaros tarfolt nem jól látszik ilyen szögben.]

Kísérlet a gyakorlat második napján: plazmid elvesztése szelekció megszűntekor

A kísérlet célja, hogy demonstráljuk, hogy a szelekciós nyomás megszűnésével a plazmid is megszűnik előnyös lenni, ezért fokozatosan eltűnik a baktériumpopulációból. Ehhez tudni kell, hogy a baktériumok egymás közt versengenek, hiszen amelyik gyorsabban osztódik, annak az utódai értelemszerűen többségben lesznek a populációban. (És mi a versengés lényege, ha nem ez?) Az osztódás egyik limitáló tényezője a genom lemásolása lehet, így a baktériumok esetében gyakori a genom minimalizálása, akár kromoszómális régiók deléciója, akár a szükségtelen plazmidok elvesztése révén.

A plazmid kétféle módon „tűnhet el” a populációból. Az egyik, hogy a szükségtelen plazmidot a baktérium mint tápanyagforrást hasznosítja, azaz lebontja, felhasználja, ennek során a plazmid DNS megszűnik létezni. A másik elméleti út a plazmid hígulása. Tegyük fel, hogy az osztódás előtt a plazmidot a sejt nem másolja le, de a már meglevő példányokat sem pusztítja el. Ekkor azok az osztódás során a két leánysejtbe kerülnek, körülbelül fele-fele arányban. Tehát egy nagy kópiaszámú plazmid esetén (például sejtenként 400 kópia), az osztódás után csak 200-200 kópiát fog tartalmazni

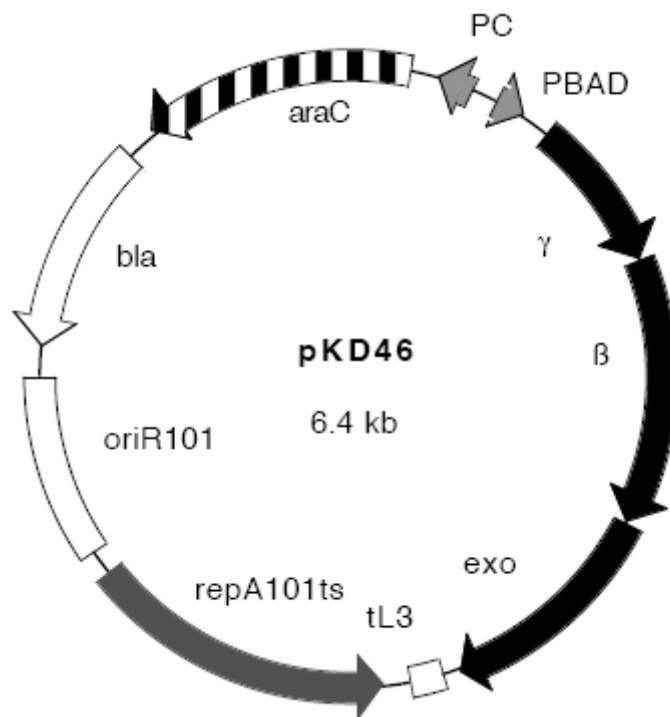
a két utódsejt. Ekkor elméletileg a kilencedik osztódásra a sejtenkénti átlagos kópiaszám 1 alá esik, tehát biztosan megjelennek azok a baktériumok, melyek nem tartalmazzak egy kópiát sem, de valójában – mivel az eloszlás nem egyenletes –, már akkor is megjelenhetnek az „üres” sejtek, amikor az átlag még 1 fölött van. A plazmidok ebben az esetben nem bomlanak el, és csak az egyedi baktériumsejt elpusztulásakor kerülnek ki a populációból, azaz addig valójában csak az eredeti plazmidmennyiség van szétosztva a sejtek közt.

A valós kép azonban nem ez, mivel a plazmid replikációját a baktériumban semmi sem gátolja, tehát mindig vannak olyan sejtek (sőt, valószínűleg ezek vannak többségben), amik a plazmidot kisebb-nagyobb mértékben replikálják, bár ezzel szaporodási hátrányba kerülnek a replikációt valahogyan leállító vagy erősen lecsökkentő sejtekhez képest. Összességében tehát a plazmid fogatkozása ellen és mellett egyaránt hatnak tényezők, melyek közösen határozzák meg a plazmid eloszlását illetve a plazmidmennyiség csökkenésének ütemét a populációban.

Ilyen módon a szelekciós nyomás alól kikerült plazmidok ugyan folyamatosan hígulva, de igen sokáig jelen lehetnek a populációban, és egy ismételt szelekció hatására a hordozó egyedek megint előnybe kerülnek, elszaporodhatnak a többi sejt rovására. Hasonló helyzetet fogunk modellezni a kísérletünkben.

Egy különös plazmid – a pKD46

A plazmidok replikációjához olykor szükség van olyan fehérjére is, amit maga a plazmid kódol, azaz a plazmid felelős a saját replikációjáért. A pKD46 egy olyan plazmid, aminek a replikáza (*repA 101*) egy hőérzékeny mutáns, ami 30 °C-on jól működik, ám 37 °C-on működésképtelen. (Ilyesfajta plazmidokra olyan kutatásokhoz lehet szükség, amikor csak átmenetileg van szükség arra, hogy a plazmid jelen legyen a baktériumokban, és ha elvégezte a feladatát, akkor szeretnénk eltüntetni. Mint látni fogjuk, pusztán a szelekció elvonásával ez nem túl hatékony folyamat.) A fentiek alapján tehát a pKD46 alkalmas arra, hogy a hőmérséklet emelésével teljesen meggátoljuk a replikációját, ezáltal csak a hígulás és a plazmid eltűnése felé irányuló folyamatok lesznek jelen a populációban. A pKD46 egyébként egy alacsony kópiaszámú plazmid, ami szintén könnyíti az eliminációját (kevesebb példánytól kell megszabadulni).



[Képaláírás: 19. Ábra A pKD46 sematikus ábrája.]

A pKD46 eliminációja szelekció megvonásával és restriktív hőmérséklettel

A kísérlethez három baktériumkultúrát használunk. Az egyik pKD46 plazmidot tartalmaz (19. ábra), és a plazmid szelekciós markerének megfelelően ampicillin tartalmú folyékony tápoldatban volt növesztve, 30 °C-on. A második ugyanezt a plazmidot tartalmazza, de egy nagy mértékű (100000-szeres) hígítás után 16 órán át szelekció nélkül növesztettük 30°C-on. A harmadik pedig szintén szelekciómentes oldatban nőtt, de 37 °C-on. A 100000-szeres hígítás elméletben azt jelenti, hogy egyenletes megkettőződést feltételezve (ami persze nem igaz) $\log_2 100000 = \text{kb. } 16$ osztódáson mennek keresztül a sejtek, azaz várhatóan már kimutathatóak lesznek olyan sejtek, amelyek elvesztették a plazmidot. (Felmerülhet a kérdés, hogy miért nincs ampicillines kultúra 37°C-on növesztve. Egyszerűen azért, mert a plazmid replikációja olyan erősen gátolt, hogy a baktériumok nem képesek új plazmidot létrehozni, azaz ha mindig el is felezik az addigi „készletüket”, akkor is néhány osztódás után már csak olyan sejtek lesznek, amikben egyetlen plazmid van. Ezen a ponton pedig már nem keletkezhetsen új sejt, azaz nem tudják teljesen benépesíteni a folyadékkultúrát.) A

kísérlet során baktériumsejteket fogunk megszámolni a plazmidot tartalmazó és nem tartalmazó sejtek CFU/ml értékét fogjuk meghatározni.

A CFU meghatározás

A CFU, vagyis korrekten használva CFU/ml a baktériumszuszpenzióban található baktériumok számát (colony forming unit) jellemző érték, azaz a baktériumok „koncentrációja”. Azt mutatja meg, hogy 1 ml oldatban hány élő, kolóniaképzésre alkalmas baktériumsejt van. Ehhez a vizsgált mintából egy ismert térfogatú csöppet (pl. 10 µl-t) LB lemezre csöppentünk, és növesztés után megszámoljuk a keletkezett telepeket. Ha például 15 telepet kapunk 10 µl mintából, akkor a vizsgált minta 1 ml-ében 1500 baktérium volt, azaz 1500 CFU/ml a szuszpenzió töménysége. A gyakorlatban azonban sokkal nagyobb értékekkel dolgozunk, 10^8 , 10^9 CFU/ml is lehetséges, azaz egy 10 µl-es csöpp többmillió telepet adna. Ezt nem lehet megszámolni, ezért hígítási sort kell készíteni, azaz a vizsgált mintát valahányszorosán (a legtöbbször 10-szeresen) hígítjuk, majd ezt is hígítjuk és így tovább addig, míg az utolsó csövekbe már várhatóan nem kerül egyetlen sejt sem. A hígítási sor minden tagjából kicseppentünk egy ismert térfogatot az LB lemezre, és másnap valamelyik csöpp helyén megszámolható mennyiségű telepet kapunk. A telepeket leszámoljuk, és mivel tudjuk, hogy a hígítási sor hanyadik tagja adott annyi telepet, ezért ki tudjuk számolni az eredeti CFU/ml értéket. Fentebb már láttuk, hogy az első csöpp már eleve 100-szoros hígítást jelent (15 telep = $15 \cdot 100 = 1500$ CFU/ml), tehát a tényleges CFU/ml érték így számolható:

$$\text{CFU/ml} = T \cdot 10^{(x+1)}$$

ahol T a telepek száma, x pedig a hígítási sorban az adott folt sorszáma. Ha tehát az első folton volt 15 telep, akkor $T = 15$, $x=1$, azaz $\text{CFU/ml} = 15 \cdot 10^{(1+1)} = 1500$. Ha viszont 5 telepet kapunk a hatodik csepp helyén, akkor az érték $5 \cdot 10^{(6+1)} = 50\,000\,000$.

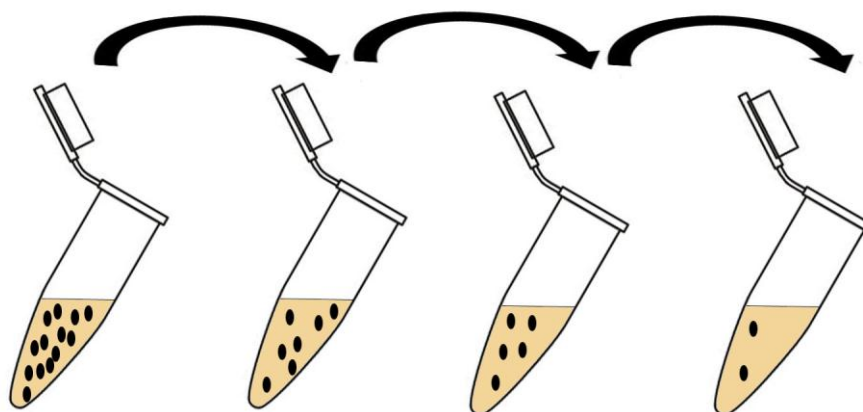
Ez az eljárás természetesen nem teljesen pontos, valójában inkább nagyságrendi becslést ad az eredeti CFU/ml értékre, hiszen a hígításoknál számos pontatlanság történhet. Ugyanezen okból érdemes egy mintából több párhuzamos mérést végezni.

A kísérlet menete

A kísérlet során CFU/ml érték meghatározása a cél az eltérő lemezekben. Ehhez 10 tagú, 10-szeres hígítási sort készítünk mindhárom folyadékkultúrából, majd a három hígítási sort ampicillines és ampicillin mentes LB lemezre csöppentjük. Mindkét fajta lemezből kettőt készítünk (összesen tehát négyet), kettőt közülük 30°C-on, a másik kettőt 37°C-on termosztáljuk. Végül másnap a telepek megszámolásával megállapítjuk a két kultúrában a baktériumok számát. A nem szelektáló lemezen meghatározott CFU érték a teljes baktérium-mennyiséget méri, hiszen a plazmidot tartalmazó és nem tartalmazó telepek is kinőnek rajtuk. A szelektív lemezen csak a plazmidot tartalmazó sejtek adnak telepet, vagyis az ampicillin rezisztens sejtek CFU/ml értékét mérjük. A 37°C-on ampicillines lemezen nem várunk növekedést, de előfordulhat a tömény baktériumok (tehát az első néhány csepp) esetén az, hogy baktériumkenetet kapunk, itt ugyanis még elég plazmid van az egyes sejtekben ahhoz, hogy néhány osztódás történhessen (de a plazmid nem replikálódik, csak eloszlik a sejtek közt). Ebben az esetben egyedi telepek nem lesznek.

A kísérlethez fejenként 9 db Eppendorf-csövet, LB tápfolyadékot, valamint mindenki a háromféle baktérium kultúra egyikét fogja használni (szintén Eppendorf-csőben kiosztva).

- 1) Első lépésként az Eppendorf-csövekbe 180 µl folyékony LB-t mérünk szét. A csöveket 2-10-ig számozzuk, az 1-es cső maga a tömény baktériumkultúra. Nem kell jégen dolgozni.
- 2) A tömény baktérium kultúrából 20 µl-t az első Eppendorf-csőbe mérünk. Elkeverjük, majd egy új pipettaheggyel a következő oldatba mérünk a már hígított oldatból és így tovább, a 10. csőig (20 ábra).



[Képaláírás: 20. Ábra Hígítási sor elkészítése.]

- 3) A hígítási sort hátulról (a leghígabbtól kezdve) kicsöppentjük a két lemezre úgy, hogy ne folyjanak össze. Amíg a hígabbtól a töményebb felé haladunk, nem kell pipettahegyet cserélnünk. (Ez azért van így, mert a hegyen esetlegesen maradó hígabb szennyeződés nem zavarja a töményebb oldatot, de ha töményebb szennyeződés marad a hegyen, az megzavarja a hígabbat. Például szemmel nem látható 0,1 ul töményebb oldat annyi baktériumot tartalmaz, mint 1 ul hígabb a következő lépésből, tehát 10% hibát csinál. Ha véletlenül két lépéssel fentebből hozunk szennyeződést, az óriási hibát jelenthet.) Egy lemezen több hígítási sor is elfér.
- 4) A lemezeket láng mellett félig nyitva száradni hagyjuk, míg a cseppek oda nem száradnak. Ezután a lemezek felét 37°C-on, a másik felét 30°C-on termosztáljuk másnapig.

