Előszó a

SEJTBIOLÓGIA ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA

jegyzethez

A jegyzetet összeállította: Szabad János
egyetemi tanár
Szegeden, 2012. őszén

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet
6720 Szeged, Somogyi u. 4.
Tel: 62/545132
E-mail: szabad.janos@med.u-szeged.hu

Kedves Olvasó!
A jegyzet fejezetei 1993 és 2005. között születtek. Lényegében az elsőéves orvostanhallgatóknak tartott „Sejtbiológia és molekuláris genetika" tantárgy előadásainak néhány oldalas összefoglalói. Az elmúlt néhány évben, miközben nem szegedi egyetemeken tanítottam, a fejezetek némelyikét frissítettem, módosítottam. (Ennek tudható be, hogy van néhány olyan témakör, amely két fejezetben is felbukkan.) A jegyzet mostani, elektronikus változata a régi, valamint a frissített fejezeteket tartalmazza. A jegyzetnek - mint annak idején az előadásoknak - az a célja, hogy a genetika, a molekuláris- és a sejtbiológia területéről olyan ismereteket mutasson be hallgatóinknak, amelyekre építhetnek további tanulmányaik, munkájuk során.

A jegyzet a következő fejezetekből áll:

1. Az élet keletkezése.
2. A sejtek szerveződése.
3. Kemoszintézis, fotoszintézis, légzés.
4. DNS, gén, genom, kromoszómák.
5. Replikáció és sejtosztódás.
6. Fág- és baktériumgenetika.
7. Mendeli genetika, kapcsoltság, géntérképek.
8. Nem-mendeli genetika; anyai hatás, anyai öröklődés.
9. Transzkripció.
10. Transzláció és a genetikai kód.
11. Mutációk, mutagének, reparáció.
12. Transzpozonok, genetikai mozaikosság.
13. A génexpresszió szabályozása prokariotákban.
14. A génexpresszió szabályozása eukariotákban.
15. Rekombináns DNS technológia. Elméleti alapok.
16. Rekombináns DNS technológia. Gyakorlati alkalmazások.
17. A szaporodás biológiája. Élőlények klónozása.
18. Az egyedfejlődés genetikai szabályozása.
19. Sejtváz, sejtmozgások.
20. Membránok és sejtkommunikáció.
21. Hormonok és szerepük.
22. Sejtciklus és szabályozása.
23. A daganatképződés molekuláris genetikája.
24. Az immunrendszer biológiája.
25. Az idegsejtek molekuláris biológiája.
26. Az érzékelés molekuláris biológiája, a viselkedés genetikája.
27. A populációk genetikája.
28. Az élővilág evolúciója. Ökorendszerek és a népesség.

A fejezetek összeállítása során a következő forrásokat használtam:

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, K., ESSENTIAL CELL BIOLOGY. ISBN 0-8153-1619-4. Garland Publ., Inc. New York, 1998.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. and Walter, P., ESSENTIAL CELL BIOLOGY. ISBN 9780815341291. 3rd edition, 2009.

Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., PRINCIPLES OF GENETICS. ISBN 0-7167-2083-3. W. H. Freeman and Comp., New York, 1989.

Fristrom, J.W. and Spieth, P.T. and Clegg M.T., PRINCIPLES OF GENETICS. ISBN 9780716720836; ISBN 0716720833. 2nd edition 1990.

Gilbert, S.F. DEVELOPMENTAL BIOLOGY. ISBN 0-87893-243-7. Sinauer Assoc. Sunderland, MA, 2000.

Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. and Gelbart, W. M., AN INTRODUCTION TO GENETIC ANALYSIS. ISBN 0-7167-3520-2. W. H. Freeman and Comp., New York, 2000.

Griffiths, A.J.F., Wessler, S., Carroll, S. and Doebley, J., INTRODUCTION TO GENETIC ANALYSIS. ISBN 1-4292-2943-8; ISBN 978-1-4292-2943-2. 10th edition, 2012.

Karp, G., CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, STUDY GUIDE: CONCEPTS AND EXPERIMENTS. ISBN 0471162310; ISBN 978-0471162315. 5th edition, 2008.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, D., Baltimore, D., and Darnell, J., MOLECULAR CELL BIOLOGY. ISBN 0-7167-3136-3. H. W. Freeman and Comp., New York, 2000.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P., MOLECULAR CELL BIOLOGY. ISBN 0716776014; ISBN 978-0716776017, 6th edition, 2007.

Purves, W.K., Sadava, D. Orians, G.H. and Heller, H.C., LIFE, THE SCIENCE OF BIOLOGY. ISBN 0-7167-2869-9. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, 2001.

Sadava, D., Hillis, D.M., Heller, H.C. and Berenbaum, M., Life: The Science of BiologyISBN 1-4292-1962-9; ISBN 978-1-4292-1962-4. 9th edition, 2011.

Az egyes fejezetek végén további források is fel vannak tüntetve.

A jegyzet összeállítója bizton reméli, hogy a fejezetekben összefoglalt ismeretanyag legalább akkora örömet fog szerezni olvasóinak, mint azoknak a kutatóknak, akik annak idején megismerték, és mint nekem, miközben mondandómat írásba öntöttem. Olvasóinak a jegyzet hasznos és eredményes tanulmányozását kívánja,

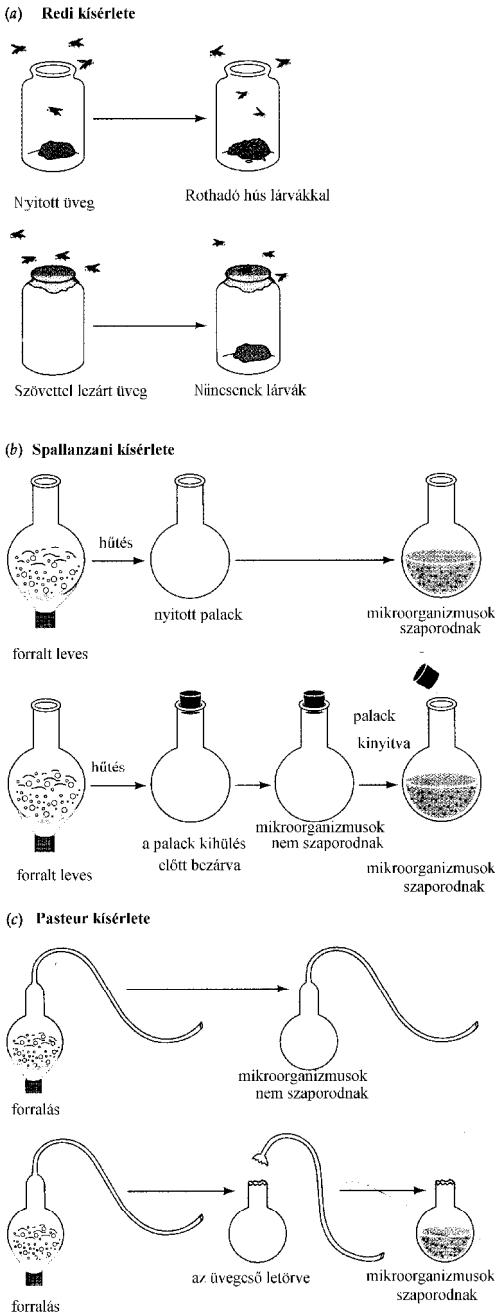
1. AZ ÉLET KELETKEZÉSE

A Föld kialakulása és a prebiotikus környezet. A fossziliák jelentősége. A szerves molekulák eredete és szerveződése. A DNS evolúciója. A progenota kialakulása. Az életfeltételek változása.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

Mindenkinek természetes, hogy vannak élőlények, hogy élőlények születnek, élnek és meghalnak. De vajon mindig is voltak élőlények? Vagy valamikor keletkezett az élet? Ha keletkezett az élet, akkor olyan kérdések merülnek fel, hogy hol, hogyan, mikor és milyen körülmények között?



1.1. ábra. Korai elképzelések az élet spontán eredetéről.

A tudomány fejlődése lehetővé tette, hogy az előző kérdésekre ma már többé-kevésbé pontos válaszok adhatók. Az első fejezet célja az élet keletkezésére vonatkozó ismeretek rövid összefoglalása.

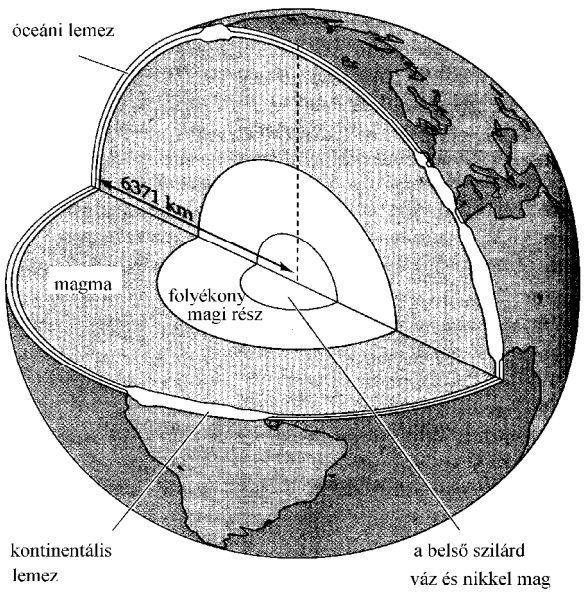
Korai elképzelések az élet eredetéről

Az élet **ősnemzés** eredete, melyet Arisztotelesz (i.e. 384 – i.e. 322) is vallott, kizárható. Rothadó húsból nem képződnek légylárvák (Redi 1668). Az első mikroszkópot Robert Hook készítette 1665-ben. Leeuwenhoek 1676-ban látott először mikroszkópban élő sejteket, mikroorganizmusokat. A sterilizált, lezárt tápoldatban nem képződnek mikroorganizmusok (Spallanzani, 1770 körül). Louis Pasteur (1862): *omne vivum e vivo* (minden élet életből származik (1.1. ábra). Minden élőlény sejt(ek)ből áll. Miből képződtek az első sejtek, és miből a sejteket alkotó szerves anyagok?

A Föld rövid története.

Az univerzum anyaga sok milliárd évvel ezelőtt kis térfogatban volt összezsúfolva. Anyaga a NAGY BUMM (13,7 milliárd éve) után szétszóródott, belőle galaxisok képződtek. A bolygók a gravitáció, valamint a szétszóródott részecskék aggregációja révén alakultak ki. A Föld mintegy 4,5 milliárd éves. Belső magja 3700 km sugarú, folyékony vas és nikkel alkotja. A magma 3000 km vastag, sűrű, olvadt szilikátokból áll. A magmán úszik a földkéreg, amely 5-40 km vastag (1.2. ábra). A külső rétegek nyomása, meteoritok becsapódása és a radioaktív bomlás hevítette fel.

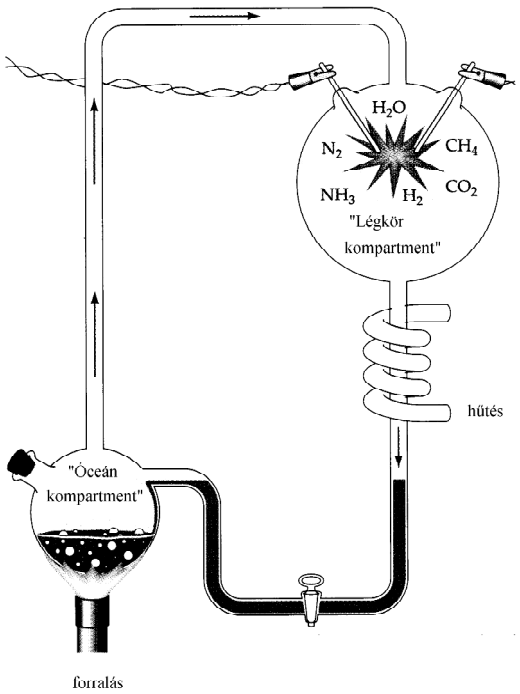
A legöregebb fossziliák, az élőlények geológiai korokból megőrzött struktúrái, 3,8 milliárd évesek. Az élet 4 milliárd éve keletkezhetett, itt a Földön. Hogyan?



1. 2. ábra A Föld szerkezete.

A első szerves molekulák eredete

Az ősi föld légköre redukáló jellegű volt, oxigént nem tartalmazott. A magmából és a földkéregből kiszabadult H_2O, CO_2, H_2, N_2, NH_3, H_2S, CO és CH_4 alkotta. Minden oxigén más elemekkel alkotott vegyületeket. Bár a hidrogén a légkörből az űrbe szökik, a vulkanikus aktivitás bőségesen pótolta. A légkör hűlésével víz csapódott ki. A villámlás, az ultraibolya sugárzás és a magas hőmérséklet a légköri gázokat egyszerű szerves vegyületekké alakította. Harold Urey és Stanley Miller (az 1950-es években) lombikban korai földi körülményeket teremtve elektromos kisülésekkel, viszonylag magas hőmérsékleten valósította meg szerves molekulák szintézisét (1.3. ábra). Berendezésükben már rövid idő alatt is olyan vegyületek képződtek, mint pl. HCN, formaldehid, acetaldehid, ecetsav, hangyasav, urea, sőt aminosavak is (glicin, alanin, glutaminsav, aszparaginsav).



1. 3. ábra Az Urey és Miller berendezés működésének elvi alapjai.

A reaktív vegyületekből, különösen a HCN-ből és a formaldehidből, könnyen képződnek olyan bonyolult molekulák, mint az adenin vagy a cukrok. A prebiotikus körülmények között képződő sokféle vegyület monomerjei könnyen polimerizálódnak. A polimer molekuláknak sok fontos tulajdonsága ismert: reakciókat katalizálhatnak, replikálódhatnak, információt tárolhatnak, aggregálódhatnak. A polimerek stabilak. Valószínű, hogy az első biológiai aktivitású polimerek RNS-szerű molekulák voltak, olyanok, mint a ribozimok.

A ribozimok enzimatikus aktivitású RNS-ek, az 1980-as évek elején ismerték meg őket. Az enzimek olyan katalitikus aktivitású szerves molekulák, amelyek az életfeltételeknek megfelelő hőmérsékleten gyorsítják fel a kémiai reakciókat. Az enzimek szelektívek: a sok lehetséges kémiai reakció közül csak egyfélét katalizálnak. A különféle ribozimok különféle reakciókat katalizálnak. A sokféle ribozimmal nagyon sokféle enzimatikus reakció katalizálható. Ribozimok katalizálhatták az aminosavak polimerizációját peptidekké, fehérjékké. A fehérjék sokfélesége teremthette meg az alapot további enzimatikus folyamatokhoz, valamint a "sejtszerű" szerkezetek kialakulásához. A kettős spirálú nukleinsavak, egyfajta polimerek, lehettek képesek a replikálódásra, olyan információk tárolására, amelyek a tulajdonságok átörökítéséhez szükségesek.

A szerves molekulák szerveződése

Az évmilliók folyamán az ősóceánban felhalmozódtak a szerves molekulák. Koncentrációjuk különösen magas lehetett a beszáradó pocsolyákban, ahol tovább polimerizálódhattak, belőlük aggregátumok alakulhattak ki. Ismert, hogy az aminosavak száraz keverékének hevítésekor fehérjeszerű molekulák képződnek. A fehérjeszerű oldatok hűtésekor olyan, kb. 2 μm átmérőjű cseppecskék formálódnak, amelyeknek kettős külső rétegük van, fehérjeszerű molekulákat abszorbeálnak, bimbóznak, osztódnak és önszervező képességűek. (Talán nem véletlen, hogy a legidősebb, 3,8 milliárd éves fosszíliák mérete is 2 μm.) A kis agyagszemcsék segítik a cseppecskék szerveződését. A poláros és apoláros csoportokat egyaránt tartalmazó molekulákból spontán képződnek membránok. A membránok alkalmas szerkezetek a szelektív anyagfelvételre és leadásra. A membránokon protonok pumpálódhatnak át, lehetőséget teremtve az energiatermelésre.

Alexander Oparin mutatta meg először (1924, 1936), hogy a különféle polimerekből ma is készíthetők olyan szerkezetek, ún. koacervátumok, amelyek a sejtekre jellemző bizonyos tulajdonságokat mutatnak. Pl. szelektíven vesznek fel anyagokat környezetükből és alakítanak át. Képesek anyagokat koncentrálni belsejükben, és arra is, hogy megszabaduljanak a felesleges anyagcsere termékektől. A hidrofób természetű lipidek és/vagy a fehérjék részei "membránokkal" burkolhatták be a koacervátum cseppecskéket. Azok a koacervátumok szaporodhattak, amelyek át tudták örökíteni tulajdonságaikat "utódaikra".

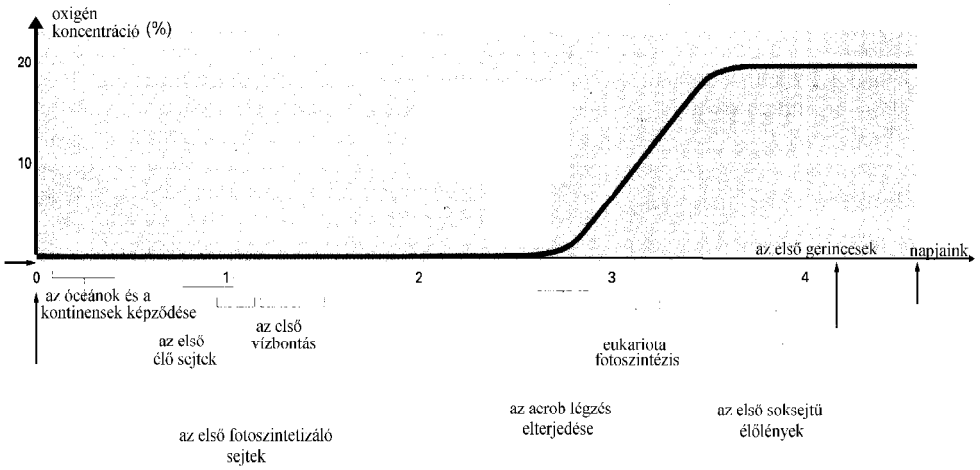
A progenota (proto-sejt) kialakulása

A DNS, valamennyi élőlény örökítő anyaga, membránnal körbezárt sejtszerű struktúrában alakulhatott ki RNS minta alapján. A progenota (a proto-sejt) az első olyan élőnek tekinthető élőlény, amelyet membrán határolt, DNS-t tartalmazott és tulajdonságait átörökítette utódaira. Az első progenota kb. 4 milliárd éve képződhetett. A tudomány mai álláspontja szerint egyetlen egy progenota az őse minden, a Földön valaha élt élőlénynek. A DNS változásai, a mutációk biztosították a progenota leszármazottainak azt a változatosságát, amelyek közül a természetes szelekció révén válogatódtak ki az élet- és szaporodásképesek. Nagyon valószínű, hogy az élet a Földön képződött, és minden bizonnyal csak egyszer. A Föld képződésétől a progenota kialakulásáig kb. 500 millió év telt el. Volt esély a szerves vegyületek képződésére, a polimerek kialakulására, koncentrálódására, a különféle szerves anyagok kombinálódására, a progenota kialakulására. Sok, egyenként kis, de nem nulla valószínűségű esemény bekövetkeztére. A közös eredetet egyebek mellett olyan tények bizonyítják, mint

minden élőlény sejt(ek)ből áll, minden élőlény örökítő anyaga DNS és sejtjeiket hasonló jellegű szerves vegyületek alkotják.

A korai életfeltételek

Az ultraibolya sugárzás roncsoló hatása miatt élet az nedves felszínen, árnyékban, iszapban vagy 5 méternél mélyebb vízben képződhetett. Az első élőlények oxigénmentes körülmények között éltek, anaerobok voltak. Anyag- és energiaforrásuk az ősóceán szerves molekulái voltak.

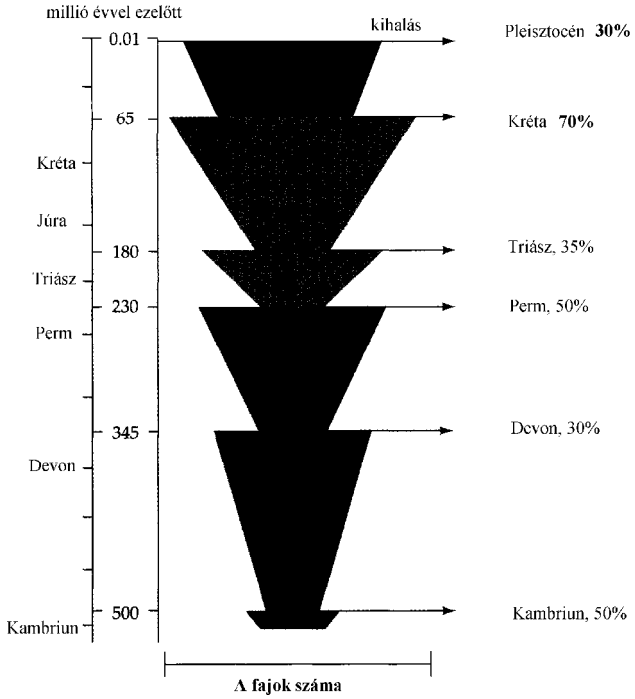


1. 4. ábra. A légköri O_2 koncentráció változása a Föld története során, néhány fontosabb esemény feltüntetésével.

A szerves anyagok fogytával az élőlények az energiát szervetlen anyagok (elsősorban a vulkanikus tevékenység miatt bőségesen rendelkezésre álló H_2S) oxidálásával, és a fényből nyerték. "Megtanultak" szervetlen anyagokból szervest készíteni. Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok 3,8 milliárd évesek. A fényenergiát csak ATP szintézisére használták. A szerves molekulák előállításához szükséges hidrogént szervetlen (pl. H_2S) vagy szerves anyagokból nyerték. (Részletesebben lásd a 3. előadás anyagát.) Hidrogén forrásként a vizet először a cianobaktériumok kezdték használni, kb. 3,2 milliárd éve (1.4. ábra). (Ne felejtsük el, hogy a víz bontása során felszabaduló O_2 toxikus az anaerob élőlényekre!) A cianobaktériumok által a vízből felszabadított O_2 csaknem 2 milliárd éven át nem halmozódott fel a légkörben, mert az óceánok vizében oldott Fe^{2+}-t oxidálta Fe^{3+}-á. A légkör O_2 koncentrációja csak kb. 1,5 milliárd éve kezdett nőni. Az O_2 koncentráció növekedtével nyílt lehetőség az energiát hatékonyan termelő aerob légzés kialakulására. A légköri O_2 egy része az ultraibolya sugárzás hatására ózonná (O_3) alakul. Az ózon hatékonyan abszorbeálja az ultraibolya sugárzást, lehetőséget teremtve az élőlények megtelepedésére a tengerek és a földfelszínen. A Földet kb. 1,3 milliárd évvel ezelőttig csak prokariota (sejtmag nélküli) élőlények népesítették be. Az eukariota (valódi sejtmagvas) soksejtes élőlények fejlődése csak kb. 800 millió éve kezdődött. A sejtszervecskék, köztük az endoszimbionta eredetű kloroplasztok és a mitokondriumok kialakulása fontos esemény az evolúció folyamán. A soksejtű élőlények kialakulása nyomán jött létre az élőlények mindannyiunk által jól ismert sokfélesége.

A közelmúlt életfeltételei

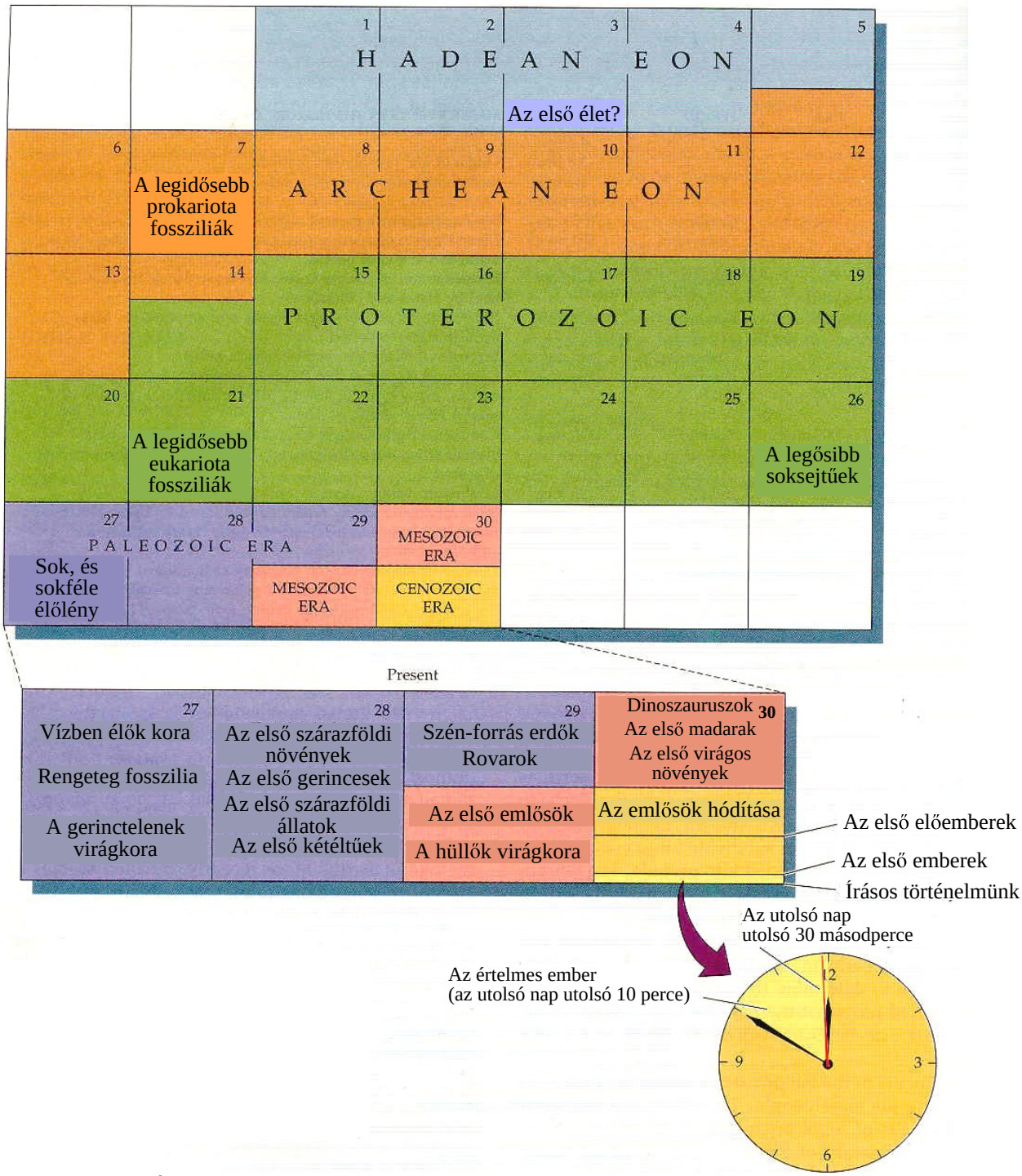
Az életfeltételek folyamatosan változtak, és bár lassan, de folyamatosan változnak a Földön. Mintegy 550 millió éve a szárazföld 6 kontinensre tagolódott. Valamennyi az egyenlítő körül helyezkedett el. Kb. 200 millió éve egyetlen kontinensé (Pangea) egyesültek. A Pangea később kontinensekre hasadt. A kontinensek elkülönültek, és bár lassan, ma is sodródnak, torlódnak. Az évmilliók során változott (és változik ma is) a Föld klímája. A Földnek a világűrben történő mozgása felmelegedésekhez, és olyan lehűlésekhez vezet, mint pl. a jégkorszakok. (Ma az átlagosnál hidegebb korszakban élünk.)



1.5. ábra. Az elmúlt 500 millió év során hatszor haltak ki tömegesen fajok. A tömeges kihalások jelzik a földtörténeti korok határait.

Jelentős, és gyors lehűléshez vezettek a vulkánkitörések, és az ütközések meteor óriásokkal. A fossziliák tanulsága alapján a Föld története során a hirtelen bekövetkezett lehűlések fajok tömeges kihalásához vezettek (1.5. ábra). Mára a Föld története során valaha élt fajok több mint 99%-a kihalt. A

környezeti feltételekhez alkalmazkodó és szaporodó élőlények élnek tovább, származnak tőlük utódok.



1.6. ábra. Az „Élet kalendáriuma” harminc napba sűrítve. Egy nap kb. 150 millió évnek fele meg.

Evolúció egyhónapos skálán

Ha a Föld történetét egyetlen hónapba sűrítve szemléltetjük, egy nap kb. 150 millió évnek felel meg (1.6. ábra). A Föld képződését követően bőven volt idő a szerves anyagok kialakulására és szerveződésére. A progenota, ez első „élőlény”, a 4. napon alakulhatott ki. A legidősebb prokariota fossziliák a 7., az eukarioták csak a 21. (!), a soksejtűek a 26. napról származnak. Az első szárazföldi növények és az állatok csak a 28. napon bukkantak fel. A dinoszauruszok a 29. nap délutánján élték fénykorukat, amikor az első emlősök képződtek. Az utolsó nap delére fejlődtek ki a madarak és a virágos növények, késő délutánján az emberszabású majmok. Az értelmes ember (*Homo sapiens*) a 30. nap utolsó tíz percének terméke. Írásos történelme pedig mindössze 30 másodpercnyi (1.6.

ábra). Az élőlények eredetére vonatkozó molekuláris bizonyítékokkal részletesen egy későbbi előadás foglalkozik.

ÖSSZEFOGLALÁS

A korai földi körülmények alkalmasak voltak arra, hogy szerves anyagok képződjenek, szerveződjenek. Szerencsés véletlenek folytán az élet a Földön alakult ki, minden bizonnyal csak egyszer. Nagyon valószínű, hogy a Földön valaha élt minden élőlény a progenota leszármazottja. Az élőlények sokféleségének az örökítő anyag, a DNS változékonysága és a változó életfeltételeket képviselő természetes szelekció az alapja.

FORRÁS

Sadava D. et al., Life the Science of Biology, 440-535, 2009.

2. A SEJTEK SZERVEZŐDÉSE

A sejtalkotó makromolekulák. A sejt, mint alapvető egység. A pro- és az eukarioták általános jellemzői. Sejtszervecskék és funkcióik.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

Az élőlények kialakulásának fontos mozzanata volt a szerves molekulák szerveződése, majd sejtszerű struktúrák kialakulása. A sejt fontosságát mi sem bizonyítja jobban, mint hogy minden életjelenség sejttel kapcsolatos, valamint az is, hogy minden sejt sejtből származik. A sejt lényegében az élet alapvető szerveződési és funkcionális egysége. Hogyan épülnek fel a sejtek? Milyen szerveződési és funkcionális jellegzetességei vannak a sejteknek? A jelen fejezet a fenti kérdésekre ad rövid válaszokat.

A SEJTALKOTÓ MAKROMOLEKULÁK

1. Lipidek. Apoláros oldószerekben (pl. benzolban) oldódó, polárosakban (pl. vízben) nem oldódó, meglehetősen különböző kémiai szerkezetű molekulák. Funkcióikat illetően is szerteágazó természetű vegyületek. Különféle típusaik energiát tárolnak, membránok alkotói, hormonok, stb. A zsírok (egyszerű lipidek vagy trigliceridek) hatékony energiatárolók. Glicerin és zsírsavak (palmitin-, sztearin-, olaj- és linolsav) észterei. A foszfolipidekben, mint a trigliceridekben, egy glicerin molekula két zsírsavval kapcsolódik. A harmadik zsírsav helyett vagy egy foszforsav maradék (a foszfatidokban), vagy egy foszforsav maradékon át egy töltött molekula kapcsolódik (a foszfatidil kolinban a kolin, a foszfatidil etanolaminban az etanolamin). A foszfolipideknek egyaránt vannak hidrofil és hidrofób részeik. A biológiai membránok alapvető szerkezetét két foszfolipid réteg alkotja. A membránok belső hidrofób részét a hidrofób zsírsavláncok, a felszíneit pedig a hidrofil részek alkotják. Az egyéb lipidek közül megemlítjük a karotenoidokat, a fényelnyelő pigmentek egyik családját. A β-karotin növényekben az egyik fényenergia elnyelő pigment, egyben az A vitamin előanyaga. Az A vitamin egyik származéka pedig annak a rodopszinnak az egyik komponense, amely az állatvilágban a fényérzékelésre általánosan használt pigment. A szteroidok némelyike membránalkotó, mások hormonok. A koleszterin, a membránok egy fontos összetevője, részben a májban képződik, részben a táplálékból (tejből, vajból és állati eredetű zsírokból) szívódik fel. A koleszterin tartalom növekedése csökkenti a membránok fluiditását. A koleszterin az epesavak előanyaga is. A szív ereiben történő lerakódása arterioszklerózishoz, szívinfarktushoz vezet-hethet. Koleszterinből képződnek a szteroid hormonok (tesztoszteron, ösztrogének, kortizon, ekdizon). A D vitamin is egyfajta szteroid, a kalcium felszívódás és lerakódás fontos szabályozója. (A lipidek természetével részletesen a biokémia foglalkozik.)

2. Szénhidrátok. A CH_2O általános formulával jellemezhető. Az energiatárolásban, és vázanyagaként is fontos szerepet betöltő, meglehetősen heterogén méretű molekulák. A legismertebb monoszacharidok a hatszénatomos glükóz (a fotoszintézis legfontosabb terméke), a fruktóz, a mannóz és a galaktóz, az ötszénatomos ribóz és deoxiribóz (a nukleinsavak egyik alkotója). A diszacharidok legismertebbike a tejcukor, valamint a háztartásokban használt répacukor. A keményítő, a glükogén, valamint a cellulóz a legismertebb poliszacharidok.

3. Fehérjék. Aminosavakból peptid kötésekkel képződő polimerek. Az aminosavakat különféle módon szokás osztályozni. Oldalláncaik alapján lehetnek hidrofób természetűek, (valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, metionin és prolin), hidrofilok (aszparaginsav, glutaminsav, lizin, arginin, hisztidin) vagy semlegesek (glicin, alanin, szerin, cisztein, triptofán, tirozin, treonin, aszparagin, glutamin). A fehérjék fontosabb funkciói a következők: lehetnek enzimek, szerkezeti elemek, hírvivő, jeltovábbító molekulák, immunglobulinok, és mechanoenzimek. A fehérjék elsődleges szerkezetét az őket alkotó aminosavak sorrendje határozza meg. Másodlagos szerkezetüket az olyan struktúrák kialakulása jelenti (mint pl. az α-hélix, a β-lemez, a tripla hélix), amelyek alapja az aminosav oldalláncok közötti kölcsönhatások sokasága. A harmadlagos szerkezetet a fehérje molekula térbeli alakja jelenti. A negyedleges szerkezet alapja a különböző fehérje molekulák asszociációja funkcionális komplexekké.

4. Nukleinsavak. Kétféle típusát ismerjük: a DNS-t, valamint az RNS-ek különféle típusai. A sejtalkotó makromolekulákkal részletesen a biokémia tantárgy foglalkozik.

A SEJTEK KÖZÖS TULAJDONSÁGAI

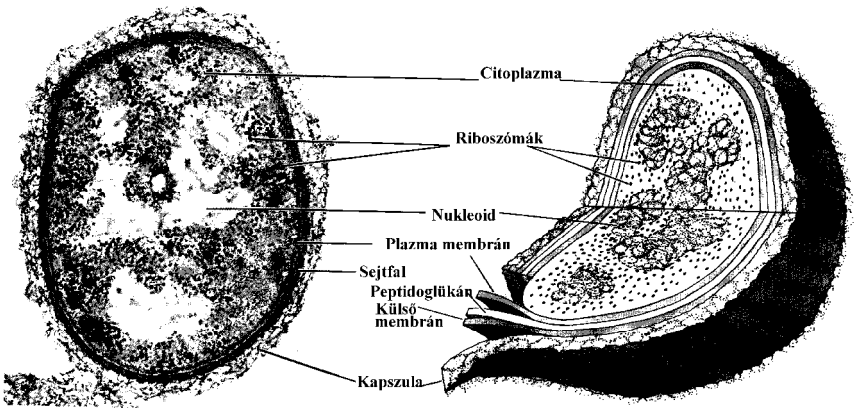
A sejt az élőlények szerveződési és funkcionális egysége. Minden élőlény sejt(ek)ből áll. Sejt csak sejtből származik. Általában kicsik (térfogatuk 1-1000 μm^3), ám vannak nagyok is, mint pl. a madártojások, vagy az idegsejtek. Energiát vagy energiahordozó anyagokat vesznek fel a környezetből. Szelektíven vesznek fel és adnak le anyagot környezetükből és környezetükbe. A sejtek a genetikai információ kifejeződésének helyei.

PROKARIOTÁK

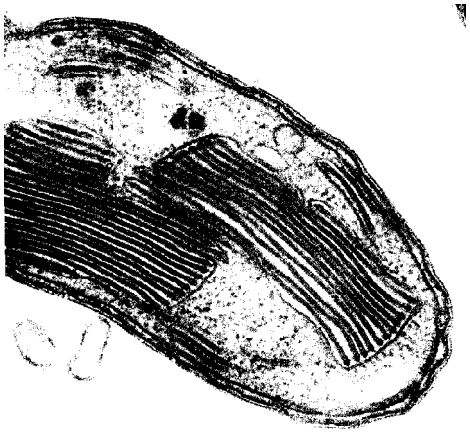
Nincs jól meghatározott sejtmagjuk. Valamennyien egysejtűek. A baktériumok a prokarioták. Nincsenek sejtszervecskéik. Sejtjeikben a kompartmentalizáció csaknem teljesen hiányzik. Az átmérőjük kb. 2 μm, tömegük 10^{-12} gramm, egy átlagos állatsejt ezrednyi része. Generációs idejük rövid: a közönséges bélbaktérium (*Escherichia coli*) 37°C-on kb. 20 percenként osztódik.

Vannak baktériumok, amelyek falát nyálkás poliszacharidból álló kapszula borítja, védve a kiszáradás, és a fehérvérsejtek ellen (2.1. ábra). A sejtfalat a murein nevű glükoprotein alkotja, ami egyetlen, keresztbe kötött, aminocukrokból képződött

óriásmolekula. Minthogy a baktérium sejtfalnak nincs eukariota megfelelője, a baktériumokat a sejtfal képződésének megakadályozásával (bizonyos antibiotikumokkal, mint pl. a penicillinnel) is el lehet pusztítani. A plazmamembrán, mint minden sejtben, elválaszt a környezettől, szabályozza az anyagáramlást. A fotoszintetizáló baktériumokban a plazmamembrán betüremkedik, réteges szerkezetet alkot, benne fotoszintetikus pigmentekkel, elsősorban bakterioklorofillal, a klorofill egy típusával (2.2. ábra). (Ne feledjük: a kloroplasztok a cianobaktériumok származékai.)



2.1. ábra. Egy baktérium sejt szerkezete.



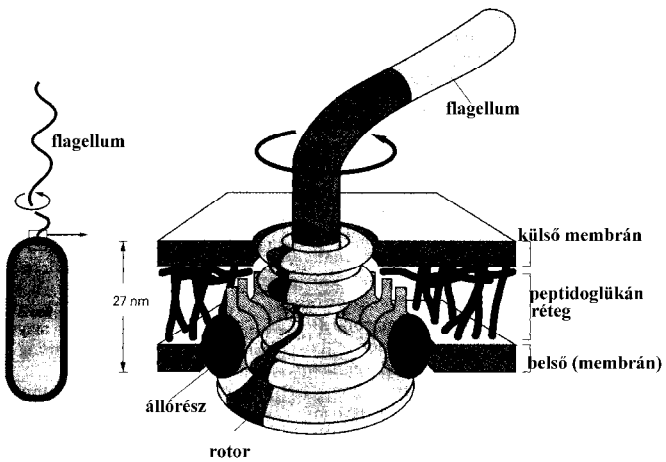
2.2. ábra. Sejthártya betüremkedések egy baktérium sejtben.

Vannak olyan baktérium fajok, amelyekben a sejthártya befűződése révén mezoszóma képződik. A mezoszóma a sejtosztódásban és az energiatermelő folyamatokban játszik szerepet. A baktériumsejtek belsejét citoszol tölti ki. Vannak olyan baktérium fajok, amelyek flagellumokkal változtatják helyüket. A flagellumok flagellin fehérje molekulákból állnak, finom szerkezetük kicsiny dugóhúzóra emlékeztet (2.3. ábra). A pílusok, a flagellumoknál hosszabb nyúlványok, némely baktérium fajban a sejtek tapadását segítik, vagy az állati sejtkehez, vagy egy másik baktériumhoz, pl. a konjugáció, a baktériumok párosodása folyamán. A nukleoid a citoszol nukleinsavakban gazdag része. A nukleoid körül nincs membrán, és a baktérium "kör alakú" kromoszómájának zömét tartalmazza. (Az *Escherichia coli* közönséges bélbaktérium, egyetlen sejtje 2 μm "hosszú" és 0,8 μm "vastag". Kromoszómája 0,9 mm (!) hosszú. A baktériumok genomjában jószerivel nincsenek repetitív szekvenciák. A baktérium sejtekből hiányzanak a hisztonok (amelyekből eukariotákban azok a fehérje labdacsok képződnek, amelyekre a sejtmagi DNS feltekeredik), nincs mitózis és meiózis. A citoszolt 70% víz, 15% fehérje, 1% DNS, 6% RNS, 3% szénhidrát, 2% lipid, 1% ionok és más anyagok alkotják.

A baktériumok alakjuk szerint lehetnek gömbalakúak (kokkuszok), bacilusok (pálcika) és spirálisan tekeredők (a spirocheták). A baktériumoknak két nagy csoportja ismert: az ős-, valamint a valódi baktériumok. (Arche- illetve eubaktériumok.) Az ősbaktériumok sejtfala peptidszerű anyagokból áll (ami miatt penicillinre érzéketlenek). Plazmamembránjuk szerkezete nagyon egyszerű, 16S rRNS-ük és fehérje szintézisük is különleges. (Ami miatt pl. sztreptomicinre érzéketlenek). Nagy sótartalmú (halofilek), a szokásosnál magasabb hőmérsékleten (termofilek), savas körülmények között (acidofilek) között élnek, és vannak metánképző fajaik is (az ún. metánképző baktériumok). A metánképző baktériumokból különösen sok él a fűevő emlősök emésztő rendszerében. A következő reakció alapján termelnek energiát anaerob környezetben:

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O + \text{energia}$$
$$(1 \text{ mol ATP}/1 \text{ mol } CO_2)$$

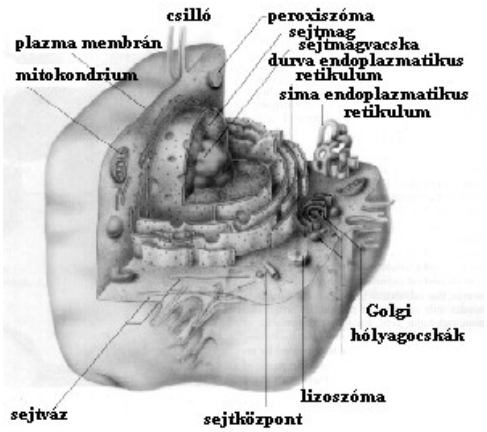
Becslések szerint a szarvasmarhák emésztő rendszerében élő metánképző baktériumok évente 2 milliárd tonna metánt termelnek. A metán a CO_2 mellett az üvegház hatás fő okozója.



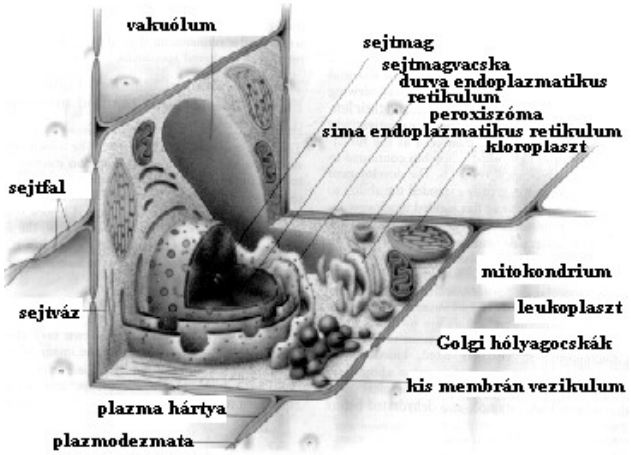
2.3. ábra. A baktérium flagellumot forgató „turbina”.

EUKARIOTÁK

Az eukarioták sejtjeiben jól elkülönülő sejtmag(vak) van(nak), és jellemző rájuk a kompartmentalizáció: bennük a különféle biokémiai folyamatok térben elkülönülten zajlanak (2.4. és 2.5. ábrák). A citoplazma a sejtmag és a sejt hártya közötti állomány. A citoszol a citoplazma folyékony része, amelyben a sejtszer-vecskék (organellumok) szuszpendálva vannak. A sejtszervecskék felszínét is hártyák burkolják. Jellegzetes feladat elvégzésére specializálódott képző-mények. A hártyák szabályozzák a molekulák áramlását, anyagokat burkolnak be és szállítanak, adnak otthont enzimeknek, a fotoszintézis pigmentjeinek, segítik a sejtfelismerést, a sejtek kommunikációját.

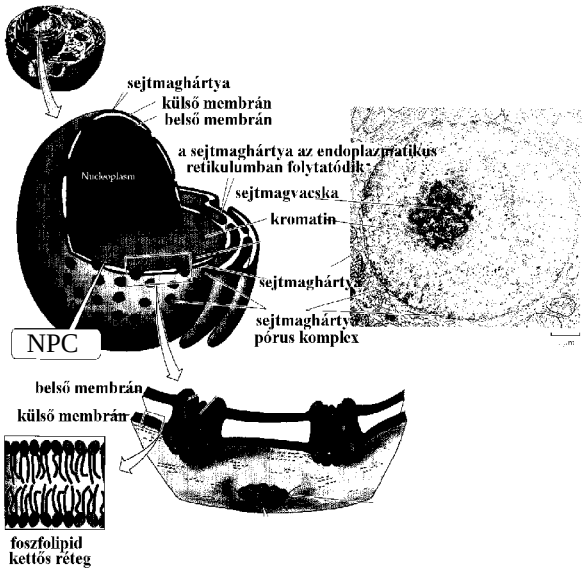


2.4. ábra. Egy állati sejt sematikusan.

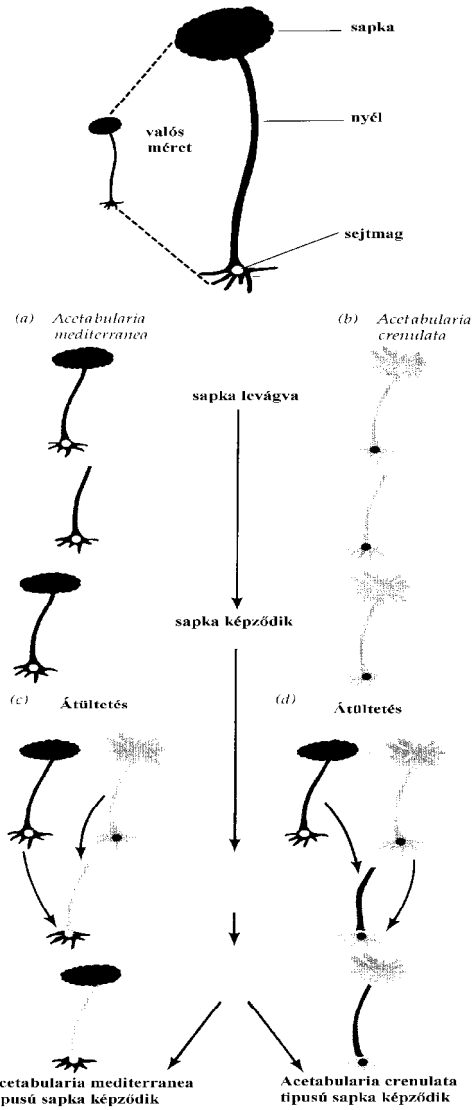


2.5. ábra. Egy növényi sejt sematikusan.

A sejtmag. Átmérője kb. 5 μm. Az örökítő anyag tárolásának, valamint az RNS-szintézis legfőbb helye. A sejtmagot sejtmaghártya választja el a citoplazmától. A sejtmaghártya egy kettős membrán, rajta ún. sejtmag-pórus-komplexekkel (2.6. ábra). A pórusokon át történik a sejtmag és a citoplazma közötti anyagáramlás. A pórusok átmérője „csukott" állapotban 9 nm, de pl. a riboszómák kijutásakor 26 nm-esre nyílnak. A maghártya külső rétege a citoplazmába türemkedik, ahol az endoplazmatikus retikulumot képezi. A kromatin, a kromoszómák anyaga, a sejtmag belsejének mindössze kb. 5%-át tölti ki (2.6. ábra).



2.6. ábra. A sejtmag felépítése. NPC = sejmagpórus-komplex.



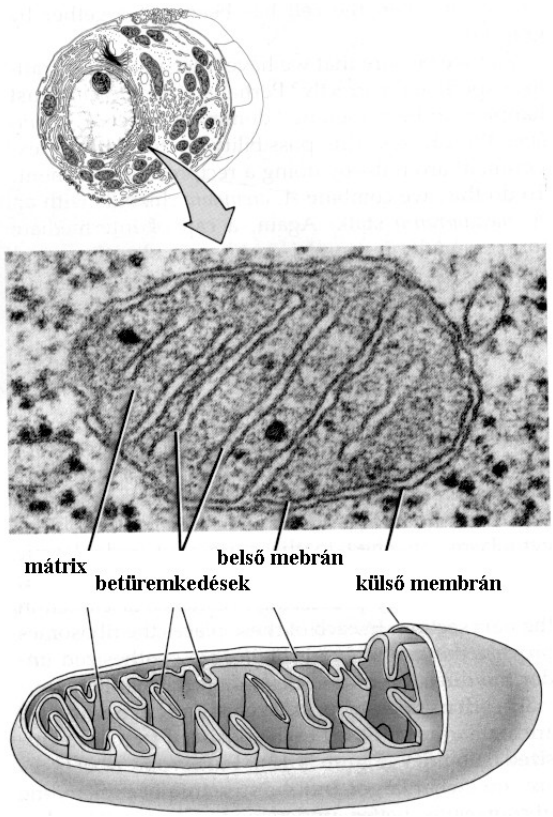
2.7. ábra. A sejtmagi dominancia azt jelzi, hogy a sejtek alapvető jellegzetességeit a sejtmagban tárolt információk határozzák meg.

A kromatin a sejtosztódások előtt kromoszómákká, mikroszkóppal jól látható képződményekké szerveződik. A sejtmagi dominancia értelmében a sejtek életét a sejtmag határozza meg (2.7. ábra).

A sejtmagvacska a sejtmagon belül jól látható képződmény. Számuk fajonként állandó. A sejtmagvacska a riboszómák képződési helye, a DNS rRNS-t kódoló szakaszai, rRNS (riboszómális-RNS), valamint a riboszómális fehérjék alkotják.

Mitokondrium

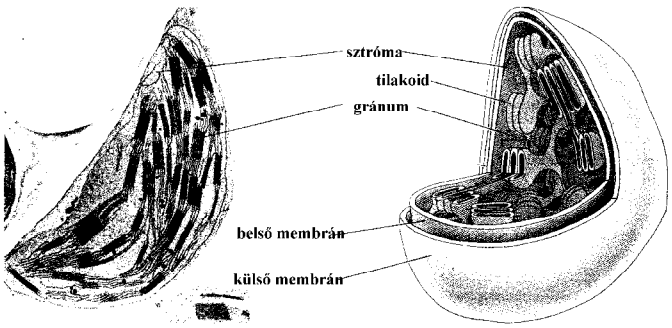
Az energiaforgalmazó sejtszervecskék egyike (2.8. ábra). Mérete 2-8 μm, mint sok baktériumé. Két membrán burkolja: a külső sima, és jellegzetesen eukariota szerkezetű, a belső bolyhosan betüremkedik a mitokondrium belsejébe és a prokariotákra jellemző. A mitokondriumok a sejtlégzés folyamán energiát termelnek, amelyet ATP-ben raktároznak. A mitokondriumok száma sejtenként egytől néhány százezer között változik. Saját DNS-ük van, egy vagy néhány kópiában. A mitokondriális-DNS (mtDNS) sokban hasonlít a baktériumok DNS-ére: gyűrű alakú, nem tekeredik hiszton fehérjékből képződött korongocskákra, és nincsenek bennük intronok. A mtDNS a mitokondriális rRNS-ek, tRNS-ek és csak néhány mitokondriális fehérje szintézisét kódolja. Bizonyított, hogy a mitokondriumok endoszimbiózis eredményei. (Az endoszimbiózis prokarioták létezése eukariota sejteken belül a két fél kölcsönös hasznára.) A mitokondriumok a bíbor fotoszintetizáló baktériumok származékai.



2.8. ábra. Egy mitokondrium felépítése.

Plasztiszok

Az energiaforgalmazó másik sejtszervecske (2.9. ábra). Méretük, mint sok baktériumé, 3-5 μm. A plasztiszok közül a zöld kloroplasztok a legismertebbek. A kloroplasztokban történik a fotoszintézis. A kloroplasztokat egy olyan sima külső membrán burkolja, amelynek felépítése az eukariota sejthártyára emlékeztet. A belső membránról pénztekercsszerűen elrendezett zacskócskák (tilakoidok) fűződnek le, úgy, mint a cianobaktériumokban (2.2. ábra). A tilakoidok tartalmazzák a fotoszintetikus pigmenteket. A kloroplasztoknak, mint a mitokondriumoknak, saját DNS-ük van. A kloroplaszt-DNS gyűrű alakú, nem tekeredik fehérje korongocskákra, és nincsenek bennük intronok. A plasztisz-DNS is rRNS-ek, tRNS-ek és néhány kloroplaszt fehérje szintézisét kódolja. A kromoplasztok színesek (vörösek, narancsszinűek és sárgák). A leukoplasztok színtelenek, keményítőt vagy növényi zsírokat tárolnak. Bizonyos, hogy a kloroplasztok, mint a mitokondriumok is, endoszimbiózis eredményei, és a cianobaktériumokból származnak.



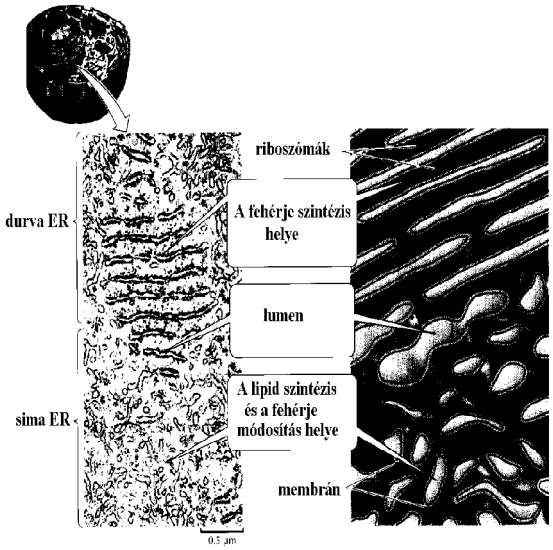
2.9. ábra. Egy kloroplaszt felépítése.

Endoplazmatikus retikulum (ER)

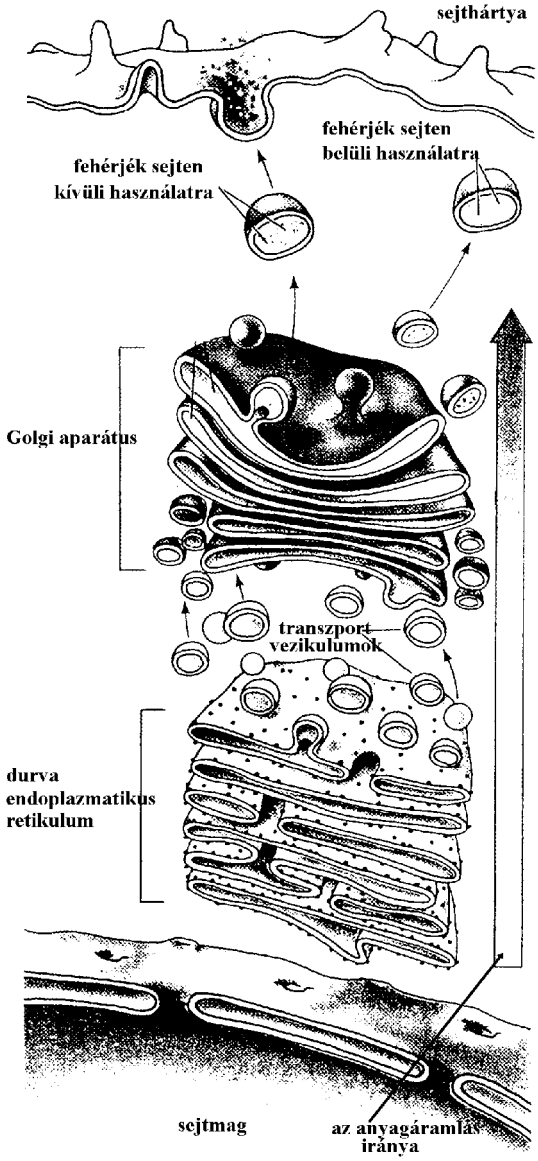
Csövek és ellaposodott zacskók hálózata, a külső maghártya betüremkedése a citoplazmába (2.10. ábra). A durva ER külső felszínén riboszómák ülnek. Olyan fehérje féleségek szintézisén szorgoskodnak, amelyek az ún. szekréciós utat követik: beépülnek a membránokba, a sejten kívülre jutnak, stb.). A citoszolban oldott „szabad” riboszómákon olyan fehérje féleségek szintetizálódnak, amelyek a sejtmagba importálódnak, a mitokondriumok alkotóivá válnak, vagy a citoszolban oldottak. A sima ER három fontos esemény helye: (1) ott módosul sok, a durva ER-en képződött fehérje, (2) ott képződnek a lipidek és a szteroid hormonok, valamint (3) ott bomlik le számos méregfajta.

Golgi készülék

(Nevét felfedezője, Camillo Golgi nyomán kapta 1898-ban; 2.11. ábra.) A Golgi készülék "képződő része" olyan hólyagocskákból áll össze, amelyek az ER-ről fűződnek le. Az "érő rész" olyan fehérjék raktározási helye, amelyek bizonyos sejtszervecskékbe, és a sejten kívülre fognak kerülni.



2.10. ábra. Az endoplazmatikus retikulum.



2.11. ábra. Az endoplazmatikus retikulum és a Golgi apparátus kapcsolata.

Lizoszómák

A Golgi készülékből lefűződő, 1-3 μm átmérőjű hólyagocskák. A lizoszómákat egyrétegű membrán burkolja. Legalább negyven különféle emésztő enzim van bennük. A fehérjék, nukleinsavak, lipidek és poliszacharaidok bontását végzik. A lizoszómák illetve enzimjeik fontos szereplői a programozott sejthalálnak, az apoptózisnak. Az apoptózis során sejtek pusztulnak el. (Mint pl. az ebihalak farkának sejtjei, vagy a végtagkezdemények azon sejtjei, amelyek szomszédságában az újjak fejlődnek.)

Mikroszómák

A mikroszómák 0,2-1,7 μm átmérőjű, egyetlen membránnal burkolt hólyagocskák. Az ER-ről fűződnek le. A peroxiszómák a kémiai reakciókban elkerülhetetlenül képződő toxikus peroxidokat, leggyakrabban a H_2O_2-t bontják. A glyoxiszómák a csíranövények sejtszervecskéi. Bennük alakulnak a raktározott lipidek szénhidrátokká.

Vakuólumok

Jellegztesen a növények sejtszervecskéi. Különféle anyagok vizes oldataival töltöttek, egyrétegű membránnal burkoltak. Gyakran tartalmaznak toxikus, vagy kellemetlen ízű anyagokat. Ne feledjük, hogy gyógyszereink jókora hányada a vakuólumokban raktározott anyagokból származik! Vannak tartalék-tápanyagokat raktározó vakuólumok. Vakuólumok tartalmazzák pl. a sziromlevelek színanyagát. Közismert a papucsállatka lüktető vakuóluma is, amely a felesleges vizet pumpálja ki az egysejtűből.

Az exocitózis és az endocitózis anyagok kiválasztását vagy felvételét jelenti a környezetbe, illetve a környezetből (2.11. ábra). A pinocitózis folyadék, a fagocitózis szilárd anyagok felvételét jelenti. A fagocitózis sok egysejtű lény táplálkozási módja, és az immunrendszer bizonyos sejtjeinek fontos jellegzetessége.

Sejtváz

Olyan fehérje rostok együttese, amelyek (i) biztosítják a sejt alakját és (ii) a sejten belüli elmozdulásokban játszanak szerepet. Alkotó molekuláik típusai, méretük és funkciójuk alapján négy elemük ismeretes: (1) a mikrotubulusok, a (2) mikrofilamentumok, (3) az intermediális filamentumok és (4) a mikrotrabekuláris hálózat.

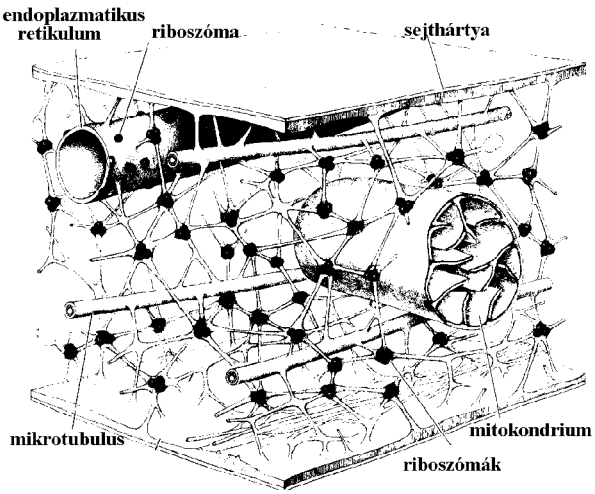
A mikrotubulusok 25 nm átmérőjű, hosszú lyukas csövecskék. Nem ágaznak el. Tubulin dimerekből (amelyek egy-egy α- és β-tubulinból állnak) képződnek polimerizációval. Szerepük közismert a sejtosztódásokban, az orsófonalak kialakulásában, az axonok és dendritek képződésében, az axoplazmatikus transzportban, a csillók és a flagellumok mozgásában, a sejtek alakváltozásában, valamint az alapi testek és a sejtközpont funkciójában.

A mikrofilamentumok 7 nm átmérőjű, aktinból és más fehérjékből álló citoplazma alkotók. A sejten belüli mozgások, a sejtek alakváltozásainak fontos résztvevői. Olyan fontos események szereplői, mint az izomösz-

szehúzódás, a citoplazma áramlás, vagy a sejtek lefűződése a sejtosztódások végén. A mikrofilamentumok nemcsak a mozgásokban, hanem a sejtszerkezet stabilizálásának is fontos elemei.

Az intermediális filamentumok 8-12 nm átmérőjű, fehérjékből polimerizációval felépülő rostos, kötélszerű, ellenálló természetű és meglehetősen stabil képződmények. (Olyan fehérjék, mint amilyenek pl. a haj, a pata, vagy a bőr alkotói.) Gyakran a sejtmaghártyához kapcsolódva rögzítik a sejtmagot (és más sejtszervecskéket is) a sejten belül. Vannak intermedier filamentumok, amelyek a jellegzetes izomszerkezetet biztosítják. Általánosságban stabilizálják a sejt struktúráitt, ellenállnak a külső erőknek. Bizonyos típusaik sejteket kötnek össze. Csak a soksejtű élőlények alkotói. Hiányoznak a gyorsan osztódó és az újonnan képződött sejtekből is.

A mikrotrabekuláris hálózat mintegy 6 nm "vastag" fehérje fonalak hálózata (2.12 ábra). Szerepe a citoplazma finom szerkezetének biztosítása, a sejtorganellumok térbeli helyzetének stabilizálása.



2.12. ábra. A mikrotrabekuláris hálózat.

Ssejtfal

A plazmamembrán külső felszínén képződik némely egysejtűekben, gombákban és növényekben. Korlátozza a víz be- és kiáramlását a sejtekbe és a sejtekből. Elsősorban cellulóz, lignin és szuberin alkotja. A sejtfalon ún. plazmadezmaták ívelnek át: plazmahidacskák, amelyek kapcsolatot teremtenek a növény sejtjei között. A gombák sejtfalát kitin alkotja, amint a rovarok külső vázát is.

Riboszóma

A fehérjeszintézist megvalósító képződmények. (A riboszómákkal részletesebben egy külön fejezet anyaga foglalkozik.)

A többsejtű élőlények kialakulása

A soksejtűek kialakulása kb. 700 millió éve kezdődött, a légkör oxigén tartalmának növekedtét követően (1.4. ábra). Bizonyos, hogy a többsejtű élőlények az eukariota egysejtűekből fejlődtek, többféle mechanizmus szerint. (1) Egyetlen sejt utódsejtjei együtt maradtak, kolóniát képeztek, majd differenciálódtak. A sejtek közötti munkamegosztás biztosította a kolónia jó alkalmazkodó képességét. (2) Soksejtűek képződhettek úgy is, hogy egy sokmagvú sejtből sok egymagvú képződött, differenciálódott. Ma is élnek mindkét típusra jellemző élőlények. Bizonyos, hogy a soksejtűség olyan, korábban ismeretlen génfunkciók kialakulását feltételezi, mint amilyenek pl. a sejtek együt tartásához, kommunikációjához vagy a sejtdifferenciációhoz szükségesek.

ÖSSZEFOGLALÁS

A sejt minden élőlény létezésének elemi feltétele. A sejtek közös tulajdonsága, hogy bennük jellegzetes felépítésű makromolekulák látnak el szerkezeti, enzimatikus és információt tároló feladatokat. A prokariota sejtek látszólag egyszerűbb, az eukarioták a kompartmentalizáció következtében bonyolultabb szervezettségűek. Mindkét sejttípus az evolúció győztese: olyan funkciók ellátására alkalmasak, amelyek kb. 4 milliárd éve biztosítják az élet folyamatosságát a változó életfeltételek közepette.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 9. kiadás, 21-148, 2011.
2. Karp, G., Cell and molecular Biology, 3-78, 2008.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 1-29, 371-379, 2007.
4. Alberts, B. és mtsi. Essential Cell Biology, 1-112, 2004.

3. KEMOSZINTÉZIS, FOTOSZINTÉZIS ÉS LÉGZÉS

A korai földi körülmények. A sejtek anyag- és energia-ellátása. Kemoszintézis. Foto- és oxidativ foszforiláció. Fény- és sötétreakciók. Glükolízis, fermentáció és sejtlégzés. Az energiatermelés strukturális alapjai.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

Az élőlények létezéséhez elengedhetetlen (i) a testüket felépítő anyagok, valamint (ii) az életfolyamataikhoz szükséges energia. Az *autotróf* élőlények energiájukat vagy a természetben rendelkezésre álló kémiai energiából (a kemoszintetizálók), vagy a fényenergiából nyerik (a fotoszintetizálók), a testüket felépítő molekulákat pedig szervetlen anyagokból állítják elő: a CO_2 redukciójával szénhidrátokká. A *heterotróf* élőlények az autotrófok által készített szerves anyagokat használják fel, mind energiaforrásként, mind pedig testépitő anyagként (3.1. táblázat).

3.1. táblázat. Az élőlények osztályozása anyag- és energiaforrásuk szerint.

Az élőlény típusa	Testépítő anyagok	Energia-forrás	Élőlény
Autotróf	CO_2 + H	Kémiai	Baktériumok
		Fény	Baktériumok Algák Növények
Heterotróf	Szerves	Szerves	Baktériumok Gombák Állatok

Anyagcsere a korai földi körülmények között

Az első élőlények az ősóceán szerves anyagát használták anyag- és energiaforrásként. Mivel a Föld légkörében nem volt oxigén, az első élőlények bizonyosan anaerobok voltak. Energiájukat olyan mechanizmusokkal állíthatták elő, mint pl. a glükolízis vagy a fermentáció. A prebiotikus eredetű szerves anyagok fogytán az élőlényeknek új energia-, valamint építőanyag forrásokat kellett találniuk.

KEMOSZINTÉZIS

Az aktív vulkani tevékenység bőségesen ellátta az ősi Föld légkörét CO_2-al, H_2-vel, CH_4-el és H_2S-el. Az ősóceán vizében bőségesen volt NH_3, nitrát, CO_2, szulfátok és foszfátok. Kezdetben a légkör és a vizek CO_2 koncentrációja a mainak többszöröse volt. (Anaerob körülmények között a hidrogén tartalmú vegyületekből is sokkalta több volt, mint napjainkban. Ma, amikor a levegő O_2 koncentrációja 21%, az O_2 gazdag feltételek kedveznek a hidrogén tartalmú vegyületek oxidációjának). Az ősóceán szerves anyaga-inak fogytával a kemoszintetizáló élőlények élhettek tovább. Azok, amelyek CO_2-ből és H_2-ből szerves anyagokat állítanak elő kémiai eredetű energia befekte-tésével a következő általános séma szerint:

$$\mathbf{CO_2 + H_2X + ENERGIA \rightarrow CH_2O + H_2O + X,}$$

ahol H_2X a hidrogéndonor, X a hidrogént vesztett (oxidálódott), CH_2O a képződő szerves vegyület jele. A kemoszintetizáló élőlények szervetlen vegyületek oxidálása során nyerik azt az energiát, aminek egy részét életfolyamataikhoz, a többit szerves alkotóik szintézisére használják.

Kemoszintézis anaerob körülmények között

A mai anaerob kénbaktériumok energiatermelő folyamata olyan, mint őseiké lehetett kb. 3-4 milliárd éve, és a következő reakció szerint történik:

$$H_2S \rightarrow S + \text{energia}$$

Kemoszintézis aerob körülmények között

Kemoszintetizáló baktériumok ma is élnek. Az aerob kemoszintetizáló baktérium fajok a légköri O_2-t használják szervetlen anyagok oxidálására és energiatermelésre. A legfontosabb példák a következők.

- Az aerob kénbaktérium fajok az elemi ként oxidálják:

$$S + O_2 \rightarrow SO_2 + \text{energia (1230 kJ/mol)}$$

- A nitrifikáló baktériumok ammóniát oxidálnak nitrátokká:

$$NH_3 + O_2 \rightarrow NO_3 + \text{energia (619 kJ/mol)}$$

  A nitrifikáló baktériumok mezőgazdasági szerepe kiemelkedő, mert hektáronként évente kb. 200 kg nitrátot készítenek. A nitrátok a növények egyedüli nitrogén forrásai.

- A metánbaktériumok metánt égetnek el, csökkentve a metán szerepét az üvegház hatásban:

$$CH_4 + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + \text{energia}$$

- A durranógáz baktériumok hidrogént égetve termelnek energiát:

$$H_2 + O_2 \rightarrow H_2O + \text{energia}$$

- A vasbaktériumok az $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ oxidáció során felszabaduló energiát hasznosítják. Leggyakrabban vízvezeték rendszerekből kikerülő barna lepedékként láthatjuk őket.

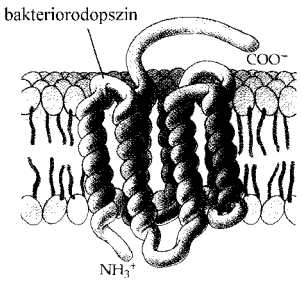
A kemoszintézis folyamán megtermelt energia mennyisége bár csekély, a kemoszintetizáló baktériumok megelégszenek vele. A kemoszintetizáló élőlények benépesítik az olyan sötét, vagy fényszegény élettereket, amelyekben oxidálható szervetlen molekulák állnak rendelkezésükre. (A CO_2 mennyisége szinte sohasem korlátozza a kemoszintetizálók életét.) Ismerünk olyan élőlényeket, mint pl. a *Scenedesmus* zöldalga, amely fényben fotoszintetizál, sötétben pedig úgy termeli az energiát, mint a durranógáz baktériumok, létezése arra utal, hogy a fotoszintetizáló élőlények a kemoszintetizálókból fejlődtek.

FOTOSZINTÉZIS

A fotoszintézis az a biológiai folyamat, amely során az élőlények a fényenergiát energiaforrásként hasznosítják (i) az életműködésükhöz, valamint (ii) a szervetlen CO_2 redukciójára (fixálására) szerves anyagokká. A fotoszintézis az evolúció óriási "találmánya": megoldás a Napból fény formájában érkező, jószerivel korlátlanul rendelkezésre álló energia hasznosítására. Közvetve a fotoszintézis teszi lehetővé a heterotróf élőlények létezését is. A fotoszintézisnek anaerob körülmények között egy "egyszerűbb", aerob körülmények között egy bonyolultabb formája hasznosítja a fényenergiát.

A fotoszintézis legegyszerűbb típusa

A fotoszintézis "legegyszerűbb" típusa azokban az archebaktériumokban folyik, amelyek magas sótartalmú helyeken élnek, és amelyek a fényenergiát az ún. bakteriorodopszinnal hasznosítják. A bakteriorodopszin egy membránba épült fehérje féleség (3.1. ábra). Kísértetiesen hasonlít az állatvilágban a fény érzékelésére használt rodopszinra. Az egyébként heterotróf halobaktériumok oxigén szegény környezetben a bakteriorodopszint használva állítanak elő ATP-t: a fény energiájával protonokat "szivattyúznak" ki a sejtből. A sejtbe visszaáramló protonok energiája épül be ATP-be.



3.1. ábra. A bakteriorodopszin a halobaktériumok membránjába épült fehérje.

Fotoszintézis anaerob körülmények között

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok oxigénmentes környezetben élnek, és a következő általános séma szerint redukálják a CO_2-t szerves anyagokká:

$$\mathbf{CO_2 + H_2X + energia \rightarrow CH_2O + H_2O + X,}$$

ahol H_2X a hidrogén donor. Az anaerob fotoszintézisnek ma három típusát ismerjük: (1) zöld kénbaktériumok, (2) bíbor kénbaktériumok, valamint (3) bíbor nemkénbaktériumok. Legfontosabb fotoszintetikus pigmentjük a bakterioklorofill, amely mellett vörös és sárga karotenoidokat, ún. járulékos pigmenteket is tartalmaznak. A járulékos pigmentek olyan hullámhossz tartományban abszorbeálnak fényenergiát, amelyeknél a bakterioklorofill nem. Gerjesztési energiájukat átadják a bakterioklorofillnak, javítva a fényenergiahasznosítás hatékonyságát. A pigmenteket a sejthártyáról a citoszolba betűremkedő tilakoidok tartalmazzák (2.2. ábra).

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumoknak csak egyfajta pigmentrendszerük van. (A pigmentrendszer olyan pigment molekulák együttese, amelyek a rekaciócenrumhoz továbbítják gerjesztési energiájukat.) A rekaciócentrum pedig olyan bakterioklorofill molekula, amely speciális fehérje molekulának adhatja át egyik elektronját. A tilakoidok része az a fehérje molekulákból álló elektrontranszport lánc, amely prtotonokat szivattyúz ki a sejtekből. A sejtekbe visszaáramló protonk energiája raktározódik ATP-ben. A megtermelt ATP-t a baktériumok részben életfolyamataikhoz, részben pedig a CO_2 redukálására használják. A zöld, valamint a bíbor kénbaktériumok H_2S-ből nyerik a hidrogént, amit NADPH formájában használnak a CO_2 redukciójára (3.6. ábra). Melléktermékként elemi ként választanak ki. A bíbor nemkén-baktériumok vagy H_2-t használnak, vagy szerves vegyületekből (pl. etanol, tejsav) nyerik a hidrogént.

Az anaerob fotoszintetizáló baktériumok 3,4 milliárd éve olyan bőségesen éltek, hogy elszenesedett (részlegesen lebomlott) maradványaikból akkora szén telepek képződtek, mint a fásszárú növényekből 3 milliárd évvel később.

Fotoszintézis aerob körülmények között

Az aerob fotoszintézis hidrogén forrásként a vizet használja. A víz bontása során melléktermékként O_2 szabadul fel. A vízbontás képességére először a cianobaktériumok tettek szert 3-3,3 milliárd éve. Az O_2 megváltoztatta a Föld légkörét, klímáját. Megnyitotta az utat az aerob légzés, az oxigén használatán alapuló hatékony energiatermelés előtt. Az O_2 teremtett lehetőséget az ózónpajzs kialakulására, és arra, hogy az élőlények a földfelszínt élettérként elfoglalják. Elsősorban a fotoszintézis vonta ki a CO_2 döntő többségét a légkörből. A kivont szén szerves anyagok és üledékek alkotója lett. Ma a légkör 78%-a N_2, 21%-a O_2, és csak 0.03%-a CO_2. (A levegő csak nyomokban tartalmaz más alkotókat.) A Föld átlagos hőmérséklete +17°C. (Légkör nélkül -18°C lenne.) Az élet nélküli Föld légköre olyan forró lenne, mint a Vénuszé, 95% CO_2-al és 3%-nyi N_2-el.

A fotoszintetizáló élőlények a fény energiáját (1) ATP előállítására és (2) a CO_2 redukálására (fixálására) használják a következő reakció szerint:

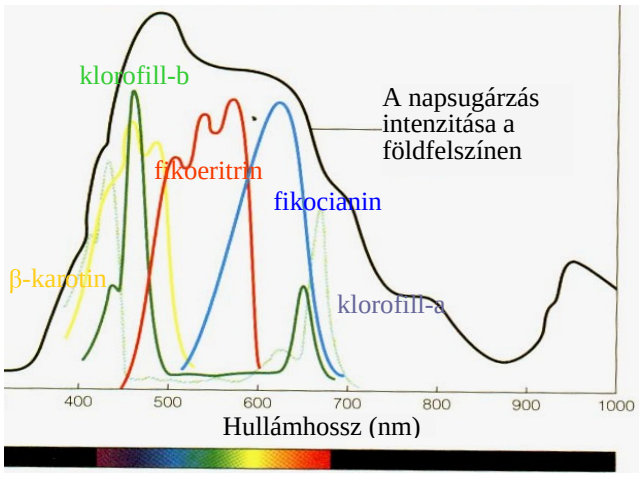
$$\mathbf{6CO_2 + 12H_2O^* + energia\ (2824\ kJ/mol) \rightarrow}$$
$$\mathbf{C_6H_{12}O_6 + 6O_2^* + 6H_2O}$$

(A *jel azt mutatja, hogy az O_2 a vízből képződik a víz fotolízise során.)

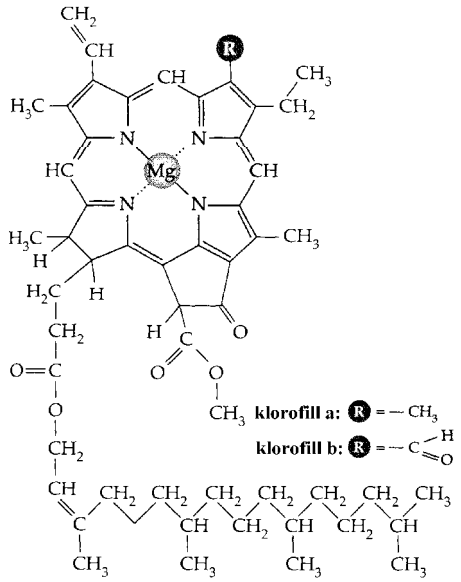
A fotoszintézis mechanizmusa

A fotoszintézis a tilakoidokban történik (2.9. ábra). A tilakoidok az algákban és a növényekben a kloroplasztok részei. A fényt a tikaloid membránokba ágyazott fotoszintetikus pigmentek abszorbeálják (3.2. és 3.3. ábra). A fotoszintetikus pigmentek abban a hullámhossz tartományban abszorbeálják a fényt, amely eléri a Föld felszínét. A klorofillok mellett ún. járulékos pigmentek segítik a fény hasznosításának hatékonyságát, a karotinok és a fikobillinek. (A cianobaktériumokban a fikocianin, a vörös moszatokban a fikoeritrin). A pigmentek pigmentrendszereket alkotnak, bennük egy-egy reakciócentrummal. A reakciócentrum olyan klorofill-a molekula, amely speciális membránfehérjével kapcsolódik. A membránfehérje veszi át a reakció-

centrum gerjesztési energiáját, és biokémiai folyamatok sorozatát indítja el. A pigmentrendszereknek, összetételüknek és funkcióiknak megfelelően két típusa van. (Lásd később.)



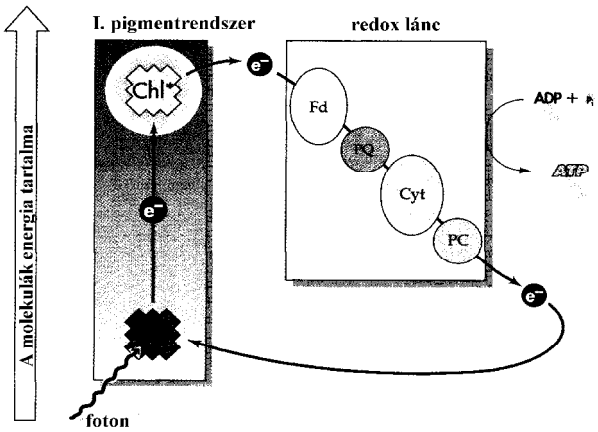
3.2. ábra. A fotoszintetikus pigmentek abszorpciós spektruma.



3.3. ábra. A klorofill molekulák szerkezete. A klorofillok hosszú szénhidrogén lánccal illeszkednek a foszfolipid membrán hidrofób részébe. A klorofill gyűrűje hasonló a hemoglobin és a citokrómok hem csoportjához.

A ciklikus fotofoszforiláció

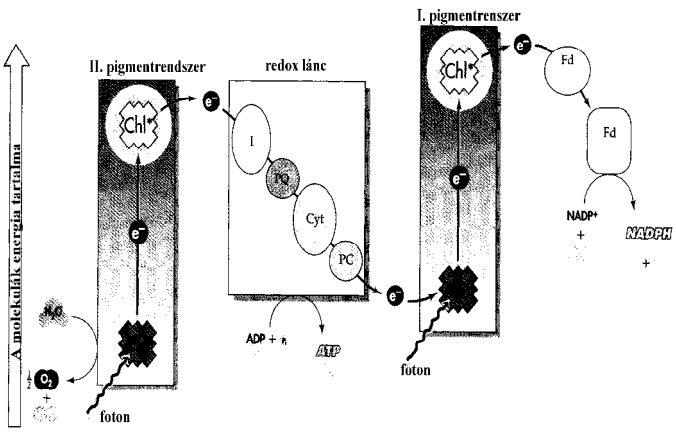
A ciklikus fotofoszforiláció során a fényenergia felhasználásával csak ATP képződik. A ciklikus fotofoszforilációban csak az 1-es pigmentrendszer vesz részt (3.4. ábra). Gerjesztett klorofilljának elektronja (az energia hordozója) a tilakoid membránokba ágyazott fehérjékre jut. A fehérjék egy oxidációs-redukciós láncot alkotnak, amelyen át az elektron visszajut a reakciócentrumba. Vándorlása közben az elektron elveszti energiáját. Az elektron energiája olyan proton pumpákat működtet, amelyek tevékenysége nyomán a tilakoidok belsejében nő a H^+ ion koncentráció. A tilakoidok belsejéből kiáramló protonok energiáját az ATP szintetáz gyűjti össze és raktározza ATP-ben az ADP + P_i + energia = ATP rekació folyamán. (Ahol P_i a szervetlen foszfát jele.)



