

Dr. Sinka Rita

A genetikai kapcsoltság. A crossing-over és a rekombináció. Rekombináció alapú térképezés eukariótákban (rekombinációs frekvencia számítása) és prokariótákban (konjugáció) és a fággenomok térképezésének tanulságai

Segédlet a BSc záróvizsgára való felkészüléshez

Jelen tananyag a Szegedi Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

Genetika

Segédlet a BSc államvizsgára való felkészüléshez

Készítette: Dr. Sinka Rita
SZTE, 2020

Államvizsga tétel címe:

A genetikai kapcsoltság. A crossing-over és a rekombináció. Rekombináció alapú térképezés eukariótákban (rekombinációs frekvencia számítása) és prokariótákban (konjugáció) és a fággenomok térképezésének tanulságai.

A genetikai kapcsoltság

A **meiotikus rekombináció** olyan haploid **allélkombináció** létrejötte a meiózis során, amely különbözik a haploid szülői allélkombinációtól.

Az **interkromoszómális** (független) rekombináció valójában **Mendel 2.** törvénye, amely mindig 50 százalékos rekombinációs gyakoriságot eredményez, **9:3:3:1** aránnyal.

Intrakromoszómális rekombináció esetén a rekombinánsok aránya kevesebb mint 50 százalék.

Mendeli számarányoktól (9:3:3:1) való eltérést az okozza, hogy a keresztezésben szereplő gének **azonos kromoszómán** helyezkednek el, és ezért **nem szegregálhatnak szabadon**.

A diploidok rekombináns termékeit legkönnyebben a **heterozigótáknak** recesszív **tesztelő törzshöz** való keresztezésével azonosíthatjuk.

Ha tesztkeresztesben a rekombinációs gyakoriság két gén között **kisebb mint 50%**, akkor a két gén **ugyanazon a kromoszómán** kapcsoltnak található.

Amennyiben a **rekombinációs gyakoriság 50%**, a két gén **nem kapcsoltnak**, és nagy valószínűséggel **különböző kromoszómákon** vagy azonos kromoszómán, de nagyon távol helyezkednek el.

A rekombinációs gyakoriságból a gének közötti távolságra következtethetünk.

A gének közötti távolság mérésével meghatározható a gének helye a kromoszómán, vagyis **géntérkép** alkotható. Az első eukarióta géntérképet a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) esetében alkották meg.

A kapcsoltságról akkor beszélünk, ha két vizsgált gén ugyanazon kromoszómán található. Ez mind a 9:3:3:1-es mind az 1:1:1:1-es mendeli F2 arányt alapvetően megváltoztatja oly módon, hogy az eredeti szülői génkombinációk a vártnál nagyobb arányban szerepelnek az F2 utódok között.

Az intrakromoszómális rekombináció a crossing-over (átkereszteződés) következménye, mely a meiózis profázisában a homológ kromoszómák nem testvér kromatidái között jön létre. A kiazma az átkereszteződés sejttani szinonimája, a meiózis során citológiailag (mikroszkóposan) megfigyelhető kereszt alakú képlet a homológok között.

Rekombinációs gyakoriság: rekombináns utódok száma osztva az összes utód számával.

A térképtávolságot a rekombinációs gyakorisággal (RF) mérjük.

$$\text{RF} = \frac{\text{rekombináns utódok száma}}{\text{összes utódok száma}} = \text{rekombinánsok átlagos száma}$$

0,01 (1%) rekombinációs gyakoriság (RF) egyenlő 1 térképegységgel, melyet T.H. Morgan tiszteletére centimorgannak (cM) is neveznek. **1 cM = 1 géntérkép egység** (map unit, rövidítve m.u.)

A referencia térképeken egy kromoszóma rendszerint hosszabb mint 50 cM.

A térképezés során mindig közeli lókuszokat térképeznek egymáshoz, és az adatokat térképfüggvénnyel pontosítják.