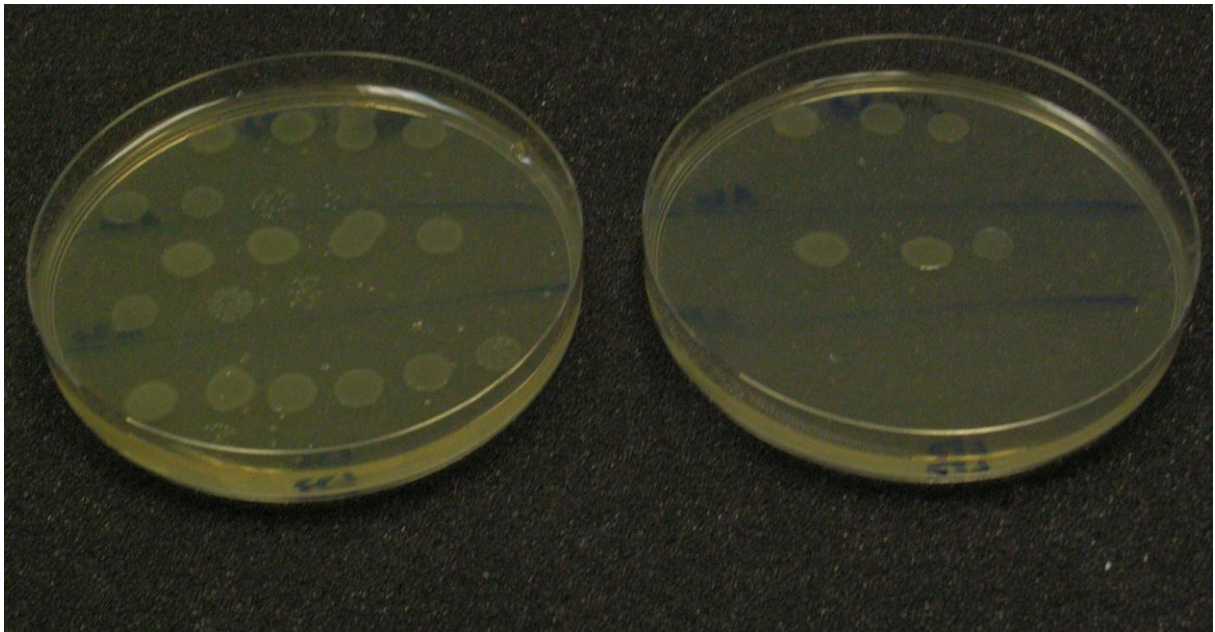
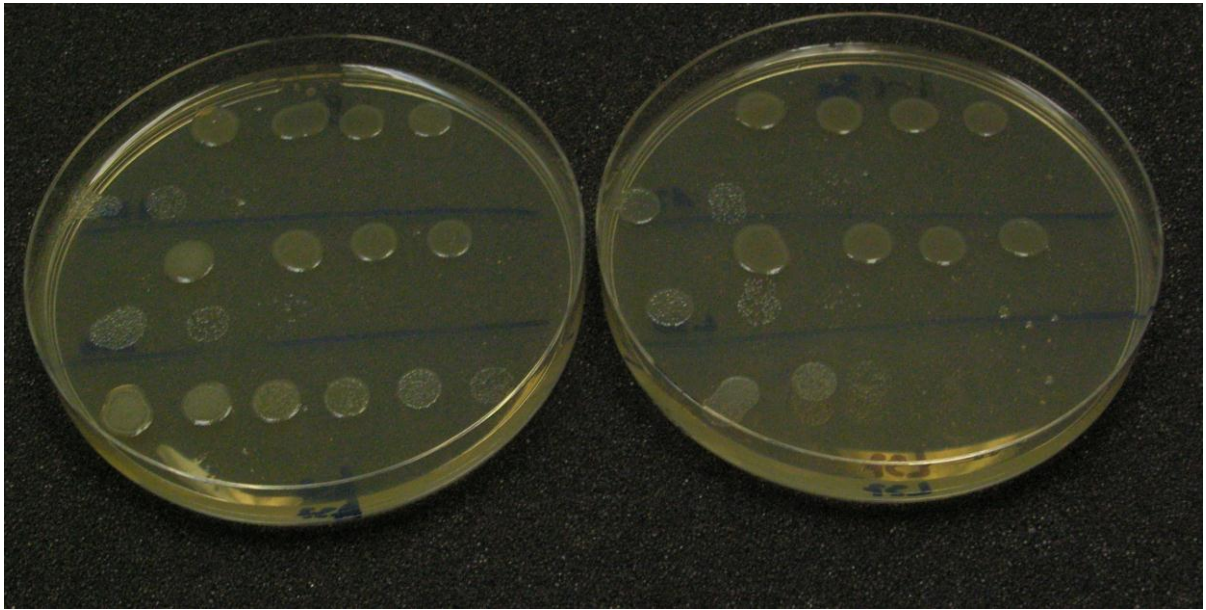
Mit várunk?

A kísérletben azt szeretnénk kimutatni, hogy a plazmid kényszerített eliminációja és a pusztán a szelekció hiányából adódó eliminációja közt milyen különbség van.

Várhatóan az ampicillinben 30°C-on növesztett sejtek az ampicillines lemezen és a nem szelektáló LB lemezen (30 és 37°C-on) is ugyanannyi telepet adnak, tehát az összes sejt száma megegyezik a rezisztens sejtek számával, mivel az összes sejtben van plazmid.

A nem szelektív környezetben növesztett sejtek egy része elveszti a plazmidot, emiatt ennek a szuszpenzióknak a mérésekor talán eltérést fogunk tapasztalni a szelektív és a nem szelektív lemezek számolható telepszámok között, de csak ha a veszteség elég nagy. A nem szelektáló lemezen várhatóan ugyanannyi sejt lesz, mint a másik esetben, hiszen a teljes baktériumszámot az LB tápanyagtartalma és a növesztés körülményei befolyásolják – ez kb. 10^9 nagyságrendbe esik majd. A szelektív lemezen és a nem szelektív lemezen számolható telepek aránya fogja megmutatni, hogy mennyi volt a plazmidot megtartó sejtek aránya a teljes populációhoz képest.

A restriktív hőmérsékleten növesztett sejteknél azt várjuk, hogy kb. 1000-szeres (vagy akár 10000-szeres) különbség legyen a két lemez között, hiszen itt csak azokat a baktériumokat kapjuk vissza, melyek az 1:50000-szeres hígításban eredetileg levő plazmid mennyiséget tartalmazták. Alább a kísérlet általunk kapott eredménye látható:



[Képaláírás: **30. Ábra Baktérium tenyészetek szelektív táptalajon.** A fenti két képen a jobb oldali lemez az LB, a bal oldali az ampicillines LB, a felső két lemez 30°C-on, az alsó kettő 37°C-on volt növesztve.]

Az összes lemezen a felső harmadban az eredetileg ampicillines LB folyadékban, 30°C-on növesztett sejtek láthatóak. A középső harmad az LB folyadékban, 30°C-on növesztett sejteket mutatja. Az alsó harmadban a 37°C-on LB folyadékban növesztett baktériumok láthatóak.

Jól látszik, hogy a jobb alsó lemezen a felső és a középső szekcióban három tömör baktériumfolt van, de nincsenek telepek. Ennek, ahogy fentebb említettük, az az oka, hogy amíg a baktériumcsepp elég tömény, addig a jelen lévő plazmid mennyiség elég ahhoz, hogy a sejtek növekedjenek, és pár osztódás is elég egy látványos baktériumfolt kialakulásához. Amikor a hígítás elér egy kritikus szintet, akkor a meglévő plazmidok már nem elegendőek a túléléshez, így itt hirtelen, átmenet nélkül kapunk 0 telepet. Ugyanezen lemez alsó harmadában még ilyen folt sincs, mert itt még a legtöményebb sejtszuszpenzióban sincs elegendő plazmid ahhoz, hogy a folt kialakuljon.

Az alábbi táblázat mutatja, hogy milyen CFU/ml értékeket kaptunk az egyes lemezeken:

	LB, 30°C-os lemez	Amp, 30°C-os lemez	LB, 37°C-os lemez	Amp, 37°C-os lemez
Eredetileg Amp, 30°C folyadék	7. csepp, kb 30 telep: $3 \cdot 10^9$	7. csepp, kb 30 telep: $3 \cdot 10^9$	7. csepp, kb 30 telep: $3 \cdot 10^9$	Nem bomlott telepekre.
Eredetileg LB, 30°C folyadék	7. csepp, kb 15 telep: $1,5 \cdot 10^9$	7. csepp, kb 15 telep: $1,5 \cdot 10^9$	7. csepp, kb 20 telep: $2 \cdot 10^9$	Nem bomlott telepekre.
Eredetileg LB, 37°C folyadék	7. csepp, kb 15 telep: $1,5 \cdot 10^9$	4. csepp, kb 30 telep: $3 \cdot 10^6$	7. csepp, kb 25 telep: $2,5 \cdot 10^9$	Nem nőtt semmi.

Tapasztalatok: az ampicillinben és az LB-ben, 30°C-on növesztett kultúrák hasonlóan viselkedtek: ugyanakkora telepszámot kaptunk minden lemezen, kivéve a 37°C-on növesztett ampicillines lemezen, amin nem kaptunk telepet. (A kenetszerűen nőtt részt nem vesszük figyelembe a CFU/ml számításnál.) Ez azt jelenti, hogy még 1:50000 hígítás esetén sem kapunk számottevő plazmid eliminációt.

A kényszerített eliminációnál (37°C-on, LB folyadékkultúrában növesztve) az LB-n (akár 30, akár 37°C-on) kapott CFU/ml értékhez képest 3 nagyságrenddel kisebb értéket kapunk a melegen növesztett ampicillines lemezen, azaz a teljes baktériumpopuláció 1/1000 részében található meg a plazmid.

A kísérlet jól szemlélteti, hogy bár a plazmidok a megfelelő antibiotikumos környezeten kívül kis mértékű hátrányt jelenthetnek a gazdasejtre nézve, de pusztán a szelekciós nyomás elvétele (azaz az antibiotikum hiánya) nem elegendő ahhoz, hogy a populációban gyorsan csökkenni kezdjen a plazmid mennyisége.

Kapcsolódó számítások:

1. A gyakorlathoz 10^6 titerű fágra van szükség. A hűtőben találunk egy csőnyi fágot. 1 ml folyadékban felhígítjuk ennek a fágoldatnak 1 μl -ét, majd egy baktérium lemezre kicseppentünk a hígított fágból 10 μl -t. Másnapra 25 különálló plakkot számolunk. Alkalmas-e az eredeti fágoldat a gyakorlat végrehajtására?
2. Egy kompetens sejtről azt állítja a gyártó, hogy a sejt kompetenciája 10^8 CFU/ μg . 10 ng DNS-t transzformálunk, hány telepet várunk?
3. Egy ismert, 10^7 CFU/ μg kompetenciájú sejtbe transzformálunk ismeretlen töménységű DNS-ből 1 μl -t. A transzformálás végén a sejtek és a tápoldat összes térfogata 500 μl . Három lemezre szélesztünk: az elsőre 5 μl -t, a másodikra 50 μl -t, a harmadikra a maradékot. Az első két lemezen kb 10 illetve 100 telep nőtt, a harmadikon megszámlálhatatlanul sok. Mennyi lehetett a DNS koncentrációja?
4. Fágoldattal fertőzünk baktériumkultúrát. Azt szeretnénk elérni, hogy maximum a sejtek 5%-a fertőződjön egynél több faggal. Milyen MOI-t kell alkalmazni?
5. Baktériumszuszpenzióból tízszeres hígítási sort készítünk, majd 10-10 μl -es cseppeket cseppentünk LB táptalajra. Két párhuzamos lemezt készítünk, az egyiket a 7. csepp 12 telepet ad, a 8. csepp és az azt követők egyet sem, a másikon a 7. csepp 9 telepet, a 8. csepp 2 telepet ad, az azt követők egyet sem. (Az első csepp a lemezeken a tömény baktériumszuszpenzió.). Mennyi lehetett az eredeti oldat CFU/ml értéke?

Anyagok:

LB táptalaj (Luria-Bertani táptalaj)

Az *Escherichia coli*-val való munkák során legáltalánosabban használt táptalaj. Összetétele: 10 g/l pepton (ez egyfajta húskivonat), 5 g/l élesztő kivonat és 10 g/l NaCl. A szilárd változatába 12 g/l bakteriológiai agart is keverünk. A pepton és az élesztő kivonat kémiaileg nem „tisztá” vegyületek, hanem aminosavak, peptidek, szénhidrátok olyan többé-kevésbé ismert minőségű keveréke, amit az élesztő vagy a hús, amiből készültek, tartalmazott.

MacConkey táptalaj:

Szénhidrát hasznosítás kimutatására alkalmas táptalaj. 20 g/l pepton, 5 g/l NaCl, 0,03 g/l neutrálvörös, 0,001 g/l kristályibolya. Ebből csak szilárdat használunk, ami 12 g/l bakteriológiai agarral készül. Mindezekon kívül tartalmaznia kell a megfelelő szénhidrátot, melynek hasznosítását kimutatjuk. Ez a gyakorlaton 10 g/l laktóz.

YTA és YTA fedő agar (YTA = Yeast, Trypton, Agar.)

Ez a *Rhizobium meliloti* tenyésztésére szolgáló táptalaj. 10 g/l triptont, 1 g/l élesztő kivonatot, 5 g/l NaCl-ot, 1 mM $MgCl_2$ -t és 1 mM $CaCl_2$ -t tartalmaz. A szilárd YTA 15 g/l, a fedő (top) agar 7,5 g/l bakteriológiai agart tartalmaz.

Antibiotikumok és egyéb kiegészítő vegyszerek koncentrációja:

Kanamicin: 30 µg/ml

Ampicillin: 80 µg/ml

Zeocin: 80 µg/ml

X-Gal: 40 µg/ml

X-Gluc: 50 µg/ml

Tetrádelemzés

Dr. Lengyel Katalin egyetemi tanársegéd
ELTE TTK Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék

A gyakorlat célja

A tetrádanalízis fogalmának, elvének megismertetése. A tetrádanalízis/homológ rekombináció látványos szemléltetése spóraszín mutánsok keresztezésével. A génkonverzió jelenségének bemutatása és szerepének kiemelése a homológ rekombináció folyamatában. A génkonverzió és *crossover* viszonyának demonstrálása.

A rekombináció

A szülői allélek átrendeződésével (rekombinálódásával) új kombinációk jelenhetnek meg az utódgenerációban. Független gének esetében a gének alléljai Mendel II. törvénye értelmében szabadon kombinálódnak, és így egyenlő arányban alakulnak ki szülői és nem szülői típusú ivarsejtek (gaméták). Kapcsolt, vagyis egy kromoszómán lokalizált gének esetében az új kombinációk kialakulását a *crossing over* biztosítja (az allélek reciprok kicserélődése a homológ kromoszómák között a homológ rekombináció folyamata során), amelynek eredményeként szülői és rekombináns kromoszómákat kapunk. Rekombináció nélkül csak szülői típusú gaméták keletkeznek.