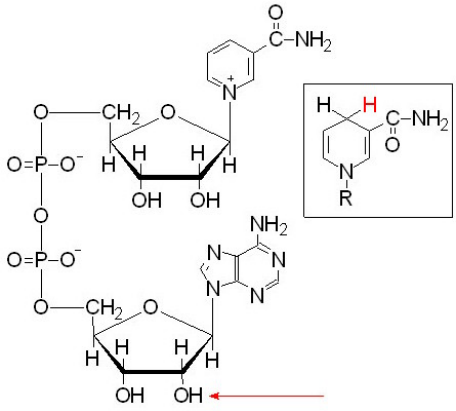
3.4. ábra. A ciklikus fotofoszforiláció során a fény energiája ATP-ben raktározódik.

A nemciklikus fotofoszforiláció

A nemciklusos fotofoszforiláció folyamán nem csak ATP képződik, hanem NADPH is (3.5. ábra). Az I. pigmentrendszer elektronja nem kerül vissza a pigmentrendszerre, hanem a $NADP^+$-t redukálja NADPH-vá (3.5. és 3.6. ábra). Az "elveszett" elektront a II. pigmentrendszerből származó elekron pótolja. A II. pigmentrendszer elektronja a vízbontás során képződő hidrogénből származik (3.5. ábra). A vízbontás során hidrogén és O_2 képződik, az O_2 - mint valamilyen melléktermék - kiválik. A hidrogén elektronjai a rekaciócentrumok és az elektrontranszport lánc komponensek között vándorolnak, elválasztódva az elektronokat a protonoktól (H^+). Az elektronok vándorlásához szükséges energiát a pigmentek által elnyelt fény energiája biztosítja. Végeredményben a II. pigmentrendszer, a víz bontása és az O_2 képződés nyomán a nemciklikus fotofoszforiláció változtatta meg a Föld arculatát.



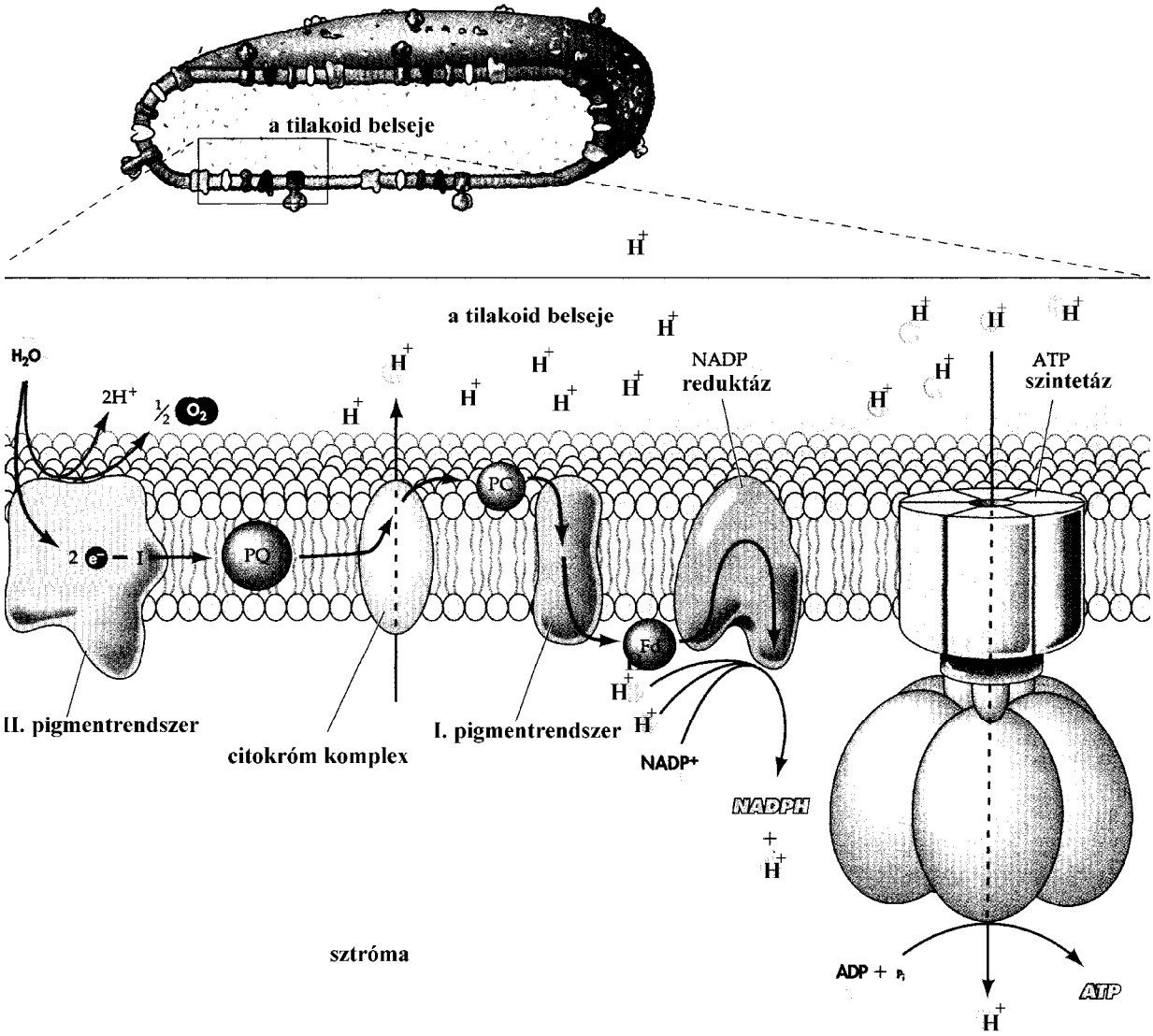
3.5. ábra. A nemciklikus fotofoszforiláció eredményeként a fény energiája ATP-ben és NADPH-ban raktározódik, melléktermékként pedig O_2 képződik.



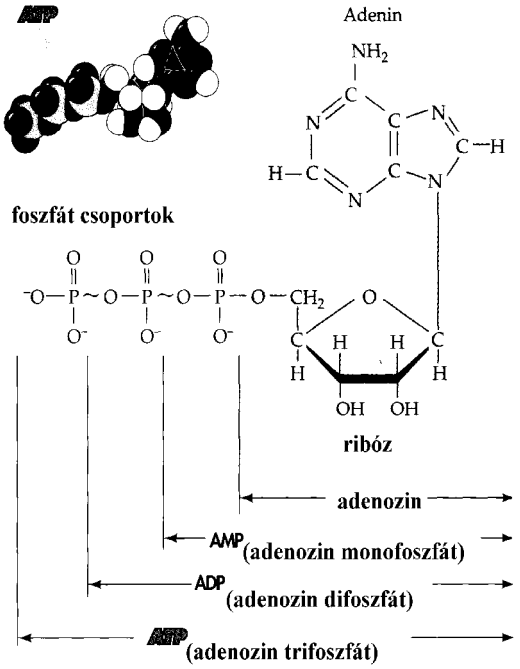
3.6. ábra. A NAD^+ (nikotinamid dinukleotid) szerkezete. A bekeretezett rész a redukált (NADH) formát ábrázolja. A NADP-ben a ← nyíllal jelölt helyen foszfát csoport van. A NAH és a NADP a legfontosabb és leggyorsabb elektronadók/kapók a biokémiai reakciókban. A NAD^+ többnyire a bontó, a NADP az építő rekaciók résztvevője.

Az ATP-képződés strukturális alapjai

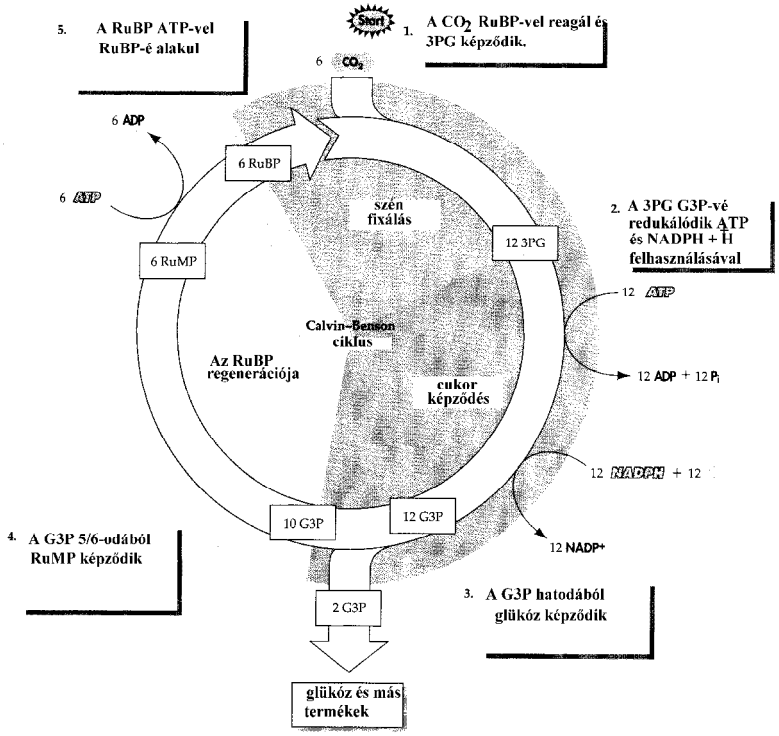
A víz bontása a tilakoid belsejében történik (3.7. ábra). Az elektron a II. pigmentrendszert elhagyva a membránba épült elektron transzport láncon át az I. pigmentrendszerre jut. Mindeközben a citokróm komplex - az elektron energiáját felhasználva - protonokat pumpál a sztrómából a tilakoid belsejébe. Az elektron az I. pigmentrendszerben ismét energiát gyűjt, és végül a $NADP^+$-re jut, azt NADP-vé redukálja. A fotoszintézis fényreakciói során a tilakoid belsejében protonok halmozódnak fel (csökken a pH). A protonok, koncentrációjukat kiegyenlitendő, a tilakoid belsejéből a sztrómába igyekeznek. Útjuk a tilakoid membránba épült csatornán át vezet. A csatorna az ATP szintetáz, egy olyan enzim, amely a protonok energiáját ATP-be építi (3.7. és 3.8. ábra).



3.7. ábra. A kloroplasztokban az ATP az ún. kemiozmotikus mechanizmus szerint képződik.



3.8. ábra. ATP.

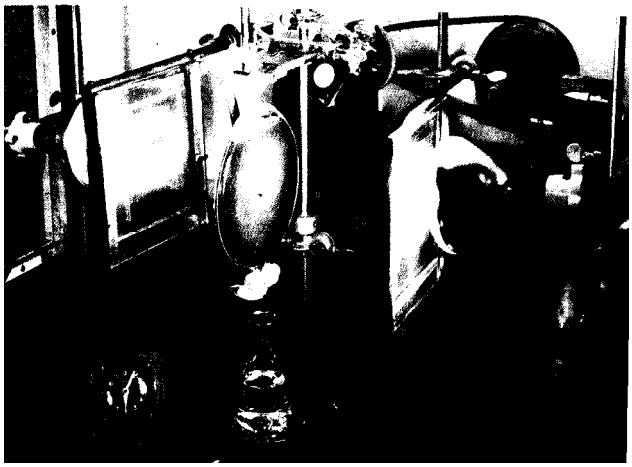


3.9. ábra. A Calvin-Benson ciklus sematikus ábrázolása.

A fotoszintézis biokémiája

A Calvin-Benson ciklus

A nemciklikus fotofoszforiláció során a kloroplasztok sztrómájában ATP és NADPH halmozódik fel, olyan molekulák, amelyek energiatartalma magas, és amelyek a CO_2 szükségesek a redukciójához. A CO_2 redukciója és a szerves anyagok szintézise a fotoszintézis sötét reakciói, az ún. Calvin-Benson ciklus során történik (3.9. ábra). A folyamat részlet kiderítendő, Melvin Calvin és munkatársai egy vékony üvegpalackba fotoszintetizáló algákat tettek. A palackba a szén sugárzó izotópját tartalmazó $^{14}CO_2$-t vezettek (3.10. ábra). A palackot erős fénnyel világították meg, hogy elkezdődjön a fotoszintézis. A palackból mintát engedtek forró alkoholba, hogy leállítsák a fotoszintézist és hogy kioldják a fotoszintézis termékeit. A minta komponenseit papírkromatográfiával elválasztották és autoradiográfiával tették láthatóvá. Amint azt a 3.11. ábra mutatja, a ^{14}C már 30 másodperc multán sokféle szerves anyagnak volt alkotója. Mindössze két másodperc elteltével már féltucatnyi szerves komponens volt radioaktívan jelölt. Az első radioaktívan jelölt anyag a 3-foszfoglicerinaldehid (PGA). A PGA a glükolízisnek is az egyik közti terméke, jelezve, hogy a fotoszintézis és a glükóz lebontása hasonló folyamatok. A Calvin-Benson ciklus részleteivel a biokémia tantárgy foglalkozik. Itt csupán azt említjük meg, hogy a Calvin-Benson ciklusban a fotoszintézis fényreakcióiban megtermelt ATP és NADPH+H^+ felhasználásával PGA-t állít elő. A PGA-ból glükóz és más olyan szerves anyagok képződnek, amelyekből (i) a fotoszintetizáló élőlények felépítik testüket és (ii) energiát is nyerhetnek. Lényegében a fotoszintetizáló (= fotoautotróf) élőlények által előállított szerves anyagok adják minden heterotróf élőlény életének az alapját.



3.10. ábra. Berendezés a fotoszintézis sötét reakcióinak tanulmányozásához.

3.11. ábra. A fotoszintézis termékeinek azonosítása papirkromatográfiával és autoradiográfiával.

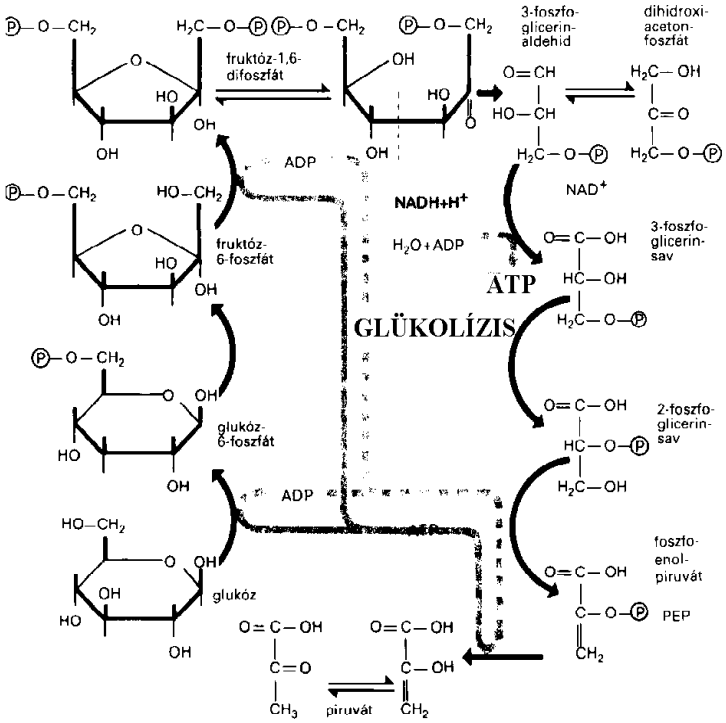
ENERGIATERMELŐ FOLYAMATOK

A sejtek a glükózban (vagy más szerves anyagban) raktározott energiát a körülményektől függően vagy (1) a glükolízis és a fermentáció, vagy (2) a glükolízis és a sejtlégzés folyamán szabadítják fel. A szerves molekulák lebontása során képződhetnek azok az anyagok is, amelyek vagy közvetlenül, vagy átalakítások után használhatók a test építésére.

Az energiatermelő folyamatokban lényegében a szerves anyagok oxidációja következik be. Az energiatermelés apró, egymásba kapcsolódó enzimatikus lépésekből áll. A szerves anyagok oxidációja nyomán felszabaduló energia ATP-ben raktározodik. Az ATP-ben raktározott energia a legkönnyebben hozzáférhető az életfolyamatokhoz. Hosszabb távra az élőlények makromolekulákban tárolnak energiát. A fontosabb szerves vegyületek energia tartalma a következő: a szénhidrátoké 17,2, a fehérjéké 17,2, a zsíroké 39,9 kJ/g (vagy 4,1, 4,1 és 9,3 kcal/g). Természetesen a hosszútávú energiaraktározók energia tartalma visszaalakítható ATP-be.

Glükolízis

A glükolízis (a glükóz bontása) az energiafelszabadító mechanizmusok legősebbike. A glükolízis a citoszolban, a citoplazma folyékony részében történik. A glükolízis során a glükóz csak részlegesen bomlik le: egy glükóz molekulából két piroszőlősav (piruvát) molekula képződik, valamint NADH (3.12. ábra). A glükolízis lényegében előkészítő lépés vagy a fermentációra, vagy a sejtlégzésre. A glükolízis folyamán, miközben egyetlen glükóz molekula két piroszőlősav molekulára bomlik, mindössze két ATP képződik. A glükolízis energiahozama csekély, mindössze 586 kJ/mol. (A glükolízis részleteivel a biokémia tantárgy foglalkozik.)



3.12. ábra. A glükolízis lépései.

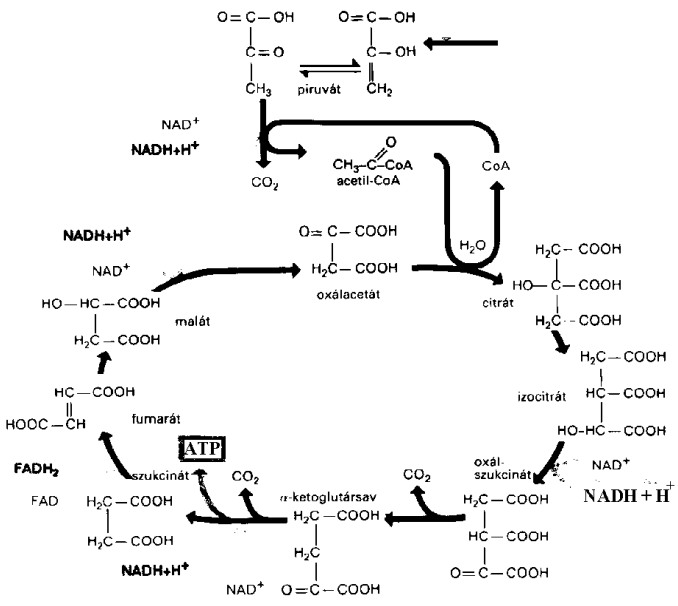
Fermentáció

Anaerob, vagy csak kevés oxigént tartamazó környezetben (alkalmasint a vázizmokban is) a glükolízis a legfontosabb energatermelő folyamat. A glükoilízis folyamán képződő piroszőlősav a citoszolban etanollá fermentálódik, erjed (mint pl. az élesztőkben): a piroszőlősavból CO_2 hasad ki és acetaldehid képződik. Az acetaldehid NADH felhasználásával etilalkohollá redukálódik, miközben NAD^+ képződik. A NAD^+ a glükolízis folytatásához szükséges. A vázizmokban az erjedés végterméke a tejsav és a NAD^+. (A tejsavtól érzünk izomlázat.)

A piroszőlősav átalakulása alkohollá vagy tejsavvá az erjedés során nem jár további energia felszabadulásával, csupán úgy hangolja át a sejtanyagcserét, hogy a glükolízis intenzitása az aerob körülmények közöttinek tízszeresére fokozódik. Végeredményben tehát a glükolzis, a fermentációval kiegészítve, jelentős mennyiségű energia felszabadulásával járhat. Ám a glükolízis és a fermentáció végtermékei még energiában gazdag vegyületek. Az idegsejtekből, nem úgy mint a vázizom sejtekből, hiányzik az az enzimrendszer, amely a fermentációhoz szükséges. Következésképpen az idegsejtek módfelett érzékenyek az oxigén hiányára, és oxigén hiányában elsőként éppen az idegsejtek halnak el.

Sejtlégzés

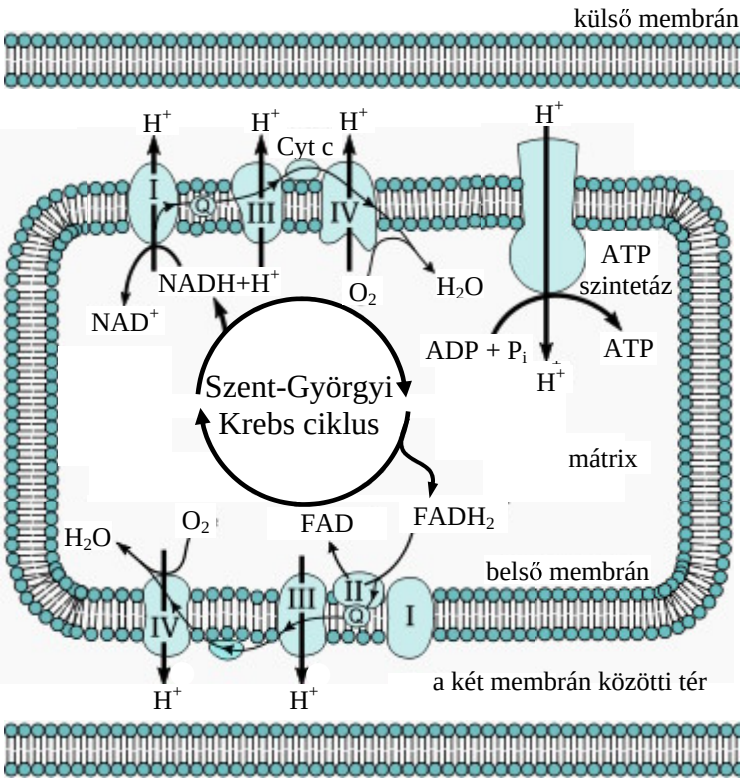
A sejtlégzés lényegében azt jelenti, hogy a szerves anyagok hidrogénje a légkörből származó oxigénnel egyesül, és miközben energia szabadul fel, CO_2 és H_2O képződik. A reakció lényegében a fordítottja annak, amellyel a fotoszintézis tanulmányozása során megismerkedtünk. A sejtlégzés során felszabaduló energia ATP-ben raktározódik. (Az ATP a sejtek legfontosabb energiaforrása. Az ATP egy szervetlen foszfát ionjának lehasításakor 30,6 kJ/mol energia szabadul fel, miközben ADP és P_i képződik. Hogyan képződik ATP a sejtlégzés folyamán?



3.13. ábra. A Szent-Györgyi-Krebs ciklus lépései.

A glükolízis eredményeként képződő piroszőlősav molekulák rövid úton a mitokondriumokba jutnak, ahol CO_2-vé és H_2O-vá oxidálódnak. (A fotoszintézis kiindulási anyagaivá.) A piroszőlősav az ún. Szent-Györgyi-Krebs (citromsav, trikarbonsav) ciklusban, egymást követő enzimatikus lépések során fokozatosan bomlik le, miközben CO_2 hasad ki és NADH képződik (3.13. ábra.) (A Szent-Györgyi-Krebs ciklussal részletesen a biokémia foglalkozik.)

A Szent-Györgyi-Krebs ciklus a mitokondriumok belsejében (a mátrixban) zajlik. A ciklusban résztvevő csaknem minden enzim a matrix része. A képződő NADH elektronját a mitokondrium belső membránjába beágyazott ún. légzési lánc első tagjának, a NADH-Q reduktáznak adja át (3.14. ábra). Az elektron tovább „csorog" az oxidációs-redukciós elemekből álló ún. légzési láncon, egészen az O_2-ig, a rendszer legerősebben oxidáló eleméig (3.14. ábra). Az O_2 átveszi az elektronokat, majd protonokat vesz fel a matrixból, és közben vízzé alakul. Megjegyzendő, hogy az O_2 általában bőségesen rendelkezésre áll. A végtermék víz nem toxikus, könnyen eltávolítható, mint ahogy a CO_2 is.



3.14. ábra. A légzési lánc a mitokondrium belső membránjában, valamint az ATP képződés kemiozmotikus mechanizmusa.

Az ATP képződés strukturális alapjai

A légzési lánc elemei, miközben elektronokat továbbítanak, H^+-t pumpálnak a mitokondrium belső membránján át a mitokondrium belsejéből a két membrán közötti térbe (3.14. ábra). A légzési lánc funkciójának eredményeként csökken a mitokondrium két membránja közötti tér pH-ja. Az ún. kemiozmotikus modell értelmében (Peter Mitchell, 1961) a H^+ ionok a mitokondrium belsejébe igyekeznek diffundálni. A H^+ ionok diffúziója egy csatornán keresztül valósul meg. A csatorna a belső mitokondrium membrán része. Valójában az ATP szintetáz nevű enzimkomplex, amely a H^+ ionok energiájával az ADP + P_i = ATP reakcióban ATP-t szintetizál. A folyamatot oxidatív foszforilációnak is nevezik. Vegyük észre, hogy a sejtlégzés lényegében a fotoszintézis fordított folyamata. Nem nagy bátorság kijelenteni, hogy a heterotróf élőlények életműködésükhöz közvetve a Nap energiáját használják.

[Tudnivaló, hogy a mitokondriumok belső membránjában vannak olyan nyitható/zárható csatornácskák, amelyeken a H^+ ionok az ATP szintetáz csatona megkerülésével juthatnak be a mitokondriumok belsejébe. A "menedék" csatornákon átáramló H^+ ionok energiája hővé alakul. A "menedék" csatornák állatokban elsősorban az ún. barna zsírszövet sejtjeiben gyakoriak, és a hőgazdálkodás fontos tényezői. Bizonyosra vehető, hogy a kóros elhízás kapcsolatban van a "menedék" csatornák gentikailag hibás funkciójával.]

A Szent-Györgyi-Krebs ciklus és az aerob légzés sok baktériumfaj sejtjeiben zajlik, és ATP is képződik, annak ellenére, hogy a baktériumokban nincsenek mitokondriumok. Az aerob légzéssel energiát termelő baktériumokban olyan membránok vannak, amelyek kísértetiesen hason-lítanak, és úgy is funkcionálnak, mint a mito-kondriumok belső membránja.

Vannak anaerob körülmények között élő, és lélegző baktériumok is. Ők nem az O_2-re, hanem kémiailag kötött oxigénre továbbítják elektronjaikat. Példaként említjük

- a szulfát redukáló baktériumokat

$$Na_2SO_4 + H_2 \rightarrow Na_2S + H_2O + \text{energia},$$ és a

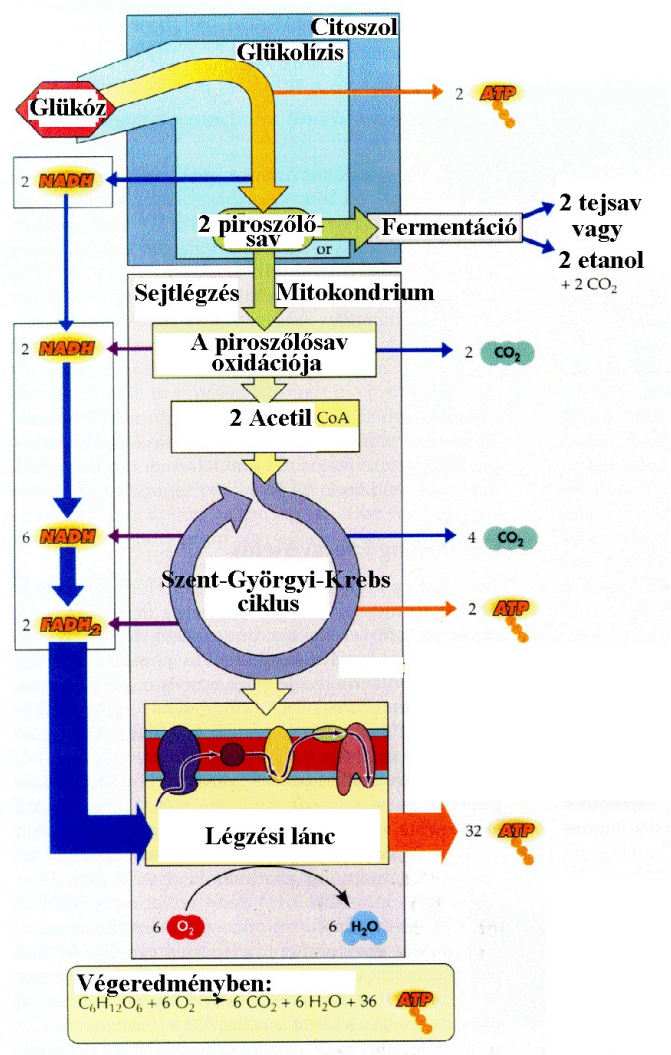
- denitrifikáló baktériumokat

$$NO_3 + H_2 \rightarrow N_2 + H_2O + \text{energia}$$

A denitrifikáló baktériumok a termőtalajnak azt a nitrát tartalmát használják el, amely a növények egyetlen nitrogén forrása, komoly károkat okozva a mezőgazdaságnak. A denitrifikáló baktériumok legnagyobb ellensége a szántás...

A sejtek energiagazdálkodásának hatékonysága

Egy mol glükóz elégetése során (O_2-ben) 2870 kJ energia képződik. A glükóznak a sejtjeinkben történő elégetése folyamán 36 ATP molekula képződik: kettő a glükolízis, 34 a sejtlégzés folyamán (3.15. ábra). A glükolízisben a glükóz energiatartalmának mindössze 5,5%-a szabadul fel. A glükolízis és a sejtlégzés során képződő ATP molekulák energia tartalma 1807 kJ, vagyis a magasabbrendű élőlények a glükóz energiatartalmát 63%-os hatékonysággal hasznosítják.



3.15. ábra. A glükózbontás lépéseinek sematikus ábrázolása, különös tekintettel az ATP képződére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az autotróf élőlények az életfolyamataikhoz szükséges energiát szervetlen anyagok oxidációja során vagy fényenergiából nyerik. A heterotróf élőlények úgy tesznek szert energiára, hogy főleg a fotoszintetizálók által előállított szerves anyagokat bontanak le. Az ATP-ben raktározott energia termelése protonoknak membránokon történő átáramlásával kapcsolatos. Az autotróf élőlények az energia egy részét a CO_2-nak szerves anyagokká történő redukálására használják. A cianobaktériumok, az algák és a növények a CO_2 redukciójához a hidrogént a víz fotolíziséből nyerik. A fotolízis melléktermeke az az O_2, amely egyben a sejtlégzés alapja. Lehetővé teszi, hogy a heterotróf élőlények közvetve a Nap enregiáját hasznosíthassák életjelenségeikhez.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 9. kiadás, 48-208, 2011.
2. Karp, G., Cell and Molecular Biology, 179-238, 2008.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 479-532, 2007.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 427-496, 2004.

4. DNS, GÉN, GENOM, KROMOSZÓMÁK.

Minden élőlény örökítő anyaga DNS. A DNS szerkezete, szekvenálása. Genom és genom projektek. Kromatin, a kromoszómák szerveződése. Kariotípus.

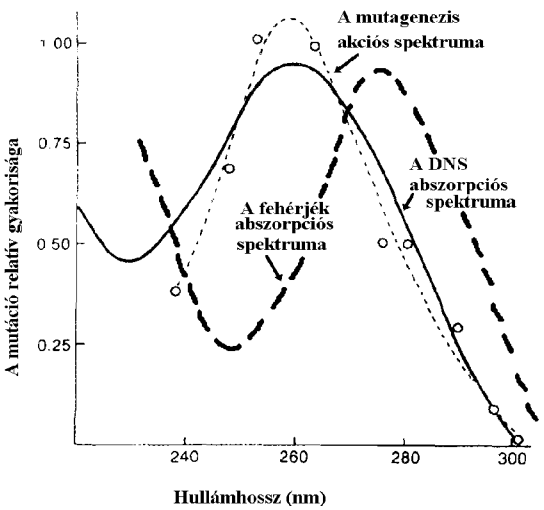
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

Az örökítő anyag létezésére, jelentőségére csak a 19. század végén kezdtek gondolni a kutatók. Nyilvánvaló, hogy az örökítő anyagnak négy fontos ismérve van: (1) a **replikáció** (másolódás) képessége, (2) a **mutáció** (változás) képessége, (3) a **funkció**, amellyel meghatározza az élőlények öröklődő tulajdonságait, szabályozza a sejtek működését, valamint (4) biztosítja az élővilág **komplexitását**, sokféleségét. A 20. század első felében vált nyilvánvalóvá, hogy az örökítő anyag része a kromoszómáknak. A kromoszómák anyaga, a kromatin, DNS és fehérjék együttese. Vajon a DNS vagy a fehérje az örökítő anyag? Az 1930-as években, miközben már ismert volt a fehérjék sokfélesége, a DNS egyszerűnek tűnt. P. A. Levene szerint a DNS-ben az A:T:C:G bázisok aránya 1:1:1:1, és a DNS valójában négy egységből álló tetranukleotid. Levene szerint csak $4^4 = 256$ féle DNS létezhet, vagyis a DNS nem lehet az örökítő anyag. Nem meglepő, hogy az 1950-es évekig általános volt a tévhit: a fehérje az örökítő anyag.

A DNS az örökítő anyag

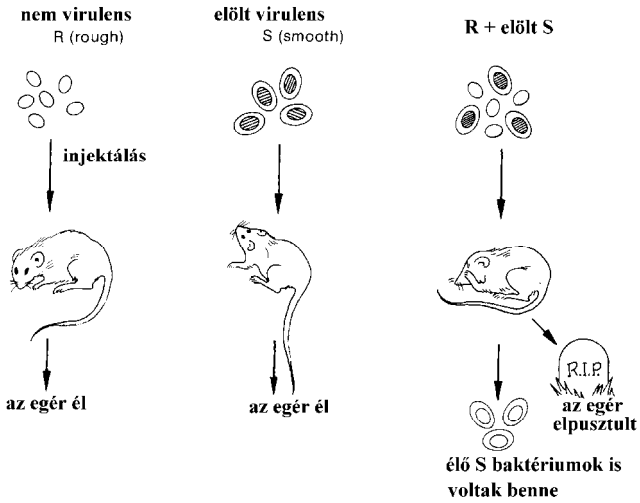
A következőkben négy kísérlettel ismerkedünk meg, amelyek az örökítő anyag különböző ismérvei alapján bizonyítják, hogy a DNS az örökítő anyag.



4.1. ábra. A mutációk indukciójának akciós spektruma a DNS abszorpciós spektrumára hasonlít.

1. L. J. Stadler és F. M. Uber (1942) kukorica virágporszemeket sugárzott be különböző hullámhosszúságú ultraibolya (UV) sugárzással. Az UV a mutációk indukciójára képes *mutagének* egyike. Stadler és Uber a besugárzott polleneket kukoricák bibéjére kente, majd a mutáns kukoricaszemek gyakoriságát vizsgálta. Azt tapasztalták, hogy az indukált mutációk akciós spektruma nagyon hasonlított a DNS abszorpciós spektrumára: a két spektrum maximuma 260 nm-nél egybeesett (4.1. ábra). Minthogy a fehérjék abszorpciós spektruma 280 nm-nél van, Stadler és Uber arra következtetett, hogy a DNS az örökítő anyag és nem a fehérje. Kritikusaik szerint valójában a DNS elnyeli az energiát, átadja a fehérje molekuláknak, amelyek megváltoznak. A megváltozott (mutáns) jelleg a fehérjék változásával kapcsolatos.

2. F. Griffith 1928-ban lett figyelmes a következő szokatlan jelenségre. Amikor a *Streptococcus pneumoniae* baktériumok R típusú (mutáns) sejtjeit egerekbe fecskendezte, az egerek egészségesek maradtak (4.2. ábra). Az S variánstól az egerek megbetegedtek, majd elpusztultak. Az R és az S variáns baktériumok Petri csészében alkalmas táptalajon növesztve durva (**R**ough) illetve sima (**S**mooth) telepeket képeznek. Amint várható, az elölt S baktériumoktól nem betegedtek meg az egerek. Griffith meglepetésére azonban az egerek elpusztultak, miután egyszerre injektált beléjük élő R és elölt S baktériumokat. Az elpusztult egerekből izolált élő baktériumok között az R variánsok mellett S-ek is voltak (4.2. ábra). Vagyis, az elölt S baktériumok anyagai között volt olyan, amely az R baktériumokat S-é alakította, **transzformálta**. Vajon mi volt a transzformáló tényező?

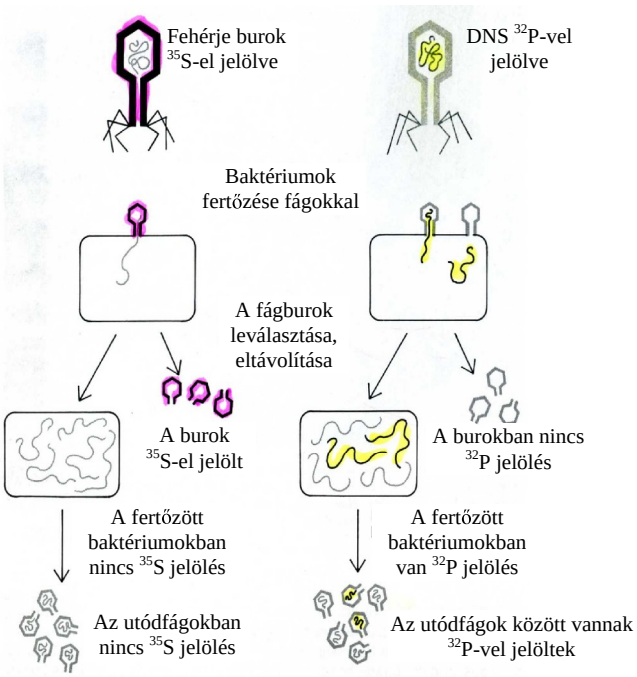


4.2. ábra. Griffith transzformációs kísérletei.

Griffith rendszere ideális: a baktériumok R vagy S jellege táptalajon növesztés során eldönthető, a transzformáció kémcsőben elvégezhető. A transzformáló anyag természetére vonatkozó kísérleteket Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod és Maclyn McCarty közölte 1944-ben. Az S variáns különféle alkotói közül (fehérje, lipid, szénhidrát, RNS és DNS) csak a DNS okozott transzformációt. A DNS-t bontó enzimmel folytatott emésztés után megszűnt a DNS transzformáló képessége. Tehát a DNS az S tulajdonság meghatározója, az örökítő anyag.

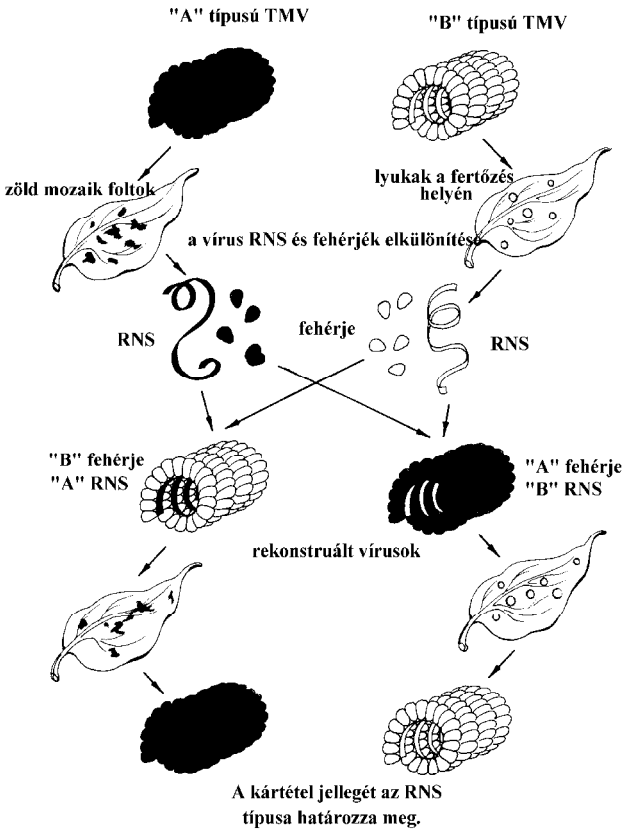
Avery és munkatársai azt is megmutatták, hogy a DNS molekula súlya akár 500.000 Dalton (Da) is lehet. (1Da = egy hidrogén atom tömege.) A félmillió Da-nyi DNS-t kb. 1600 nukleotid alkotja. Az 1600 nukleotidból álló DNS molekulák $4^{1600} = 10^{960}$ félék lehetnek, és roppant sok fehérje féleség képződését kódolhatják. A 10^{960} nagyon nagy szám. Az 1600 bázispár pedig alig több mint amennyiből egy átlagos baktérium gén áll. Végeredményben tehát a DNS elég komplex ahhoz, hogy bármely élőlény genetikai információját kódolja. Kritikusaik szerint Averyék DNS preparátumai nem voltak elég tiszták…

3. Alfred D. Hershey és Martha Chase (1952) az örökítő anyag replikációja alapján bizonyította, hogy a DNS az örökítő anyag. Olyan T2 fággal fertőztek *E. coli* sejteket, amelyeknek vagy a fehérje burka (^{35}S tartalmú aminosavakkal) vagy a DNS-e (^{32}P-vel) volt megjelölve (4.3. ábra). Külön, külön kísérletben követték a radioaktív jelölés sorsát. A baktériumokat összekeverték a jelzett fágokkal. Vártak néhány percet, majd erős keveréssel leválasztották a fágokat a baktériumokról. Centrifugálással leülepítették a baktériumokat. A fágok burkai a felülúszóban maradtak. Amíg a ^{35}S a felülúszóban maradt (a fágburokban), a ^{32}P jelölés az üledékben (a baktériumokban) volt jelen. Hershey és Chase a baktériumokból kiszabaduló fágokat is megvizsgálta. A fágok nem tartalmaztak ^{35}S jelölést, ellenben a ^{32}P jelölés csaknem teljes egészében jelen volt az utód fágokban (4.3. ábra). Hershey és Chase kísérleti eredményei alapján nyilvánvaló vált, hogy a DNS replikálódott és került az utódokba, vagyis a DNS az örökítő anyag.



4.3. ábra. A Hershey és Chase kísérlet sematikus ábrázolása.

4. Heinz Fraenkel-Conrat és Bea Singer (az 1950-es években) az örökítő anyag funkciójának vizsgálata alapján bizonyította, hogy a nukleinsav az örökítő anyag. A dohány mozaikvírus (TMV) *A* variánsának fertőzése nyomán a leveleken kis foltokban elhalnak a sejtek és barna foltok képződnek (4.4. ábra). A *B* variáns fertőzése nyomán a leveleken kis lyukak képződnek. A TMV RNS-e (örökítő anyaga) és a burkoló fehérjék kényelmesen elválaszthatók. Összeke-verve, az RNS a fehérjékkel fertőzőképes vírusokká áll össze. Az *A* RNS-t *B* fehérjékkel kombinálva olyan vírusok képződtek, amelyek a leveleken barna foltokat alakítottak ki. A *B* RNS-ből és az *A* fehérjékből álló vírusok fertőzése nyomán lyukak képződtek (4.4. ábra). Eredményeik alapján Fraenkel-Conrat és Singer arra következtetett, hogy a vírusok funkcióját nem a fehérjék, hanem az RNS-ek határozzák meg. Tehát a nukleinsav az örökítő anyag.

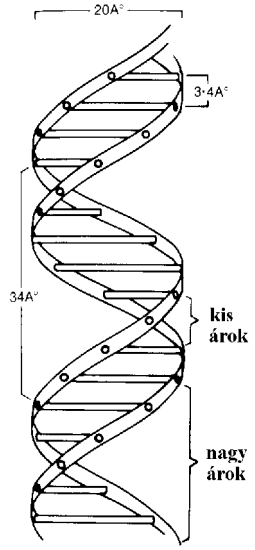


4.4. ábra. A Fraenkel-Conrat és Singer kísérlet sematikus ábrázolása.

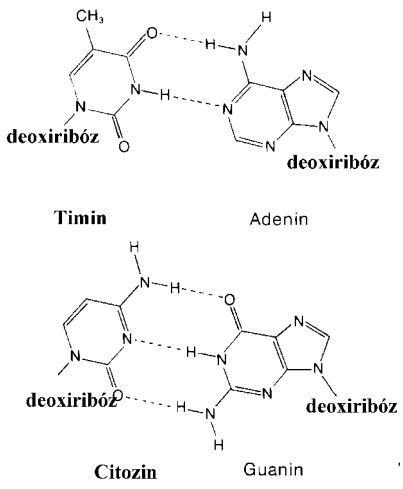
A DNS szerkezete

A nukleinsav kémia fejlődésével Ervin Chargaff és munkatársai munkája nyomán vált nyilvánvalóvá, hogy a DNS-ben az A/T = 1 és a C/G = 4. Az A+T/G+C arány bár fajonként állandó, a különféle fajokban nagyon különböző lehet. Rosalind Franklin és Maurice Wilkins röntgenkrisztallográfiai eredményei, valamint Linus Pauling modell építő módszere alapján James Watson és Francis H. C. Crick írta le a DNS szerkezetét. (A Crick és Watson Nature dolgozat megjelenésétől, 1953-tól számítjuk a molekuláris biológia kezdetét.) A DNS molekula egy jobbmenetű, 2 nm "széles" kettős spirál, nukleotidok óriás polimerje (4.5. ábra). Egy polinukleotid fonal alapja a -cukor-foszforsav-cukor-

foszforsav-cukor- lánc. A cukorhoz (a deoxiribózhoz) kapcsolódnak a bázisok (4.6. ábra). A foszforsav maradékok a szomszédos cukor molekulák 5' és 3' szénatomjai között teremtenek kapcsolatot. Lényegében tehát a DNS fonalnak 5' → 3' irányú polaritása van. (Egyben az az irány is, amelyben a nukleinsavak szintézise folyik.) A DNS két szála ellenkező lefutású. (Ún. antiparallel állásúak). A kettős spirál alapját az A=T, és a G≡C bázispárok között képződő H-híd kötések adják (4.6. ábra). A szemközti szálak közötti bázisok komplementerek. A szomszédos bázispárok 3,4 A-nyire vannak egymástól, és 36°-ot zárnak be egymással. A DNS fonal mentén egy nagy és egy kis árok vonul végig (4.5. ábra). A DNS genetikai információ tartalmát a bázisok sorrendje jelenti.



4.5. ábra. A DNS kettős spirál szerkezete.



4.6. ábra. Az A=T és a G≡C komplementer bázispárok.

Gén és genom

A **genom** az egyszeres kromoszóma készletben levő DNS összessége. Másként megfogalmazva: a kromoszómák egyszeres készlete. A **gén** az öröklődés, a genetikai funkció olyan egysége, amely egy polipeptid féleség képződését kódolja. (Johanson dán biológus volt a névadó 1911-ben.) A genom mérete a különböző fajokban meglehetősen változó (4.1. táblázat).

4.1. táblázat. Néhány faj genomjának mérete

Faj	Bázispárok száma	Hossza (méter)
FÁGOK, VÍRUSOK		
SV40	5226	$1,7 \times 10^{-6}$
ϕX 174	5375	$1,8 \times 10^{-6}$
λ	$4,65 \times 10^{4}$	$1,6 \times 10^{-5}$
BAKTÉRIUMOK		
Streptococcus pneumoniae	$1,75 \times 10^{6}$	$6,0 \times 10^{-4}$
Escherichia coli	$2,60 \times 10^{6}$	$9,0 \times 10^{-4}$
EUKARIOTÁK		
Élesztő	$1,75 \times 10^{7}$	$6,0 \times 10^{-3}$
Muslica	$1,75 \times 10^{8}$	$3,0 \times 10^{-2}$
Ember	$3,00 \times 10^{9}$	$9,0 \times 10^{-1}$
Kukorica	$6,60 \times 10^{9}$	2,2
Amphiuma	$1,50 \times 10^{11}$	50
Liliom	$2,00 \times 10^{11}$	110

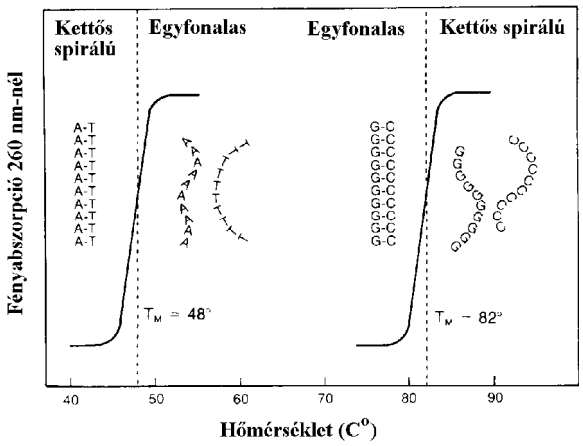
Az ember genomjának nukleotid szekvenciája 1000 olyan könyvet töltene meg, amelyek mindegyike 1000 lapból állna, laponként kb. 3000 betűvel. A ϕX 174 fág genomja 10, az *E. coli* bélbaktériumé 4377, az élesztőé 5770, a muslicáé 13379, az emberé kb. 30000 gént tartalmaz. Amíg prokariotákban a genom java részét, eukariótákban a genomnak mindössze néhány százalékát teszik ki a gének.

A genom szerveződése

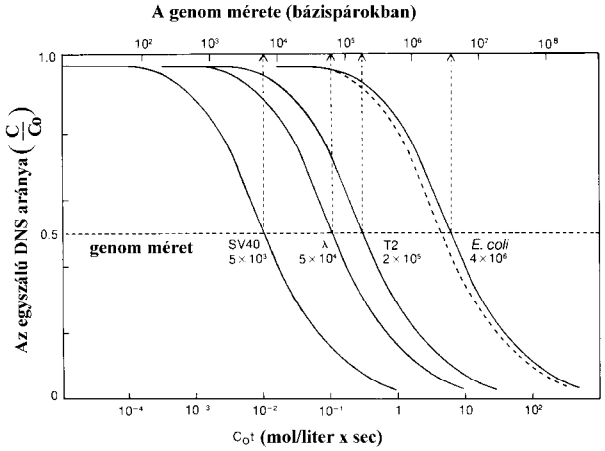
A hőmérséklet növekedésével a DNS két szálát összetartó A=T és G≡T bázispárok közötti H-hídak felbomlanak, a DNS "megolvad", denaturálódik, egyszálúvá válik, miközben a 260 nm-en mért fényelnyelése növekszik. A csupa A=T bázispárból álló DNS olvadáspontja 48°C, a csupa G≡C-ből állóé 82°C (4.7. ábra).

Aprítsunk össze prokariota DNS-t kb. 400 bázispárból álló darabokra (pl. egy turmixgépben). Melegítsük fel a DNS oldatot, hogy csupa egyszálú DNS legyen az oldatban, majd - miközben figyeljük az oldat fényelnyelését - engedjük, hogy az oldat lehűljön. Hűlés közben a komplementer szálak egymásra találnak, párosodnak (hibridizálnak), helyreáll a kétszálú állapot. Közben fokozatosan csökken az oldat fényelnyelése, végül visszaáll a kiindulási értékre.

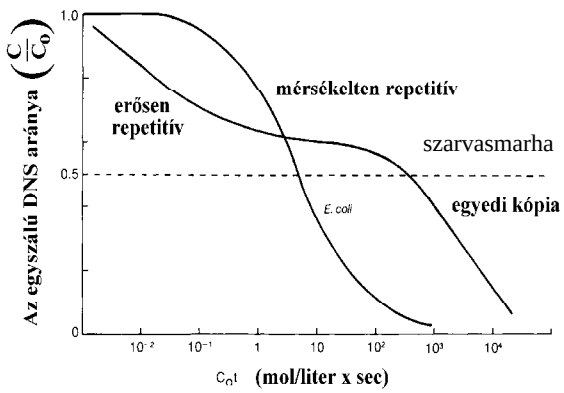
Ha a C/C_o arányt (ahol C az egyszálú DNS koncentrációja, C_o pedig az eredeti DNS koncentráció) a $C_o t$ (t = idő másodpercekben) függvényében ábrázoljuk, a görbék jellegzetes lefutásúak (4.8. ábra, az ún. denaturációs-renaturációs kinetika). Természetesen minél kisebb a genom (mint pl. az SV40 vírus esetében), annál nagyobb az esélye annak, hogy a komplementer DNS szálak egymásra találnak és egyesülnek. Minél nagyobb a genom, a renaturáció annál tovább tart. A denaturáció-renaturáció kinetikája alapján kényelmesen meghatározható a genom mérete (4.8. ábra).



4.7. ábra. A csupa A=T és a csupa G≡C bázispárból álló DNS fényelnyelésének változása a hőmérséklet függvényében.

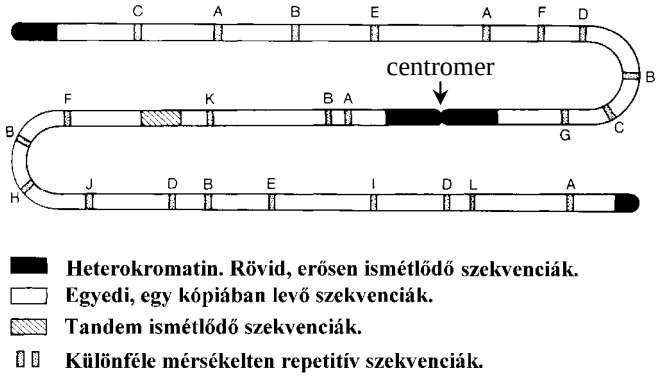


4.8. ábra. A DNS renaturációs kinetika vírusok és baktériumok esetében.



4.9. ábra. Az *E. coli* és a szarvasmarha DNS renaturációs kinetikája.

A denaturációs-renaturációs kinetika eukarioták esetében a prokariotákétól eltérő lefutású (4.9. ábra): van (1) egy gyors renaturációt mutató, (2) egy lassabb, de még viszonylag gyors, és (3) egy lassú, hosszan elnyúló része. A gyorsan renaturálódó rész az eukariotákra jellemző ún. *erősen repetitív* szekvenciák-nak felel meg. Az erősen repetitív szekvenciák genomonként 10^5 - 10^7 kópiában vannak jelen, viszonylag rövid, öt-tíz bázispárból állnak, tandem elrendeződésűek, és a genomnak akár 5-30%-át is kitehetik. (Pl. a tengerimalacban a CCTA szekvencia ismétlődik nagyon nagyon sokszor.) Nyilvánvaló, hogy az erősen repetitív egyszálú szekvenciák gyorsan rátalálnak valamelyik komplementerükre, renaturálód-nak. Az erősen repetitív szekvenciákból áll a *heterokromatin*, amely többnyire a kromoszómák centromer közeli részeit és a kromoszómák végei (telomer) közeli részeit alkotja 4.10. ábra).



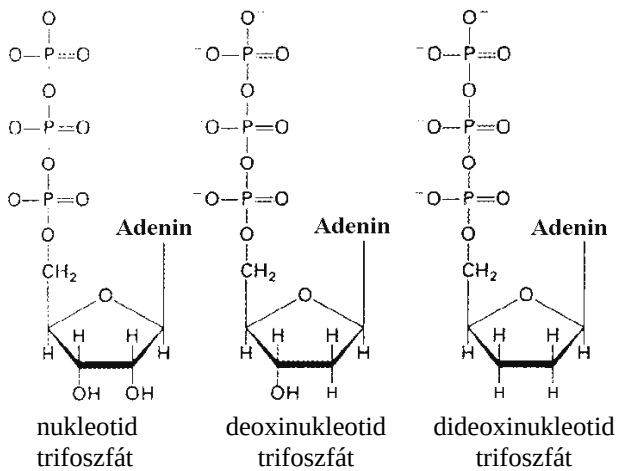
4.10. ábra. A különféle szekvencia típusok eloszlása egy eukariota kromoszómában.

A denaturációs-renaturációs kinetika második szakaszának a *mérsékelten repetitív* szekvenciák felelnek meg. A mérsékelten repetitív szekvenciák genomonként 30 - 10^4 kópiában vannak jelen. Hosszuk többnyire 200-400 bázispár közötti, tandem elrende-ződésűek, szekvencia családokat alkotnak és az eukromatinban, kis „szigetecskékben" vannak elszórva (4.10. ábra). A mérsékelten repetitív szekvenciákat szokás *változó számú tandem ismétlődő* (angolul variable number of tandom repeats, VNTR) szekvenciáknak nevezni, mert az ismétlődések száma kromoszómánként változhat, és személyek azonosítására alkalmas. Azért, mert ultracentrifugálás során a mérsékelten ismétlődő szekvenciák a fő DNS sáv mellett kis különálló (szatellit) sávot alkotnak, a VNTR-t mikroszatellit DNS-nek is szokás nevezni.

Az eukariota DNS harmadik típusát azok az ún. *egyedi kópia* DNS szekvenciák alkotják, amelyek genomonként csak egyetlen kópiában vannak jelen. Az egyedi szekvenciák alkotják az eukromatint, és bennük a géneket (4.10. ábra).

DNS szekvenálás

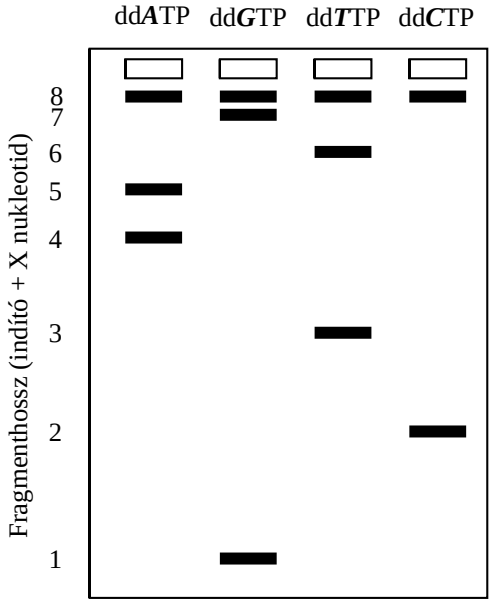
A DNS-ben kódolt genetikai információ tartalma a bázisok sorrendjében rejlik. A DNS szekvenálása a bázisok sorrendjének meghatározását jelenti. A DNS szekvenálásra ma több módszer is használatos. Közülük a legelterjedtebbel, a Sanger (1981) féle dideoxi módszerrel ismerkedünk meg. A módszer lényege a következő. A szekvenálandó DNS-ről DNS polimerázt használva egyszálú DNS-t állítanak elő. A szintézishez olyan primert (indítót) használnak, komplementere a szekvenálandó egyszálú DNS 3' végének. [A primer 15-30 nukleotidból álló szintetikus, egyszálú DNS, amely a komplementer szekvenciákkal párosodik, lehetőséget adva a templát (minta) szálnak megfelelő komplementer DNS szintézisre.] A mintát négy részre osztják. Mindegyikhez adnak (1) DNS polimeráz enzimet, amely a primerhez kapcsolódva a templát (minta) szál alapján DNS-t szintetizál, (2) deoxinukleotid trifoszfátokat, a DNS építő elemeit, valamit (3) az egyik csőbe dideoxi ***A***TP-t, a másikba dideoxi ***G***TP-t, stb. A dideoxi nukleotidok 3' szénatomjához nem kapcsolódik -OH csoport, csupán két hidrogén (4.11. ábra). A deoxi és a dideoxi nukleotidok aránya 100/4. Elkezdődik a DNS szintézis. A szintetizálódó DNS-be beépülő valamelyik komponens (a primer és/vagy a deoxi nukleotid) meg van jelölve. (A jelzés lehet ^{32}P vagy gyakrabban fluorszcensen jelölt deoxi nukleotid.) A dATP és dd***A***TP tartalmú mintában a DNS szintézis elakad, valahányszor dATP helyett dd***A***TP épül be a szintetizálódó DNS szálba (4.11. ábra). Végeredményben annyi féle DNS fragment képződik, ahány T van a templát szálban. A különböző hosszúságú DNS fragmentek gélelektroforézissel elkülöníthetők. A gél mintázat alapján a nukleotidok sorrendje (a szekvencia) kényelmesen meghatározható. A DNS szekvenálását ma már automata berendezések végzik. A szekvenciát gépek olvassák és raktározzák nagyteljesítményű számítógépekben, adatbankokban.



4.11. ábra. Az ATP, a dATP és a ddATP szerkezete.

A fajok genetikai információ tartalma a genomokba van beleírva. A genomprojektek célja annak meghatározása, hogy mely bázispárok, és milyen sorrendben alkotják valamely faj genomját. Elsőként a *Haemophilus influenzae* baktérium genomja vált ismertté 1995-ben. Aztán jött a többi, köztük az élesztő (1996), a *Caenorhabditis elegans* fonálféreg (1998), az ember (2000), a muslica (2002), a csimpánz (2005). Ma már több ezer faj genomja ismert. Az adatbankok szekvenciáit nagyteljesítményű számítógé-pekkel tanulmányozzák. A szekvenciák összehasonlítása alapján nagyon sok, az élővilág fejlődésére vonatkozó értékes ismeretnek jutottunk birtokába.

A meghatározandó szekvencia: 5'*GCATTAGC*———3' Az indító (primer) 3'———5'		
Dideoxi nukleotid	Fragment-hossz (indító + X nukleotid)	A képződő fragmentek
dd***A***TP	8	5'CGTAATCG———3'
	5	3'***A***ATCG———5'
	4	3'***A***TCG———5'
dd***G***TP	8	5'CGTAATCG———3'
	7	3'***G***TAATCG———5'
	1	3'***G***———5'
dd***T***TP	8	5'CGTAATCG———3'
	6	3'***T***AATCG———5'
	3	3'***T***CG———5'
dd***C***TP	8	5'CGTAATCG———3'
	2	3'***C***G———5'

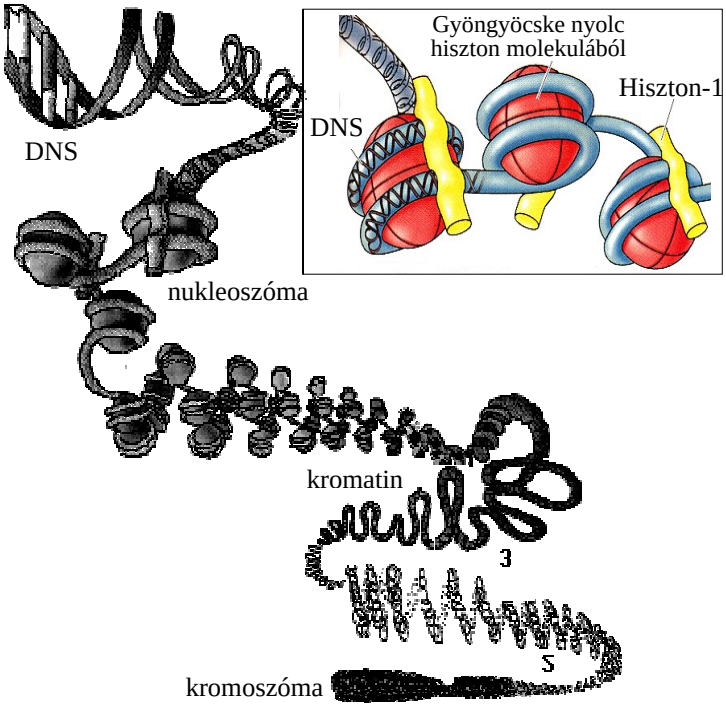


4.12. ábra. A Sanger-féle dideoxi DNS szekvenálás elvi alapjai. A fragmentek hossza alapján a komplementer szál szekvenciája meghatározható, és a következően alakul a legrövidebbtől a leghosszabb fragmentek irányában haladva: 1: G, 2: C, 3: T, 4: A, 5: A, 6: T, 7: G. A. A komplementer szál szekvenciája alapján a meghatározandó szekvencia (a fejlécben) egyszerűen megadható.

A kromoszómák szerveződése

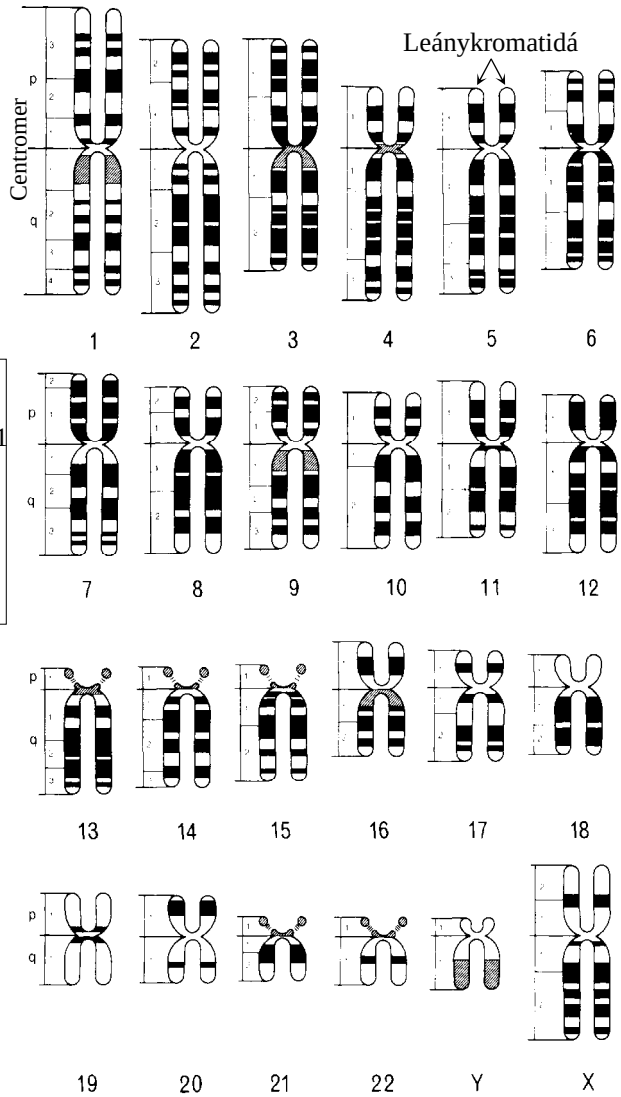
A baktérium kromoszóma egyetlen körbezáródó, gyakorta gyűrű alakúnak nevezett DNS molekula, amely egy ponton a sejthártyához rögzül. Sok baktérium a kromoszóma mellett kis kör alakú DNS molekulá(ka)t, plazmido(ka)t is tartalmaz. A plazmidok önállóan replikálódó, kromoszómán kívüli DNS-ek. A baktérium kromoszómáknak és a plazmidoknak - bár sok, a génműködést szabályozó fehérjével kapcsolódnak - nincs különleges szerkezetük.

Az eukarioták DNS-e bázikus molekulákból képződött gyöngyöcskékre tekeredik. A gyöngyöcskéket a rájuk tekeredett DNS-el nukleoszómáknak nevezik (4.13. ábra). A nukleoszómákra tekeredett DNS más, ún. nem-hiszton-fehérjékkel kapcsolódva tekercseket, majd szupertekercseket képez. A "szupertekercselődés" mértéke az osztódásban levő sejtekben a legnagyobb, amikor bizonyos festések nyomán a kromoszómák mikroszkópban jól láthatókká válnak. A kromatint, a kromoszómák anyagát DNS, hiszton és nemhiszton fehérje molekulák alkotják.



4.13. ábra. Az eukariota kromoszóma szerveződése. A DNS hiszton fehérjékből képződő gyöngyöcskékre tekeredik, és nukleoszómákat alkot. Egy nukleoszómát nyolc hiszton molekula alkot, két-két H2A, H2B, H3 és H4 típusú. A nukeloszómákat a H1 hiszton moleku-lák stabilizálják, fűzik össze. A nukleoszóma-füzér további fehérjefeléseégekkel kapcsolódva kromatint képez, tekercselődik, szupertekercselődik, és kromo-szómaként válik ismerőssé.

Egy, a mitózis metafázisában levő ún. metafázisos kromoszóma már replikálódott, tehát kétszeres mennyiségű DNS-t tartalmaz, és két leánykromatidává (ikerkromatidákká) szerveződött (4.14. ábra). Egy kromatidát egyetlen DNS kettős spirál és nagyon sok fehérje molekula alkot. A leánykromatidák, egyetlen DNS kettős spirál két származéka, a centromerjüknél tapadnak össze. A centromer jellegzetes, mérsékelten repetitív DNS szekvenciából és a hozzájuk kapcsolódó ún. centromer fehérjékből áll. A centromer a kromoszómák különböző helyein lehet. A telomereket, a kromoszómák végeit is jellegzetes DNS szekvenciák és a hozzájuk kapcsolódó specifikus fehérjék alkotják.



4.14. ábra. A humán haploid (egyszeres) kariotípus. Metafázisú kromoszómák. A 13., a 14., a 15., valamint a 21. és a 22.kromoszómák rövid (p) karjainak végén levő részt szatellitnek nevezik. Az alattuk levő, nyélszerű szakaszokban vannak azok a gének, amelyek a riboszómális-RNS molekulák képződését kódolják. Az 1-22. kromoszómákat autoszómáknak, az X és az Y kromoszómákat nemi (ivari) kromoszómáknak nevezik.

Kariotípus

A haploid kromoszómaszám fajonként jellemző és állandó. Az ember valamely metafázisú diploid sejtjében 23 pár kromoszóma van. Az egyik garnitúra anyai, a másik apai eredetű. Bármely pár két tagja, az ún. **homológ kromoszómák**, azonos méretű, alakú, azonos szerveződésű, és ugyanazon a pontján ugyanarra tulajdonságra (pl. szemszín) vonatkozó információt hordoz. Az információ tartalma lehet azonos (legyen a szemszín kék) vagy különböző (kék és barna). A kromoszómák méretük, a centromer helye és a festődési mintázat alapján könnyen azonosíthatók (4.14. ábra). Az egy sejtben jelenlevő kromoszómák alkotják a kariotípust. Az ivarsejtek haploidok, csak egyetlen kromoszóma szerelvényt tartalmaznak: emberben 22 autoszómát és egy ún. nemi (ivari) kromoszómát. Az autoszómák látszólag nem tartalmaznak a nemre vonatkozó információt. A nemi kromoszómáknak (X és Y, ám pl. a madarakban Z és W) szerepük van a nem (ivar) meghatározásában. A diploid sejtek egy anyai és egy apai eredetű kromoszóma szerelvényt hordoznak. Vegyük észre, hogy a 13., a 14., a 15., a 24. és a 22. kromoszómák rövid karjainak jellegzetes dobverő alakú (szatellit) részei vannak. Azok tartalmazzák az ún. riboszómális gének java részét, amelyek a riboszómális RNS-ek (rRNS) zömét kódolják. (Az 5S rRNS gének az X kromoszóma részei.) A riboszómális gének a sejtmagvacska egyik alkotói az interfázisú sejtben.

A kariotipizálás, vagyis valamely sejt kromoszóma készletének megállapítása, diagnosztikai jelentőségű: a normálistól eltérő számban kromoszómát hordozó, vagy a rendellenesen szervezett kromoszóma(ka)t hordozó sejtek funkciója gyakorta sérült, többnyire a megbomlott géndózis és géntermék koncentráció arányok miatt.

A gének az öröklődés egységei, a genetikailag kódolt tulajdonságok meghatározói, valamely kromoszóma DNS-ének jól meghatározott szakaszai. Amint az elkövetkező fejezetekből kiderül, a genetikai térképezés során nem csak azt lehet meghatározni, hogy valamely gén melyik kromoszóma része, hanem azt is, hogy a kromoszóma mely helyén van. A molekuláris genetika feladata a gének helyének pontos meghatározása a DNS-en belül. A gén ismerete alapvető feltétele az olyan munkák gyakorlati feladatokat.

ÖSSZEFOGLALÁS

Minden élőlény örökítő anyaga a DNS. A DNS a nukleotid szekvenciák sokfélesége alapján elég komplex ahhoz, hogy végtelenül sokféle fehérje szintézisét kódolja, biztosítsa az élőlények sokféleségét. A DNS-ben kódolt genetikai információ tartalmát az építő nukleotidok sorrendje jelenti. A prokariota genomot csaknem teljes egészében egyedi szekvenciák alkotják és "csupasz", gyűrű alakú kromoszómává szerveződik. Az eukariota genom és kromoszómák is bonyolultabb szervezettségűek. Bár az eukariota genom nagyon nagy, vannak olyan módszerek, amelyekkel el lehet benne igazodni, géneket tudunk azonosítani. Valamely gént első lépésben kromoszómákhoz lehet kapcsolni, majd meg lehet helyét állapítani a kromoszómán belül, és végül klónozni lehet a gént: molekuláris szinten lehet megállapítani szerkezetét és funkcióját.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 61-65, 267-284, 366-381, 2011.
2. Karp, G., Cell and Molecular Biology, 391-428, 2008.
3. Griffiths, A.J.F. és mtsi., Introduction to Genetic Analysis, 265-269, 2008.
4. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 11-13, 113-119; 217-268; 2007.
5. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 427-496, 2004.
6. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 1-87, 1989.

5. REPLIKÁCIÓ ÉS SEJTOSZTÓDÁS.

A replikáció mechanizmusa. Konkatamer és a forgó gyűrű. Teltfej és a helyspecifikus pakolódás. Mitózis és meiózis. Nondiszjunkció. Aneuploidia és következményei.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

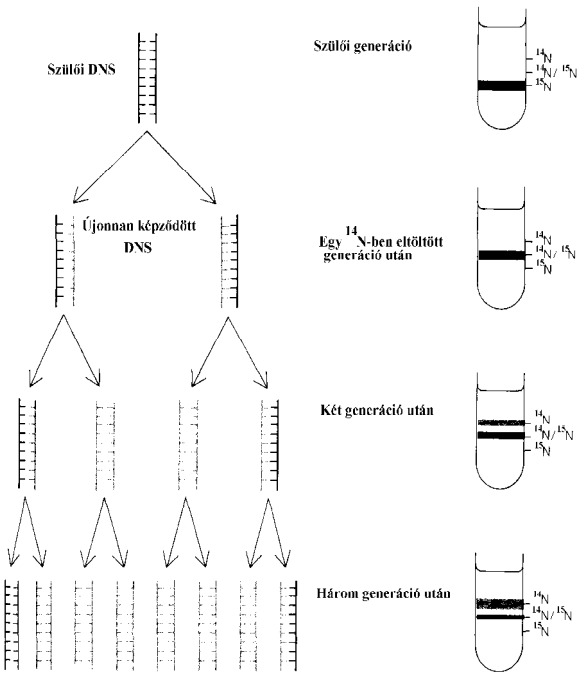
BEVEZETÉS

Az utódok hasonlósága az egymást követő nemzedékekben azt jelzi, hogy a DNS, az örökítő anyag átjut sejtről sejtre, generációról generációra. A DNS csak azután öröklődhet, ha előzőleg megkettőződik, replikálódik. Vajon hogyan replikálódik a DNS? Milyen mechanizmusok szerint oszlik meg az utódsejtek között? Milyen következményei vannak a DNS és a kromoszómák tökéletlen megoszlásának? A következő fejezet a fenti kérdéseket válaszolja meg.

REPLIKÁCIÓ

A replikáció szemikonzervatív természete

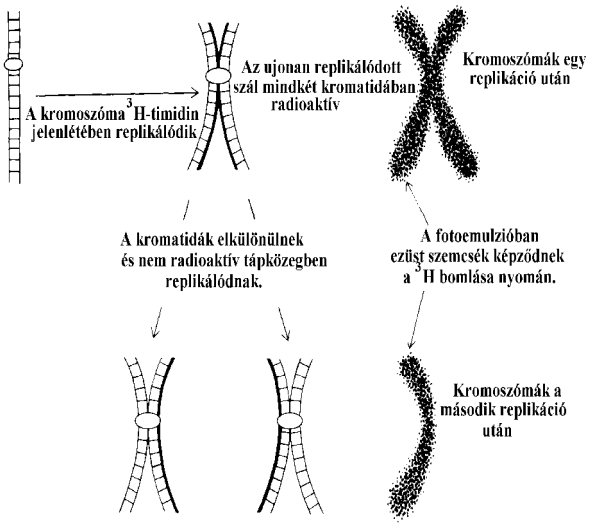
Egy DNS kettős spirál megkettőződésére elvileg három lehetőség kínálkozik. (1) A **konzervatív** mechanizmus, amely szerint az eredeti DNS kettős spirál mintájára úgy képződik egy új kettős spirál, hogy az eredeti kettős spirál is megőrződik. (2) A **szemi-konzervatív** modell szerint a DNS kettős spirál szálai elválnak egymástól, és mindkét szál templátként szolgál a komplementer szál szintéziséhez. (3) A **diszperzív** modell szerint az új DNS kettős spirálokban az eredeti DNS szálak anyaga véletlenszerű elrendeződésben őrződik meg az utódszálakban. A replikció három lehetséges módja közül a szemikonzervatív az igazi, amint azt M. Meselson és F. Stahl 1958-ban bebizonyította.



5.1. ábra. A replikáció szemikonzervatív mechanizmusának sematikus ábrázolása.

Meselson és Stahl olyan közegben szaporított sok generáción át baktériumokat, amely ^{15}N-t, a nitrogén nehéz izotópját tartalmazta. Az ^{15}N a DNS alkotójává vált, „nehézzé" téve a DNS-t. A nehéz DNS cézium kloridos sűrűséggradiens centrifugálás során a centrifuga cső alsó részébe ülepszik, oda, ahol a sűrűsége megegyezik a közeg sűrűségével. A könnyű, ^{14}N-et tartalmazó DNS-ből a centrifuga cső felső részében képződött sáv (5.1. ábra). A "nehéz" baktériumokat egyetlen generációra olyan közegbe tették, amely a nitrogén könnyű, ^{14}N változatát tartalmazta. Egy generáció (kb. 20 perc) múltán DNS-t izoláltak a baktériumokból, és megvizsgálták a sűrűségét. A DNS egyetlen sávot képzett a centrifuga csőben a közepes sűrűségű helyen (5.1. ábra). Tehát az ^{14}N-es közegben replikálódott DNS egyik szála nehéz, a másik könnyű volt, bizonyítva a replikáció szemikonzervatív természetét. Ha a replikáció konzervatív volna, egy nehéz (az eredeti) és egy könnyű (az új) DNS-nek megfelelő sáv képződött volna a centrifuga csőben. Diszperzív replikáció esetén ugyan csak egy, ám elmosódott sáv képződése lenne várható a centrifuga cső közepe táján. Meselson és Stahl a nehéz baktériumok egy másik mintáját két generáción át szaporította ^{14}N könnyű nitrogént tartalmazó közegben, majd DNS-t izoláltak és vizsgáltak sűrűséggradiens centrifugálással. A centrifuga csőben két egyforma vastagságú sáv alakult ki: egy a közepes, egy pedig a könnyű „helyen", megerősítve a replikáció szemikonzervatív természetét (5.1. ábra). (Ha a replikáció konzervatív volna, egy nehéz és egy könnyű sáv képződött volna, és a könnyű háromszor több DNS-t tartalmazott volna, mint a nehéz. Diszperzív replikáció esetén egy elmosódott sáv képződött volna, valahol a közepes és a könnyű sávok között...)

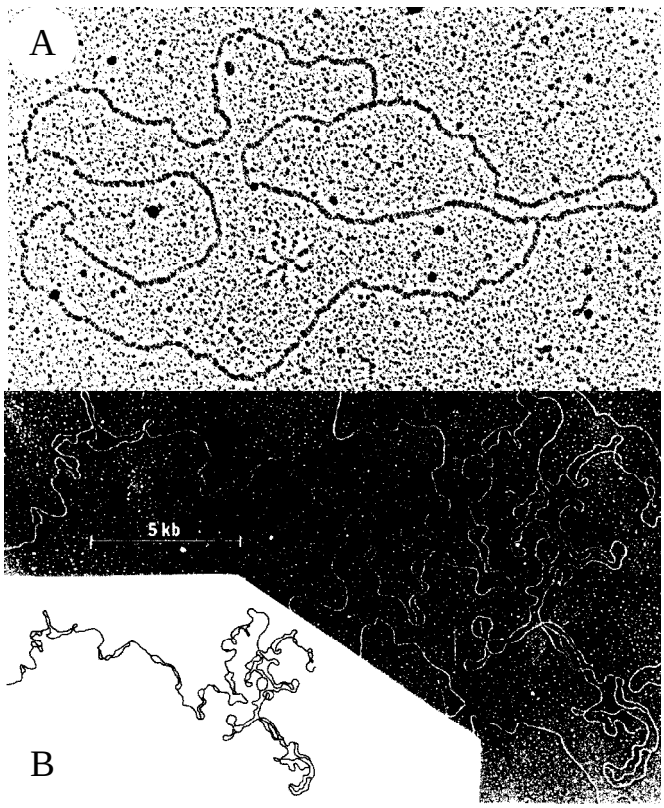
Herbert Taylor azt bizonyította (1958-ban), hogy a replikáció mechanizmusa eukariotákban is szemikonzervatív (5.2. ábra). Taylor egy sejtciklusra olyan közegbe tett emlős sejteket, amely ^{3}H-al jelzett timint tartalmazott. (Mivel a timin csak a DNS-be épül be, ^{3}H-timinnel a DNS specifikusan jelölhető.) Egy sejtciklus, kb. egy nap múltán metafázisos kromoszómákat preparált a sejtekből, és megfestette őket. A



5.2. ábra. Az eukariota kromoszómák replikációja is szemikonzervatív módon történik.

preparátumot vékony fotoemulzió réteggel borította, és autoradiográfiával detektálta a ^{3}H-al jezett kromatidákat. (A ^{3}H bomlása során képződő β sugárzás nyomot hagy az emulzióban, ami előhívás után fekete jelként ismerhető fel; 5.2. ábra.) Azt tapasztalta, hogy a leánykromatidák mindegyike felett elsötétedett a fotoemulzió, vagyis mindkét kromatida tartalmazott egy-egy új, ^{3}H-al jelzett DNS fonalat. (Ha a replikáció konzervatív volna, csak a leánykromatidák egyike tartalmazott volna ^{3}H timint, a másika nem. Diszperzív replikáció esetén a leánykromatidák "foltosan" kiegészítették volna egymást, és a foltosság mértéke is változó lett volna.)

Taylor a ^{3}H-al jelzett sejtek egy mintáját egy további sejtciklusra olyan közegbe tette, amely nem tartalmazott ^{3}H-t, majd ismét kromoszóma preparátumokat készített és vizsgált. A második replikáció után csak a leánykromatidák egyike tartalmazott ^{3}H jelölést, a másika nem, bizonyítva, hogy a replikáció eukariotákban is szemikonzervatív (5.2. ábra).