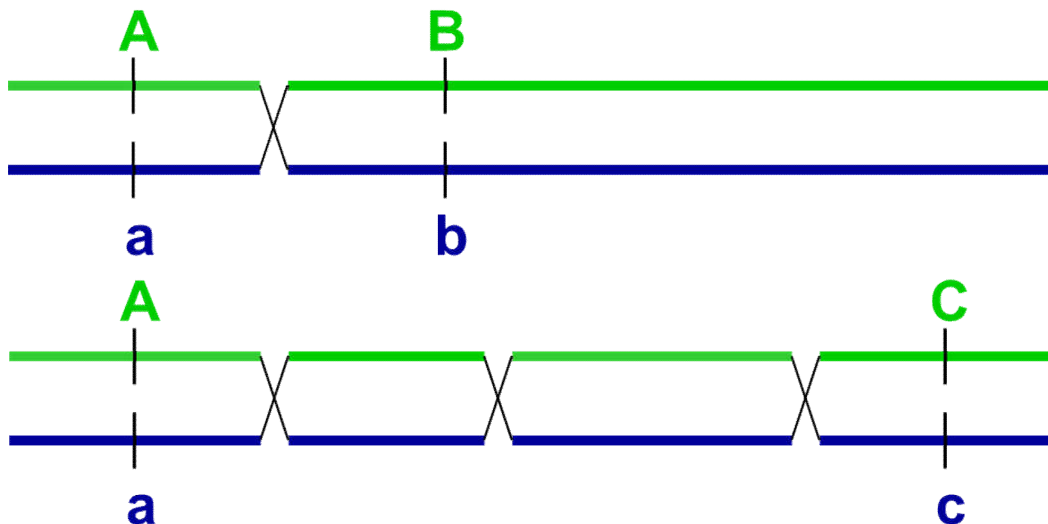
Rekombináció alapú térképezés eukariótákban

Kétpontos keresztezés során két gén közötti rekombinációs gyakoriságot mérünk, ami arányos a köztük lévő távolsággal. 1% rekombinációs gyakoriság = 1 térképegység (mu.) = 1 cM.

3 pontos keresztezés esetén egyszerre 3 allélpár öröklődését (rekombinálódását) követhetjük egyetlen keresztezésben, de a **kiértékelés itt is génpáronként** történik.

A 3 pontos térképezés pontosabb a 2 pontosnál, mert abban nyomon követhetjük a kettős rekombináció termékeit is.

Az RF nagy távolságokra pontatlan mérőszám.



Minél távolabb van két gén a kromoszómán annál nagyobb valószínűséggel játszódik le átkereszteződés közöttük a meiózisok során.

A kapcsoltság, vagy a kapcsoltság hiánya fontos kérdés. Az esetben, ha a számarányok nem mutatnak nyilvánvaló különbséget, statisztikai vizsgálattal (χ^2 próba) állapítható meg, hogy a kis különbséget a véletlen, vagy valós eltérés okozza.

A becsült és a megfigyelt adatok illeszkedésének vizsgálatára alkalmas módszer a χ^2 próba. Azt mondja meg, hogy az eltérést egy várt értéktől mekkora valószínűséggel okozhatja az alacsony mintaszám miatti mintavételi hiba.

A meiózis I. profázisában történik a **rekombináció** a **homológok nem testvér kromatidái** között, amikor az egymás mellé rendeződött két homológ kromoszóma mindegyike két kromatidából áll. A rekombináció kromoszóma darabok **nukleotid pontosságú kicserélődését** jelenti **törés – újra egyesülés** útján, közben genetikai anyag nem vesz el.

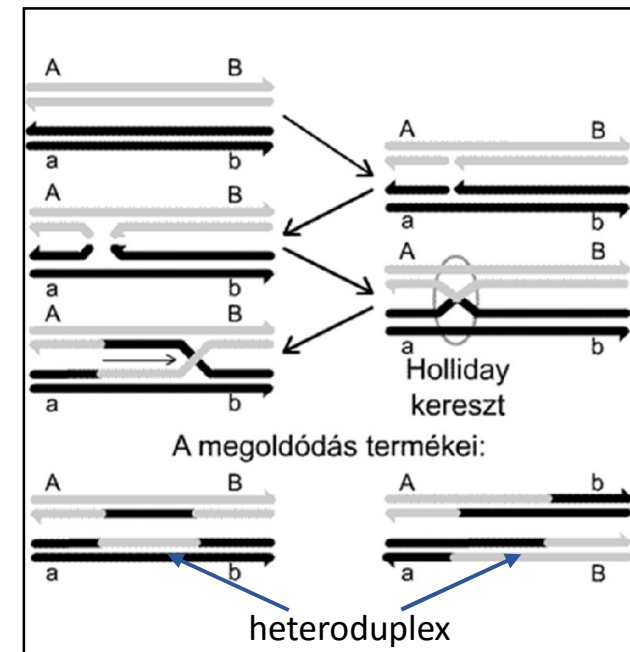
Holliday rekombinációs modell főbb lépései

- Két nem testvér kromatida között az egy-egy DNS szála eltörik, majd azok átkereszteződésével kereszthíd alakul ki.
- A kereszthíd elcsúszik (vándorol).
- A kereszthíd feloldódik, ami kétféleképpen történhet: Vagy az átkereszteződött szálak vágásával, (ami nem okoz rekombinációt) vagy a nem átkereszteződött másik két szál vágásával (ami rekombinációt okoz).