Rekombináció alatt tehát több folyamatot is érthetünk (ide sorolhatjuk még a helyspecifikus rekombinációt vagy a transzpozíciót is), ebben a fejezetben csak a meiózis során programozottan, pontosan időzítve végbemenő homológ rekombinációval fogunk foglalkozni.

Tetrádelemzés

A tetrádanalízis során egyetlen meiotikusan osztódó sejt 4 haploid termékét (a tetrádot) vizsgáljuk. Szemben az eddig megismert statisztikus kiértékelési móddal a tetrád elemzés során egyedileg vizsgáljuk egy-egy meiózis termékeit. Ily módon az egyedi eseményeket hasonlítjuk össze. A meiotikus osztódás haploid terméke az állatokban a petesejt a három sarki testtel illetve a spermiumok. Virágos növényekben a végtermék a 8 sejtből álló embriózsák és a három haploid sejtből álló pollenszem. Haploid tömlősgombák esetében 4, illetve a meiózist követő mitotikus osztódás után 8 haploid aszkospóra egy meiózis terméke. A 4 illetve 8 aszkospóra a tömlőben vagy másnéven aszkuszbán található, ez teszi lehetővé a

tetrádok elkülönült vizsgálatát. A tömlősgombák egy részében a meiotikus osztódás, illetve a mitózis tengelye szigorúan rögzített. Az egyes osztódások lineáris rendben követik egymást és ezt az elrendeződést megőrzi a végtermék, a 8 askospóra is, ezeket nevezik rendezett tetrádoknak. A spórák genotípusának lineáris rendje a tetrádanalízis kulcsa, ez teszi lehetővé, hogy rendezett tetrádok esetén egyetlen gén és centromeronja közti távolságot tudunk megadni.

A gyakorlatban az askuszkok mintázatának vizsgálata úgy történik, hogy az askuszokat egy csipesszel kinyomják az ún. termőtestből, majd az egyes askuszokból a spórákat sorrendben, egyenként kiemelik egy vékony üvegtűvel. Ezután minden spórát külön-külön kémcsőben táptalajon kicsíráztatnak és a gombafonaltömeg, a micélium tulajdonságait ellenőrzik. Ezt a munkafolyamatot disszekciónak nevezik. Mivel a spóra haploid, a micélium tulajdonságainak ellenőrzése elárulja a spóra genotípusát.

Van, amikor nincs szükség disszekcióra, mert a spórákról ránézésre meg lehet állapítani, hogy milyen allélt hordoznak. Ilyen pl. az, amikor a spóra színmutánsok segítségével végezzük a tetrádelemzést. A vad típusú spóra színe rendszerint sötét, de vannak mutánsok, amelyekben ez a festékanyag nem képződik, ezért a spóra színe világos. (Természetesen a gyakorlaton ez utóbbi tulajdonságot fogjuk vizsgálni.)

○ *A spórasorrend jelentése*

Az askusz szigorú térrendje azt eredményezi, hogy harántsíkban elhasítva két egyenlő félre osztható, a 8 askospóra első és második négyese az apai és anyai kromoszómapár centromeronjait jelképezi, illetve a centromeronhoz kapcsolódó kromatidák genetikai tartalmát. Hiszen az első meiotikus osztódáskor ez a két centromeron „vonszolta” a kromoszóma többi részét az utódsejtek pólusaihoz.

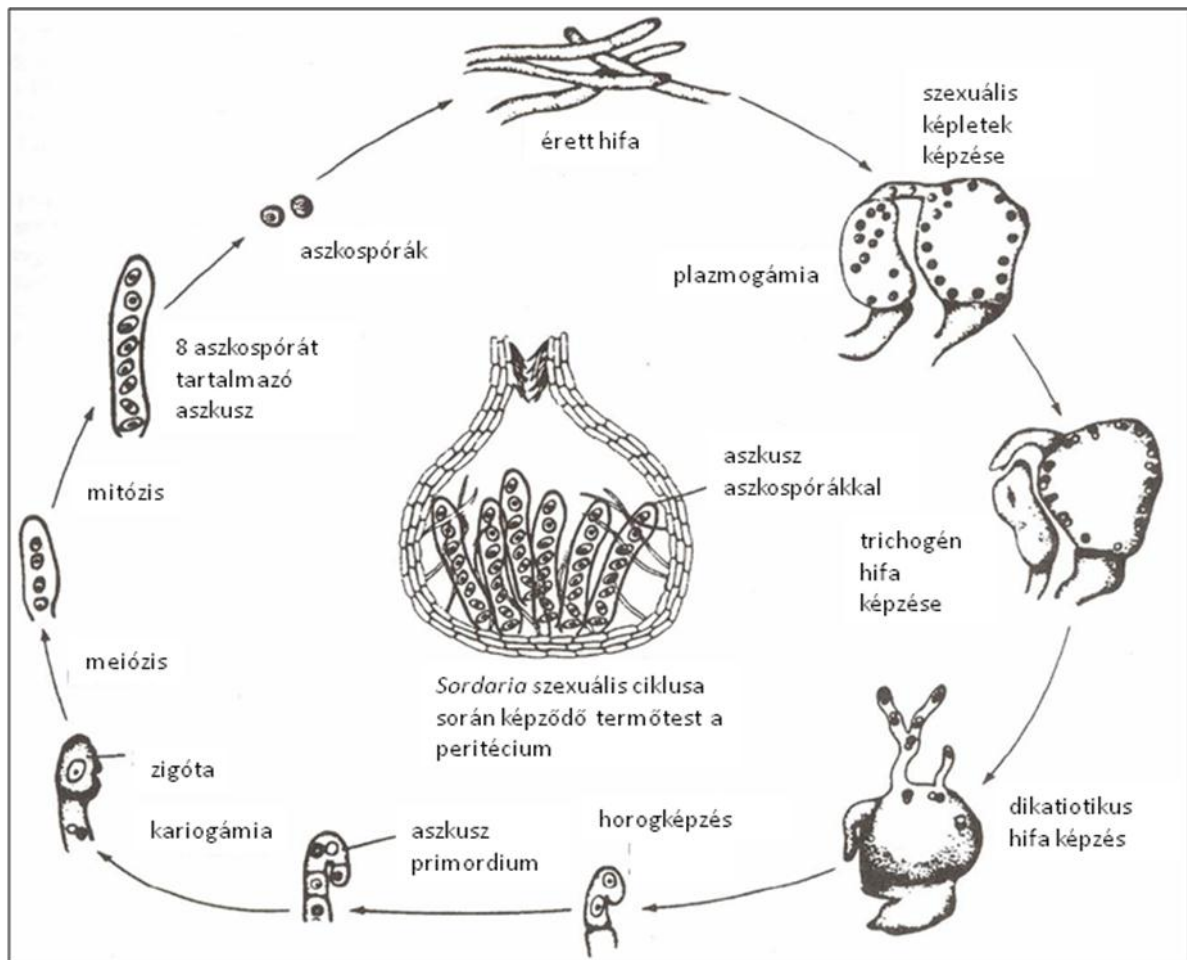
A második meiotikus osztódás, amikor a centromeron is osztódik, s ezáltal a testvér kromatidák is elválhatnak egymástól, a spórapárral jellemezhető: az 1. és 2.; 3. és 4.; 5. és 6. illetve 7. és 8. pozícióban fekvő spórák a kromatidák genetikai tartalmát jelképezik. Mivel a kromatida DNS-e egyetlen hosszú DNS kettős spirálból áll, a spórapár az adott DNS-molekulán fekvő allélokról tájékoztat. Ezek után nem nehéz belátnunk, hogy az askusz minden egyes spórája a kromatidafonalban levő DNS kettős spirál egyik szálát jelenti, illetve az azon levő genetikai információt. A spórapárok tagjai tehát elméletileg azonosak, hiszen egy DNS kettős spirál duplázódásával jöttek létre.

Azonos centromeronhoz kapcsolódó kromatidák (testvér kromatidák) közötti kicserélődés genetikai változást nem eredményez, így nem is észlelhető. A tetrád mintázata ezek szerint bizonyítja a fizikai kicserélődés tényét a centromeron és a vizsgált allélpár kromoszómális helye között.

○ *A tömlősgombák életsiklusa*

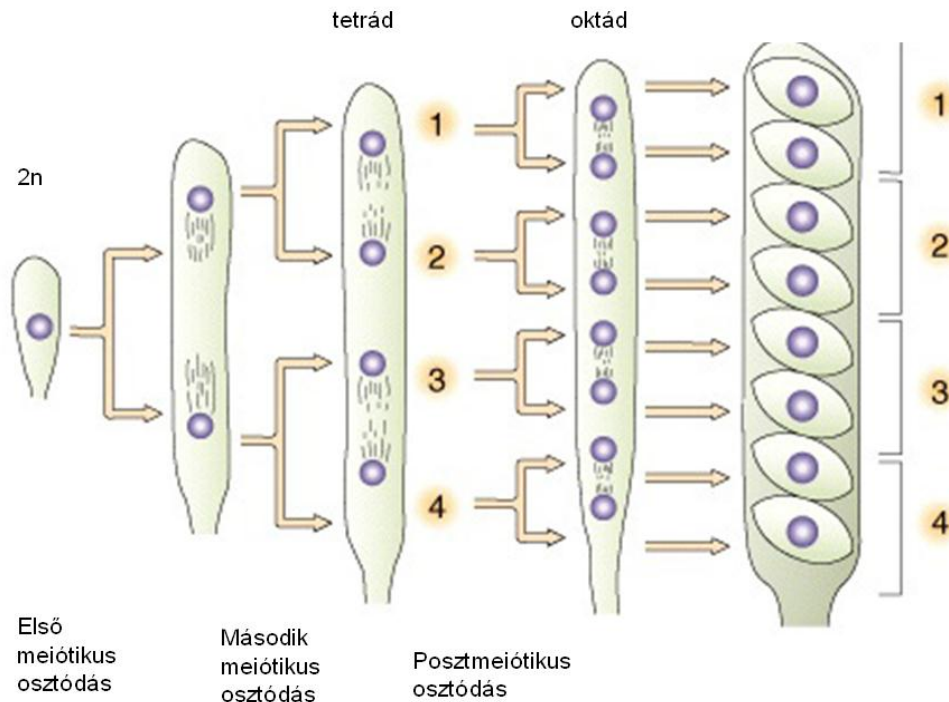
A tetrádanalízis klasszikus objektumai az *Ascomycetes*/tömlősgombák osztályába tartozó gombák. A tömlősgombák közé olyan ismert fajok is tartoznak, mint például az élesztők, penészgombák, a lisztharmat, a kucsmagomba és a szarvasgomba. Gyakran vizsgálat fajok például a *Neurospora crassa*, a *Sordaria fimicola* és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő (ez utóbbi nem rendezett tetrádokat képez). Mivel a gyakorlaton *S. fimicola* törzseket vizsgálunk, most csak e faj életciklusát mutatjuk be.

A *Sordaria fimicola* vegetatív teste a válaszfalakkal tagolt haploid micélium (1. ábra). Szaporodása esetén termőtestet (ascocarpium) képez, a spórák miután kikerülnek az aszkusból kicsíráznak és primer micéliumot (tenyésztetet) hoznak létre, melyen női ivarszervek (aszkogóniumok) és hímivarszervek (anterídiumok) képződnek. Az aszkogónium csúcsán helyezkedik el a párzó fonal (trichogin), ezen átvándorolva jutnak a hímivarsejtek az anteridiumból az aszkogóniumba. Egyesülve diploid úgynevezett magpárt (dikariont) képeznek, mely magpárok az aszkogónium által létrehozott hifákba vándorolnak. Az összeolvadást nem követi azonnal kariogámia, ezáltal magpáros sejtek, majd azokból magpáros („aszkogén”) hifák jönnek létre. A magpáros vagy dikariotikus hifákból jön létre a termőtest (ascocarpium). A termőtest kialakulása a tömlősgombákra általánosan jellemző. A kariogámia a dikariotikus hifa végsejtjében horogképzéssel megy végbe. A horogképződés mechanizmusa meggátolja két azonos ivarjellegű sejtmag összekeverülését. A zigótát tartalmazó sejt megnyúlik, sporangiummá alakul, majd először meiózissal és azt rögtön követő mitózissal – általában nyolc – spóra alakul ki. Ezt a megnyúlt sporangiumot nevezzük tömlőnek vagy aszkusznak, a benne kifejlődött spórákat pedig aszkospóráknak.

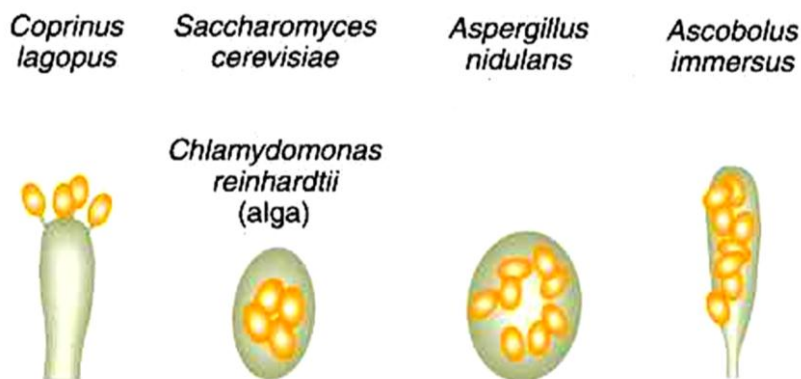


21. ábra. A *Sordaria fimicola* szexuális szaporodási ciklusa A *Sordaria fimicola* életciklusa során az askospórákból, hifák keletkeznek, melyeken a szexuális szaporodás során , kialakulnak a kép közepén látható termőtestek (peritéciumok), az askospórákat tartalmazó aszkuszokkal. [alternatív szöveg: a *sordaria fimicola* szexuális szaporodási ciklusa]

Sordaria nemzetségben és néhány más fajnál a spórák kialakulása szigorúan lineáris elrendeződésben történik az aszkuszban (2. ábra). Az ilyen lineáris elrendezésű tetrádokat, oktádokat rendezett tetrádoknak, oktádoknak nevezzük, a spórákat nem lineáris rendben tartalmazó tetrádokat nem rendezetlen tetrádoknak nevezzük. Nem rendezett tetrádokat alakít ki például az élesztő (3. ábra).