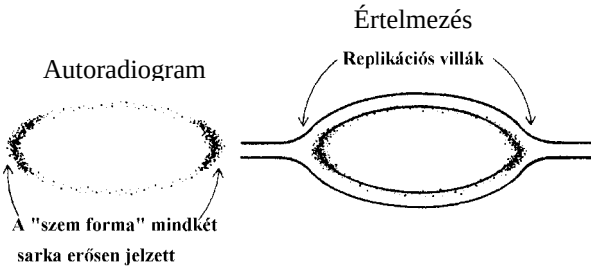


5.3. ábra. A replikáció prokariotákban egy (A), eukariotákban sok helyen kezdődik (B).

A replikáció kétirányú

John Cairns és munkatársai elektronmikroszkópos felvételeken tanulmányozta a DNS replikációját (5.3 ábra). Láthatóvá vált, hogy a replikáció a prokariota kromoszóma (és plazmid) egyetlen pontján kezdődik, eukariotákban pedig egyszerre sok helyen (5.3. ábra).

D. Prescott és R. G. Wake ^{3}H-timint tartalmazó közegbe tett rövid időre baktériumokat (mások eukariota sejteket). A bakériumokból DNS-t izoláltak elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. A kromoszómákat vékony fotoemulzió réteggel borították, hogy láthatóvá tegyék azokat a helyeket, ahová ^{3}H épült be, bomlott el és hagyott jelölést a fotoemulzión (5.4. ábra). A jelek vizsgálata alapján vált világossá, hogy a replikáció a DNS kettős spirál mindkét irányban folyik, pro- és eukariotákban egyformán.

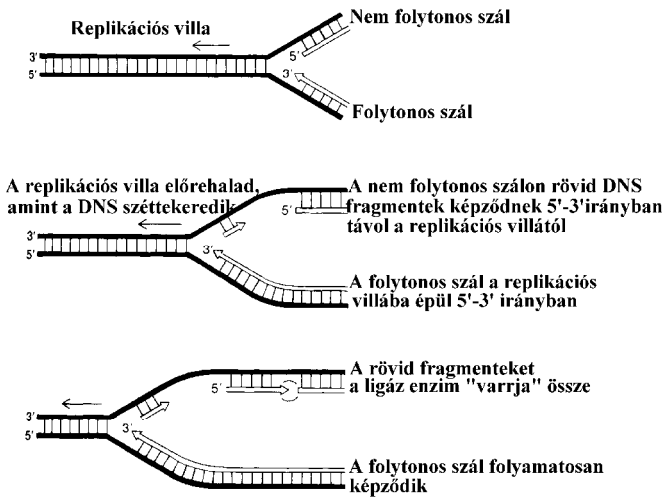


5.4. ábra. A replikáció két irányban folyik.

A replikáció molekuláris mechanizmusa

A DNS replikációjában enzimek sokasága vesz részt. A replikáció az ún. replilkáció iniciációs helyeken kezdődik. A replikációhoz a DNS kettős spirált szét kell tekerni. (A széttekeredés sebessége kb. 10^4 fordulat/perc.) A széttekeredés után a DNS mindkét szála templátként (mintaként) szolgál az új, komplementer DNS szálak szintéziséhez (5.5. ábra). Az új DNS szálak szintézisének sebessége lenyűgöző: prokariotákban 10^5, eukariotákban 10^4 nukleotiddal hosszabbodnak percenként! Az új DNS szálat a DNS templát szál alapján a DNS polimeráz enzim komplex végzi. A DNS polimeráz csak a 3' véghez képes újabb nukleotidot építeni, tehát a DNS (ugyanúgy, mint minden más nukleinsav) szintézise 5' → 3' irányban folyik. Ahhoz, hogy a DNS polimeráz elkezdhesse a DNS szintézisét egy indító molekulára, ún. primerre van szükség. A primer *E. coli*-ban egy kb. 30 nukleotidból álló RNS, amit egy primáz nevű RNS polimeráz enzim szintetizál a DNS templát alapján. A primert az 5' irányból érkező DNS polimeráz bontja el és épít helyére DNS-t. A DNS polimeráz a négyféle deoxi nukleotidból a DNS templát alapján szintetizálja az új DNS fonalat. Amíg az ún. vezető szál szintézise folyamatosan haladhat az 5' → 3' irányban, addig az ellentétes polaritású késlekedő szál rövid részletekben (ún. Okazaki fragmentekben) szintetizálódik. Az Okazaki fragmenteket a ligáz enzim kapcsolja egységes fonallá (5.5. ábra). (A DNS replikáció részletes mechanizmusát a genetikai és molekuláris biológiai szakkönyvek tárgyalják.)

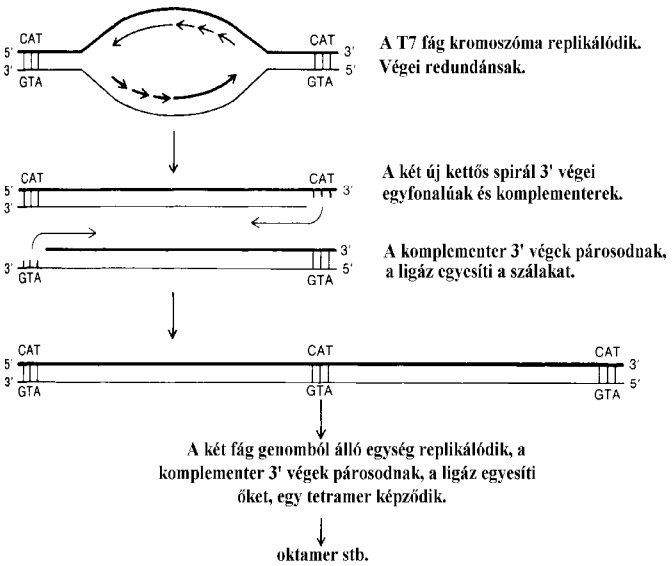
Mivel (i) minden DNS szál szintézise csak RNS primerrel kezdődhet és (ii) minden DNS szintézis templát alapján történik, a DNS szálak végének replikációja külön problémát jelent. A probléma megoldására különféle megoldásokat ismerünk. A baktériumok kromoszómái és a plazmidok gyűrűbe zárultak. A konkatamerek esetében a lineáris DNS szakaszok összekapcsolódnak. Eukariotákban az ún. telomeráz enzim akadályozza meg a kromoszómák rövidülését.



5.5. ábra. A replikáció mechanizmusának fontosabb lépései.

A konkatamer

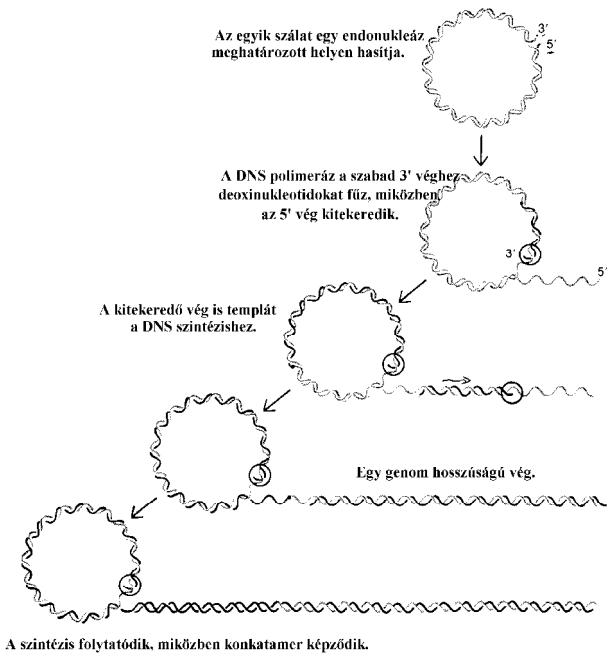
Sok, mint pl. a T7 fág DNS-e lineáris, és különös módon replikálódik (5.6. ábra). Egy replikáció végén olyan szabad 3' végek képződnek, amelyek komplementerei egymásnak. A komplementer végek párosodnak, és az ún. ligáz enzim összeköti őket. Végeredményben olyan DNS képződik, egy ún. konkatamer, amely két kópia fág genomból áll. A konkatamert alkotó fág genomok száma mértani haladvány szerint halad a replikációk nyomán, és ilymódon nagyon hosszú konkatamerek képződhetnek.



5.6. ábra. A konkatamer képződés modellje.

A forgó gyűrű

A forgó gyűrű módszer sok fág és plazmid esetében is hatékony megoldás a DNS replikációjára (5.7. ábra). Első lépésben egy endonukleáz enzim elhasítja a gyűrű alakú DNS kettős spirál egyik szálát. Amíg az 5' vég szabaddá válik, a szabad 3'-hez kapcsolódva a DNS polimeráz DNS-t szintetizál a gyűrű alakú templát alapján. Miközben a templát DNS körbe forog, az újonnan szintetizálódott DNS egyre hosszabb lesz, és templátként szolgál a másik DNS szál szintéziséhez. Végeredményben egy hosszú DNS kettős spirál, egy konkatamer képződik, amely annyi fág genomot tartalmaz, ahányat gördült a gyűrű (5.7. ábra).



5.7. ábra. A forgó gyűrű replikáció eredménye hosszú lineáris konkatamer.

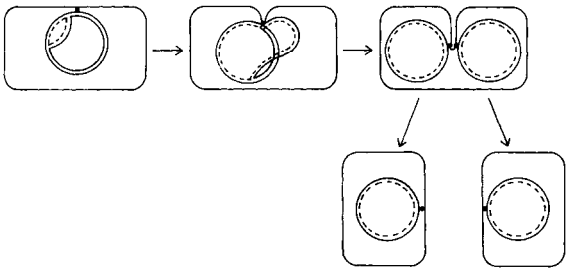
KROMOSZÓMÁK ÁTJUTÁSA SEJTRŐL SEJTRE, GENERÁCIÓRÓL GENERÁCIÓRA

A "helyspecifikus" és a "teltfej" pakolódás

konkatamerből kétféle módon képződhetnek genom méretű fragmentek. A *helyspecifikus* változatban a konkatamert endonukleázok jól definiált helyeken hasítják, úgy hogy egy fragment éppen egy fág genomnyi DNS-t tartalmaz. A genomnyi DNS épül be a fágburokba, miközben fertőzőképes fágok képződnek. A *teltfej* pakolódás esetében a konkatamer egyik vége betüremkedik a fágburokba, majd egy endonukleáz enzim akkor vágja el a konkatamert, amikor az éppen kitölti a fágfejet. A fágfej térfogata akkora, hogy pontosan egy fág genomnyi DNS fér bele. A konkatamer bármely pontján is kezdődjön el a "teltfej" pakolódás, a fágfej mindig egy genomnyi DNS-t tartalmaz.

A baktérium sejtek osztódása

A baktérium kromoszómák egy ponton a sejthártyához kapcsoltak. (A kapcsolódási pont nem azonos azzal a ponttal, ahol a replikáció kezdődik, bár a két pont nincs távol egymástól.) A replikációt követően a baktérium sejtek osztódása azon a ponton kezdődik el, ahol a kromoszóma a sejthártyához kapcsolódik. A sejthártya lefűződése, a tapadási pontok elkülönülése azt eredményezi, hogy a kromoszómák is elkülönülnek egymástól, és végeredményben más-más sejtbe jutnak (5.8. ábra).

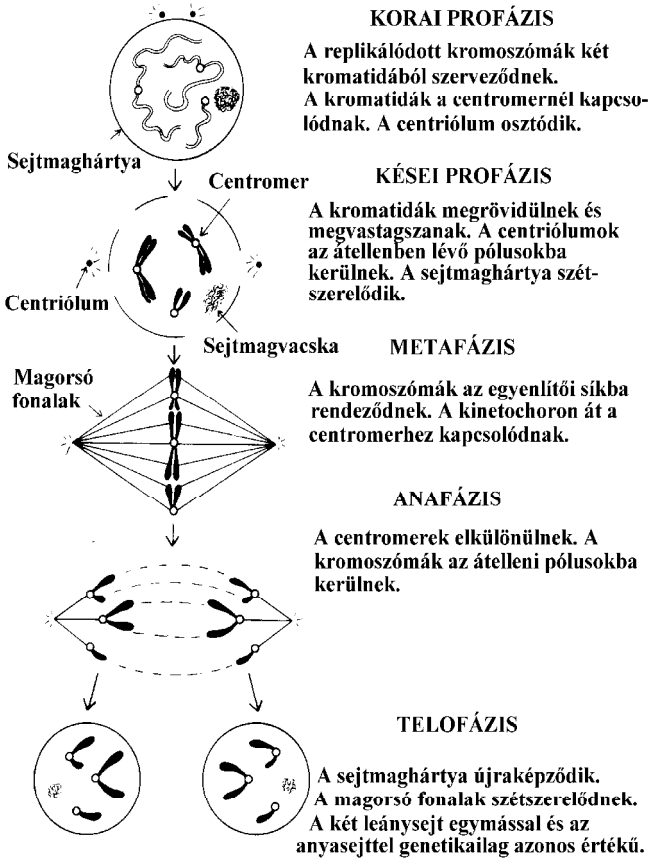


5.8. ábra. A baktérium kromoszómák megoszlása az utódsejtek között a sejtosztódás folyamán.

Az eukariota sejtek osztódása

MITÓZIS

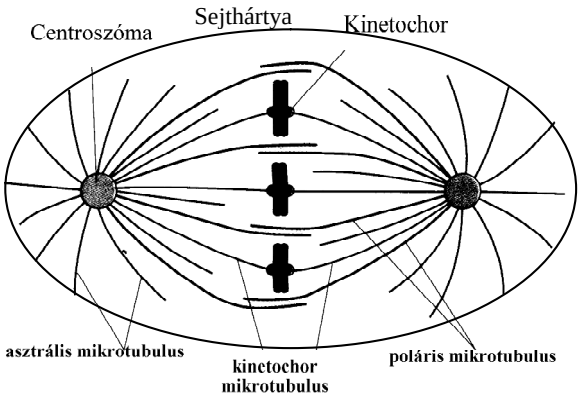
Az eukariota sejtek életében a növekedés és az osztódás ciklusokban követik egymást. Két osztódás között, az interfázisban, van egy olyan szakasz, az ún. S (szintézis) fázis, amikor a sejtek örökítő állománya (a sejtmagi DNS) replikálódik, megkettőződik. Az osztódásra felkészült sejtből a mitózis folyamán két leánysejt képződik. (A mitózist szokás számtartó sejtosztódásnak is nevezni.) A két leánysejt genetikai értelemben azonos értékű egymással, valamint az anyasejttel is.



5.9. ábra. A mitózis sematikus ábrázolása.

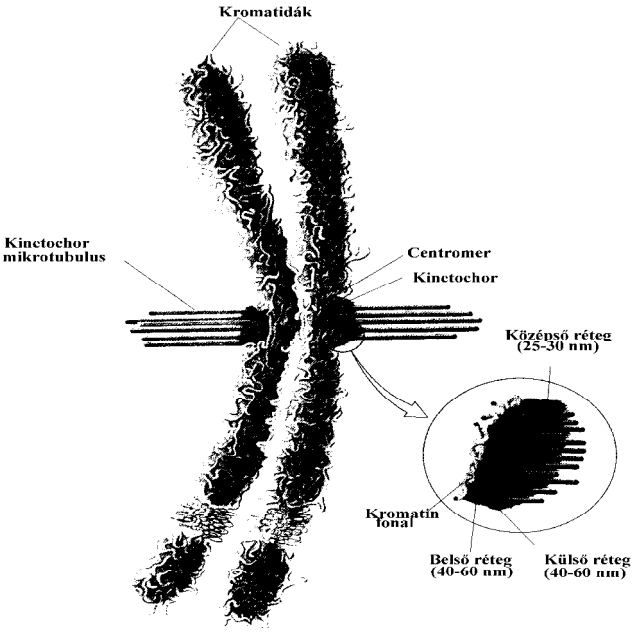
A mitózist mikroszkópban jól látható események alapján négy fontosabb szakaszra szokás osztani (5.9. ábra).

1. Profázis. Minden kromoszóma két leánykromatidából áll. A leánykromatidák a centromerjeiknél kapcsolódnak, és erősen megrövidülnek. A centriólum osztódik. Az osztódás termékei a sejtmaghártya felszínén a szemközti pólusokba vándorolnak. A sejtmagvacska és a sejtmaghártya felbomlik.



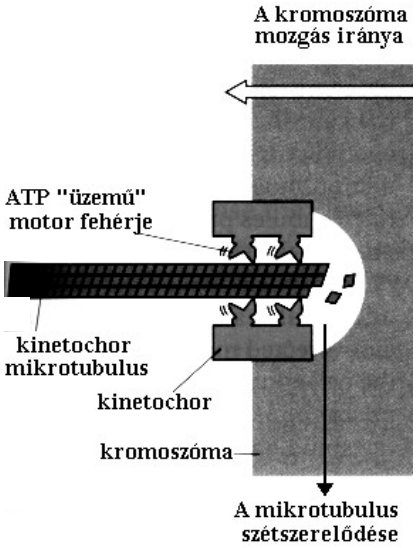
5.10. ábra. A háromféle mikrotubulus egy metafázisos sejtben.

2. Metafázis. A centriólum háromféle mikrotubulus szerveződését szabályozza (5.10. ábra). (1) Az ún. *poláris mikrotubulusok* a sejt egyenlítői síkjában átfednek. A poláris mikrotubulusokhoz az átfedő részeken olyan ún. mechanoenzimek (motor fehérje molekulák) kapcsolódnak, amelyek miközben összekapcsolják a mikrotubulusokat, az ellenkező irányba tolják őket. A poláris mikrotubulusok tartják távol egymástól a sejtközpontokat. (2) A *kinetochor mikrotubulusok* a kinetochorhoz tapadnak. A kinetochort szendvicsszerűen elrendezett ún. kinetochor fehérjék alkotják. A kinetochor a centro merhez kapcsolódik.



5.11. ábra. A centromer, a kinetochor, és a kinetochor mikrotubulus kapcsolata.

Egyetlen kinetochorhoz 30-40 mikrotubulus tapad, kapcsolatot teremtve a kinetochor mikrotubulusok és a kromoszómák között (5.11. ábra). A leánykromatidák egyike az egyik, másika a másik sejtközpontba futó kinetochor mikrotubulussal kapcsolódik. Ismereteink szerint a kinetochor motor fehérjéken keresztül kapcsolódik a mikrotubulusokhoz (5.12. ábra). A motor fehérjék (mechanoenzimek) egyik csoportját a dineinek, másikát kinezinek alkotják. A motor molekulák húzó hatása rendezi a kromoszómákat a sejt egyenlítői síkjába. A kolhicin az őszi kikerics alkaloidája, a tubulinhoz kapcsolódva megakadályozza a mikrotubulusok képződését, a metafázisban függeszti fel a mitózist, lehetővé téve a kariotipizálást, a metafázisos kromoszómák sorrendbe rakását. (3) Az *asztrális mikrotubulusok* a centroszómából sugárzanak ki és tartják a centroszómákat a sejt megfelelő térrészében.



5.12. ábra. A kromaszómát dinein motor fehérje szállítja a kinetochor mikrotubulus mentén.

3. Anafázis. A centromerek, és a leánykromatidák elválnak egymástól. A kromoszómák az ellentételes oldalakon levő pólusokhoz jutnak. A kromoszómák vándorlását dinein motor fehérje molekulák valósítják meg. A ma elfogadott nézetek szerint a motor fehérje molekulák a kinetochorhoz kapcsolódnak, és ATP felhasználásával a mikrotubulusok mentén a pólus felé vándorolnak, magukkal cipelve a kromoszómát (5.12. ábra). Mérések szerint egy kromoszóma "elszállításához" 20 ATP molekulát használnak fel a motor molekulák.

4. Telofázis. Befejeződik a mitózis. Újraalakul a sejtmaghártya, a sejtmagvacska, szétszerelődik a mitotikus mikrotubulus apparátus. Végeredményben két, az anyasejttel genetikai értelemben azonos értékű leánysejt képződik.

A citokinézis folyamán különülnek el egymástól a leánysejtek, miközben az anyasejt citoplazmája a két leánysejt között megoszlik. Állati sejtekben a leánysejtek elkülönülését mikrofilamentumok és a hozzájuk kapcsolódó speciális miozin molekulák biztosítják. Magasabbrendű növényekben az egyenlítői sík környékén, az osztódási orsóra merőlegesen egy ún. sejtlemez (fragmoblaszt) alakul ki. A sejtlemez a mikrotubulusok származéka. Anyagai a Golgi készülékből érkeznek apró hólyagocskákban, bennük az új sejthártya és a sejtfal építő elemeivel.

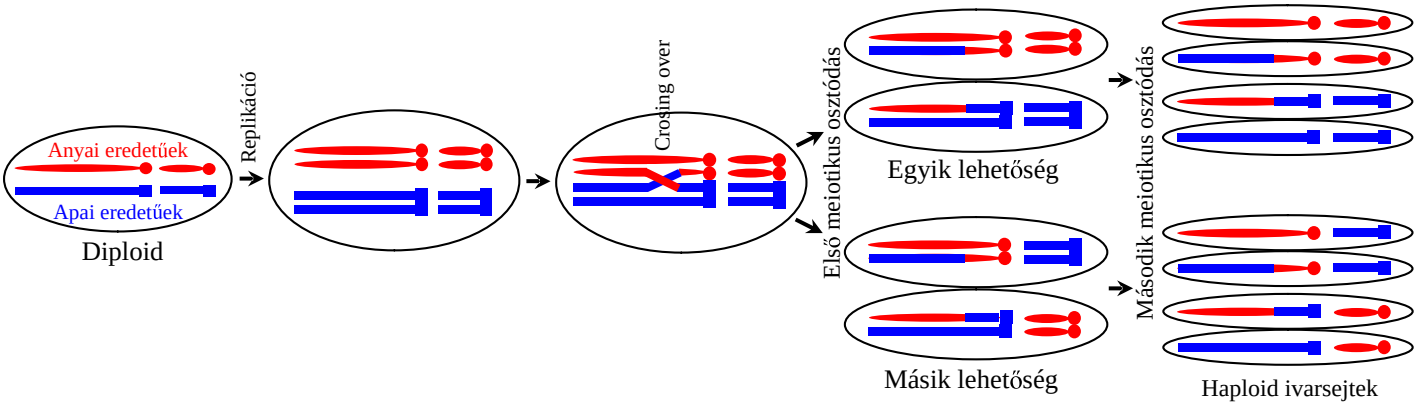
Mitotikus nondiszjunkció

A mitózis nagy pontossággal biztosítja, hogy a metafázisos kromoszómák egyik leánykromatidája az egyik, másika a másik leánysejtbe kerüljön, és azt is, hogy a kromoszómák száma sejtenként nem változik, a sejtek diploidok (2n) maradnak. A leánysejtek kromoszóma száma csak nagyon ritkán különbözik az anyasejtétől. Olykor-olykor elvész egy-egy kromoszóma. Ritkán előfordul, hogy a kromoszómák rendellenesen oszlanak meg az utódsejtek között, ún. kromoszóma szét-nem-válás, szakszóval nondiszjunkció következik be. Az ún. **mitotikus nondiszjunkció** következményeként az egyik leánysejtbe a szokásosnál általában egy kromoszómával több (2n+1, ún. triszómia), a másikba egy kromoszómával kevesebb (2n-1, ún. monoszómia) kerül. A szokásostól eltérő számú kromoszómát hordozó sejteket **aneuploid** sejteknek nevezzük. [A sejtek euploidok, ha a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú többszörösét hordozzák. A triploidok (3n) háromoszorosát, a tetraploidok (4n) négyszeresét, stb.)]

Az aneuploid sejtek életképessége a diploidhoz képest csökkent, a megbomlott géndózis és géntermék koncentráció viszonyok miatt. Már viszonylag kis kromoszómák hiánya, vagy a közepes méretű kromoszómák feleslege a sejt pusztulásához vezet. Minél kisebb a számfeletti vagy a hiányzó kromoszóma, annál kevésbé csökken a sejtek életképessége. A triszómiás sejtek életképessége jobb, mint a monoszómiásoké. A túlélő aneuploid sejtek osztódhatnak, együtt maradhatnak, és ún. egy klónt alkothatnak. Az aneuploid sejtek rákos daganatok kiindulási gócai lehetnek. Ismertek olyan környezetszennyező tényezők, amelyek fokozzák a mitotikus nondiszjunkció gyakoriságát. A mitotikus nondiszjunkció egy-egy testi sejtben szokott bekövetkezni. Nondiszjunkció természetesen nemcsak a mitózis, hanem a meiózis folyamán is megtörténhet.

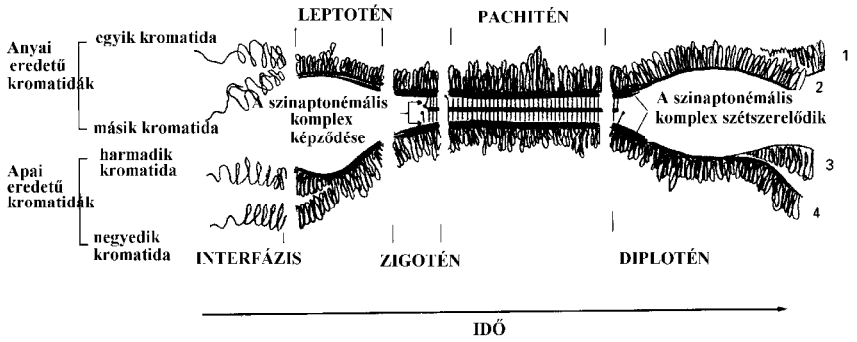
A MEIÓZIS

A meiózis, vagy számfelező sejtosztódás, lényegében két sejtosztódás, amelyek végén a diploid sejtekre jellemző kromoszómaszám megfeleződik. Úgy, hogy a meiózis termékeként képződő ivarsejtekbe minden homológ kromoszómából csak egyetlen egy kerül (5.13. ábra). Az ősivarsejtek diploidok, és mitotikusan osztódnak. A nő- illetve a hímnemű egyedekben oo- illetve spermatogoniális sejteknek nevezik őket. Az oo- és a spermatogoniális sejtek kezdik el az első meiotikus osztódást. Az első meiotikus osztódásban levő sejtek az elsődleges oociták, illetve spermatociták. Az elsődleges oociták az emberi magzatok petefészkeiben a 3-8. hónapban képződnek, és az első meiotikus osztódás profázisában "vesztegelnek" a



5.13. ábra. A meiózis sematikus ábrázolása két pár homológ kromoszómával.

nemi érés kezdetéig. A nemi érés kezdetétől hormonális hatásra folytatódik a meiózis az elsődleges oociták némelyikében. (Megjegyzendő, hogy a különböző fajok nősténye iben az oogenezis különféle stádiumokban szokott stagnálni. A legtöbb gerinces fajban a második meiotikus osztódás metafázisában, és a meiózis csak a megtermékenyülés után fejeződik be.) Az első meiotikus osztódás után a sejtek rögtön elkezdik a második meiotikus osztódást. A második meiotikus osztódást elkezdett sejteket nevezik másodlagos oo- illetve spermatocitáknak. A második meiotikus osztódás végén képződnek az ivarsejtek.



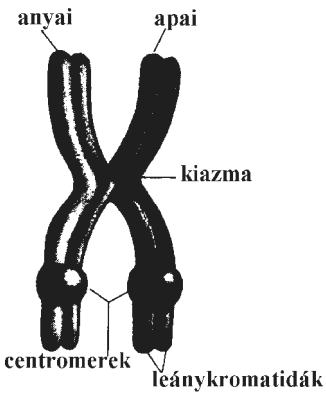
5.14. ábra. Az első meiotikus osztódás profázisát alkotó stádiumok időbeli ábrázolása. Magyarázat a szövegben.

Az első meiotikus vagy redukciós osztódás

Az első meiotikus osztódás, hasonlóan a mitózishoz, stádiumokra osztott.

Profázis I. Az első meiotikus osztódás során a homológ kromoszómák részei kicserélődnek, rekombinálódnak, köztük ún. **crossing over** játszódik le. Az első meiotikus osztódás profázisát az egyszerűség kedvéért négy alstádiumra szokás elkülöníteni (5.14. ábra).

1. A *leptotén* stádiumban a már replikálódott kromoszómák tömörödnek, mikroszkópban felismerhetők. A leánykromatidák szorosan összetapadnak.
2. A *zigotén* stádiumban a homológ kromoszóma párok (természetesen egyenként két-két leánykromatidával) párosodnak és egy ún. szinaptonémális komplexet képeznek. (Egy kromoszóma összetapadt ikerkromatidáit diádnak nevezik. Két homológ kromoszóma összetapadt négy kromatidja egy ún. tetrádot alkot.)
3. A *pachitén* stádiumban cserélődnek ki a kromatidák komplementer részei, játszódik le a crossing over. A crossing over mindig a nemleány kromatidák között történik, és pontos. Bár csak ritkán, ám meg-megtörténik a kromatidák egyenlőtlen cseréje is. A crossing over alapja a DNS fonalak törése és újraegyesülése. A crossing over a rekombináció, a genetikai sokféleség egyik pillére: a szülői eredetű kromoszóma részek cseréjével a tulajdonságok új kombinációi valósulnak meg. (A crossing over molekuláris mechanizmusával a genetika tankönyvek foglalkoznak.) A rekombináció az anyai és az apai eredetű krmomoszómák, vagy kromoszóma részek (lényegében a genetikailag meghatározott szülői tulajdon-ságok) újfajta kombinációinak kialakulását jelenti az ivarsejtek képződése folyamán.



5.15. ábra. A homológ kromoszómák kromatidáinak cseréje helyén kiazma képződik.

4. A *diplotén* stádiumban a homológ kromoszómák (négy kromatida) kezdenek elválni egymástól. A crossing over helyén a kromatidák X alakban rendeződnek el, és egy ún. kiazmát képeznek (5.12. ábra). A kiazma tehát a crossing over megjelenési formája. A diakinézis során a kromatidák kondenzálódnak. Elkezdődik a sejtmaghártya szétszerelődése.

Metafázis I. Szétszerelődik a maghártya és a sejtmagvacskák is. Mikrotubulusok képződnek és kapcsolódnak a kinetochorhoz. A homológ kromoszómák (mindegyikük két-két leánykromatidával) az egyenlítői síkban helyezkednek el.

Anafázis I. A homológ kromoszómák egyike az egyik, másika a másik a pólushoz kerül. Az anyai és az apai eredetű kromoszómák véletlenszerű kombinációkban jutnak az egyik vagy a másik pólushoz. Az anyai és az apai eredetű kromoszómák véletlenszerű kombinációja a meiózis "értelme", a rekombináció egyik komponense (a másik a crossing over), az élőlények sokféleségének, a környezethez való alkalmazkodó képességének egyik pillére. (Zárójelben jegyezzük meg, hogy a kromoszómáknak az első meiotikus osztódás anafázisában bekövetkező véletlenszerű szegregációja miatt egy ember $2^{23} = 8{,}4x10^6$ különböző kromoszóma kombinációjú ivarsejtet képezhet. A $8{,}4x10^6$ értékből eredő változatosságot fokozza a kromoszómánkénti 2-3 crossing over, valamint a ritkán bekövetkező mutációk is.)

Telofázis I. Csak nagyon rövid ideig tart. Új sejtmaghártya képződik. Az első telofázist csak egy rövid interfázis követi. Az interfázis szokatlan, mert a kromoszómák nem dekondenzálódnak, és nem történik replikáció.

Második meiotikus (ekvációs) osztódás

A második meiotikus osztódás lényegében egy mitózis (5. 13. ábra).

Profázis II. Csak pár percig tart, miközben lebomlik a sejtmaghártya.

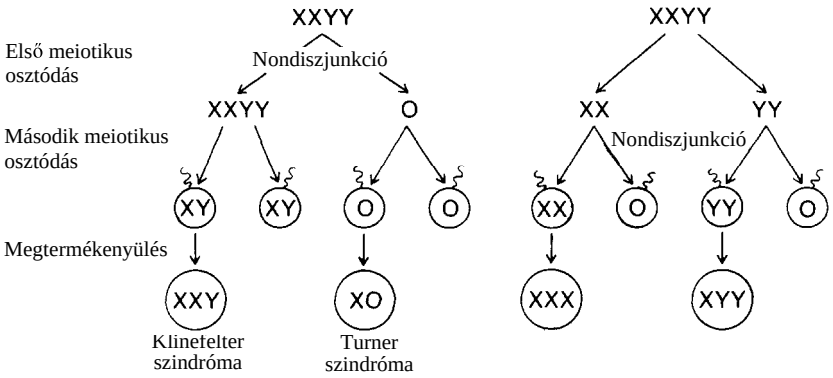
Metafázis II. A kromoszómák (a homológok egyike két kromatidával) az egyenlítői síkban helyezkednek el, és szorosan kapcsolódnak a kinetochor mikrotubulusokkal.

Anafázis II. A leánykromatidák elkülönülnek egymástól, és mint önálló kromoszómák az ellentétes oldali pólusokba vándorolnak. A DNS mennyisége a haploid sejtekre jellemző értéket veszi fel.

Telofázis II. Négy haploid sejt képződik. Újra képződik a sejtmaghártya. Nőstényekben a haploid sejtek petesejtté és sarki testekké, hímekben spermiumokká differenciálódnak (5.13. ábra).

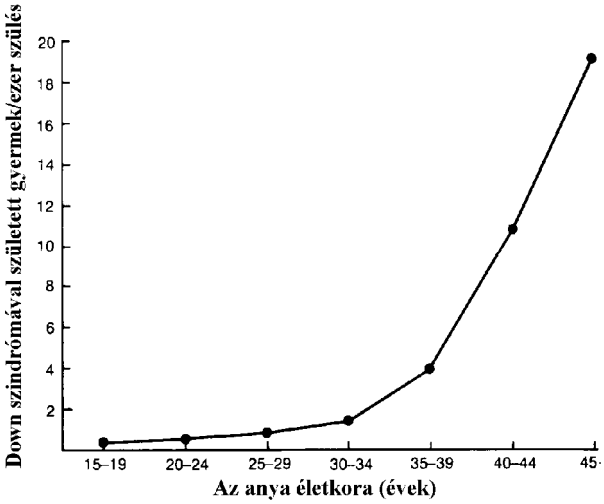
Meiotikus nondiszjunkció

Nondiszjunkció, a kromoszómák rendellenes megoszlása az utódsejtek között, természetesen az első és a második meiotikus osztódás során is bekövetkezhet. A nondiszjunkció érintheti az autoszómákat és a nemi kromoszómákat is (5.16. ábra). Ha egy aneuploid petesejtet normális számú kromoszómát hordozó spermium termékenyít meg (vagy fordítva) olyan zigóta képződik, amelynek minden sejtje aneuploid. A minden sejtükben aneuploid élőlények sokkal szembetűnőbbek, mint azok, amelyek testi sejtjeinek csupán egy kis csoportja aneuploid. (Az aneuploid sejtek életképességére a fentebb elmondottak igazak.)



5.16. ábra. A meiózis folyamán bekövetkező nondiszjunkció eredményeként aneuploid ivarsejtek képződnek. A példa a nemi kromoszómákra vonatkozik.

Az autoszómák aneuploidiájára legismertebb példa a Down szindróma (vagy mongoloid idiotizmus), triszómia a 21. kromoszómára. Ismert, hogy az anyai kor előrehaladtával exponenciálisan növekszik a Down szindrómával született gyermekek gyakorisága (5.17. ábra).

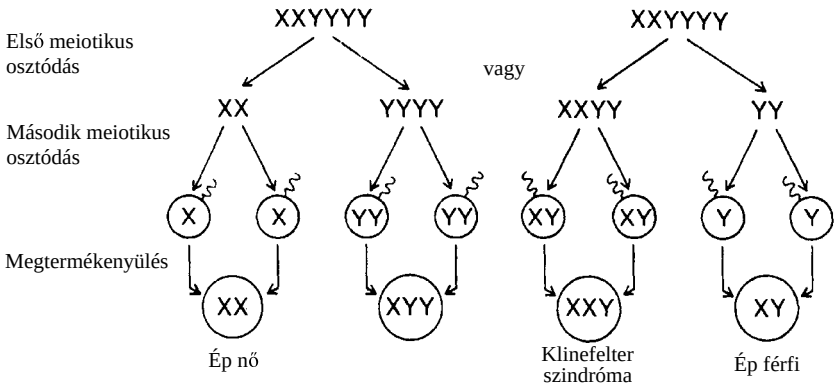


5.17. ábra. Összefüggés a szülő nő életkotra és annak valószínűsége között, hogy gyermeke Down szindrómás lesz.

Nondiszjunkció következtében nemcsak az autoszómák, hanem a nemi kromoszómák száma is lehet rendellenes (5.16. ábra). A nemi kromoszómákra aneuploid élőlények életképessége csak csekély mértékben csökkent. Ha rendellenes számban nemi kromoszómákat hordozó ivarsejtek vesznek rész a megtermékenyülésben olyan emberek születnek, akik pl. a Turner (X0), a Klinefelter (XXY) szindrómára jellemző tünetegyüttest mutatják (5.1. táblázat.)

5.1. táblázat. Rendellenes nemi kromoszóma garnitúrák jellemzői emberben.

Kromo-szóma	Születési gyako-riság	Nem	Jellemzői	Barr test
X0 Turner	0,04	Nő	Steril, rövid törzs, széles nyak. Csökkent értelmi képesség.	0
XYY	0,125%	Férfi	Semmi különös	0
XXY Kline-felter	0,14%	Férfi	Steril, magas, kis emlők fejlődnek. Csökkent értelmi képesség.	1
XXX	1,10%	Nő	Csökkent fertilitás és értelmi képesség	2
XXXX	<0,03%	Nő	Csaknem sterilek, értelmi képesség csökkent.	3



5.18. ábra. A másodlagos nondiszjunkció során a már aneuploid sejtekből sok aneuploid ivarsejt képződik.

A diploid sejtekben bekövetkező nondiszjunkciót nevezik *elsődleges nondiszjunkciónak*. A *másodlagos nondiszjunkció* során a már eleve aneuploid ősivar sejtekből származnak aneuploid ivarsejtek. Az aneuploid sejtekben ugyanis megmarad a számfeletti kromoszóma a meiózis során, és valamelyik ivarsejt alkotójává válik (5.18. ábra). Végeredményben tehát az aneuploid élőlényektől anélkül származnak nagy gyakorisággal aneuploid ivarsejtek, hogy bennük elsődleges nondiszjunkció következne be.

Prenatális diagnosztika

A prenatális diagnosztikai módszereket elterjedten alkalmazzák elsősorban olyan esetekben, amikor vélhető, hogy a magzat kromoszóma garnitúrája rendellenes. (Mint pl. a 40 évesnél idősebb várandós asszonyok esetében.) A vizsgálat során magzati sejteket kariotipizálnak. A magzatból sejteket négyféle módszerrel lehet gyűjteni: (i) a magzatvízből, (ii) a korionboholyból, (iii) a köldökvénából, vagy (iv) az anya vérkeringéséből.

BEFEJEZÉS

Az örökítő anyag szemikonzervatív módon replikálódik, hogy szabályozza a következő generációk életét, biztosítsa a fajok létét. Az örökítő anyag átadására bár sokféle mechanizmus alakult ki az evolúció folyamán, közös jellemzőjük, hogy az átadott "egység" genomnyi. Az örökítő anyag fontos jellemzője, hogy különféle mechanizmusok révén biztosítja az élőlények sokféleségét, esélyét a túlélésre a változó életfeltételek közepette. Az örökítő anyag mennyiségének részleges változása (az aneuploidia) a sejtek és/vagy az utódok teljes vagy csökkent életképtelenségét eredményezi.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 209-235, 276-284, 2011.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis, 42-57, 107-109, 90-94, 102-109, 542-546, 2008.
3. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology, 139-143, 781-791, 864-904, 2007.
4. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 88-146, 1989.

6. A FÁGOK ÉS A BAKTÉRIUMOK GENETIKÁJA

6.1. A (BAKTERIO)FÁGOK GENETIKÁJA.

Markerek. Gének térképezése. Térképezés géneken belül: intragénikus rekombináció. A restrikciós-modifikációs rendszer. Restrikciós enzimek, palindrom szekvenciák. Metiláz.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

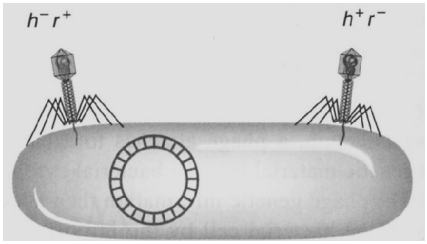
Vannak olyan, a bakteriofágokkal kapcsolatos jellegzetességek, amelyek alapján térképezni lehet a fágok génjeit. Bár a genetikai keresztezések során képződő rekombináns fágok ritkák lehetnek, az utód fágok nagy száma, valamint a kiváló szelekciós rendszerek lehetővé teszik a ritka rekombinánsok azonosítását. Akár az olyanokét is, amelyek génen belül bekövetkező (ún. intragénikus) rekombináció nyomán képződnek. A fágokkal végzett keresztezések nyomán derült fény az ún. restrikció-modifikáció jelenségére, mely elvezetett a restrikciós enzimek felfedezéséhez, a molekuláris genetika kialakulásához. A jelen fejezet a bakteriofágok genetikájába pillant be.

Markerek a bakteriofágok genetikájában

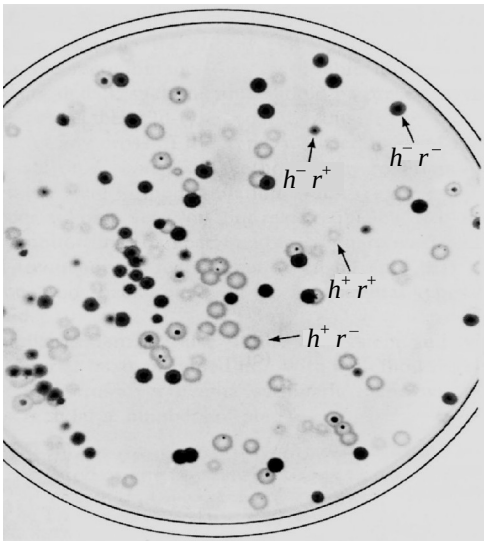
A bakteriofágok (baktériumokat evő vírusok) miközben baktérium pázsiton egymás után „falják fel" a baktériumokat, tarfoltokat, plakkokat képzenek. Egy tarfolt egyetlen fág utódainak tevékenysége nyomán képződik. A tarfoltok mérete, alakja a fágok valamely génje által meghatározott tulajdonság. Például az *E. coli* T2 fágja, amely az r^+ ép gént hordozza, a baktérium pázsiton kis foltokat képez. Az r^- (*r*apid lysis) mutáns allélt hordozó fágok viszont nagy plakkokat képeznek. Egy további genetikailag meghatározott tulajdonság az ún. gazdaspecificitás (*h*ost range), ami azt mutatja, hogy valamely fág mely baktérium törzset, törzseket képes fertőzni, és melyeket nem. (Egy törzset valamilyen szempontból azonos genotípusú élőlények alkotnak. Itt egyetlen baktérium leszármazottai.) Például az *E. coli* T2 fágja, amely a h^+ ép gént hordozza, azokat a baktériumokat fertőzi és „falja fel", amelyek a #1-es törzsből származnak. A #2-es baktérium törzs sejtjeit viszont nem képes megfertőzni. (A h^+ T2 fág szaporodás képtelensége a #2-es baktérium törzs sejtjein egyfajta restrikciós körülménynek felel meg.) A h^- mutáns allélt hordozó baktériumok viszont mind a #1-es, mind a #2-es baktérium törzs sejtjeit meg tudják fertőzni, pázsitjainkon plakkokat képezni. A plakkok mérete, a fág fertőzőképessége alapján tehát különbséget lehet tenni az r^+ és az r^-, valamint a h^+ és a h^- allélokat hordozó fágok között.

Fágkeresztezés két gén két alléljával

Az előzőekben bemutatott két gén két-két alléljával végezte el munkatársaival Alfred D. Hershey (1949) a következő keresztezést: $h^- r^+$ x $h^+ r^-$. Úgy, hogy a #1-es törzs baktériumainak szuszpenziójához (egy kémcsőben) egyszerre adott $h^- r^+$ és $h^+ r^-$ fágokat (1. ábra). (A #1 törzs baktériumain a h^+ és a h^- fágok is szaporodnak.) Néhány óra inkubáció után a baktériumok szétestek, a kémcső tartalma kitisztult. (A baktérium szuszpenzió tejszerű, mert a látható fény hullámhosszánál nagyobb baktériumokon szóródik a fény. A fény hullámhosszánál kisebb fágok nem szórják a fényt, a fágok szuszpenziója átlátszó.) Hershey a fágok szuszpenziójának kis mintáját olyan baktérium pázsitra tette, amely pázsitot #1-es és #2-es baktériumok keverékéből növesztett, majd néhány órás inkubáció után meghatározta, hogy milyen fágok, és milyen gyakorisággal növekedtek a pázsiton (2. ábra és 1. táblázat).



6.1. ábra. A #1-es *E. coli* törzs baktériumainak egyidejű fertőzése (a fágkeresztezés) kétféle fággal.



6.2. ábra. A $h^- r^+$ x $h^+ r^-$ fágkeresztezés nyomán a #1 és a #2 baktériumok keverékéből álló pázsiton képződő plakkok típusai.

6.1. táblázat. A $h^- r^+$ x $h^+ r^-$ fágkeresztezés nyomán képződő fágok típusai és gyakoriságai.

Plakk fenotípus	Fág genotípus	Plakk (%)	A fág típusa
$h^- r^+$	Átlátszó, kicsi	42	Szülői
$h^+ r^-$	Homályos, nagy	34	Szülői
$h^+ r^+$	Homályos, kicsi	12	Rekombináns
$h^- r^-$	Átlátszó, nagy	12	Rekombináns

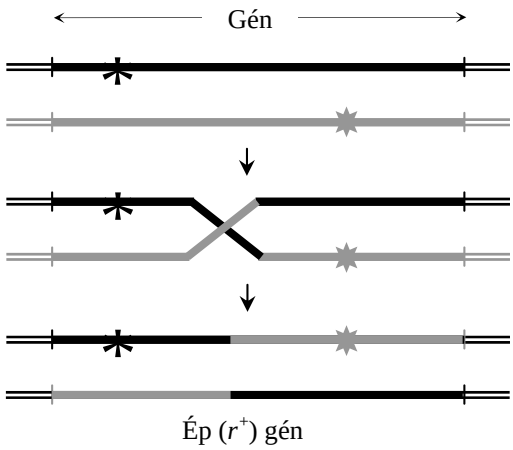
(Megjegyzés: homályos, mert a h^+ fágok nem tudják „felfalni" a #2-es baktériumokat.)

Hershey kísérletei megmutatták, hogy miközben a kétféle genotípusú fág egyszerre van jelen a baktérium sejtben, kromoszómáik között rekombináció játszódhat le, rekombináns kromoszómák, fágok képződhetnek. A rekombináns fágok felismerhetők, gyakoriságuk meghatározó.

Fágkeresztezés egy gén két alléljával; intragénikus rekombináció

Az utód fágok rendkívül nagy száma, valamint a szelekciós rendszer megbízhatósága teszi lehetővé a roppant ritka rekombináns fágok detektálását. Az 1950-es években Seymur Benzer laboratóriuma az *E. coli* baktérium sejteket gyorsan elpusztító T4 fág *r* mutánsaival végzett keresztezéseket. Az ép r^+ allélt hordozó T4 fágok az *E. coli* B és K törzsék pázsitján kis plakkokat képeznek. Az *r* mutánsok viszont csak a B törzs sejtjein képesek szaporodni, a K törzsből növesztett pázsiton nem képeznek plakkokat.

S. Benzer r^1 és r^2 mutáns fágokkal fertőzte egyidejűleg a B törzsből származó baktériumok szuszpenzióját. (Az r^1 és r^2 mutációk egymástól függetlenül következtek be, ugyanabban az r^+ génben.) Benzer feltételezte, hogy ha az r^1 és r^2 mutációk a gén különböző helyein vannak, közöttük rekombináció játszódhat le (6.3. ábra). A rekombináció nyomán olyan kromoszóma képződik, amely nem hordozza sem az r^1, sem az r^2 mutációt, lényegében egy r^+ gént hordozó fág képződik, amely a K törzsből készített baktérium pázsiton plakkot képez.

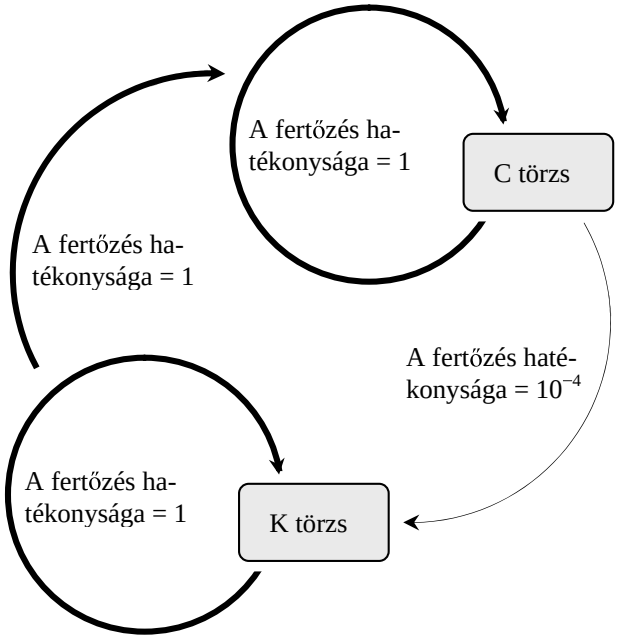


6.3. ábra. A két *r* mutáns allél (∗ és ✸) között a génen belül bekövetkező rekombináció nyomán olyan fág kromoszóma képződik, amely az ép r^+ gént hordozza.

A B baktériumok szétesése nyomán képződő fágszuszpenziót (amelynek 1 ml-e akár 10^9 fágot is tartalmazhat) a K törzsből készített baktériumok pázsitjára tette, ahol bár csak kevés, ám a vadtípusú fágra jellemző kis plakk képződött. A kis plakkok olyan fágokat létét mutatták, amelyek a génen belül bekövetkezett ún. intragénikus rekombináció nyomán képződtek. Sok *r* mutáns fág egymás között keresztezése nyomán arra is fény derült, hogy az r^+ ép génen belül két funkcionális egység van, amelyeket Benzer cisztronnak nevezett. A Benzer által kifejlesztett technika oly' érzékeny, hogy alkalmas két bázispár között bekövetkező rekombináció detektálására.

A restrikciós modifikációs rendszer

A λ fágokkal végzett kísérletek nyomán különös jelenségre figyeltek fel a kutatók. Az *E. coli* K törzsének sejtjein szaporodó λ fágok roppant hatékonyan fertőzik meg a sejteket, és pusztítják el azokat (6.4. ábra).



6.4. ábra. A fágfertőzés hatékonysága különféle körülmények között növekedett fágok esetében.

Werner Arber és munkatársai itt nem részletezett genetikai kísérletek során arra jött rá, hogy a K törzs baktériumai úgy védekeznek a C sejteken növekedett fágok ellen, hogy a sejtjeikbe bejutó fág DNS-t darabokra hasítják, védekezésként a fágfertőzés ellen. A DNS aprítását végző enzimeket ma *restrikciós endonukleázoknak*, röviden *restrikciós enzimeknek* nevezik.

Ha nagy feleslegben fertőznek K sejteket C sejtekben növekedett fágokkal, és kimerítik a baktérium DNS aprító kapacitását, néhány fág DNS megússza a feldarabolódást, mintegy alkalmazkodik a K baktériumhoz, hogy aztán abban elszaporodjon, és elpusztítsa a baktérium sejtet. A jelenség kapcsán egész sor kérdés merül fel. Mi a különbség a C és a K baktériumban szaporodott fágok között? Minek alapján ismeri fel a K baktérium a C-ben képződött fágokat? Miért nem aprítja fel a K baktérium a saját DNS-ét? Miként tesz különbséget a K baktérium a saját DNS-e és a C-ben képződött fágok DNS-e között?

A válasz az ún. restrikciós-modifikációs rendszer jellegzetességeiben rejlik. A C sejtekben van egy olyan restrikciós enzim, amely jellegzetes, ún. *palindrom szekvenciát* ismer fel, és ott elvágja a DNS-t. (Az 5'GAATTC3' a palindrom szekvenciák egyike; 5'→3' irányban olvasva a bázisok sorrendje azonos a DNS két szálán.) A restrikciós enzimek a C sejtekben növekedett fágok DNS-ében felismerik a palindrom szekvenciákat, elhasítják, megsemmisítik a fág DNS-t. Miért nem aprítja fel a restrikciós enzim a K sejt a saját DNS-ét? Azért nem, mert a saját DNS-ének A és/vagy C bázisait a kritikus helyen egy metiláz enzim metilálja. Minthogy a metilált A-t és/vagy C-t tartalmazó palindrom szekvenciákat a restrikciós enzim nem ismeri fel, nem vágja el DNS-t. A metiláz és a restrikciós enzim kart karba öltve funkcionál. Azért, mert a C törzsből származó fág DNS nem metilált, a K törzsbe lépve a restrikciós enzim feldarabolja. Az a néhány fág DNS molekula, amely elkerüli a restrikciós enzim áldatlan hatását, a kritikus helyeken metilálódik, miáltal védetté válik a restrikciós enzimmel szemben, szabályozhatja az utód fágok képződését, a baktérium szétesését. A K sejtből kiszabaduló fágok DNS-ében a palindrom szekvenciák metiláltak, éppen úgy, mint a K baktérium saját DNS-e, velük szemben a K sejtek (és a C-k is) védtelenek. Érthető, hogy a fágok nagy hatékonysággal fertőzhetik mind a K, mind a C törzs baktériumait. A restrikciós-modifikációs rendszer „hozadékai", a restrikciós enzimek, forradalmasították a biológiát.

Összefoglalás

A fágok genetikája egykor úgy tűnt, mint néhány kutató hobbija. Kiderült azonban, hogy a fágokkal megismerhetők a génfunkció egységei. A gazdaspecificitás, és a fágokkal végzett keresztezések furcsaságainak rejtélyeit kutatva a restrikciós enzimek szép új világa bontakozott ki, azok nyomán pedig egy új tudományág: a molekuláris biológia.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi., Genetic Analysis, 199-204, 180-189, 204-220, 2008.
2. Gingeras, T.R., Restriction-modification systems: genetic sentries in the study of molecular genetics. (In: Modern Microbial Genetics; Streips U.N. and Yasbin, R.E. editors; ISBN 0-471-56845-7; Wiley-Liss,), 301-322. 1990.

6.2. A BAKTÉRIUMOK GENETIKÁJA.

Transzformáció, transzdukció, konjugáció. A baktériumok géntérképei.

BEVEZETÉS

Joshua Lederberg és Edward L. Tatum írta le először (1946-ban) az örökítő anyag és a tulajdonságok kombinálódását baktériumokban. Az *E. coli* két törzséből származó sejteket hoztak össze egymással (pl. $a^- b^- c^-$ mutánsokat $d^- e^- f^-$ mutánsokkal), majd - nagy meglepetésükre - az utód baktériumok között rekombinánsokra lettek figyelmesek (pl. $a^- b^- e^- f^-$, vagy $c^- d^-$ baktériumokra). Hogyan cserélik ki a baktériumok genetikai anyagukat? Mi a jelentősége a baktériumok genetikájának életünkben? A jelen fejezet az előző kérdésekre keresi a választ. Ma már tudjuk, hogy a baktériumokban három módja van a genetikai anyag átadásának és kombinálódásának: transzformáció, transzdukció, és konjugáció. A baktériumok genetikája a molekuláris biológia egyik pillére.

Mutáns fenotípusok baktériumokban

A mutáns és a vadtípusú baktériumok közötti különbségtétel alapja a *szelekció*: olyan körülmények biztosítása, amelyek között a vadtípusú (vagy a mutáns) sejtek életben maradnak, osztódni képesek és telepet, kolóniát képeznek. Amely körülmény között a mutáns (vagy a vadtípusú) sejtek nem osztódnak, esetleg elpusztulnak. (Egy-egy baktérium telepet, kolóniát olyan sejtek alkotnak, amelyek egyetlen sejt együtt maradt leszármazottai). Arra, hogy különbséget tegyünk vadtípusú és mutáns baktérium sejtek között négy szelekciós rendszert ismerünk.

1. Rezisztens ↔ érzékeny

Amíg a rezisztens baktériumok szaporodni tudnak valamilyen hatóanyag, vagy fágok jelenlétében (pl. a nátrium azid, az antibiotikumok, vagy a különféle fágok), az érzékeny sejtek vagy nem tudnak osztódni, vagy elpusztulnak.

2. Auxotrófok ↔ prototrófok

Amíg a prototróf baktériumoknak minimális a tápanyagigénye, az auxotrófok létéhez szükség van valamilyen segítségre, tápanyagra. Pl. amíg a leu^+ vadtípusú baktériumok elő tudják állítani az életükhöz szükséges leucint, addig a leu^- auxotróf mutáns baktériumok növekedésükhöz leucint igényelnek.

3. Szénforrás hasznosítás képessége

Képesség, illetve a képesség hiánya valamilyen tápanyag hasznosítására. Amíg pl. a gal^+ vadtípusú baktériumok tudják hasznosítani a galaktózt és szaporodnak, a gal^- mutáns sejtek nem tudják a galaktózt szénforrásként hasznosítani. Ha a galaktóz az egyetlen szénforrás a gal^- mutáns sejtek nem osztódnak.

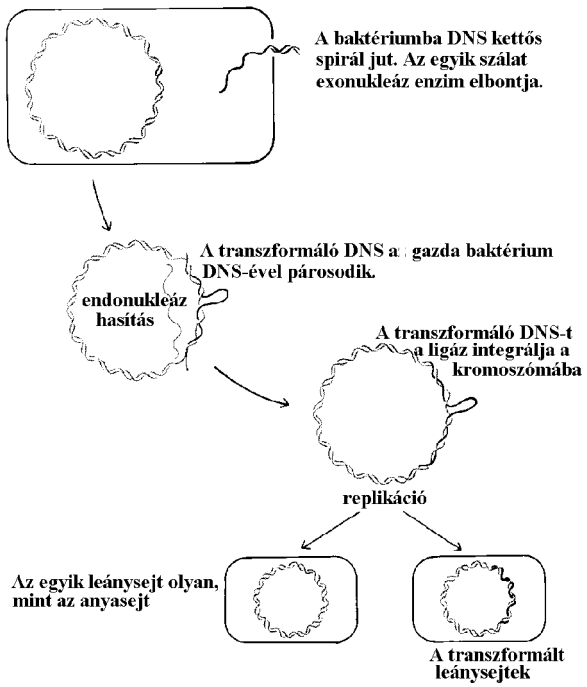
4. Kondicionális letális mutánsok

Az ún. kondivionális letális mutánsok *restriktív* körülmények között (pl. a szokásosnál kissé magasabb hőmérsékleten) nem, de *permisszív* körülmények között szaporodnak. A vadtípusú sejtek restriktív körülmények között is osztódnak, szaporodnak.

A szelekciós körülmények teszik lehetővé a rekombináns baktériumok kimutatását, valamint azt is, hogy megismerjük a genetikai anyag kombinálódásának törvényszerűségeit baktériumokban.

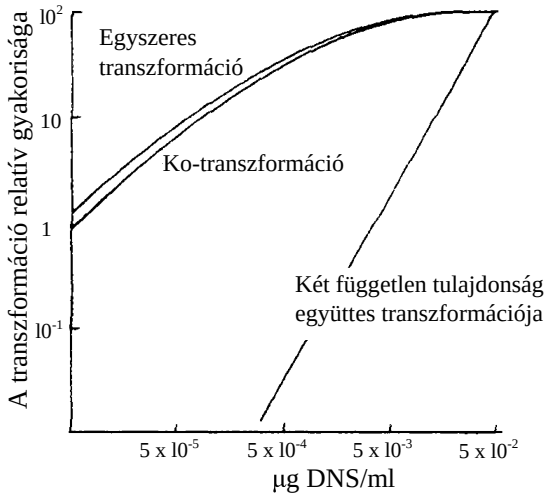
TRANSZFORMÁCIÓ

A transzformáció alapja DNS darabok felvétele a környezetből, és beépülése a baktérium genomjába. Tudott, hogy a transzformáció sok baktériumfajban megtörténik, mint pl. a *Hemophilus influenzae*, a *Bacillus subtilis*, a *Pseudomonas aeruginosa*, az *E. coli* és természetesen a *Streptococcus pneumoniae*-ben. (Lásd Griffith, valamint Avery és munkatársai kísérleteit a 4. fejezetben.) A transzformáció lépései a következők. 1. A kompetens sejtek felveszik a DNS-t. (Azokat a sejteket nevezzük kompetensnek, amelyek *képesek* a DNS felvételére. Általában a sejteknek csak kis hányada kompetens. Különféle kezelésekkel, pl. $CaCl_2$ kezeléssel növelni lehet a kompetens sejtek, a transzformáció gyakoriságát.) 2. A DNS felvétele során a DNS egyik szála megsemmisül, a másik bejut a sejtbe. 3. A bejutott DNS szál ún. heteroduplexet képezhet a komplementer szállal, amely része a baktérium kromoszómájának (6.5. ábra). (A heteroduplexben a két DNS szál nem tökéletesen komplementer.) 4. Egy egyszálú DNS hurok kitüremkedik, amit aztán enzimek kivágnak és elemésztenek. 5. A ligáz enzim összeköti a szabad végeket, és a transzformáció során a sejtbe jutott DNS a baktérium kromoszóma részévé válik. Az integrálódás gyakorisága kb. 50%. A replikációt követően csak az egyik sejt transzformáns (6.5. ábra).



6.5. ábra. A transzformáció mechanizmusa.

A ko-transzformáció (transzformáció egyszerre több génnel) használható baktérium gének térképezésére (6.6. ábra). Nyilvánvaló, hogy amennyiben közel van két gén egymáshoz a kromoszómán (lehetnek a transzformáló DNS szakasz részei), akkor gyakran vehetnek részt egyidejűleg a transzformációban, és fordítva: ha távol vannak, csak nagyon ritkán, a kettős transzformációk esetében. A ko-transzformációt úgy mérik, hogy meghatározzák a transzformáció gyakoriságát a DNS koncentráció függvényében. Amint azt a 6.6. ábra mutatja, a transzformáció gyakorisága más összefüggés szerint alakul az egymás közelében levő, illetve a távoli gének esetében. A távoli gének esetében az egyidejűen bekövetkező transzformáció gyakorisága annyi, mint a két génre külön-külön számított transzformációs gyakoriságok szorzata. Az egymás közelében levő gének esetében a ko-transzformáció sokkal gyakoribb, mint a külön-külön gyakoriságok alapján várható volna.



6.6. ábra. Az együttes transzformáció gyakorisága eltérő összefüggést mutat a DNS koncentráció függvényében a közeli és a távoli gének esetében.

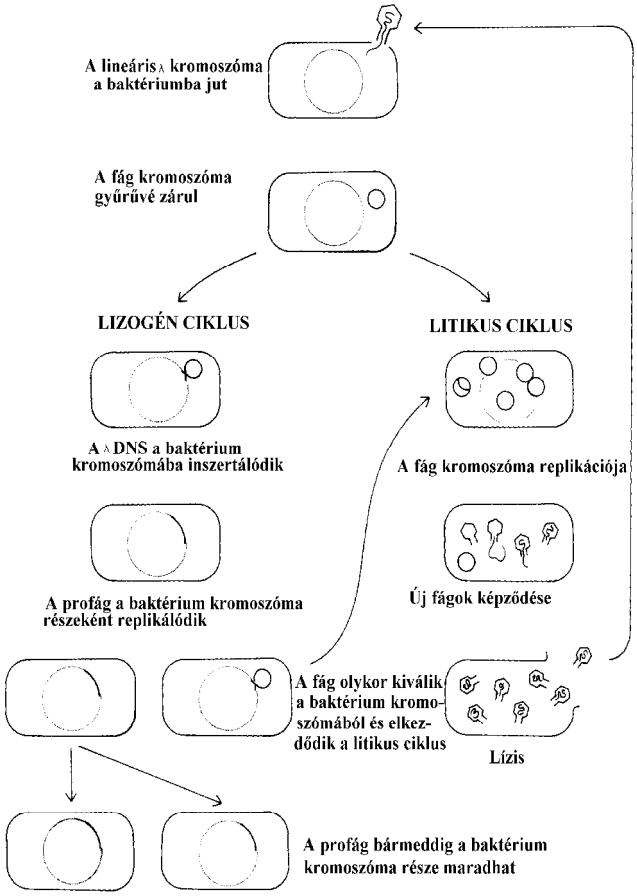
TRANSZDUKCIÓ

Transzdukció: baktérium DNS átvitele egyik baktérium sejtből egy másikba bakteriofágok közvetítésével. A transzdukciónak, attól függően, hogy a donor baktérium mely kromoszóma szakasza jut át a recipiens baktériumba, két típusa van: az általános és a specializált. Transzdukcióra csak a *mérsékelt* fágok képesek, a *virulens* fágok nem. Először a mérsékelt fágokkal ismerkedjünk meg, a transzdukció közvetítőivel.

Mérsékelt fágok

Valószínű, hogy a λ fág a legismertebb mérsékelt fág. Genomját egyetlen, kb. 48.500 bázispárból álló DNS alkotja. A mérsékelt fágoknak *lizogén* és *litikus* ciklusa is van (6.7. ábra). A lizogén ciklus folyamán a fág kromoszóma a baktérium kromoszómába inszertálódik. Az inszerció speciális helyeken történhet, ún. *helyspecifikus rekombinációval*. A baktérium kromoszómába inszertálódott fágot *profágnak* nevezik. A kromoszómájukban profágot hordozó baktériumok a *lizogén baktériumok*. A profág a baktérium kromoszómájával korlátlan ideig replikálódhat és fennmaradhat.

Az egyetlen jele a profág jelenlétének az, hogy a lizogén baktériumok ellenállóak egy, a profággal azonos típusú fág fertőzésével szemben. A mérsékelt fágok litikus ciklusa elkezdődhet pl. UV besugárzás hatására. A litikus ciklus kezdetén a fág kromoszóma kirekombinálódik a baktérium kromoszómájából, majd miután fágok képződtek, a baktériumsejt feloldódik, kiszabadulnak az utódfágok, hogy újabb sejteket fertőzzenek meg. A fágok lizálják a baktériumokat, és egy ún. *plakkot* (tarfoltot) képeznek a baktérium pázsiton. Egy plakk lényegében egyetlen fág klónja. Amíg a mérsékelt fágoknak lizogén és litikus ciklusa is van, a *virulens* fágoknak csak litikus ciklusuk van.

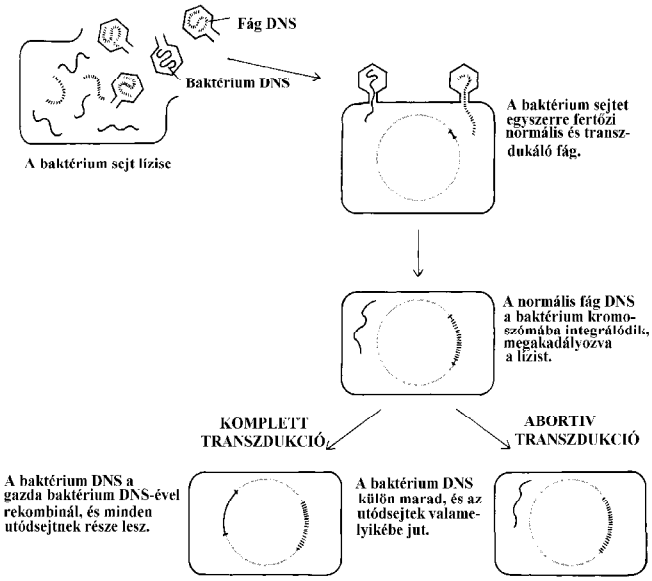


6.7. ábra. A λ mérsékelt fág lizogén és litikus ciklusai.

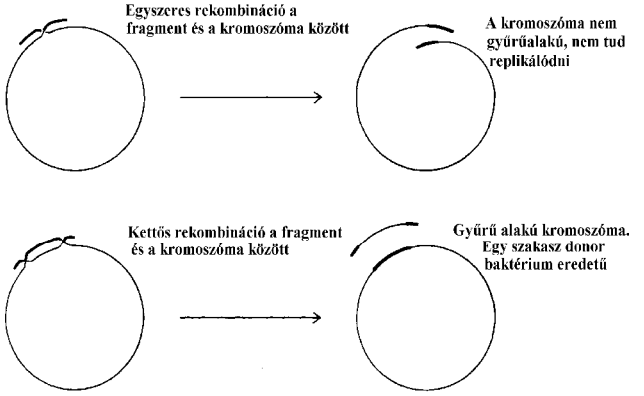
1. Általános transzdukció

Norton Zinder és Joshua Lederberg írta le először (1952-ben), hogy egy recipiens baktériumsejt genetikailag átalakítható egy donor baktérium kromoszómájának bármely szakaszával az általános transzdukció folyamán. A transzdukció baktérium DNS bevitelét jelenti egy másik baktérium sejtbe fágok közreműködésével. Az általános transzdukció pedig azt jelenti, hogy a donor baktérium genomjának bármely szakasza becsomagolódhat a fágfejbe és bejuthat a recipiens baktérium sejtbe. A fágok között kb. 10^{-5} azoknak a fágfejeknek a gyakorisága, amelyben nem fág, hanem baktérium DNS van.

Az általános transzdukció során a baktérium DNS-t tartalmazó fágburok és egy ép fág egyszerre jut be a recipiens baktériumsejtbe (6.8. ábra). A fág a lizogén ciklusba léphet, megakadályozva a további fágfertőzést. Ugyanakkor a donor baktérium DNS-e rekombinációval részévé válhat a baktérium kromoszómának. Természetesen csak a kettős rekombináció vezet transzdukcióhoz. Az egyszeres rekombináció eredményeként keletkező kromoszómának két szabad vége van, ami nem teszi lehetővé a baktériumok életét (6.9. ábra). A transzdukció gyakorisága 10^{-5}-10^{-7}. Egy alkalommal a baktérium genomnak kb. 1%-a integrálódhat. A transzdukció komplett, ha a donor baktérium DNS a recipiens baktérium kromoszómájának részévé válik (6.8. ábra). A komplett transzdukció nyomán mindkét utódsejt tartalmazza a donor baktériumból származó géneket, és minden utódsejt képes az osztódásra szelektív körülmények között. A sejtek száma az osztódások számával exponenciálisan nő (mértani haladvány szerint), és végeredményben nagy baktériumtelepek képződnek. Abortiv transzdukció esetén a donor baktériumból „érkezett" DNS szakasz bár funkcionál, nem integrálódik a recipiens baktérium kromoszómájába (6.8. ábra). A sejtosztódások után mindig csak az a sejt osztódhat tovább, amely tartalmazza a donor DNS-t. Az abortiv transzdukció esetén a telepet alkotó sejtek száma osztódásonként mindössze eggyel nő (számtani haladvány szerint), és végeredményben apró telepek képződnek.



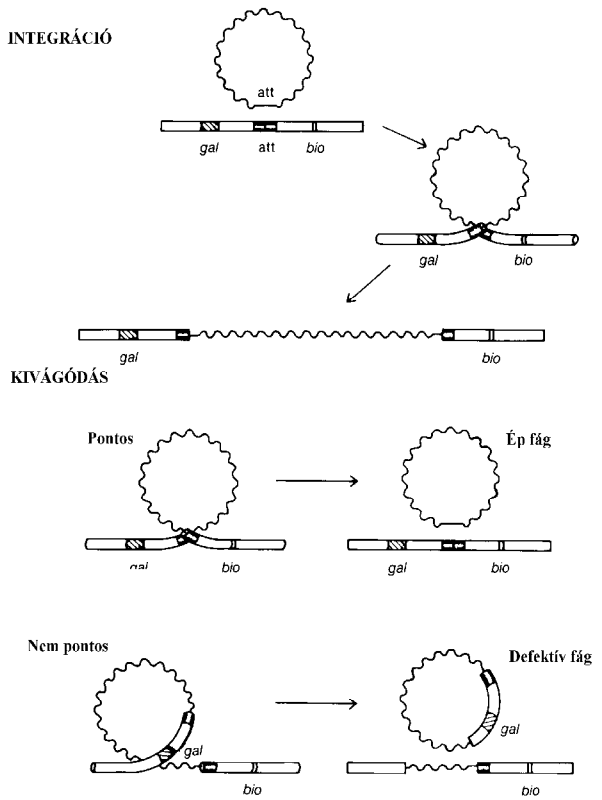
6.8. ábra. A transzdukció mechanizmusa.



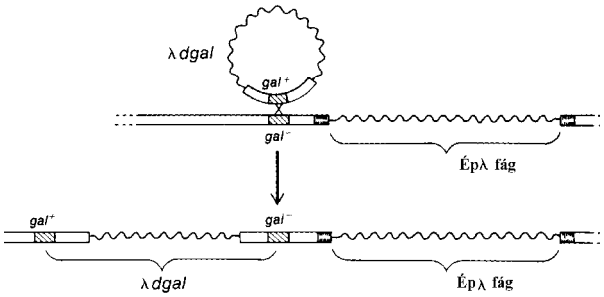
6.9. ábra. Csak a kettős rekombináció vezet komplett transzdukcióhoz.

Specifikus transzdukció

A litikus ciklus kezdetén a fág kromoszóma kivágódása az esetek nagy többségében tökéletes (ún. precíz excízió). Azonban az esetek kb. milliomod részében a fág kromoszóma kivágódása tökéletlen (nem precíz excízió; 6.10. ábra). A tökéletlen kivágódás nyomán olyan, ún. *defektív fágok* képződnek, amelyeknek DNS-ét fág és baktérium DNS egyaránt alkotja. Nyilvánvaló, hogy a defektív fágok DNS-e olyan baktérium DNS szakaszokat tartalmaz, amelyek a profággal szomszédosak (6.10. ábra). A specifikus transzdukció során a defektív fágok olyan DNS szekvenciákat visznek be baktérium sejtekbe, amelyek fág, valamint baktérium DNS-ből állnak. A defektív fág többnyire a homológ helyen inszertálódik a kromoszómába egy olyan esemény során, amit homológ rekombinációnak neveznek (6.11. ábra). Végeredményben olyan baktérium kromoszómák képződnek, amelyekben két profág van és ugyanannak a génnek két kópiája, egy ép és egy mutáns alléllal.



6.10. ábra. Az inszerció, a precíz és a nem precíz excízió mechanizmusa.



6.11. ábra. A defektív fág inszerciója homológ rekombinációval a baktérium kromoszómájába.

A molekuláris klónozás alapjai

A defektív fágok DNS-e *rekombináns*: egyaránt alkotja fág, valamint *idegen* (itt baktérium) DNS. Egyetlen defektív fágból kiindulva sok-sok ciklus után az idegen DNS-nek lényegében korlátlan számú kópiája állítható elő abban a folyamatban, amit molekuláris klónozásnak neveznek. A fág egyfajta vektor: eszköz, amellyel idegen eredetű DNS szakaszok molekulárisan klónozhatók, korlátlan méretben elszaporíthatók.

KONJUGÁCIÓ

Konjugáció: a baktérium kromoszóma átadása egy baktériumsejtből egy másikba konjugációs csövön át. A DNS átviteléről az F faktor, egy speciális plazmid "gondoskodik". A konjugáció nem történik meg minden baktérium fajban, de bizonyosan bekövetkezik pl. az *E. coli*, a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Vibrio comma* fajokban.

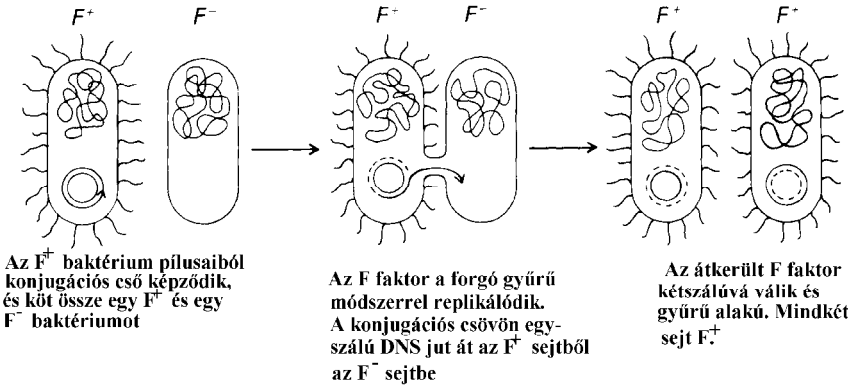
Az F faktor

Az F (fertilitás) faktor egy kb. 10^5 bázispárból álló plazmid, egy kör alakú DNS molekula. Az F faktor, mint minden plazmid, önállóan replikálódik. Az F faktort tartalmazó, és a nem tartalmazó baktériumokat rendre F^+ és F^--nak nevezik. Az F^+ sejtek pílusokat fejlesztenek. A pílusokból képződik az a konjugációs cső, amelyen át megtörténik a DNS átadása az F^+ sejtből az F^- sejtbe. (Az F^- sejteknek nincsenek pílusaik.)

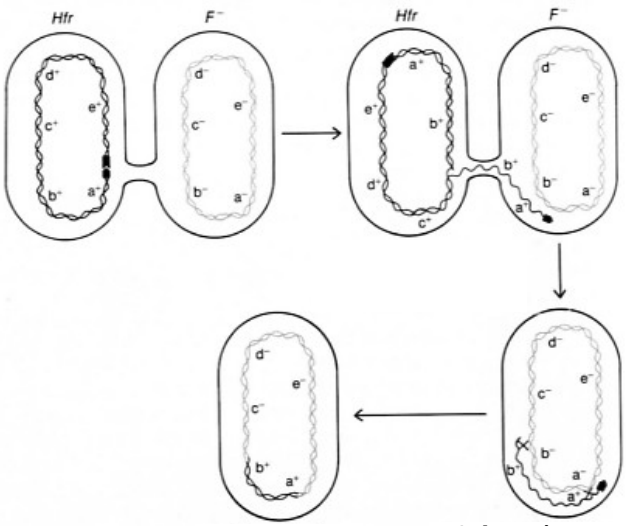
A konjugáció lépései a következők (6.12. ábra). 1. Konjugációs cső képződik egy F^+ és egy F^- sejt között. 2. Az F faktorban forgó gyűrű replikáció kezdődik. Az F^+ sejtből az egyik DNS fonal átjut az F^- sejtbe. 3. Befejeződik az F faktor replikációja az F^+ és az F^- sejtekben, miközben az F^- sejt F^+-á alakul. Az F faktor fertőző: egy baktériumtenyészetben egyetlen F^+ sejt nyomán minden F^- sejt rövid idő alatt F^+-á alakul. (6.12. ábra).

Az F faktor az ún. episzómák jellegzetes képviselője: mint autonóm módon replikálódó plazmid, és mint a kromoszómába inszertálódott DNS is létezhet (hasonlóan a profágokhoz). Bár a Hfr (*h*igh *f*requency *r*ecombination) törzsekben az F faktor a baktérium kromoszómába inszertálódott, mégis jellegzetes F faktorként viselkedik: konjugáció során az F faktor DNS-el egyetemben kromoszómális DNS-t is átjuttat a recipiens F^- baktériumokba (6.13. ábra). A konjugáció úgy kezdődik, mint a nem inszertálódott F faktor esetében, és egy egyszálú DNS jut át a recipiens sejtbe. A DNS eleje (5' vége) az F faktor, a további része a kromoszómából származik. A DNS - úgy, mint a transzformáció esetében - párosodik a kromoszóma komplementer szálával, lehetőséget teremtve új genetikai kombinációk kialakítására (6.13. ábra).

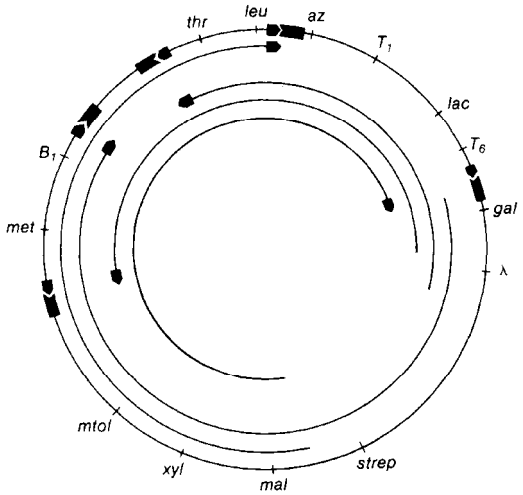
Mivel az F faktor a baktérium kromoszómába több helyen és mindkét irányban inszertálódhat, nem meglepő, hogy a DNS átvitele a különböző *Hfr* törzsekben különböző helyről kezdődhet és az óramutató járásával egyező, vagy ellenkező irányban haladhat (6.14. ábra).



6.12. ábra. Az F faktor átadása F^+ és F^- sejtek között a konjugáció folyamán.



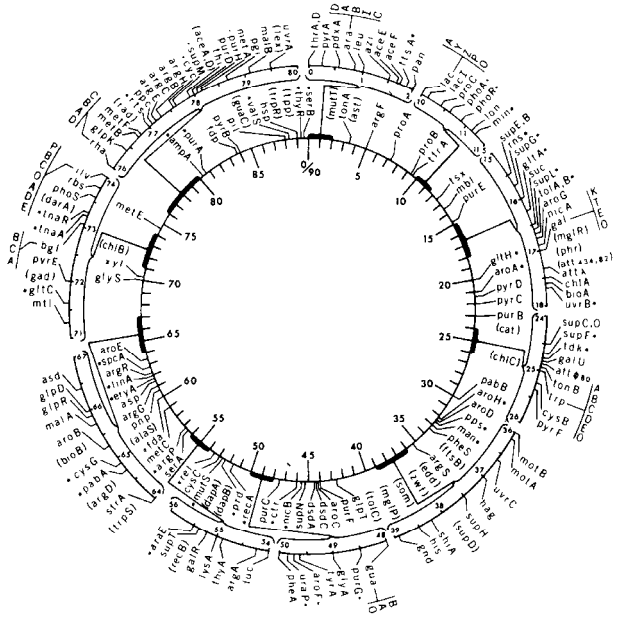
6.13. ábra. A baktérium DNS átadása Hfr törzsből F^- sejtbe.



6.14. ábra. A DNS átadása a különböző Hfr törzsekben a kromoszóma különböző pontján kezdődik, és az óramutató járásával egyező vagy ellenkező irányban haladhat.

Gének térképezése konjugációval

Konjugáció során *E. coli*-ban a genom átjuttatása bármely Hfr törzsből egy F^- sejtbe 37°C-on 100 percet vesz igénybe. A félbeszakított konjugációk során, amikor a konjugációt meghatározott idő elteltével erős keveréssel megszakítják, a genomnak csak bizonyos része jut át az F^- sejtbe. Szelekciós módszerekkel meghatározható, hogy milyen gének (i) milyen sorrendben, és (ii) mennyi idő elteltével jutnak át a recipiens sejtekbe. A gének sorrendje és egymáshoz viszonyított távolsága a géntérkép, a térkép egysége pedig a perc (6.15. ábra).