A heteroduplex és annak létrejötte

A kereszthíd elcsúszása miatt a két homológ nem testvér kromatidán olyan DNS szakasz keletkezik, melynek egyik szála az egyik, másik szála a másik homológól származik. A két homológ szál részleges különbözősége miatt ez a szakasz össze nem illő „mismatch” bázispárosodásokat tartalmazhat, ezért a hibrid szakaszokat heteroduplexnek nevezzük.

A crossing-over és a rekombináció



A rekombináció molekuláris eseményei **Holliday modellje**. A nem-testvér kromatidák DNS szálai egymás alatt vannak ábrázolva úgy, hogy az egymáshoz közeli szálak irányultsága azonos.

A mikróbák előnyei a genetikai analízisben, konjugáció

- Kis méret, gyors generációs idő, nagy utódszám.
- Szaporodásuk kémiai feltételei a táptalaj összetétellel szabályozhatók.
- Szelekciós technikák (rezisztencia, prototrófia)
- Gyors genetikai változékonyság, sok új allél.
- Keresztezhető, habár meiózisuk nincs, de rekombináció van.
- A mikróbák genetikája vezetett a molekuláris biológia tudományágának megszületéséhez.

A **baktériumoknak nincs meiózisuk**, ezért Mendel törvényei nem érvényesek rájuk. Genetikai vizsgálatukat a **konjugáció**, transzformáció, transzdukció teszi lehetővé.

A konjugáció során egy bizonyos baktérium sejt közvetlen érintkezéssel képes egy másik baktérium sejtbe bejuttatni a kromoszómáját, vagy annak egy darabját, így a két kromoszóma között létrejöhet rekombináció.

A konjugációt követő rekombináció NEM eredményez szimmetrikus termékeket, mert az egyik rekombináns termék mindig elvész.

A baktérium gének rekombinációját a konjugáció teszi lehetővé

konjugáció: Két baktérium sejt fizikai kapcsolata, melynek során a donor baktériumból genetikai információ (kromoszóma darab) kerül át a recipiensbe.

episzóma: Genetikai elem baktériumokban, amely képes szabadon replikálódni a citoplazmában vagy beépül a baktérium kromoszómába és a kromoszómával együtt replikálódik.

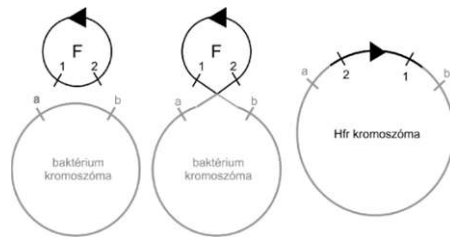
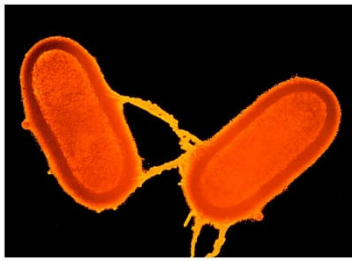
F faktor = fertilitási faktor: Bakteriális episzóma, amelynek jelenlétében a baktérium "donorként" viselkedik, vagyis konjugációra képes **egy F faktort nem tartalmazó baktériummal**.

Hfr sejt: (high frequency of recombination) Olyan *E. coli* sejtek, amelyeknek fertilitási faktora (F faktor) beépült a kromoszómájukba. A Hfr sejtek nagy gyakorisággal képesek kromoszóma részletek átadására (konjugáció).

A konjugáció során részlegesen diploid állapot jön létre, amit **merozigótának** nevezünk. A merozigóta genetika két szempontból alapvetően különbözik az eukarióta genetikától:

A diploid állapot nem vonatkozik a teljes genomra.

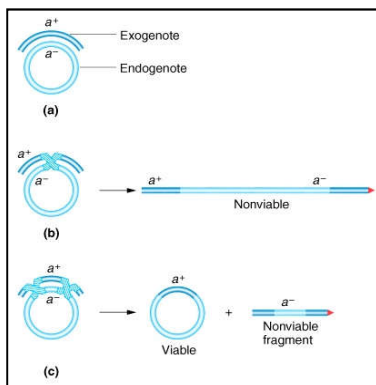
A rekombináció során a kicserélődés reciprok termékei közül csak az egyik marad meg, a másik lebomlik.



A genetikai információ a donor („hím” vagy F⁺) sejtéből kerül át a recipiens („nőivarú” vagy F⁻) sejtbe a csőszerű fehérje képződményen, a konjugációs hídon keresztül. (F = fertilitás). Az **F plazmid** egyetlen átkeresztezéssel épül be az E.coli kromoszómájába.