22. ábra A rendezett oktád kialakulása. A diploid ($2n$) zigótából a meiózis során 4 (valójában 8) haploid (n) sejt keletkezik. A sejtmagokat lila gömbök jelölik. A második meiótikus osztódás után a tetrádból egy meiózissal alakul ki az oktád. A sejtek érése után kialakul a nyolc askospórát tartalmazó askusz. A végtermékben (askusz) a keletkezett haploid sejtek rendezetten helyezkednek el, pozíciójuk és fenotípusuk világosan mutatja a meiózis során fellépő homológ rekombinációs eseményeket vagy azok hiányát. [Alternatív szöveg: A rendezett oktádok kialakulása]



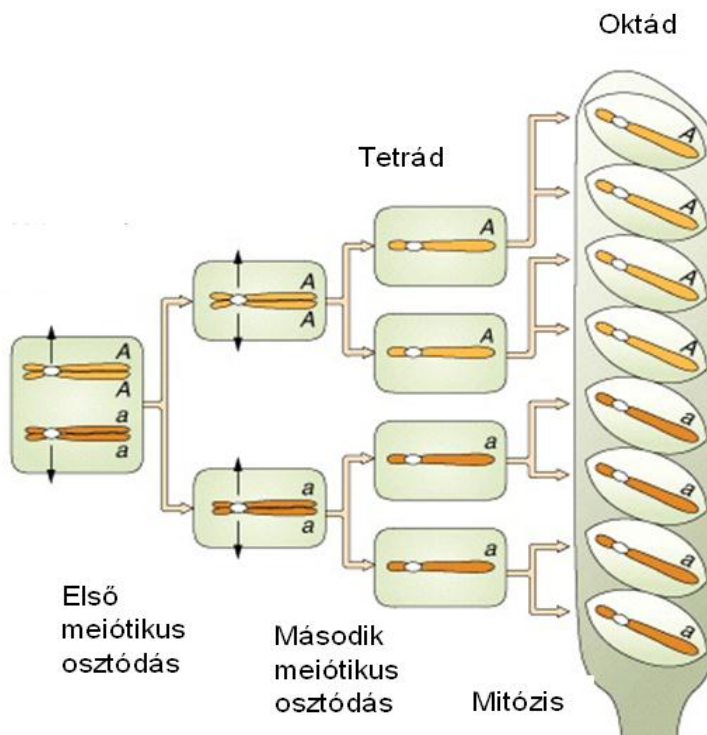
23. ábra Nem rendezett tetrádok, oktádok. A nem rendezett tetrádokat, oktádokat kialakító fajokban (pl.: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*) a tetrádok helyzete nem kötött, így azok helyzete nem hordoz információt. Ezek a rendszerek nem alkalmasak a meiótikus események (homológ rekombináció folyamata) pontos követésére. [Alternatív szöveg: nem rendezett tetrádok, oktádok]

○ Térképezés a tetrádelemzés során

A tetrádeanalízis során vizsgálható két gén távolsága és egyedülálló módon (igaz csak a rendezett tetrádok esetében, lásd később) egyetlen gén és centromeronjának távolsága is.

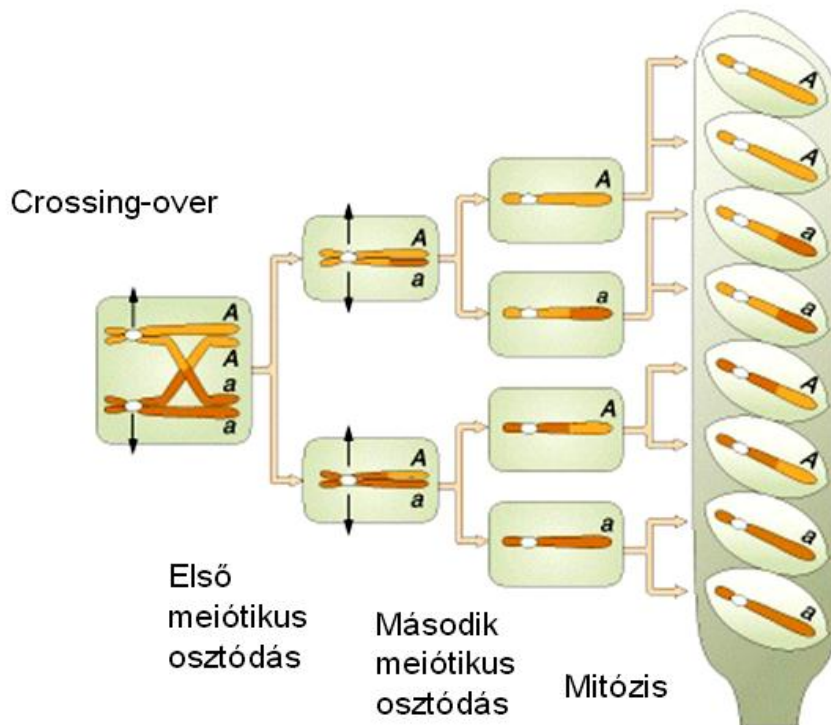
▪ Monohibrid (egy génés) keresztezés elemzése

A következőkben kövessük nyomon egy kiválasztott gén (A) két alléljának (A , a) sorsát a meiózis során. (Természetesen az Aa genotípusú zigóta az $A \times a$ keresztezés eredményeként jön létre.) Ha a meiózis során nem történik *crossing over* a vizsgált gén és centromeronja között, a gén két allélja már az első meiotikus osztódás során külön sejtekbe kerül, ezt nevezik **első osztódásos szegregációnak (MI)** (4. ábra). Ezért az oktád első négy sejtje az egyik, második négy sejtje a másik allélt tartalmazza, a spórák mintázata az aszkuszban 4:4 (első osztódásos szegregációs mintázat, MI).



24. ábra **Első osztódásos szegregáció a tömlősgomba meiózisa során.** Első osztódásos szegregációról akkor beszélünk, amikor nem történik a meiózis során átkereszteződés (*crossing over*) a vizsgált gén (A) és centromeronja között. Az első meiótikus osztódás után a két allél (A és a) elválnak egymástól, különböző utódsejtekbe kerülnek. Az érett aszkuszban a spórák mintázat 4:4. [Alternatív szöveg: első osztódásos szegregáció]

Abban az esetben, ha *crossing over* történik a gén és centromeronja között, a két allél csak a második meiotikus osztódást követően kerül különböző sejtekbe, ezt nevezik **második osztódásos szegregációnak (MII)** (5. ábra). A spórák mintázata ebben az esetben többféle lehet attól függően, hogy mely kromatidák vettek részt a *crossing over*-ben. Kialakulhat kétféle 2:2:2:2 és kétféle 2:4:2 mintázat (rím), ezeket nevezzük második osztódásos szegregációs mintázatoknak (MII).



25. ábra Második osztódásos szegregáció. Amikor a heterozigóta zigóta miózisa során *crossing over* történik a vizsgált gén (A) és centromeronja között második osztódásos szegregációról beszélünk. A két allél (A és a) az első meiotikus osztódás után még nem válik szét, a sejtekben mindkét allél megtalálható. Az allélek a második meiotikus osztódás során válnak szét. Az érett aszkuszban a spórák mintázata 2:2:2:2 lesz. [Alternatív szöveg: második osztódásos szegregáció]

Megfordítva a leírtakat, ha 4:4-es elrendeződésben látjuk a spórákat, tudjuk, hogy nem történt *crossing over* a vizsgált gén és centromeronja között az adott tetrád kialakulása során, ha eltérő mintázatot kapunk biztosak lehetünk benne, hogy történt átkereszteződés a meiózis során. Ez a tény teszi lehetővé számunkra egy gén és centromeronja közti távolság kiszámítását, annak ellenére, hogy egyetlen gén vizsgálatakor nem tudjuk egy spóráról megállapítani, hogy rekombináns vagy sem, de az aszkuszokról megállapítható, hogy *crossing over* történt-e kialakulásakor.

Hogyan számoljunk hát? Azt tudjuk, hogy a térképtávolság, rekombinációs gyakoriság meghatározásához az alábbi képletet használjuk.

$R = \frac{\text{rekombináns utódok}}{\text{összes utód}}$, (emlékeztetőül: a térképtávolság nem a rekombinánsok, hanem a *crossing over*ek számával egyenesen arányos). Azon aszkuszokban, melyek MII mintázatot mutattak *crossing over* történt a meiózis során. Ezen aszkuszokban az utódok felében található rekombináns kromoszóma. Tehát az MII mintázatú aszkuszok számát megszorozzuk nyolccal (minden aszkuszban 8 spóra található!), és osztjuk kettővel (a 8 spóra felében van rekombináns kromoszóma) vagyis:

$$\frac{8 \text{ MII}}{2}$$

Az így kapott összeget osztjuk az összes aszkusz számának nyolcszorosával (8 spóra található aszkuszonként). Matematikailag rendezve az eddigieket kapjuk a következő képletet:

$$R = \frac{\text{MII}}{2 \times \text{összes aszkusz}} \times 100$$

▪ Dihibrid (kétgénes) keresztezés elemzése

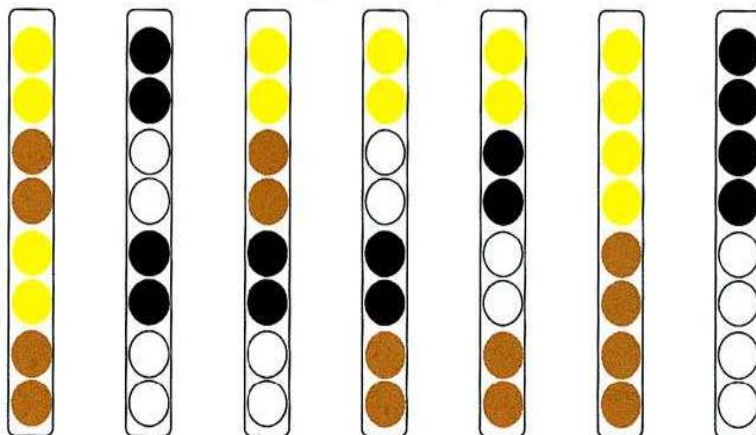
Dihibrid keresztezés végzésekor meghatározható a két gén kapcsoltsági viszonya, ha kapcsoltak távolságuk, illetve mindkét gén centromerontól mért távolsága. Vagyis kapcsolt gének esetén eldönthető, hogy a kromoszóma azonos karján vagy különböző karokon találhatóak-e a vizsgált lokuszok.

Kétgénes térképezés esetében a monohibrid keresztezéskor megfigyeltnél több eltérő mintázat alakulhat ki. A lehetséges mintázatokat három csoportba sorolhatjuk (6. ábra):

Parentális ditípus (PD): csak a szülőivel megegyező (szülői típusú) feno/genotípusú spórát tartalmaz.

Nem parentális ditípus (NPD): csak a szülőitől eltérő kombinációjú (rekombináns) spórát tartalmaz.

Tetratípus (T): mind a négyféle spórát tartalmazza.

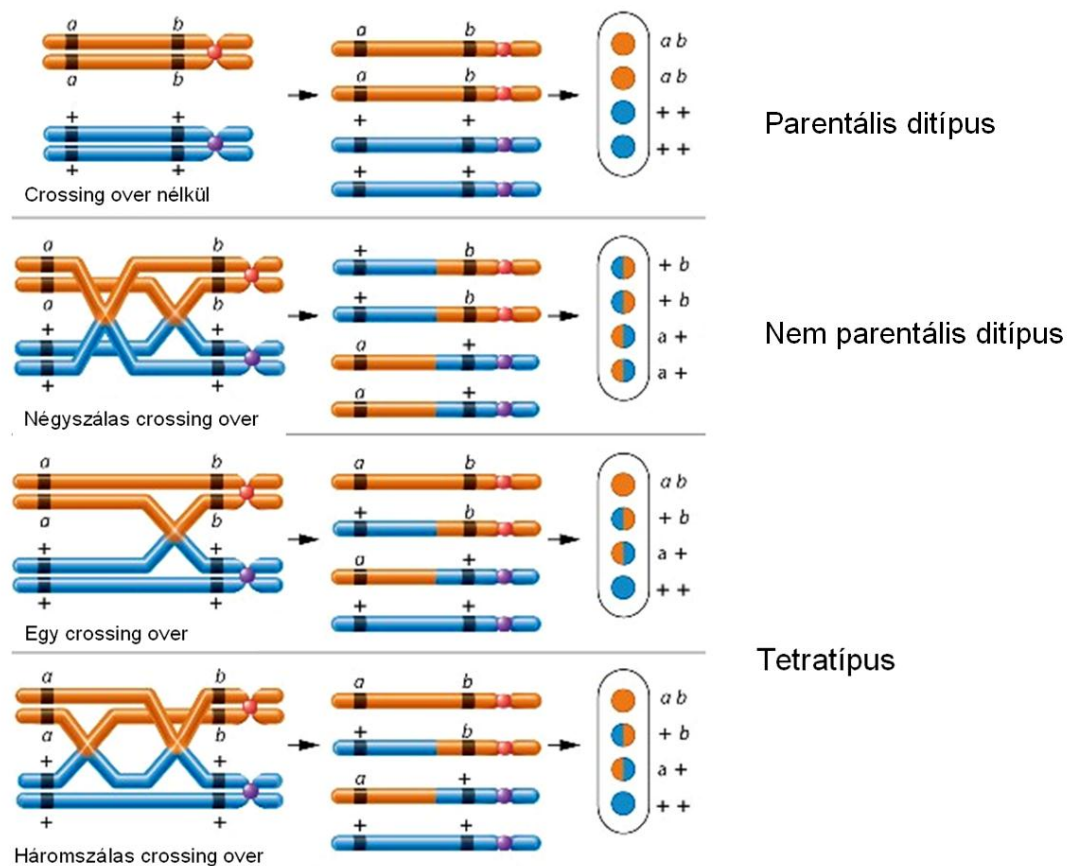


26. ábra Aszkusz szín fenotípusok. Aszkusztípusok dihibrid keresztezés után sárga és barna

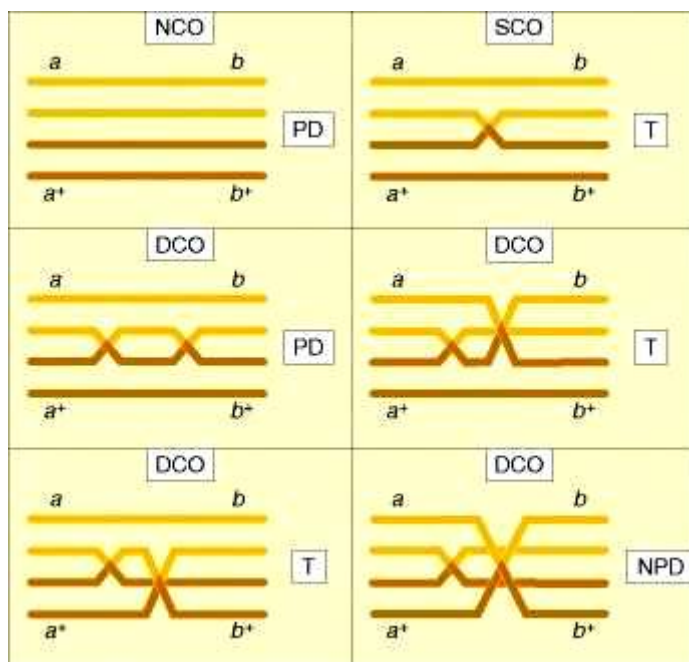
spórájú törzsek keresztezése után kialakuló aszkusztípusok sorrendben: PD, NPD, T, T, T, PD, NPD. [Alternatív szöveg: különböző aszkusztípusok]

- **Kapcsolt gének**

Kapcsolt gének esetén, ha a meiózis során nem történik *crossing over*, a vizsgált két gén között PD aszkuszokat kapunk. Ha egy átkereszteződés történik a két gén között mindig T aszkuszok alakulnak ki (7. és 8. ábrák). Ha a gének között két *crossing over* történik, attól függően, hogy mely kromatidák vettek részt az átkereszteződésekben, kaphatunk PD, NPD és T aszkuszokat is. Belátható, hogy ha a két átkereszteződés azonos két kromatida között játszódik le, visszakapjuk a szülői elrendezést, tehát az aszkusz parentális dítípusú lesz. A három kromatida között végmenő két *crossing over* T, négy kromatida átkereszteződés esetén NPD aszkusz alakul ki.