6.15. ábra. Az *E. coli* géntérképe. A térkép egysége a perc.

Az F-dukció (szex-dukció)

Az F faktor, hasonlóan a λ profághoz, kiválhat a baktérium kromoszómából és önállóan replikálódó plazmidként létezhet a baktérium sejtekben. Az F faktor excíziója többnyire pontos, precíz. Néha azonban az F faktor excíziója pontatlan, amely setben magával viszi a szomszédos baktérium kromoszóma egy részét (miután

F’ a jele). Az F’ faktor a következő transzdukciók folyamán, amit F-dukciónak vagy szex-dukciónak is neveznek, a baktérium DNS egy darabkáját is viszi magával, lehetőséget teremtve új genetikai kombinációk kialakulására.

Az F’ faktor egy olyan rekombináns DNS molekula, amelyet egyszerre alkot plazmid és idegen (itt baktérium) DNS. A plazmidok a vektorok egy másik típusát reprezentálják. Tetszőleges mennyiségben izolálhatók, beléjük idegen DNS szakasz illeszthető, majd a baktériumok egyikébe-másikába transzformálva tetszőleges mértékben elszaporítható, a plazmidba illesztett idegen DNS szakasz molekulárisan klónozható. A plazmidok, a fágokkal egyetemben, a molekuláris biológia fontos eszközei.

ÖSSZEFOGLALÁS

A transzformáció, a transzdukció és a konjugáció biztosítja az örökítő anyag változatosságát baktériumokban. Bár a három mechanizmus különböző, a végeredmény hasonló: a genetikai változatosság. A csillagászati sokféleség a biztosítéka a baktériumok közismert alkalmazkodóképességének a változó környezeti feltételekhez. A baktérium genetika ismerete alapján nyílt lehetőség a fágok és a plazmidok vektorként történő felhasználására DNS szakaszok klónozására. A klónozás teremtette meg a lehetőséget az ún. rekombináns DNS technika megalapítására, a biológiai jelenségek molekuláris szintű megismerésére, és azok gyakorlati felhasználására.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis, 181-220, 2008.
2. Purves, W.K. és mtsi., Life the Science of Biology, 281-305, 2007.
3. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 285-305, 1989.

7. MENDELI GENETIKA. KAPCSOLTSÁG ÉS GÉNTÉRKÉPEK.

Mendel szabályai. Az öröklődés típusai. Független kombinálódás. Kapcsoltság, crossing over és géntérképek.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

A tulajdonságok öröklődése régóta foglalkoztatja az emberiséget. Az öröklődés törvényszerűségeit először egy Ágoston rendi szerzetes, Gregor Johann Mendel ismerte meg és tette közkincsé 1865-ben. Thomas Hunt Morgan és munkatársai (1913) mutatták meg, hogy a tulajdonságok ún. kapcsoltsági csoportokban öröklődnek, és hogy egy kapcsoltsági csoport egy kromoszómának felel meg. A gének, mint gyöngyök egy füzéren sorakoznak a kromoszómákban. Sorrendjük és távolságuk alapján szokás szerkeszteni a genetikai térképeket. A jelen fejezet az öröklődés törvényszerűségeivel foglalkozik és leírja a géntérképek szerkesztésének elvi alapjait.

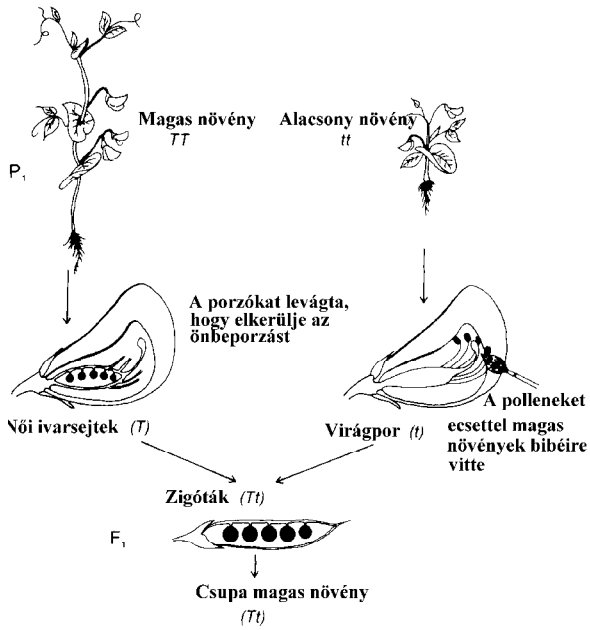
Néhány fontosabb genetikai fogalom

Gén: az öröklődés, és a genetikai funkció egysége, a DNS jól definiálható szakasza.
Allél: a gén olyan változata, amely a gén többi változatától megkülönböztethető.
Lokusz: a gén helye a kromoszómában.
Genotípus: egy élőlény genetikai tartalma, egy vagy több gént, tulajdonságot illetően.
Fenotípus: mindazon látható jellegzetességek összessége, amelyek a genetikai tartalom és a környezeti tényezők együttes hatására fejlődnek ki.
Heterozigóta: olyan élőlény, amely egy gén különböző alléljait hordozza.
Homozigóta: olyan élőlény, amely egy gén ugyanazon alléljait hordozza.
Hemizigóta: a diploid élőlényekben egyetlen kópiában jelenlevő génekre vonatkozó állapot. (Mint pl. az X kromoszómákhoz kapcsolt tulajdonságok az XY egyedekben.)
Recesszív: olyan allél, amely fenotípusa csak homo-, vagy hemizigóta állapotban nyilvánul meg.
Domináns: valamely allél azon képessége, hogy heterozigóta állapotban is meghatározza a fenotípust.
Expresszivitás: egy tulajdonság kifejeződésének mértéke a fenotípusban, az egyedek szintjén.
Penetrancia: a fenotípust mutató hordozók aránya a populáció szintjén.

A Mendel szabályok

1. Az uniformitás szabálya

Mendel kísérleteiben a borsónak olyan ún. tiszta genetikai vonalait használta, amelyekben minden szülő homozigóta egy (vagy több) tulajdonságra. Első kísérleteinek egyikében Mendel magas növényeket keresztezett alacsonyakkal (7.1. ábra). Tapasztalatai szerint az első, ún. F1 generáció minden tagja egyformán (uniformisan) magas volt. Mendel első, az uniformitás szabálya értelmében az F1 generáció tagjai egyformák. (Természetesen, ha homozigóta szülőket kereszteznek egymással.) Az alacsonyság tulajdonsága látszólag eltűnt. A magas tulajdonság domináns, az alacsony pedig recesszív.



7.1. ábra. A Mendel kísérletek kivitelezésének sémája.

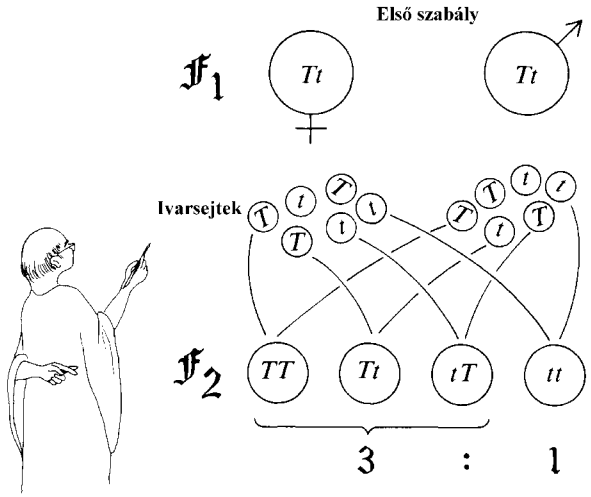
2. A hasadás szabálya

Mendel az F1 generáció tagjait egymás között keresztezte, és elkészítette a második, ún. F2 generációt. Megfigyelte, hogy az F2 generációban 3:1 arányban származtak magas és alacsony növények. Mendel második, a hasadás szabálya értelmében a szülői tulajdonságok a második generációban 3:1 arányban hasadnak. Mendel hét tulajdonságpár öröklődését tanulmányozta. (7.1. táblázat).

7.1. táblázat. Mendel F2 eredményei egy-egy allélpárra.

Tulajdonság	Domináns		Recesszív		Összesen
	darab	%	darab	%	
A mag alakja	5474	74,7	1850	25,3	7324
A sziklevél alakja	6022	75,1	2001	24,9	8023
A mag színe	705	75,9	224	24,1	929
A hüvely alakja	882	74,7	299	25,3	1181
A hüvely színe	428	73,8	152	26,2	580
A virágok helyzete	651	75,9	207	24,1	858

Mendel a 3:1-es hasadási arány alapján arra következtetett, hogy a növények magasságát két faktor határozza meg. (A faktorokat ma géneknek nevezzük.) Felismerte, hogy (i) az ivarsejtek a faktoroknak csak az egyikét hordozzák (vagy a *T* = magas, vagy a *t* = alacsony faktort), és hogy (ii) a női és a hím ivarsejtek véletlenszerűen kombinálódnak (7.2. ábra). Az ivarsejtek véletlenszerű kombinálódása eredményezi a domináns allélra homozigóta (*T*/*T*), a heterozigóta (*T*/*t* és *t*/*T*), valamint a recesszív allélra homozigóták (*t*/*t*) képződését. Az első három típus hordozza a *T* domináns allélt és magasak, a negyedik *t*/*t* homozigóta és alacsony. A genotípusok szegregációjának, hasadásának aránya 1 *T*/*T* : 2 *T*/*t* és 1 *t*/*t*.



7.2. ábra. Az ivarsejtek a két faktornak csak az egyikét hordozzák, és a megtermékenyülés folyamán véletlenszerűen kombinálódnak.

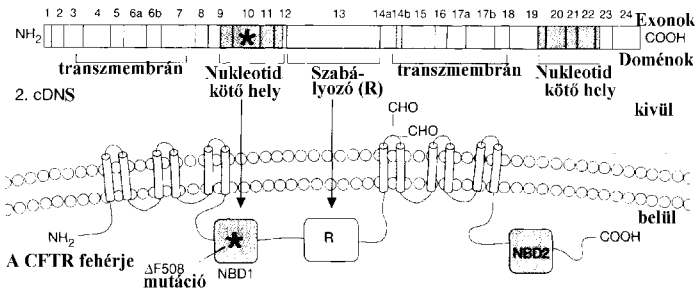
A lehetséges geno- és fenotípusok számbavételére R. Punnett egy olyan eljárást dolgozott ki, amelyben egy táblázat fejlécében és első oszlopában a szülők ivarsejtjeinek lehetséges genotípusai vannak feltüntetve. A Punnett táblázat további helyeiben az utódok lehetséges genotípusai vannak feltüntetve.

Az ivarsejtek genotípusa. Egyik szülő	Az ivarsejtek genotípusa. Másik szülő	
	T	*t*
T	*TT*	*Tt*
t	*tT*	*tt*

Példák a domináns-recesszív öröklődésre emberben. Autoszómákhoz kapcsoltan öröklődő tulajdonságok, betegségek

Az embereknek számos olyan tulajdonságuk van, amelyek domináns-recesszív módon öröklődnek. Pl. a barna szem domináns a kékkel, a gyapjas haj a simával szemben. (Csirkékben a kopasz nyak domináns a tollassal szemben.) Számos örökletes betegség öröklődés mintázata domináns-recesszív mintát követ, amint azt a *T* és a *t* allélpár esetében láttuk. Pl. a rövidujjúságot (brachydactylia) és a sokujjúságot (polydactylia) az autoszómákhoz kapcsolt *Bd* és *Pd* domináns mutációk okozzák. Talán meglepő, de a sokujjúság nem alakul ki minden *Pd*/+, a mutációt hordozó emberben: a *Pd* mutáció *penetranciája* nem 100%-os. A sokujjúság mértéke, *Pd* mutáció *expresszivitása* is változó: *Pd*/+ emberek között vannak olyanok, akiknek mind a négy végtagján hat ujj képződik, másoknak csak az egyiken, esetleg egyiken sem.

Bőségesen ismertek olyan öröklődő betegségek, amelyekben a mutációra homozigóta emberek (a *t*/*t*-hez hasonlók) betegek. A sok közül csak néhányat említünk érintőlegesen. A *cisztás fibrózis* (*cf*) Európában a leggyakoribb öröklődő betegség: 2000 újszülött között egy *cf*/*cf*. (A heterozigóták aránya 1/22!) A *cf*/*cf* gyermekek tüdejében sűrű váladék képződik és pang. Tüdő, hasnyálmirigy és emésztőrendszeri tünetek is kifejlődnek. A halál 20-30 éves korban következik be. A CF ép gén (és természetesen mutáns alléljai is) a 2. kromoszóma része. A CF gén egy 1480 aminosavból álló fehérjét kódol, amely a sejtmembránhoz kapcsolódva a klorid ioncsatornák működést szabályozza (7.3. ábra). A mutáns fehérjék hibás vagy hiányzó klorid csatorna funkciót, betegséget és halált eredményeznek. A *Tay-Sachs* betegséget a hexózaminidáz-A enzim hiánya okozza. Az enzim hiányában az idegrendszer fokozatos degenerációja következik be, majd halál ötéves kor előtt. A betegség gyakorisága 1/3600 az askenázi zsidók között. A *fenilketonúria* a hibás fenilalanin metabolizmus következménye. A homozigóták szellemi fogyatékosak, és általában 30 éves koruk előtt meghalnak. A *sarlósejtes vérszegénység* a β-hemoglobin egyetlen aminosavának cseréje miatt következik be. Az *albinizmus* olyan mutációk következménye, amelyek a színanyagok szintézisét szüntetik meg.



7.3. ábra. A CF gén, és a CFTR fehérje szerkezete.

Az inkomplett domináns (intermedier vagy szemidomináns), és a kodomináns öröklődésmenet

A *T* allél a homológ kromoszómák egyikének, a *t* másikának a része. Az allélok öröklődése egy olyan általános sémát követ, amely alapja a homológ kromoszómák szegregációja a meiózis két osztódása folyamán. Az *inkomplett domináns* (más néven intermedier vagy szemidomináns) öröklődés esetében a heterozigóták fenotípusa sem a domináns homozigótákra, sem a recesszív homozigótákra nem jellemző. A domináns allél által meghatározott tulajdonság kifejeződése nem teljes, inkomplett, szemidomináns vagy intermedier.

A *kodomináns* öröklődés esetében a két allél a fenotípushoz azonos mértékben járul hozzá. A legismertebb példa az A és a B vércsoportok öröklődése. (Az AA emberek vércsoportja éppúgy A típusú, mint az A0 vagy az AB embereké.)

Nemhez kapcsolt öröklődés

Mendel kísérleteiben, vagy pl. a barna és a kék szemszín öröklődése során az utódok tulajdonságai nem függenek sem a szülők, sem pedig az utódok nemétől. Azokban a

kísérletekben viszont, amelyekben Thomas Hunt Morgan és munkatársai vörös szemű muslica (*Drosophila melanogaster*) nőstényeket fehérszemű hímekkel kereszteztek, minden utód szeme uniformisan vörös volt (7.2. táblázat). Meglepetésükre, a *reciprok keresztezés* során, amikor is fehérszemű nőstényeket kereszteztek vörös szemű hímekkel, minden hím utód szeme fehér volt és minden nőtény szeme vörös (7.2. táblázat). A Morgan csoport arra következtetett, hogy a hím utódok a fehér mutációt tartalmazó allélt kapták a nőstényektől, és nem hordozták a homológ kromoszómát, amelynek része ép gén. Azt a kromoszómát, amelynek része a szemszínt kódoló gén, nemi, ivari vagy X kromoszómának nevezték el. Az X kromoszómából a nőstények sejtenként kettőt, a hímek csak egyet hordoznak. A nőstények tehát olyan X kromoszómákat hordoztak, amelyek egyike a „fehér" (mutáns), másika a „vörös" (vadtípusú) allélt tartalmazta. Lévén a vörös domináns a fehérrel szemben, a nőstények szeme vörös volt. Természetesen a fehér/vörös heterozigóta nőstényektől fele-fele arányban származtak vörös, valamint fehérszemű hímek. A muslica X kromoszómáján kb. 2200 gén van. A vadtípusú, vörös szemszínt kódoló gén egy a 2200 közül. A hímekre jellemző nemi kromoszómát Y-nak nevezzük. (Madarakban és a szenderféle lepkékben a hímek nemi kromoszóma összetétele ZZ, a nőstényeké ZW.)

7.2. táblázat. A reciprok keresztezések eredménye vörös és fehérszemű muslicákkal.

A nőstény ivarsejtje	A hím ivarsejtjei	
	X	Y
X	**X***X* vörös	**X**Y vörös

reciprok keresztezés

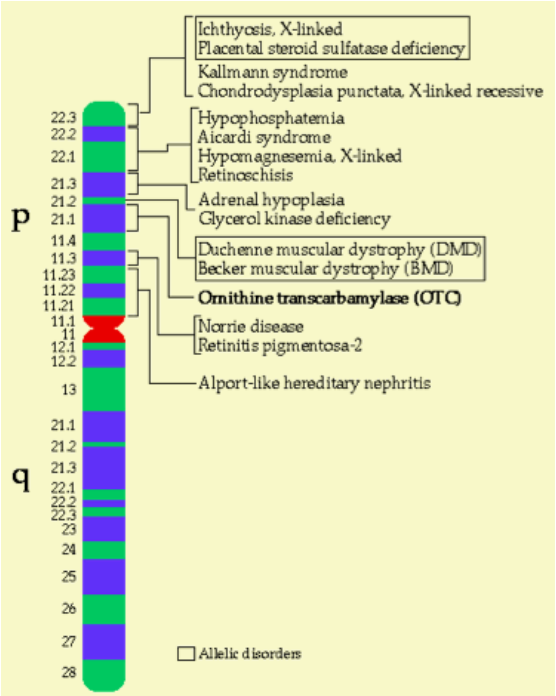
A nőstény ivarsejtje	A hím ivarsejtjei	
	X	Y
X	**X***X* vörös	*X*Y fehér

X = X kromoszóma, amely a vadtípusú, vörös szemszínt kódoló allélt hordozza.

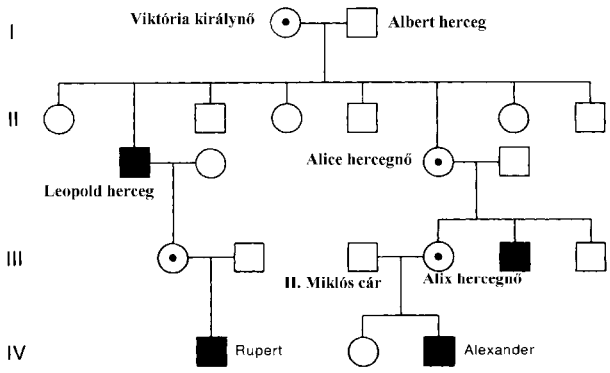
X = X kromoszóma, amely a mutáns, fehér szemszínt kódoló allélt hordozza.

Az ember X kromoszómája, a muslicához hasonlóan, sok gént tartalmaz. Férfiakban az X kromoszómához kapcsolt gének hemizigóta állapotban vannak, vagyis sejtenként csak egy kópiában, mert az Y kromoszóma csak nagyon kevés olyan gént tartalmaz, amely az X kromoszómának is része (7.4. ábra). Az X kromoszómához kapcsolt mutációk általában a férfiakat befolyásolják és jellegzetes öröklődésmintázatot mutatnak: a mutáns tulajdonság (olykor betegség) minden második generációban a férfiakban nyilvánul meg, és a tulajdonságokat a heterozigóta *hordozó* anyák örökítik fiaikra (7.5. ábra).

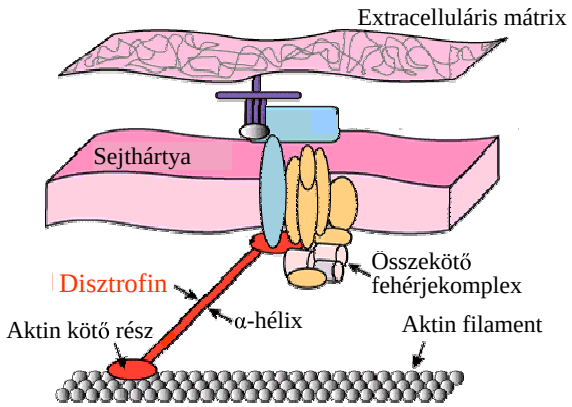
Emberben csak kevés X-hez kötött domináns mutációt ismerünk. Az X-hez kötött recesszív mutációk által okozott tulajdonságok sokkal ismertebbek. Itt csak néhányat említünk. A *Lesch-Nyhan* szindróma a hipoxanthin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) enzim hiánya miatt alakul ki. A HPRT a purin és az ATP bioszintézis fontos eleme. A HPRT enzim hiánya abnormális szellemi tevékenységhez, paralízishez vezet. A vérzékenységet is egy X-hez kapcsolt mutáció okozza. A mutáció eredményeként véralvadási zavarok fejlődnek ki a fiúkban (7.4. ábra). Az *izomsorvadást* a disztrofin gén mutációi okozzák. A disztrofin gén a legnagyobb ismert emberi gén: 2,4 millió bázispárból áll. Az ép gén terméke, a disztrofin fehérje, a sejtváz és a sejtközötti állomány között teremt kapcsolatot egy transzmembrán komplexen keresztül (7.6. ábra). A disztrofin gén mutációi az izmok fokozatos sorvadását eredményezik a harmadik életévtől kezdődően. A *színvakságot* vagy *Daltonizmust* és az *ichthyosist* (pikkelybőrűség) is X kromoszómához kapcsoltan öröklődő mutációk okozzák.



7.4. ábra. Az ember X kromoszóma egy részének genetika térképe.



7.5. ábra. A vérzékenység nemhez kötött öröklődése családfa bemutatásával.



7.6. ábra. A disztrofin fehérje a sejtváz és az extracelluláris állomány között létesít kapcsolatot.

Vannak, akik állítják, hogy a fülkagyló külső peremének szőrösödését az Y kromoszómához kapcsolt mutáns allél okozza. A *nemre szorítkozó* (angolul sex-limited) öröklődés kifejezés olyan génekre vonatkozik, amelyek csak az egyik nemben fejeződnek ki. Az elsődleges, és a másodlagos nemi tulajdonságok változatai nyilvánvaló példák. (Meglehetősen nehéz volna az emlő vagy a tőgyalak genetikáját a hímeken tanulmányozni, bár az emlő és a tőgy alakjára vonatkozó géneket a hímek is örökítik utódaikra.) A mindkét nemben, ám a különböző nemekben különböző mértékben/módon kifejeződő tulajdonságok *nem által befolyásolt* öröklődést (angolul sex-influenced) mutatnak. (A kopaszság bizonyos típusai öröklődnek a nem által befolyásolt módon.)

Keresztezések két génnel

3. A független kombinálódás szabálya

Mendel olyan kísérleteket is folytatott, amelyekben két allélpár öröklődését követte, pl. az *Y*/*y* és az *R*/*r* allélpárokét. (*Y* = sárga, *y* = zöld színű borsó magvak, *R* = gömbölyű és *r* = szögletes magvak. *Y* és *R* a domináns, *y* és *r* a recesszív allélok.) Mendel *YY*; *RR* borsókat keresztezett *yy*; *rr* borsókkal. Az F1 generációban a magvak uniformisan sárgák és gömbölyűek voltak, genotípusuk pedig *Y*/*y*; *R*/*r*. Mendel egymás között keresztezte az F1 *Y*/*y*; *R*/*r* borsókat és elkészítette az F2 generációt (7.3. táblázat).

7.3. táblázat. Az *Y*/*y*; *R*/*r* x *Y*/*y*; *R*/*r* keresztezésből származó F2 utódok geno- és fenotípusa.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa			
	Y; *R*	*Y*; *r*	*y*; *R*	*y*; *r*
Y; *R*	*YY*; *RR* ○	*YY*; *Rr* ○	*Yy*; *RR* ○	*Yy*; *Rr* ○
Y; *r*	*YY*; *Rr* ○	*YY*; *rr* □	*Yy*; *Rr* ○	*Yy*; *rr* □
y; *R*	*Yy*; *RR* ○	*Yy*; *Rr* ○	*yy*; *RR* ●	*yy*; *Rr* ●
y; *r*	*Yy*; *Rr* ○	*Yy*; *rr* □	*yy*; *Rr* ●	*yy*; *rr* ■

A fenotípusok: ○ = sárga és gömbölyű; □ = sárga és szögletes; ● = zöld és gömbölyű; ■ = zöld és szögletes.

Az F2 generációban az arányok a következők voltak: sárga és gömbölyű : zöld és gömbölyű : sárga és szögletes : zöld és szögletes = 9 : 3 : 3 : 1. A 9 : 3 : 3 : 1 hasadási arány alapján Mendel arra következtetett, hogy a sárga/zöld és a gömbölyű/szögletes faktorok (ma gének) függetlenül kombinálódva öröklődnek. [Vegyük észre, hogy a 9:3:3:1 hasadási arány a (sárga : zöld = 3:1) x (gömbölyű : szögletes = 3:1) két mendeli tulajdonság szegregációs arányának szorzata.] A fentiek alapján Mendel harmadik szabálya azt mondja ki, hogy a különféle tulajdonságokat kódoló faktorok függetlenül kombinálódva öröklődnek. A független kombinálódás természetes, ha a két allél pár különböző autoszómákhoz kapcsoltan öröklődik.

A 7.3. táblázat komplikáltnak tűnhet. Az ún. kétfaktoros keresztezések áttekinthetőbbé tételéért a genetikusok ún. tesztelő keresztezéseket (angolul test cross) alkalmaznak. A tesztelő keresztezésekben a partnerek egyike homozigóta a recesszív allélokra, amint azt a 7.4. táblázat mutatja. A tesztelő keresztezés eredménye egyszerű, mert (i) csak négyféle utód képződik, és mert (ii) az egyes geno-, illetve fenotípusok aránya 1:1:1:1. A rekombinánsok aránya az utódok között 50%.

7.4. táblázat. Az *Y*/*y*; *R*/*r* x *y*/*y*; *r*/*r* tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az *Y*/*y* és az *R*/*r* allélok különböző kromoszómák részei.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa *y*; *r*	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya
Y; *R*	*Yy*; *Rr* ○	szülői	1
Y; *r*	*Yy*; *rr* □	rekombináns	1
y; *R*	*yy*; *Rr* ●	rekombináns	1
y; *r*	*yy*; *rr* ■	szülői	1

A fenotípusok: ○ = sárga és gömbölyű; □ = sárga és szögletes; ● = zöld és gömbölyű; ■ = zöld és szögletes.

Kapcsoltság, kapcsoltsági csoportok

Elsőként Thomas H. Morgan csoportja figyelt fel arra, hogy miközben kettős heterozigótákkal tesztelő keresztezéseket végeztek, az utódgenerációkban a fenotípusok aránya nem volt mindig 1:1:1:1. (Lásd a 7.4. táblázatot). Az 1:1:1:1-től eltérő hasadási arány azt mutatja, hogy a két gén (illetve alléljaik) nem függetlenül kombinálódva, hanem *kapcsoltan* öröklődnek. Kapcsoltan, mert nem különböző kromoszómák részei, hanem ugyanahhoz a kromoszómához kapcsoltan öröklődnek, és egymás közelében vannak. Érthető, hogy a szülői kategóriák (az *A B* és *a b*; 7.5. táblázat) gyakoribbak, mint a rekombinánsok (*A b* és *a B*). Ugyanakkor a két szülői, valamint a két rekombináns osztály aránya 1:1 (*A B* : *a b* = 1:1, és *A b* : *a B* = 1:1). A két rekombináns osztály azonos gyakorisága azt jelzi, hogy a rekombinánsok egyetlen esemény két, egymást kiegészítő termékei. Az esemény a crossing over.

7.5. táblázat. Az *A*/*a*; *B*/*b* x *a*/*a*; *b*/*b* tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az *A*/*a* és az *B*/*b* allélok ugyanannak a kromoszómák a részei, kapcsoltan öröklődnek.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa *a b*	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya[1]
A B	A B/*a b* ❁	szülői	45
A b	*A b*/*a b* ☼	rekombináns	5
a B	*a B*/*a b* ✹	rekombináns	5
a b	*a b*/*a b* ❀	szülői	45

A fenotípusok: ❁ = sötét, karéjos sziromlevelek; ☼ = fehér, csipkés sziromlevelek; ✹ = fekete, csipkés sziromlevelek; ❀ = fehér, karéjos sziromlevelek.
[1] = egy példa.

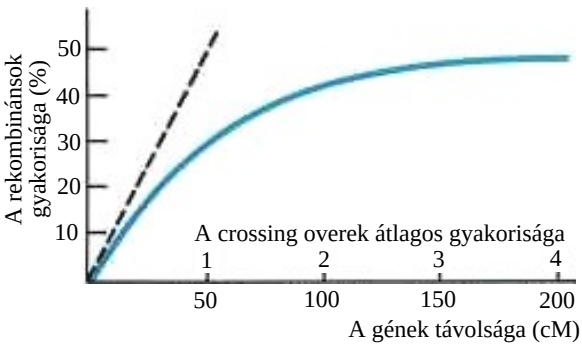
A kapcsoltan öröklődő gének közötti távolságot a rekombinánsok gyakoriságával (%-ban) szokás mérni a következő összefüggés alapján:

$$\frac{\text{a rekombináns utód}}{\text{összes utód}} \times 100.$$

és Thomas H. Morgan tiszteletére *centiMorgan* (cM) egységben mérik. Az a két gén van 1 cM-ra egymástól, amelyek között 1%-os gyakorisággal képződnek rekombinánsok. A fenti példában az *A* és a *B* gének közötti távolság = (5+5/45+5+45) x 100 = 10 cM.

A legnagyobb mérhető távolság 50 cM. Ha ugyanis két gén $\geq$50 cM-ra van egymástól, a rekombinánsok gyakorisága 50%. Éppen annyi, mit a szülői (vagy a rekombináns) kategóriáké a különböző kromoszómákon levő allélpárok esetében, vagyis a négy kategória aránya 1:1:1:1, mintha a két gén különböző kromoszómához kapcsoltan öröklődne (7.4. táblázat). Mendel 3. szabálya tehát módosul: a különböző kromoszómákon, valamint az ugyanazon a kromoszómán, egymástól $\geq$50 cM-ra levő gének függetlenül kombinálódva öröklődnek.

Mivel a rekombináns kromoszómák (utódok) arányát valamely két pont között bekövetkező második crossing over csökkenti, torzul a gének közötti mért és valós távolság. A gének között mért és valódi távolságok viszonyát JBS Haldane (1919) térképfüggvénye írja le: $r = 1 \ (1 - e^{-2m})$, ahol r a rekombináns kromoszómák aránya, *m* pedig két pont távolsága (cM).



7.6. ábra. Haldane térképfüggvénye a rekombinánsok gyakorisága és a gének távolsága közötti összefüggést írja le.

A fentiek miatt a térképtávolságokat rövid, rendszerint kisebb, mint 10 cM egységekben mérik, majd a kis távolságokat összeadják. A nagy kromoszómák térképei jóval több, mint 100 cM hosszúak, a kisebbeké akár csak néhány cM-nyiak is lehetnek.

A genetikai térképek

A rekombinánsok típusa, és gyakorisága alapján A. H. Sturtevant olyan módszert dolgozott ki, amellyel genetikai térképek szerkeszthetők, vagyis meghatározható a kapcsoltan öröklődő gének (i) sorrendje, valamint (ii) a köztük levő távolságok is. A genetikai térképek gysége a cM.

Morgan és Sturtevant azt is megmutatta, hogy a gének, mint gyöngyök a füzéren, lineárisan követik egymást és ún. *kapcsoltsági csoportokat* alkotnak. A kapcsoltsági csoportok száma azonos a haploid kromoszóma számmal. A 20. század elején vált nyilvánvalóvá, hogy a kromoszómák az öröklődő tulajdonságok anyagi hordozói. Morgan és sokan mások bizonyították, hogy az öröklődés törvényszerűségei általános érvényűek az élővilágban.

Részletes genetikai térképek nemcsak a muslica, hanem más fajok esetében is készültek. Jól ismert az élesztő, a kukorica, az egér, az ember és néhány más faj géntérképe. A genetikai térképek a fizikaiakkal és a molekulárisakkal egyetemben teszik lehetővé az öröklődő tulajdonságok molekuláris szintű vizsgálatát, a gének molekuláris klónozását, módosítását és akár a génterápiát is.

A családfák

A tulajdonságok generációkon át történő öröklődését a családfákkal szokás szemléltetni (7.5. ábra). A családfák egy, esetleg néhány tulajdonság öröklődését szemléltetik. A családfák tanulmányozása alapján megállapítható, hogy milyen öröklődés menetet követ az illető tulajdonság (vagy öröklődő betegség), amely ismeret segít a lehetséges utódok típusainak és gyakoriságaik megállapításában.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az öröklődés törvényszerűségei általános érvényűek az eukariotákban, és összhangban vannak a kromoszómák "viselkedésével" a meiózis folyamán. A marker mutációk (látható fenotípust eredményező allélok) tették lehetővé a géntérképezést, a kapcsoltsági csoportok felállítását, az eligazodást a gének között. A géntérképek a molekuláris genetika alapjai.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 9. kiadás, 237-259, 2011.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis, 31-180, 2008.
3. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 147-177, 201-252, 1989.
4. Rédei, P.G., Genetika, 87-110, 1982.

8. NEM-MENDELI GENETIKA: ANYAI HATÁS ÉS ANYAI ÖRÖKLŐDÉS.

Anyai hatás: a pete(sejt) citoplazma alkotók hatása az öröklődésre. Anyai öröklődés: a kloroplasztok, a mitokondriumok, és az endoszimbionta baktériumok genetikája.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

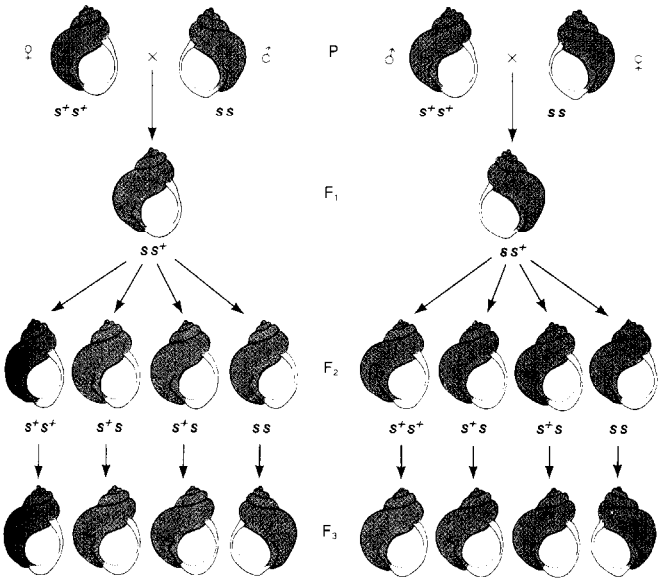
A nemi kromoszómák létére, a nemhez kapcsolt öröklődésre a reciprok keresztezések eltérő eredménye hívta fel a figyelmet. A reciprok keresztezések eredménye különböző az anyai hatás, valamint az anyai öröklődés esetében is. Az anyai hatás azt jelenti, hogy valamely tulajdonság öröklődését a petesejtek citoplazmájának tényezői (vagy azok hiánya) határozzák meg, elsősorban mRNS és fehérje féleségek. A hiányosan feltöltött petesejt citoplazma rendellenes fejlődést, és/vagy nőstény sterilitást eredményez. Az anyai öröklődés esetében a tulajdonságokat a mitokondriumok, a plasztiszok, vagy az endoszimbionta baktériumok DNS-e határozza meg. Számos öröklődő betegség ismert, amelyek alapja a mitokondriális DNS mutációja. A két öröklődő típust szokás a nem-mendeli genetikának nevezni. A következő fejezet anyai hatás, valamint az anyai öröklődés jellegzetességeit mutatja be.

ANYAI HATÁS

Alfred H. Sturtevant (1923) a csigaház tekeredési irányát tanulmányozta egy vízi csigafajon (*Lymnaea peregra*). Megfigyelte, hogy a reciprok keresztezések eredménye különböző volt: amikor s^+/s^+, jobbra tekeredő házú nőstényeket *s*/*s*, balra tekeredő házú hímekkel keresztezett, mindegyik F1 csiga háza jobbra tekeredett (8.1. ábra). Sturtevant arra következtetett, hogy a jobbra tekeredés (s^+) domináns, a balra tekeredés (*s*) recesszív. A reciprok keresztezésekből származó minden F1 csiga háza balra tekeredett, mintha *s* lenne a domináns allél (8.1. ábra). Az F2 generációban minden csigaház jobbra tekeredett, mindkét keresztezésben. Az F3 generációban (amely önmegtermékenyítés eredmé-nye) azonban a jobbra és a balra tekeredés jellegzetes, 3:1 arányban hasadt, amint azt Mendel 2. szabálya alapján várható. A 3:1 hasadási arány azt jelzi, hogy a csigaház tekeredésének irányát olyan gén alléljai határozzák meg, amelyek a sejtmagban vannak, és a kromoszómák részei. A kérdés az, hogy miért késik egy generációt a recesszív tulajdonság felbukkanása.

A csigaház tekeredési irányának öröklődése alapján Sturtevant arra következtetett, hogy a csigák petéi olyan anyagot tartalmaznak, amely meghatározza a csigaház tekeredésének irányát, és amely anyag szintézisét az anya genetikai állománya szabályozza, függetlenül a zigóta genotípusától. A jelenség neve: *anyai hatás*. Az anyai hatás az állatvilágra általánosan jellemző jelenség.

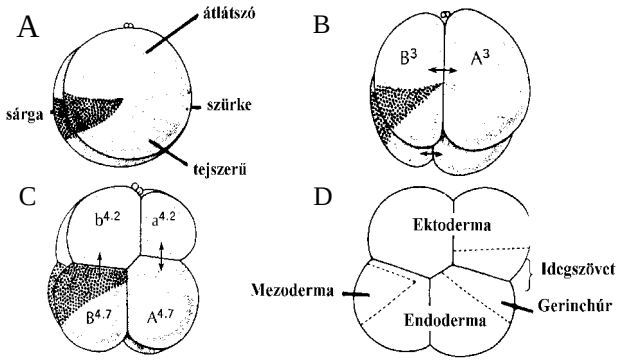
A Mendel szabályok természetesen érvényesek az anyai hatás esetében, bár a fenotípusok hasadása egy generációval megkésik. Ma már tudjuk, hogy az s^+/s^+ és az s^+/s nőstények petéinek citoplazmája olyan fehérje féleséget tartalmaz, amelytől a csigaház jobbra tekeredik. A fehérje hiányzik az *s*/*s* nőstények petéiből, ami miatt a csigaház balra tekeredik. Az apai eredetű allélnak nincs szerepe a zigóta csigaház tekeredési irányára.



8.1. ábra. A csigaház tekeredési irányának öröklődése az anyai hatás jellegzetes példája.

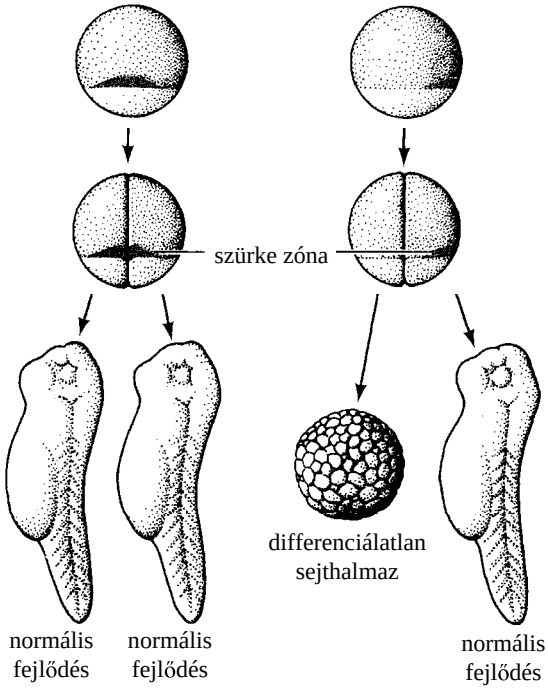
A petesejtek citoplazmatikus tényezői

Egy zsákállat faj, *Cynthia partita* petéiben négy különböző színű rész különíthető el (8.2. ábra). Az embrionális sejtosztódások során a különböző citoplazma részek más-más sejtek részeivé válnak. Az átlátszó citoplazmát tartalmazó sejtekből lesz az ektoderma, a világosszürkét tartalmazókból fejlődik az idegrendszer és a gerinchúr. A sötétszürke citoplazmát tartalmazó sejtekből fejlődik az endoderma, a sárga citoplazmát tartalmazókból pedig a mezoderma. Bármely citoplazma rész kiszívása olyan embriók képződéséhez vezet, amelyekből hiányoznak a megfelelő sejtek. Ha pl. a sárga citoplazma részt szokatlan helyre injektálják, szokatlan helyen képződnek mezoderma sejtek. A *Cynthia partita* esete az ún. mozaik típusú fejlődés példája: az embrionális sejtek fejlődési programját a petesejt citoplazmájában levő tényezők határozzák meg.



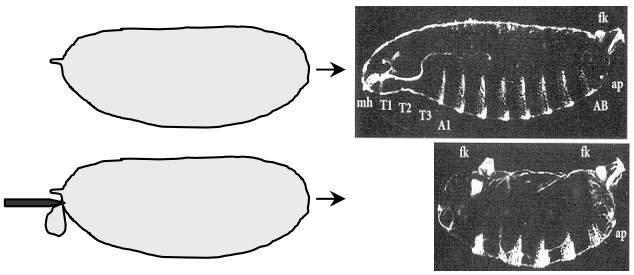
8.2. ábra. A mozaik típusú fejlődés esetében a sejtek fejlődési potenciálját a pete citoplazmájában levő anyai eredetű tényezők határozzák meg.

A petesejt citoplazma egyedfejlődést meghatározható szerepe nemcsak az alacsonyabb, hanem a magasabbrendű élőlényekre is jellemző, bár kisebb jelentőséggel. Pl. "egypetéjű ikrek" képződnek, ha egy béka embrió sejtjeit úgy különítjük el, hogy a petesejt citoplazmájának "szürke félhold" (angolul grey crescent) anyagából mindkét félbe jut. Ha az embrionális sejteknek egyik csoportjába nem jut a "szürke félhold" anyagból, csupán differenciálatlan sejthalmaz képződik (8.3. ábra).



8.3. ábra. A békapete szürke félhold anyaga szükséges a normális embriógenezishez.

A béka és a muslica peték citoplazmája is tartalmaz olyan, mRNS-ből és fehérjékből álló apró rögöcskéket, amelyek az embrionális osztódások folyamán az ősivarsejtek alkotóivá válnak. Az ősivarsejtekből származnak majdan az ivarsejtek. Ha a rögöcskéket elroncsolják (pl. UV sugárzással), a petékből olyan békák és muslicák fejlődnek, amelyek sterilek, mert nincsenek ivarsejtjeik.



8.4. ábra. A muslica peték elülső részében a "fejséget" meghatározó tényező van.

Egy muslica petében ép lárva fejlődik kb. egy nap alatt (8.4. ábra). Ha azonban a frissen képződött pete elülső végébe vékony tűvel beszúrunk, és egy kevés citoplazmát eltávolítunk, az embriónak nem képződik feje, jelezve, hogy a pete citoplazma elejében a "fejséget" meghatározó tényező van (8.4. ábra). Ha a pete hátulsó végéből távolítunk el egy kevéske citoplazmát, az embriónak nem képződik potroha: a pete citoplazma hátulsó részében a "potrohságot" meghatározó tényező van.

A peték (petesejtek) citoplazmája számos olyan tényezőt tartalmaz, amelyek az oogenezis folyamán képződnek és válnak a pete citoplazma részévé. A pete citoplazma itt említett tényezői anyai hatás révén szabályozzák az embriógenezist. Ha pl. egy béka zigóta sejtmagját (a zigóta saját génjeit) eltávolítják, az ún. enukleált "sejt" kezdetben ugyanúgy fejlődik, mint a sejtmagot tartalmazó testvéreik. Az embrionális osztódások egy idő múltán lelassulnak, de amikorra megállnak, az embriót már néhány száz "sejt" alkotja, és - némi fantáziával - ebihalnak tűnik. Az enukleált béka zigóta esete világosan bizonyítja, hogy a zigóta saját, a sejtmagban kódolt genetikai állománya nem szükséges a korai embriógenezishez. A korai embriógenezist azok az anyai eredetű anyagok szabályozzák, amelyek a pete citoplazma részei. A muslica embriókban a transzkripció csak a blasztoderma stádiumban kezdődik, amikorra már 13 osztódás történt, az embriót kb. hatezer sejt alkotja.

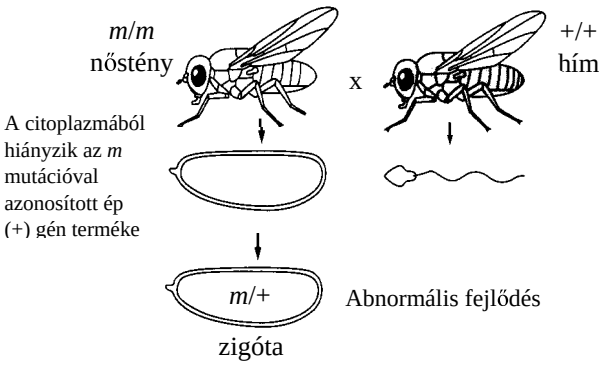
Aktinomicin-D oldatban, ahol gátolt a transzkripció, az egér zigóták a négy-, az ember zigóták a kétsejtes állapotig fejlődnek. Az anyai hatás természetesen nemcsak a négy- illetve a kétsejtes állapotig tart. A fejlődés elakadása a négy- illetve a kétsejtes stádiumban csupán azt jelenti, hogy az egér és az ember zigóták a négy- illetve a kétsejtes állapotban kezdik először használni a saját genetikai állományukat. Az előző fejezetben leírt kísérletek azonban semmit sem mondanak az anyai hatás molekuláris természetéről.

Az anyai hatás genetikai boncolása

Nyilvánvaló, hogy a peték (petesejtek) anyagának szintézisét az anya genetikai állománya szabályozza. Az anyai hatás tényezőit kódoló géneket mutációkkal tönkre lehet tenni. Amikor egy nőstény homozigóta egy ún. anyai hatású mutációra (itt *m*/*m*), petéiből hiányzik az a komponens, amely képződését nem teszi lehetővé az *m* mutáns allél (8.5. ábra). Pl. nem képződnek rögöcskék (és ősivarsejtek sem) azoknak a nőstényeknek a petéiben, amelyek homozigóták egy olyan mutációra, amely a rögöcskék szintézisét meghatározó gének valamelyikében következett be. Az *m*/*m* nőstényeknek ugyan lesznek utódaik, de mivel az utódok sterilek, az *m*/*m* nőstényeknek nem lesznek unokáik. A muslica megfelelő mutációját jól ismerik és *grandchildless*-nek, unokátlannak nevezik. (Egy fontos megjegyzés: a genetikusok az ép géneket a mutáns fenotípus alapján szokták elnevezni.)

Az anyai hatású mutációk legtöbbjének esetében az *m*/*m* nőstényektől látszólag csupa ép peték származnak, amelyekből azonban az *m* mutációval azonosított ép (+) gén terméke hiányzik. Elkezdődik az embriógenezis, de megakad azon a ponton, ahol az illető komponensre szükség volna. Az embriók elpusztulnak, függetlenül a saját genotípusuktól (8.5. ábra). Végeredményben tehát

az *m*/*m* mutáns nőstények (nők) sterilek (meddők). A nőstények sterilitását okozó ún. nőstény-steril mutációk között sok olyan van, amely az anyai hatásban szerepet játszó molekulák valamelyikének szintézisét kódolja. Minthogy a mutáns fenotípus alapján következtetni lehet az ép gén szerepére, a mutáns (*m*) allélból kiindulva meg lehet határozni az ép (+) gén funkcióját. A *genetikai boncolás* megoldás azt jelenti, hogy genetikai módszerrel (mutációkkal) azonosítunk olyan géneket, amelyek valamely folyamat elemei. A gének szerepét megismerve a folyamat, mint egy kirakós játék, összeállítható, megismerhető.

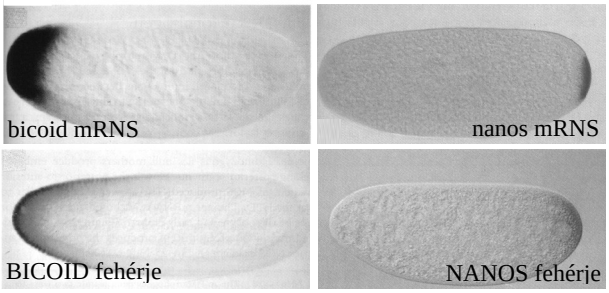


8.5. ábra. Sok ún. nőstény-steril mutáció olyan gént azonosít, amelyek termékei az anyai hatás fontos tényezői, amelyek az embriógenezist szabályozzák.

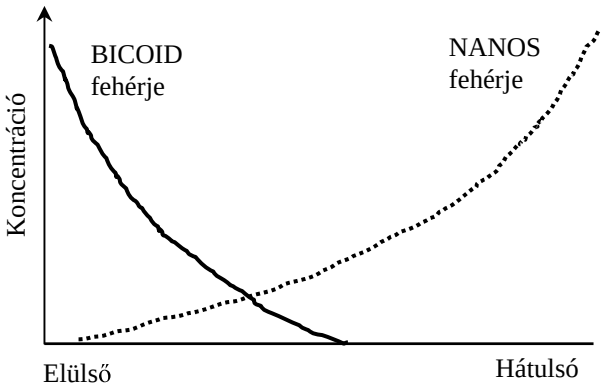
A muslica *bicoid* mutációja azonosítja azt az ép *bicoid*$^+$ gént, amely terméke (a bicoid fehérje) szükséges ahhoz, hogy az embrióknak feje képződjön. A *bicoid*/*bicoid* mutáns nőstények embrióinak nem képződik feje. A fej nélküli embriók nem különböztethetők meg azoktól, amelyek az 8.4. ábrán bemutatott petékben fejlődtek. A *nanos*$^+$ ép gén terméke (a nanos fehérje) az embriók potroh részének kialakulásához szükséges.

A *nanos*/*nanos*, a mutáns allélra homozigóta nőstények embrióinak nem képződik potroha, elpusztulnak. A potroh nélküli embriók pontosan úgy néznek ki, mint azok, amelyek a hátulsó végükön meglékelt petékben képződtek.

A *bicoid*$^+$ és a *nanos*$^+$ gén molekuláris biológiája is jól ismert. A bicoid mRNS a peték elülső végében lokalizált, éppen ott, ahonnan kifolyik a citoplazma, amikor beleszúrunk a petébe (8.6. ábra). A bicoid fehérje röviddel a blasztoderma stádium előtt képződik, koncentrációja *gradiensként* változik el a peték elülső részében: elöl nagyon nagy, hátrafelé haladva fokozatosan csökken, és hiányzik a pete citoplazma hátulsó végéből (8.6. ábra). A bicoid fehérje az ún. *morfogének* egyike, olyan molekula, amely közvetlenül meghatározza a sejtek fejlődési programját. A bicoid fehérje a zigóta sejtjeiben a DNS jól definiált helyeihez kapcsolódik, és - mint *transzkripciós faktor* - bizonyos géneket be-, másokat kikapcsol. A sejtek fejlődési programját az határozza meg, hogy bennük mely gének aktívak/inaktívak. A nanos fehérje is egy morfogén. Koncentrációja a pete citoplazma hátulsó végében nagy, előrefelé csökken. (8.6. és 8.7. ábra).

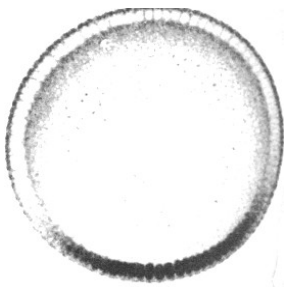


8.6. ábra. A bicoid mRNS, a bicoid fehérje, a nanos mRNS, és a nanos fehérje eloszlása a muslica petékben.



8.7. ábra. A BICOID és a NANOS fehérje is gradiensként oszlik el a muslica peték citoplazmájában. A BICOID fehérje, mint morfogén, közvetlenül meghatározza az embrió sejtek differenciációját az elülső-hátulsó tengely mentén.

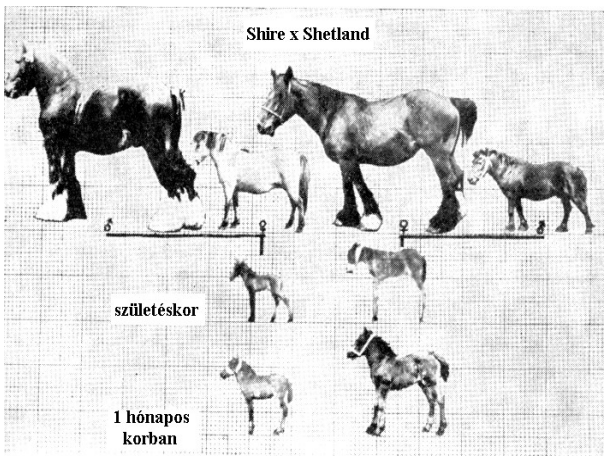
A muslica további anyai hatású mutációi tanulmányozása alapján derült fény a *dorsal* génre, illetve a DORSAL fehérjére, arra a morfogénre, amely az embrió sejtek hasi/háti irányú differenciációlódását szabályozza (8.8. ábra). A DORSAL morfogén hatásmechanizmusa a BICOID és a NANOS morfogénekét követi. Természetesen a DORSAL fehérje a zigóta más génjeinek expresszióját szabályozza.



8.8. ábra. A DORSAL fehérje koncentrációja egy muslica blasztorerma keresztmetszetén. A fehérje koncentrációja hasoldali, sötét színű sejtekben a legnagyobb, és hiányzik a hátoldali sejtekből. A DORSAL fehérje a hasi/háti tengely mentén szabályozza a sejtek differenciációját.

Anyai hatás az emlősökben

Az anyai hatás szerepéről emlősökben csak nagyon keveset tudunk. Az anyai hatás létét szépen bizonyítja a ló-öszvér és a szamár-öszvér esete. Amíg a ló kancák és szamár csődörök hibridjei (a ló-öszvérek) a lovakra, a szamár kancák és a ló csődörök hibridjei (a szamár-öszvérek) a szamarakra hasonlítanak. A kétféle öszvér közötti különbség annyira szembetűnő, hogy sok nyelvben külön szavakat használnak rájuk. (Angolban a ló-öszvér neve mule, a szamár-öszvéré hinny.) Bár a kétféle öszvér génjeinek egyik fele ló, a másik fele szamár, küllemük mégis inkább az anyáéra hasonlít. Az is ismert, hogy a csikók testmérete az anyákéra emlékeztet (8.9. ábra).



8.9. ábra. A csikók testmértét az anya testének mérete határozza meg.

A közelmúltban derült arra fény, hogy az egér és az ember petesejtek citoplazmája is tartalmaz a korai embriógenezist szabályozó tényezőket. Becslések szerint a meddő asszonyok 8-10 %-a homozigóta olyan mutációra, mint azt az *m*/*m* esetben láttuk. Az is bizonyosra vehető, hogy vannak olyan környezeti tényezők (egyikük a dohányzás), amelyek gátolják az anyai hatás anyagainak bekerülését és elrendeződését a petesejtek citoplazmájába. A tökéletlenül feltöltött petesejtek eredményezhetik pl. a nyitott gerinccsatorna kialakulását és más fejlődési rendellenességeket. Az ún. magzatvédő programok egyik célja a petesejtek tökéletes "felkészítése" a fogamzásra. Tudott, hogy a folsav (egy koenzim, a B2 vitamin komplex fontos komponense) a petesejtek "feltöltődésének" legfontosabb tényezője.

ANYAI ÖRÖKLŐDÉS

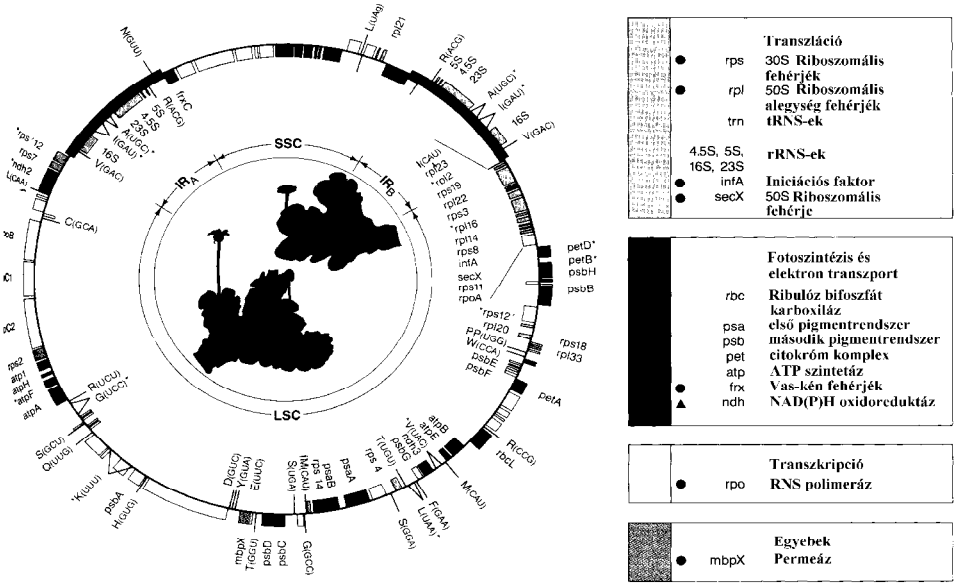
1. A plasztisz DNS-ben kódolt tulajdonságok öröklődése

Carl Correns (1909) olyan csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*) virágok bibéire vitt polleneket, amelyek zöld levelű ágak végén képződtek. A polleneket olyan virágokból gyűjtötte, amelyek zöld, variegáló, vagy sárga levelű hajtások végén képződtek. (A variegáció itt azt jelenti, hogy ugyanazt a levelet egyszerre alkotják zöld és sárga színű sejtek, foltokban eloszolva. A foltok mintázata véletlenszerű.) Correns megvizsgálta az F1 növényeket, és azt tapasztalta, hogy a levelek mindhárom esetben zöldek voltak (8.1. táblázat).

8.1. táblázat. A levélszín anyai öröklődése a csodatölcsér növényben.

Női virág	Pollen	Utódok
zöld	zöld	mind zöld
zöld	variegált	mind zöld
zöld	sárga	mind zöld
variegált	zöld	mind variegált
variegált	variegált	mind variegált
variegált	sárga	mind variegált
sárga	zöld	mind sárga
sárga	variegált	mind sárga
sárga	sárga	mind sárga

Amint azt az 8.1. táblázat mutatja, az F1 növények fenotípusa minden esetben az "anyáéval" volt azonos. Sőt az anyai meghatározó szerep a további generációkban is megmaradt. A csodatölcsér levélszínének öröklődése nem követi a Mendel szabályokat, hanem az *anyai öröklődés* jellegzetes példája.



8.10. ábra. A májmoha kloroplaszt DNS és génjei. A levélszín öröklődésének az az alapja, hogy az utódok minden kloroplasztja a női ivarsejtből származik. A pollenek nem visznek magukkal sem plasztiszokat, sem plasztisz DNS-t. A kör alakú kloroplaszt DNS viszonylag kicsi, és csak kevés gént kódol.

A levelek színét egy olyan gén kódolja, amely a kloroplaszt DNS része (8.10. ábra). Ha a kloroplaszt DNS az ép allélt hordozza, a kloroplasztok és a sejtek is zöldek. Ha a plasztisz DNS a mutáns allélt hordozza, a plasztiszok és a levelek is sárgák a karotinoidoktól. (A sárga plasztiszok nem fotoszintetizálnak. A sárga sejteket zöldszínű testvéreik tartják el.) Sok sejt halványzöld, mert bennük egyaránt vannak zöld és sárga színű plasztiszok. Mivel a sejtosztódások folyamán a plasztiszok véletlenszerűen oszlanak meg az utódsejtek között, az utódsejtek lehetnek zöldek, halványzöldek és sárgák is. Minthogy az utódsejtek egymás közelében szoktak maradni, a különböző színű sárga foltok meglehetősen nagyok is lehetnek.

2. A mitokondriális DNS (mtDNS) által kódolt tulajdonságok öröklődése

Mary és Hershel Mitchel (1952) a *Neurospora* penészgomba (*N. crassa*) *poky*$^-$ mutációra homozigóta "női" egyedeit keresztezte vadtípusú *poky*$^+$ "hímekkel". (A *poky*$^-$ mutáns sejtek lassan szaporodnak, kis telepeket képeznek.) Mitchelék arra lettek figyelmesek, hogy az F1 generációban csupa *poky*$^-$ utódok képződtek. A *poky*$^-$ jelleg a további generációkban is megmaradt. Még akkor is, ha az utód *poky*$^-$ gombákat *poky*$^+$ "hímekkel" keresztezte, sok-sok generáción át.

A reciprok keresztezésben (amelyben *poky*$^+$ „nőstényeket" *poky*$^-$ „hímekkel kereszteztek) csupa *poky*$^+$ utódok származtak. Vagyis az utódok fenotípusa nem a Mendel szabályok szerint alakult, hanem mindig az anyáét követte: a *poky* jelleg öröklődése az anyai öröklődés jellegzetes példája. Ma már tudjuk, hogy a *Neurospora* sejtek lassú növekedésének oka a mitokondriális DNS (mtDNS) egyik génjének mutációja. A mitokondriumok, benne a mtDNS, ugyanúgy anyai úton, a petesejt citoplazmáján át öröklődnek az utódokra, mint a kloroplasztok.

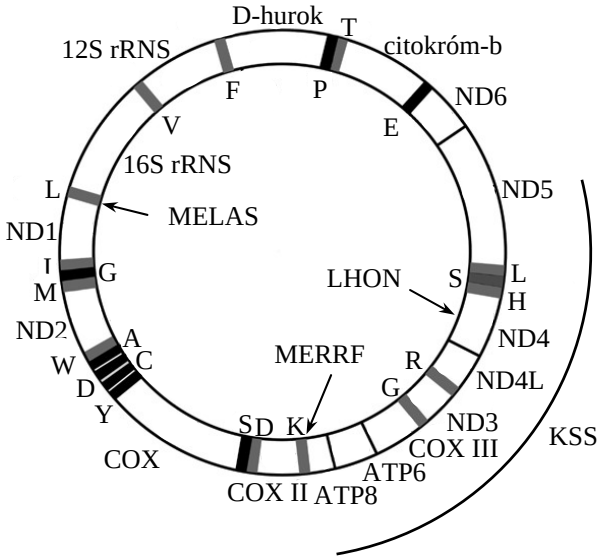
Az olyan típusú öröklődést, mint pl. a kloroplaszt színe, vagy a *Neurospora* telepek mérete, *anyai öröklődésnek* nevezik. Az anyai öröklődést szokás extranukleáris, vagy extrakromoszómális öröklődésnek is nevezni. Azért, mert olyan DNS kódolja, amely nem része a sejtmagnak, a kromoszómáknak, hanem a citoplazmában, kétféle sejtszervecskében van.

3. Az endoszimbionta baktériumok anyai öröklődése

Az endoszimbiózis (baktériumok létezése eukariota sejtekben) számos élőlényre jellemző jelenség. Az endoszimbionta baktériumok (és fágjaik) örökítő anyaga DNS. Minthogy a baktériumok (és fágjaik) a peték citoplazmája révén kerülnek az utódokba, és a baktérium (és a fág) DNS-e is határozhat meg különféle jellegzetességeket, várható, hogy az endoszimbionta baktériumok, és az általuk meghatározott tulajdonságok is anyai öröklődést mutatnak. Egy endoszimbionta *Spirochaeta* baktérium fágjai felelősek azért, hogy bizonyos *Drosophila* fajokban sokkal kevesebb hím utód képződik, mint nőstény. Egy másik endoszimbionta baktérium faj szigma vírusa a fertőzött Drosophila vonalak CO_2 érzékenységét okozza: a CO_2-al kezelt muslicák paralizálódnak és rövid időn belül elpusztulnak. A hímek nem örökítik a CO_2 érzékenységet utódaikra. A fertőzött törzsek antibiotikum kezelése nyomán a nőstény hím arány 1:1 lett, és megszűnt a CO_2 érzékenység is…

Az emberi mtDNS jellemzői, és a mutációival kapcsolatos betegségek öröklődése

Az ember mtDNS-e 16.569 bázispárból álló, kör alakú DNS. Egy-egy mitokondriumban 2-10 mtDNS van. Az ember mtDNS-ét összesen 37 gén alkotja: 13 kódolja fehérjék szintézisét (mind a légzési lánc eleme), 22 tRNS-ekét, kettő pedig rRNS-ekét (8.11. ábra).



8.11. ábra. Az ember mitokondriális-DNS-ének szerveződése. A mtDNS 37 génje közül 13 kódolja fehérjék képződését: az ND1-6, az ND4L, a COX I-III, a citokróm-b a légzési lánc, az ATP6 és az ATP8 gének az ATP-szintetáz egy-egy fehérjeféleségét. A mtDNS két rRNS (12S és 16S), valamint 22 tRNS féleség képződését kódolja. A P, a T, az E stb. betűk azokat a tRNS géneket jelölik, amelyek által kódolt tRNS-ekhez a P, a T az E stb. betűkkel jelölt aminosavak kötődnek a fehérjeszintézisre készülődve. Az úgynevezett D-hurok, amely nem része egyetlen génnek sem, 1121 bázispárból áll, és a származás-viszonyok megállapításában húznak hasznot belőle a szakemberek. A KSS jelű, ötezer bázispárnyi deficiencia nyomán alakul ki a Kearns-Sayre-szindróma. A MELAS, a LHON és a MERRF betegségek a nyilakkal jelölt helyen bekövetkezett pontmutációkra vezethetők vissza

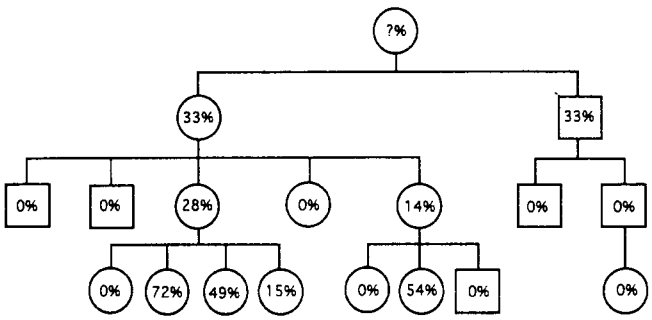
.

Egy mitokondriumban mutációt hordozhat egy, néhány, vagy akár mindegyik mtDNS. Egy sejten belül a mitokondriumok különböző hányada hordozhat ép és/vagy mutáns mtDNS-eket. A mitokondriumok szaporodása folyamán olyanok is képződhetnek, amelyekben mindegyik mtDNS hordozza a mutációt. Bár ezek a mitokondriumok funkcióképtelenek, funkcióképes társaik mellett életben maradhatnak. A sejtek

osztódása során képződhetnek (és képződnek is) olyan sejtek, amelyekbe csupa funkcióképtelen mitokondrium kerül. A zömében vagy csupa funkcióképtelen mitokondriumot tartalmazó sejtek funkcióképtelenek, és elpusztulnak.

Mivel a mitokondriumokban nincs reparációs rendszer, a mtDNS hibái nem javítódnak. Sőt az ép mtDNS-ekkel szemben replikációs előnyben vannak azok a mtDNS-ek, amelyekből rövidebb-hosszabb szakaszok hiányoznak. A szokásosnál rövidebb mtDNS-ek hosszú távon felhalmozódnak a mitokondriumokban, a sejtekben. Az idős emberekben gyakoriak az olyan mtDNS-ek, amelyek különböző helyeiből különböző nagyságú szakaszok hiányoznak. Elfogadott az a vélemény, hogy a mtDNS mutációi (elsősorban rövidülése) az öregedés egyik fontos tényezője.

Vannak olyan anyák, akik petesejtjeiben a mitokondriumok különböző arányban tartalmaznak ép és mutáns mtDNS-eket. Ők természetesen különböző arányban örökítik utódaikra az ép és a mutáns mitokondriumokat, ami nyomán gyermekeik között különböző arányban vannak egészségesek és betegek. Érthető módon változó a betegség mértéke (8.12. ábra).



8.12. ábra. A mtDNS-el kapcsolatos emberi betegség az anyai öröklődés jellegzetességeit mutatja. A betegség megnyilvánulásának mértéke meglehetősen változó.

A mtDNS mutációi számos betegség forrásai. Legismertebbek a miopáthia, kardiomiopáthia, enkefalomiopáthia, diabetes mellitus (cukorbetegség) bizonyos típusai, a LHON (Leber féle öröklődő optikai neuropáthia), a MERRF (myoclonus epilepszia és rongyos-vörös köteg szindróma), a MELAS (mitokondriális mielopáthia, enkefalopáthia, tejsavas acidózis és rohamszerű rosszullétek), és a PEO (progresszív externális oftalmoplégia; 8.11. ábra). Tapasztalati tény, hogy a mtDNS mutációival kapcsolatos betegségek az életkor előrehaladtával fokozatosan nyilvánulnak meg, és lesznek egyre súlyosabbak.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az ún. anyai hatású mutációk alapján ismerték meg a szakemberek a korai embriógenezis szabályozásának mechanizmusát, a nőstény-sterilitás genetikai alapjait, és dolgozták ki a magzatvédő programokat. Nyilvánvaló, hogy bár a legtöbb élőlény élete a megtermékenyülés pillanatában kezdődik, az egyedfejlődés feltételei a petesejtek érése során teremtődnek meg. Az egymást követő generációk mintegy átfolynak egymásba egy olyan folyamat során, amely kb. 4 milliárd éve kezdődött, az első sejt, a progenota kialakulásakor. A kloroplaszt, és a mitokondriumok DNS-e által kódolt tulajdonságok jellegzetes öröklődés-mintázatot követnek. A mtDNS mutációk természetének ismeretében értettük meg néhány öröklődő emberi betegség, valamint az öregedés egyik szereplőjének alapjait.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis, 112-118, 427-439, 2008.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 236-242, 969-977, 2007.
3. Anyai öröklődés, anyai hatás. Mindentudás Egyeteme, III. kötet, 231-241, Kossuth Kiadó, Budapest, 2004.
4. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 253-266, 587-603, 1989.
5. http://mindentudas.hu/elodasok-cikkek/item/65-anyai-%C3%B6r%C3%B6kl%C5%91d%C3%A9s-anyai-hat%C3%A1s.html

9. TRANSZKRIPCIÓ PRO- ÉS EUKARIOTÁKBAN

Promóter és TATA box. Értelmes és néma szál. RNS polimeráz és mRNS. Intron, exon és pre-mRNS érés.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

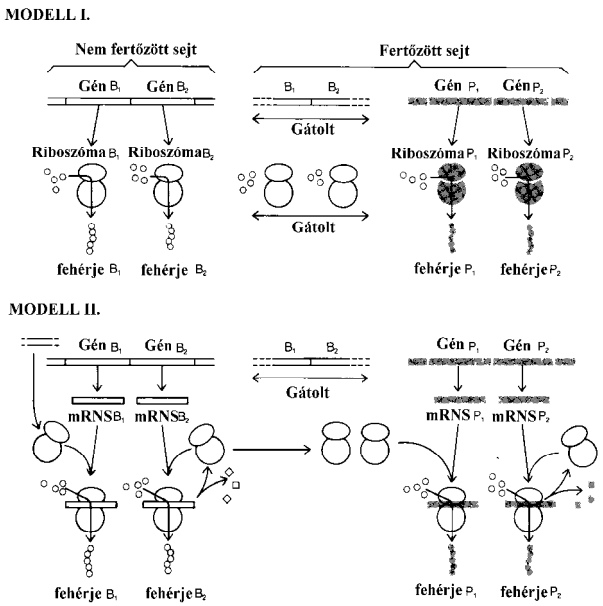
Bár a DNS az örökítő anyag, a sejtek, az élőlények jellegzetességeit döntően az őket alkotó fehérje molekulák határozzák meg. A fehérjék tulajdonságai attól függenek, hogy őket milyen aminosavak, és milyen sorrendben alkotják. Az aminosavak sorrendje pedig a DNS nukleotid sorrendjében kódolt. A fehérjeszintézis előfeltételeként a DNS információ tartalma először hírvivő-RNS-be (messenger, vagy mRNS) másolódik át a transzkripció során, amely alapján aztán fehérje molekulák képződnek. A 9. fejezet a transzkripció mechanizmusát tekinti át.

Transzkripció: RNS molekulák képződése DNS templát alapján.

Az mRNS felfedezése

Miután Watson és Crick 1953-ban leírta a DNS szerkezetét, kérdések tucatja fogalmazódott meg a DNS funkcióját illetően.. Például: milyen mechanizmus irányítja a fehérjék szintézisét a DNS-ben kódolt genetikai információ alapján? Milyen "szerkezet", és hogyan olvassa a DNS-ben kódolt információt? Az egyik elméleti lehetőség az volt, hogy a DNS-ben kódolt információt újonnan képződő riboszómák olvassák, majd szintetizálnak fehérjéket. A riboszómák szerepét Sydney Brenner, Francis Jacob és Mathew Meselson tanulmányozta (1961). Ők a nitrogén és a szén nehéz izotópjaival (^{15}N-el és ^{13}C-al) riboszómákat jelöltek meg. Úgy, hogy baktériumokat ^{15}N-öt és ^{13}C-at tartalmazó tápoldatban szaporítottak (9.1. ábra). A baktériumokat izolálták, és olyan tápoldatba tették, amely a nitrogén és a szén könnyű izotópjait (^{14}N-et és ^{12}C-t) tartalmazta. Ugyanakkor a baktériumokat egy virulens (T4) fággal fertőzték. Hét perc múltán izolálták a riboszómákat és meghatározták, hogy a riboszómák nehezek (a fágfertőzés előtt képződtek) vagy könnyűek voltak (a fágfertőzés után képződtek). (Korábban már ismert volt, hogy a fágfertőzést követően a baktériumok abbahagyják saját fehérjéik szintézisét és csak fágfehérjéket szintetizálnak.) Ha tehát a fág DNS információ tartalmát újonnan képződött riboszómák olvassák, várható, hogy a baktériumokban könnyű riboszómák is lesznek a nehezek mellett. Ha azonban az "öreg" riboszómák olvassák a fág DNS-t, nem képződnek könnyű riboszómák. Minthogy minden riboszóma nehéz volt Brenner, Jacob és Meselson arra következtetett, hogy a fágfertőzést követően nem képződnek új riboszómák, a régiek szintetizálják a fágfehérjéket (9.1. ábra).

Egy további kísérletben Brenner, Jacob és Meselson a fágfertőzéssel egyidejűen ^{14}C-el jelzett uracilt adott a baktériumokhoz. (Az uracil csak az RNS molekulák alkotója.) A ^{14}C-uracil egy olyan rövid életű RNS féleségbe épült be, amely szorosan kapcsolódott a riboszómákhoz. Minthogy az újonnan felfedezett RNS molekulaféleség hírvivőként szerepelt a DNS és a riboszómák között, messenger (hírvivő) RNS-nek nevezték el, és mRNS-nek jelölték.

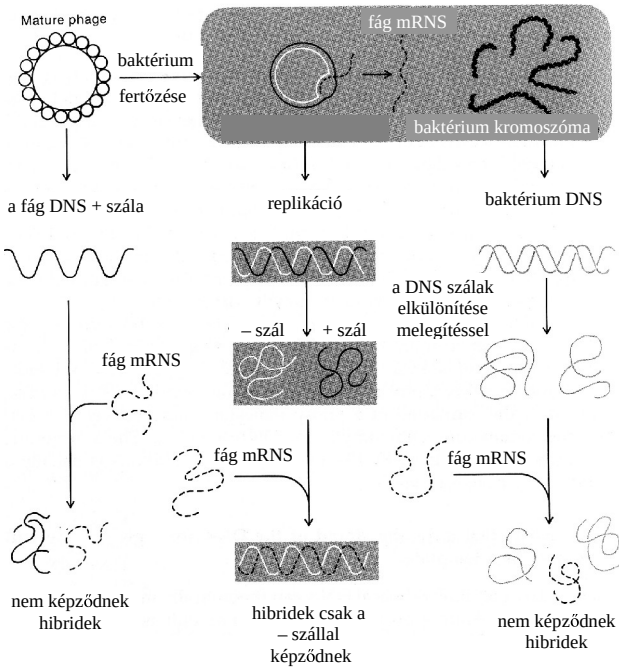


9.1. ábra. Elméleti lehetőségek a DNS-ben tárolt információ olvasására.

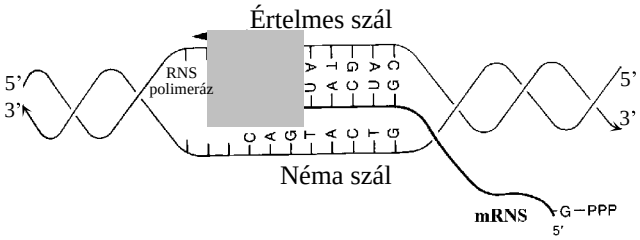
A transzkripció során csak a DNS értelmes szála templát az mRNS szintéziséhez

Benjamin Hall és Sol Spiegelman (1961) olyan környezetben fertőzött meg *E. coli* sejteket fágokkal, amely ^{32}P-t tartalmazott. Az volt a céljuk, hogy megjelöljék az újonnan szintetizálódott mRNS molekulákat. Hall és Spiegelman RNS-t izolált a fertőzött sejtekből. A ^{32}P-vel jelölt RNS molekulákat egyszálú bakteriális és fág DNS-el hibridizálták. Minthogy ^{32}P-RNS/DNS hibridek csak a fág DNS-el képződtek, Hall és Spiegelman arra következtetett, hogy a ^{32}P-mRNS a fág templát DNS alapján képződött.

Hyashi és Spiegelman (1961) bizonyította, hogy bármely gén esetében a DNS kettős spirálnak csak az egyik szála alapján képződik mRNS. (Ma már tudjuk, hogy vannak kivételek.) A szálat *értelmes* (templát) szálnak nevezik. Hyashi és Spiegelman *E. coli* sejteket a ϕX174 fággal fertőzte (9.2. ábra). A ϕX174 fág kromoszómája egyszálú, gyűrű alakú DNS, amit + szálnak neveznek. A fertőzést követően képződik a komplementer – (negatív) szál, és a kétszálú DNS. Az a DNS molekula, amely szabályozza a ϕX174 mRNS molekulák szintézisét. Hyashi és Spiegelman mRNS-t izolált a fertőzött sejtekből. Ez az mRNS nem hibridizált sem a baktérium DNS-el, sem pedig a + fág DNS-el. A ϕX174 fág mRNS csak a – szállal hibridizált, jelezve, hogy a transzkripció során a ϕX174 kettős spirálnak csak az egyik (a –) szála templát az mRNS szintéziséhez. A másik, a + (*néma*, vagy nem templát) szálnak elsősorban a replikáció során van jelentősége (9.3. ábra). A ϕX174 fág genomja az ismert legkisebb. Csak kevés gént kódol és ritka kivétel, hogy csak az egyik szála értelmes. Valójában egy DNS fonálnak mindkét szálán vannak értelmes szakaszok, természetesen a különböző génekben.



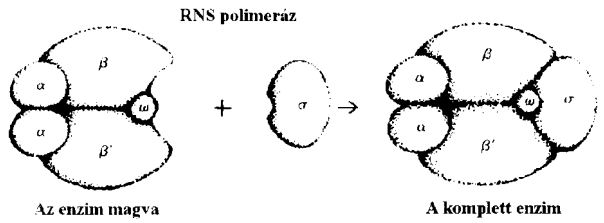
9.2. ábra. A transzkripció során a DNS-nek csak az egyik szála szolgál templátként az mRNS-ek szintéziséhez.



9.3. ábra. Az mRNS szintézise 5'→3' irányban történik. Az értelmes szálat az RNS polimeráz 3'→5' irányban olvassa.

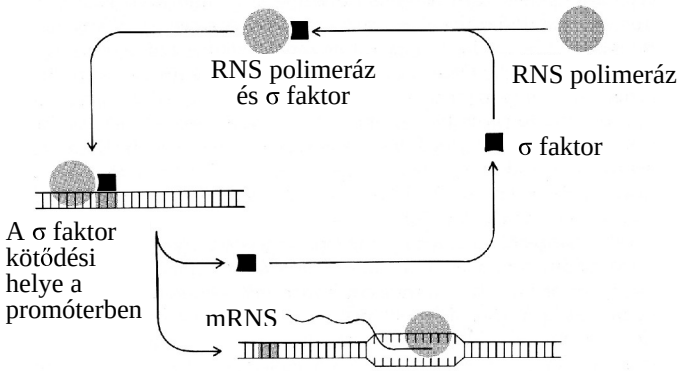
Az RNS polimeráz

Az mRNS molekulákat óriás méretű fehérje komplex szintetizálja, a DNS-függő RNS polimeráz, röviden *RNS polimeráz. E. coli*-ban az RNS polimeráz tömege kb. 490 kDa. Az enzim magját (core enzim) két α, egy β, egy β' és egy ω egység alkotja (9.4. ábra). Az RNS polimeráz magja a DNS bármely részéhez kapcsolódhat és elkezdheti az mRNS szintézisét. Az ún. holoenzim, a teljes enzimkomplex akkor alakul ki, amikor az enzim magja egy további fehérjével egészül ki, a σ (szigma) faktorral (9.4. ábra).



9.4. ábra. Az enzim magja + σ faktor = holoenzim.

A σ faktor az RNS polimerázt a DNS jellegzetes helyeihez, a promóterekhez irányítja. A promóterhez kapcsolódás után a σ faktor kiválik a komplexből, hogy egy további RNS polimerázt irányítson egy másik promóterhez (9.5. ábra).



9.5. ábra. A σ faktor az RNS polimeráz holoenzimet a promóterhez irányítja.

Az mRNS-nek, mint minden más nukleinsavnak a szintézise 5' → 3' irányban történik (9.3. ábra). Minthogy az mRNS komplementere a DNS értelmes (templát) szálának, és minthogy a komplementer szálak antiparalel állásúak, az RNS polimeráz az értelmes szálat 3' → 5' irányban olvassa. A transzkripció sebessége 30 nukleotid/sec. (Összehasonlítás kedvéért: a replikáció sebessége eukariotákban 170 nukleotid/sec, a transzlációé 2 aminosav/sec.) A különböző génekről különböző gyakorisággal képződnek mRNS-ek: némely gén esetében 1-2 mRNS/sec, mások esetében óránként mindössze egy. Eukariotákban speciális fehérje molekulák, ún. transzkripciós faktorok is szükségesek a transzkripcióhoz. A transzkripciós faktorok specifikus DNS szekvenciákat ismernek fel, miközben a DNS nagy árkában fekszenek. A transzkripciós faktorok valójában DNS-hez kötődni képes fehérjék.