Konjugációnál a konjugációs híd képződik, melyen keresztül az egyik baktériumból a **fertilitási (F) faktor** (egy kör alakú DNS) átjut a másik sejtbe. **Hfr törzsek esetén a bakteriális kromoszómába beépült F faktor a kromoszómát vagy annak egy részét is átviszi a recipiens sejtbe**, az azon lévő gének beépülhetnek a recipiens genomba.

A konjugáció során a ~ 5 millió nukleotid hosszú E.coli kromoszóma egy alig százezer bázispár hosszú plazmid adott szakaszához kapcsolódva jut át az egyik sejtől a másikba.



Minden páratlan számú átkeresztezédes élet-képtelen, mert lineáris kromoszómát eredményez. A be nem épült lineáris DNS darab lebomlik. A Hfr-ről berekombinálódott genomi szakasz stabil, kifejeződik a recipiensben.

megszakított párosodás: A bakteriális gének térképezésére használt technika, amely azon alapszik, hogy konjugáció során a gének a donorból a recipiensbe meghatározott sorrendben és időrendben jutnak át. A konjugációt (a donor és a recipiens összekapcsolódását) fizikai ráhatással különböző időpontokban megszakítják.

A baktérium kromoszóma térképezésének módszerei

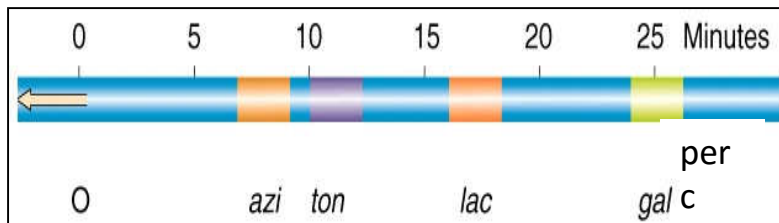
- Térképezés megszakított konjugációval
- Térképezés transzfer grádiens alapján

Az első bakteriális perctérkép

A perctérkép egy kromoszóma térkép, ami a baktérium gének sorrendjét és távolságát adja meg.

A **konjugáció** során a **gének átjutása szigorúan lineáris** sorrendben történik. HFR törzsek konjugációja során az F⁺ törzs kromoszómája átkerül a tőle különböző alléleket hordozó F⁻ törzsbe.

Az átjutás időbeli sorrendje alkalmas a gének sorrendjének megállapítására. **Az átjutási idő pedig a gének távolságával arányos.** Megszakított párosodással elkészíthető a baktérium genetikai térképe (90 perc). A térképtávolság két szomszédos gén átjutása között eltelt **konjugációs idővel** fejezhető ki, és mértékegysége a **perc**.



Az átjutás időbeli sorrendje alkalmas a gének sorrendjének megállapítására. Az átjutási idő pedig a gének távolságával arányos.

Minél távolibb egy lókuszt a konjugáció kiindulási pontjától, annál rosszabb hatékonysággal jut át. Ezt a jelenséget **transzfer grádiens**nek nevezzük. Oka, hogy a konjugáció során a pilusok gyakran maguktól is eltörnek, és így a konjugáció megszakad.

A fággenomok térképezésének tanulságai

A vírusok felépítése a legegyszerűbb (a DNS, RNS mint örökítőanyag mivoltának bizonyítása). A vírusok közül a legtöbb felfedezés az *E. coli* vírusainak, a T és I bakteriofágok nevéhez fűződik.

Különböző genotípusú fágok keresztezésével rekombinánsok nyerhetők, melyek gyakorisága genetikai térkép szerkesztését teszi lehetővé. Hershey a T2 fág tanulmányozása során dolgozta ki a fágok keresztezését. A fágok genetikai térképe kör alakú (baktériumba jutva gyors replikáció) és a fág fejbe csomagolt lineáris fág kromoszóma kettőssége rendkívüli példája a fágok fennmaradását és hatékony szaporodását célzó alkalmazkodásnak.

Benzer T4 fág rII lókusszal végzett kísérleteinek tanulsága

A korábbi genetikai ismeretek szerint a rekombináció és a mutáció egységének a gént tekintették. Benzer kísérletei megmutatták, hogy génen belül is lejátszódhat rekombináció, és egy génen belül nagyszámú mutáció térképezhető egymáshoz képest.

A mutációs hely egysége csakúgy mint a rekombináció legkisebb egysége egyetlen nukleotid pár.

Egy cisztron = egy polipeptid

A cisztron az a genetikai egység, amin belül a mutációk nem komplementálják egymást. A cisztron egyenértékű a génnel, a gén egyetlen polipeptidet kódoló szakaszát jelöli.