27. ábra Dihibrid keresztezés, kapcsolt gének esetén (a). Két kapcsolt gén (a, b) keresztezése során három fő aszkusztípus alakulhat ki: parentális, nem parentális dítípus és tetratípus. Ha a meiózis során nem történik *crossing over* a két vizsgált gén között PD, ha egy *crossing over* történik TT, ha két *crossing over* történik attól függően, hogy mely szálak vesznek részt az átkereszteződésekben mindhárom aszkusztípus kialakulhat. Az ábrán a két *crossing over* során kialakuló aszkusztípusokból az NPD és a TT látható. [Alternatív szöveg: dihibrid keresztezés, kapcsolt gének esetén]



28. ábra Dihibrid keresztezés, kapcsolt gének esetén (b). A 7. ábrához hasonlóan itt is két kapcsolt gén (a és b) keresztezését ábrázoltuk. Látható, hogy két crossing over (DCO) háromféle aszkusztípust hozhat létre: ha két kromatida vesz részt az átkereszteződésekben PD, ha három TT, ha négy NPD aszkusz alakul ki. (NCO: nem történt crossing over, SCO: egyetlen crossing over történt, DCO: két crossing over történt a vizsgált gének között a meiózis során). [Alternatív szöveg: dihibrid keresztezés kapcsolt gének esetén]

Ha feltételezzük, hogy minden kromatida egyforma valószínűséggel vesz részt a *crossing over*ekben és felvázoljuk, hogy mely kromatidák átkereszteződése milyen típusú aszkuszhoz vezet (1. táblázat), beláthatjuk, hogy a kettős *crossing over*rel kialakult aszkuszok aránya 1PD:2T:1NPD.

1. táblázat. Két *crossing over* esetén kialakuló aszkusztípusok.

	1 – 3	1 – 4	2 – 3	2 – 4
1 – 3	PD	T	T	NPD
1 – 4	T	PD	NPD	T
2 – 3	T	NPD	PD	T
2 – 4	NPD	T	T	PD

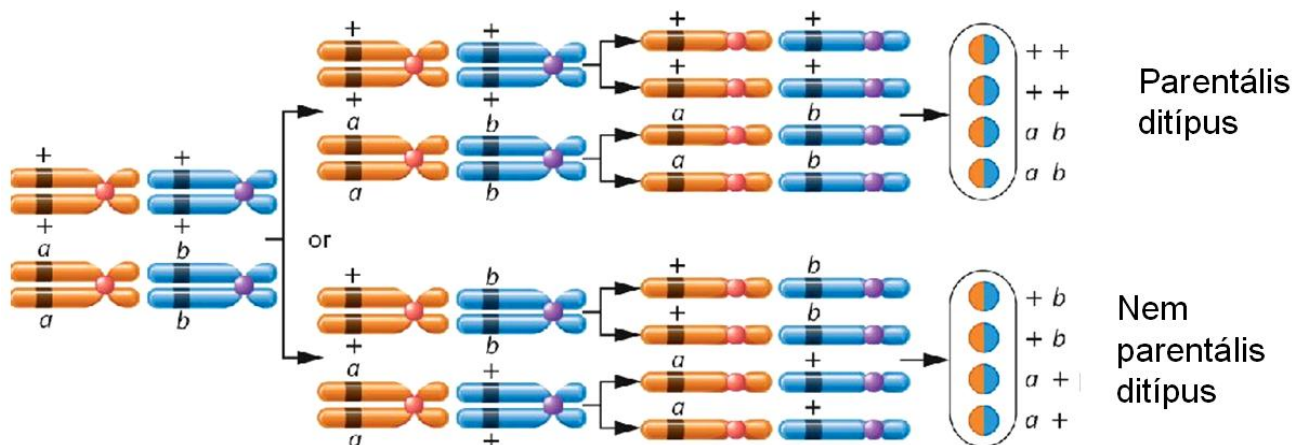
A különböző típusú aszkuszok számának ismeretében meghatározhatjuk két gén távolságát. A monohibrid keresztezéshez hasonlóan most is aszkuszokat számlálunk meg, nem pedig egyes spórákat. Láttuk, hogy PD és T aszkuszt kétféleképpen is kaphatunk (az eltérő módon kialakuló azonos típusú aszkuszokat nem tudjuk megkülönböztetni). NPD aszkusz azonban

csak akkor alakul ki, ha két *crossing over* történt a gének között. Az egy átkereszteződés után kialakuló askuszkok számát megkaphatjuk úgy, hogy a T askuszkok számából levonjuk a NPD askuszkok számának kétszeresét (ennyi T askuszk keletkezett kettős *crossing over*rel) ez tehát $T - 2NPD$. A két átkereszteződéssel keletkezett askuszkok számát a fenti táblázat alapján, úgy kaphatjuk meg, hogy a NPD askuszkok számát szorozzuk négygel ($4NPD$). $4NPD$ számú askuszkban összesen $8NPD$ számú *crossing over* történt. Az összes *crossing over* száma tehát $T - 2NPD + 8NPD = T + 6NPD$. A rekombináció gyakorisága tehát az alábbi képlettel számolható (a monohibrid keresztezésnél levezetett gondolatmenet alapján osztunk az összes askuszk számának kétszeresével):

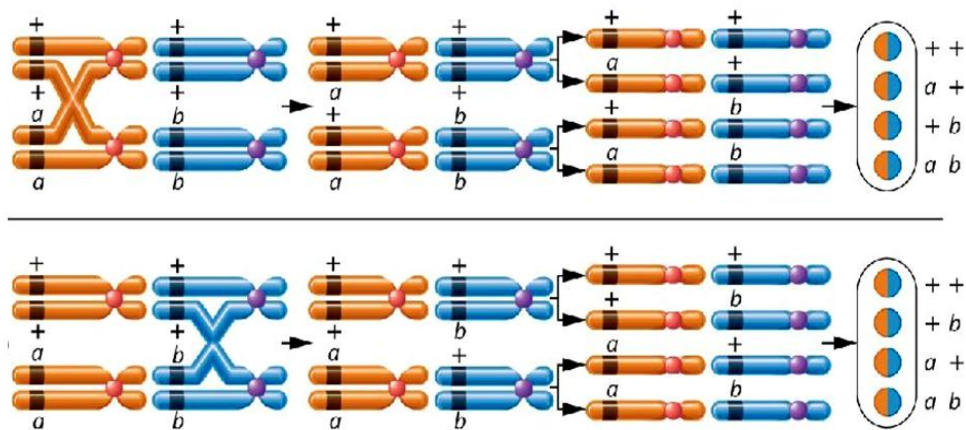
$$R = \frac{T + 6NPD}{2 \times \text{összes askuszk száma}} \times 100$$

-
- **Független gének**

Független gének esetén a szabad kombinálódás miatt *crossing over* nélkül egyenlő arányban kapjuk a PD és NPD askuszkokat (9. ábra). Egy átkereszteződés esetén T (10. ábra), kettő esetében PD, T NPD keletkezhet.



29. ábra Dihibrid keresztezés, független gének esetén, *crossing over* nélkül. **Ha a két vizsgált gén (*a* és *b*) különböző kromoszómákon találhatóak (függetlenek) Parentális ditípusú és nem parentális ditípusú askuszkok egyforma valószínűséggel alakulhatnak ki, amennyiben nem történik *crossing over* a meiózis során.** [Alternatív szöveg: dihibrid keresztezés független gének, *crossing over* nélkül]



Tetratípus

30. ábra Dihibrid keresztezés, független gének esetén, crossing overrel. *Ha a két vizsgált gén (a és b) függetlenek és a meiózis során egy crossing over történik (fent a gén és centromeronja, lent b gén és centromeronja között) tetratípusú aszkuszkok alakulnak ki.*
[Alternatív szöveg: dihibrid keresztezés, független gének, crossing overrel]

Ha két génről el akarjuk dönteni, hogy kapcsoltak-e, egyszerűen a PD és NPD aszkuszkok arányát kell megvizsgálnunk: ha PD száma közelítően egyenlő NPD számával, a vizsgált gének függetlenek, ha PD jóval meghaladja NPD számát, a gének kapcsoltak, hiszen kapcsoltság esetén NPD mintázatot csak a kettős *crossing over* után kialakult aszkuszkok negyede mutat. Ha eldöntöttük, hogy a két gén kapcsolt, a korábban megadott képlettel számolhatjuk ki a távolságukat. A gének és centromeronjaik távolságát pedig a monohibrid keresztezésnél leírtak alapján állapítjuk meg.

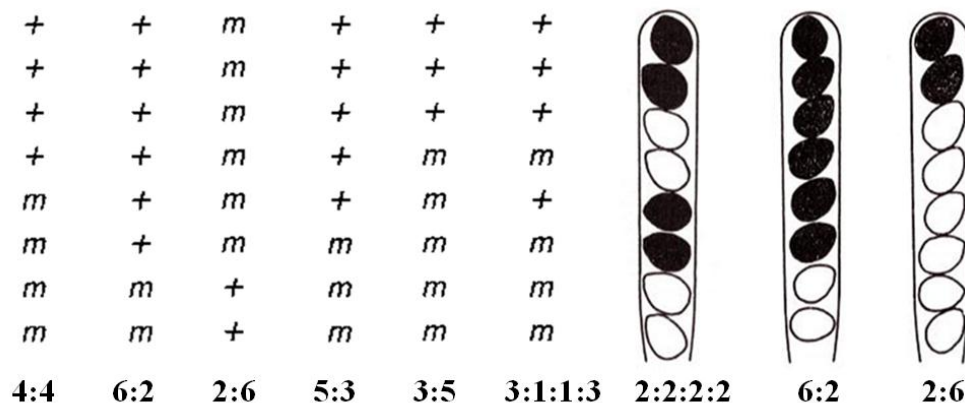
▪ Nem rendezett tetrádok

Nem rendezett tetrádok esetén, mint korábban láttuk, nincs jelentése a spórák sorrendjének, ezért nem tudunk gén és centromeron közti távolságot számolni. Dihibrid keresztezés esetén azonban a rendezett tetrádokhoz hasonlóan megállapítható a három aszkusztípus és ezek alapján eldönthető a gének kapcsoltsága, és azonos képlettel számolható a gének távolsága is.

○ Génkonverzió

Az eddig megismert mintázatokon kívül kis százalékban megjelennek olyan aszkuszkok is amelyek mintája meglepő: 3:5, 6:2 arányban tartalmazzák a két allélt, illetve aberráns 4:4 mintázatúak (3:1:1:3), ahol „csak” a spórapárok tagjai térnek el egymástól (11. ábra). Az

egyenlőtlen spórapár tökéletlenül párosodó DNS-szekvenciát jelez (*mismatch*), amelyben legalább egy bázispár inkorrekt: pl. AC, TG, AG, TC, stb.



31. ábra Génkonverziós aszkusz mintázatok. A 4:4 es mintázattól eltérő aszkusz mintázatok magyarázata a génkonverzió jelensége. A 6:2, 2:6 és 5:3, 3:5 aszkuszok esetén nem azonos arányban jelenik meg a két allél (m és +), vagyis a meiózis során az egyik allél átalakult a másikká. Az aberráns 4:4, vagyis 3:1:1:3 mintázatú aszkusz esetében pedig az eltérő fenotípusú spórapárok mutatják a génkonverziót. [Alternatív szöveg: génkonverziós aszkusz mintázatok]

Az ilyen úgynevezett **heteroduplex** DNS-ek javítását általában a *mismatch* (nem megfelelő bázisok párosodása a DNS két antiparallel lánc között) *repair* (javítás) rendszer javítja. A tetrádban a *mismatch* kijavítása értelem szerűen az egyik vagy másik szál (javított) genetikai tartalmának elvesztéséhez vezet, ill. az ellentétes szál (javító) genetikai tartalmának megduplázódásához. A javított DNS kettős spirál replikációja azonos genetikai tartalmú utód kettős spirálokhoz vezet, amelyet mint spórapárt észlelünk az aszkuszban - azonos genotípussal.

A fenti megfontolások után az aberráns tetrádokat jól értelmezhetjük: az ilyen tetrádban heteroduplex kromatidáknak kellett keletkezni a meiózis első osztódása (profázis) során, s a *mismatch* javítása vezet az allélok eltűnéséhez, illetve fölös számú megjelenéséhez. Ezt a jelenséget génkonverciónak (allélek egyirányú – nem reciprok – kicserélődése; az egyik allél a maga képére alakítja a másik allélt) nevezzük. A génkonverzió jelensége (amelyet közvetlenül tudunk detektálni a tetrádok elemzésével) sérti Mendel szegregációs alapelvét. Ez az alapelv azt mondja ki, hogy a meiózis során keletkezett 4 haploid sejtben (gaméta) a gének fele anyai, a másik fele apai eredetű lesz (az allélek függetlenül kombinálódnak, tehát az egyik az egyik utódsejtbe, a másik a másik utódsejtbe szegregálódik). A kérdés akkor válik jelentőssé, ha arra gondolunk, mennyire univerzális jelenség a génkonverzió. Csupán néhány gombában detektálható, vagy a többi élőlényben is inherensen megfigyelhető a homológ rekombináció során?