Eukariotákban egy RNS polimeráz komplexet 10-15 fehérje alkot. Az RNS polimeráz tömege 500 kDa. Mégis, a pro- és eukariota polimerázok minden bizonnyal közös eredetűek, mert pl. az *E. coli* RNS polimeráz DNS kötő komponense, a β' fehérje homológ az eukariota RNS polimeráz L' komponensével.

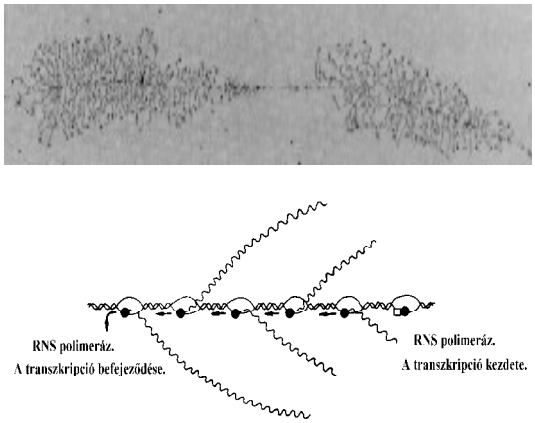
Az RNS polimerázoknak funkcióiknak és az α-amanitin érzékenységüknek megfelelően három típusuk van (9.1. táblázat).

9.1. táblázat. Az RNS polimerázok jellemzői

RNS polimeráz	A szintetizált RNS típusa	α-amanitin* érzékenység	Számuk sejtenként
I. (a)	Riboszómális RNS	Nem érzékeny	Negyvenezer
II. (b)	mRNS	Nagyon érzékeny	Negyvenezer
III. (c)	transzfer RNS, és 5S rRNS	Mérsékelten érzékeny	Húszezer

* a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) alkaloidja.
(I-III. az USA-ban, a-c Európában.)

A transzkripció elektronmikroszkópban láthatóvá tehető (Oscar Miller). Egy intenzíven átírt gén esetében a képződő mRNS molekulák úgy néznek ki, mint karácsonyfán az ágak (9.6. ábra). Az mRNS molekulák világosan kijelölik a gének határait, azt a két pontot, ahol elkezdődik az mRNS molekulák szintézise, és azt is, ahol befejeződik.



9.6. ábra. A transzkripció során az egy génről képződő mRNS molekulák karácsonyfaszerűen néznek ki elektronmikroszkópban a prokarioták sejtjeiben.

A promóter

Korábban említettük, hogy az RNS polimeráz a DNS promóter régiójához kötődik. Az RNS polimeráz a promóterhez kötődve marad, ha hiányoznak az mRNS szintéziséhez szükséges építőelemek. A DNS a hozzá kapcsolódó RNS polimerázzal izolálható. A DNS-nek az RNS polimerázzal nem védett részei DN-ázzal, egyfajta DNS bontó enzimmel, elbonthatók. Végeredményben a DNS-nek csak a promóter részei maradnak épek. A promóterek izolálhatók, vizsgálhatók, szekvenálhatók.

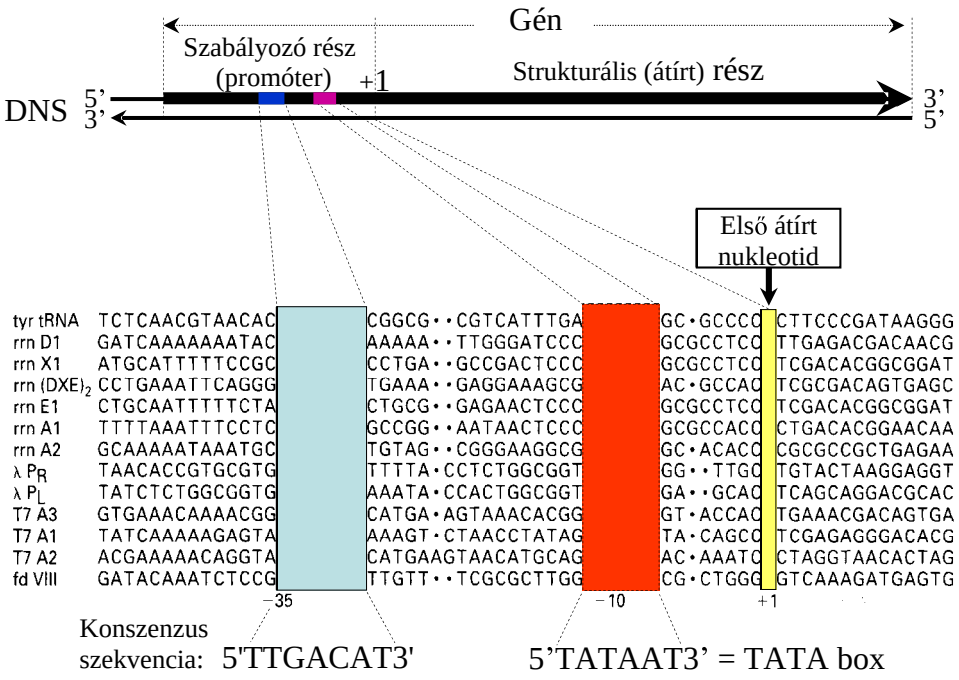
A polimeráz egy kb. 50 bázispárból álló DNS szakaszt véd meg a DN-áztól. A különféle gének promóter szekvenciáinak összehasonlítása alapján arra derült fény, hogy a promóterekben két erősen konzervált szakasz, ún. box van. (*Box*nak a DNS evolúciósan erősen konzervált szakaszát nevezzük.)

(1) Az egyik szakasz a -35. hely körül helyezkedik el, és leggyakrabban az 5'TTGACAT3' sorrendben alkotják a nukleotidok (9.7. ábra). A leggyakoribb, az összeshez legjobban illeszkedő szekvenciát konszenzus szekvenciának szokás nevezni. Az 5'TTGACAT3' szekvencia ahhoz szükséges, hogy az RNS-polimeréz a DNS-hez kötődhessen.

(2) Az ún. TATA-boxot többnyire 5’TATAAT3’ sorrendben alkotják a nukelotidok (9.7. ábra). (A TATA boxot porkariotákban felfedezője, David Pribnow tiszteletére, Pribnow-boxnak is nevezik.) A TATA box A=T bázispárokban gazdag. Egy másik hely a promóteren belül, ahová az RNS polimeráz kötődik, és ahol a DNS két szála könnyen elválasztható, lehetőséget teremtve az értelmes DNS szál átírására. A transzkripció a TATA boxtól 5-9 bázispárral lentebb, a 3' irányban kezdődik (9.7. ábra).

Az első átírt nukleotid többnyire purin bázis. A képződő mRNS másod-percenként átlagosan 40 nukleotiddal hosszabbodik.

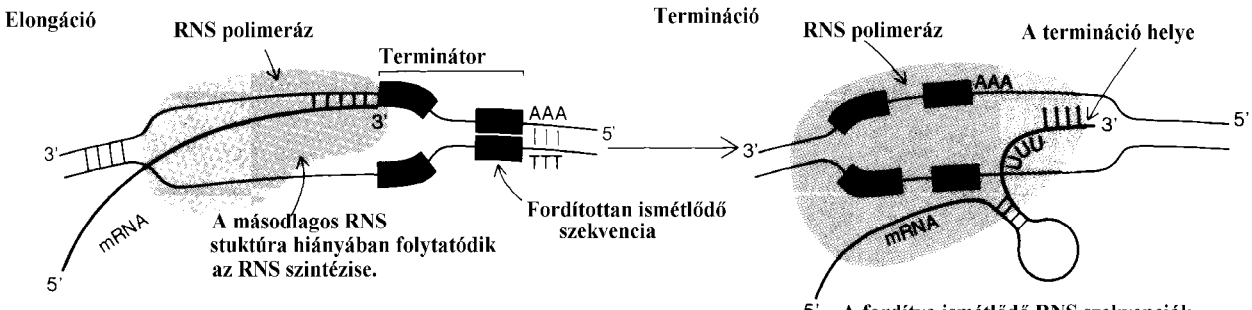
Bár a két erősen konzervált szekvencia közötti rész nem konzervált, hossza 17 bázispár. A két box közötti szakasz egy részének, vagy akár csak egyetlen bázispárjának a deléciója csökkenti, vagy megszünteti a promóter aktivitását, a gén kifejeződését.



9.7. ábra. A prokarioták promótereiben két evolúció-san erősen konzervált szekvencia ismerhető fel. (Itt az *E. coli* 13 promóterében.) Mindkettő az RNS polimerázt segíti kötődni a promóterhez. A -35 hely környékén levőt folyamatos, az ún. TATA boxot szaggatott vonal kertezi be. A transzkripció a +1-el jelölt helyen kezdődik. A +1 nukleotid az esetek többségében A, vagy G.

A transzkripció terminációja

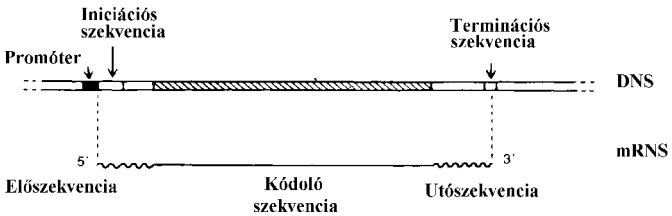
E. coli-ban a transzkripció terminációjának két típusa van. (i) Sok gén esetében egy fehérje, az ún. *rho* faktor, biztosítja a transzkripció befejeződését. (ii) A második megoldás alapjai az ún. fordítva ismétlődő (angolul inverted repeats) szekvenciák. A fordítva ismétlődő szekvenciák transzkripciója után az mRNS olyan komplementer szekvenciákat tartalmaz, amelyek egymással párosodnak és nyél-hurok (hajtű) szerkezetet képeznek (9.8. ábra). A nyél-hurok szerkezet kialakulása után az mRNS leválik az RNS polimerázról, befejeződik a transzkripció.



10.8. ábra. A transzkripció terminációját fordítottan ismétlődő szekvenciák is lehetővé teszik az mRNS-ben képződő nyél-hurok szerkezettel.

Az mRNS molekulák szakaszai

Minden mRNS molekulát három szakasz alkot (9.9. ábra). (1) Az ún. *előszekvencia* (angolul leader sequence) az mRNS 5' végétől az AUG (start) kodonig tart. Szerepe az mRNS-riboszóma kapcsolat megteremtése, a fehérjeszintézis elkezdődéséhez. (2) A *kódoló szekvencia* vagy nyitott leolvasási keret (angolul open reading frame, ORF) az AUG kodontól az első stop kodonig tart. (3) Az *utószekvencia* (angolul trailer szekvencia) az első stop kodontól az mRNS 3' végéig tart. A elő-, illetve az utószekvenciát szokás 5', illetve 3' nem-transzlálódó régióknak is nevezni. (Angolul 5' untranslated region, 5'UTR, illetve 3'UTR.)



9.9. ábra. A DNS és a kódolt mRNS szerkezete közötti kapcsolat.

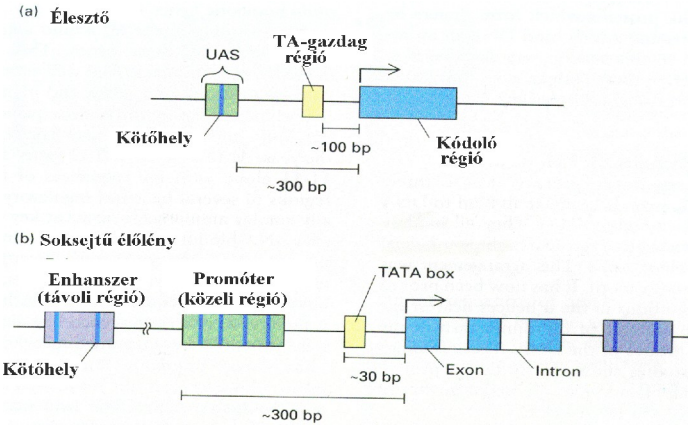
TRANSZKRIPCIÓ EUKARIOTÁKBAN

Promóter eukariotákban

9.10. ábra. TATA box az eukariota gének promóterében. A felső vonal a DNS egyik szálát mutatja, és azt, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő az adott helyen a különféle bázisok nagyon sok eukariota gén promóterében. A szaggatott téglalappal bekeretezett helyen a T A T A A/T A szekvencia fordul elő a leggyakrabban, az ún. TATA box. Az RNS polimeráz a TATA boxnál tekeri szét a DNS két szálát, hogy azon 18-26 nukleotidnyit lefelé (a 3' irányba) gördülve a +1 helyen elkezdje a transzkripciót, az mRNS szintézisét. (A +1 nukleotid az esetek 75%-ában A vagy G.)

Az eukariota gének promótereiben is gyakran felismerhető két erősen konzervált szakasz. A TATA box konszenzus szekvenciája 5'TATA$^{A}/_{T}$A$^{A}/_{T}$3', és felfedezője tiszteletére Hogness boxnak nevezik (9.10. ábra). Eukariotákban további DNS szekvenciák, az enhanszerek, valamint a silencerek (ejtsd szájlenszer) is szabályozzák a transzkripciót, a gének kifejeződését (9.11. ábra).

A transzkripció kezdetén az RNS polimeráz a TATA boxnál tekeri szét a DNS két szálát, hogy azon 18-26 nukleotidnyit lefelé (a 3' irányba) gördülve a +1 helyen elkezdje a transzkripciót, az mRNS szintézisét. Az mRS molekulák másodpercenként 60 nukleotiddal hosszabbodnak.



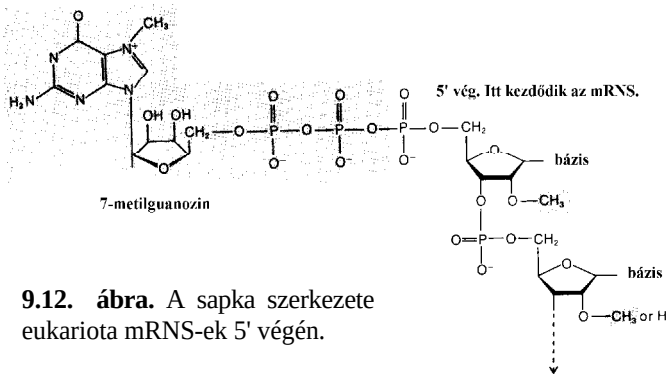
9.11. ábra. Szabályozó szekvenciák az élesztő és valamely soksejtű élőlény DNS-ében. A kötőhely azokat a DNS szakaszokat jelöli, amelyekhez transzkripciós faktor fehérje molekulák kapcsolódhatnak. (UAS = upstream activating sequence.)

A pre-mRNS molekulák érése

A legtöbb eukariota mRNS molekula egy olyan *érési folyamat* eredménye, amelyet angolul processing-nek neveznek. A transzkripció első lépésében ún. pre-mRNS molekulák képződnek. A pre-mRNS molekulák összessége alkotja az ún. heterogén sejtmagi RNS-t (hnRNS). A pre-mRNS molekulák érésük során három lépésben módosulnak.

1. Első lépésben egy ún. *sapka* (CAP) képződik a még el sem készült pre-mRNS 5' végére. A sapka egy metil guanin és további metil csoportok képződését jelenti (9.12. ábra). A sapka képződését az RNS polimeráz

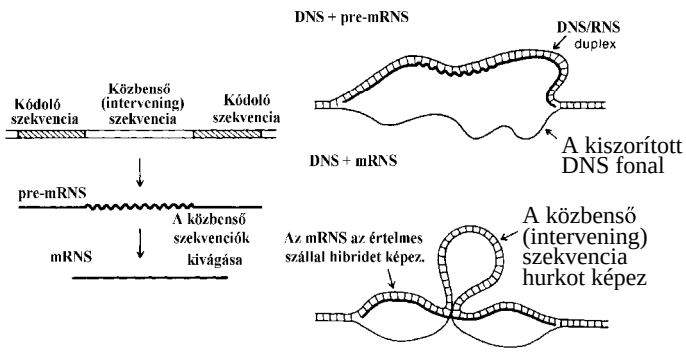
komplex egyik komponense építi az 5' végre. A sapka a pre-mRNS-t, és a majdan belőle képződő mRNS-t védi a degradációtól. A sapka szükséges továbbá a szplájszinghoz, valamint az mRNS-riboszóma kapcsolat megteremtéséhez.



9.12. ábra. A sapka szerkezete eukariota mRNS-ek 5' végén.

2. Szplájszing (splicing)

A pre-mRNS molekulák mérete néhány száztól több mint egy millió nukleotid között változik. Amíg pl. a β-globin pre-mRNS kb. 1500 nukleotid hosszú, az érett, citoplazmában levő β-globin mRNS csak kb. 700 nukleotidból áll. Amikor a pre-mRNS-t a kódoló DNS-el hibridizálták és a pre-mRNS/DNS hibridet elektronmikroszkópban vizsgálták, két egymáshoz tapadó és egy vékony egyszálú DNS szakasz látszott (9.13. ábra). Az érett mRNS molekula is hibridizál a kódoló DNS-el. Azonban az előzőtől különböző szerkezet képződik: az a DNS szakasz, amelynek megfelelő szekvencia hiányzik az mRNS-ből hurkot képez (9.13. ábra). Nyilvánvaló, hogy a pre-mRNS-ből bizonyos szakaszok kivágódnak még a sejtmagon belül. A kivágott szakaszt *intronnak* (angolul intervening sequence, intron) nevezik. Azt a folyamatot nevezik *szplájszingnak*, amely során az intronok kivágódnak a pre-mRNS-ekből, a megmaradó az RNS szakaszok összeforradnak, érett mRNS-t képeznek. Az intron bármely gén átírt, de az érett mRNS-ben nem képviselt szakaszát is jelenti. Azokat a DNS szakaszokat *exonoknak* nevezik, amelyek az érett mRNS-eket alkotják.

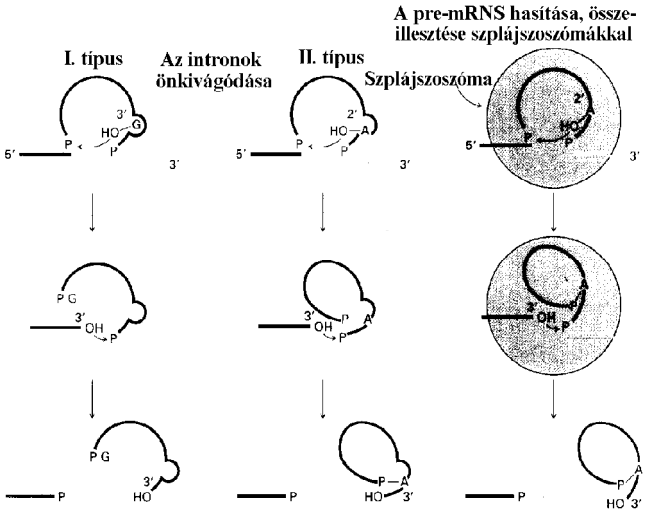


9.13. ábra. Az intron szekvenciák kihurkolódnak az RNS/DNS hibridekből.

Tudott, hogy ugyanabból a pre-mRNS-ből különféle mRNS-ek képződhetnek az egyedfejlődés különböző szakaszaiban a különféle sejttípusokban. Az intron/exon "használat" a kódoló DNS "gazdaságos" felhasználását jelenti: egy génnel többféle funkció is kódolható. Az intronok a genetikai flexibilitás egyfajta lehetőségét is jelentik: az intronok exonokká válhatnak az evolúció során. Ismerünk olyan DNS szekvenciákat, amelyek bizonyos esetekben intronok, másokban exonok. Sőt, vannak olyan gének, amelyek egy másik gén intronjában vannak.

A pre-mRNS molekulák szplájszingja kétféle módon történik.

(1) A legtöbb pre-mRNS érése a *szplájszoszómák* közreműködésével történik. A szplájszoszómákat kis sejtmagi, ún. snRNS molekulák, valamint a hozzájuk kapcsolódó speciális fehérjék alkotják. Az snRNS-ekből nyolcat ismerünk (U1 - U8). A szplájszoszómák felismerik a pre-mRNS-ekben az ún. hasítási helyeket (valójában jellegzetes szekvenciákat), elhasítják a pre-mRNS-eket, kivágják az intron szekvenciákat, majd ligálják az exonoknak megfelelő részeket (9.14. ábra).



9.14. ábra. Az intron szekvenciák kivágása pre-mRNS-ből önszpájszinggal és a szplájszoszómával.

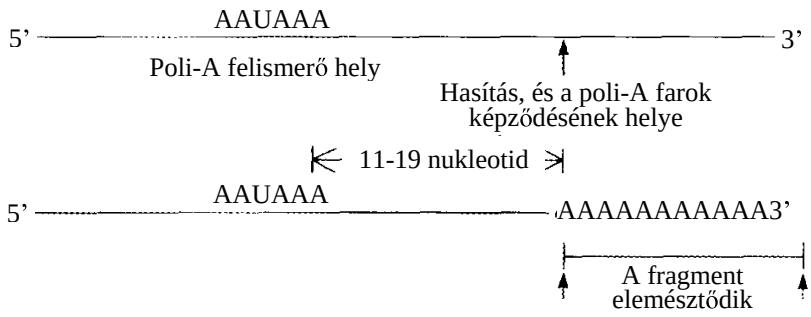
(Zárójelben említjük meg, hogy a szplájszoszómák megismerésében a *Lupus erythematosus* - farkasfoltosság - autoimmun betegség volt a kutatók segítségére: a farkasfoltos betegek némelyikének a vére olyan ellenanyagot tartalmaz, amely a szplájszoszómák valamely komponense ellen képződött. Az ellenanyagok tették lehetővé a szplájszoszómák izolálását, tanulmányozását.)

(2) Vannak olyan pre-mRNS-ek, amelyek önszplájszinggal távolítják el magukból az intronokat (9.14. ábra). A pre-mRNS-nek olyan katalitikus aktivitása van, amely éppen az intron kivágását, az exonok ligálását katalizálja.

3. A poly-A farok

Az állatok sejtjeiben a legtöbb mRNS féleségnek *poli-A farka* van az mRNS 3' végén. A poli-A farok 100-250 adenin nukleotidból áll, és templát nélkül képződik. A poli-A farok képződésének mechanizmusa a következő

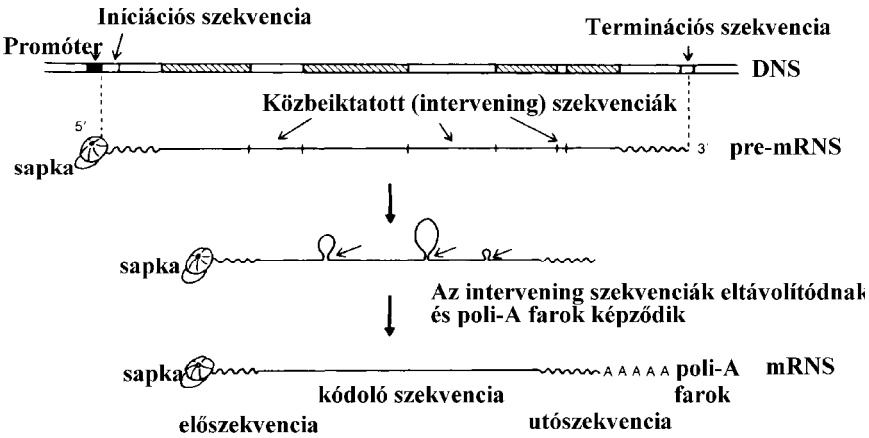
(9.15. ábra). Egy enzim az AAUAAA ún. poli-A felismerési helytől 10-30 nukleotiddal lentebb (a 3' irányban) elvágja a pre-mRNS-t. Egy másik enzim 100-250 hosszú poli-A farkat készít. Nagyon valószínű, hogy a poli-A farok az mRNS élettartalmát szabályozza: minél többször gördülnek végig a riboszómák egy mRNS-en, annál rövidebb lesz a poli-A farka.



9.15. ábra. A poli-A farok képződésének mechanizmusa eukariota mRNS-ek 3' végén.

A pre-mRNS érése kb. 30 percet vesz igénybe, természetesen a sejtmagon belül. Talán meglepő, de a pre-mRNS molekuláknak csak kis hányada érik meg, és az érett mRNS molekuláknak csak kb. 5%-a exportálódik a citoplazmába, vesz részt a transzlációban. A többi sohasem hagyja el a sejtmagot, hanem szétesik, elemésztődik. Az mRNS molekulák aktív transzporttal exportálódnak a citoplazmába. Az eukariotákkal ellentétben a prokariotákban az mRNS-ek transzlációja már akkor elkezdődik, amikor szintézisük még be sem fejeződött.

Végeredményben egy mRNS molekulának három fontos része van: az előszekvencia, a nyitott leolvasási keret, valamint az utószekvencia (9.16. ábra). Az mRNS molekulák alapján szintetizálódnak a fehérjék a transzláció folyamatában, a citoplazmában.



9.16. ábra. Egy tipikus eukariota mRNS képződése és szerkezete.

ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS-ben kódolt genetikai információ a fehérjék szintjén nyilvánul meg. A fehérjék szintézise kétlépcsős „erősítési" folyamatban történik. Az első lépcsőben, a transzkripció során a sejtenkénti általában egy, két (ritkábban néhány) génről sok mRNS molekula képződik. Amint azt a jelen fejezet bemutatja. Minden egyes mRNS alapján nagyon sok fehérje molekula képződhet. Az mRNS szintézisét speciális fehérje molekulák komplexe, az RNS polimeráz végzi. Az mRNS molekulák szintéziséhez specifikus DNS szekvenciákra, promóterekre van szükség. A promóterek nem csak a transzkripció kezdetét jelölik, hanem szabályozzák a transzkripció, és végeredményben a gének expressziójának mértékét is. A DNS tehát nemcsak azt kódolja, hogy milyen fehérje molekula- féleségek képződjenek, hanem azt is, hogy belőlük mely sejttípusban, az egyedfejlődés mely szakaszában, és mennyi.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi., Introduction to Genetic Analysis, 283-308, 2012.
2. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 290-298, 2011.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 118-126, 273-286, 2007.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 229-243, 2004.
5. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 346-380, 1989.

10. TRANSZLÁCIÓ ÉS A GENETIKAI KÓD

A transzláció jellemzői. A riboszómák szerkezete. A tRNS szerkezete és funkciója. A fehérjeszintézis lépései. A genetikai kód természete.

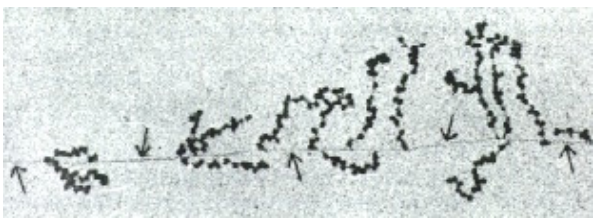
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, 2011. őszén.

BEVEZETÉS

Bár az élőlények öröklődő jellegzetességeinek alapja a DNS-ben kódolt genetikai információ, a fehérjék azok a molekulák, amelyek ellátják a biológiai funkciót: enzimek, szerkezeti elemek, jeltovábbítók, vagy a kórokozók ellen védenek. A fehérje molekulák szintézisének azok az mRNS molekulák az alapjai, amelyek a transzkripció folyamán képződnek, amelyekről a 8. fejezet szólt. Hogyan képződnek a fehérje molekulák a transzláció során? Mi a fehérje szintézis mechanizmusa? Hogyan határozzák meg az mRNS-ek nukleotidjai, hogy mely aminosavak, és milyen sorrendben épüljenek be a képződő fehérje molekulákba? Mik a genetikai kód jellemzői? A 11. fejezet az itt felvetett kérdésekre ad választ.

Transzláció: folyamat, amely során az mRNS-ben kódolt genetikai információ alapján fehérje molekulák képződnek.

Amint azt elektronmikroszkópos felvételek mutatták, a baktérium sejtekben a transzkripció során képződő mRNS molekulák már akkor kapcsolatba kerülnek a riboszómákkal, amikor az mRNS-ek szintézise még folyamatban van (10.1. ábra). Minthogy az mRNS szintézise az 5' → 3' irányban történik, az mRNS transzlációjának iránya is 5'→ 3'. Az ugyanannak az mRNS molekulának a transzlációját végző riboszómákat szokás *poliszómának* nevezni.



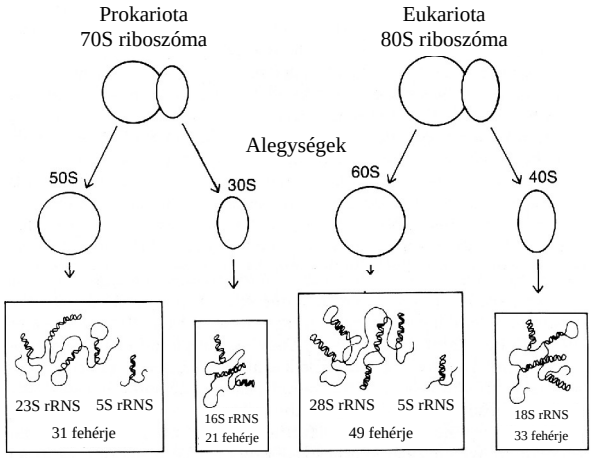
10.1. ábra. Prokariotákban a riboszómák már akkor elkezdik az mRNS transzlációját, amikor annak szintézise még folyamatban van. A nyilak a DNS-t jelölik.

Eukariotákban az érett mRNS molekulák egy része a sejtmagból a citoplazmába exportálódik, ahol a riboszómákkal kapcsolatot teremtve kezdődhet a transzláció. Vagy azokon a riboszómákon, amelyek a durva endoplazmatikus retikulum (ER) külső felszínéhez kapcsolódnak, vagy azokon, amelyek szabadon helyezkednek el a citoplazmában. Az ER-hez kapcsolódó riboszómákon képződnek a membránfehérjék, az ER-ben, a Golgi készülékben és a lizoszómákban funkcionáló fehérjék, valamint azok, amelyek a sejten kívülre kerülnek. A citoplazmában képződő fehérjék némelyike a sejtmagba importálódik, mások a citoplazmában maradnak, és pl. a sejtvázat alkotják, ismét mások a mitokondriumokba, a kloroplasztokba, vagy a peroxiszómákba jutnak.

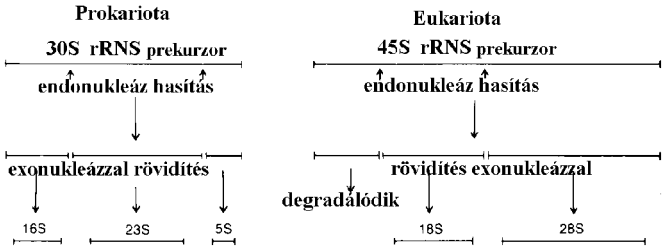
A riboszómák

A riboszómák riboszómális-RNS (rRNS) molekulákból és riboszómális fehérjékből állnak. Egy nagy és egy kis alegység alkotja őket (10.2. ábra). Prokariotákban a kis alegység egy 16S (eukariotákban 18S) rRNS-t valamint 21 (emlősökben 33) különféle fehérje molekulát tartalmaz. A nagy alegység egy-egy 5S és egy 23S rRNS-t (emlősökben egy-egy 5S, 5,8S és 28S) valamint 31 (emlősökben 49) különféle fehérje molekulát tartalmaz (10.2. ábra). Az 5S, a 16S, a 18S, a 23S és a 28S rRNS molekulákat rendre 85, kb. 1500, 2000, 3000 és 5000 nukleotid alkotja.

A riboszómák a sejtmagvacská(k)ban képződnek. Emberben az rRNS-eket kódoló gének a 13., 14., 15., 21. és a 22. kromoszómák szatellit részében vannak, tandem elrendeződésben. Az ún. riboszómális génekről (mind a pro-, mind az eukariotákban) első lépésben prekurzor (elő-) rRNS-ek képződnek (10.3. ábra). A prekurzor rRNS-ek érése nyomán képződnek azok a különféle rRNS-ek, amelyek a riboszómális fehérjékkel kapcsolódnak. A riboszóma alegységek a sejtmagban inaktívak. Aktivitásukat azután nyerik el, miután a sejtmagpórus-komplexeken keresztül a citoplazmába exportálódnak, ahol néhány további riboszómális fehérjével egészülnek ki.

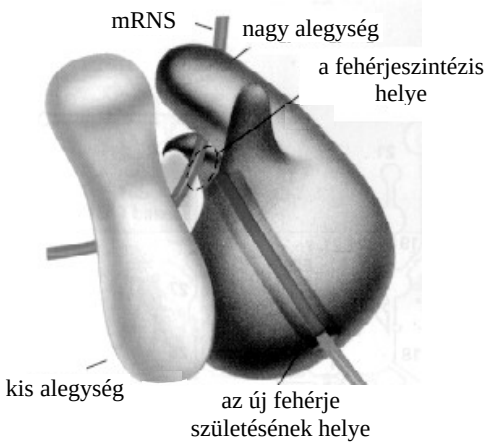


10.2. ábra. A riboszómákat rRNS és riboszómális fehérje molekulák alkotják.



10.3. ábra. Az rRNS-ek képződésének mechanizmusa.

A riboszóma alegységek a transzláció során kapcsolódnak az mRNS-el (10.4. ábra). Az újonnan képződő fehérje molekula pedig a nagy alegység belsejében levő csövön át „születik”.



10.4. ábra. A két alegységből álló riboszóma végzi az mRNS-ben kódolt genetikai információ transzlációját.

A genetikai kód természete

A genetikai kód természetét a lent felsorolt kérdések megválaszolása révén ismerhetjük meg.

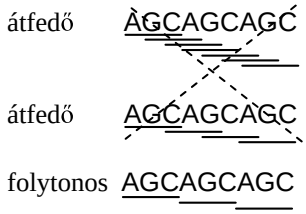
1. Valóban az 5’ vég közelében kezdődik az mRNS-ek transzlációja?

Az ún. *in vitro* transzlációs rendszerek minden olyan komponenst tartalmaznak, amelyek az mRNS molekulák (akár a kémcsőben szintetizáltak) transzlációjához szükségesek. Abban a kísérletben, amelyben egy *in vitro* transzlációs rendszerbe olyan mRNS-t tettek, amely csupa A-ból állt és csak az 5’ vég közelében volt egy C nukleotid (5’AAAAACAAAAAAAAAAAA~~~~~~AA3’), az mRNS-ről olyan polipeptid képződött, amely egy kivételével lizin aminosavakból állt. Az egyetlen kivétel egy aszparagin volt, a polipeptid N-terminálisa közelében (N-Lys-Asn-Lys-Lys-~~~~Lys-C), jelezve, hogy az mRNS transzlációja valóban az mRNS 5’ vége közelében, a fehérje molekulák szintézise pedig az N-terminálissal kezdődik. Ha a C nukleotid az mRNS 3’ vége közelében volt (5’AA~~~~~~~AAAAAAAAAAAACAAAAA3’), az aszparagin a polipeptid C terminálisa közelébe épült be.

2. Hány betűből áll a genetikai kód?

Minthogy a fehérje molekulák képzésében húsz különféle aminosav vesz részt, és minthogy az mRNS-t csak négyféle nukleotid alkotja nyilvánvaló, hogy a genetikai kód nem lehet egybetűs. Kétbetűs sem, mert a négy nukleotidból kettőt-kettőt választva a lehetőségek száma $4^2 = 16$, ami kevesebb, mint 20. Ha három betű alkotná a genetikai kódot, úgy 64 ($= 4^3$) lehetőség adódik. A 64 pedig bőségesen elegendő. Lehet, hogy a genetikai kód hárombetűs?

Abban a kísérletben, amelyben H. G. Khorana és munkatársai egy *in vitro* transzlációs rendszerbe 5’AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC3’, kémcsőben szintetizált mRNS-t tettek, az mRNS alapján háromféle oligopeptid képződött. Az egyiket csupa szerin, a másik csupa alanin, a harmadikat csupa glutamin aminosavak alkották. A háromféle oligopeptid képződése azt mutatja, hogy (1) a mesterséges mRNS transzlációja bármely ponton elkezdődhet. (2) A polipeptid szintézis a kiindulás helyétől kezdődően folyamatosan halad, nem hagy ki nukleotidokat. (3) A genetikai kód nem átfedő. Az mRNS-ben kódolt A*G*C*A*G*C*A*G*C információt a riboszómák nem A*G*C.*G*C*A*C*A*G, és nem is A*G*C*C*A*G*G*C*A sorrendben olvassák (10.5. ábra). (4) Egy mRNS kodon három betűből áll, vagy esetleg a három többszöröséből.



10.5. ábra. A genetikai kód olvasása nem átfedően, hanem folytonosan, és szünetmentesen történik. Egy vízszintes vonal három olyan nukleotidot jelöl, amelyek információ tartalmát a riboszóma egy lépésben leolvassa.

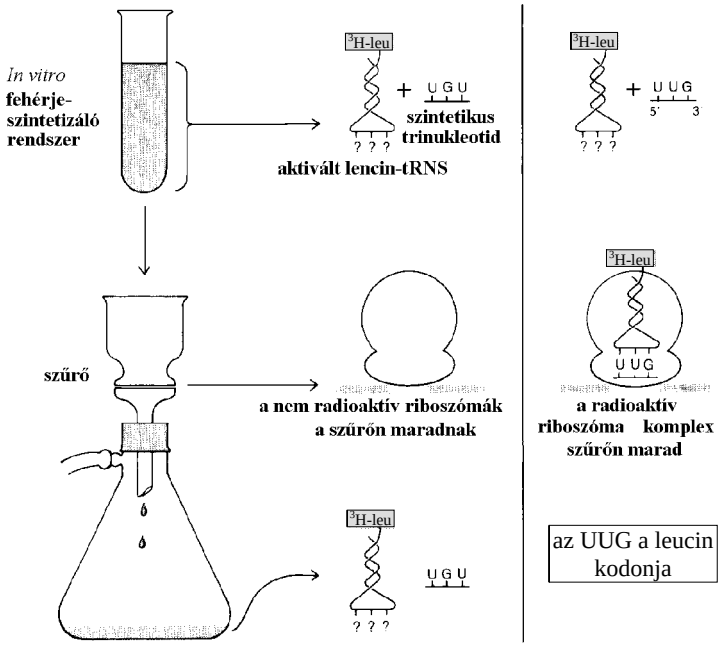
Az, hogy egy kodon három betűből áll, a következőkből derült ki. Az α-hemoglobin mRNS-t 650 nukleotid alkotja, az α-hemoglobin fehérjét pedig 141 aminosav. Ha a genetikai kód három betűből állna, a 141 aminosav kódolásához 423 nukleotidra lenne szükség, és maradna 227 az mRNS elő-, valamint utószekvenciáira. Ha a genetikai kód hat, vagy kilenc betűs lenne, a 650 nukleotidból álló α-hemoglobin mRNS-ben nem lenne annyi nukleotid, amely a 141 aminosav kódolásához szükséges. A genetikai kód tehát hárombetűs.

3. Mi a hárombetűs kodonok jelentése?

Az előző kísérlet alapján nem lehet eldönteni, hogy a szerin kódja AGC, GCA vagy CAG. Azokból a kísérletekben, amelyekben a szintetizált mRNS csupa A-ból állt, olyan polipeptid képződött, amelyben csak lizinek voltak, jelezve, hogy a lizin (legalábbis egyik) *kodonja* AAA. (Az mRNS bázishármasait nevezik *kodon*oknak. A DNS néma szálának bázishármasait *kód*nak.) Az UUU a fenilalanint, a CCC a prolint kódolja. (A poli-G mRNS összegabalyodik, a benne levő információt a riboszómák nem tudják elolvasni.)

A genetikai kód megfejtésére Akai Kaji és Hideko Kaji (1963) dolgozott ki módszert, amely alapján Marschall Nirenberg és Philip Leder fejtette meg a genetikai kódot 1964-ben. A módszer lényege a következő (10.6. ábra). Állítsunk össze egy *in vitro* fehérje szintetizáló rendszert. Tartalmazza a rendszer az összes olyan komponenst, amely a

fehérje molekulák szintézishez szükséges. Tegyünk a rendszerbe pl. radioaktív ^{3}H-al jelzett ún. aktivált leucin aminosavat. (Aktivált aminosav = a tRNS-hez kovalensen kapcsolt olyan aminosav, amely közvetlenül beépíthető a szintetizálódó fehérjékbe.) Adjunk a rendszerhez pl. UGU szintetikus trinukleotid molekulákat. (UGU a 64 különféle legrövidebb mRNS egyike; 10.6. ábra). Ha az UGU nem a leucin kodonja, úgy nem alakulnak ki olyan komplexek, amelyet egyenként az UGU szintetikus trinukleotid, a riboszóma két alegysége és a ^{3}H-leu-tRNS alkot. Vagyis a ^{3}H-leu-tRNS molekulák egy kislyukú szűrőn átszűrhetők, elválaszthatók a riboszómáktól. Ha viszont a rendszerbe olyan trinukleotidot teszünk, amely a leucin egyik lehetséges kodonja (a 10.6. ábrán UUG-t), olyan komplexek alakulnak ki, amelyek egyenként az UUG mRNS-ből, a riboszóma két alegységéből, valamint a ^{3}H-leu-tRNS-ből állnak. Vagyis a ^{3}H-leu-tRNS nem választható el a riboszómáktól, és a szűrőn marad. A ^{3}H-leu-tRNS kötődése azt jelzi, hogy az UUG a leucin (egyik) kodonja. Az itt bemutatott módszer volt alkalmas a genetikai kód megfejtésére.



10.6. ábra. Módszer a genetikai kód jelentésének megfejtésére.

A genetikai kódszótár és jellemzői

Az mRNS kodonok jelentését a 10.1. táblázat összegzi. Az ún. kódszótár tanulmányozása alapján a következő fontosabb megállapításokat tehetjük.

1. Egy aminosavat több kodon is kódolhat. Szakszerű kifejezéssel: a genetikai kód degenerált. Ugyanakkor egy kodon csak egyfajta aminosavat kódol.
2. A transzláció elkezdődését (START) az AUG iniciációs kodon jelenti. Az AUG kodon egyben a metionin kodonja is. A fehérjék szintézise tehát metioninnal kezdődik. (A metionin aztán vagy megmarad a fehérje molekulák N-terminális végén, vagy eltávolíttatik onnan.)
3. A 64 mRNS kodon közül az UAG, az UAA és az UGA kodonok jelentése STOP, és transzláció befejeződését kódolják. [Az UAG, az UAA és az UGA STOP kodonokat szokás rendre borostyánkő (amber), okker (ochre) és opál (opal) kodonoknak is nevezni. A STOP kodonokat régebben terminációs és értelmetlen (nonsense) kodonoknak is nevezték.]
4. A genetikai kód „lötyögős”: gyakori, hogy a kodonok három betűje közül csak az első kettő fontos, a harmadik lényegtelen. Például a valin aminosav négy kodonja a következő: GUU, GUC, GUA és GUG (10.1. táblázat). A négy kodon első két (GU) betűje azonos, a harmadik pedig bármelyik lehet a négy közül. A négy kodont ugyanaz a tRNS^{Val} ismeri fel.

10.1. táblázat. A genetikai kódszótár: mRNS kodonok és jelentésük. Az aminosavak három, valamint egybetűs jelei.

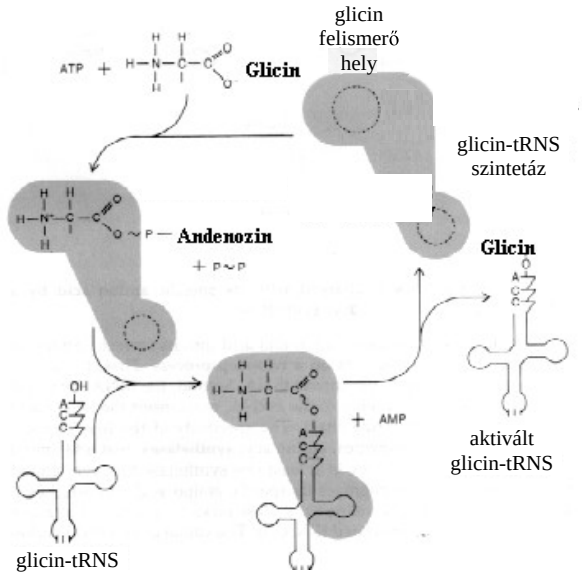
Első nukleotid	Második nukleotid U	C	A	G	Harmadik nukleotid
U	Phe F	Ser S	Tyr Y	Cys C	**U**
	Phe F	Ser S	Tyr Y	Cys C	**C**
	Leu L	Ser S	**STOP**	**STOP**	**A**
	Leu L	Ser S	**STOP**	Trp W	**G**
C	Leu L	Pro P	His H	Arg R	**U**
	Leu L	Pro P	His H	Arg R	**C**
	Leu L	Pro P	Gln Q	Arg R	**A**
	Leu L	Pro P	Gln Q	Arg R	**G**
A	Ile I	Thr T	Asn N	Ser S	**U**
	Ile I	Thr T	Asn N	Ser S	**C**
	Ile I	Thr T	Lys K	Arg R	**A**
	Met^1 M	Thr T	Lys K	Arg R	**G**
G	Val V	Ala A	Asp D	Gly G	**U**
	Val V	Ala A	Asp D	Gly G	**C**
	Val V	Ala A	Glu E	Gly G	**A**
	Val V	Ala A	Glu E	Gly G	**G**

Met^1 = iniciációs kodon; STOP = a transzláció terminációja. A színkódok: erősen hidrofób, gyengén hidrofób, erősen hidrofil, gyengén hidrofil.

Az aminosavak aktiválása

A riboszómák a fehérje molekulák szintéziséhez aktivált aminosavakat használnak. Az alkalmas tRNS-hez kapcsolt, ún. aktivált (a fehérje szintézisre előkészített) aminosavak tRNS molekulákhoz az ún. aminosav aktiválás során kötődnek (10.7. ábra). (Az aminosav aktiválást szokás a tRNS feltöltésének is nevezni.) Az aminosav aktiválás fontosabb lépései a következők.

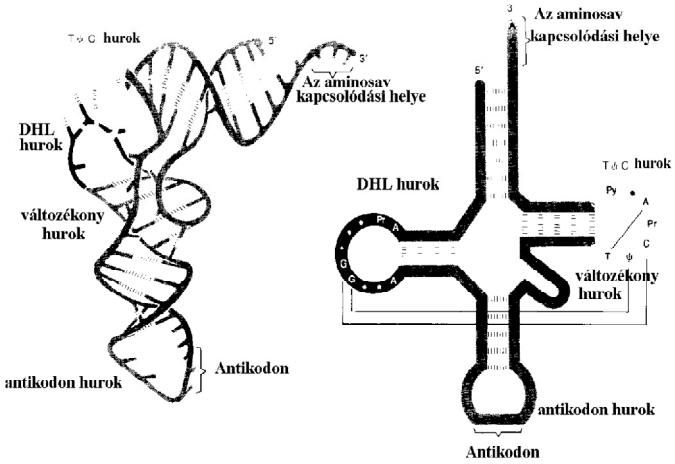
Az első lépésben az aminosavra specifikus amino-acil-szintetáz enzim kovalensen köt AMP-t az aminosavakhoz, azokat energiával tölti fel. Az AMP ATP-ből származik. A következő lépésben az AMP-hez kapcsolt aminosav kötődik a neki megfelelő tRNS 3’ végéhez. (A kötés az aminosav -COOH és a tRNS 3’ végen levő ribóz -OH csoportja között képződik; 10.7. ábra). Az aktivált aminosavak végül leválnak az amino-acil-szintetáz enzimről, hogy majdan a fehérjeszintézis résztvevői legyenek.



10.7. ábra. Az aminosav aktiválás lépései.

A tRNS molekulák

A tRNS-ek olyan kis, kb. 75 nukelotidból álló adapter természetű RNS molekulák, amelyek aminosavakat szállítanak a fehérje szintézishez. Szerkezetük 1965. óta ismert (10.8. ábra). Az aminosavak a tRNS-ek 3' végéhez kapcsolódnak. A 3' véget olyan 5'CCA3' alkotja, amely (mint a poli-A farok) nincs kódolva a DNS-ben, amit egy enzim épít ki a tRNS-ek 3' végén. A tRNS-ek némely bázisa a specifikus funkció céljából kémiailag módosul (10.8. ábra). A tRNS-ek komplementer részei párosodnak, és kettősszálú részeket képeznek. Azok az egyszálú tRNS szakaszok, amelyeknek nincs komplementere, hurkokat alkotnak.



10.8. ábra. A tRNS szerkezete.

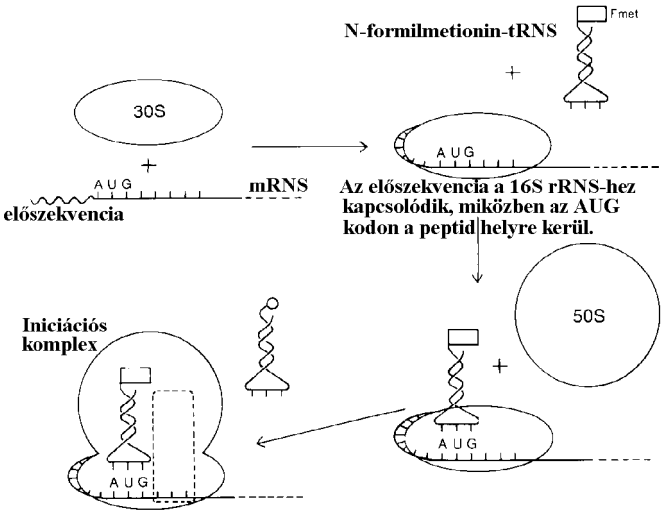
A tRNS-ben három huroknak van kitüntetett szerepe. (1) Az antikodon hurok, amelynek része a tRNS *antikodon*, az mRNS kodonnal párosodik a fehérjeszintézis folyamán. (Természetesen az antiparalel illeszkedési elv szerint.) (2) A DHU (dihidroxi-uridin) hurok az amino-acil-szintetáz enzimmel teremt kapcsolatot az aminosav aktiválás során. (3) A TΨC hurok kapcsolódik a riboszómához a fehérje szintézis folyamán.

A genetikai kód degeneráltságának ismeretében nem meglepő, hogy az élőlényekben nincs 61 féle tRNS. Csak kb. 30-40, a különféle fajokban. A tRNS-ek képződését az ún. tRNS gének kódolják. A tRNS gének is tandem elrendeződésűek. Róluk, mint az rRNS gének esetében, egy tRNS prekurzor (elő-) tRNS képződik, amelyből egy érési folyamat során képződnek a funkcionális tRNS molekulák.

A fehérjeszintézis lépései

1. Iniciáció

A fehérjeszintézis első lépéseként az mRNS előszekvenciájának egy szakasza párosodik a kisebb (prokariotákban 30S, eukariotákban 40S; 10.2. ábra) alegység rRNS-évl (prokariotákban 16S, eukariotákban 18S). Eukariotákban a CAP-nak is szerepe van az mRNS és a kisebbik riboszóma alegység kapcsolódásában. A két RNS molekula párosodása az AUG (START, metionin) kodont a riboszóma ún. peptid helyére illeszti (10.9. ábra). A metionin-tRNS antikodonja antiparalel állásban illeszkedik az mRNS kodonjához.

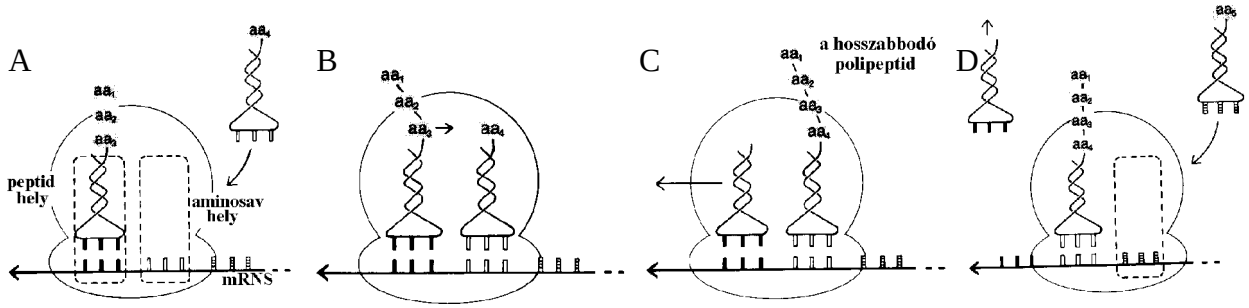


10.9. ábra. A fehérjeszintézis elkezdődése.

2. Elongáció

A következő lépésben az mRNS + kis riboszóma alegységhez csatlakozik a nagy riboszóma alegység, és kialakul az ún. iniciációs komplex. A fehérjeszintézis ún. elongációs szakaszában az aminosavak egymás után épülnek be a fehérje láncba peptid kötések képződése közben. A fehérjeszintézis lépései a következők (10.10. ábra). A riboszóma + mRNS komplexben két hely van: (1) a peptid hely, ahova a tRNS illeszkedik, végén a növekvő polipeptiddel (10.10. ábra). (2) Az aminosav helyre az a tRNS illeszkedik, amely a következő beépülő aminosavat hordozza (10.10. ábra). A tRNS beilleszkedéséhez egy ún. elongációs faktorra és GTP-re van szükség. A nagy riboszóma alegység egyik fehérjéje (a peptidil-transzferáz) peptid kötést alakít ki az aminosavak között (10.10. ábra). Közben a polipeptid a peptid helyről az aminosav helyre kerül, az „üres" tRNS pedig kiválik a peptid helyről. Az aminosav helyen levő tRNS akkor jut a peptid

helyre, amikor az mRNS a riboszóma mentén egy lépéssel (három nukleotiddal) elmozdul (10.10. ábra). A folyamat az mRNS első STOP kodonjának eléréséig folytatódik, olykor sok ezerszer. A fehérjeszintézis szintézis sebessége 2 aminosav/másodperc.

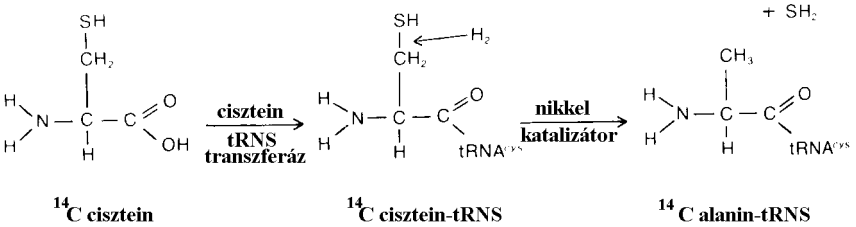


10.10. ábra. A fehérje szintézis lépései.
(aa = aminosav)

Azt, hogy valamely fehérje molekulában milyen aminosavak követik egymást (hogy mi a fehérje elsődleges szerkezete) az mRNS kodonok sorrendje, lényegében pedig az határozza meg, hogy a DNS-ben mi a bázispárok sorrendje.

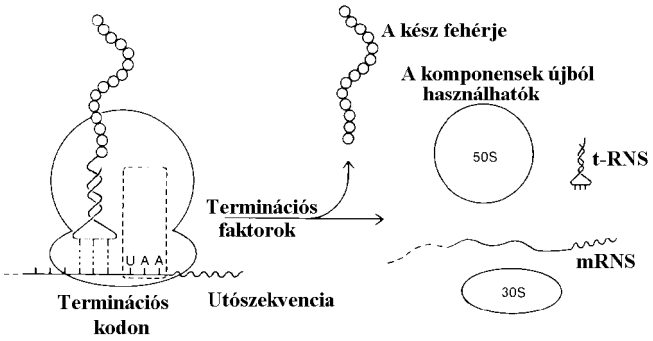
Egyes fehérjékben több metionin is van. Vajon mindegyik metionin mRNS kodonnál elkezdődik a fehérjeszintézis? Vagy csak az elsőnél? És ha csak az elsőnél, hogyan tesznek a riboszómák különbséget az első és a többi metionin kodon között? A fehérje szintézis iniciációs mechanizmusa egy speciális metionin-tRNS-t (metionin-tRNS^{init}), valamint egy iniciációs faktort használ. (A kétféle metionin-tRNS csak a TΨC hurokban különbözik.)

Vajon mitől függ az, hogy milyen aminosav épül be a képződő fehérjébe? Attól, hogy milyen aminosavat hordoz a tRNS? Vagy a tRNS antikodonjától? Egy kísérletben G. von Ehrenstein, B. Weisblum és S. Benzer ^{14}C-el jelzett aktivált cisztein-tRNS-t katalizátor és H_2 jelenlétében alaninná alakított (10.11. ábra). Majd azt vizsgálták, hogy vajon az alanint hordozó cisztein-tRNS az α-hemoglobin cisztein vagy alanin helyeire épült be az *in vitro* fehérje szintetizáló rendszerben. Azt tapasztalták, hogy az α-hemoglobinban a cisztein helyeken alaninok voltak, vagyis nem a tRNS-hez kapcsolódó aminosav határozza meg, hogy melyik aminosav épül be a fehérjébe, hanem a tRNS antikodonja.



10.11. ábra. A cisztein tRNS-hez kötött cisztein átalakítása alaninná.

3. A transzláció terminációja.
A fehérje szintézis akkor fejeződik be, amikor a riboszóma aminosav helyére valamely STOP mRNS kodon kerül. Minthogy nincsenek a STOP kodonoknak megfelelő tRNS-ek, megszakad az elongáció, a tRNS-hez kapcsolódó fehérje leválik a riboszómáról, szintézise befejeződik (10.12. ábra). A transzláció terminációjához speciális, ún. terminációs faktorok is szükségesek. Miután a tRNS leválik a fehérjéről, a fehérje vagy azonnal funkcióképes, vagy csak bizonyos módosító lépések után nyeri el funkcióját.

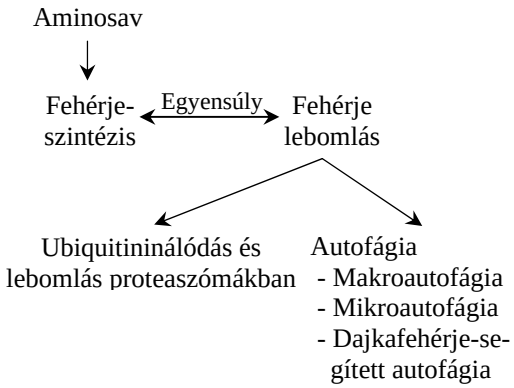


10.12. ábra. A transzláció befejeződésének mechanizmusa.

A genetikai kód és a fehérje szintézis mechanizmusa is univerzális, jelezve, hogy a transzláció evolúciósan nagyon ősi, erősen konzervált folyamat. (A mitokondriális-DNS-re jellemző genetikai kód különlegességeire, amelyek látszólag ellentmondanak a genetikai kód univerzális jellegének, valamint az ún. editing mechanizmusra itt nem térünk ki. Az érdeklődők a szakkönyvekben olvashatnak a témakörről.)

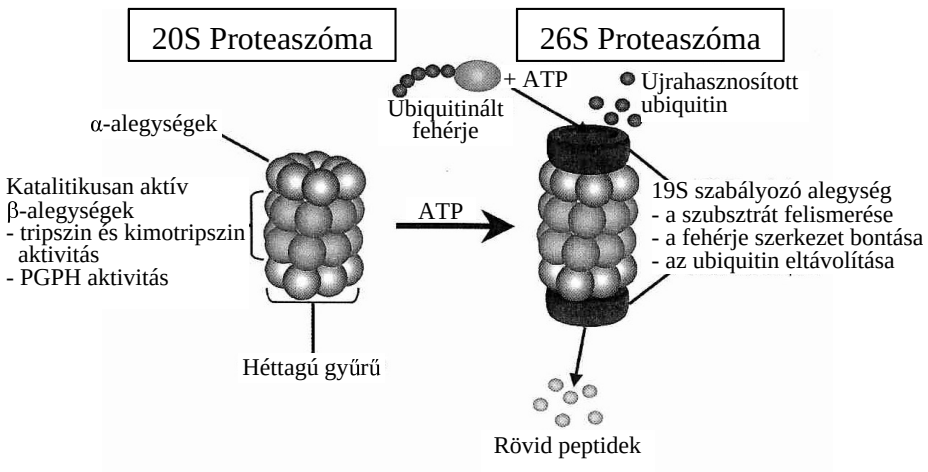
A fehérjék lebomlása

A fehérjék folyamatosan képződnek, és bomlanak le. A fehérjék lebomlása két utat követ: vagy (1) ubiquitinálódás után az ún. proteaszómákban bomlanak le, vagy (2) az autofágia valamely „módszerével” (10.12. ábra).



10.12. ábra. A fehérjék életének mozzanatai.

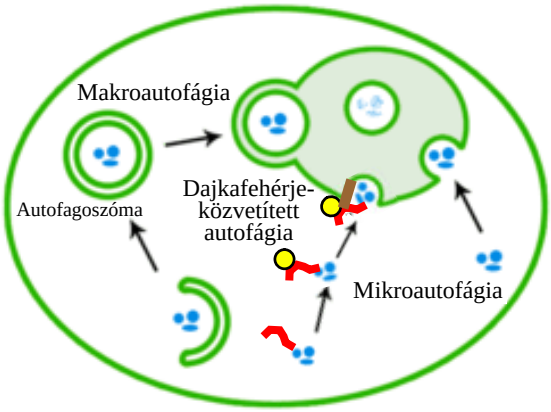
Az ubiquitin olyan, mindössze 76 aminosavból álló, evolúciósan erősen konzervált kis fehérje féleség, amely része minden eukariota sejtnek, amely más fehérje molekulákkal kapcsolódva, azokat megjelöli, a proteaszómákhoz „irányítja”, hogy aztán ott lebomoljanak, majd alkotóik újrahasznosuljanak. (Az ember és az élesztő ubiquitinjeiben az aminosvak sorrendje 96%-ban azonos.) A fehérjék ubiquitinizációjának folyamata a következő fontosabb lépésekből áll. Az ubiquitin - egy ún. ubiquitin-aktiváló-enzimmel - aktiválódik: képessé válik arra, hogy fehérje molekulákhoz kapcsolódjon. Az ubiquitin, lizin oldalláncokon keresztül, fehérje molekulához kapcsolódik. Előbb egy, majd az elsőhöz további ubiquitinek kapcsolódnak: a fehérje molekula poliubiquitinálódik. Ha legalább négy ubiquitin kapcsolódik a fehérjéhez, úgy azt felismeri a 26S proteaszóma, a fehérje molekulát lebontó sejtorganellum (10.13. ábra).



10.13. ábra. A proteaszóma szerkezete.

A proteaszómák olyan, meglehetősen nagy, hordószerű szerkezetek, amelyekben két kamra van. A fehérjék bontása, 3-24 aminosavból álló peptidekre ezekben történik. A peptidek aztán tovább bomlanak, hogy a belőlük képződő aminosavak ismét fehérjék alkotóivá válhassanak. Ám még mielőtt a fehérjék degradálódnának, leválnak róluk az ubiquitin molekulák, hogy aztán elláthassák jelölő szerepüket (10.13. ábra).

A fehérjék lebontásának ubiquitin-proteaszóma útja olyan folyamatok része, mint a sejtciklus-szabályozás, a génexpresszió-szabályozás, vagy védekezés az oxidatív stressz ellen.



10.14. ábra. Az autofágia típusai.

Az autofágia a sejt saját anyagának lebontását jelenti lizoszómák közreműködésével. Az autofágia olyan pontosan szabályozott folyamat, amelynek a sejtek növekedésében, az egyedfejlődésben, a programozott sejthalálban, van szerepe, fenntartva az egyensúlyt a szintézis és a lebontás között, miközben biztosítja a sejt anyagainak újrahasznosítását. Az a folyamat, amely tápanyag ellátottság szűkében biztosítja a sejt anyagainak mozgósítását, újraelosztását.

Bár az autofágiának különféle típusai vannak, az közös bennük, hogy a lizoszómák közreműködésével bontják a sejt alkotóit. A legismertebb mechanizmus a makroautofágia, amely során a sejt valamely része körül kettős membrán képződik, elkülönítve azt a citoplazma többi részétől. Az így kialakult ún. autofagoszóma lizoszómával egyesül, tartalma lebomlik (10.14. ábra). Az itt említett mechanizmus, egyes vélekedések szerint, a neurodegeneráció, a daganatképződés és sejten belüli fertőzések elleni védelem fontos eszköze. Az ún. mikroautofágia során a lizoszómák közvetlenül kebelezik be a citoplazma kis részeit. A dajkafehérje-közvetített autofágia során azok a fehérje féleségek

bontódnak el, amelyeknek része egy olyan ún. szignál peptid, amelyet egy 70 kDa-nyi dajkafehérje ismer fel. A fehérje/dajkafehérje komplex a lizoszóma membránjához jutva ott egy receptorral kapcsolódik. A lebontandó fehérje elveszti szerkezetét, átjut a membránon, és a lizoszóma belsejében lebomlik.

BEFEJEZÉS

A sejtekben jelenlevő néhány DNS molekula funkciója a transzkripció és a transzláció révén olyan fehérje molekulák képződését eredményezi, amelyek ellátják a rájuk jellemző funkciókat, lehetővé téve az élőlények életét, alkalmazkodását a gyakorta változó környezeti feltételekhez. A fehérje molekulák természetét az őket alkotó aminosavak sorrendje, és végeredményben az határozza meg, hogy milyen sorrendben követik egymást a bázispárok a DNS-ben. A fehérje molekulák szintézisük után módosulhatnak. A fehérje molekulák nem örökéletűek. Jól ismert mechanizmusok bontják le őket, hogy alkotóik hasznosuljanak.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 260-272, 2011.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 127-138, 2011.
3. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Introduction to Genetic Analysis, 319-349, 2008.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 224-234. 1998.
5. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 346-380, 19811.

11. MUTÁCIÓK, MUTAGÉNEK. REVERZIÓ ÉS REPARÁCIÓ.

Spontán és indukált mutációk. A mutációk típusai és következményei. Reparáció. Reverzió és szuppresszió. Kromoszóma mutációk és következményeik. Mutagének/karcinogének. Ames teszt.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. őszén.

BEVEZETÉS

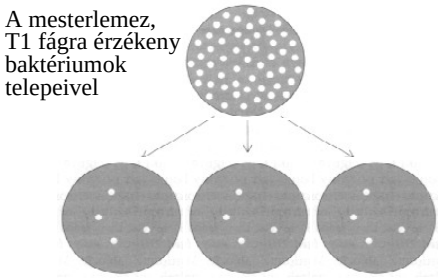
A folytonos változás képessége az örökítő anyag fontos jellemzője. A mutációk - az örökítő anyag hirtelen bekövetkező és öröklődő változásai - képezik az élőlények változatosságának és végeredményben az evolúciónak az alapját. Mutációk spontán is bekövetkeznek, ám a környezeti tényezők is indukálnak mutációkat. Minthogy minden mutagén karcinogén, a környezetszennyező mutagének súlyos egészségügyi problémát jelentenek. A mutagéneket/karcinogéneket mutagén tesztekkel mutatják ki. A reparációs rendszerek ugyan a DNS sok változását kijavítják, de nem mindegyiket. A mutációk során nemcsak az örökítő anyag *minősége*, hanem a *mennyisége* is változhat kromoszóma törések következményeként, valamint kromoszóma vesztés és/vagy nondiszjunkció nyomán. A mutációk következményei legtöbbször hátrányosan befolyásolják a sejtek, élőlények életét. A 11. fejezet a mutációk típusait és következményeit tekinti át, és csak érintőlegesen a mutációk jelentőségét életünkben és az evolúcióban.

A SPONTÁN MUTÁCIÓK

Vajon a sztreptomicin indukálja a sztreptomicin-rezisztenciát? Vagy talán a rezisztencia spontán eredetű? Vajon a fágokkal szembeni rezisztencia fágfertőzés nyomán képződik? Vagy spontán eredetű?

Joshua és Esther Lederberg (1952) Petri csészékben kb. 10^8 *E. coli* telepet növesztett olyan sejtekből, amelyek korábban sohasem találkoztak T1 fágokkal. A replika lemez módszerével a kolónia-készlet másolatait olyan Petri csészékre vitték, amelyek T1 fágokat tartalmaztak (11.1. ábra). A T1 fágok jelenlétében csak a fágra rezisztens baktériumok szaporodhattak, képezhettek telepeket. Mivel a T1 rezisztens telepek minden replika lemezen ugyanazon a helyen képződtek, Joshua és Esther Lederbeg arra következtetett, hogy a mutációk spontán, véletlenszerűen képződnek, és nem a T1 fágok indukálják a T1-rezisztenciát. Esther és Joshua Lederberg megállapítása a biológia fontos elve: a mutációk spontán bekövetkezte a DNS, az örökítő anyag egyik fontos tulajdonsága. A mutációk nem a célszerűség elve alapján következnek be, hanem „vakon", véletlenszerűen. A mutánsok (a mutáció fenotípusát mutató élőlény) némelyike túlélheti a változó környezeti feltételeket és biztosíthatja a faj fennmaradását. A megváltozott életfeltételekhez alkalmazkodni nem tudó egyedeket a természetes (vagy a mesterséges, ember által megvalósított) szelekció kirostálja, kiválogatja. Végeredményben a mutációk biztosítják az élőlények változékonyságát, az evolúció alapját.

A spontán mutációk gyakorisága alacsony, és különböző az élőlények különféle csoportjaiban: a baktériumokban 10^{-10} és 10^{-6}/gén/generáció között változik. Az eukarioták diploid állapota nagyobb mutációs gyakoriságot tesz lehetővé, ami pedig nagyobb genetikai változékonyságot, alkalmazkodóképességet, evolúciós előnyt biztosít. A spontán mutációs gyakoriság a *Neurospora* gombákban kb. 10^{-8}, Drosophilában 10^{-4}-10^{-5}, kukoricában kb. 10^{-6}, egérben kb. 10^{-5}, emberben $4x10^{-6}$-10^{-4}/gén/generáció között változik. A diploid élőlények genomjában lassacskán halmozódnak a recesszív mutációk, és el is veszhetnek. A mutációk jelentős hányada letális: homozigóta állapotban nem teszi lehetővé az élőlény életét. Becslések szerint egy ember 3-5 recesszív letális mutációra heterozigóta.



Replikák T1 fág

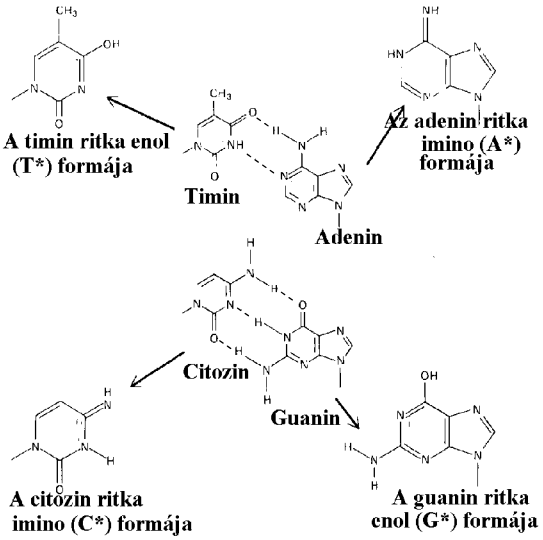
11.1. ábra. A T1 rezisztens baktériumok telepei a replikák azonos helyen képződnek, jelezve, hogy a mutációk véletlenszerűen, "vakon" következnek be.

A spontán mutációk eredete

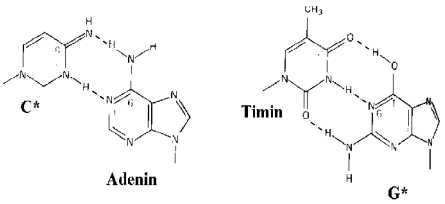
1. Tautomer átrendeződések

Szabály szerint az egyik DNS fonal A bázisai a komplementer szál T bázisaival, a G-k a C-kkel párosodnak. Ritkán, és csak rövid időre a bázisok ún. tautomer átrendeződésen mennek át, miközben az adenin és a citozin imino, a guanin ás a timin enol formává alakul (11.2. ábra). A szokatlan formában az A^* C-vel, a T^* G-vel, a G^* T-vel, a C^* A-val párosodik (11.3. ábra). Ha a tautomer átrendeződés a replikáció pillanatában történik, szokatlan bázispárok (ún. mismatch-ek) alakulnak ki a DNS-ben (11.4. ábra). A szokatlan bázispárok zömét a reparációs rendszerek kijavítják. Ha azonban a szokatlan bázispár megmarad, egy újabb replikáció után egy ún. bázispár csere (szubsztitúció) következik be. A bázispár csere a négy kromatidnak csak az egyikét érinti (11.4. ábra). A példában az eredeti A=T bázispár helyét egy G≡C veszi át. A bázispár csere egy mutáció: hirtelen bekövetkező öröklődő változás a DNS-ben. Az olyan mutációkat, amelyekben az egyik purin bázis helyét a másik purin bázis veszi át (vagy az egyik pirimidinét a másik) *tranzíciónak* nevezik (A=T → G≡C vagy G≡C → A=T). Az olyan báziscsere mutációkat, amelyekben egy purin bázis helyére valamelyik pirimidin bázis kerül (vagy egy pirimidin bázis helyére egy purin bázis) *tranzverzióknak* nevezik (pl. A=T → T=A vagy C≡G).

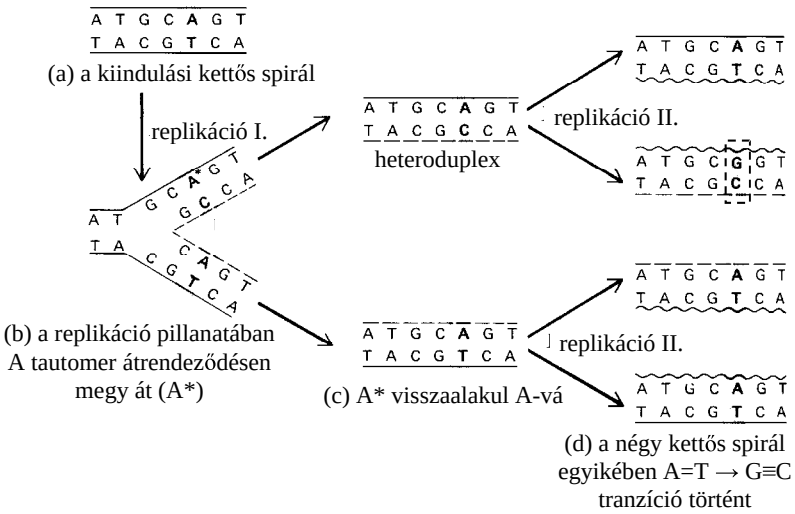
Eukariotákban a bázispár cserék spontán gyakorisága kb. 10^{-6}/bázispár/replikáció. Becslések szerint a humán genom egy replikációja során nyolc spontán mutáció képződik.



11.2. ábra. A tautomer átrendeződések szokatlan szerkezetű bázisok képződnek.



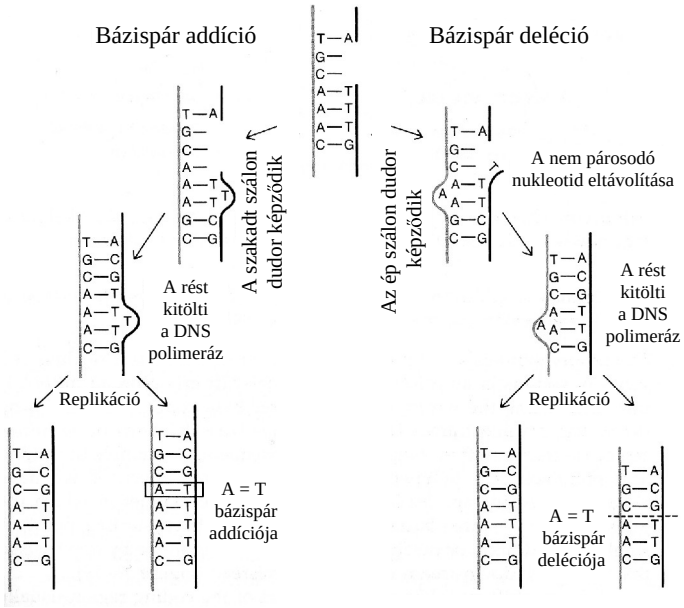
11.3. ábra. A tautomer átrendeződések szokatlan bázispárok kialakulásához vezetnek.



11.4. ábra. Bázispár csere típusú mutáció kialakulása tautomer átrendeződés és két replikáció után.

2. Bázispárok deléciója, addíciója

A komplementer DNS fonalak téves párosodása ún. extrahelikális hurkok képződéséhez vezethet: a DNS rövid szakaszán az egyik fonál kitüremkedik (11.5. ábra). Az extrahelikális hurkok többnyire az egyik fonal szakadása nyomán képződnek. Az egyik DNS fonal szakadása többféle esemény során is kialakulhat: ionizáló sugárzás, replikáció, rekombináció, reparáció, valamint a DNS szerkezetének egyéb változásai nyomán is.



11.5. ábra. A komplementer DNS fonalak téves párosodása az egyik kettős spirálban bázispár(ok) deléciójához, a másikban addíciójához vezet.

A DNS fonalak téves párosodása a replikáció nyomán olyan kettős spirálok képződéséhez vezet, amelyek egyikéből néhány bázispár hiányzik; ún. *deléció* alakul ki. A másik esetben a szokásosnál több bázispár képződik; ún. *addíció* alakul ki (11.5. ábra). A bázispár(ok) deléciójának és addíciójának eredményeként a genetikai információ sorrendje eltolódik. Nem meglepő, hogy a delécióval és az addicióval létrejött mutációkat *kereteltolódásos (frame shift) mutációknak* nevezik.

Minthogy a bázispárok típusának, illetve számának itt említett változásai a DNS-nek, a géneknek csak roppant kicsiny részét érintik, az ilyen típusú mutációkat génmutációknak, vagy pontmutációknak is szokás nevezni. A mutációk osztályozását a 11.1. táblázat mutatja be.

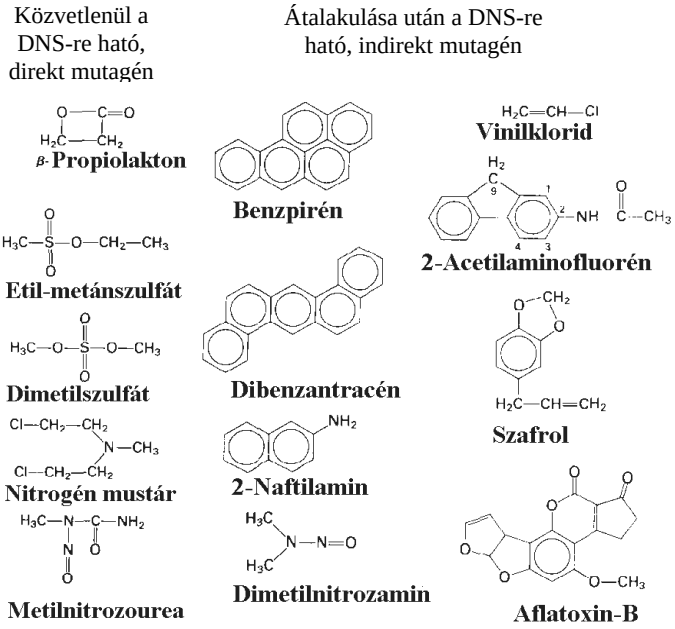
11.1. táblázat. A mutációk osztályozása.

Eredetük szerint

Spontán	Tautomer átrendeződés Téves bázispárosodás	
Indukált	Természetes mutagének	
	Kémiai	Direkt mutagén
	Fizikai	
	Biológiai	Indirekt mutagén
	Mesterséges mutagének	
	Kémiai	Direkt mutagén
	Fizikai	
	Biológiai	Indirekt mutagén

Típusaik szerint

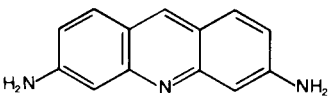
Minőségi (kvalitatív), gén-, vagy pontmutációk	Bázispár szubsztitúció	Tranzíció
		Tranzverzió
	Kereteltolódásos (frame shift) mutáció	Deléció
		Addíció
	Szerkezeti változások (átrendeződések)	Inverzió
		Transzlokáció
		Transzpozíció
Mennyiségi (kvantitatív), kromoszómamutációk	Szerkezeti változások	Deficiencia
		Duplikáció
	Számbeli változások (kromoszómavesztés, és/vagy nondiszjunkció következtében)	Euploidia (pl. triploidia)
		Aneuploidia (pl. monoszómia)



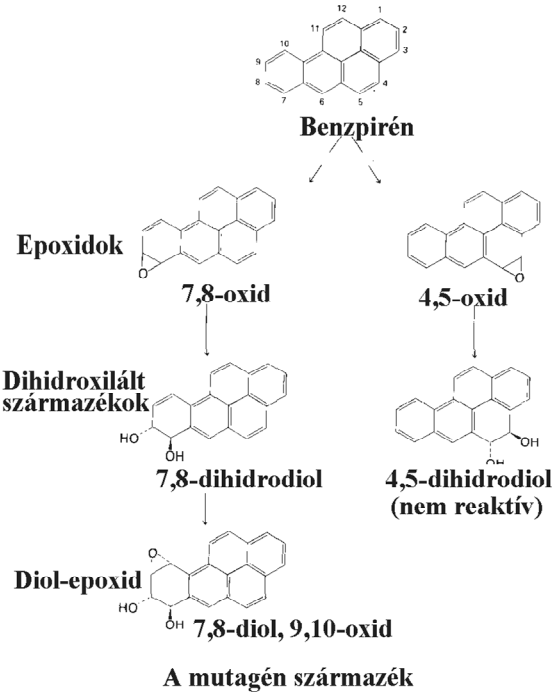
11.7. ábra. Néhány ismert mutagén szerkezeti képlete.

AZ INDUKÁLT MUTÁCIÓK

Az ún. interkaláló (a DNS molekulákba beékelődni képes) vegyületek stabilizálják a 11.5. ábrán bemutatott extrahelikális hurkokat, miáltal növelik a kereteltolódásos típusú mutációk bekövetkeztének esélyét. Az ún. interkaláló vegyületek közül az akridinek, és közülük is a proflavin, a legismertebb (11.6. ábra). A proflavin az ún. **mutagének** jellegzetes példája: olyan hatás, amely képes a mutációk indukciójára. Mutációk tehát nem csak spontán történnek, hanem indukálhatók is, fizikai (ionizáló sugárzások, UV), kémiai (az ún. kémiai mutagének), vagy biológiai (transzpozonok, retropozonok) tényezőkkel. Számos mutagén régtől fogva része a természetnek. A legismertebbek közül való az ionizáló és az UV sugárzás, valamint néhány gomba és növény anyagcsere melléktermék, mint pl. az aflatoxin (11.7. ábra). A legtöbb mutagén azonban „mesterséges" az emberi civilizáció "terméke". Olyan kémiai és fizikai tényezők, amelyek mutációkat okoznak. A *direkt mutagének* közvetlenül a DNS-re hatva fejtik ki hatásukat. Az *indirekt mutagének* (mint pl. a benzpirén a cigarettafüstben) a szervezetben úgy alakulnak át, hogy a belőlük képződő származékok mutagének (11.8. ábra).



11.6. ábra. Egy interkaláló vegyület, a proflavin molekula szerkezeti képlete.

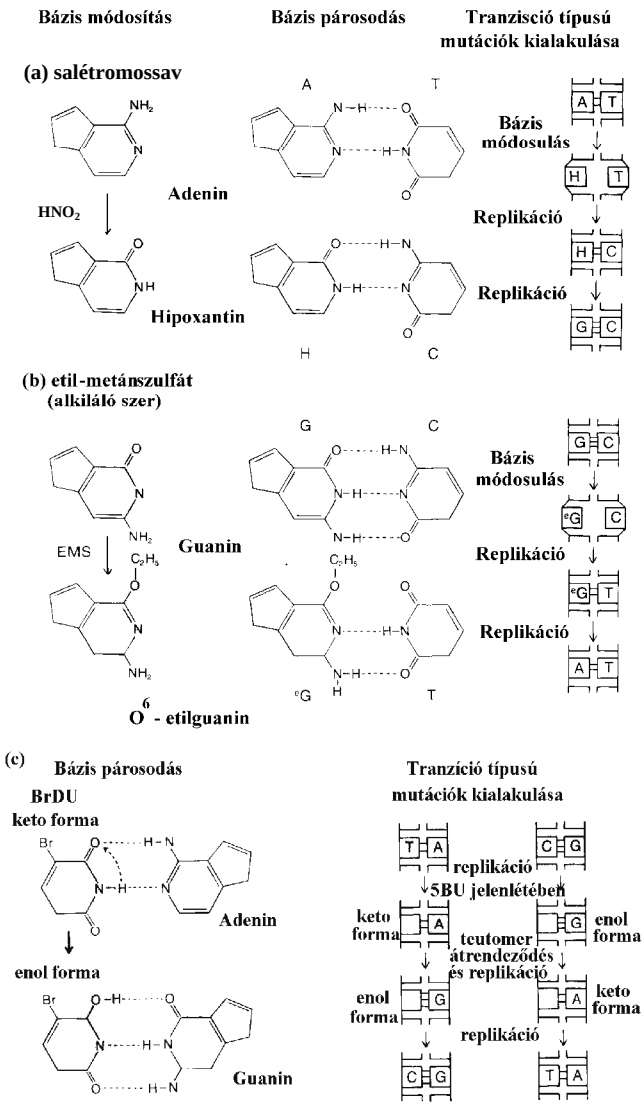


11.8. ábra. Az indirekt mutagén benzpirénből a szervezetben képződik mutagén származék.

A következő fejezet négy ismert direkt mutagén hatásmechanizmusát tekinti át.

Salétromossav (HNO_2

A HNO_2 a bázisok amino csoportjait keto csoportokká alakítja: a citozint uracillá, az adenint hipoxantinná (11.9a. ábra). Két replikáció után az A=T bázispár helyén G ≡ C képződik, a bázispár csere tranzíció típusa játszódik le.

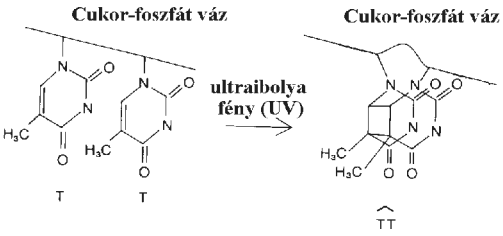


11.9. ábra. A salétromossav, az EMS, valamint a BrDU direkt mutagének hatásmechanizmusa.

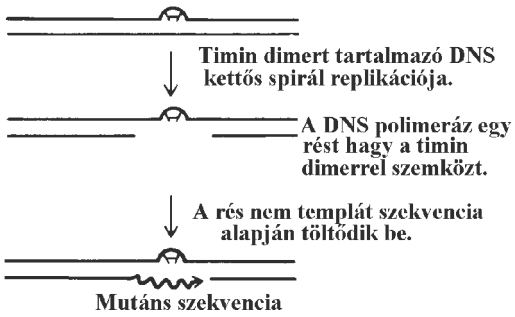
Etil-metánszulfonát (EMS)
Az egyik legismertebb alkiláló vegyület. Az EMS a guanint etilguaninná (EG) alakítja. Az EG a T-vel párosodik. Két replikációt követően egy G≡C → A=T tranzíció következik be (11.9b. ábra). Az EMS hatására képződött etiltimin a G-vel párosodik, és végeredményben T=A → A=T tranzverziót eredményez.

Bróm-deoxiuridin (BrDU)
A BrDU egy pirimidin analóg (11.9c. ábra). Úgy okoz tranzíciókat, hogy fokozza a tautomer átalakulások gyakoriságát.

Ultraibolya (UV) sugárzás
Az UV közvetve okoz bázispár cseréket. UV hatására valamelyik DNS fonálban két szomszédos pirimidin bázis között kovalens kötések képződhetnek (11.10. ábra). A dimerek többnyire timin dimerek. A timin dimerek nem szolgálnak templátként a replikáció folyamán, velük szemben véletlenszerűen épít be nukleotidokat a DNS polimeráz, végeredményben bázispár szubsztitúciók következnek be (11.11. ábra).



11.10. ábra. Az ultraibolya sugárzás pirimidin (többnyire timin) dimerek képződéséhez vezet.



11.11. ábra. Mutáns szekvencia képződése timin dimerrel szemközt.

A MUTÁCIÓK KÖVETKEZMÉNYEI

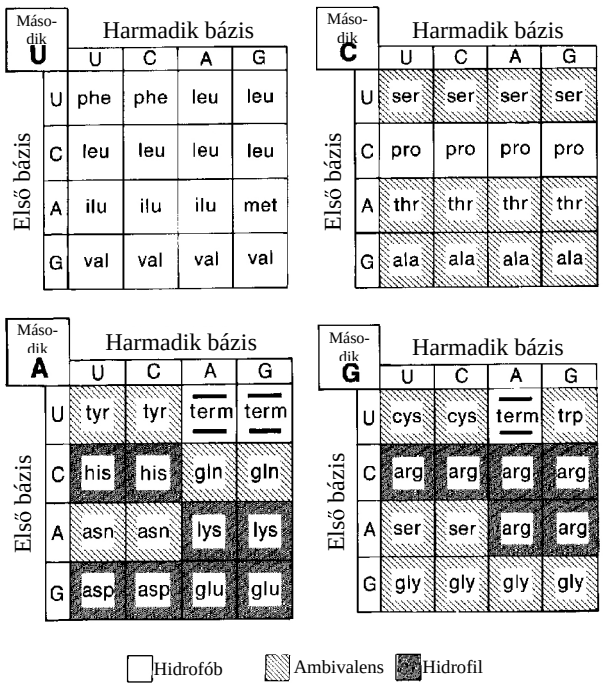
A bázispár cserék következményei

A bázispár cserék a DNS-ben tárolt információ tartalmát, jelentését változtatják meg. A bázispár csere típusú mutációkat következményeik alapján szokás osztályozni.

1. Az ún. *néma* mutációknak, mert a bázispárok harmadik tagját érintik, és mert a genetikai kód degenerált, nincsenek következményei. (Lásd a genetikai kódszótárt.)

2. Az ún. *halk* mutációk esetében a bázispár csere eredményeként valamely aminosav helyére egy azonos jellegű épül be a fehérjébe. (Pl. egy glutaminsav helyére egy aszparaginsav.) A halk mutációk általában nem befolyásolják jelentősen a fehérjék funkcióját. Sőt, a genetikai kódszótár azt mutatja, hogy a hasonló jellegű aminosavaknak hasonlóak a genetikai kódjaik, egyfajta védelmet biztosítva a túlzottan gyakori mutációk ellen (11.12. ábra). A genetikai kódszótár vizsgálata alapján kiderül, hogy a bázishármasok második helyeit érintő mutációk következményei a legkevésbé kedvezőek.

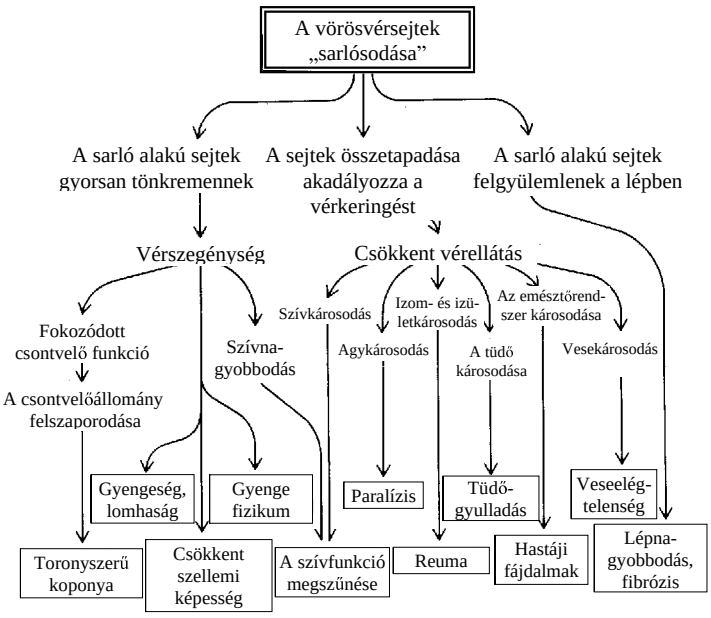
3. Az ún. *téves* (missense) mutációk esetében a bázispár cserének olyan aminosav csere a következménye, amely jelentősen megváltoztatja a kódolt fehérje funkcióját. Például, a sarlósejtes vérszegénység esetében a bázispár csere (5'GAA3' → 5'GTA3') Glu → Val aminosav cserét eredményez a β-hemoglobin 6. aminosavában. A Glu→Val csere egy olyan, autoszo-málisan öröklődő recesszív mutáció következménye, amely sarló alakú vörösvérsejtek képződését eredmé-nyezi. (Oxigén szegény környezetben a heterozigóták-ban is). A gyorsan pusztuló vörösvérsejtek vérsze-génységhez, és számos további rendellenességhez vezetnek (11.13. ábra). Egyetlen mutáció szerteágazó következményeinek összességét *pleiotrópiának* nevezik.



11.12. ábra. A hasonló jellegű (hidrofób, hidrofil vagy ambivalens) aminosavak kodonjai hasonlóak.

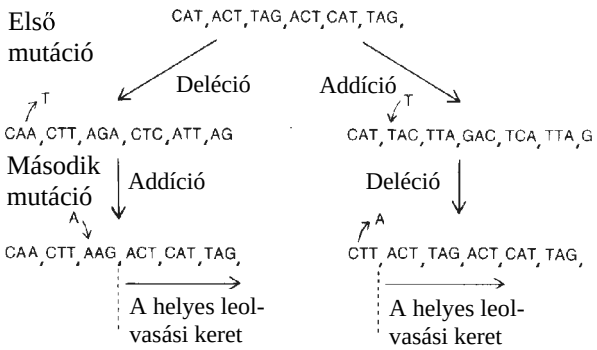
11.13. ábra. A sarlósejtes vérszegénységet egyetlen bázispár csere okozza a β-hemoglobint kódoló génben.

4. Az *értelmetlen* (nonsense) mutációk egy aminosav kodont a három STOP kodon valamelyikére változtatnak. Az értelmetlen mutációk a fehérjeszintézis időelőtti befejeződését, a szokásosnál rövidebb fehérjék képződését eredményezik. A szokásosnál rövidebb fehérjék általában funkcióképtelenek és gyorsan degradálódnak.
5. A *lánchosszabbító* mutációk valamelyik stop kódot értelmes, aminosavat kódoló kóddá alakítanak (Pl. TAG (STOP) → TAC (Tyr). A lánchosszabbító mutációk esetében a fehérjeszintézis az mRNS következő STOP kodonjáig folytatódik, és végeredményben a szokásosnál hosszabb fehérje molekulák képződnek. A szokásosnál hosszabb fehérje molekulák vagy nem, vagy csak csökkent mértékben funkcionálnak. A vérszegénység sok típusát okozzák lánchosszabbító típusú mutációk.



11.14. ábra. Egyetlen mutáció szerteágazó következményei.

A kereteltolódásos mutációk következményei
A kereteltolódásos mutáció helyétől kezdődően a genetikai információ tartalma az eredetihez képest teljesen más (11.15. ábra). Gyakori, hogy a kereteltolódásos mutációk eredményeként a szokásosnál rövidebb, vagy hosszabb fehérjék képződnek. A pontmutációk közül kétségtelenül a kereteltolódásosak következményei a legkellemetlenebbek.



11.15. ábra. A kereteltolódásos mutációk következményei és szuppressziója.

A fentiekben áttekintett mutációk az örökítő anyag kis, pontszerű részét érintik, ami miatt *pontmutációknak* is szokás nevezni őket. Mivel hatásuk egyetlen génre szorítkozik, *génmutációként* is ismertek. A pontmutációk esetében az örökítő anyag minősége változott, mennyisége nem, vagy csak elhanyagolható mértékben. Az ún. kromoszómamutációk esetében változik az örökítő anyag mennyisége (is) (11.1. táblázat).

KROMOSZÓMAMUTÁCIÓK

Mutációk a kromoszóma szerkezet változásai miatt

Elsősorban az ionizáló sugárzások, ám sok kémiai és biológiai mutagén is gyakorta töri el a DNS-t. A DNS töréseknek szerteágazó következményei lehetnek. Az *inverziók* esetében a bázispárok hosszabb szekvenciája megfordul. A *transzlokációk* esetében valamely kromoszóma nagyobb szegmentje egy másik kromoszóma részévé válik. (A reciprok transzlokációk esetében kromoszóma részek kölcsönösen cserélődnek ki.) A *transzpozíció* transzpozon (ugráló gén) áthelyeződését jelenti a genomban. Megjegyzendő, hogy az inverziók, a transzlokációk, és a transzpozíciók esetében nem feltétlenül változik az örökítő anyag mennyisége (11.1. táblázat).

A kromoszóma átrendeződéseknek gyakorta súlyosak a következményei. Egy jellegzetes példa az ún. Cri-du-chat (macskanyávogás) szindróma, amely az 5. kromoszóma egy darabkájának a 13. kromoszómára történő transzlokációja miatt, illetve a transzlokáció következtében kialakuló genetikai kiegyensúlyozatlanság nyomán alakul ki (11.16. ábra). A *deficienciák* esetében nagy DNS szakaszok vesznek el a kromoszómákból. (A deléciók csak egy, esetleg néhány bázispár elvesztését jelentik.) A *duplikációk* esetében már meglevő hosszabb szekvenciákkal bővül a genetikai állomány. Bármilyen sok káros következménye is legyen a kromoszóma átrendeződéseknek, jelentőségük kiemelkedő nem csak az evolúcióban, hanem a gének azonosításában, molekuláris szintű vizsgálatában. (A töréspontok gyakorta génekben történnek, mutációkat okoznak. A töréspontokat citológiailag és molekulárisan is viszonylag egyszerűen lehet azonosítani.)

Mutációk a kromoszómák számbeli változása miatt

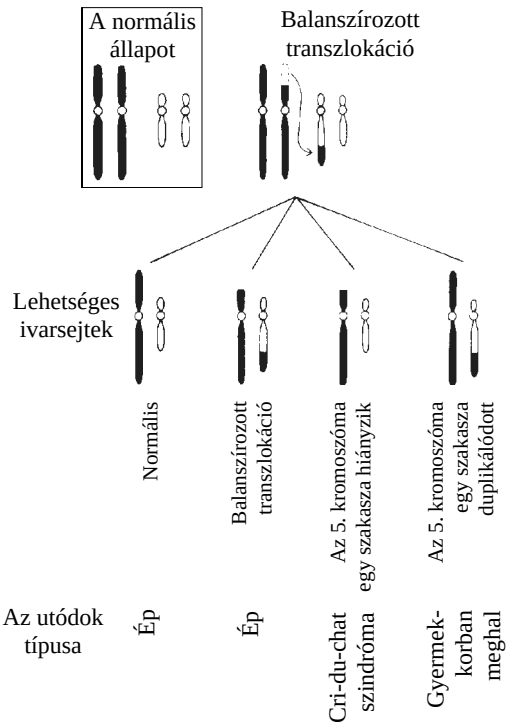
A DNS mennyisége a sejtekben/élőlényekben nemcsak deficienciák, duplikációk és transzlokációk miatt változhat, hanem teljes kromoszómák vesztése vagy nyerése következtében is. A kromoszómaszám kromoszóma vesztés és/vagy nondiszjunkció következtében változhat, amint azt egy korábbi fejezet áttekintette.

Mutációk az ősivar-, valamint a testi sejtekben

Mutációk természetesen az ősivar-, valamint a testi sejtekben egyaránt bekövetkezhetnek. A testi sejtekben bekövetkező mutációk csak a testi sejtek funkcióját érintik (pl. daganatképződés során), az utódokra nem öröklődnek. Az ősivarsejtekben indukált mutációk átöröklődhetnek az utódokra, növelve a faj ún. genetikai terheltségét.

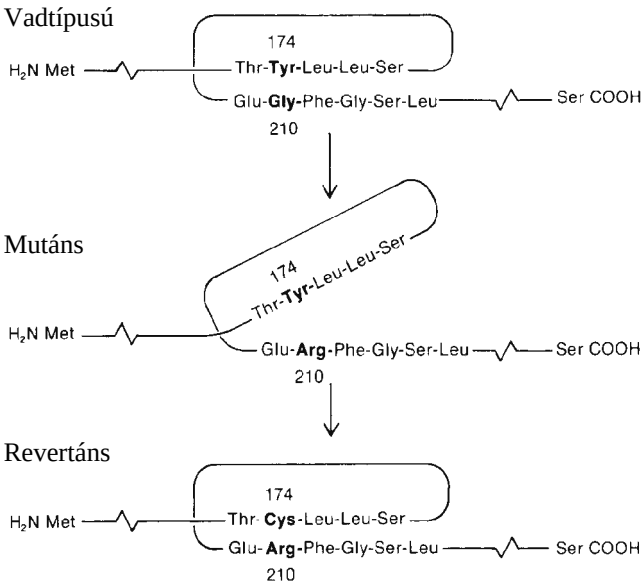
REVERZIÓ ÉS SZUPPRESSZIÓ

Olykor megtörténik, hogy *reverzió* következtében visszaáll a normális fenotípus. A reverzió minden esetben egy *második mutáció* következménye. A nagyon ritka valódi *revertánsok* esetében a bázisok eredeti sorrendje áll helyre. A *szuppresszor mutációk* is második mutációk, mert vagy helyreállítják az eredeti fenotípust, vagy csökkentik a mutáns fenotípus erősségét. A szuppresszor mutációk sokféle módon kifejthetik hatásukat. Itt egy-egy példát említünk az *intra-* és az *extragénikus szuppresszióra*. A triptofán szintetáz enzimet kódoló génben a 212. aminosavat kódoló helyen történt GGA→AGA mutáció következtében Gly→Arg aminosav csere történt (11.17. ábra). A mutáció következtében megváltozott a fehérje szerkezete, elveszett funkciója. A 174. helyen bekövetkezett második mutáció (TGT→TAT) egy Cys→Tyr aminosav cserét eredményezett, helyreállítva a fehérje eredeti szerkezetét és funkcióját is (11.17. ábra). A triptofán szintetáz mutációinak esete az ún. *intragénikus szuppresszió* klasszikus példája.

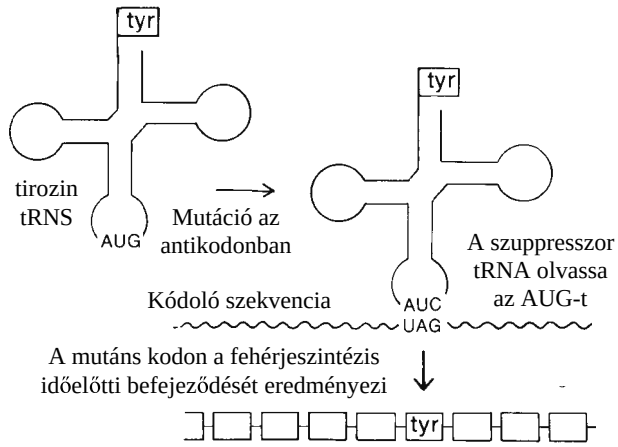


11.16. ábra. A Cri-du-chat szindróma alapja egy transzlokáció: az 5. kromoszóma egy darabkája a 13. kromoszómára helyeződött át.

Az *extragénikus szuppressziók* esetében a második (a szuppresszor hatású) mutáció nem abban a génben következik be, mint az első mutáció. Jellegzetes példa tRNS-eket kódoló gének esete. A valamely tRNS génben bekövetkezett mutáció eredményeként képződő mutáns tRNS egy, az első mutáció miatt képződött STOP kodon helyén aminosav beépülését teszi lehetővé a transzláció folyamán (11.18. ábra). A tRNS szuppresszor mutáció következtében nem képződik a szokásosnál rövidebb fehérje, hanem a fehérjeszintézis a következő STOP kodonig folytatódhat. Az extragénikus tRNS szuppresszor mutációk ugyan „kisegítik" az élőlényeket, de a szokásosnál hosszabb fehérjék képződéséhez is vezetnek, és általában csökkentik az életképességet.



11.17. ábra. Az intragénikus szuppresszor mutációk úgy revertálják (állítják helyre) az enzimaktivitást, hogy egy második mutációval visszaállítják a fehérje eredeti szerkezetét.



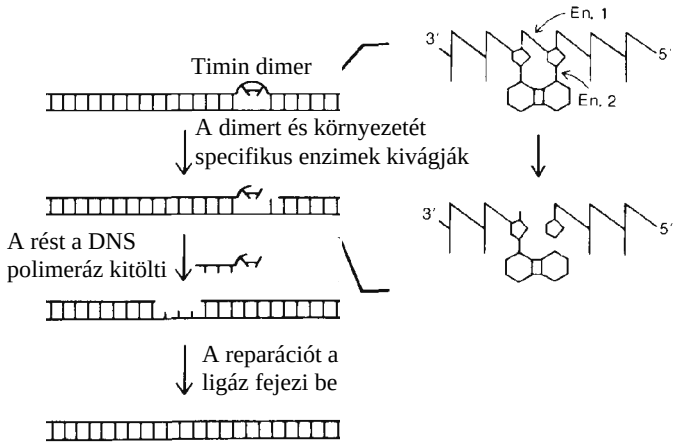
11.18. ábra. A tRNS gén mutációja extragénikusan szuppresszálhat egy értelmetlen mutációt.

A kereteltolódásos mutációk reverziója legtöbbször intragénikus, és további bázispárok deléciójával vagy beékelődésével valósulhat meg (11.15. ábra). Minél közelebb történnek a szuppresszor mutációk az eredetihez, annál hatékonyabb a szuppresszió, és áll helyre az eredeti fenotípus.

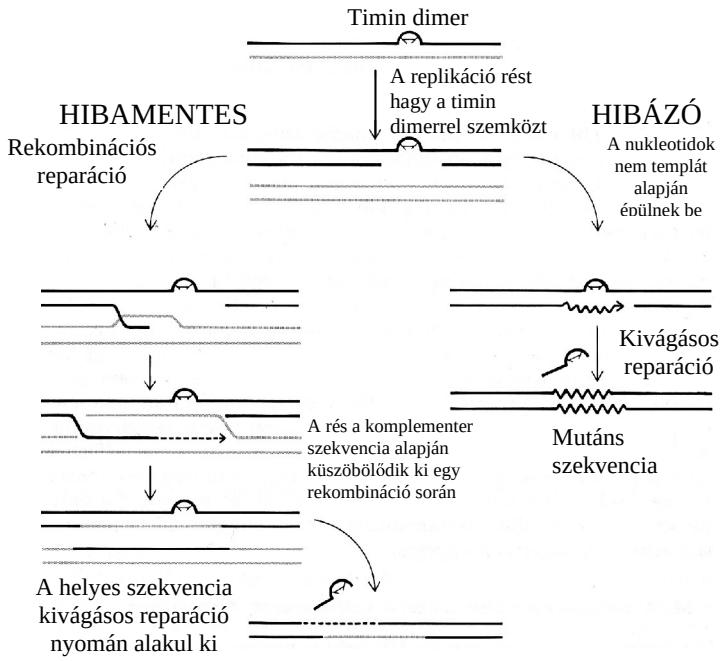
REPARÁCIÓ

A reparáció a DNS hibák (ám nem a mutációk) enzimatikus javítását jelenti. Pro- és eukariotákban egyaránt vannak olyan enzimrendszerek (de nincsenek pl. a mitokondriumokban), amelyek folyamatosan felügyelik a DNS épségét, és kijavítják hibáikat. A reparációs mechanizmusoknak három típusa ismert.

1. A *fotoreaktivációs* reparációs rendszer a timin dimerek közötti kovalens kötéseket hasítva állítja vissza az eredeti állapotot. A fotoreaktivációs reparációs rendszer látható fénnyel aktiválható.
2. Az ún. *kivágásos* (excíziós) reparációs rendszer a timin dimereket, a kémiailag módosított bázisokat és a szokatlan bázispárosodásokat (a mismatch-eket) javítja (11.19. ábra). A kivágásos reparációs rendszer először kivágja az egyik DNS szálból a meghibásodott szakaszt, majd az ép szál alapján helyreállítja a nukleotidok eredeti sorrendjét.
3. A reparáció rekombinációval egybekötve is megtörténhet (11.20. ábra). Az ún. *rekombinációs reparáció* folyamán a már replikálódott komplementer DNS szál szolgál mintául az eredeti DNS szekvencia helyreállításában.



11.19. ábra. A timin dimerek excíziós reparációja.



11.20. ábra. A DNS hibák reparációja kivágásos (jobboldalon) és rekombinációs (baloldalon) reparációval.

A reparációs rendszerek a DNS legtöbb hibáját kijavítják. A *Xeroderma pigmentosum* betegség esetében a reparációs rendszerek valamelyik eleme hiányzik. Bármelyik reparációs enzimet kódoló gén mutációja homozigóta állapotban *Xeroderma pigmentosum*-hoz vezet. A mutációra homozigóta emberek sejtjeiben, leggyakrabban az UV sugárzásnak kitett bőrsejtekben, halmozódnak a mutációk. A mutációk előbb-utóbb megváltoztatják, vagy megszüntetik a sejtosztódást szabályozó gének némelyikének funkcióját is, gyakorta melanómát, malignus bőrrákot okozva.

MUTAGÉNEK, KARCINOGÉNEK

A daganatok képződésének alapjai a DNS-ben, a mutációkban rejlenek. (Lásd a 15. fejezetet.) Mivel a napjainkig megvizsgált több száz mutagén mindegyike képes daganatok képződését indukálni kijelenthetjük, hogy minden mutagén rákkeltő. (A rákkeltők, karcinogének, olyan fizikai, kémiai és biológiai hatások, amelyek daganatok képződést indukálhatják.)

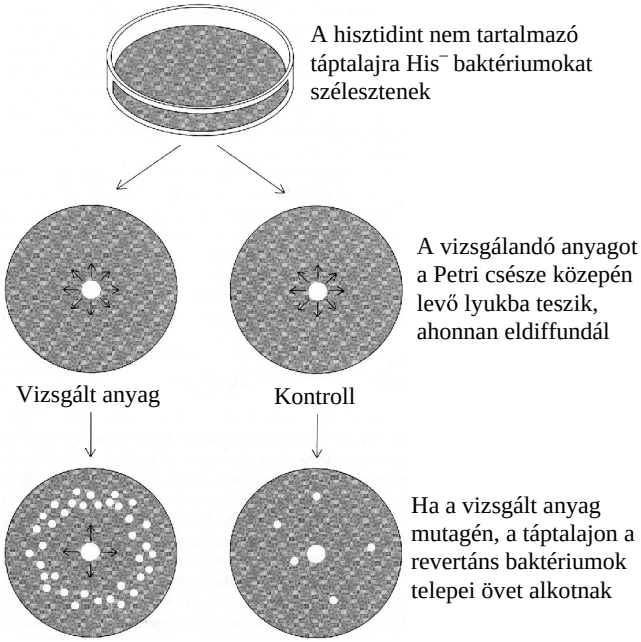
A mutagén hatás tesztelése

A rákos megbetegedések legalább 90%-át a környezetszennyező mutagének okozzák. Becslések szerint évente mintegy harmincezer olyan vegyületet állítanak elő, amelyek korábban nem léteztek a Földön. Az új vegyszerek némelyikéből gyógyszer lesz, másokból rovarölő, gyomirtó, gombaölő szer, vagy ételadalék, kozmetikum stb. Az élőlényeknek nem volt sem szükségük, sem lehetőségük, hogy alkalmazkodjanak az új vegyszerekhez. Az élőlényekben nem alakult ki olyan vészjelző rendszer sem, amely felhívhatná a figyelmet a mutagénekre.

A mutagén és a rákkeltő hatások közötti szoros kapcsolat lehetőséget biztosít a környezetben levő karcinogének kimutatására. Számos ún. mutagén hatást vizsgáló eljárást dolgoztak ki. A legismertebb, és a leggyakrabban alkalmazott az ún. Ames teszt, amelyet Bruce Ames fejlesztett ki.

Az Ames teszt a *Salmonella typhimurium* baktérium olyan mutáns törzseinek használatán alapul, amelyek hisztidin auxotrófok. Egyik törzsükben a hisztidin szintézishez szükséges egyik génjükben kereteltolódásos mutáció van. Más törzsükben bázispár cserén alapul a hisztidin auxotrófia. Egy további mutáció miatt a baktériumokból hiányzik a kivágásos reparációs rendszer, egy másik nyomán pedig a sejthártyájuk pedig fokozottan permeábilis. A hisztidin auxotróf baktériumok nem szaporodnak olyan táptalajon, amely nem tartalmaz hisztidint. Ha azonban a vizsgált hatás mutagén, és egy második mutációval revertáltatja a hisztidin auxotrófiát, szaporodásnak indulhatnak, telepeket képezhetnek azok a baktérium sejtek, amelyekben megtörtént a reverzió (11.21. ábra).

Az Ames teszt kivitelezése során Petri csészébe hisztidin mentes táptalajt öntenek, amely felszínére szélesztik a baktériumokat (11.21. ábra). A Petri csésze közepébe lyukat fúrnak, és belehelyezik a vizsgálandó anyagot. A vizsgált anyag diffundál a táptalajban, és különböző koncentrációban érintkezik a baktériumokkal. Ha a vizsgált szer mutagén, mutációkat indukál, köztük a hisztidin auxotrófia reverzióját is, amely események nyomán baktérium telepek képződnek. Vagyis, a telepek képződése mutagén hatásra utal. Minél több telep képződik, annál erősebb a vizsgált szer mutagén, karcinogén hatása.



11.21. ábra. Az Ames teszt elvi alapjai sematikusan.

A megvizsgált tényezők sokasága bizonyult mutagénnek: a dohányosok vizelete, sok hajfesték, a DDT stb. stb. A mutagén tesztek eredményeként születtek meg azok a törvények, amelyek kötelezővé teszik az új termékek mutagén/rákkeltő hatásának vizsgálatát.

Megemlítjük, hogy az ún. *teratogének* olyan fizikai, kémiai és biológiai környezeti hatások, amelyek bár nem mutagének, rendellenes egyedfejlődést okoznak. Egyikük-másikuk ún. *fenokópiát* eredményez: ismert mutációk fenotípusát "másolja". Ismeretes, hogy a veleszületett fejlődési rendellenességek egy része genetikai, másika környezeti okok miatt alakul ki. A magzatvédő programok a környezeti teratogének hatását (is) igyekszenek csökkenteni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az újonnan képződő mutációk óriási többsége előnytelen hatású. Mégis, a mutációk adják a genetikai variabilitás alapját. Az evolúció során kialakult kényes egyensúly biztosítja azt a mutációs gyakoriságot, amely lehetővé teszi az élőlények alkalmazkodását a folyamatosan változó környezeti feltételekhez. Mutációk a kezdetektől fogva folyamatosan történnek, spontán, és a természetes mutagénektől indukálva is. A vegyszerek újabb keletű használata fokozza a mutációk és a rákos megbetegedések gyakoriságát. A daganatos megbetegedések fokozódó gyakorisága a környezetszennyezés veszélyeire figyelmeztet.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi., Genetic Analysis, 487-540, 2012.
2. Sadava D. és mtsi., Life the Science of Biology, 274-281, 2007.
3. Fistrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 135-146, 452-485, 1989.
4. Rédei, P.G., Genetika, 351-384, 395-405, 1987.
5. Tudomány, 51-56, 1987/7.
6. Goodenough, U. and Levine, R.P, Genetics, 196-224, 1974.

12. TRANSZPOZONOK ÉS GENETIKAI MOZAIKOSSÁG.

Inszerciós elemek, retrovírusok, transzpozonok. Variegáció. Genetikai mozaikosság. Mozaikok, kimérák.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán.

BEVEZETÉS

A változás képessége az örökítő anyag egyik fontos jellemzője. A transzpozonok, az ún. mozgékony genetikai elemek olyan speciális DNS szekvenciák, amelyek változtatni tudják helyüket a genomban, lehetővé téve saját és idegen DNS beépülését, valmint kilépését a genomba, vagy a genomból. Miközben a transzpozonok változtatják helyüket a genomban, mutációkat indukálhatnak, vagy éppenséggel helyreállíthatják a gének ép funkcióját. A mobilis genetikai elemek új géneket is létrehozhatnak DNS szekvenciák átrendezésével. Miközben mutációkat indukálnak, vagy génfunkciót állítanak helyre, a mobilis genetikai elemek genetikai mozaikosságot okoznak. Olyan állapotot, amelyben az élőlény testét eltérő geno- és fenotípusú sejtek alkotják. A jelen fejezet a genetikai mozaikok képződésének egyéb módjait is áttekinti. A genetikai mozaikosság ismerete alapján néhány meglepő genetikai jelenséget is megérthetünk.

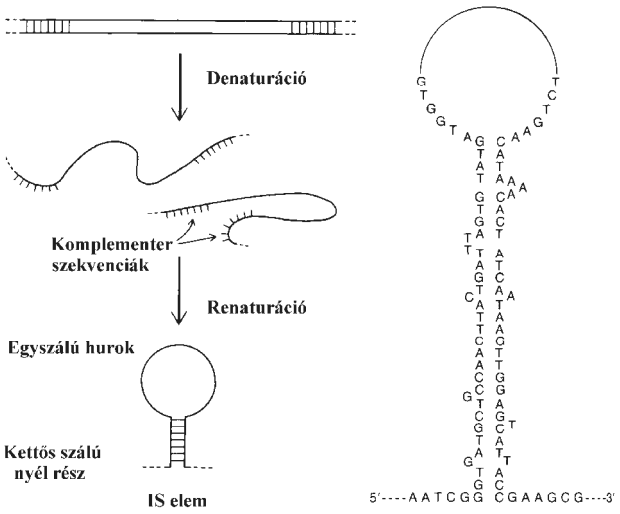
INSZERCIÓS SZEKVENCIÁK (IS elemek)

12.1. táblázat. IS elemek típusai *E. coli*-ban.

IS elem	Méret (bp)	Kópia	Az ismétlődő szekvencia hossza (bp)
IS1	768	5-8	18/23
IS2	1327	5	32/4
IS3	1400	5	32/38
IS4	1400	1	16/18
IS5	1250	?	rövid
γ-δ	5700	1 v. több	35

Az ún. **inszerciós szekvenciák** (IS elemek), olyan speciális DNS szekvenciák, amelyek a baktérium kromoszómának, pl. a λ fágnak és az F faktornak egyaránt alkotói. Az IS elemek teszik lehetővé, egyebek mellett, a λ fág és az F faktor inszercióját és excízióját (kivágódását) a baktérium kromoszómába, illetve kromoszómából az ún. helyspecifikus rekombináció folyamán. Az IS elemeknek különböző típusai vannak, és általában kevesebb, mint 2000 bázispár alkotja őket (12.1. táblázat). Az IS elemek végein a szekvenciák ismétlődnek, repetitívek, és minthogy egymáshoz képest fordított irányúak, fordítva ismétlődő szekvenciáknak (inverted repeats) nevezik őket. A fordítottan ismétlődő szekvenciák esetében a bázispárok sorrendje azonos, csak fordított irányú: a komplementer szekvenciák ugyanazon a DNS szálon vannak (12.1. ábra). Az IS elemek denaturációt majd renaturációt követően jellegzetes nyélből és hurokból álló szerkezetet képeznek. (Olyanok, mint egy „nyalóka”; 12.1. ábra.)

Az IS elemek a kromoszómákban csak néhány helyen és kópiában vannak jelen, a genomnak kevesebb, mint 0.3%-át teszik ki (12.1. táblázat). A λ fág kromoszóma egy IS2, az F faktor egy IS2, két IS3 valamint egy ún. γ-δ IS elemet tartalmaz.

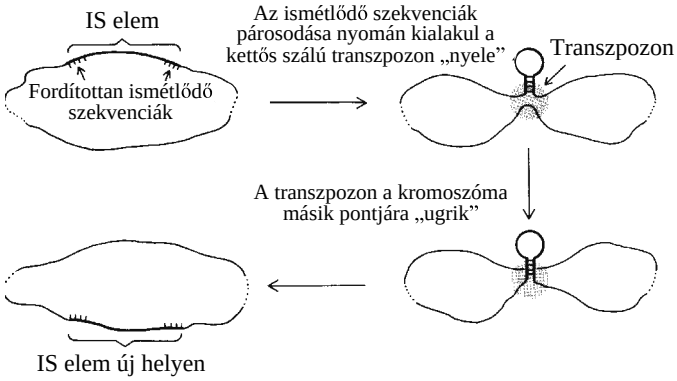


12.1. ábra. A fordítottan ismétlődő szekvenciák denaturáció és renaturáció után nyél-hurok struktúrát képeznek.

TRANSZPOZONOK

Az IS elemek elemi transzpozonok

Az IS elemek nem csak az episzómák inszercióját és excízióját segítik a kromoszómába, illetve a kromoszómából, hanem képesek pozíciójukat, helyüket változtatni a kromoszómán belül. A pozíció-változtatás képessége miatt az IS elemek az ún. mobilis genetikai elemek, a *transzpozonok* osztályába tartoznak.



12.2. ábra. Az IS elemek illegitim rekombinációval változtatják helyüket a kromoszómában. A genom bármely pontjára ugorhatnak. Az ugrásokat az ún. transzpozáz enzim teszi lehetővé.

A transzpozíció helyváltoztatása ún. *illegitim rekombinációval* történik (12.2. ábra). Illegitim, mert nem alapul homológ szekvenciák párosodásán, kölcsönös cseréjén. Rekombináció, mert újfajta DNS szekvenciák kombinációját hozza létre. Az IS elemek

alkotója az ún. transzpozáz gén, amely terméke - a *transzpozáz* enzim - szükséges az IS elem helyváltoztatásához, ugrásához (12.2. ábra). Az IS elem helyváltoztatása csaknem véletlenszerűen történik a genomban. A transzpozíció gyakorisága csekély: mindössze 10^{-4}-10^{-7}/generáció. Az IS elemek a legegyszerűbb mozgékony (mobilis) genetikai elemek, *elemi transzpozonoknak* is szokás nevezni. És mert helyüket változtatni képesek, *ugráló géneknek* is ismerik őket.

Az episzómák olyan kis, gyűrű alakú DNS molekulák, amelyek a baktérium kromoszómától függetlenül vagy a baktérium kromoszómába inszertálódva létezhetnek. Az IS elemek révén inszertálódhat az F faktor a baktérium kromoszómába. Úgy, mint a λ fág. Az F faktor és a λ kromoszóma nagyfokú hasonlósága evolúciós rokonságukra utal.

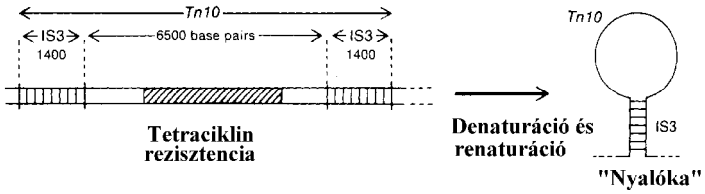
Az rezisztencia (R) plazmidok

A plazmidok, nem úgy, mint az episzómák, nem tudnak inszertálódni a baktériumok kromoszómáiba. A rezisztencia vagy R plazmidok (amelyeket R faktornak is neveznek) olyan géneket tartalmaznak, amelyek különböző hatóanyagokkal szemben ellenálló képességet, rezisztenciát biztosítanak. Az R plazmidoknak különös jelentősége van az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciában. Az R100 jelű plazmidot hordozó baktériumok rezisztensek a sztreptomicinre, a tetraciklinre, a szulfonamidokra, a kloramfenikolra. Csupa olyan anyagra, amelyeket baktériumok ellen alkalmaznak. Az R100 rezisztenciát biztosít higany ellen is, alkalmazkodva a környezetszennyezéshez.

Az R faktor - ugyanúgy, mint az F faktor - infektív: lehetővé teszi, hogy az R baktériumok konjugáció során átadják az R faktort az R^- baktériumokba. Sőt, az R faktor a különféle baktérium fajok között is átadódik. Pl. az *E. coli*-ból *Shigella dysenteriae*-ba, a dizentériát okozó baktériumba, vagy pl. *Salmonella typhimurium*-ba (ami tífuszt okoz). Más R plazmidok átadását leírták *Klebsiella pneumoniae*-ba (ami a tüdőgyulladás heveny formáját okozza) és a *Proteus* fajokba (amelyek némelyike a húgyutak és az emésztőrendszer megbetegedését okozza), gonokokkusz baktériumokba (amelyek pl. a gonorrheát okozzák), vagy *Pasteruella pestis*-be (a bubópestist okozó baktériumba). Az antibiotikumok használata nyomán egyre több baktérium hordoz R plazmidot. Pl. Japánban az ötvenes évek közepén a dizentériában megbetegedett embereknek még csak 0,2%-a hordozott olyan *Shigella* baktériumokat, amelyek valamelyik antibiotikumra rezisztensek voltak. 1960-ban az izolált baktérium mintáknak már 13, 1965-ben 58%-a volt antibiotikum rezisztens. Sőt, a baktériumok ún. polirezisztensek lettek, egyszerre több antibiotikummal szemben ellenállóak. 1965-ben a kórházban kezelt emberekből izolált *E. coli* 84%, a *Klebsiella* 93%-a, a *Proteus* 90%-a volt egyszerre többféle antibiotikummal szemben ellenálló. Általában elmondható, hogy az R plazmidok széleskörű elterjedése jelentősen csökkentette az antibiotikumok alkalmazhatóságát a terápiában. A polirezisztencia világszerte komoly problémát okoz mind az ember, mind az állatgyógyászatban.

Összetett transzpozonok

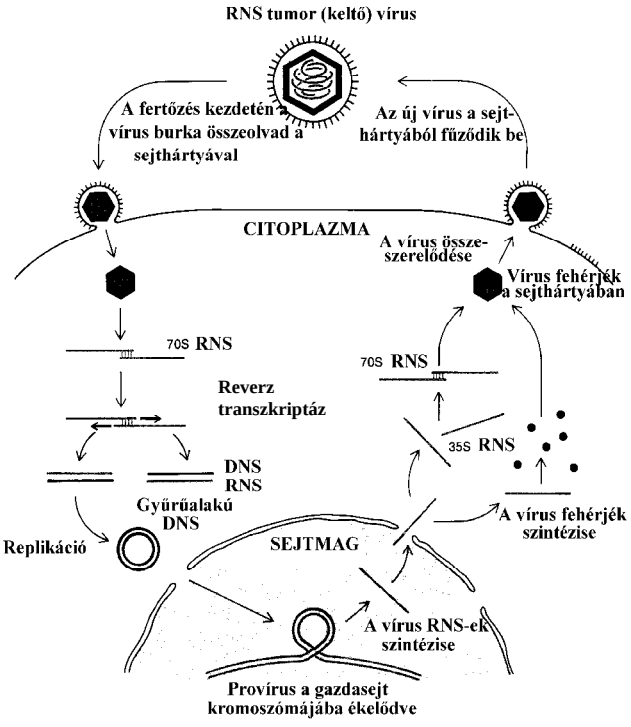
Gyakori jelenség, hogy az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát kódoló gének transzpozonok részei, természetesen azokkal a génekkel egyetemben, amelyek a transzpozícióhoz szükségesek. Az összetett transzpozonok sokkal nagyobbak, mint az IS elemek. Olykor akár 23 kbp-ból is állhatnak (12.3. ábra). Hasonlóan az IS elemekhez, az összetett transzpozonok végeit is repetitív szekvenciák alkotják. A repetitív szekvenciák lehetnek fordított (inverted repeats) vagy egyező (direct repeats) irányúak. Sok összetett transzpozonban (mint pl. a *Tn10*-ben) a repetitív szekvenciák maguk az IS elemek (12.3. ábra). Az összetett transzpozonok, úgy, mint az elemiek, ún. nyél-hurok szerkezetet képeznek denaturációt követő renaturáció során, és illegitim rekombinációval változtatják helyüket a genomban. A transzpozonok, miközben "ugrálnak" a genomban "összeszedegetik" és tovább viszik a rezisztencia géneket. Az antibiotikum kezelések nyomán pedig kiszelektáljuk azokat a baktériumokat, amelyek tartalmazzák a rezisztencia géneket.



12.3. ábra. Egy összetett transzpozon (a *Tn10* jelű) szerkezete.

Retrovírusok, retropozonok

A retrovírusok az állatok vírusai. Örökítő anyaguk egyszálú RNS. Ismert retrovírus az egér emlőtumor vírus (MMTV), a Rous szarkóma vírus, vagy pl. az HIV vírus. Az MMTV életciklusát a 12.4. ábra mutatja.



12.4. ábra. Az egér emlőtumor retrovírus életciklusa.

A sejtbe bejutó vírus RNS szekvenciája alapján a vírus eredetű ún. *reverz transzkriptáz* enzim DNS kettős spirált készít. (Reverz, mert a transzkripció fordítottját végzi. Lényegében egy olyan polimeráz, amely RNS minta alapján készít DNS-t.) A vírus eredetű DNS kettős spirál a gazdasejt valamelyik kromoszómájába inszertálódhat. A kromoszómába inszertálódott vírus DNS-t *provírusnak* nevezik. Minthogy a retrovírus DNS is képes változtatni helyét a genomban, *retorpozonnak* is nevezik.

Az ún. *duplikációs transzpozíció* a retropozonok fontos jellemzője. A duplikációs transzpozíció során először a provírus DNS minta alapján sok RNS molekula képződik. Az RNS molekulákat a reverz transzkriptáz templátként használja, miközben sok kör alakú DNS kettős spirált készít. A DNS molekulák inszertálódhatnak a kromoszómákba, a provírus sok-sok példányát hozva létre. Valójában az ember és más élőlények genomjának jelentős hányadát retropozonok és származékaik teszik ki. Az emberi genom retrpozonjai az ún. mérsékelten repetitív DNS osztályba tartoznak. Az emberi genom ún. *Alu* szekvenciái jellegzetes példák a retropozonokra. (*Alu*-nak nevezik, mert tartalmazza azt az AGCT palindrom szekvenciát, amelyet az *Alu*I restrikciós enzim felismer.) A teljes (kb. 200 bp) és a részleges *Alu* szekvenciák az emberi genomnak mintegy 5%-át teszik ki, szanaszét szórva a genomban.

Az eukarioták transzpozonjai

Transzpozonok nem csak a baktériumokban vannak, hanem az eukariotákban is, köztük az élesztőkben, a kukoricában, a Drosophilában és természetesen az emberben. Az eukarioták transzpozonjainak szerveződése és funkciója lényegében ugyanaz, mint a prokariotákban. Az eukariota transzpozonok jelentősége abban rejlik, hogy miközben helyüket változtatják a genomban különféle szekvenciákat kombinálva új géneket hozhatnak létre. (

A muslica (*Drosophila melanogaster*) ún. P-elemei a legismertebb eukariota transzpozonok. Az 1970-es években fedezték fel őket. Margaret Kidwell arra figyelt fel, hogy a Drosophila különböző törzseit keresztezve szokatlan jelenségek történtek: (i) az utódok életképtelenek voltak, (ii) az utód nőstények sterilek voltak és (iii) az F1 generációban feltűnő gyakorisággal képződtek mutációk és kromoszóma-rendellenességek. A jelenségek összefoglaló neve a *hibrid diszgenezis*. (Hibrid, mert a hibridekben nyilvánul meg, diszgenezis, mert a jelenségek a genetika szabályaival nem voltak magyarázhatók.) A hibrid diszgenezis alapja a P-elemek mobilizációja, ugrása, ugrálása. A P-elem egy kb. 3,8 kb hosszú transzpozon, amely a természetben élő némely Drosophila populációban van jelen. A P-elemeket tartalmazó vonalakat P, a P elemeket nem tartalmazó, többnyire a laboratóriumokban tartott törzseket M-nek nevezik. Amíg a P hímek és az M nőstények utódai a reciprok keresztesből származók és nem diszgenikus azok. A reciprok keresztezések eltérő természete az anyai hatást jelzi, a peték citoplazmájának fontosságát. (A P x P és az M x M keresztezések sem diszgenikusak.) És valóban, a P nőstények petéinek citoplazmája tartalmaz egy olyan komponenst, amely megakadályozza a P-elemek transzpozícióját. Az M nőstények petéinek citoplazmájából viszont hiányzik az a tényező, amely megakadályozná a P-elemek transzpozícióját. Vagyis az M ♀ x P ♂ keresztezésből származó utódok sejtjeiben ugrálhatnak a P-elemek. Az ugrálás erősségének (és a P-elemek számának) megfelelően az utódok (i) elpusztulnak, (ii) sterilek, vagy (iii) gyakoriak köztük a mutánsok. Különös, hogy az 1950 előtt begyűjtött törzsekben nincsenek P elemek. A P-elemek inváziója a Drosophila genomban 1950 óta történik.

Jól ismert a P-elem molekuláris szerkezete és funkciója. A laboratóriumokban módosított P-elemeket intenzíven használják mutagenezisre, gének azonosítására és klónozására, transzgénikus muslicák előállítására, sőt a muslicák „génterápiájára" is. A Drosophilára hasonló rendszerek rendelkezésre állnak, pl. élesztőkben, kukoricában, egérben. Sőt, már folyamatban vannak - a retropozonok használata alapján - az első génterápiás próbálkozások az emberben is.

A transzpozonok száma a genomban limitált. P-elemeké pl. 30-50 genomonként. Az ún. önmérséklő rendszer alapja egy olyan represszor fehérje, amely szintézisét a transzpozon kódolja. A transzpozíció gyakorisága és a transzpozonok száma nem növekedhet, ha a represszor fehérje koncentrációja egy adott értéket elért. Bizonyos, hogy a transzpozonok alkalmazkodtak a gazdaszervezethez, és olykor "hasznosak" is: akár olyan új géneket is kreálhatnak, amelyek kedveznek a "gazda" vagy utódai túlélésének, alkalmazkodásának a változó környezeti feltételekhez.

VARIEGÁCIÓ

A transzpozonok csaknem véletlenszerűen változtatják helyüket a genomban. Meg-megesik, hogy a transzpozon beugrik egy génbe, megszünteti annak funkcióját. A transzpozon-indukált mutáció befolyásolhatja a fenotípust. A mutáns sejt túlélhet, és tulajdonságát örökítheti az utódsejtekre. Az utódsejtek együtt maradhatnak, és a mutáns sejtek klónját alkotják. Végeredményben tehát a szervben, az élőlényben ép, valamint mutáns sejtek élnek együtt, *variegáció* alakul ki. (Variegáció: különböző genoés/vagy fenotípusú sejtek együttélése ugyanabban az élőlényben.) Közismert példa a sárga mozaik foltok képződése zöld levelekben és fordítva. Az ok a következő: transzpozon ékelődik be a klorofill szintézisért felelős egyik génbe, elvész a gén funkciója. A sejt elveszti a klorofill szintézis képességét. A sejt, mert a szomszédok kisegítik, életben marad, osztódik. Tulajdonságát átörökíti utódsejtjeire. A mutáns sejtek sárgák, mert továbbra is szintetizálnak karotinokat. Végeredményben tehát sárga folt képződik egy zöldszínű levélben. Természetesen a folyamat fordítva is megtörténhet: a transzpozon kiugrik a génből, helyreáll a gén eredeti funkciója, és egy zöld folt képződik a sárga levélen. Könnyen elképzelhető, hogy a barna szemben képződő kék foltok, illetve a kék szemben képződő barna foltok mögött is ugráló gének vannak… A fenti mozaik foltokat hordozó élőlények példák a valódi genetikai mozaikok egyik típusára.

12.5. ábra. A transzpozon-indukált variegáció; különböző geno- és/vagy fenotípusú sejtek együttélése ugyanabban az élőlényben.

GENETIKAI MOZAIKOK

Azokat az élőlényeket, amelyek testét különböző geno- és/vagy fenotípusú sejtek alkotják, *genetikai mozaikoknak* nevezik. A genetikai mozaikosság a soksejtű élőlények egyik jellemzője. Sokkal általánosabb jelenség, mint azt gondolnánk. A következőkben a genetikai mozaikok típusait, keletkezésük módjait tekintjük át. A genetikai mozaikok osztályozásának egy lehetséges módját a 12.2. táblázat mutatja. A valódi genetikai mozaikok valamint a funkcionális mozaikok élete két ivarsejt fúziójával kezdődik. A kimérák testét bár diploid sejtek alkotják, a sejtek több mint két ivarsejtből származnak. A genetikai mozaikok egyik jellegzetessége, hogy bizonyos típusú mozaik, mint pl. a nőstény/hím mozaikok különféle mechanizmusok alapján is képződhetnek.

12.2. táblázat. A genetikai mozaikok osztályozása.

Ivar-sejt[1]	A genetikai mozaik típusa		A mozaik képződésének típusa
2	Valódi genetikai mozaikok	Minőségi mozaikok	Pontmutáció Mitotikus rekombináció
		Mennyiségi mozaikok	Kromoszómavesztés Mitotikus nondiszjunkció
	Funkcionális mozaikok		Pozíció-effektus-variegáció
			X kromoszóma inaktiváció
>2	Kimérák		Többszörös megtermékenyülés[2]
			Fúziós (aggregációs) kimérák
			Injekciós kimérák
			Sejtcserés kimérák

[1], ennyi ivarsejtből származnak a genetikai mozaik testét felépítő sejtek.
[2], Úgy, hogy a genetikai mozaik testét diploid, esetleg diploid és haploid sejtek alkotják.

Valódi genetikai mozaikok

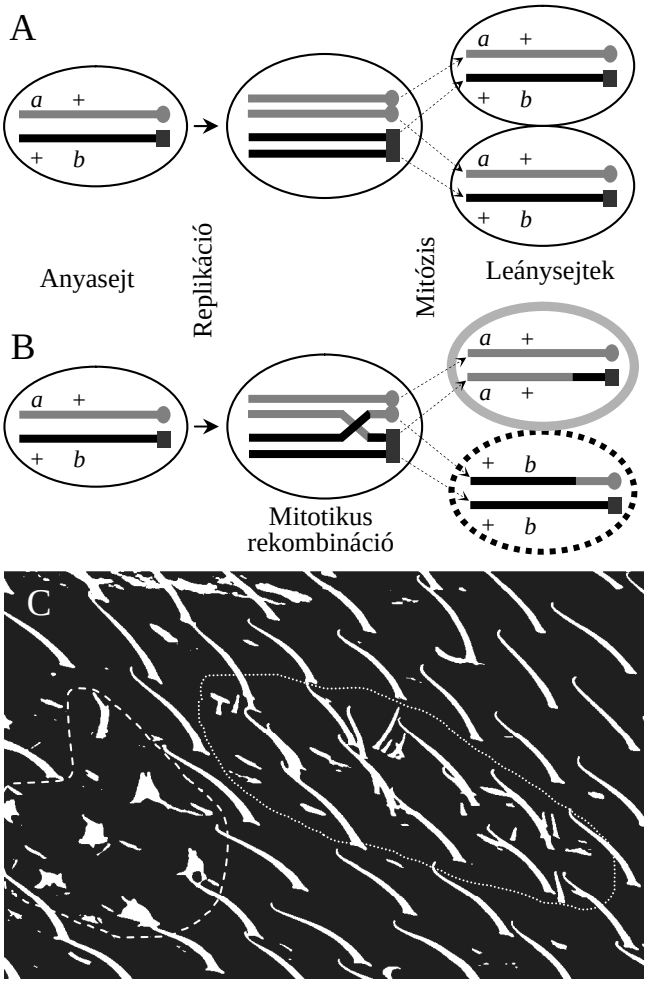
1. Minőségi mozaikok

A *minőségi* mozaikokban bár a sejtek genetikai állományának mennyisége az élőlény sejtjeiben lényegében azonos, a sejtek információ tartalma különböző. Alapvetően két mechanizmus alapján képződhetnek: (1) pontmutációk illetve (2) mitotikus rekombinációk nyomán.

(1) *Mozaikok pontmutációkból*

A fent bemutatott, transzpozonok által indukált genetikai mozaikok példák a valódi genetikai mozaikokra. Nagy általánosságban igaz, hogy a transzpozonnal és a más mutagénekkel indukált mozaik foltok fontos jellegzetessége a szabálytalan méret, alak és elhelyezkedés (205.. ábra).

(2) *Mozaikok mitotikus rekombináció nyomán*



12.6. ábra. A mitotikus rekombináció mechanizmusa és következményei. (A) Egy mitózis folyamán két olyan leánysejt képződik, amelyek genotípusa azonos az anyasejtével. (B) Mitotikus rekombinációt követően olyan leánysejtek képződhetnek, amelyek egyike az egyik (*a*/*a*), másika a másik (*b*/*b*) mutációra homozigóta. A "genetikailag megjelölt" sejtek a többiekkel együtt osztódnak, és mutatják az egyik, illetve a másik mutáció fenotípusát, ún. ikerfolt képződik. (C) egy ikerfolt muslica szárnyon. Egy szárnysejtből rendesen csak egy szőrszál fejlődik. Az *a*/*a* sejtek mindegyike 2-7 szőrszálat képez. A *b*/*b* sejtek mindegyikéből ugyan csak egyetlen szőrszál képződik, ám azok tönkszerűek.

Mitotikus rekombináció, vagyis a homológ kromoszómák kromatida részeinek cseréje a mitózis folyamán olyan sejtek képződéséhez vezethet, amelyek genotípusa eltér a környező sejtekétől: a leánysejtek egyike az egyik, másika egy másik recesszív mutációra válhat homozigótává (12.6. ábra). A "genetikailag megjelölt" sejtek átörökíthetik tulajdonságaikat utódsejtjeikre, amelyek osztódása nyomán mozaik foltok képződnek (12.6. ábra).

Mitotikus rekombinációk, bár kis gyakorisággal, spontán is történnek. A mutagén/rákkeltő tényezők több nagyságrenddel fokozzák a mitotikus rekombinációk gyakoriságát. Egy olyan sejtből, amely heterozigóta egy daganatképződést okozó recesszív mutációra, a mitotikus rekombináció nyomán olyan sejtek képződhetnek, amelyek homozigóták a mutációra, és belőlük daganat képződése indulhat.

2. Mennyiségi mozaikok

A sejtosztódások során bekövetkező kromoszóma-vesztés és/vagy mitotikus nondiszjunkció révén képződnek az ún. *mennyiségi* (kvantitatív) mozaikok: élőlények, amelyek testét olyan sejtek alkotják, amelyek kromoszóma száma eltérő. Az X kromoszóma vesztése miatt képződő XX/X0, XXX/XX/X0 vagy Turner mozaikok jellegzetes példái a kvantitatív mozaikoknak. Az XX/X0 mozaikok az egyik X kromoszóma vesztése, az XXX/XX/X0 típusú Turner mozaikok valamelyik X kromoszóma mitotikus nondiszjunkcióját követően képződnek. (Ahol 0 az X kromoszóma hiányát jelöli.)

Drosophilában, ahol az XX kromoszóma készletű sejtek nőstények, az X0-ak hímek, az XX/X0 mozaikok nőstény/hím mozaikok, és günandereknek nevezik őket (12.7. ábra). A günanderek egyben *valódi hermafroditák* is. Olyan élőlények, amelyek testét egyszerre alkotják nő és hím sejtek. Az emlősök, köztük az emberek között is vannak XY/X0, XYY/X0 és XYY/XY/X0 mozaikok, akik az Y kromoszóma vesztése, vagy nondiszjunkciója nyomán képződnek.

A Down-szindróma mozaikok sejtjeinek egyik csoportjában két, a másikában három van a 21-egyedik kromoszómából. (Azok a sejtek elpusztulnak, amelyekben csak egyetlen 21. kromoszóma van.) Az ún. Down mozaikok a 21. kromoszóma mitotikus nondiszjunkciója nyomán képződnek. És bár mindegyik 21. kromoszómájuk mind a 350 génje ép, mégis kialakulnak a jellegzetes rendellenességek. Azért, mert egyik-másik gén termékéből a szokásosnál 50%-al több van.

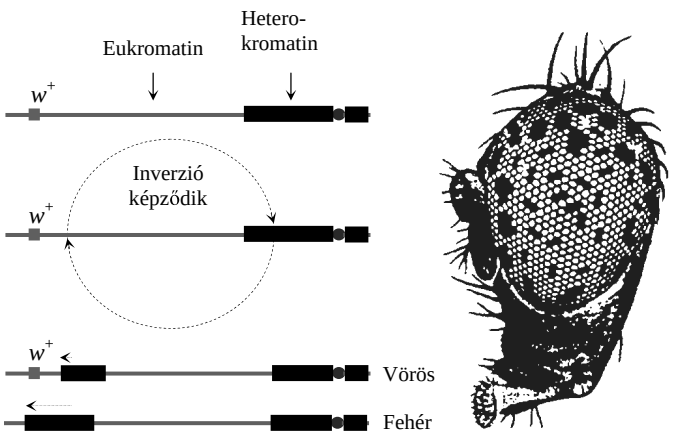
12.7. ábra. Egy Drosophila gynander. A günander baloldala nőstény (**X***X*) és heterozigóta a fehér szemszínt (*w*) és a sárga testszínt (*y*) okozó recesszív mutációkra. A günander jobboldala hím (*X*0), és mutatja az *X* kromoszómához kapcsoltan öröklődő *w* és *y* mutációk fenotípusát. Az **X***X*/*X0* vonal lefutása véletlenszerű.

Funkcionális mozaikok

A mozaikosság fent említett típusai olyan élőlényekben alakulhat ki, amelyek élete két ivarsejt fúziójával kezdődik. Bennük pontmutáció, mitotikus rekombináció, kromoszóma vesztés vagy mitotikus nondiszjunkció nyomán alakult ki mozaikosság. Az ún. funkcionális mozaikokban bár állandó a sejtek örökítő anyagának mennyisége, és genotípusa is azonos, mégis kialakul egyfajta mozaikosság. Azért, mert a heterokromatinizáció miatt eltérő módon fejeződnek ki a gének az élőlényt alkotó sejtekben. A következőkben a funkcionális mozaikosság két típusát tekintjük át.

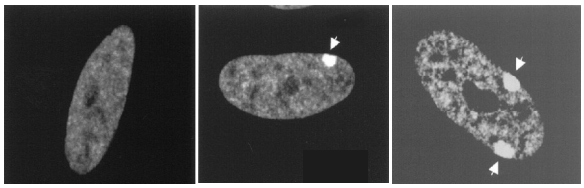
(1) *Heterokromatinizáció és pozíció-effektus-variegáció* (PEV). Vannak olyan inverziók, amelyek az eukromatinban levő gének közelébe heterokromatint visznek (12.8. ábra). Ha valamely szervkezdemény néhány sejtjében a heterokromatin ráterjed valamely génre, azt inaktiválja. A szervkezdemény más sejtjeiben a heterokramatinizáció nem éri el a gént, az aktív maradhat, kifejeződhet. A heterokromatinizáció irreverzibilis: az egyedfejlődés korai szakaszában inaktivált gén inaktív marad, tulajdonságát átörökíti utódsejtjeire. A nem inaktivált gén funkcióképes marad. Végeredményben tehát a kifejlett szerv olyan klónokból áll, amelyek egyikében a gén aktív, másikában nem, és tipikus variegációs mintázat alakul ki (12.8. ábra).

Minthogy a variegáció a gén helyétől, pozíciójától függ, a variegáció itt leírt típusát *pozíció-effektus-variegációnak* (PEV) nevezik. A PEV jól ismert jelenség számos eukariotában, köztük az emberben is. A PEV esetében a sejtek genotípusa azonos, de fenotípusa különböző. Minthogy a mozaikosság a gének eltérő funkciójára vezethető vissza, a PEV-el kapcsolatos mozaikosságot szokás *funkcionális mozaikosságnak* is nevezni.

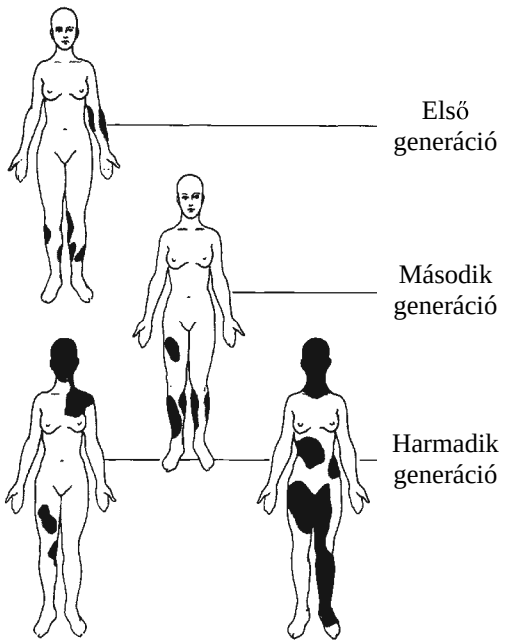


12.8. ábra. Pozíció-effektus-variegáció egy Drosophila szemben. Egy inverzió heterokromatint vitt az ép *white*$^+$ (w^+) gén közelségébe. Ha a szemkezdemény valamely sejtjében a heterokromatinizáció nem éri el a w^+ gént, a sejt utódsejtjei téglavörös színű mozaik foltot képeznek. Ha a tovaterjedő (←) heterokromatin eléri, és inaktiválja a w^+ gént, a sejtből és utódsejtjeiből fehér (valójában színtelen) klón képződik. Végeredményben vörös/fehér mozaikosság, variegáció alakul ki.

(2) *Variegáció X kromoszóma inaktiváció nyomán.*
A méhlepényes emlősök nőstény (X**X**) embrióiban az anyai és az apai eredetű X kromoszómák véletlenszerűen inaktiválódnak. Különös, hogy a méhlepény sejtekben mindig az apai eredetű X kromoszóma inaktiválódik. (A tojásrakó emlősök és az erszényesek embrióiban mindig az apai eredetű X kromoszóma inaktiválódik. Az apai eredetű X kromoszóma mintegy „meg van jelölve", imprintálva van, elő van programozva az inaktiválódásra. A kromoszóma imprintálódás alapja a DNS bizonyos helyeinek metilációja és/vagy speciális fehérjék kapcsolódása az X kromoszómával.) Az inaktiválódás során csaknem a teljes X kromoszóma erősen kondenzálódik. Úgy, mint a heterokromatin képződése során. (Az X kromoszóma nem inaktiválódott, autoszómaként viselkedő rövid szakaszai jelentik a különbséget a Turner szindrómás X0, illetve a csodálatosan szép, és okos nők között.) Az inkativálódott X kromoszóma a sejtmaghártya belső felszínéhez tapad, és mint jellegzetesen festődő test, az ún. *Barr test* ismerhető fel (12.9. ábra).



12.9. ábra. A Barr test erősen kondenzálódott X kromoszóma a nők sejtmagjaiban. A Barr test (∇) a sejtmaghártya belső felszínéhez tapad. Sejtenként mindig csak egy X kromoszóma aktív. Az XXX sejtekben két Barr test van.

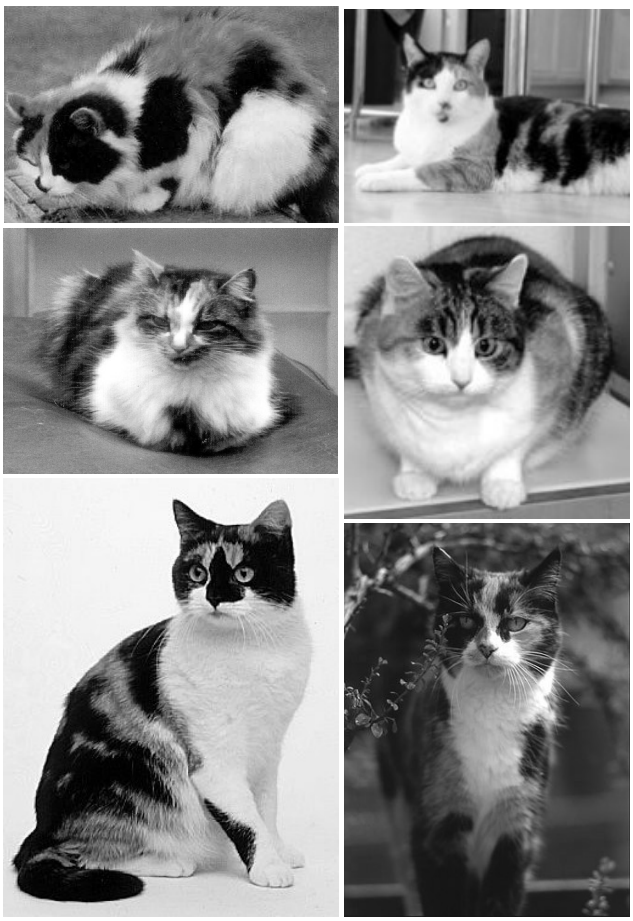


12.10. ábra. Az $X^{ad}\mathbf{X}^{+}$ embriókban az X^{ad} és az $\mathbf{X}^{+}$ kromoszóma inaktivációját követően olyan területek képződnek, amelyeken vannak, illetve nincsenek verejtékmirigyek. Az ábra egy nagymama, a lánya és az egypetéjű unokái testén mutatja a kétféle bőrfelület eloszlását.

Az X kromoszóma inaktiváció azonos géntermék koncentráció viszonyokat biztosít a nő(sténye)k és a hímek sejtjeiben, abban a folyamatban, amelyet *dóziskompenzációnak* neveznek.

Azok a nőstények, amelyek heterozigóták az X kromoszómákhoz kapcsolt mutációkra, variegációt mutatnak a mutáns fenotípusra. Pl. az *anhidrotikus diszplázia* (*ad*) mutációra heterozigóta ($X^{ad}/\mathbf{X}^{+}$) nők azon testrészein képződnek verejtékmirigyek, és kicsi a bőr elektromos ellenállása, ahol az X^{ad} kromoszóma inaktiválódik, az $\mathbf{X}^{+}$ marad aktív. Más testtájaikon viszont nem képződnek verejtékmirigyek és nagy a bőr elektromos ellenállása. Ott, ahol az X^{ad} kromoszóma aktív, az $\mathbf{X}^{+}$ inaktiválódik (12.10. ábra).

Az X kromoszóma inaktiváció közismert példája a macskák bundájának vörös/fekete (vörös/szürke) variegációja. A bunda szürke, fekete és vörös színét egy, az X-kromoszómához kapcsoltan öröklődő gén alléljai kódolják. A $X^{v}\mathbf{X}^{\mathbf{f}}$ ún. teknőctarka macskák bundája fekete és vörös foltokból áll, attól függően, hogy sejtjeikben az X^{v} vagy az $\mathbf{X}^{\mathbf{f}}$ kromoszóma inaktiválódott (12.11. ábra). (Az ún. kalikó cicákban fehér foltok is képződnek egy autoszómához kapcsoltan öröklődő domináns mutáció miatt.)



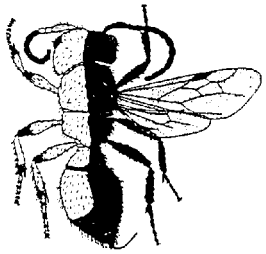
12.11. ábra. A kalikó cicák bundájának fekete/vörös foltossága az X kromoszóma inaktiváció következtében alakul ki, és példa a funkcionális mozaikosságra. Vegyük észre, hogy ahány macska, annyi féle a színek eloszlása bundájukon.

Az X kromoszóma inaktiváció nyomán kialakuló különböző fenotípusú foltok vizsgálata alapján fontos megállapításokat tehetünk.
(1) Mivel az ép és a mutáns foltok egyaránt nagyok arra következtethetünk, hogy az X kromoszóma inaktiváció az embriógenezis korai szakaszában következik be.
(2) Mivel a teknőctarka macskák bundájában vörös sejtek között nincsenek feketék (és fordítva) megállapíthatjuk, hogy az X kromoszóma inaktiváció irreverzibilis.
(3) Mivel az ép és a mutáns területek eloszlása véletlenszerű, nyilvánvaló, hogy az X kromoszóma inaktiváció is véletlenszerű folyamat (12.10. ábra).
(4) Minthogy az ép és a mutáns sejtek összefüggő foltokat képeznek nyilvánvaló, hogy az epidermisz sejtkezdemény sejtjei nem keveredtek az egyedfejlődés során.
(5) Minthogy az ép és a mutáns sejtekből álló foltok nagysága nagyjából azonos nyilvánvaló, hogy egyik mutáció sem befolyásolja a sejtek életképességét.
(6) A mutáns fenotípus autonóm: a környező sejtek nem befolyásolják a mutáns fenotípus megnyilvánulását.

KIMÉRÁK

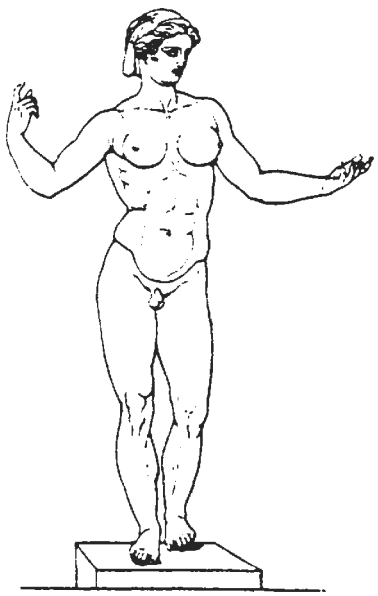
A valódi genetikai, valamint a funkcionális mozaikok testét olyan sejtek alkotják, amelyek két ivarsejt fúziója és a létrejött diploid sejt osztódása nyomán képződtek. A kimérák olyan genetikai mozaikok, amelyek testét bár diploid (esetleg diploid és haploid) sejtek alkotják, a sejtek több mint két ivarsejtből származnak. A kimérák testét alkotó sejtek többféle mechanizmus nyomán jöhetnek létre (202. táblázat).

(1) *Kimérák többszörös megtermékenyülésbő*
A diploid/haploid mozaik méhek többnyire *többszörös megtermékenyülés* nyomán képződnek. Például úgy, hogy az egyik spermium megtermékenyíti a petesejt magját, a másik spermiumból haploid sejtek képződnek. A diploid/haploid nőstény/hím méhek a günanderek újabb típusát alkotják. Testük egyszerre alkotják női (diploid) és hím (haploid) sejtek (12.12. ábra). A legkülönösebb kimérákat az ún. öröklődő fürkészdarázs (*Habrobracan juglandis*) esetében írták le. (Pl. a petesejt magja osztódik. Az egyik sejtmag egy spermiummal egyesül, a másikból haploid sejtek képződnek. Vagy a petesejt magja osztódik, és belőle haploid hím testtájak képződnek, miközben két spermium magja egyesül, és belőlük a kiméra nőstény testrészei fejlődnek.)

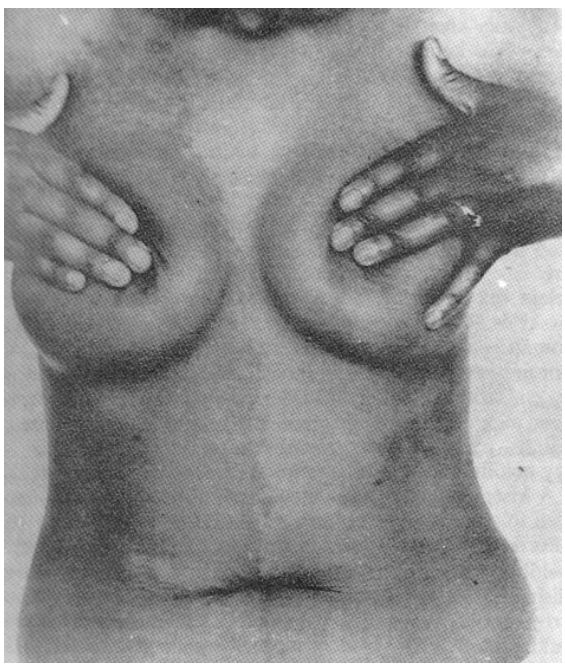


12.12 ábra. Egy diploid/haploid darázs mozaik. A mozaik baloldala nőstény (szárnyatlan, rövid csáp, világos testszín), és diploid sejtek alkotják. A mozaik jobb oldala hím (van szárny, hosszú a csáp és sötét testszín), és haploid sejtek alkotják.

(2) *Fúziós kimérák*
A fúziós kimérák spontán képződnek embriók eggyé olvadásával. A nő (XX) és hím (XY) embriók összeolvadása nyomán képződnek az XX/XY nőstény/hím mozaikok, az ún. valódi hermafroditák (12.13. ábra). Ismertek olyan fúziós kimérák is, amelyek két XX (vagy két XY) embrió összeolvadása nyomán képződtek. Az XX/XX és az XY/XY kimérákat általában a bizonytalan vércsoportjuk alapján szokták felismerni, olykor a szokatlan bőrpigmentáció nyomán (12.14. ábra).



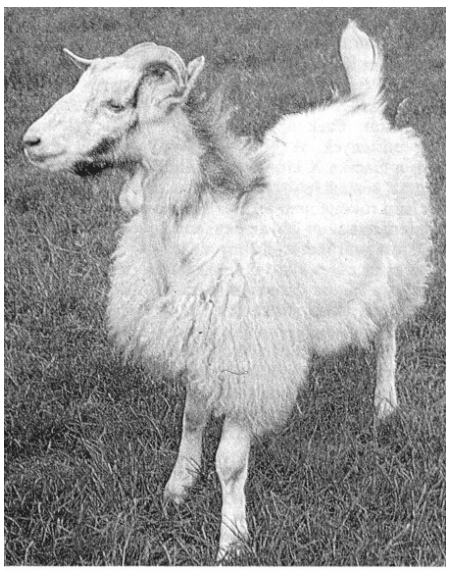
2013. ábra. Egy hermafroditát ábrázoló antik szobor rajza.



12.14. ábra. Egy XX/XX fúziós kiméra nő. Bőrének foltossága alapján derült fény kiméra jellegére.

(3) Aggregációs kiméra
Az ún. *aggregációs* kimérák emberi tevékenység nyomán, embriók fuzionáltatásával képződnek. Születtek már olyan kiméra egerek, amelyek három embrió egyesítéséből származtak, és amely kiméra egereknek hat szüleje volt (12.15. ábra). Sőt, már olyan kimérákat is készítettek, amelyek birka és kecske embriók egyesítése nyomán képződtek (12.16. ábra).

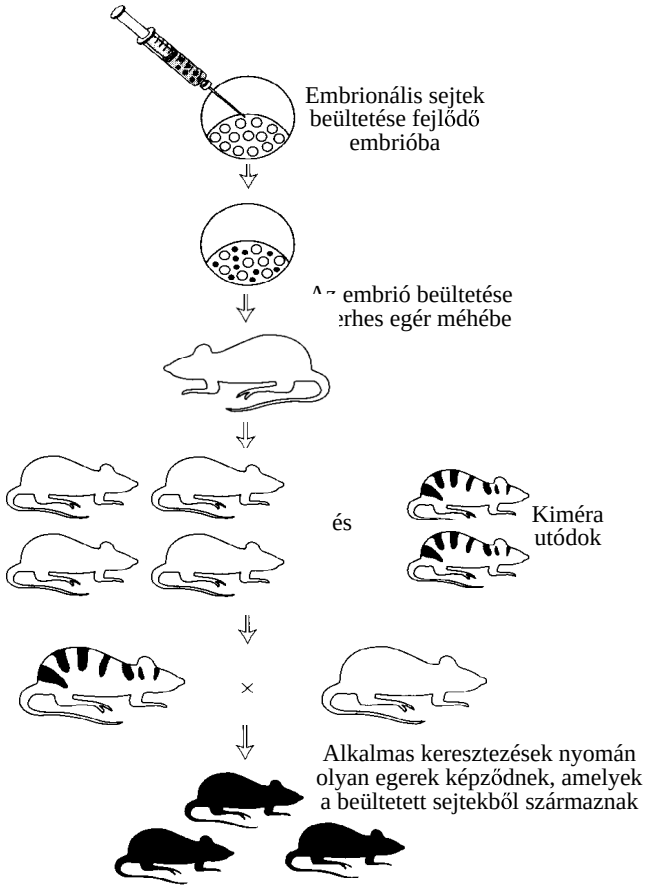
12.15. ábra. Egér aggregációs kiméra, amely egy-egy szürke, fehér és fekete embrió aggregációja nyomán képződött.



12.16. ábra. Kecske/birka aggregációs kiméra.

(4) Injekciós kimérák
Az *injekciós* kimérákat úgy készítik, hogy blasztociszta stádiumú embriókba sejttenyészetből származó, embrionális jellegű sejteket ültetnek (12.17. ábra).

(5) A *sejtcserés* kimérákban anyai sejtek integrálódtak a fejlődő embrió sejtjei közé, majd továbbélnek, funkcionálnak az utód élete során. A folyamat fordítva is megtörténik: az anya szervezetében élnek, és kimutathatók az utód sejtjei. Jóval a születés után is.



12.17. ábra. Injekciós kimérák készítése.