A 6 : 2, illetve 2:6 tetrádokban két *mismatch* kromatida keletkezett, amelyeket a javító enzimek azonos módon javítottak ki. Az 5 : 3, illetve 3 : 5 esetekben ismét két *mismatch* kromatida keletkezett, de ezek közül csak az egyiket javította ki a javító rendszer.

Az egyenlőtlen spórapár jelenségét posztmeiotikus szegregálásnak nevezzük, mert a meiotikus osztódást követő replikáció, illetve mitózis következtében válik genetikailag önállóvá az eredeti *mismatch* két tagja. Az aberráns

4:4 esetekben az eddigiek alapján belátható, hogy a két *mismatch* kromatida egyik tagjában sem történt javítás: az eredmény két egyenlőtlen spórapár az aszkusz két másik, azonos genotípusú spórapárja mellett.

Javításkor a hibajavító enzimek elméletileg bármely szálat használhatják templátul, ám elképzelhető, hogy valamelyik allélt nagyobb valószínűséggel (preferáltan) javítják, mint a másik allélt (*biased gene conversion*). Fontos felhívni a figyelmet, hogy a hibajavítás irányától függően egyes allélek előfordulása kisebb, másoké nagyobb lehet az utódpopulációban, mint a szülőiben (3:5, 2:6 arányok).

A génkonverziók megfigyelése a tetradanalízis során fontos felfedezés volt, amely elősegítette a homológ rekombináció molekuláris modelljeinek kidolgozását.

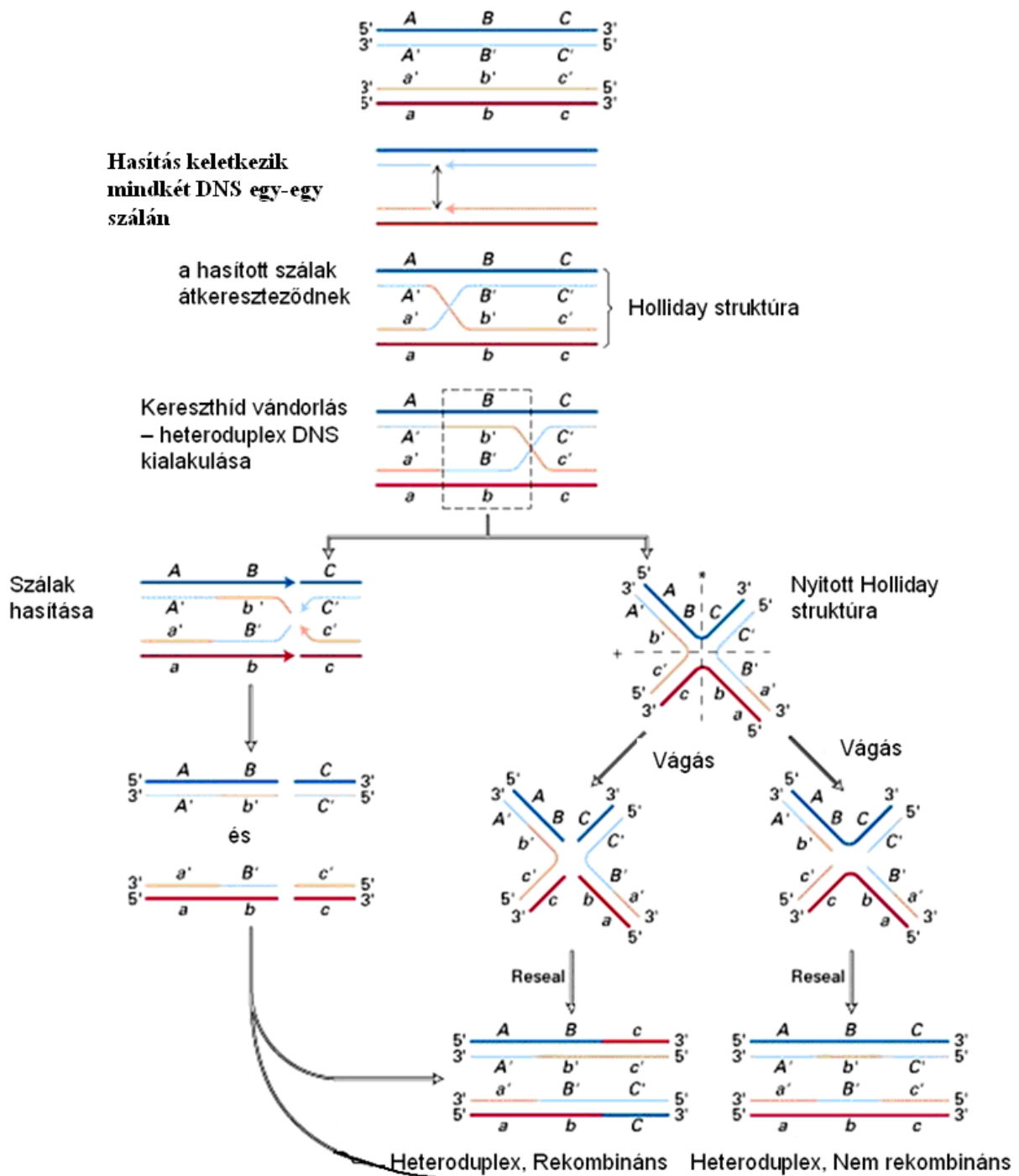
Homológ rekombináció molekuláris modelljei

A homológ rekombináció molekuláris szintű magyarázatára több elmélet született. A továbbiakban két modellt ismertetünk ezek közül: a Holliday modellt, illetve a ma leginkább elfogadott DSBR (*double strand break repair*), vagy magyarul kettős szálú DNS törés javító modellt. A két modellnek több közös pontja van: mindkettő feltétele hosszabb homológ szakaszok jelenléte, mindkettőben szerepet játszik a DNS szálak törése (igaz jelentősen eltérő módon) és újraegyesülése (szálcsere), mindkettőben létrejön az úgynevezett kereszthíd (Holliday) struktúra, amely képes elmozdulni a (vándorlás; *branch migration*), illetve amelynek eltérő feloldási lehetőségei vannak.

○ *A Holliday modell*

A Holliday modell ismertetésekor a rekombinációban részt vevő két DNS dupla hélixet általában úgy ábrázolják, hogy két azonos polaritású szál kerül egymás mellé (12. ábra). Az ábrán tehát csak négy DNS szálat tüntettünk fel, a kromoszóma másik két kromatidáját nem jelöltük. A folyamat első lépéseként mindkét DNS kettős spirál egy-egy szála azonos helyen (azonos nukleotidok között) elhasad. A DNS szálak ezután átkereszteződnek (*strand exchange*), majd kovalensen kötődnek (ligálódnak). Így alakul ki a kereszthíd, vagy más néven a Holliday struktúra. Ez a folyamat nem igényel DNS szintézist. A kialakult kereszthíd bármely irányba elmozdulhat, ezt nevezik kereszthíd vándorlásnak (*branch migration*). Ez a vándorlás jelenti a modell lényegét. Megfigyelték ugyanis, hogy **a rekombináció sosem pontszerű esemény, hanem mindig kiterjedése van**, azaz a DNS molekula egy szakaszát foglalja magába. Az elmozdulás során (ha a két kromoszóma között allélikus/szekvenciális különbség volt) az adott szakaszon heteroduplex DNS alakul ki (a DNS molekula egyik szála az egyik homológból, a másik szála a másik homológból származik). Érdemes megjegyezni, hogy **ha a két allél különbözött, ott heteroduplexben *mismatch*ek alakulnak ki**. A heteroduplex DNS a hasítás helyétől a kereszthídig tart. A két szabad kromatida visszanyeréséhez a DNS-t el kell hasítani, ezt a Holliday szerkezet feloldásának (*resolution*) nevezik. A feloldás folyamatának megértését nagyban segítik a szerkezet térbeli ábrázolása, vagyis a DNS kitekerése és 180°-os elforgatása. Mint látható, a Holliday struktúra kétféle (egymásra merőleges) hasítással oldható fel, ezek előfordulásának valószínűsége azonos/ezek egyforma valószínűséggel következnek be – a szálekvalencia elvének megfelelően. Mint

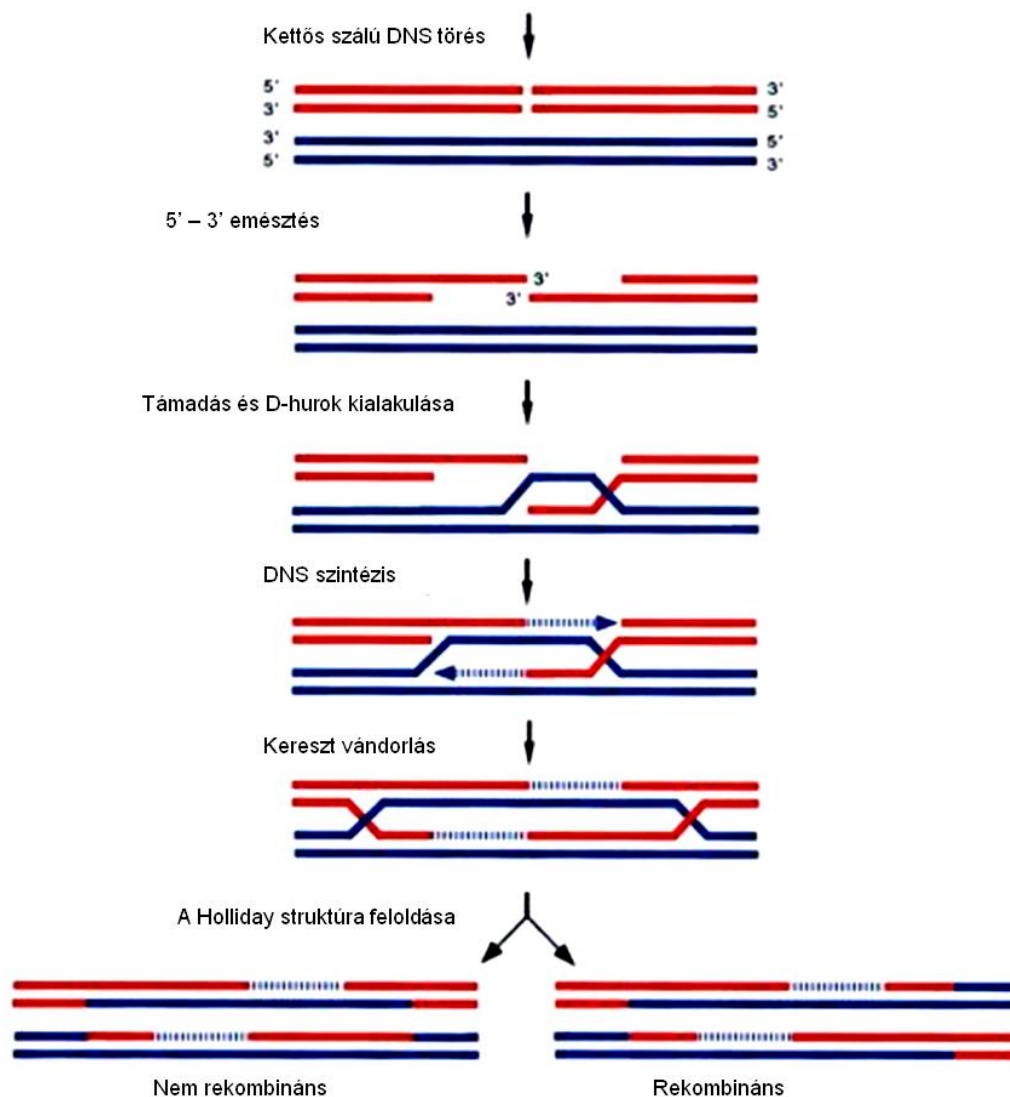
látható, az egyik hasítási irány eredményeként rekombináns kromoszómák (*crossing over* termék; ezt nevezik *splice*-nak is), a másik hasítás során nem jön létre rekombináns kromoszómák (nem keletkezik *crossing over* termék; ún. *patch* keletkezik). Mindkét termék/kromoszóma tartalmaz egy-egy génkonverziós régiót, amely hossza a szálvándorlás hosszától (heteroduplex) függ.



32. ábra A Holliday modell. A Holliday modell legfontosabb elemei az egyszálú DNS hasítás, a Holliday struktúra kialakulása, a kereszthíd vándorlása, és a szálak különböző hasítási módjai. A Holliday struktúra hasítása után rekombináns és nem rekombináns terméket is kaphatunk, de mindkettő tartalmaz heteroduplex régiót. [Alternatív szöveg: Holliday modell]

○ **A DSBR modell**

A DSBR (kettős szálú törést javító modell; Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35, 1983) már első lépésében lényeges eltérést mutat a Holliday modelltől: **az egyik DNS kettős spirál (homológ) mindkét szála eltörik egy enzim (Spo11) segítségével, tehát aktív módon, míg a másik DNS molekula (homológ) végig intakt marad** (13. ábra). Valójában az intakt szál biztosítja az eltört DNS molekula javításához szükséges intakt genetikai információt. Ezután a DNS 5' végei emésztődnek, így 3' túlnyúló végek keletkeznek, melyet támadó szálnak is neveznek. Az egyik 3' egyszálú DNS szál és a homológ kromoszóma két szála háromszálú DNS struktúrát hoz létre (D-hurok). Ezt követően egy újabb lényegi eltérés következik: a 3' végeken DNS szintézis kezdődik. A DNS szintetáz primerként a 3' a szálat használja a replikáció során, templátként a homológ kromoszóma megfelelő polaritású szálát. (Ha a törés közelében allélikus/szekvencia különbség volt a homológok között, annak információja az emésztés, majd a homológrol történő pótlás során elveszhet. Ilyenkor génkonverzió történik javítás nélkül.) A szintézist követően a megfelelő polaritású szálak közt kovalens kötés alakul ki, ennek eredményeként két Holliday szerkezet keletkezik. Mindkét Holliday szerkezet szabadon elmozdulhat a DNS mentén (kereszthíd vándorlás). Két Holliday struktúra négy módon is feloldódhat/hasítódhat. Itt is kétféle: *crossover* (rekombináns) és nem *crossover* (nem rekombináns) terméket kaphatunk, és itt is megfigyelhetünk génkonverziós (azaz heteroduplexet tartalmazó) szakaszokat.