ÖSSZEFOGLALÁS

A transzpozonok olyan DNS szekvenciák, amelyek sokféle szerepet játszanak az élőlények életében: mutációk indukciójával és a DNS szekvenciák átrendezésével fokozzák a genetikai variabilitást, az élőlények sokféleségét, alkalmazkodóképességét a változó környezeti feltételekhez. Mivel a transzpozonok "összegyűjtögetik" az ún. rezisztencia géneket és segítik elterjedésüket, nagymértékben rontják az antibiotikumok használhatóságát a gyógyászatban. A transzpozonok, csakúgy, mint az egyéb mutagének, pontmutációkat okozhatnak a testi sejtek egyikében-másikában, variegáció alakulhat ki, jelezve a genetikai mozaikosság egyik formáját. Másfajta genetikai mozaikok valamint kimérák is képződhetnek, ha a genetikai anyag minősége, mennyisége vagy funkciója eltérő az élőlény testét alkotó sejtekben, és a különbség a fenotípusban is megnyilvánul. A genetikai mozaikosság természetének ismeretében számos érdekes biológia jelenség alapjait érthetjük meg.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis, 211-212, 493-494, 487-510, 746-747, 2008.
2. Szabad János, A vörös/fekete tarka macskák üzenete. Természet Világa **134**, 495-497, 2004.
3. Gilbert, S.F., Developmental Biology, 99-101, 124-127, 419, 561, 627-628, 2003.
4. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, , 677- 682, 1982.

13. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA PROKARIOTÁKBAN.

Enzimindukció. Indukálható operon. Operátor. Poligénikus mRNS. Katabolit represszió. Represszálható operon. Attenuáció.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2010. őszén.

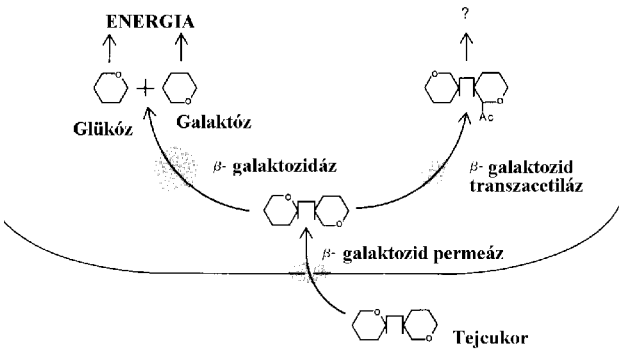
Génexpresszió: funkcióképes RNS és fehérje molekulák képződése génben kódolt genetikai információ alapján.

ELŐSZÓ

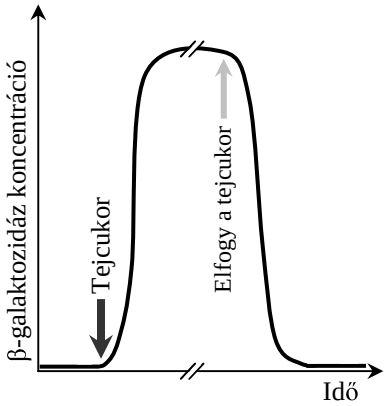
Az örökítő anyag egyik fontos tulajdonsága, hogy szabályozza az élőlények funkcióját. Hogyan "tudják" az élőlények génjeiket az igényeknek megfelelően bevagy kikapcsolni? Hogyan használják az élőlények génjeiket a környezetükben levő tápanyagforrások hasznosítására? Hogyan veszik fel azokat a szénforrásokat, amelyekből életfolyamataik energia igényét fedezik és azokat a tápanyagokat, amelyekből testüket építik? A következő fejezet azokat a mechanizmusokat tekinti át, amelyek a prokariota gének expresszióját szabályozzák.

Enzimindukció

Tapasztalati tény, hogy csupán néhány β-galaktozidáz enzim molekula van azokban a baktérium sejtekben, amelyek olyan közegben élnek, amely nem tartalmaz laktózt (tejcukrot). A β-galaktozidáz azon enzimek egyike, amelyek ahhoz szükségesek, hogy a baktériumok a laktózt szénforrásként hasznosíthassák (13.1. ábra). Ha a tápoldatba laktózt teszünk, a baktérium sejtek β-galaktozidáz tartalma hamarosan növekedni kezd (13.2. ábra). A jelenség az ún. enzimindukció jellegzetes példája, és azt jelenti, hogy a laktóz, az *induktor* molekula, indukálja a β-galaktozidáz enzim szintézisét. (Elvileg az is elképzelhető, hogy az induktor már jelenlevő, de még inaktív enzim molekulákat aktivál.) Miután elfogy a tápoldatból a laktóz, a sejtek β-galaktozidáz tartalma hamarosan csökkenni kezd, majd visszaáll az eredeti állapot (13.2. ábra). Mi történik az enzimindukció folyamán? Hogyan készítenek a sejtek β-galaktozidázt, amellyel hasznosíthatják a környezetükben rendelkezésre álló energiaforrást?



13.1. ábra. A laktóz hasznosításának enzimei.



13.2. ábra. A laktóz, mint induktor, indukálja a β-galaktozidáz enzim szintézisét.

AZ INDUKÁLHATÓ OPERON

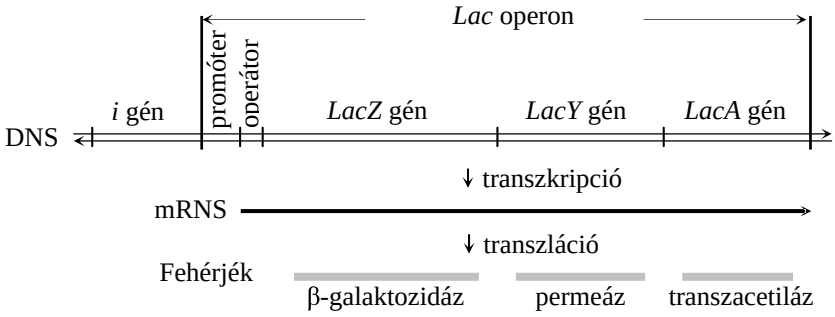
A Lac operon szerkezete

A β-galaktozidáz enzim molekulák szintézisét a baktérium kromoszóma egy olyan működési (operációs) egysége kódolja, amelyet *laktóz* (*Lac*) operonnak neveznek (13.3. ábra). A *Lac* operon három enzim szintézisét kódolja. Az enzimek a tejcukor hasznosításhoz szükségesek. (1) a β-galaktozid permeáz juttatja be a β-galaktozid típusú vegyületeket (köztük a laktózt) a sejtekbe. (2) A β-galaktozid transzacetiláz funkciója alig ismert. (3) A β-galakto-zidáz hasítja a laktóz molekulákat glükózra és galaktózra, hogy a cukrok energia tartalma további enzimatikus lépések nyomán a baktérium sejtek rendelkezésére álljon. A három enzim ugyannak az ún. *poligénikus* mRNS molekulának az alapján képződik (13.3. ábra). Az mRNS-t azért nevezik poligénikusnak, mert három gén együttes transzkripciója során képződik, és három gén információ tartalmát hordozza. A poligénikus mRNS-ben három nyitott leolvasási keret van (13.3. ábra). Az operon „értelme" az, hogy az ugyanabban a folyamatban szereplő három gén expressziója közösen szabályozott. A két szabályozó elem a *promóter* és az *operátor*, a *Lac* operon két jól definiált szakasza (13.3. ábra).

A *Lac* operon expressziójának szabályozása

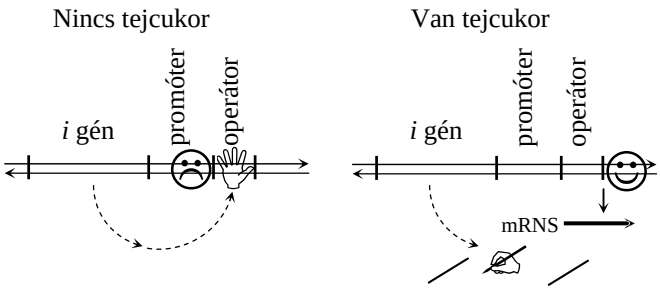
Ha nincs a baktérium sejtek környezetében laktóz, a *Lac* operon "csukva", *represszált* állapotban van (13.4. ábra). A "csukott" állapotot az biztosítja, hogy az operátorhoz az ún. *represszor* fehérje kötődik, megakadályozva, hogy az RNS polimeráz átírja a *Lac* operon *z*, *y* és *a* génjeit.

A represszor fehérje az *i* gén a terméke. Az *i* gén - ritka kivételként - annak az operonnak az egyik szomszédja, amely expresszióját szabályozza. Az *i* gén nem része a *Lac* operonnak. Az *i* gén bár csak kis mértékben, de *konstitutívan* (folyamatosan) expresszálódik, biztosítva, hogy a baktérium sejtekben mindig legyen néhány represszor fehérje molekula.



13.3. ábra. A *Lac* operon szerkezete.

Ha laktóz (induktor) kerül a baktérium sejtek környezetébe, a sejtbe bekerülő valamelyik laktóz molekula kapcsolódik a represszor fehérjével. Miután laktózzal kapcsolódott, megváltozik a represszor térbeli szerkezete, olyan ún. *allosztérikus* változás történik, ami nyomán az induktor-represszor komplex leválik az operátorról, az operon mintegy "kinyílik", *derepresszált* állapotba kerül. A derepresszált állapotban kezdődhet el a *Lac* operon *z*, *y* és *a* génjeinek transzkripciója, a poligénikus mRNS képződése és transzlációja. Végeredményben annak a három enzimnek a szintézise, amelyek a laktóz hasznosításához szükségesek. (Emlékeztetünk arra, hogy laktóz hiányában is van a sejtekben néhány az enzimmolekulából. Rájuk azért van szükség, hogy a közegbe kerülő laktóz molekula bejusson a sejtekbe, a laktózt "észlelhessék" a baktériumok.) Ha elfogyott a közegből a laktóz (az induktor), a represszor fehérje ismét kötődik az operátorhoz, "becsukja", és represszálva tartja a *Lac* operont (13.4. ábra). A β-galaktozidáz molekulák lebomlanak, hogy anyaguk hasznosulhasson.



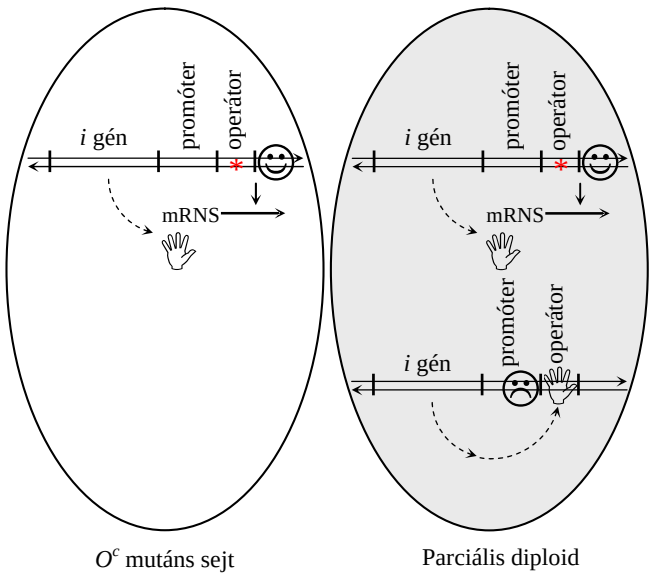
13.4. ábra. A *Lac* operon expressziójának szabályozása. A jelölések a következők: ☹ akadályba ütközött RNS polimeráz; ☺ transzkripciót végző RNS polimeráz; ✋ az operátorhoz kötődött represszor fehérje; / induktor (itt: laktóz); az induktorral kapcsolódott ✍ represszor fehérje.

Mutációk és a *Lac* operon funkciója

A fent leírt mechanizmusra Francois Jacob, Jacques Monod és munkatársaik (1960) olyan mutánsok vizsgálata révén derítettek fényt, amelyek megváltoztatták a *Lac* operon szabályozhatóságát. A következőkben azt tekintjük át, hogy melyek voltak a legfontosabb mutációk és jellemzőik, és hogy miként derült fény a *Lac* operon létére, valamint azokra a mechanizmusokra, amelyek a *Lac* operon expresszióját szabályozzák.

1. O^c, az *operátor konstitutív* mutáció. A mutánsok között volt olyan, amely esetében a sejtek attól függetlenül tartalmazták bőségesen mindhárom enzimet, hogy a tápközegben volt laktóz vagy sem. Abból, hogy egyetlen mutáció egyszerre három gén expresszióját változtatta meg arra lehetett következtetni, hogy a három gén expressziójának szabályozása együttesen történik. Az O^c mutáció úgy változtatta meg az operátort, hogy a represszor nem tudott hozzá kapcsolódni, következésképpen a *Lac* operon folyamatosan, konstitutíven expresszálódik. Kézenfekvő, hogy a mutáció neve ez: *operátor konstitutív*, O^c.

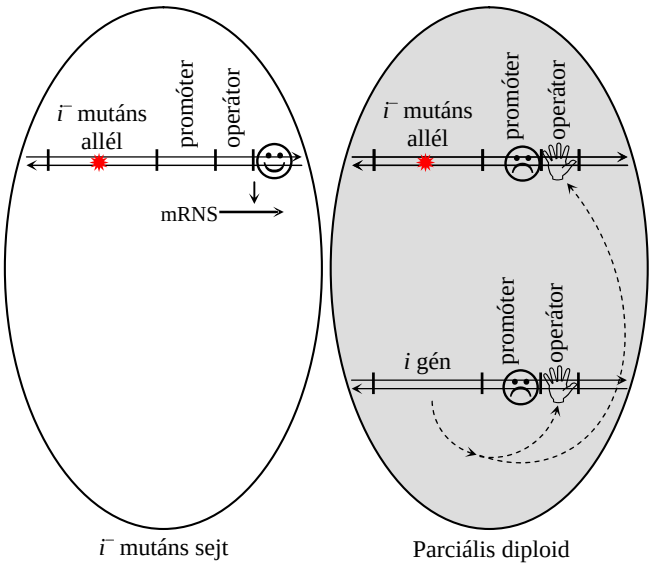
Sőt, amikor a baktérium saját kromoszómája mellé (egy plazmid részeként) egy ép *Lac* operont és egy ép *i* gént vittek be, az ún. parciális diploid* baktériumok továbbra is termelték mindhárom enzimet. Érthető, hiszen a baktérium saját *Lac* operonja szabályozhatatlan. Vagyis az O^c mutáció domináns, „éli saját életét" (13.5. ábra).



13.5. ábra. Az O^c mutáció (*) domináns, mert a parciális diploidokban is folyamatosan képződik mindhárom *Lac* operon-kódolt enzim. A jelek jelentését a 13.4. ábra szövege összegzi.

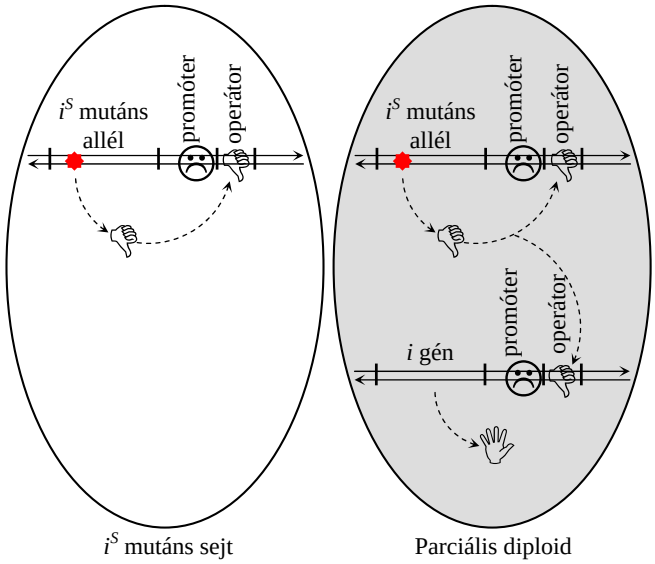
* A parciális diploid sejtek a baktérium kromoszóma mellett egy ép *Lac* operont és egy ép *i* gént is hordoznak. Az ép *Lac* operon és az ép *i* gén egy plazmid része.

2. Az i^- mutáció. Jacob és Monod mutagenezis kísérleteiből olyan mutánsok is származtak, amelyek attól függetlenül termelték a három enzimet, hogy volt a tápközegben laktóz, vagy sem. Ha ellenben a sejtek saját kromoszómája mellé egy ép *Lac* operont és egy ép *i* gént vittek (a parciális diploidokban), a sejtek viselkedése normalizálódott: laktóz hiányában nem termelték az enzimeket, ám laktóz jelenlétében indukálni lehetett bennük a három enzim képződését (13.6. ábra). Jacob és Monod arra következtetett, hogy a mutáns sejtekből hiányzik az a represszor fehérje, amely szabályozhatná a *Lac* operon működését. Represszor hiányában pedig folyamatosan expresszálódhat az operon. (Innen a mutáció i^- jele.) A parciális diploidokban viszont képződik ép represszor, ami viszont szabályozni tudja mindkét *Lac* operon funkcióját. Az i^- mutáció tehát recesszív.



13.6. ábra. Az i^- mutáció (✹) recesszív, mert parciális diploidokban szabályozott mindhárom *Lac* operon-kódolt enzim képződése. A jelek jelentését a 13.4. ábra szövege összegzi.

3. Az i^S mutáció esete. A mutagenezis kísérletekből olyan mutációk is származtak, amelyek következményeként a *Lac* operon mintegy örökre bezárult: nem képződtek *Lac* operon-kódolt enzimek sem a mutáns sejtekben, sem a parciális diploidokban, függetlenül attól, hogy volt a táptalajban laktóz, vagy sem. A mutáció hatása túlzott (szuper) volt, innen a neve: i^S. Az i^S mutáció az *i* gén azon pontját változtatta meg, amely a represszornak a laktóz (induktor) kötő részét kódolja. A mutáns represszor ugyan képes az operátorhoz kapcsolódni, de onnan laktózzal nem távolítható el, örökre bezárja az operont. Ha a mutáns sejtekbe ép *Lac* operonokat és ép *i* géneket viszünk (plazmidok részeként), az i^S-kódolt mutáns represszor molekulák előbb-utóbb az összes *Lac* operont bezárják (13.7. ábra). Nyilvánvaló, hogy az i^S mutáció domináns. Valójában az i^S mutáció a *funkciónyeréses* típusú mutációk jellegzetes példája: a domináns mutáns fenotípus alapja olyan mutáns fehérje képződése és funkciója, amelyet a mutáns allél kódol. Az i^S mutáció egyben példa az ún. *domináns negatív mutációkra*: a mutáns allél géntermeke vetélkedik az ép allél termékével, és akadályozva annak funkcióját. A mutáns géntermék hatását olykor csak sok ép gén termékével lehet visszaszorítani, kompenzálni.



13.7. ábra. Mivel az i^S mutáns allél (✹) által kódolt represszorhoz (👎) nem tud laktóz (induktor) kötődni, a mutáns géntermék örökre bezárja a *Lac* operonokat. A jelek jelentését a 13.4. ábra szövege összegzi.

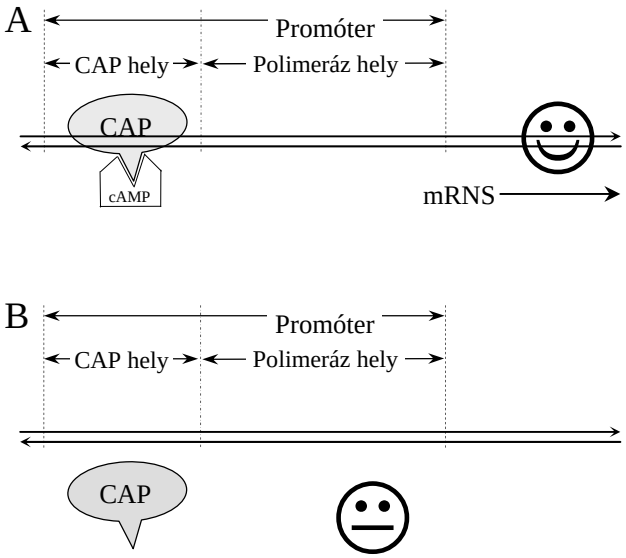
Katabolit represszió

A baktérium sejtek nem csupán arra képesek, hogy valamely szénforrás (katabolit) jelenlététől függően a szénforrás hasznosításához szükséges enzimeket szintetizálják, hanem képesek „válogatni” a szénforrások között. Érthetően azt a szénforrást választják, amely energia tartalma gyorsan és “olcsón” hozzáférhető.

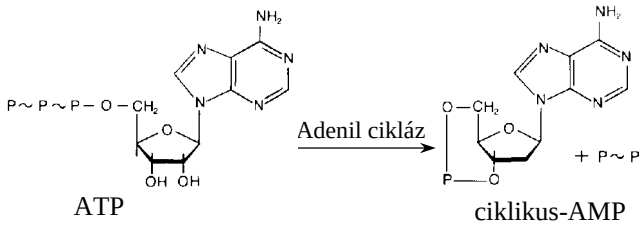
Ha pl. az *E. coli* sejtek glükóz és laktóz között választhatnak, először a glükózt „fogyasztják el”, és csak azután „fanyalodnak” a laktózra, miután a glükóz már elfogyott. Vajon mi az ún. *katabolit represszió* (a választás képessége a szénforrások közül) mechanizmusa?

A *Lac* operon promóter régiójában nem csak olyan hely van, ahová az RNS polimeráz kötődik, hanem egy másik, ún. CAP hely is. A CAP helyre az ún. katabolit aktivátor protein (CAP) kötődik (13.8. ábra). A CAP fehérje azonban csak azután tud a CAP helyéhez kötődni, ha előzően ciklikus AMP-vel (cAMP) kapcsolódott. A cAMP a nagy biológiai hatású szabályozó jellegű molekulák egyike. A cAMP-t az adenil cikláz enzim készíti ATP-ből (13.9. ábra). Az RNS polimeráz csak akkor tud a polimeráz helyhez kapcsolódni és elkezdeni a *Lac* operon transzkripcióját, ha a CAP helyre cAMP-CAP komplex kötődött (13.8. ábra). Minthogy a glükóz gátolja az adenil cikláz enzim aktivitását, glükóz

jelenlétében nem képződik cAMP. Ha nincs cAMP, akkor nincs minek kapcsolódni a CAP fehérjéhez, a CAP fehérje nem tud a *Lac* operon promóterének CAP helyéhez kapcsolódni. Ha a CAP hely üres, az RNS polimeráz sem tud kapcsolódni, tehát a *Lac* operon zárva marad, represszált. Ha ellenben a tápközegből elfogy a glükóz, megszűnik a glükóz adenil cikláz aktivitást gátló hatása, az adenil cikláz újból készít cAMP-t, a cAMP kapcsolódhat a CAP fehérjével, a cAMP-CAP komplex a promóter CAP helyéhez kacsolódhat, megteremtve a lehetőséget az RNS polimeráz kapcsolódásához, a *Lac* operon transzkripciójához (13.8. ábra). (Zárójelben jegyezzük meg, hogy a sejtekben bár lassan, áme mindig funkcionál az ún. cAMP foszfodieszteráz enzim, amely a cAMP-t inaktív AMP-vé bontja.)



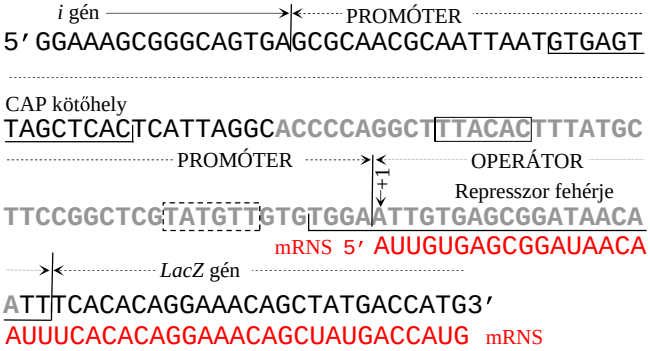
13.8. ábra. A katabolit represszió mechanizmusa. Részletes magyarázat a szövegben.



13.9. ábra. Az adenil cikláz enzim ATP-ből cAMP-t készít.

A CAP fehérjére tehát szükség van a *Lac* operon expressziójához. A CAP fehérje az ún. *pozitív regulátorok* jellegzetes példája: ha jelen van, expresszálódik a gén, ha nincs jelen, a gén nem expresszálódik. A CAP fehérjével szemben a represszor fehérje a *negatív regulátorok* jellegzetes példája: ha jelen van, gátolja az operon expresszióját.

Miután megszekvenálták a *Lac* operon promóter régióját arra derült fény, hogy a CAP és az RNS polimeráz kötő helyet is ún. palindrom szekvenciák alkotják, olyan szekvenciák amelyek nukleotid sorrendje a DNS mindkét szálán azonos az 5'→3' irányban olvasva (13.10. ábra). (A *gézakékazég* a legismertebb palindromok egyike.)



13.10. ábra. A nukleotidok sorrendje a *Lac* operon szabályozó szakaszában. Az üresen bekeretezett rész azt a konzervált szekvenciát jelöli, ahol az RNS polimeráz „megveti az egyik lábát". A szaggatott vonallal bekeretezett rész az ún. TATA-box. A transzkripció a +1 jelű nukleotidnál kezdődik. Az ábrán azok a szekvenciák is fel vannak tüntetve, amelyekhez a katabolit aktivátor (CAP), illetve a represszor fehérje kapcsolódik. Az RNS polimeráz által lefedett részt szürke, kövér betűk jelölik.

A REPRESSZÁLHATÓ OPERON

Az indukálható operonok funkciójára elsősorban olyan esetekben van szükség, amikor a tápközegben pl. szénforrás bukkan fel, olyan molekulák, amelyeket le lehet bontani, belőlük az életfunkciókhoz szükséges energia nyerhető. Mi történik azokban az esetekben, amikor olyan anyagok bukkannak fel a baktériumok környezetében, amelyeket maguk is el tudnak készíteni? Nyilvánvaló, hogy nem érdemes az olyan vegyületek szintézisével bajlódni, amelyek készen, szinte ingyen vehetők fel a környezetből. Azokat a géneket, operonokat, amelyek az illető vegyület szintéziséért felelősek érdemes bezárni, *represszálni*. A triptofán operon az ún. **represszálható operonok** jellegzetes példája. A következőkben azt tekintjük át, hogy miként „működik" a triptofán operon.

A triptofán operon

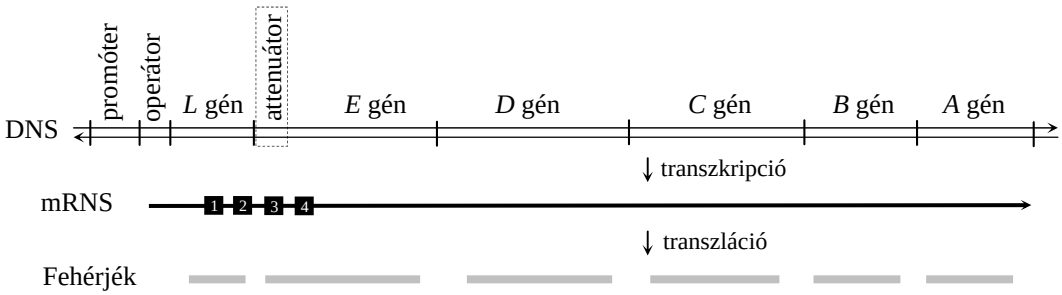
A triptofán operonban hat gén együttes kifejeződése szabályozott. Azé a hat géné, amelyek a triptofán bioszintézist végzik (13.11. ábra). A triptofán operon esetében a promóter funkciójának eredményeként poligénikus mRNS képződik. A poligénikus mRNS alapján képződik a hat különféle enzim.

A triptofán operon expressziója a következő módon szabályozott. A távoli, és konstitutívan expresszálódó *P* gén terméke, a represszor fehérje önmagában nem képes a triptofán operon operátor helyéhez kapcsolódni. (Nem úgy, mint a *Lac* represszor, amely egyedül képes kapcsolódni a *Lac* operon operátorához.) A triptofán operátor represszora csak azután képes az operátorhoz kötődni, miután előbb triptofánnal kapcsolódott. A triptofán-represszor

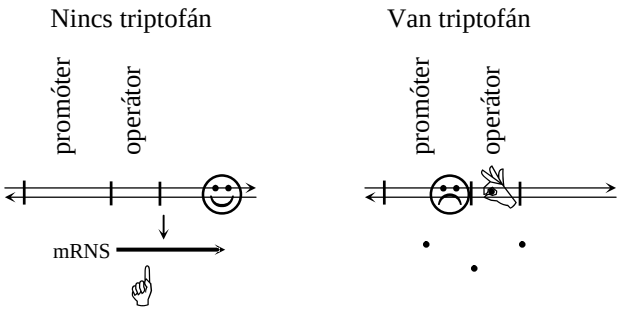
komplex az operátorhoz kötődik, és megakadályozza, hogy az RNS polimeráz átírja a triptofán operont, végeredményben tehát represszálja a triptofán operont (13.12. ábra). A represszorral együttműködő, a triptofán operont repressziójában résztvevő triptofánt szokás *ko-represszornak* is nevezni.

Attenuáció és az attenuátor

A represszálható operonoknak része az ún. *attenuátor*, az a DNS szakasz, amellyel egyrészt hatékonyan tudják represszálni az operon funkcióját, illetve azt finoman tudják hangolni. Az attenuátor nem része a promóternek, hanem az operonnak azon a részén van, amely a transzkripció során átíródik (13.13. ábra).

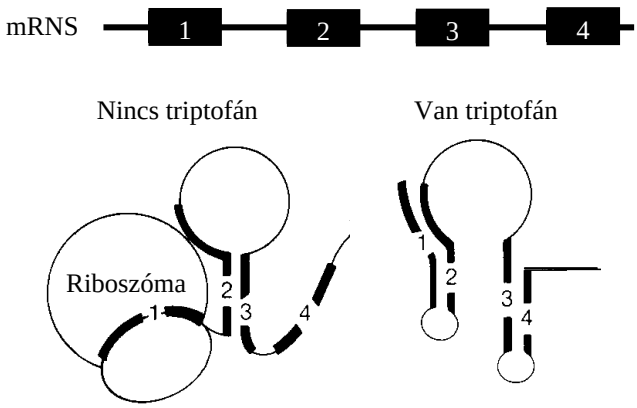


13.11. ábra. A triptofán operon sematikus ábrázolása. Az operon alapján egy olyan poligénikus mRNS képződik, amely hat fehérjefeléleség képződését kódolja. Valamennyinek a triptofán bioszintézisben van szerepe. Az mRNS négy kivastagított szakaszának szerepét az attenuációban a 13.13 ábra magyarázza részletesen. Vegyük észre, hogy az mRNS 3. szakaszát a DNS attenuátor része kódolja



13.12. ábra. A triptofán operon ki-, illetve bekapcsolásának mechanizmusa. Ha nincs triptofán a baktériumok környezetben, a triptofán operon nyitva van: minthogy a szabályozó fehérje (☝) nem tud az operátorhoz kapcsolódni, az RNS-polimeráz (☺) átírja az operont, mRNS és olyan fehérjék képződnek, amelyek funkciója nyomán a baktérium triptofánt készít. Triptofán (•) jelenlétében úgy változik meg a szabályozó fehérje (👌) szerkezete, hogy kötődni tud az operátorhoz, és bezárja az operont.

Ha tehát nincs a tápközegben triptofán, a triptofán operon expresszálódhat: képződnek a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek, a baktérium saját maga készíti el a létéhez szükséges triptofán molekulákat. Ellenben ha a tápközegben van triptofán, a sejtbe bejutó triptofán kapcsolódik a represszor fehérjével. A triptofán-represszor komplex az operátorhoz kötődve represszálja (kikapcsolja) azt a triptofán operont, amely funkciójára pillanatnyilag incs szükség. A baktérium a környezetéből szerzi be az olcsó triptofánt.



13.13. ábra. Az Az attenuáció mechanizmusa. részletes magyarázat a szövegben.

Az attenuáció mechanizmusának megértéséhez emlékezzünk arra, hogy prokariotákban az mRNS molekulák transzlációja már akkor elkezdődik, amikor az mRNS-nek még csak az 5’ végi része képződött. Az mRNS mentén haladnak a riboszómák, miközben aminosavakat építenek be a képződő fehérjébe. Nos, ha nincs a tápközegben triptofán (vagy csak kevés), amit beépíthetne a képződő fehérjébe, a riboszóma nem (vagy csak lassan) halad az mRNS mentén. Ebben az esetben az mRNS 3. jelű szakasza a 2-al párosodik, és olyan szerkezet alakul ki, amely nyomán az RNS polimeráz folytathatja az operon átírását, mRNS, majd olyan fehérjék képződhetnek, amelyek triptofánt szintetizálnak, a baktérium élheti életét. (Ne feledjük: prokariotákban az mRNS-ek transzlációja már akkor elkezdődik, amikor az mRNS-nek még csak a kezdeti szakasza képződött.) Ha a tápközegben bőven van triptofán, a riboszómák gyorsan haladhatnak az mRNS mentén, amely esetben az mRNS 3. jelű szakasza a 4-el párosodik. Most két olyan RNS-hurok képződik, amelyek jelenlétében az RNS polimeráz „leesik” a DNS-ről, befejeződik a transzkripció. Ha nincs transzkripció, nem képződnek a triptofán szintéziséhez szükséges enzimek, a baktérium nem pocsékolja feleslegesen energiáját

triptofán szintézisre, az „olcsó” triptofánt a környezetéből veszi fel. A 2/3 párosodás esetén viszont nem történik korai transzkripció termináció, hanem teljes hosszúságú poligénikus mRNS molekulák képződnek. A poligénikus mRNS molekulák transzlációja nyomán pedig olyan enzimek készülnek, amelyek lehetővé teszik a létfontosságú triptofán molekulák szintézisét, a baktérium életben maradását és szaporodását.
(13.13. ábra).

ÖSSZEFOGLALÁS

Amint azt a 13. fejezetben áttekintettük, a baktériumok génjei a körülményeknek és az igényeknek megfelelően expresszálódnak: képződnek a bennük kódolt genetikai információ alapján funkcionális fehérjék, vagy éppenséggel „zárva” maradnak. Az operonok és a poligénikus mRNS-ek a genetikai információ kibontakozásának hatékony megoldásai, eszközei. A gének expresszióját olyan jellegzetes DNS szakaszok szabályozzák, amelyekhez speciális fehérjék kapcsolódhatnak. A 13. fejezetben példát láttunk mind a pozitív, mind a negatív szabályozás típusokra. Egy biztos: a baktériumok rendelkeznek azokkal az eszköztárral (az operonokkal), amelyekkel hatékonyan hasznosíthatják környezetük forrásait.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology (2009), 342-352.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis (2000), 335-348.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology (2000), 341-358.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology (1998), 257-264.
5. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics (1989), 522-537.

14. A GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA EUKARIOTÁKBAN.

A differenciális génexpresszió. Sejtdifferenciáció és a sejtek DNS tartalma. Az eukariota gének expresszióját szabályozó DNS szakaszok. Transzkripciós faktorok. DNS-kötő fehérje motívumok. Riporter gének. A génexpresszió szabályozás szintjei. Kromatin és génexpresszió. Mikro-RNS-ek és RNS-interferencia. Jelek eukariota gének szabályozásához. Szignáltranszdukció.

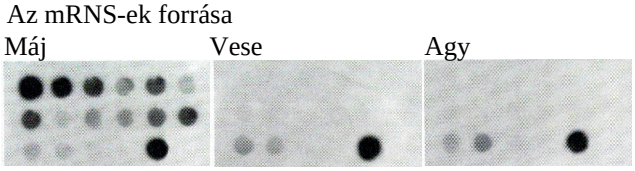
A fejezetet szabad János egyetemi tanár állította össze 2010. őszén.

BEVEZETÉS

A prokariota élőlények életében a génexpresszió szabályozás célja elsősorban az, hogy a baktérium a leghatékonyabban alkalmazkodjon környezetéhez. Mivel a soksejtű eukariota élőlények sejtjei meglehetősen állandó környezetben élik életüket, bennük a génexpresszió szabályozásának elsődleges célja nem a környezethez való alkalmazkodás, hanem a sejtdifferenciáció kiteljesedése az egyedfejlődés folyamán, az élőlény sejtfunkcióinak összehangolása. Milyen mechanizmusok biztosítják a soksejtű élőlényekben, hogy a gének a megfelelő sejtekben, a megfelelő időben és mértékben fejeződjenek ki (= expresszálódjanak)? Melyek azok a DNS szakaszok, amelyek a gének kifejeződésében szerepet játszanak? Milyen fehérjék és hogyan szabályozzák a gének expresszióját? Milyen szintjei vannak a génexpresszió szabályozásnak. Hogyan "érzékelik" a sejtek a jeleket és hangolják át génjeik expresszióját? A jelen fejezet célja a fenti kérdések megválaszolása.

A differenciális génexpresszió

A soksejtű eukariota sejtek testét kétféle sejt alkotja: (i) az ún. ivarsejt-vonal sejtek, amelyekből a kifejlett élőlény ivarsejtjei származnak, valamint (ii) az ún. testi sejtek, amelyekből a legtöbb élőlényben nem származnak utódok. (A kivételek zömét az ivartalan szaporodás különféle típusai jelentik.) Vajon a testi sejtek mindegyikében minden gén expresszálódik? A kérdést a következő kísérlet alapján válaszolhatjuk meg. Kössünk különféle cDNS-eket egy nitrocellulóz szűrőpapírhoz (14.1. ábra). (A cDNS-ek olyan DNS féleségek, amelyeket az ún. reverz transzkriptáz enzim szintetizál mRNS-ek alapján. Ne feledjük: ha egy gén expresszálódik, a benne tárolt genetikai információ alapján mRNS molekulák képződnek.) A cDNS-ek olyan mRNS féleségek alapján képződtek, amelyeket májsejtekből izoláltak. Adjunk máj, vese, valamint agysejtekhez ^{32}P-UTP-t. (A ^{32}P-UTP csak az RNS molekulákba épül be. Jelzi, ha valamely gén átíródik, mRNS molekulák képződését irányítja.) Izoláljunk össz-mRNS mintákat azokból a máj, vese és agysejtekből, amelyek ^{32}P-UTP jelenlétében élnek, és végezzünk el egy hibridizációt, amely során a ^{32}P-UTP-vel megjelölt mRNS-ek a nitrocellulóz szűrőpapírhoz kötött cDNS-ekkel állhatnak párba, az mRNS molekulák párosodnak a cDNS-ek komplementer szálaival. Az autoradiográfia módszerével el lehet dönteni, hogy képződött az illető sejttípusban valamely gén alapján mRNS vagy sem: ha expresszálódik a gén, képződik ^{32}P-jelzett RNS, amely hibridizál a cDNS komplementer szálával, és az autoradiogramon sötét folt képződik (14.1. ábra). Nyilvánvaló, hogy ha nincs jel az autoradiogramon, nincs olyan ^{32}P-el megjelölt mRNS, ami a cDNS-el hibridizálhatna, vagyis nem expresszálódik az a gén, amelyet a cDNS reprezentál. A 14.1. ábra alapján nyilvánvaló, hogy (i) van olyan gén, amely alapján a máj, a vese és az agysejtekben is képződik mRNS. (Példa a harmadik sor első, második és ötödik helyén levő cDNS, amelyek az aktin, az egyik α-tubulin féleség, valamint az egyik tRNS génnek felelnek meg. Az aktin, az α-tubulin és a tRNS gének az ún. *háztartási* gének jellegzetes példái. A háztartási gének funkciójára minden sejtnek szüksége van. (ii) Vannak olyan gének, amelyek csak az egyik sejttípusban expresszálódnak, más sejttípusokban nem. A jelenség neve a *differenciális génexpresszió*. (iii) A különféle gének expressziójának mértéke erősen változó. Nyilvánvaló, hogy vannak olyan mechanizmusok, amelyek szabályozzák, hogy mely sejttípusban, mely gének expresszálódjanak, és szabályozni tudják a gének expressziójának mértékét is.



14.1. ábra. A differenciális génexpresszió bemutatása. Olyan nitrocellulóz szűrőpapírokról készült autoradiogramok, amelyekhez foltokban olyan cDNS molekulák vannak kötve, amelyek májsejtekből izolált mRNS-ek alapján készültek. A szűrőpapírokhoz ^{32}P-vel jelzett RNS-eket hibridizáltak. A ^{32}P-vel megjelölt RNS-eket máj-, vese-, valamint agysejtekből izolálták.

A sejtek DNS tartalma a differenciáció folyamán

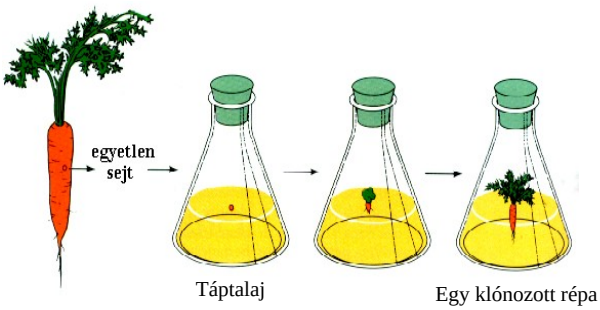
Egy lehetőség szerint azért nem expresszálódik valamely gén valamely sejttípusban, mert a sejt nem tartalmazza az illető gént. Elképzelhető, hogy az egyedfejlődés során, miközben egy testi sejttípus valamely speciális feladat elvégzésére differenciálódik, elveszti azokat a géneket, amelyekre nem lesz szüksége hátralevő élete során. A feltételezés nem alaptalan. Vannak olyan féreg- és rovarfajok, amelyek testi sejtjeinek differenciálódása során kromoszómák vagy kromoszóma részek vesznek el. A jelenség neve a kromoszóma diminúció, mechanizmusa pedig a következő: kromoszómák vagy kromoszóma részek erősen kondenzálódnak (úgy, mint a heterokromatin), majd a sejtosztódások során elvesznek a sejtekből.

Itt említjük meg a kromoszóma(rész) eliminációjával ellentétes folyamatot, a génamplifikációt, amely folyamat során a DNS olykor meglehetősen nagy szakaszai replikálódnak, és élnek a kromoszómától független életet. A DNS kópiák tovább replikálódnak, miáltal néhány (olykor csak egyetlen) gén kópiaszáma megsokszorozódik. Ismert példa a selyemhernyó nyálmirigy sejtjeiben a gubó képződése során az ún. selyem gének amplifikációja, valamint az ún. multidrog rezisztencia gén amplifikációja a daganatsejtek bizonyos típusaiban. A multidrog rezisztencia fehérje a sejthártyába épül, és mert kipumpálja a sejtekből az oda nem való molekulákat, lecsökkenti a kemoterápia hatékonyságát.

Vajon a magasabb rendű élőlények differenciálódott sejtjei tartalmaznak minden gént? Vagy belőlük is vesznek el gének? A kérdésre a következő két kísérlet ad választ.

1. A sárgarépa klónozás tanulsága

Egy kísérletsorozatban sárgarépa sejteket különítettek el és tették egyenként steril táptalajra (14.2. ábra). A répasejt osztódni kezdett, az utódsejtek ún. kalluszt képeztek. Megfelelő hormon tartalmú táptalajra téve a kalluszból répa képződött. Az a tény, hogy egyetlen differenciálódott sejtből növényt lehetett regenerálni azt jelenti, hogy a kiindulási sejt tartalmazza mindazt a genetikai információt, amely a sejtek osztódáshoz, és a differenciálódásához szükséges, vagyis a répasejtből nem veszett el gén.

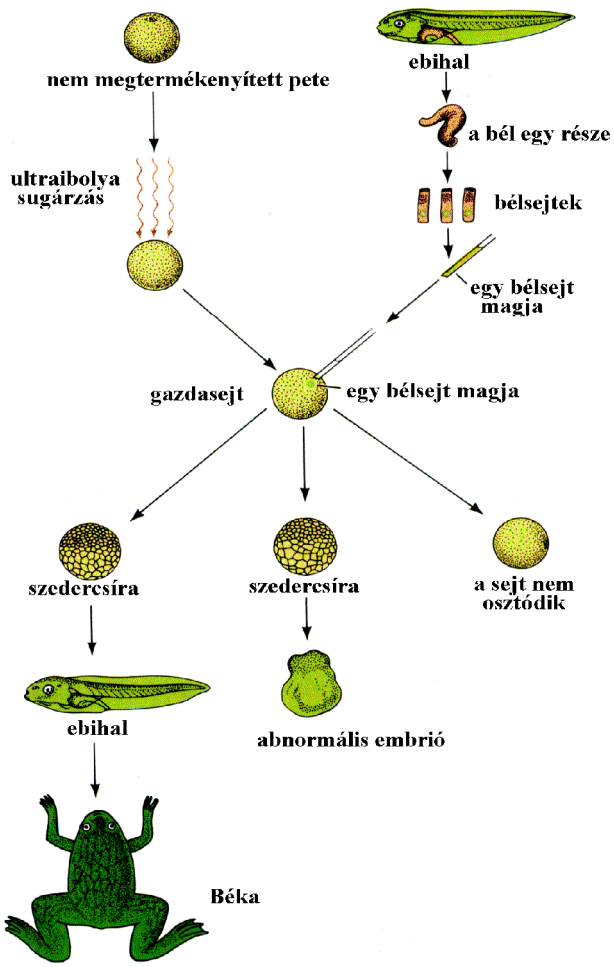


10.15. ábra. A sárgarépa klónozása. A répa terminálisan differenciálódott testi sejtjeinek mindegyikéből egy-egy répa regenerálható, jelezve, hogy a differenciálódott testi sejtek DNS tartalma nem változott a sárgarépa élete során.

A technika, hogy ti. egy növény sejtjeiből nagyon sok utódnövényt lehet előállítani, példa a klónozás egyik típusára, és mindennapos eljárás a növénynemesítésben. (Klón = egyetlen sejt vagy élőlény ivartalan szaporodással, szaporítással létrejött, azonos genotípusú leszármazottai.)

2. A béka klónozás tanulsága

Vajon az előző kísérlet tanulsága igaz az állatvilágban is? Igaz, amint azt először J. Gurdon az 1960-as évek közepén megmutatta. Gurdon az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) ebihal bélhámsejtjeiből, a terminálisan differenciálódott sejtek egyik típusából, izolált sejtmagokat (14.3. ábra). A sejtmagokat egyenként olyan meg nem termékenyített petesejtekbe ültette, amely sejtek magját előzőleg vagy eltávolította, vagy ultraibolya sugárzással tönkretette. A testi sejtek magját tartalmazó peték némelyikéből olyan békák fejlődtek, amelye utódai ma is élnek (14.3. ábra). A Gurdon kísérlet elegánsan bizonyítja, hogy a béka bélhámsejtek örökítő anyaga sem csökken a sejtdifferenciáció során. Sőt azt is, hogy a terminálisan differenciálódott sejt génexpresszió-mintázata áthangolható. A klónozás itt bemutatott módszerével készítették egyebek között Dollyt, a világhírű birkát is 1996-ban.



14.3. ábra. A béka klónozása. Béka fejlődhet abból a „zigótából”, amelyet úgy hoztak létre, hogy a sejtmagtól megfosztott petesejtbe ebihal bélhámsejt magját ültették.

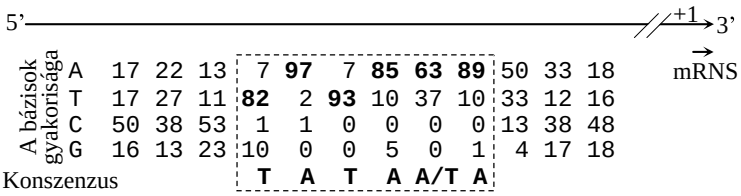
A génexpressziót szabályozó DNS szakaszok típusai

Nyilvánvaló, hogy a génexpresszió szabályozásához szükség van (i) olyan DNS szakaszokra, amelyek befolyással vannak a gének kifejeződésére és (ii) olyan fehérje molekulákra is, amelyek szabályozzák a gének transzkripcióját. A génexpressziót szabályozó DNS szakaszoknak három típusa ismeretes.

(1) **Promóter**

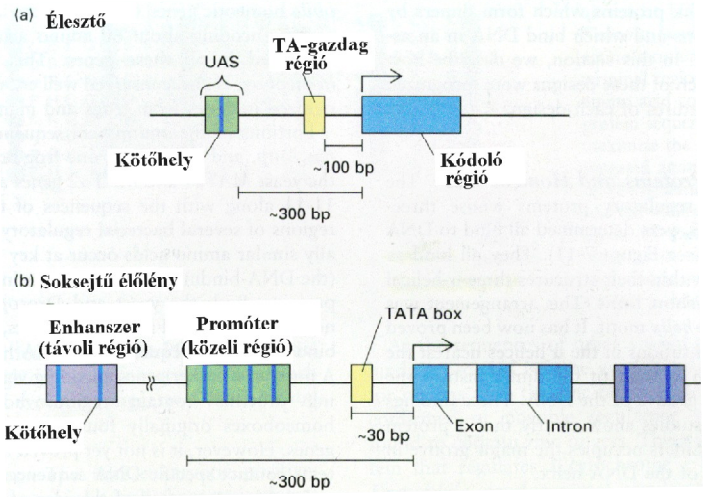
Amint azt a 8. fejezetekben áttekintettük, a gén átíródó részének 5’ vége közelében van az ún.

promóter, az a DNS szakasz, amelyhez - egyebek mellett - az RNS polimeráz enzim kapcsolódik. Az RNS polimeráz végzi a transzkripciót, a génexpresszió első lépését. Eukariotákban, mint a prokariotákban, a promóter része az A=T bázispárokban gazdag ún. TATA (Hogness) box, az evolúció folyamán erősen konzerválódott szekvenciák egyike (14.4. ábra).



14.4. ábra. Az ún. TATA box 60 eukariota gén promótere alapján.

A TATA box része a gén 5’ vége közelében levő kb. 300 bp-nyi DNS szakasznak (14.5. ábra). A promóterben olyan további DNS szakaszok vannak, amelyekhez a transzkripciót szabályozó fehérje molekulák, ún. *transzkripciós faktorok* kapcsolódhatnak. Minthogy a nevezett szekvenciák a gén 5’ vége közelében, “felfelé” vannak, élesztőkben UAS-nek (*U*pstream *A*ctivating *S*equences) nevezik őket. A soksejtű eukariota promóterekben olykor nagyon sok olyan DNS szakasz van, amelyekhez különféle transzkripciós faktor is kapcsolódhatnak. A kapcsolódó transzkripciós faktorok típusa, száma, kombinációja, a kapcsolódás helye és erőssége határozza meg, hogy mely sejttípusban és milyen mértékben expresszálódik a gén.

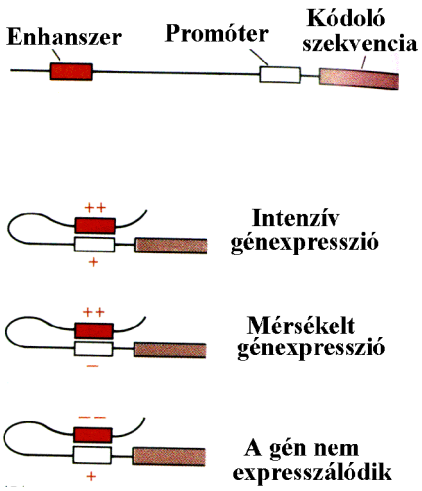


14.5. ábra. A génexpressziót szabályozó DNS szakaszok szerveződése egysejtű (élesztő) és soksejtű eukariota élőlényekben.

(2) **Enhanszer**
Az enhanszerek olyan DNS szakaszok, amelyekhez (i) transzkripciós faktorok kapcsolódhatnak, szabályozva a gén expresszióját, (ii) amelyek a szabályozott géntől olykor nagyon messze lehetnek (akár 100 kb-nyira), és (iii) a gén strukturális részéhez viszonyítva 5’ és 3’ irányban is lehetnek. Sőt az intronokban is lehetnek enhanszerek.

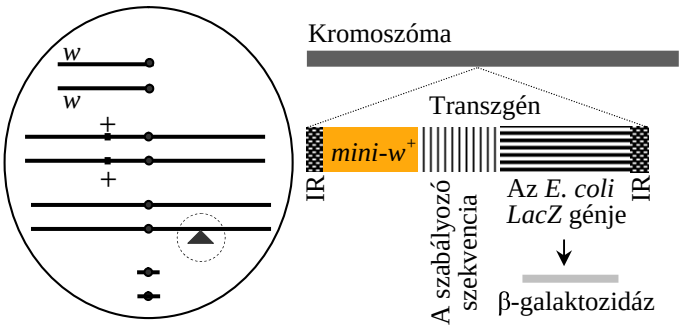
(3) **Szilenszer**
A szilenszerek olyan DNS szakaszok, amelyek csökkentik a gén kifejeződésének mértékét. A szilenszerek is lehetnek az 5’, a 3’ irányában vagy akár az intronokban is.

Hogyan szabályozhatják a génexpressziót az enhanszerek és a szilenszerek? Ne feledjük, hogy a gén a kromatin része, vagyis a promóter és pl. az enhanszer térben egymás közelében lehet. Ismerünk olyan fehérje molekulákat is, amelyek ácskapocsként hozzák egymás közelébe az enhanszert és a promótert. Egy biztos: a génexpresszió szempontjából fontos, hogy milyen fehérjék kapcsolódnak a génexpressziót szabályozó DNS szakaszokhoz, és fontos a DNS-fehérje komplex térbeli szerkezete is (14.6. ábra). Ismertek olyan esetek, hogy egyetlen foszfát csoport kiépülése a DNS-hez kapcsolódott fehérje molekulában drámai módon megváltoztatja a génexpresszió jellegét és mértékét.



14.6. ábra. A promóter és az enhanszer, illetve a hozzájuk kapcsolódó (+) illetve nem kapcsolódó (–) fehérjék szerepe a szabályozott gén expressziójára, illetve az expresszió mértékére.

A riporter gének és a transzgénikus élőlények szerepe a génexpresszió tanulmányozásában
A génexpresszió szabályozása lényegében olyan mechanizmusokat feltételez, amelyek funkcióképes fehérjék képződését jelentik (i) az egyedfejlődés megfelelő szakaszában, (ii) a megfelelő sejtekben és (iii) a megfelelő mértékben. Hogyan lehetne azonosítani azokat a DNS szakaszokat, amelyek egy adott gén kifejeződését szabályozzák? Hogyan lehetne kideríteni az egyes szakaszok szerepét a gén kifejeződésében? Az ún. *riporter* (vagy szonda) *gének* elegáns megoldást adnak a fenti kérdések megválaszolására (14.7. ábra).

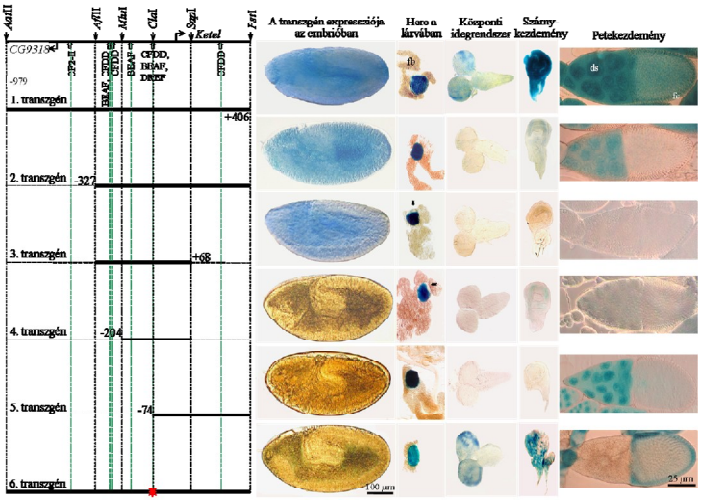


14.7. ábra. A riporter (szonda) gén szerkezete. Egy transzpozon fordítva ismétlődő szekvenciái (IR) a következő DNS szakaszokat fogják közre: (i) azt, amely a riporter gén expresszióját szabályozza, vagy annak módosított változatát. [Ugyanez a szekvencia szabályozza a tanulmányozott gén (+) expresszióját!] (ii) a riporter gént (itt az *E. coli LacZ* génjét), valamint (iii) egy ún. marker gént. (A marker gén itt *mini-w*$^+$, ami a *w*/*w* - *white* fehér szemek - háttéren narancssárga szemszínt eredményez). A fenti elemeket hordozó DNS szerkezet a kromoszómák egyikébe inszertálódott (▲). A kromoszómák annak a génnek két ép kópiáját (+) hordozzák, amely expresszióját szabályozó elemeket és szerepüket kívánjuk megismerni.

Vegyük azt a DNS szakaszt, amely tartalmazza azokat a szekvenciákat, amelyek a tanulmányozott gén kifejeződését szabályozzák (14.7. ábra). Készítsünk egy olyan ún. *kiméra gént*, amely különböző eredetű DNS szakaszokból áll: ligáljuk a szabályozó DNS szakaszt (vagy annak megfelelő részeit) pl. az *E. coli Lac* operonjának *lacZ* génjével. (A *lacZ* gén a β-galaktozidáz enzimet kódolja.) A kiméra génben a *lacZ* gén expresszióját a hozzá kapcsolt szakaszok szabályozzák. Lényegében a *lacZ* gén expressziója (a β-galaktozidáz enzim képződése) úgy alakul, amint a tanulmányozandó gén expressziója: a *lacZ* gén mint egy riporter tudósít a tanulmányozott (+) gén expressziójáról. Érthető, hogy a *lacZ* gént *riporter* (szonda) génnek nevezik. A β-galaktozidáz aktivitásának kimutatásához egy olyan színtelen X-gal nevű (β-galaktozid típusú) vegyületet szokás használni, amelyből a β-galaktozidáz enzim hatására kékszínű vegyület képződik (14.8. ábra). [Többféle riporter gén "van forgalomban", mint például a *luciferáz* enzim, amely funkciója eredményeként világítanak pl. a szentjános bogarak, egy medúza faj *zölden fluoreszkáló proteinje* (GFP), a *CAT* (klóramfenikol transzferáz) stb.]

A riporter gén felhasználásának két típusa van. (i) A fent említett kiméra gént eukariota sejtekbe juttatják (transzfektálják), és az ún. tranziens génexpresszió során követik a riporter gén expresszióját. A sejtekbe jutatott DNS szakaszok egy ideig jelen vannak, és funkcionálnak a sejtekben, majd degradálódnak. (ii) A fent említett kiméra gén széleire valamely transzpozon fordítva ismétlődő szekvenciáit ligálják, és ivarsejtvonal sejtekbe juttatják. Természetesen transzpozáz enzim jelenlétében, hogy a DNS "szerkezet" a kromoszóma DNS-be inszertálódhasson, hogy ún. transzformánsok képződ-jenek, amelyek stabilak, és utódaikra örökítik a *transzgént*. Az ivarsejt transzformáció során képződő élőlények *transzgénikusak*: saját DNS-ük mellett idegen fajból származó (vagy akár géppel szintetizált) DNS-t is hordoznak. Az alkalmasan megtervezett transzgén nem befolyásolja a sejtek funkcióját.

A szabályozó elemeket tartalmazó DNS szakaszok különböző kombinációit a riporter génnel kombinálva lehet azonosítani a génexpressziót szabályozó szakaszokat, megállapítani szerepüket a génműködés szabályozásában (14.8. ábra).



14.8. ábra. Riporter gének felhasználása annak megismerésére, hogy milyen DNS szakaszok biztosítják a Drosophila *Ketel* génjének expresszióját a különféle sejttípusokban. A transzgénekhez tartozó kivastagított szakaszok azt mutatják, hogy a promóter mely szakaszai voltak a *LacZ* génnel kombinálva. A kéken festődő szövetek azt mutatják, hogy bennük a riporter gén expresszálódik. (Részletesen lásd: Villányi et al. Mechanisms of Development **125**, 822–831206, 2008.)

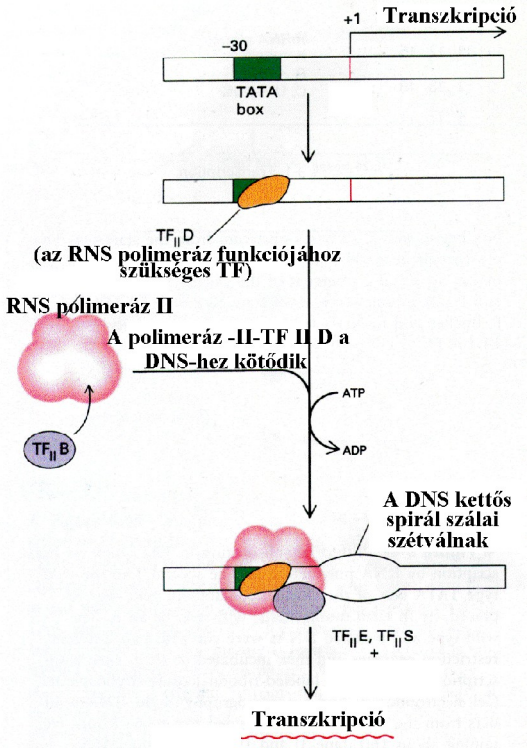
A DNS-kötő fehérjék jellemzői

A génexpresszió szabályozás további fontos tényezői a fehérje molekulák. Közülük a transzkripciót folytató RNS plimerázok szerepe kézenfekvő. Ám amíg a prokariotákban csak egyféle, addig az eukariotákban három különféle RNS polimeráz végzi a transzkripciót. (Lásd a 8. fejezetet.)

Az eukariota gének transzkripciójához nem elegendőek az RNS polimerázok. A transzkripció iniciációjához szükség van arra, hogy a promóter megfelelő szakaszához ún. *transzkripciós faktorok* (TF-ek) kötődjenek (14.9. ábra).

A transzkripciós faktorok olyan fehérje féleségek, amelyek közvetlen szerepet játszanak a transzkripció szabályozásában. Pl. a TFIID jelű a TATA boxokhoz kapcsolódik. Kapcsolódása úgy változtatja meg a fehérje és a DNS térbeli szerkezetét, hogy további TF-

ek, valamint az RNS polimeráz-II is csatlakozhat a komplexhez, és végül elkezdődhet a transzkripció. A TF-ek nemcsak a promóterhez, hanem az enhanszerekhez és a szilenszerekhez is kapcsolódhatnak. Némely TF minden sejtben jelen van, mások csak bizonyos típusú sejtekben, az egyedfejlődés bizonyos stádiumaiban, biztosítva a differenciális génexpressziót.



14.9. ábra. Az eukariota gének transzkripciójához nem csak az RNS polimerázra, hanem transzkripciós faktorokra (TF) is szükség van.

DNS-kötő fehérje motívumok

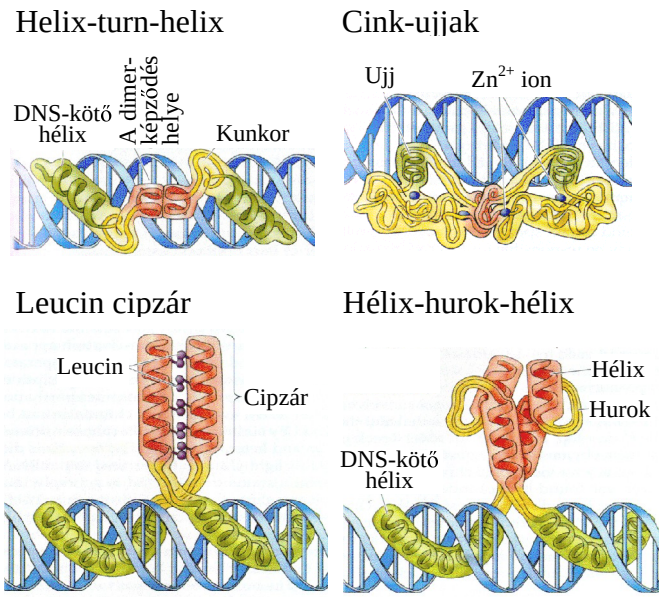
Azoknak a fehérjéknek, amelyek a DNS-hez kapcsolódhatnak olyan funkcionális egységeik (ún. doménjeik) vannak, amelyek szükségesek a kapcsolódáshoz. A legfontosabb DNS-kötő motívumok a következők (14.10. ábra).

(1) Az ún. *hélix-kunkor-hélix* (angolul helix-turn-helix) motívumot tartalmazó fehérjék dimert képezve kapcsolódnak a DNS-hez. Úgy, hogy a hélixek egyike a DNS nagy árkába illeszkedik, és ismeri fel a bázispárok megfelelő szekvenciáit. Helix-turn-helix motívumot tartalmaz egyebek között a triptofán operon expresszióját szabályozó represszor fehérje, vagy az a homeobox-kódolt domén, amelynek a testszelvények kialakulásban van fontos szerepe.

(2) Az ún. *cink-ujj* motívumokban egy Zn^{2+} ion úgy létesít kapcsolatot négy ciszteinnel, hogy a közbenső aminosavak ujjszerű kitüremkedést képeznek. Az ujjak a DNS nagy árkába illeszkednek, és alkalmas bázispár sorrendet felismerve a DNS-hez kapcsolják a fehérjét. A Zn-ujjakat tartalmazó fehérjék jellegzetes példái a szteroid hormon receptorok.

(3) A *leucin cipzárakban* a hidrofób leucin oldalláncok cipzárszerűen illeszkednek egymáshoz, miközben DNS-kötő fehérje motívum alakul ki (14.10. ábra). Leucin cipzárt tartalmaz pl. az ún. AP1 jelű fehérje, amely az emlős sejtek növekedéséhez és osztódásához szükséges. Az AP1 fehérje túlzott aktivitása (funkciónyeréses mutáció nyomán) sok rákos daganat forrása.

(4) A *hélix-hurok-hélix* (angolul helix-loop-helix) motívum pl. azoknak a fehérje féleségeknek a motívuma, amelyek az immunglobulinok és bizonyos izomfehérjék szintézisét kódoló gének expresszióját szabályozzák.

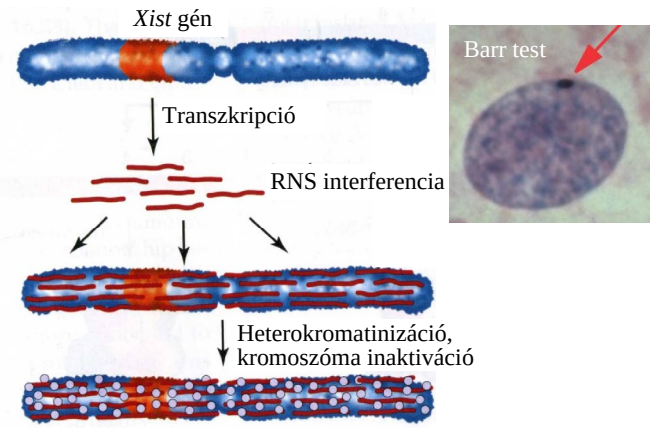


14.10. ábra. A DNS-kötő fehérje motívumok típusai.

A kromatin és génexpresszió

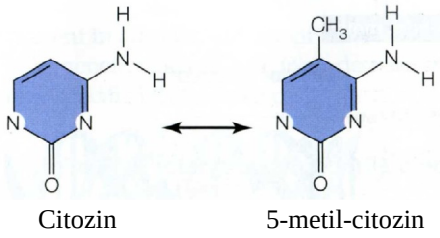
Bizonyos, hogy az eukariota génfunkciók szabályozásában a kromatinnak is szerepe van. Az eukariota genom nagy. (Emberben ~$3x10^9$ bp.) Nem kis feladat a genomonként kb. 30 ezer gén között a megfelelőt megtalálni, be- vagy kikapcsolni. Annál kevésbé, mert a DNS nukleoszómákra tekeredett, a nukleoszómák pedig szupertekercseket képeznek. Vannak olyan fehérje féleségek, amelyek a kromatinhoz kapcsolódva mintegy az alkalmas helyre irányítják a transzkripciós faktorokat. Ismertek olyan kromatin fehérjék, amelyek "nyitva tartanak" bizonyos kromatin szakaszokat, mások más kromatin szakaszokat "örökre bezárnak".

Az X kromoszóma inaktiváció lényegében a génexpresszió szabályozás olyan típusa, amely nőnemű emlősök sejtjeiben az egyik X-kromoszóma nagy részét, és persze a benne levő géneket inaktiválja. Az inaktiváció alapja a kromatin erős feltekeredése (Barr test képződése; 14.11. ábra). „Értelme" pedig az, hogy a nő- (XX) és a hímneműek (XY) sejtjeiben a X kromoszómához kapcsolt gének termékeinek dózisa azonos legyen a sejtekben. Az X kromoszóma inaktiváción alapuló mechanizmust szokás dóziskompenzációnak nevezni.



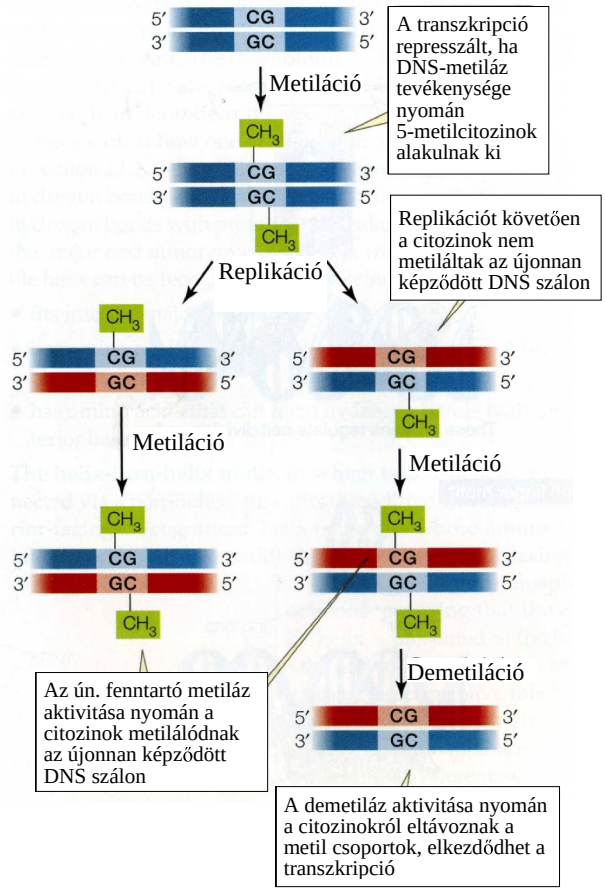
14.11. ábra. Az X kromoszóma inaktivácó mechanizmusának modellje. A Barr test az egyik, heterokromatinizálódott, inaktiválódott X kromoszóma. Az inkativáció első lépésében az X-kromoszómához kapcsoltan öröklődő *Xist* gén transzkripciója nyomán ún. interferáló RNS molekulák képződnek. Az interferáló RNS molekulák ahhoz az X kromoszómához kötődnek, amely *Xist* génjének alapján képződtek. A kötődés nyomán metilációk és deacetilációk játszódnak le, „heterokromatin" képződik, miközben az X kromoszóma inaktiválódik. Az ábra jobb oldala egy Barr testet mutat.

A kromatin szerkezet szabályozásának további módozatai is vannak. A citozinok metilációja (14.12. ábra) a promóterben azt eredményezi, hogy a metilált DNS-hez olyan fehérje molekulák csatlakoznak, amelyek megakadályozzák a transzkripciót. A metilált citozin sorsa úgy alakulhat, amint azt a 14.13. ábra mutatja.



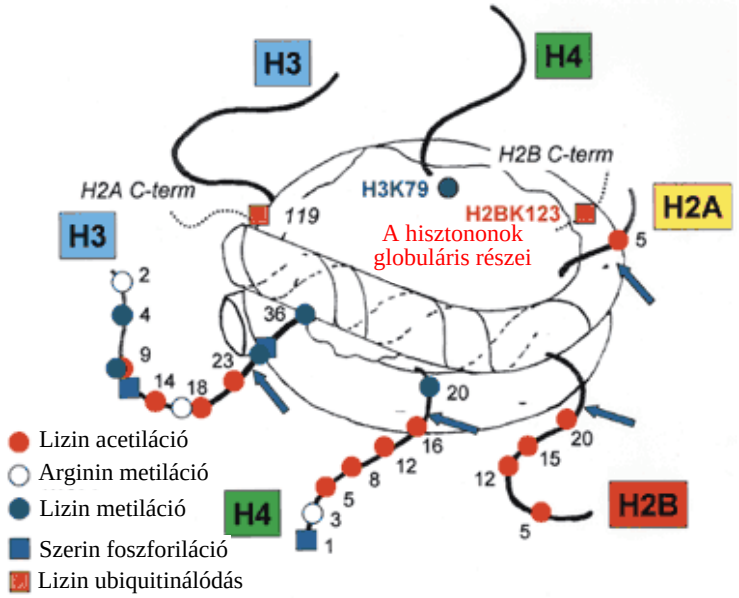
14.12. ábra. A citozin metilációja.

A DNS metilációjának szerepe különösen fontos az egyedfejlődés folyamán. A megtermékenyülés után először a spermiummal, majd a petesejtben érkezett gének demitilálódnak, aktiválódnak. Amint az embrió fejlődik, szövetei differenciálódnak, azok a génjeik, amelyekre immáron nincs szükség metilálódnak, inaktiválódnak, „elhalkíttatnak" (angolul: silenced). A metiláltság állapotának megváltozása, amint azt egy későbbi fejezetben látni fogjuk, gyakorta vezet rákos daganatok kialakulásához.

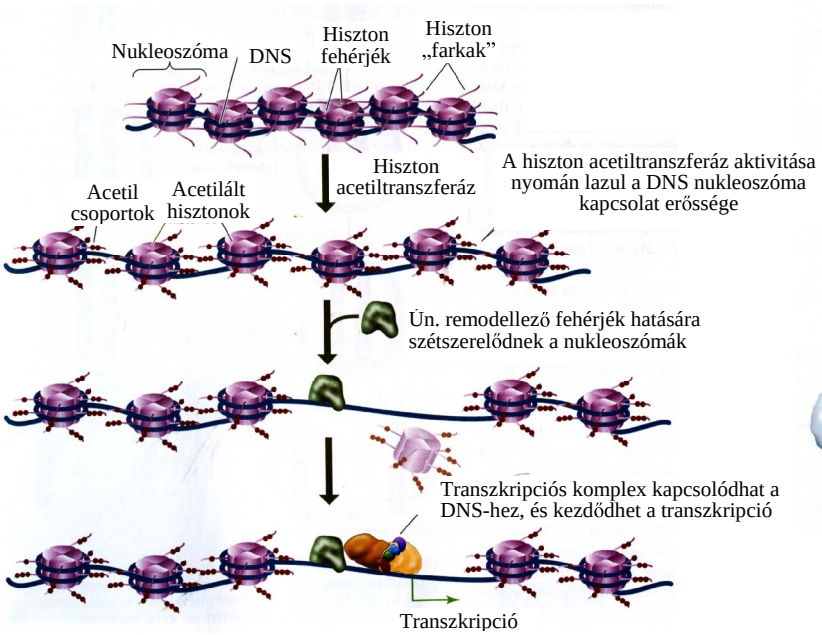


14.13. ábra. A metilált citozin lehetséges sorsai.

Az eukarioták sejtjeiben a DNS nukleoszómákra van feltekerve. (Lásd a 4.13. ábrát.) Ebben az állapotában a DNS-hez nem tud hozzáférni a transzkripciós apparátus. Amint azt a 14.14. ábra mutatja, minden hiszton féleségnek van olyan kb. 20 aminosav hosszúságú „farka" az N terminálisnál, amelyek kilógnak a nukleoszómákból (14.14. ábra). A „farkak" lizinjei, argininjei és szerinjei módosulhatnak (14.14. ábra). Az ún. hiszton acetiltranszferázok, amelyek acetil csoportokat kapcsolnak a lizin oldalláncokhoz, mintegy kinyitják a kromatint, lehetővé téve a transzkripciót. Ezzel szemben a hiszton deacetilázok, amelyek eltávolítják az acetil csoportokat, tömörítik a kromatint, megnehezítve a transzkripciót. A hisztonok metilációja a gének inaktiválódásához vezet. A szerinek foszforilációja pedig attól függően vezet gének aktiválódásához, vagy éppen inaktiválódásá-hoz, hogy melyik hisztonféleségnek melyik szerinjét érinti. A fent említett modifikációk reverzibilisek, különféle kombinációkban következhetnek be, és a gének aktivitását meglehetősen komplex módon szabályozhatják.



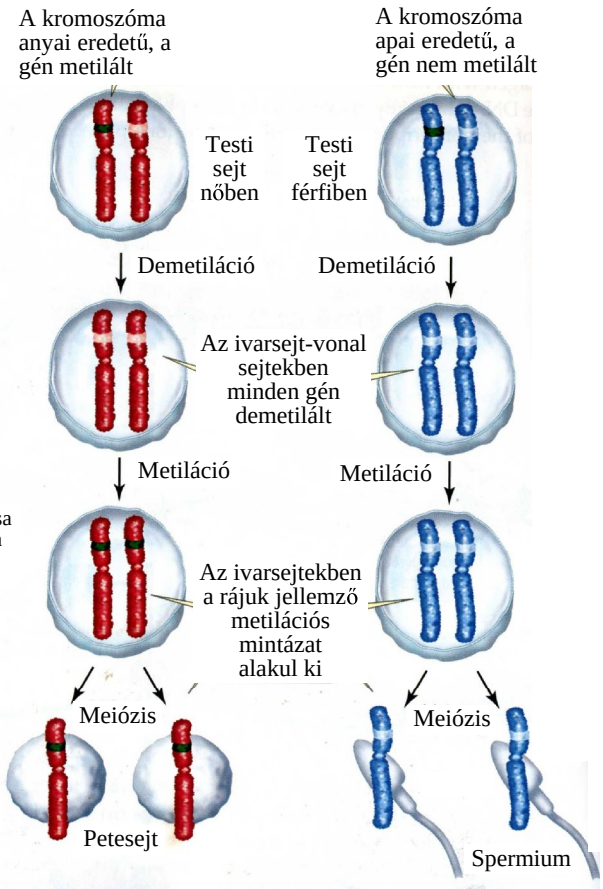
14.14. ábra. A hisztonok „farkában” levő aminosav oldalláncok ismert módosításai.



14.15. ábra. A hisztonok acetilációja és deacetilációja a kromatin lazítása tömörítése és révén teszi lehetővé, illetve lehetetlenné a gének expresszióját.

A kromatin fent említett változásai olyan, a kromoszómákkal kapcsolatos állapotot jelentenek, melyek anélkül öröklődnek sejtről sejtre, olykor generációról generációra, hogy a DNS genetikai információ tartalma változna. A fenti jelenséget epigenezisnek nevezik.

Emlősökben az ivarsejtek képződése folyamán a DNS a nemekre jellemzően metilálódik. A folyamat két lépésben történik (14.16. ábra). Először az 5-metil-citozinokról a demetiláz eltávolítja a metil csoportokat, majd a metiláz a megfelelő citozinokat metilálja. Az ivarsejtek képződése során a DNS megőrzi a metiláció új mintázatát, egyfajta epigenetikus információt (14.16. ábra). A DNS metilációs mintázata mintegy 200 génben különbözik a spermiumban és a petesejtben. Az ivarsejtekben bekövetkező metiláció mintegy előre programozza némely gén inaktivitását az utódban. A jelenség neve: genom imprintálódás, bevéső dés. A jelenség következ-ményei nyilvánvalóak. Ha pl. egy utód az anyától egy ép, ám metilált (inaktív) gént örököl, az apától pedig annak egy mutáns, funkcióképtelen változatát, bár heterozigóta a recesszív mutáns allélra, kifejeződik benne a mutáns fenotípus…

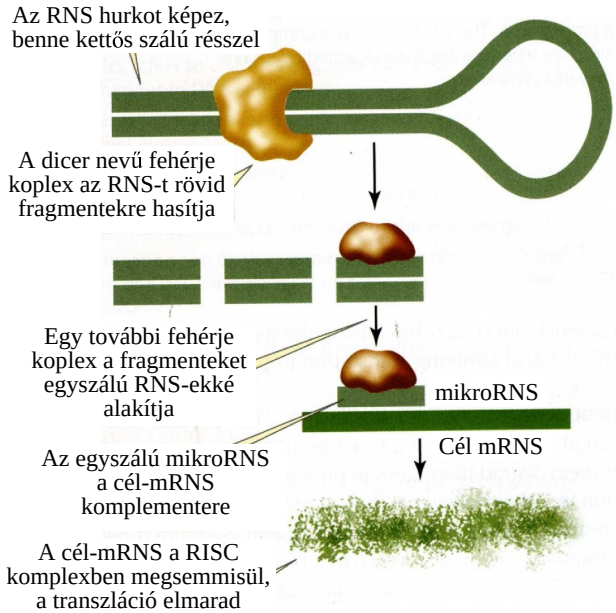


14.16. ábra. A genom imprintálódás az epigenezis egyik típusa.

MikroRNS-ek

A gének a legtöbb eukariota faj genomjának kevesebb mint 5 százalékát teszik ki. A nem kódoló részt a legutóbbi időkig feleslegesnek, „hulladéknak” (angolul: junk) vélték a szakemberek. A közelmúltban arra derült fény, hogy a nem kódoló DNS egyes szakaszairól RNS molekulák íródnak át. Minthogy ezek az RNS molekulák rövidek, mikroRNS-eknek (miRNS) nevezték el őket. A 2000-es évek elején vált nyilvánvalóvá, hogy a miRNS-ek fontos szerepet töltenek be az eukariota gének expressziójának szabá-lyozásában, pontosabban a gének „csendesítésében” (angolul: gene silencing). És minthogy a miRNS-ek nagyon ősi eukariota fajokban is jelen vannak, a gének csendesítése miRNS-ekkel minden bizonnyal

egy fontos mechanizmusa a génexpresszió szabályozásá-nak (14.17. ábra). A miRNS-ekkel, és az RNS-interferenciával, a gének „csendesítésével” kapcsola-tos kutatások értékét 2006-ban Nobel-díjjal jutalmaz-ták: a díjat Andrew Z. Fire és Craig C. Mello érdemel-te ki.



14.17. ábra. A génfunkció „csendesítése” mikroRNS-ekkel. Az RNS egy olyan, ún. RISC komplexben (angolul: RNA-induced silencing complex) semmisül meg, amelynek része a dicer, valamint több más fehérje féleség is.

Az első miRNS-t Victor Ambros és munkatársai fedezték fel 1993-ban a *Caenorhabditis elegans* fonalféregben. Arra lettek figyelmesek, hogy azok a férgek, amelyekben a *lin-14* jelű gén elvesztette funkcióját a fejlődés első stádiumát kihagyva a második stádiumba lépnek. Vagyis az ép *lin-14*$^+$ génnek az a szerepe, hogy meghatározza az első stádium bekövetkeztét, valamint annak eseményeit. Arra is figyelmesek lettek, hogy a *lin-4* mutánsokban a sejtek némelyike az első stádium eseményeit ismételgette. Ez azt jelenti, hogy az ép *lin-4*$^+$ gén terméke negatívan szabályozza *lin-14*$^+$ gén funkcióját, lehetővé téve, hogy a sejtek az elsőből a második stádiumba jussanak. Arra is fényt derítettek, hogy a *lin-14*$^+$ gén terméke egy olyan transzkripciós faktor, amely fejlődési stádiumok bekövetkeztét szabályozza. Arra számítottak, hogy a *lin-4*$^+$ gén terméke egy olyan fehérje féleség, amely a *lin-14*$^+$ gén funkcióját gátolja. Ehelyett azt tapasztalták, hogy a *lin-4*$^+$ gén terméke egy olyan, mindössze 22 nukleotidból álló miRNS amely megsemmisíti a *lin-14*$^+$-kódolt mRNS-t, csendesítve a gén funkcióját (14.17. ábra).