33. ábra A DSBR modell. A DSBR modell első lépésében egyik DNS mindkét szála hasítódik. Az 5' végek emésztésével 3' egyszálú DNS szálak keletkeznek. Fontos, hogy ebben a modellben új DNS szintézis történik. Két kereszthíd alakul ki amelyek ebben a modellben is többféleképpen oldódhatnak fel. Baloldalon a nem rekombináns, jobb oldalon a rekombináns termék kialakulását ábrázoltuk. Mindkét esetben (rekombináns, nem rekombináns) génkonverziós szakaszt (egy DNS két szála eltérő színnel jelezve) tartalmaz. [Alternatív szöveg: A DSBR modell]

A homológ rekombináció folyamán tehát mindig történik génkonverzió (az eltört DNS szál „kifoltozása” a homológ információja alapján – az egyik allél a saját képére alakítja a másik allélt; nem reciprok kicserélődés). A génkonverzió a rekombináció alapvető eseménye. Vegyük észre, hogy a génkonverzió rekombináns kromoszómákat (amilyen nem volt a szülői kombinációkban) eredményez. A génkonverziót vagy követi, vagy nem követi *crossover* esemény (a határoló szekvenciák reciprok kicserélődése). A génkonverzió és a *crossing over* tehát függetlenül szabályozott folyamatok a homológ rekombináció során.

A két modellen kívül több elmélet is született (pl.: Meselson Raddig) a homológ rekombináció molekuláris lépéseiről, illetve a DSBR modellnek más útvonalai is ismertek (SDSA; *single DNA strand annealing* – egy DNS szálát másoló), de ezek ismertetésétől most eltekintünk.

○ **A homológ rekombináció enzimeji**

A homológ rekombinációt biztosító fehérjék egy részét már megismerték, jellemezték mind prokariótákban, mind eukariótákban, ezeket ismerteti a 2. táblázat.

2. táblázat. A meiotikus homológ rekombinációban résztvevő enzimek.

Funkció	Prokarióta	Eukarióta
Dupla törés	Nem ismert	Spo11
Egyszálú DNS kialakítása	RecBCD helikáz/nukleáz	MRX komplex (Rad50, 58, 60)
Támadás (invázió)	RecA	Dmc1, Rad51
Szálvándorlás	RuvAB	Nem ismert
Feloldás	RuvC	Mus81 és mások

Prokariótákban részletesen tanulmányozott a RecA és RecBCD fehérjék szerepe. A RecBCD három fehérjéből álló komplex, mely helikáz és nukleáz aktivitással is rendelkezik, a 3' túlnyúló végek kialakításáért felelős. A recBCD kettős szálú töréseket ismer fel, majd mindkét szálát degradálja, amíg egy speciális, úgynevezett chi (*crossover hotspot instigator*) szekvenciáig nem ér. A chi szekvencia után már csak a chi-t nem tartalmazó szálát emésztí, így alakul ki a 3' egyszálú DNS. A Chi szekvenciája *E. coli*-ban: GCTCGTGG. A chi jelentőségét a rekombinációs forrópontok vizsgálatakor fedezték fel, ugyanis *E. coli*-ban a rekombináció preferált helyeken kezdődik, Chi szekvenciák környezetében a rekombináció valószínűsége 10 nagyobb, mint máshol.

RecA. A RecA fehérje egyszálú DNS-hez kötődik kooperatívan (hasonlóan a SSB (Single-Stranded DNA Binding Protein) fehérjéhez). Aktív formája az akár 100 RecA fehérjét is tartalmazó nukleoprotein filamentum (vö.: legtöbb fehérje: mono-, di-, tetra-, hexamer formában aktív). A RecA filamentumban egy egyszálú és egy kétszálú DNS kötődhet, tehát itt alakul ki a háromszálú DNS szerkezet, illetve a szálcseré is.

A kereszthidak vándorlásáért a **RuvAB** komplex felelős. A RuvA a Holliday szerkezetét ismeri fel specifikusan. A RuvB helikáz aktivitással rendelkezik, és a szálvándorlást katalizálja.

RuvC nukleáz aktivitású fehérje, nevezik rezolváznak is. E fehérje is a Holliday szerkezetet ismeri fel majd hasítja, vagyis feloldja azt.

Prokariótákban a homológ rekombináció elsősorban hibajavító szereppel rendelkezik, illetve lehető teszi a sejtbe bejutó (pl. transzdukcióval, konjugációval) „idegen” DNS-ek beépülését a kromoszómális DNS-be.

Eukariótákban ismert egy DNS kettősszálú hasítását végző fehérje, amely a homológok párba állásakor aktív, ez a **Spo11**. A kettős szálú hasításhoz két fehérje szükséges, melyek egy-egy szálát vágnak el, majd a hasítás után a kovalensen kötődnek a DNS lánchoz.

Az 5' végek emésztését az **MRX** komplex végzi, az egyszálú DNS-hez a Rad51 illetve a Dmc1 fehérjék kötődhetnek. Természetesen az említett fehérjéken kívül még számos más (itt nem részletezett) fehérje vesz részt a rekombináció folyamatában.

Eukariótákban a homológ rekombináció esszenciális a meiózis alatt, a kromoszómák tökéletes párosodásához, ezen keresztül a genom integritásának fenntartásához nélkülözhetetlen. A rekombinációs fehérjék hibája gyakran csökkenti a fertilitást. A meiózis mellett a homológ rekombináció enzimek (kivéve természetesen a spo11-t) fontos szerepet játszanak a duplaszálú törések javításában (rekombinációs hibajavítás). A homológ rekombinációnak fontos szerepe van még más folyamatokban, mint például az élesztők párosodási típus váltása.

A gyakorlat menete

○ **Felhasznált anyagok, eszközök:**

Sordaria fimicola törzsek: 2918 (vad), 2800 (tan) , 2807 (yellow)

Sordaria táptalajok (Ø 5,5 cm-es Petri csésze)

alkohol

lándzsatű

tárgylemez

fedőlemez

cseppentő

○ **A keresztezés**

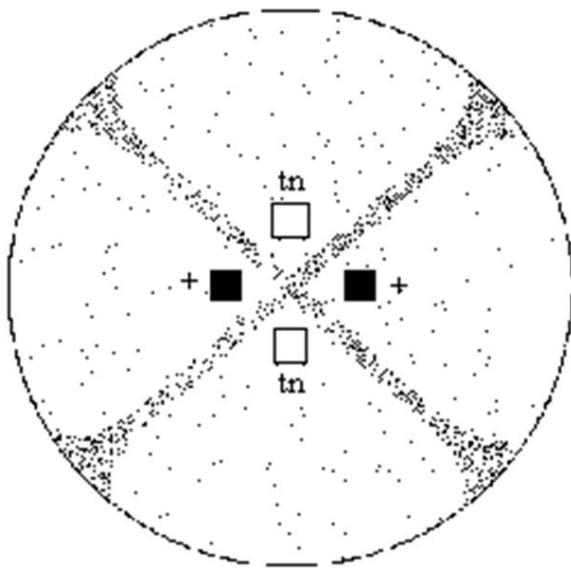
A gyakorlat során a haploid *Sordaria fimicola* törzzsel foglalkozunk. A *Sordaria fimicola* homotallikus, egy telepen belül helyezkednek el a hím és női ivarú szaporító képletek, így fenntartása egyszerű.

Három törzs felhasználásával végezzük a kísérleteket:

- 2918 jelű törzs: vad típusú, fekete spórájú
- 2800 jelű törzs: *tan* génben mutáns, barna spórájú
- 2807 jelű törzs: *yellow* génben mutáns, sárga spórájú

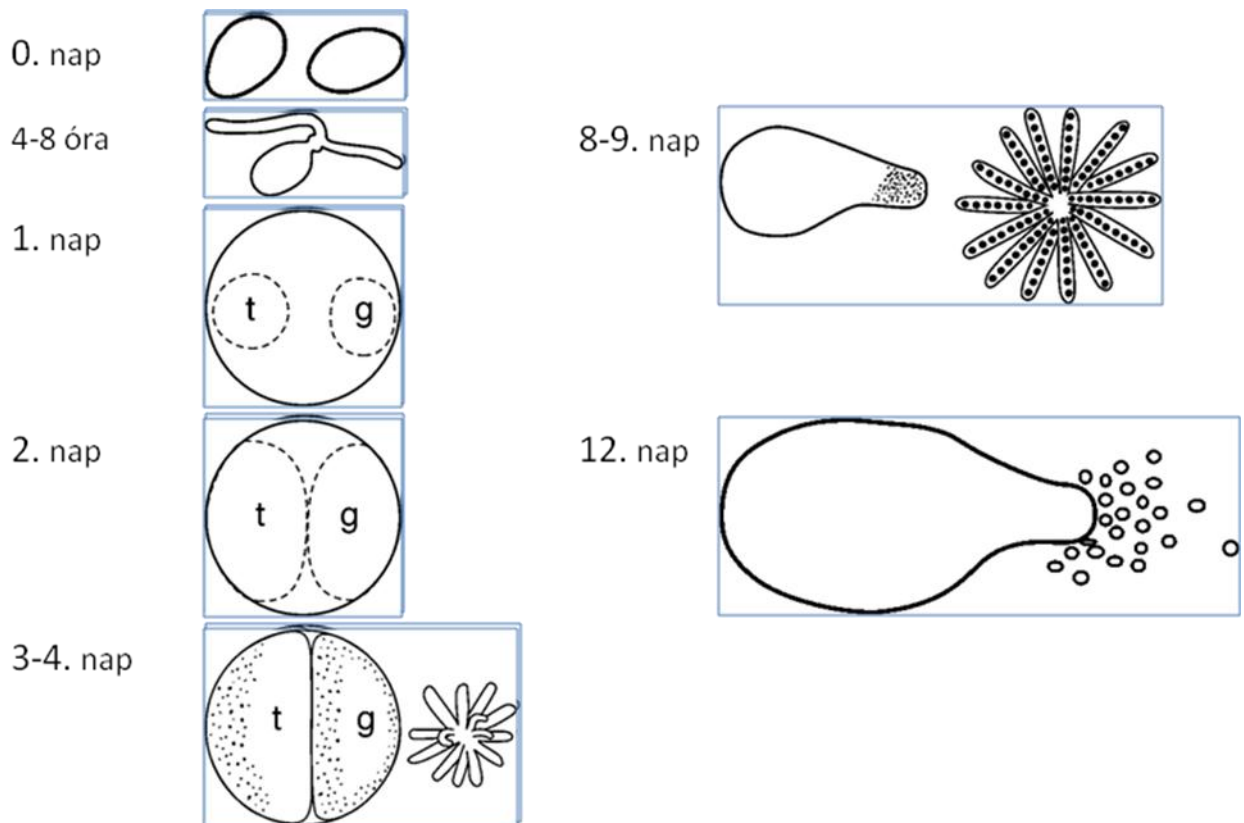
A gyakorlaton a három törzs felhasználásával vizsgálható mono- és dihibrid keresztezés is. Monohibrid kísérlet esetén a vad típust keresztezzük valamely mutánssal (2918 x 2800 vagy 2918 x 2807), míg dihibrid kísérletek esetén az egyszeres mutánsokat keresztezzük egymással (2800 x 2807).

A gyakorlat során párokban dolgozunk. Magát a keresztezést *Sordaria* táptalajon végezzük, négy részre osztva a táptalajt leoltjuk fogpiszkáló vagy lándzsatű segítségével törzseket (14. ábra). Átlósan oltjuk az azonos törzseket (14. ábra), így az érintkezési felületeken (az ábrán szürke pontozott rész) összenövések lehetségesek. Itt mehet végbe a tényleges kereszteződés.



34. ábra *A Sordaria fimicola* leoltása keresztezéshez. *A Sordaria fimicola-t* leolthatjuk kis agarkockák kivágásával és friss táptalajra helyezésével. Leolthatunk két (jobb oldalt) illetve négy kockát (bal oldalon) is egyetlen lemezre. A különböző genotípusú törzseket (tn, +) egymás mellé oltva köztük kereszteződési zóna (sűrűn pöttyös) alakulhat ki. A kialakuló peritéciumokat az apró fekete pöttyök jelzik. [Alternatív szöveg: *A Sordaria fimicola* leoltása]

Ezután napfényes meleg helyen, esetleg kivilágított termosztátban növesztjük a törzseket egy héten át. A törzsek három-négy nap elteltével érik el egymás területét és nőnek össze, majd az összenövési helyeken képesek szexuális szaporodásra (génkicserélésre). További három-négy napot igényel a spórák beérése és a megfelelő mennyiségű melanin (színanyag) képzése (15. ábra).



35. ábra *A Sordaria fimicola* életciklusa. 0. nap: a spóra 4 óra elteltével hifát képez, 1. és 2. nap: telepnövekedés, 2. nap végére az átellenes telepek összeérnek. 3.-4. nap: aszkuszképzés a telepeken, 8.-9. nap: spóráképzés az aszkuszokban, 12. nap: spórák kikerülése. [*A Sordaria fimicola* életciklusa]

○ Rekombináció megfigyelése

Mindezen ismeretek tudatában az összenövési területéről érdemes lándzsatűvel mintát venni a telep felszínét megkapargatva. A mintát tárgylemezen elhelyezkedő vízcseppbe juttatjuk és fedőlemezzel fedjük le. Ezután finoman az ujjunkkal megnyomjuk a fedőlemez, hogy a peritéciumokból kijussanak a spórák. Ezt a műveletet óvatosan érdemes végezni, mert túlzott erő kifejtés hatására a felnyílnak az aszkuszok és nem határozható meg a spórák sorrendje, mely pedig elengedhetetlen a feltételezett rekombinációk vizsgálatához. A mintát mikroszkóp segítségével 40x-es nagyításon vizsgáljuk. Az aszkuszon belül a spórák mintázata bizonyítja a rekombináció tényleges kialakulását

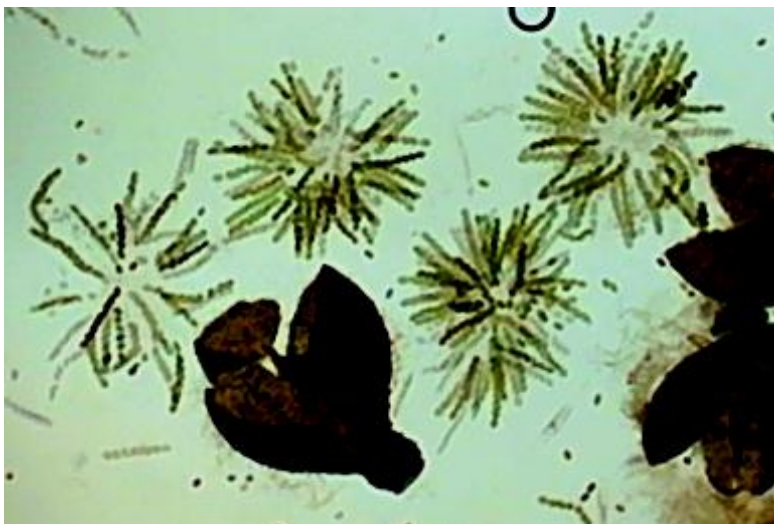
▪ A gyakorlat pontokba szedve

1. hét: Keresztezések összeállítása

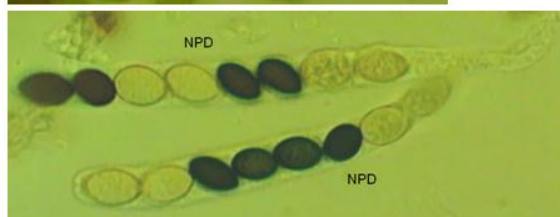
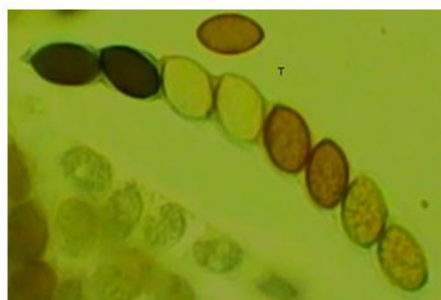
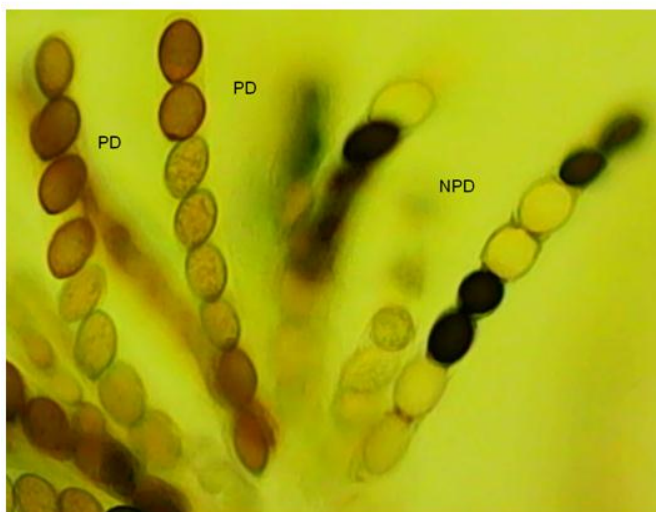
1. Páronként egy Petri csészét kiválasztanak. A Petri csésze alját megjelölik. (Páronként egy keresztezést végeznek (szabadon választott), de minden csoportban mind a három lehetséges keresztezést összeállítják.)
2. Steril fogpiszkáló vagy lándzsátű segítségével kis négyzetet vágnak ki a választott törzs micéliumait tartalmazó táptalajából.
3. Az agar kockákat új táptalajra helyezik, az ábrának megfelelő, átlós elrendezésbe.
4. Megismétlik a másik választott törzsszel.
5. A Petri csészéket a gyakorlóban növesztjük egy héten keresztül, szobahőmérsékleten, napfény mellett.

2. hét: Aszkuszok vizsgálat, rekombináció felismerése

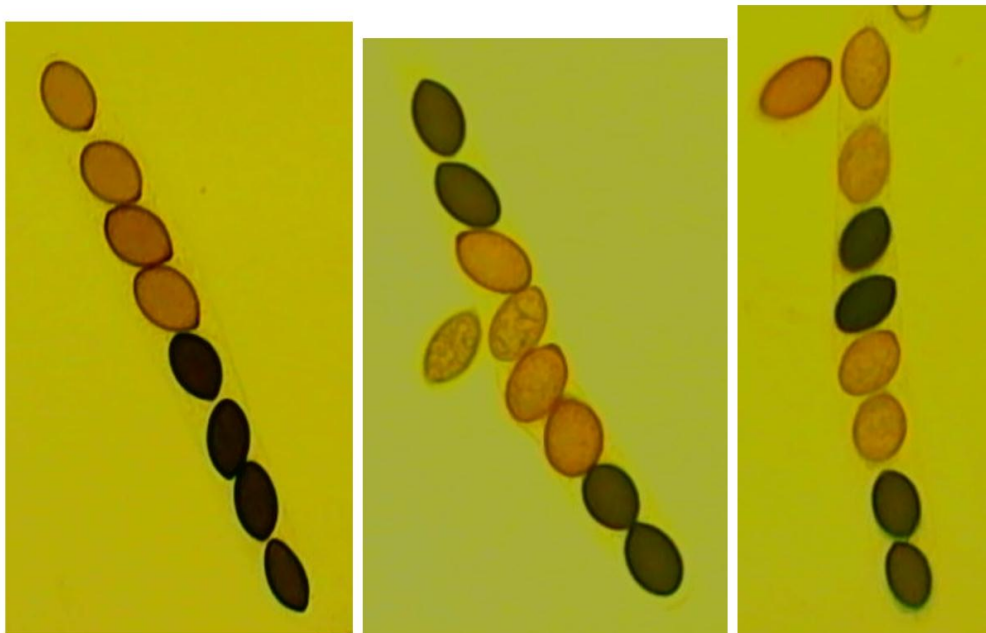
1. A keresztezéses lemezeken érett peritéciumokat keresünk (kis fekete mák szemek) a két törzs találkozási területén.
2. Tárgylemezre egy csepp vizet cseppentünk.
3. Steril fogpiszkáló vagy lándzsátű segítségével 10-12 peritéciumot helyezünk a vízcseppbe.
4. Fedőlemezrel lefedjük. A fedőlemezt ujjunkkal, vagy a citológia gyakorlaton alkalmazott módszerrel, ceruza véggel, enyhén, de határozottan megnyomjuk. A cél, hogy a peritéciumokból az aszkuszok kiszabaduljanak, de ne repedjenek fel (16. ábra).
5. A mintákat fénymikroszkóp alatt vizsgáljuk, először kis nagyítással.
6. Az aszkuszok mintázatát megfigyelve, rekombinációt (esetleg génkonverziót) keresünk (17., 18., 19 ábra).



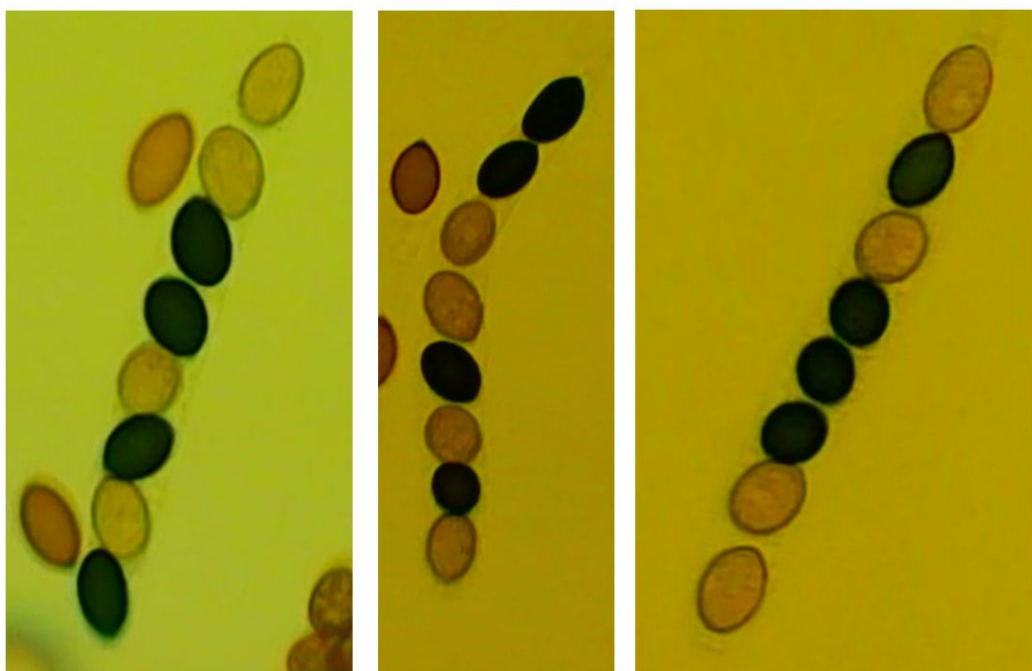
36. ábra Peritéciumok és aszkuszcsokok. Az érett peritéciumok enyhe nyomás hatására felrepednek és kiszabadulnak az aszkuszok [Alternatív szöveg: Peritéciumok és aszkuszcsokok]



37. ábra Dihibrid keresztezés aszkuszs mintázatai. A képeken sárga és barna színű spórákat termelő törzsek keresztezéséből kapott aszkuszcsokok láthatóak. Megfigyelhetők a PD (barna és sárga spórákat tartalmazó), a NPD (fehér és fekete) és a TT (mind a négy színű spórákat tartalmazó) aszkusztípusok. [Alternatív szöveg: dihibrid keresztezés aszkusz mintázatai]



18. ábra. **Monohibrid tetrád mintázatok** Vad típusú törzset mutánsal (például yellow) keresztezve a spórák színét vizsgálva a következő mintázatokat figyelhetjük meg: 4:4, 2:4:2, 2:2:2:2. [Alternatív szöveg: monohibrid tetrádok]



19. ábra. A génkonverzió kimutatása. A 2:2:2:2 tetrád mintázat helyett 1:1:1:1:2:2 (bal oldali panel), 1:1:1:1:2:2 (középen) és 1:1:1:3:2 (jobb oldali panel) mintázatok láthatók. [Alternatív szöveg: génkonverzió]

Példa feladatok

1. Egygénes keresztezés: Egy *Neurospora crassa* *a* mutáns genotípusú törzsét keresztezték vad típusú *a*⁺ törzsszel és az alábbi eredményt kapták. Milyen messze van az *a* gén a centromerontól?

1	2	3	4	5	6
a	A	A	a	A	a
a	A	A	a	A	a
a	A	a	A	a	A
a	A	a	A	a	A
A	a	a	A	A	a
A	a	a	A	A	a
A	a	A	a	a	A
A	a	A	a	a	A
37db	35db	7db	5db	6db	10db

Először megállapítjuk, mely aszkuszkok milyen mintázatúak. MI mintázatot az 1 és 2 aszkuszkok mutatnak, MII-t a 3, 4, 5 és 6.

$$R = \frac{\text{MII}}{2 \times \text{összes aszkuszk}} \times 100 = \frac{28}{2 \times 100} \times 100 = 14$$

2. Kétgénes: Két *Neurospora* törzset kereszteztünk *nic*⁺ *ad* és *nic* · *ad*⁺. Összesen 1000 darab aszkuszt vizsgáltak meg, melyek a következő mintázatokat mutatták:

1	2	3	4	5	6	7
<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺
<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺
<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>
<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>
<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>
<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> ⁺ <i>ad</i>
<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺
<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺	<i>nic</i> <i>ad</i>	<i>nic</i> <i>ad</i> ⁺

808db 1 db 90 db 5 db 90db 1 db 5 db

Először meg kell állapítani, hogy melyik aszkusz milyen típusú. Sorrendben az aszkuszkok: PD, NPD, T, T, PD, NPD, T.

A PD aszkuszkok száma tehát: $808 + 90 = 898$, az NPD aszkuszkoké $1 + 1 = 2$. Ebből megállapíthatjuk, hogy a *nic* és *ad* gének kapcsoltak. Távolságukat a korábban megismert képlet segítségével számolhatjuk ki:

$$R = \frac{T + 6NPD}{2 \times \text{összes aszkusz száma}} \times 100 = \frac{100 + 12}{2000} \times 100 = 5,6$$

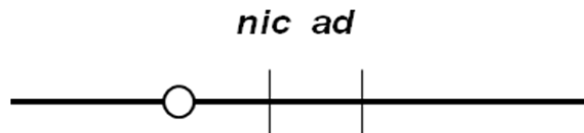
Ezután megállapíthatjuk a gének és a centromeron távolságát is. Mindkét génre külön megkeressük az MII mintázatu aszkuszkokat. A *nic* gén esetében MII mintázatot mutatnak a 4,5,6 és 7 aszkuszkok.

$$R = \frac{\text{MII}}{2 \times \text{összes aszkusz}} \times 100 = \frac{101}{2000} \times 100 = 5,05$$

Az *Ad* gén esetében MII mintázatu a 3,5,6 és 7 aszkuszkok.

$$R = \frac{\text{MII}}{2 \times \text{összes aszkusz}} \times 100 = \frac{186}{2000} \times 100 = 9,3$$

A távolságokat összevetve könnyen megállapítható, hogy a gének a kromoszóma azonos karján helyezkednek el.



3, Két különböző genotípusú élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) törzset kereszteztek egymással: $+ b c$ és $a + +$.

A következő genotípusú tetrádokat kapták, a jelzett számban

- | | |
|----------------------------|-----|
| 1, $a++$ $a++$ $+bc$ $+bc$ | 132 |
| 2, $ab+$ $ab+$ $++c$ $++c$ | 124 |
| 3, $a++$ $a+c$ $+b+$ $+bc$ | 64 |
| 4 $ab+$ abc $+++$ $++c$ | 80 |

Ebben az esetben nem rendezett tetrádokat vizsgálunk, tehát a gén és a centromeron távolságát nem tudjuk megadni. A gének kapcsoltságát azonban ugyanúgy vizsgálhatjuk, mint a rendezett tetrádok esetében. Minden aszkuszt megvizsgálunk génpárokként. *a-b* gének

esetében az aszkuszok: PD, NPD, PD és NPD típusúak. E két gén tehát nem kapcsolt, hiszen a PD és NPD aszkuszok száma közel azonos. A *b* és *c* esetében az aszkuszok mintázata: PD, NPD, T és T. E két gén sem kapcsolt, a $PD \approx NPD$. Az *A* és *c* géneket vizsgálva az aszkuszok: PD, PD, T és T mintázatúak. Ez esetben nem látunk NPD aszkuszt, az *a* és *c* gének kapcsoltak.

$$R = \frac{T + 6NPD}{2 \times \text{összes aszkusz száma}} \times 100 = \frac{64 + 80}{800} \times 100 = 18$$

Tartalomjegyzék

Tetrádelemzés.....	202
A gyakorlat célja.....	202
A rekombináció	202
Tetrádelemzés.....	202
A spórasorrend jelentése.....	203
A tömlősgombák életsiklusa.....	203
Térképezés a tetrádelemzés során.....	207
Monohibrid (egy génes) keresztezés elemzése	207
Dihibrid (kétféles) keresztezés elemzése	209
Nem rendezett tetrádok.....	213
Génkonverzió.....	213
Homológ rekombináció molekuláris modelljei.....	215
A Holliday modell.....	215
A DSBR modell	217
A homológ rekombináció enzimek.....	219
A gyakorlat menete.....	221
Felhasznált anyagok, eszközök.....	221
A keresztezés	221
Rekombináció megfigyelése	223
A gyakorlat pontokba szedve	224
Példa feladatok.....	227
Tartalomjegyzék:	230