Időközben sok száz miRNS féleséget írtak le. Mindegyik kb. 22 nukleotidból áll, és általában mRNS-ek tucatjait ismeri fel, semmisíti meg. A humán genom több mint 1000 féle miRNS-t kódol, amelyek a célpontjai a géneknek mintegy 60%-át teszik ki.

RNS interferencia (RNAi)

A kis RNS molekuláknak két típusa van: az előbb bemutatott miRNS-ek, valamint az ún. kis interferáló RNS-ek (angolul: small interfering RNA, siRNA), amelyek az RNS interferencia kulcsfontosságú tényezői. Az siRNS-ek gének termékei, és más RNS féleségekhez képesek kacsolódni, fokozva, vagy éppen csökkentve azok aktivitását. Az siRNS-ek legismer-tebb hatása az, hogy megakadályozzák az mRNS-ek funkcióját. Az RNS interferencia szerepe roppant fontos a sejteknek a vírusokkal és a transzpozonokkal szembeni védelmében, az egyedfejlődés szabályozásá-ban, valamint a génexpresszió szabályozásában.

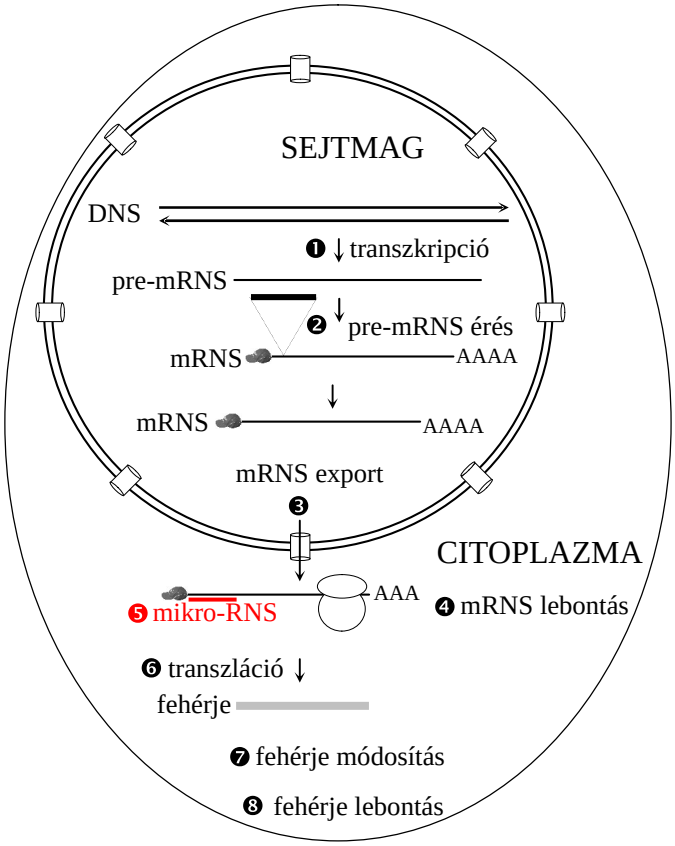
Az RNS interferencia fontos szereplője az a dicer fehérje komplex, amely a hosszú, kétszálú RNS molekulákat kb. 20 nukleotidból álló fragmentekre aprítja (14.17. ábra). A képződő kis interferáló RNS molekulák (angolul: small interfering RNA, siRNA) egyszálú fonalakká tekerednek. Az egyik alkotóira esik, a másik a RISC komplex részévé válik, ahol egy mRNS komplementer szakaszával párosodik. A párosodás nyomán az ún. Argonaute fehérje, a RISC komplex egyik alkotója, elemészti az mRNS-t.

Az RNAi oly hatékony technika, hogy vele specifikus gének funkcióját lehet eliminálni, a génfunkció hiányában pedig az ép gén funkciójára következtetni. A „funkcionális genomika” kifejezés azt jelenti, hogy az RNSi technikával elvileg bármely faj bármely génjének a funkcióját meg lehet ismerni.

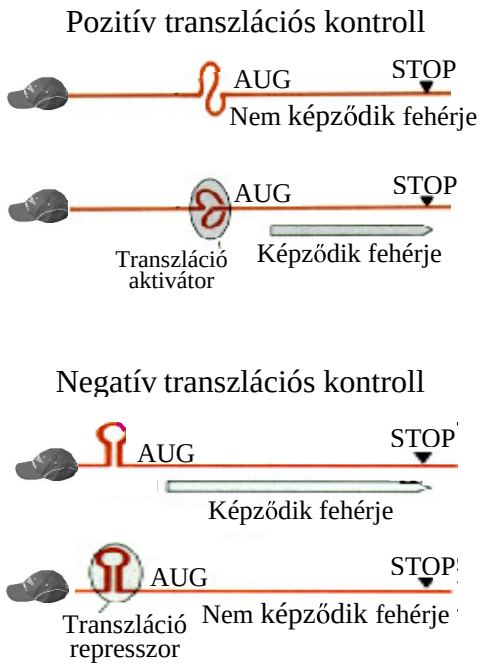
A génexpresszió szabályozásának szintjei

A génexpresszió nemcsak funkcióképes fehérje molekulák képződését jelenti a sejtekben, hanem azt is, hogy a sejtekben alkalmas mennyiségű fehérje van a funkció ellátásához. (Bizonyos fehérje féleségekből sejtenként csak néhány, másokból milliónyi molekula van). A fehérje molekulák számának és aktivitásának szabályozására a transzkripción túl további lehetősé-gek is vannak (14.18. ábra). A génexpresszió szabályozásának szintjei lényegében a következők. (1) A transzkripció, amely alighanem a legfontosabb. (2) A képződött pre-mRNS molekulák érése, hogy ti. a pre-mRNS mRNS-é érik, vagy degradálódik. (3) Pontosan szabályozott, hogy az mRNS molekulák hányad része exportálódik a citoplazmába. Vannak olyan mRNS féleségek, amelyeknek 95%-a sohasem exportálódik, hanem a sejtmagon belül degradálódik. (4) Szabályozott a citoplazmába jutott mRNS molekulák élettartama, hogy mennyi ideig élnek, hány fehérje molekula képződhet egy-egy mRNS alapján. (5) A miRNS-ek tevékenysége révén is szabályozott az mRNS féleségek koncentrációja a citoplazmában. (6) A transzlációs kontroll azt jelenti, hogy a citoplazmába jutott mRNS-ek transzlációja is szabályozott lehet (14.19. ábra). Vannak olyan mRNS féleségek, amelyek transzlációjához az szükséges, hogy az mRNS egy fehérje molekulával kapcsolódjon (pozitív kontroll). Más esetekben viszont az mRNS transzlációját az mRNS-hez kapcsolódó fehérje molekula megakadályozza (negatív kontroll). (7) A fehérje molekulák aktivitását kémiai módosításukkal

is lehet szabályozni. Akár egyetlen foszfát csoport kapcsolása (pl. egy tirozin oldallánchoz) döntően megváltoztathatja a fehérje molekula aktivitását. (8) A fehérje molekulák sem örökéletűek, élettartamuk szabályozott, egy idő multán degradálódnak.



14.18. ábra. A génexpresszió szabályozás lehetséges szintjei.



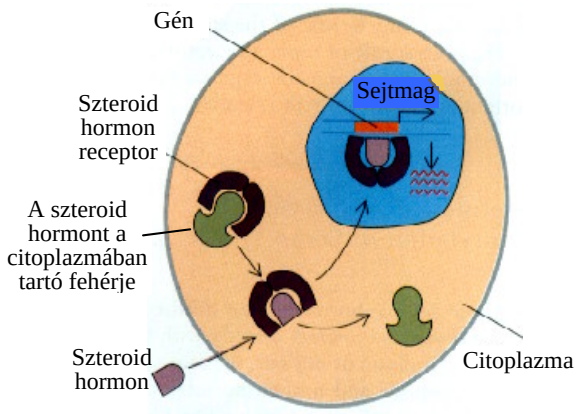
14.19. ábra. A transzlációs kontroll típusai.

Jelek eukariota gének szabályozásához

Mindenkinek természetes, hogy a soksejtű élőlények testét alkotó sejtek harmóniában élik életüket: a megfelelő helyen vannak, ellátják funkciójukat. Az is nyilvánvaló, hogy a sejtek kommunikálnak egymással. Hogyan? Melyek azok jelek és mechanizmusok, amelyek a sejtek közötti összhangot megteremtik? A sejtek kommunikációjának két alapvető mechanizmusa ismeretes.

1. Lipidoldékony hormonok, jelek

Példakén a lipidoldékony hormonokat említjük. A lipidoldékony hormonok, köztük a szteroid hormonok, akadály nélkül jutnak át a sejthártyán a citoplazmába (14.20. ábra). A citoplazmába érkezve az ún. szteroid hormon receptor nevű fehérjék valamelyikével alkotnak komplexet. A komplexek a sejtmagba jutva transzkripciós faktorként viselkednek: bizonyos gének promóter régiójában az ún. hormon reszponz elemekkel lépnek kapcsolatba. Némely géneket be-, másokat kikapcsolnak, áthangolva a sejtek génexpressziós mintázatát, a sejtek viselkedését (14.20. ábra). Hormon hiányában a receptor fehérjék olyan fehérje molekulákkal kapcsolódnak, amelyek a citoplazmában tartják a receptor molekulákat.



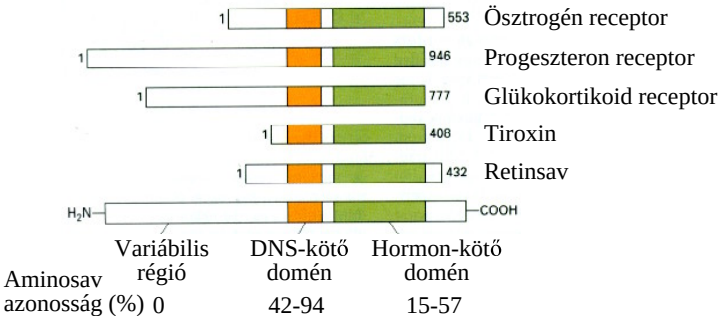
14.20. ábra. A lipidoldékony hormonok hatásmechanizmusa.

A lipidoldékony hormon receptorok egy receptor családot alkotnak. Mindegyik receptorféleségben három funkcionális egységet (domén-t) lehet elkülöníteni. (i) A hormonkötő doménban a 225-285. közötti aminosavak közül 15-57% azonos (14.21. ábra). (ii) A kb. 68 aminosavból álló DNS-kötő doménban (amelyek Zn-ujjak) az aminosavak 42-94%-a azonos. (iii) A variábilis domén, ami a hatás specifikus voltát határozza meg, nagyon különböző méretű, és - érthető módon - bennük az aminosavak azonossága 0% (14.21. ábra).

2. Vízoldékony jelközvetítők

Mivel a vízoldékony hormonok nem juthatnak be közvetlenül a citoplazmába, olyan mechanizmusok alakultak ki, amelyek (i) érzékelik a sejtekhez érkező jeleket, (ii) a jeleket átjuttatják a sejthártyán, és (iii) továbbítják a sejt belsejébe. Az eukariota sejtek

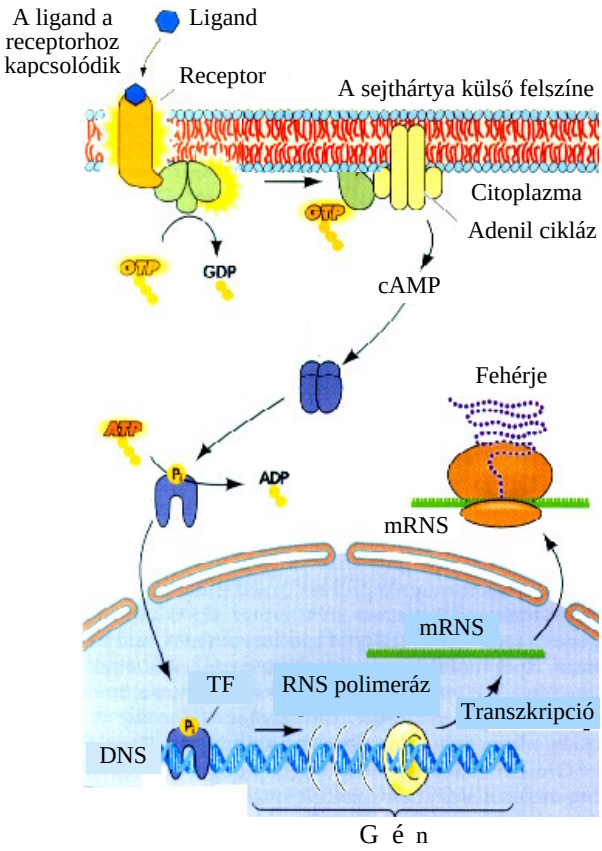
felszínén bőségesen vannak olyan fehérje molekula részek, ún. receptorok, amelyek a sejtekhez érkező jelekkel, az ún. ligandokkal, létesítenek specifikus kapcsolatot (14.22. ábra). (Ligand lehet a szomszédos sejt is, a felszínén jelenlevő, a sejtre jellemző fehérje molekulákkal.) A receptor fehérjék ún. transzmembrán doménja átível a sejthártyán és a citoplazmába nyúlik. A ligand/receptor kapcsolat nyomán úgy változik meg a receptor fehérje szerkezete, hogy a citoplazmatikus résznek enzimatikus aktivitása lesz, és például a hozzá kapcsolódó fehérje valamely tirozinját foszforilájla. A foszforilált molekulának megváltozik a térbeli szerkezete, mintegy "veszi a jelet", hogy a sejt belsejébe továbbítsa. A sejthártyán átívelő fehérjék itt említett típusait szokás tulajdonságaik alapján receptor tirozin kinázoknak nevezni. A folyamatnak, amely során a fehérje molekulák a sejthez érkező jeleket a sejten belülre juttatják szignáltranszdukció a neve. A transzmembrán fehérjék és a szignáltranszdukció szerepére a további fejezetek bőségesen említenek példákat.



14.21. ábra. A funkcionális motívumok szerveződése öt lipidoldékony hormon receptorában. Az alsó „receptort" sok hasonló fehérje féleség alapján szerkesztettek.

ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtek jellegzetességeit döntően az határozza meg, hogy bennük mely gének és milyen mértékben expresszálódnak. A génexpresszió szabályozása egy sokténye zős folyamat. Az alapot a DNS biztosítja. Nemcsak azzal, hogy fehérjék szintézisét kódolja, hanem azzal is, hogy benne olyan szakaszok vannak, amelyekhez különféle fehérje molekulák kapcsolódhatnak. A DNS-hez kapcsolódó fehérje molekulák nemcsak azt határozzák meg, hogy kifejeződjenek a gének vagy sem, hanem azt is, hogy a gének melyik sejtben, az egyedfejlődés mely stádiumában, és milyen mértékben expresszálódjanak. A génexpresszió szabályozás fontosságát az is jelzi, hogy a folyamat több szinten valósul meg. A sejtek nem csupán saját belső harmóniájukat valósítják meg a génexpresszió szabályozás révén, de arra is képesek, hogy a szomszédságból vagy akár a távolról érkező üzeneteket is észleljék, és a génexpresszió módosításával az üzeneteknek megfelelően módosítsák funkciójukat. Végeredményben a sejtek közötti összhang biztosítja az élőlény életét, alkalmazkodását a változó környezeti feltételekhez.



14.22. ábra. A szignáltranszdukció mechanizmusának sematikus ábrázolása.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology (2009), 342-364.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic Analysis (2000), 306-312.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology (2000), 384-454.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology (1998), 212-224.
5. http://www.origo.hu/tudomany/elet/20041124rnsinterferencia.html
6. http://evol.elte.hu/~geza/Oktatas/OktatasKorabbi/BFszem2007osz/RNS.ppt#256,1,Az RNS interferencia szerepe a génregulációban
7. Molnár Viktor, Bakos Beáta, Hegyesi Hargita, Falus András, Nem kódoló genom és mikro-RNS-ek: új fejezet a genetika történetében. LAM (Lege Artis Medicina) - 2008; 18(8-9).

15. REKOMBINÁNS DNS TECHNOLÓGIA. ELMÉLETI ALAPOK.

Vektorok, rekombináns DNS és molekuláris klónozás. Restrikciós enzimek. Genomikus és cDNS géntárak. PCR.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2010. őszén.

BEVEZETÉS

Úgy tűnhet, hogy minden ember teste nagyon sok DNS-t tartalmaz. Az ember genomját kb. $3x10^9$ bázispár (bp) alkotja, ami 93,5 cm hosszú. Valójában, mivel egy emberi test kb. 10^{14} sejtből áll, a genom az egyedi szekvenciák bármelyikéből csak nagyon csekély, mindössze kb. 1 nanomolnyi DNS-t tartalmaz. Ugyanakkor a magasabb rendű élőlények DNS-e nagyon sokféle szekvenciából áll. A mindennapok gyakorlatában a DNS vizsgálatához és molekuláris biológiai felhasználásához nem a teljes genomra, hanem csak egy-egy rövidke DNS szakaszból van akkora mennyiségre szükség, amennyivel különféle feladatok oldhatók meg. A cél tehát olyan módszerek kidolgozása, amelyekkel viszonylag rövid DNS szakaszok sokszorozhatók meg tetszőleges mennyiségben.

Az öröklődés alapja a DNS-ben tárolt genetikai információ. A szakemberek régi vágya a DNS funkciójának megismerése, felhasználása DNS-en alapuló diagnosztikára, gyakorlati feladatok megoldására. A 15. fejezet a rekombináns DNS technológia (génsebészetnek is szokás nevezni) elméleti alapjaival foglalkozik. Áttekintjük a vektorok és a molekuláris klónozás elvi alapjait, a restrikciós enzimek és a géntárak jellemzőit, valamint a polimeráz láncreakciót (a PCR-t).

Vektorok és a molekuláris klónozás

Amint azt a baktériumok genetikájával foglalkozó fejezetben említettük, a defektív fágok és a szexdukcióban szereplő F' plazmid DNS-e is rekombináns: egyszerre alkotja fág és baktérium, illetve plazmid és baktérium DNS. A defektív fágok és az F' plazmidok egy-egy rövid baktérium DNS szakaszt korlátlan mennyiségben képesek elszaporítani, és teljesítik a fent megfogalmazott követelményeket: egy-egy rövid DNS szakasz tetszőleges mennyiségben történő elkészítését. Vajon használhatók a fágok és a plazmidok másfajta eredetű DNS szakaszok megsokszorozására is?

Minthogy a DNS kémiai természete azonos a fágokban, a plazmidokban, a baktériumokban, az eukariotákban, vagy akár a géppel szintetizáltatott DNS esetében is, a fágokba és a plazmidokba épített idegen DNS elvileg bármilyen forrásból származhat. A fágokat és a plazmidokat vektornak is nevezik: olyan DNS molekuláknak, amelyek alkalmasak idegen eredetű DNS szakaszok elszaporítására, megsokszorozására. Miközben a vektor DNS molekulák baktérium sejtekben replikálódnak, az idegen DNS-t tetszőleges mértékben elszaporítják. A vektorok DNS-e a rekombináns DNS jellegzetes példája: különböző eredetű DNS szekvenciákból állnak. A rekombináns DNS-t előállító és felhasználó technikákat szokás rekombináns DNS technológiának, vagy génsebészetnek nevezni.

A restrikciós enzimek

A DNS manipulálásához olyan eszközökre is szükség van, amelyekkel a DNS-t reprodukálhatóan, jól meghatározott helyen lehet elvágni, hasítani. A restrikciós enzimek azok a génsebészeti eszközök, amelyekkel a DNS jellegzetes helyeken és reprodukálhatóan hasítható.

15.1. táblázat. Néhány restrikciós enzim néhány jellemzője.

Mikroorganizmus	Az enzim[1]	A felismert szekvencia[2]
Haemophilus Aegyptius	*Hae*III	↓ 5'GGCC3' 3'CCGG5' ↑
Bacilus subtilis	*Bsu*RI	↓ 5'GGCC3' 3'CCGG5' ↑
Moraxella faj	*Msp*I	↓ 5'CCGG3' 3'GGCC3' ↑
Arthrobacter luteus	*Alu*I	↓ 5'AGCT3' 3'TCGA5' ↑
Diplococcus pneumoniae	*Dpn*II	↓ 5'GATC3' 3'CTAG5' ↑
Haemophilus Influenzae	*Hinf*I	↓ 5'GAN TC3' 3'CTN^{c}AG5' ↑
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	↓ 5'GAATTC3' 3'CTTAAG5' ↑
Escherichia coli R	*Eco*RV	↓ 5'GATATC3' 3'CTATAG5' ↑
Bacillus stearothermophilus ET	*Bst*EII	↓ 5'GGTNACC3' 3'CCTN^{c}TGG5' ↑
Xanthomonas campestris	*Xcm*I	↓ 5'CCAN N TGG3' 3'GGTN^{c}N^{c}ACC5' ↑

[1] A restrikciós enzimeket azon baktériumok neve után nevezik el, amelyekből izolálják őket. A nagybetű annak a baktérium törzsnek a jele, amelyből a restrikciós enzimet izolálták. Az I-V az ugyanabból a fajból származó különféle restrikciós enzimek jele. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a restrikciós enzim a DNS-t elvágja.

[2] N = az A, G, C vagy T bázisok valamelyike, amely a komplementer (N^c) bázissal párosodik.

A restrikciós enzimek a baktériumok endonukleázai, a fágfertőzések elleni védekezés eszközei. A restrikciós enzimek legtöbbje ún. palindrom szekvenciát ismer fel és vágja el ott a DNS-t. A palindromok oda és visszafelé olvasva ugyanazt jelentik. (Egy palindrom: Ani talpa platina.) A restrikciós enzimek hasító helyeit restrikciós helyeknek szokás nevezni. Kb. 250 különféle olyan palindrom szekvencia van, amelyeket restrikciós enzimek ismernek fel (15.1. táblázat). Ugyanazt a palindrom szekvenciát többféle restrikciós enzim is felismerheti. Vannak olyan restrikciós enzimek, amelyek négyes palindromokat ismernek fel, mások ötösöket, hatosakat, és néhány olyan is, amely ugyan specifikus, de nem palindrom szekvenciát ismer fel (15.1. táblázat). Némely restrikciós enzimmel folytatott emésztés nyomán ún. ragadós végek képződnek: olyan, néhány nukleotidból álló egyszálú, túlnyúló DNS szakaszok, amelyek készek a komplementer szakasszal párosodni. A ragadós végeknek akkor vehetjük hasznát, miközben idegen DNS-t illesztünk egy vektorokba. Vannak olyan restrikciós enzimek is, amelyek úgy vágják el a DNS-t, hogy a végek tompák, vagyis nem képződnek ragadós végek.

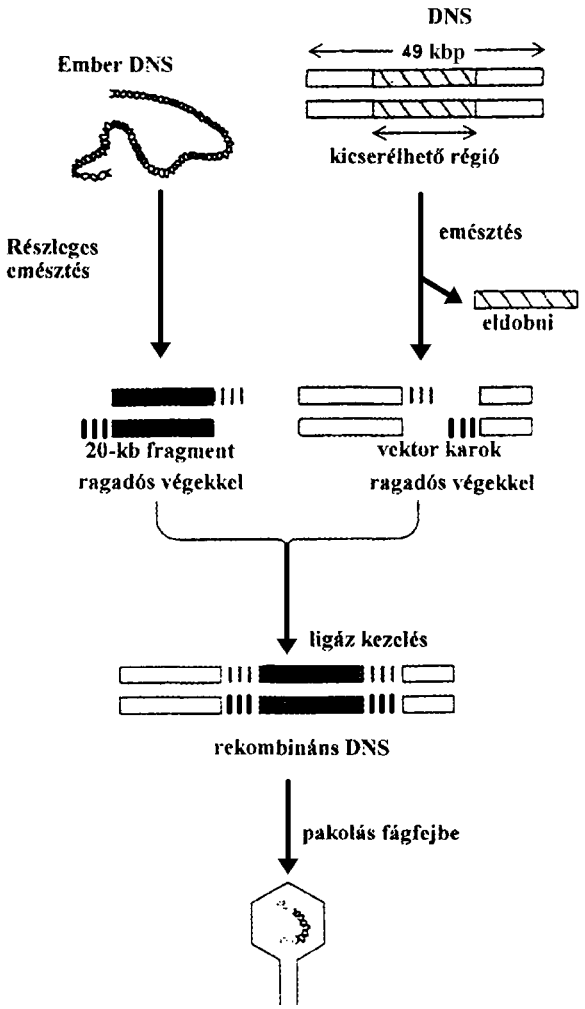
Klónozás vektorokba

A restrikciós enzimek a baktériumok endonukleázai, a fágfertőzések elleni védekezés eszközei. A restrikciós enzimek legtöbbje ún. palindrom szekvenciát ismer fel és vágja el ott a DNS-t. Valójában fág tarfolt (plakk) vagy baktérium kolónia képződését. A klónozott DNS aztán kinyerhető a fágokból vagy a plazmidokból, és felhasználható DNS technológiai munkákban.

1. Klónozás fágokba

A λ fág az ún. mérsékelt fágok egyike. DNS-éből eltávolíthatók azok a gének, amelyek a fág mérsékelt jellegét biztosítják (egy blokkban vannak), helyükre pedig idegen DNS illeszthető (15.1. ábra). A rekombináns DNS-t hordozó fág virulens fágként viselkedik, és litikus ciklusok során megsokszorozza az idegen DNS-t.

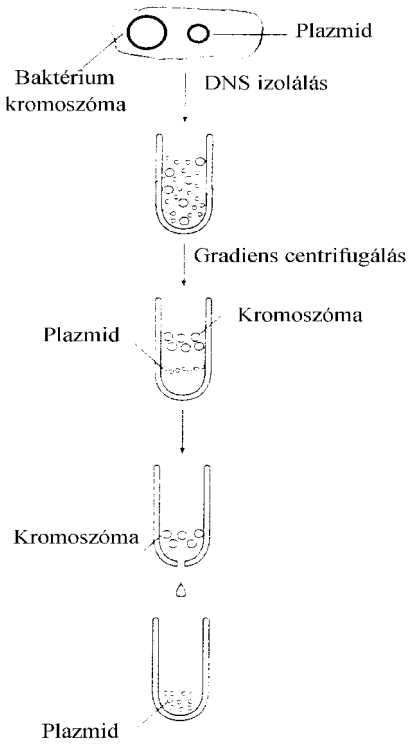
A gyakorlatban a λ fág DNS-t a *Bam*HI restrikciós enzimmel emésztik. Az emésztés nyomán három különböző méretű DNS fragment képződik: az ún. bal kar, a jobb kar és egy mintegy 20 kbp (kilobázispár) hosszú középső fragment. A középső fragment cserélhető ki kb. 20 kbp hosszú idegen DNS-re. A karokat összehozzák az idegen DNS-el, majd a ligáz enzimmel ligálják a fragmenteket. A ligálás nyomán képződött DNS-hez fágfehérjéket adnak, hogy a DNS a fágfejbe pakolódjon. A pakolódás nyomán fertőzőképes fágok képződnek. Csak a rekombináns DNS-ből képződnek fertőzőképes fágok. (A csak fágkarokat vagy a csak idegen DNS-t tartalmazó DNS-ek nem pakolódnak fertőzőképes fágokká.) A fágokat baktériumpázsitra viszik, amelyen a fertőzőképes fágok szaporodnak. Minden egyes fág utódfágjai egy-egy ún. tarfoltot (plakkot) képeznek a baktériumpázsiton. (Bár a λ fág ugyan csak 20 kbp-nyi DNS szakaszt tud befogadni, ám vannak olyan fágok is, amelyek akár 100 kbp klónozására is alkalmasak.)



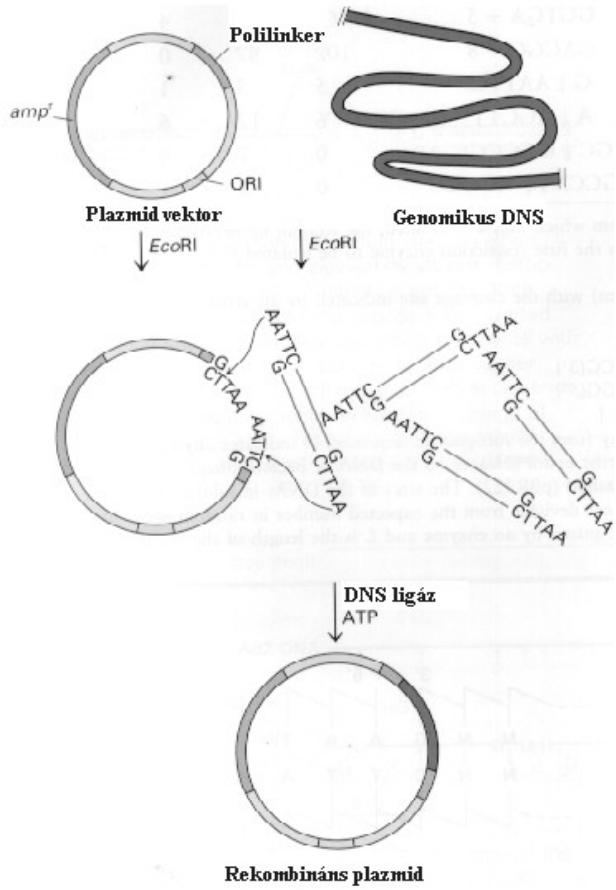
15.1. ábra. A mérsékelt fágok vektorként használhatók a molekuláris klónozásban. Velük idegen eredetű DNS szakaszok szaporíthatók el.

2. Klónozás plazmidba

A plazmidok egyszerűen izolálhatók (15.2. ábra): a baktériumokból először DNS-t izolálnak, majd elválasztják a kromoszómális DNS-t a plazmidoktól. (A kromoszóma és a plazmid DNS pl. gradiens centrifugálással is elválasztható, mert bázisösszetételük és következésképpen sűrűségük is különböző; 15.2. ábra.) A molekuláris biológiában használt plazmidok egy vagy több rezisztencia gént tartalmaznak. (Az ún. antibiotikum rezisztencia plazmidok rezisztenciát biztosítanak az őket hordozó baktériumoknak amegfelelő antibiotikumokkal szemben.) A plazmidokat a restrikciós enzimek valamelyikével fel lehet nyitni, és miután idegen eredetű DNS-t építenek bele, ismét gyűrűvé zárhatók (15.3. ábra). A plazmidok felnyitására általában olyan restrikciós enzimet használnak, amelynek mindössze egyetlen restrikciós helye van a plazmidban. Az idegen DNS plazmidba építésére két megoldás kínálkozik.

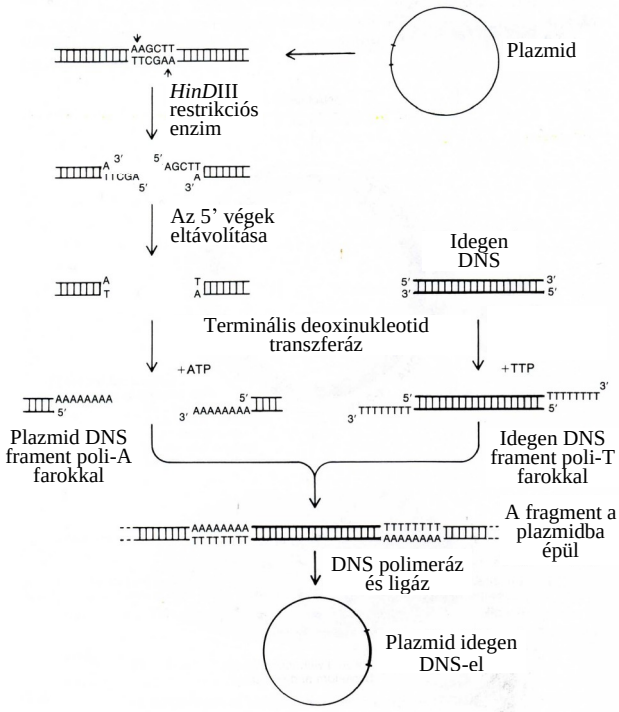


15.2. ábra. A plazmid izolálás sémája.



15.3. ábra. Idegen DNS beépítése plazmidba ragadós végekkel. (A polilinker olyan rövid DNS szakasz, amely különféle restrikciós helyeket tartalmaz.)

(i) Sok restrikciós enzim tevékenysége nyomán ún. ragadós végek képződnek: olyan egyszálú túlnyúló DNS szekvenciák, amelyek komplementerei a másik hasítási végen vannak (15.1. táblázat és 15.3. ábra). A felnyitott plazmidot szokás linearizált plazmidnak is nevezni. A linearizált plazmidot olyan idegen DNS-el keverik össze, amelyet ugyanazzal a restrikciós enzimmel emésztettek, mint a plazmidot. Minthogy a plazmidokba kb. 5 kbp idegen DNS klónozható, az idegen DNS-t úgy kell emészteni, hogy kb. 5 kbp-os DNS fragmentek képződjenek. (A célt általában a DNS részleges emésztésével szokás elérni.) A plazmid és a klónozandó DNS ragadós végei párosodhatnak, lehetőséget teremtve az idegen DNS beépülésére a plazmidba (15.4. ábra). A DNS oldatot a ligáz enzimmel kezelik, hogy összekapcsolják a szabad DNS végeket. A plazmidok baktériumsejtekbe transzformálhatók: Ca^{2+} ionok jelenlétében egymillióból kb. 1-10 baktérium veszi fel a plazmidot a közegből. A plazmidot tartalmazó baktériumok valamely antibiotikumra rezisztensek, és utódsejtjeik kolóniákat képeznek antibiotikum jelenlétében. (Az egy kolóniát, telepet alkotó baktériumok egyetlen sejt utódsejtjei.)

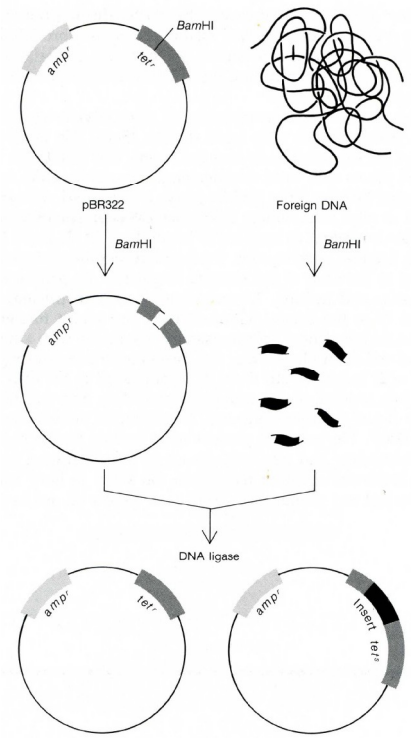


15.4. ábra. Idegen DNS beépítése plazmid poli-A és poli-T farkakkal.

(ii) A klónozandó DNS-t olykor nagysebességű turmixgéppel vagy ultrahanggal fragmentekre aprítják, vagy olyan restrikciós enzimmel emésztik, amely tompán vág. A fragmentek közül elektroforézissel szokás kiválasztani a kb. 5 kbp méretűeket. Az itt említett módon készített fragmentek végei nem ragadósak, hanem tompák. A tompa végű fragmentek plazmidba illesztésére két lehetőség kínálkozik. (i) Az

ún. tompa végű ligálás során a plazmidokat olyan restrikciós enzimekkel nyitják fel, amelyek aktivitása nyomán tompa végek képződnek (15.1. táblázat). A tompa végekhez illeszkedő idegen DNS szakasz a ligáz enzim tevékenysége nyomán a plazmidok részévé válhat. (ii) Az aprítás nyomán képződő DNS szakaszok 3' végeire rövid poli-T szekvenciákat, a linearizált plazmidok 3’ végeire pedig poli-A szekvenciákat, lényegében ragadós végeket építenek (15.4. ábra). Az idegen DNS beépítése során a komplementer poli-A és poli-T szekvenciák ragadós végként viselkednek és párosodnak (15.4. ábra). A fennmaradó réseket DNS polimerázzal töltik ki, majd a DNS szálakat ligálják, a plazmidokat baktériumokba transzformálják (15.4. ábra).

Amint várható, a ligálás során a plazmidok végei is összeforradhatnak. Vagyis az antibiotikumra rezisztens baktériumoknak nem mindegyike hordoz olyan plazmidot, amely idegen DNS-t tartalmaz. Egy lehetséges megoldás a problémára az olyan plazmidok használata, amelyeknek két rezisztencia gén is része. Pl. a pBR322 plazmid, a klónozásra elsőként használt plazmidok egyike, az ampicillin és a tetraciklin rezisztencia géneket (*amp*^{r} és *tet*^{r}) hordozza (15.5. ábra). A pBR322-ben a *Bam*H1 restrikciós hely a *tet*^{r} génben van. Az idegen DNS beépülése nyomán a baktériumok bár elvesztik a tetraciklinnel szembeni rezisztenciát, de továbbra is rezisztensek ampicillinre. Viszont amikor a plazmid ragadós végei egyesülnek újra, a baktériumok tetraciklinre és ampicillinre is rezisztensek. Végeredményben tehát különbség tehető azok között a baktériumok között, amelyek idegen DNS-t tartalmazó és idegen DNS-t nem tartalmazó plazmidot hordoznak (15.5. ábra).



15.5. ábra. A két rezisztencia gént tartalmazó plazmidokkal különbség tehető idegen DNS-t nem tartalmazó és idegen DNS-t tartalmazó plazmidok között.

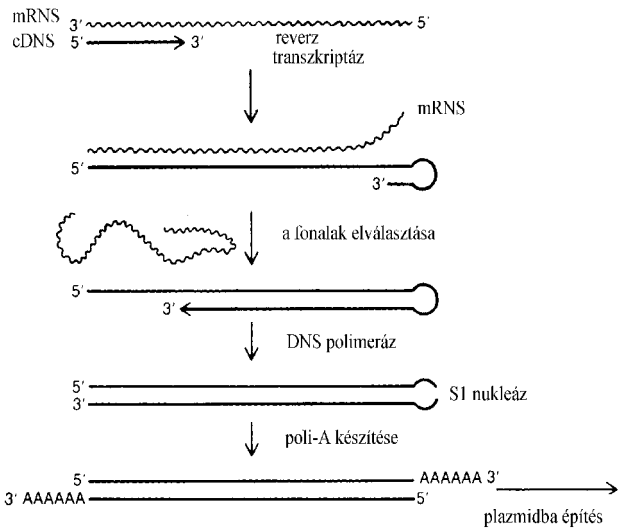
Géntárak

Ha kellő számú olyan idegen DNS-t tartalmazó plazmidot (természetesen baktériumokban) vagy fágot készítenek, amelyek valamely faj DNS-ének egy-egy rövid szakaszát tartalmazzák, bár különböző vektorokban, de gyakorlatilag a faj teljes genomja képviselve van. A géntár olyan vektorok gyűjteménye, amelyek bár apró szakaszokban, de valamely faj teljes genomját tartalmazzák. A genomikus géntárat alkotó rövid DNS szakaszok bármelyike izolálható, és belőle tetszőleges mennyiségű DNS készíthető, használható különféle célokra.

A cDNS tárak

Amint fentebb említettük, a plazmidokba mintegy 5, a λ fágba pedig 20 kbp-nyi idegen DNS klónozható. (Megjegyzés: egy átlagos baktérium gén nagyjából egy 1 kbp hosszú.) Köztudott, hogy az eukariota genomnak csak néhány százalékát teszik ki a gének. A genom zömét a gének közötti ún. intergénikus DNS szakaszok alkotják. Az eukariota gének gyakran tartalmaznak intronokat, olykor nagyon hosszúakat. A gének promóter részei sem íródnak át a transzkripció során. Vagyis az intergénikus, az intron és a promóter szekvenciák nem kódolják mRNS és fehérje molekulák szintézisét. Ismeretük sok szempontból nem fontos. Gyakorta elegendő az mRNS-nek megfelelő DNS szekvencia ismerete, mint pl. sok öröklődő betegség természetének megértéséhez, diagnózisához.

A retrovírusokból származó reverz transzkriptáz enzim az mRNS alapján szintetizál ún. komplementer DNS-t, cDNS-t (15.6. ábra). A teljes cDNS, vagy annak egyes szakaszai vektorokba klónozhatók, éppen úgy, mint bármelyik DNS fragment. A gyakorlatban mRNS-eket izolálnak valamely fajból, gyakorta csak valamely szervből. A következő lépésben az mRNS-ek alapján a reverz transzkriptázzal cDNS-eket szintetizáltatnak, amelyeket aztán vektorokba klónoznak (15.6. ábra). Az ún. cDNS tár különféle cDNS-eket, vagy cDNS szakaszokat tartalmazó vektorok összessége.



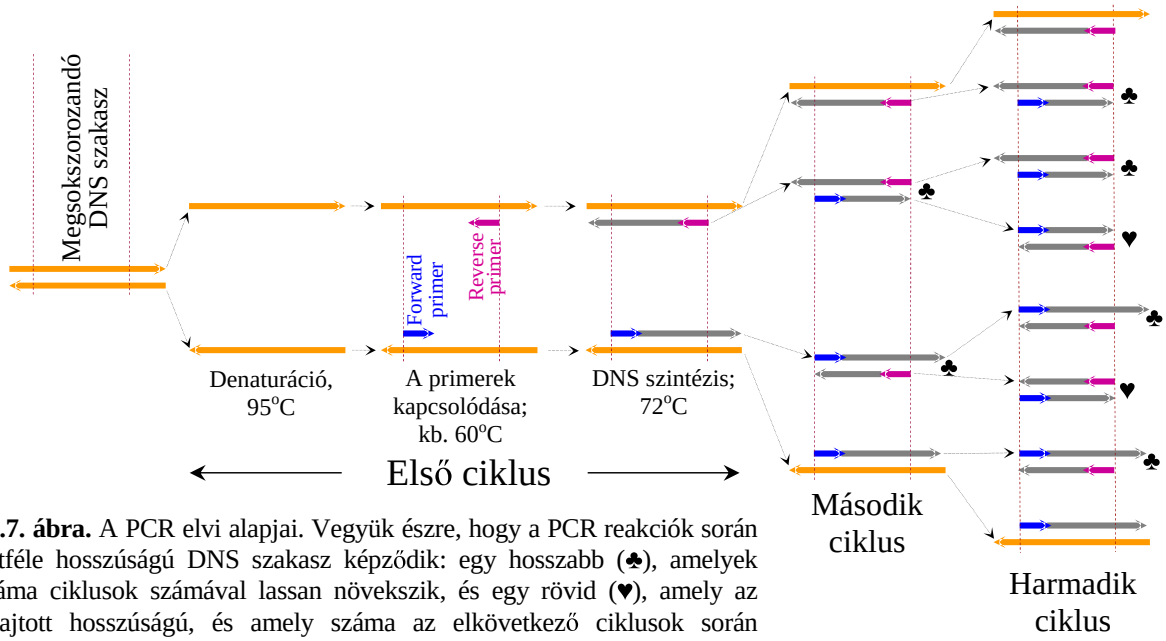
15. 6. ábra. Módszer cDNS készítésére.

PCR, polimeráz láncreakció

A rövid DNS szakaszok vektorba történő klónozását követően tekintélyes mennyiségű DNS készíthető baktériumok „közreműködésével”. Az 1983. decemberében Kary Mullis által kifejlesztett ún. polimeráz láncreakcióval (angolul polymerase chain reaction, PCR) bármely rövidebb (10-12 kbp-ig) DNS szakasz viszonylag nagy mennyiségű mintája készíthető el *in vitro*, „kémcsőben”, gyorsan, egyszerűen és olcsón. (Mullis teljesítményét 1993-ban Nobel-díjjal jutalmazták.) A PCR különösen hasznos, ha a megsokszorozandó DNS szakasz szekvenciája, vagy annak egy részlete ismert.

A polimeráz reakciók ciklusai ismételhetők (15.8. ábra). A PCR ciklusok mindegyike során három esemény ismétlődik különböző hőmérsékleten. Egy ciklus mindössze néhány percig tart. A megsokszorozandó DNS kettős spirálok száma a ciklusok előrehaladtával exponenciálisan nő.

A PCR módszerével meglehetősen sok DNS szintetizálható csupán néhány templát DNS molekula alapján, 20-30 ciklus alatt. A PCR-t kereskedelmi forgalomban kapható, programozható készülékekkel végzik, és mára sokféle változatát dolgozták ki. A reverz PCR (RT-PCR) során pl. az mRNS minták



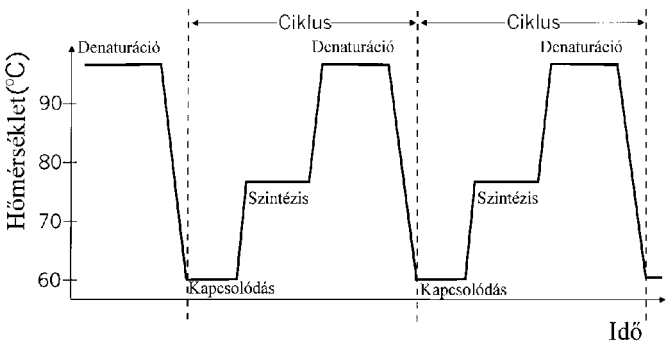
15.7. ábra. A PCR elvi alapjai. Vegyük észre, hogy a PCR reakciók során kétféle hosszúságú DNS szakasz képződik: egy hosszabb (♣), amelyek száma ciklusok számával lassan növekszik, és egy rövid (♥), amely az óhajtott hosszúságú, és amely száma az elkövetkező ciklusok során exponenciálisan növekszik.

Tegyünk kevés DNS mintát (olykor csak néhány molekulát) egy Eppendorf csőbe. Tegyünk a csőbe alkalmas pufferban és nagy feleslegben ún. *primert*, *Taq polimeráz* enzimet, valamint dATP-t, dTTP-t, dGTP-t és dCTP-t, a DNS építő elemeit. A primerek 20-30 nukleotidból álló szintetikus, egyszálú DNS oligonukleotidok, és komplementerek a templát DNS valamelyik szakaszával. A PCR három, különböző hőmérsékleten történő folyamat ismétlődését jelenti.

1. Melegítsük fel az Eppendorf csövet kb. 95°C-ra, hogy denaturáljuk a DNS-t (15.7. ábra).
2. Hűtsük le a csövet kb. 60°C-ra, arra a hőmérsékletre, ahol a primerek kapcsolódnak a komplementer DNS szekvenciákkal.
3. Melegítsük fel a csövet 72°C-ra, arra a hőmérsékletre, amely optimális a *Taq* polimeráz enzim működéséhez. (A *Taq* polimeráz a hőforrásokban élő *Thermus aquaticus* baktérium DNS polimeráza. Aktivitását nem veszti el 95°C-on sem.)

A *Taq* polimeráz enzim a primerek 3’ végéhez kapcsolódva, és onnan kiindulva a templát DNS alapján megszintetizálja a komplementer szálat. Egy PCR ciklus során a DNS kettős spirálok száma megkétszereződik (15.7. ábra).

alapján először a reverz transzkriptáz enzim szintetizál az mRNS-eknek megfelelő DNS-eket, majd az alkalmasan megválasztott primerekkel a megfelelő cDNS, vagy annak megfelelő szakasza elszaporítható. A módszer kvantitatívvá tehető, az ún. Q-RT-PCR (más kifejezéssel real time PCR) készülékekkel.



15.8. ábra. A PCR ciklusok mindegyike során három esemény ismétlődik különböző hőmérsékleten. Egy ciklus mindössze néhány percig tart.

ÖSSZEFOGLALÁS

A defektív fágok és az F' plazmidok mutatták meg, hogy idegen DNS rövid szakaszai molekulárisan klónozhatók és tetszőleges mértékben elszaporíthatók. A restrikciós enzimek alkalmas eszközök a DNS jól meghatározható helyen történő és reprodukálható vágására. A fágok és a plazmidok széles körben használt vektorok a rekombináns DNS technikában, a génsebészetben. A PCR, a közelmúltban kifejlesztett eljárás *in vitro* teszi lehetővé a klónozást, és egyre szélesebb körben alkalmazott molekuláris klónozási technika. Nemcsak a molekuláris biológiában, hanem az orvosi gyakorlatban is. A klónozott DNS „használt" a 14., valamint az azt követő fejezetek illusztrálják.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology (2009), 286-287, 323-327, 386-398.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 208-234, 2000.
3. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. An Introduction to Genetic analysis, 365-462, 1999.
4. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 314-346, 1998.
5. Fristrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 66-70, 79-84, 410-451, 1989.

http://hu.wikipedia.org/wiki/PCR#T.C3.B6rt.C3.A9net

16. REKOMBINÁNS DNS TECHNOLÓGIA. GYAKORLATI ALKALMAZÁSOK.

RFLP és a restrikciós (fizikai) térképek. Southern és Northern analízis. VNTR. *In situ* hibridizáció és a FISH technika. Transzgénikus élőlények és génterápia.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, 2011. januárjában.

BEVEZETÉS

Amint azt a 13. fejezet bemutatta, egy-egy vektor egy-egy idegen DNS szakaszt tartalmaz. Hogyan választható ki a sok vektor közül az, amely azt az idegen DNS-t tartalmazza, amelyre szükség van? Hogyan szaporítható el az a fág vagy baktérium, amely az idegen DNS-t tartalmazza. Természetesen valamely DNS szakasz a PCR technikával is megsokszorozható. A jelen fejezet azt tekinti át, hogy miként és milyen célokra használhatók a felszaporított DNS szegmentek a molekuláris biológiában és az orvostudományban.

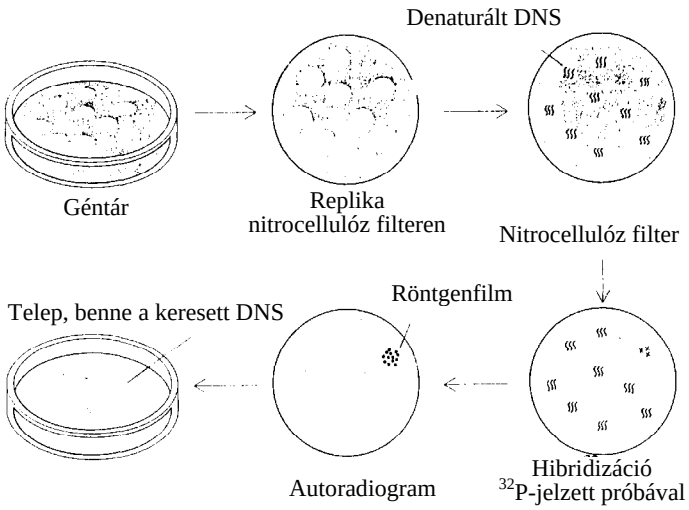
Géntárak szűrése

A könyvtárakból ki kell tudni választani azt a klónt, amely azt a DNS szakaszt tartalmazza, amelyikre szükség van. A kiválasztott klón szaporítható, majd izolálható belőle az immáron megfelelő mennyiségű, molekulárisan klónozott DNS. A géntárak szűrésének menete a következő (16.1. ábra).

Első lépésben táptalajon növesztik az idegen DNS-t tartalmazó baktériumok kolóniáit, és róluk a replika lemez módszerével másolatokat készítenek. Úgy, hogy baktérium kolóniákból baktériumokat visznek egy nitrocellulóz filterre. A nitrocellulóz filtert, rajta a baktérium sejtekkel, NaOH-val kezelik, hogy (i) feltárják a baktériumokat, (ii) denaturáljuk a DNS-t és (iii) kössék az egyszálú DNS-t a nitrocellulóz filterhez. A DNS-t 90-95 ^{o}C-on „rásütik" a filterre, hogy a továbbiakban ne vesszen el a DNS. A következő lépésben a filtert ^{32}P-vel jelölt ún. *próbával* inkubálják. (A DNS vagy az RNS próbát ma többnyire fluoreszcensen jelölik.) Az inkubáció alatt a próba DNS hibridizál a komplementer DNS szekvenciákkal. A *hibridizáció* alapja a renaturáció, a komplementer DNS szekvenciák egyesülése. A nitrocellulóz filtert röntgenfilmmel borítják. A ^{32}P bomlása során képződő β-sugárzás hatására fotokémiai reakció játszódik le a röntgenfilmben. A reakció eredményét az előhívás nyomán képződő fekete ezüstszemcsék jelzik a röntgenfilmben. Az ezüstszemcsék megmutatják, hogy melyik kolónia tartalmazza a próbával komplementer DNS szakaszt (16.1. ábra). A megfelelő baktériumok az eredeti mester lemezről izolálhatók, elszaporíthatók. A baktériumokból DNS izolálható. A kromoszómális DNS-től elkülöníthetők a plazmidok, a plazmidokból restrikciós enzimmel folytatott emésztés és gélelektroforézis után izolálható a klónozott DNS. A megsokszorozott DNS felhasználására a következő fejezetekben említünk példákat.

A hibridizációra használt próba lehet DNS fragment, cDNS vagy RNS. A cDNS tárak szűrése a fent leírtakhoz hasonlóan történik. A fárokban készített géntárak szűrése az itt leírtakhoz hasonló elvek alapján történik.

A fágokban levő géntárak szűrése lényegében az itt bemutatott technológia alapján történik.



16.1. ábra. Géntár szűrése.

A KLÓNOZOTT DNS FELHASZNÁLÁSA

Az óhaj, amit a fejezet elején megfogalmaztunk teljesült: használható mennyiségű, viszonylag rövid, de azonos szekvenciából álló DNS szakaszok készíthetők vektorokkal (plazmidokkal, vagy fágokkal), vagy - ma már többnyire - a PCR módszerével. A következő fejezetek a klónozott DNS gyakorlati felhasználására mutatnak példákat.

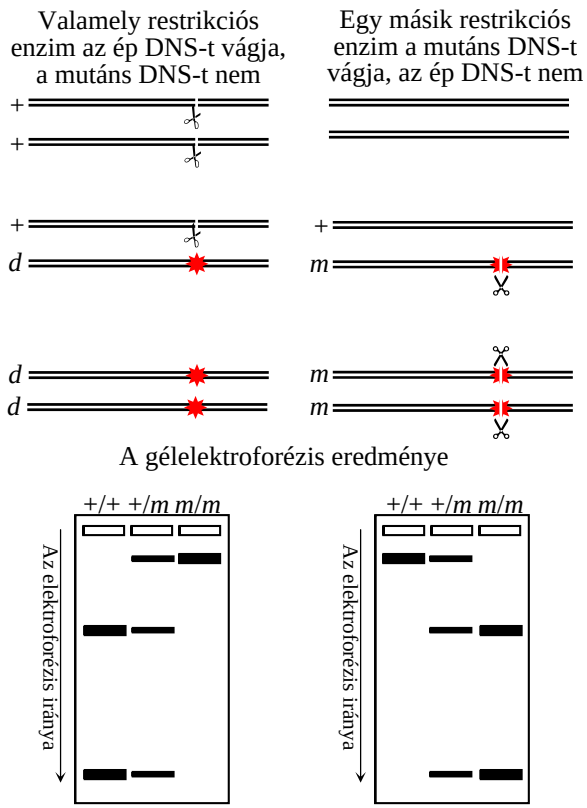
RFLP (restrikciós fragment hossz polimorfizmus)

A restrikciós enzimek a DNS-ben meghatározott bázispár szekvenciákat ismernek fel és vágják el ott a DNS-t. A hasítási helyeket restrikciós helyeknek nevezik. A hasítás nyomán olyan ún. restrikciós fragmentek képződnek, amelyek mérete megfelel a restrikciós helyek egymástól mért fizikai távolságának. (Amit a restrikciós helyek között levő bázispárok számával szokás jellemezni.) A restrikciós fragmenteket gélelektroforézissel el lehet különíteni. Az elektroforézis során a hosszabb fragmen-tek rövidebb, a rövidebb fragmentek hosszabb utat tesznek meg. Az azonos hosszúságú fragmentek egy sávot képeznek (16.2. ábra). A sávok helyzete fordítottan arányos a restrikciós fragmentek hosszának logaritmusával.

A sávok láthatóvá tételére két megoldás használatos.

(1) A DNS-hez kapcsolódó festékkel

Ha a DNS emésztése nyomán csak kevés számú fragment képződik (a DNS-t vektorból izolálták, vagy PCR-al készítették), a gélelektroforézis során csak néhány sáv képződik (16.2. ábra). A sávokban levő DNS-t többnyire etidium bromiddal teszik láthatóvá. A DNS-hez kötődő etidium bromid UV fényben narancssárgás színben fluoreszkál.



16.2. ábra. A restrikciós fragmentek diagnosztikus értéke. Készítsünk a PCR módszerével DNS-t +/+, +/*m* és *m*/*m* genotípusú emberek genomjának valamely szakaszáról. Emésszük a PCR terméket azzal a restrikciós enzimmel, amely DNS-t a ✂-el jelölt helyen elvágja. A +/+ genotípusú emberek esetében kétféle méretű fragment képződik: egy rövid és egy hosszabb. A fragmentek a géleletroforézis során két vastag sávot képeznek. Az *m* mutáns allélban a ✸ mutáció megszün-tette a restrikciós helyet, ami miatt a restrikciós enzim nem vágja el (nem emészti) a PCR terméket. Az *m*/*m* emberek esetében egyetlen vastag sáv képződik: a hosszú DNS fragmenteknek a „zseb" közelében gyülekeznek, képeznek egyetlen vastag sávot. A +/*m* heterozigóták sáv-mintázata különbözik mind a +/+, mind pedig az *m*/*m* emberekétől. Megtörténhet, hogy a ✸ mutáció nyomán olyan új restrikciós hely képződik, amelyet egy másik restrikciós enzim ismer fel és vágja el ott a DNS-t. Nyilvánvaló, hogy a fragmentmintázat a másik restrikciós enzim esetében is különbözik a +/+, a +/*m* és az *m*/*m* emberek esetében.

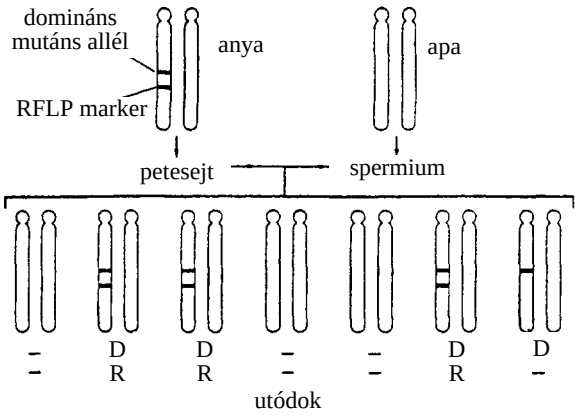
(2) DND/DNS vagy DNS/RNS hibridek kimutatásával
A DNS/DNS, vagy a DNS/RNS hibridek jelzett „próbával" folytatott hibridizáció nyomán képződnek. A genomikus DNS emésztése során oly' sok különböző hosszúságú fragment képződik, hogy azok a gélben nem diszkrét sávokat, hanem egyetlen folyamatos fragment-pástot alkotnak. Azt a módszert, amely a pástba olvadó fragmentek közül kiválasztja a megfelelő(ke)t, a későbbiekben tekintjük át.

Természetesen egy populációban sok génnek sok allélja létezhet egyidejűleg. Azt szokás mondani, hogy a populáció valamely tulajdonságot illetően polimorf. Mint láttuk, a mutációk restrikciós helyeket szüntet-hetnek meg, és újakat alakíthatnak ki, megteremtve a DNS polimorfizmus alapját. A DNS polimorfizmusa lényegében valamely restrikciós hely meglétét vagy hiányát jelenti a DNS ugyanazon szakaszán a homológ kromoszómák DNS-ében. A DNS polimorfizmus lényegében két dolgot jelent. (1) Azt, hogy valamely faj különböző egyedeiből származó homológ kromoszómák DNS-ének adott pontjában valamely restrikciós hely jelen van vagy sem. Következésképpen, valamely restrikciós enzimmel folytatott emésztés nyomán eltérő hosszúságú restrikciós fragmentek képződnek (16.2. ábra). (2) A különféle hosszúságú restrikciós fragmentek eltérő gyakorisággal lehetnek jelen a különféle populációkban. Vagyis a restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP**)** a különféle hosszúságú restrikciós fragmentek létét és gyakoriságát jelenti egy populációban. Mivel mindegyikünk genetikailag egyedi kombináció, mindegyikünkre egyedi RFLP mintázat jellemző. Ha tehát sok polimorf lokuszt veszünk figyelembe, az RFLP alkalmas módszer személyek azonosítására. Éppen úgy, mint az ujjlenyomat.

A polimorf helyek, hasonlóan a marker mutációkhoz, alkalmas eszközök a kromoszómák jól definiált pontjainak azonosítására. Amint azt a 7. fejezetben áttekintettük, a marker mutációk géneket azonosítnak. A gének azonban DNS-nek csak kicsiny hányadát (emberben mintegy 2 %-át) foglalják magukba, és közöttük csak nagyon kevésnek van marker mutáció értékű allélja. Polimorf restrikciós helyek viszont bőségesen vannak a genom azon szakaszain is, amelyek nem részei semmilyen génnek sem.

Az RFLP hasznos eljárás a genetikai eredetű tulajdonságok vizsgálatára, és használatos a prenatális diagnosztikában. Tételezzük fel, hogy az *m*/*m* homozigóták olyan betegség miatt halnak meg, mint pl. a *cisztás fibrózis* (mukoviszcidózis). Ha az *m* mutáció megszüntet (vagy éppen létrehoz) egy restrikciós helyet, az RFLP mintázat alapján különbséget lehet tenni a +/+, a +/*m*, valamint az *m*/*m* genotípusú magzatok között (16.2. ábra). A +/*m* heterozigótákat figyelmeztetni lehet a veszélyre, és magzatjaik genotípusát prenatálisan meg lehet határozni.

Minthogy a restrikciós helyek némelyike kapcsoltan öröklődhet valamely gén mutáns alléljával, a restrikciós hely lehetővé teszi a mutáns allél öröklődésének nyomon követését. Minél közelebb van a restrikciós hely a mutáns allélhoz, annál jobban használható a mutáns allél öröklődésének nyomon követéséhez (16.3. ábra).

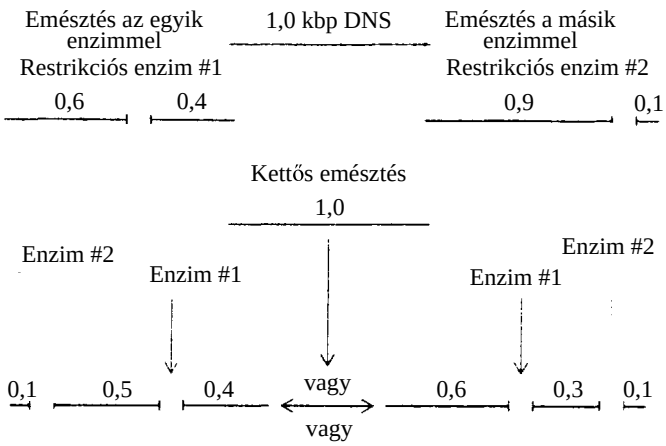


16.3. ábra. A restrikciós helyek haszna a géntérképezésben. A domináns mutáció és egy RFLP marker közötti kapcsoltság lehetővé teszi a mutáció követését az utódokban. (A D és az R jelek a D mutáció és az R marker meglétét jelzi az utódokban.)

SNP (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)
Az egypontos nukleotid-polimorfizmus (egyedi nukleotid-polimorfizmus, egyszerű nukleotid-polimorfizmus; angolul Single Nucleotide Polymorphism, SNP) olyan DNS szekvencia-variáció, melyről akkor beszélünk, ha egy nukleotid a genom egy adott helyén egy populációban a szekvenciák legalább 1%-ában jelen van. (Íme egy példa: az AAGC**C**TA szekvencia **C** helyén **T** bukkan fel: AAGC**T**TA. Az SNP-k teszik ki a humán genetikai variációk 90%-át, és minden 100-300 bázispáronként jelen vannak a humán genomban. Minden három SNP-ből kettőben a C helyén T van. Mivel az SNP-k nem sokat változnak generációról generációra, komoly segítséget jelentenek - egyebek mellett - a gyógyászatban. Érthető, hogy az SNP-k értékes „markerek” a leszármazás vizsgálatok-ban is. (Az érdeklődők a https://www.23andme.com/ honlapon tájékozódhatnak az SNP gyakorlati használatáról.)

A restrikciós vagy fizikai térképek
Ahhoz, hogy a DNS mentén eligazodjunk, kiváló lehetőséget nyújtanak a *restrikciós* vagy *fizikai térképek*. A restrikciós vagy fizikai térkép olyan ábrázolásmód, amely megmutatja, hogy a különféle restrikciós enzimek hasítási helyei milyen sorrendben és távolságban követik egymást a DNS mentén (16.4. ábra).

A restrikciós térképek készítése során valamely DNS szakaszt különféle restrikciós enzimekkel külön-külön és együtt is emésztik. Az emésztés nyomán képződő fragmenteket gélelektroforézissel elkülönítik, és meghatározzák a fragmentek méretét (16.4. ábra). A restrikciós fragmenteket méretük alapján sorrendbe lehet rendezni, *restrikciós térképet* lehet készíteni (16.4. ábra). A restrikciós térképeket szokás *fizikai térképeknek* is nevezni, mert a restrikciós helyek helyzete, egymástól mért távolsága arányos és az emésztés során képződő fragmentek hosszával, lényegében a DNS-t alkotó bázispárok számával. (A genetikai térképek torzítanak, mert a crossing overek nem azonos gyakorisággal következnek be a kromoszómák különböző szakaszain.) A restrikciós térképek készítése bármely gén molekuláris klónozásának egyik első lépése, a génfunkció molekuláris szintű megismerésének fontos mozzanata.

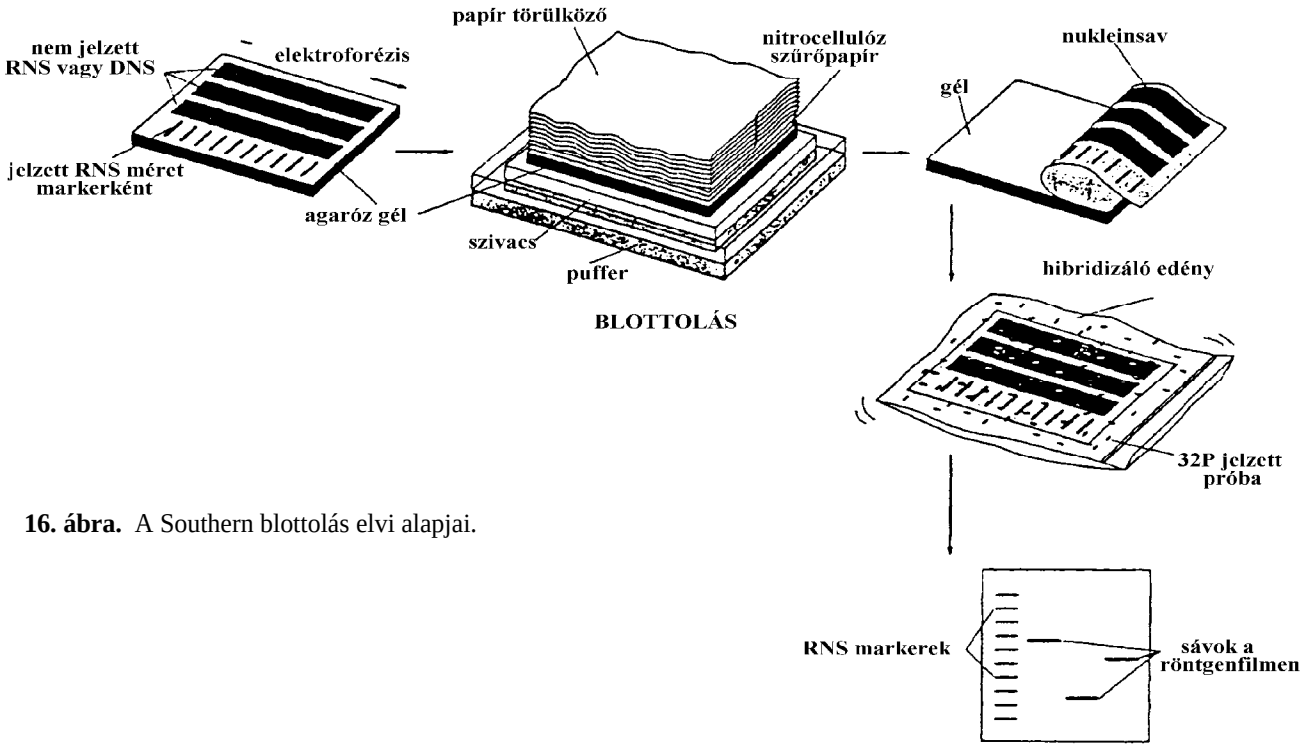


16.4. ábra. Restrikciós térkép készítésének elvi alapja. Az egy-egy restrikciós enzimmel folytatott emésztés, és gélelekroforézis nyomán meghatározhatók a restrikciós helyek, és ún. restrikciós (fizikai) térkép szerkeszthető.

Az RFLP markerek és a genetikai térképezés
Amint azt a 6. fejezetben áttekintettük, a genetikai térképek készítéséhez ún. marker mutációkat használnak. A marker mutációk lényegében látható fenotípust eredményező mutáns allélok, tájékozódási pontok a kromoszómákon. A restrikciós helyek, ugyanúgy, mint a marker mutációk, tájékozódási pontként szolgálnak a kromoszómák mentén, és használhatók térképezésre (16.4. ábra). Sok faj esetében (beleértve az embert is) részletes térképek készültek a restrikciós helyek alapján. A restrikciós helyek nemcsak gének térképezését teszik lehetővé, hanem molekuláris klónozásukat is.

Southern blottolás
Ha sejtekből, szövetekből izolált DNS-t restrikciós enzimmel emésztenek, száz és ezerszám képződnek nagyon különböző hosszúságú restrikciós fragmentek. A sokféle hosszúságú restrikciós fragment a gélelektroforézis során egy olyan hosszú „DNS fragment-pástot” képez, amelyen belül egyedi sávok nem ismerhetők fel. A megfelelő sávok felismerését a "sávtengerben” az ún. Southern analízis teszi lehetővé. A gélelektroforézissel elkülönített DNS fragmenteket nitrocellulóz (újabban nejlon) filterre „blottolják” (16.5. ábra). (A blottolás azt jelenti, hogy a gélből egy nitrocellulóz filterre szívatják át a DNS fragmenteket.) A nitrocellulóz filtert NaOH-al kezelik majd néhány tíz percen át 90-95 ^{o}C-on „sütik”,

hogy denaturálják a DNS-t, és hogy az egyszálú DNS fonalakat a nitrocellulóz filterhez kössék. A filtert ^{32}P-vel jelzett DNS próbával inkubálják, hogy a próba egyszálú szálai hibridizáljanak a komplementer szekvenciákkal. (Próbaként egyre elterjedtebben jelölik a próba DNS-t fluoreszkáló molekulákkal.) A nem hibridizáló próba DNS-t mosással eltávolítják, majd a filterre röntgenfilmet tesznek. A ^{32}P bomlása nyomán képződő β-sugárzás a röntgenfilm előhívása után fekete ezüst szemcsék sokaságaként válik láthatóvá. A képződő sötét sávok tehát lényegében megmutatják a hibrid DNS szálak helyét a különböző hosszúságú restrikciós fragmentek tengerében (16.5. ábra). A módszert - kidolgozója neve után - *Southern blottolásnak* nevezik, célja pedig DNS fragmentek detektálása jelzett DNS próbával.



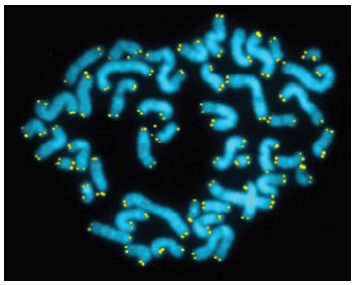
16. ábra. A Southern blottolás elvi alapjai.

Northern blottolás

A fenti elvek alapján lehet RNS-t izolálni sejtekből, szövetekből. Az RNS molekulákat gélelektroforézissel el lehet különíteni, nitrocellulóz szűrőre blottolni, majd sütni, és közülük DNS próbával kimutatni azokat, amelyek a DNS próbának komplementerei, azzal hibridizálnak. Az eljárást Northern blottolásnak nevezik. (Az ún. Western blottolás során fehérje molekulákat különítenek el gélelektorforézissel, blottolnak nitro-cellulóz szűrőre. A különféle fehérje molekulák közül specifikus ellenanyaggal detektálják és teszik láthatóvá a keresett fehérje molekulát.)

***In situ* hibridizáció és a FISH technika**

A komplementer nukleinsav szekvenciák akkor is hibridizálnak egymással, ha az egyik DNS fonal pl. egy kromoszóma része. A hibrid molekula alkalmas módszerrel láthatóvá tehető, és mikroszkópban tanulmányozható. Annak az eljárásnak, amely specifikus kromoszómális DNS szakaszt (vagy akár RNS molekulákat) tesz láthatóvá *in situ* hibridizáció a neve. Az egyedi DNS szekvenciák *in situ* kimutatása során kromatidánként olykor csak egy hibrid szerkezet képződik. A hibrid szakasz kimutatásához különleges megoldásra, a kicsinyke jel erősítésére van szükség. Egy lehetséges megoldás a következő. A próba DNS pl. digoxigeninnel (DIG) megjelölhető. A DIG-et, és rajta keresztül a hibrid DNS-t egy olyan ún. elsődleges ellenanyag ismeri fel, amely a DIG-gel specifikusan reagál. Az elsődleges ellenanyag molekulái olyan másodlagos ellenanyag molekulákkal kapcsolódnak, amelyek fluoreszcens festék molekulákkal jelzettek. Mivel egyetlen egyszálú DNS próba több DIG molekulát tartalmaz, a DNS hibrid több elsődleges ellenanyag molekulával kapcsolódhat. Egyetlen elsődleges ellenanyag molekula több másodlagos ellenanyag molekulával kapcsolódik. Egyetlen másodlagos ellenanyag molekula sok fluoreszcens csoporttal van megjelölve. Végeredményben tehát egy olyan szendvics szerkezet képződik, amely kellő intenzitással fluoreszkál, és egy fluoreszcens mikroszkópban észrevehető, tanulmányozható. A technika neve: fluoreszcencia *in situ* hibridizáció, röviden FISH. A FISH technikát általánosan használják DNS szekvenciák azonosítására kromoszómákban, mRNS molekulák helyének megállapítására sejtekbe, szövetekben (16.6. ábra).



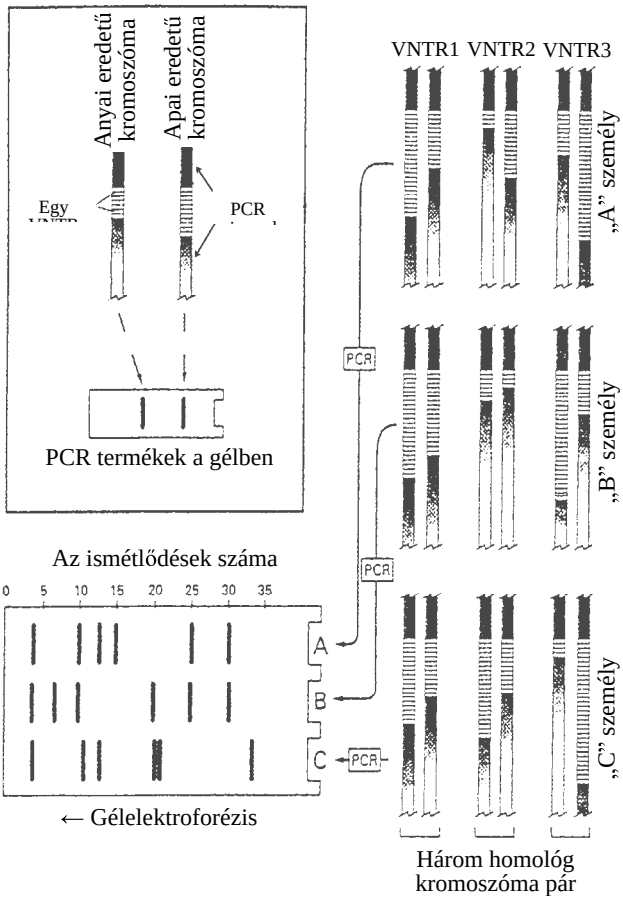
16.6. ábra. Telomer DNS kimutatása a FISH technikával. A telomer szekvencia helyét sárga pöttyök mutatják. A kromatin egyfajta festés nyomán kéken fluoreszkál.

Rekombináns DNS technológia és prenatális diagnosztika Minthogy az öröklődő betegségek az örökítő anyag változásaival kapcsolatosak, az örökítő anyag változása pedig gyakorta jár a restrikciós helyek változásával, lehetőségek kínálkoznak a magzat genotípusának megállapítására már a terhesség 10. hetében. Magzati sejtek gyűjtésére négy megoldást szokás alkalmazni. (1) Az amniocentézis során a magzatvízből gyűjtenek magzati sejteket (16.7. ábra). (2) Korion boholyból vesznek kis mintát. (A korion boholy genotípusa a magzatéval azonos.) (3) A magzat köldökvénájából vesznek pár csepp vért. (4) Az anya véréből össze lehet gyűjteni a belekerült magzati sejteket. A magzati sejteken kromoszóma, enzim és/vagy DNS vizsgálatokat lehet elvégezni. A DNS vizsgálat is többféle lehet. Leggyakrabban a DNS jól meghatározott szakaszát először a PCR módszerével amplifikálják, majd a PCR terméket vizsgálják, pl. az RFLP módszerével (16.2. ábra). Egyre gyakoribbak az olyan vizsgálatok, amelyekben megszekvenálják a PCR terméket. Olykor-olykor megesik, hogy a DNS-t először restrikciós enzimmel emésztik, a fragmenteket gélelektroforézissel elkülönítik és nitrocellulóz filterre blottolják, majd elvégzik a Southern analízist alkalmasan megjelölt DNS próbával (16.5. ábra). Természetesen a mutáns allélokat nemcsak magzatokban, hanem felnőttekben is ki lehet mutatni, és használni a genetikai tanácsadásban.

16.7. ábra. Egy 13. hetes ember embrióról készült felvétel.

VNTR. Példa a molekuláris technikák igazságügyi orvostani felhasználására
Az igazságügyi orvostan gyakran használja azt a tényt, hogy mindannyian egyedi genetikai kombinációk vagyunk. (Kivéve az egypetéjű ikreket.) A molekuláris módszerekkel csekély mennyiségű DNS-ből kiindulva azonosítanak embereket az ún. DNS ujjlenyomat valamely módszerével.

Az eukromatinban rövid DNS szekvenciák tandem módon ismétlődő kópiái vannak elrendeződve. A mérsékelten ismétlődő szekvenciák itt említett típusát *mikroszatelliteknek* vagy *VNTR*-oknak (angolul: variable number of tandem repeats) nevezik. Mivel a kópiák száma az egyes VNTR blokkokban és az egyes emberekben is gyakran különböző, a VNTR analízis az igazságügyi orvostanban jól használható személyek azonosítására (16.8. ábra).



16.8. ábra. A VNTR analízis elvi alapjai. Magyarázat a szövegben.

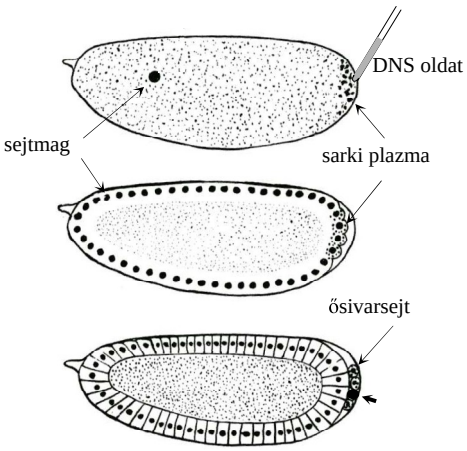
Első lépésben a különböző típusú VNTR-eket a PCR módszerével amplifikálják (16.8. ábra). Értelemszerűen, mind az apai, mind az anyai eredetű kromoszómákból származó DNS alapján. A PCR primerek azoknak a DNS szekvenciának komplementerei, amelyek közvetlenül a VNTR szomszédságában vannak, és amelyek azonosak az anyai, valamint az apai eredetű kromoszómákban. A PCR termékek hossza két dologtól függ: (i) milyen hosszú annak az „egység” DNS szakasznak a hossza, amely a VNTR-ben ismétlődik, és

(ii) a kópiák számától. A VNTR-ekről képződött PCR termékeket gélelektroforézissel elkülönítik. Az „egység” DNS szakasz hosszának ismeretében, valamint a PCR termék mérete alapján meghatározható a PCR termékeket alkotó kópiák száma. Végeredményben egy, az adott emberre jellemző mintázat képződik (16.8. ábra). A VNTR analízis roppant érzékeny: egyetlen hajhagymában, vagy egy vércsöppben van annyi DNS, amely alapján elvégezhető a VNTR analízis.

Riporter- és transzgének

A rekombináns DNS technológia (vagyis a különböző eredetű DNS szakaszok tervszerű kombinálása és használata) lehetővé teszi a DNS szekvenciák mérnöki pontosságú kombinálást, tetszés szerinti módosítását, a rekombináns DNS szekvenciák transzformálását sejtekbe, élőlényekbe.

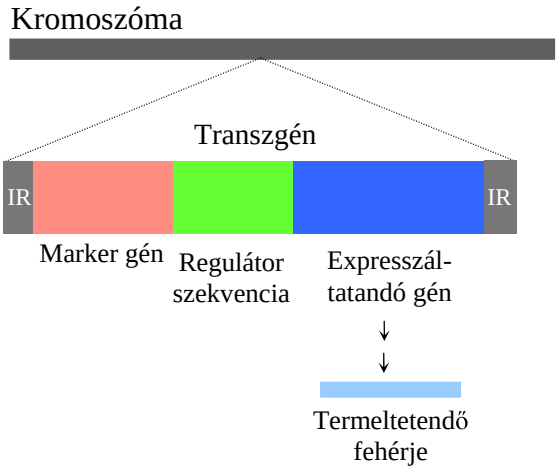
A DNS-t különféle módszerekkel lehet a sejtekbe juttatni. Vannak kereskedelmi forgalomban beszerezhető preparátumok, amelyekbe a DNS becsomagolható, és miután a sejtekhez keverik, bejuttatják a DNS-t a sejtekbe. Az ún. génpuskák olyan apró fémgömböket lőnek be a sejtekbe, amelyekre DNS molekulákat „ültettek”. Az elektroporáció során DNS oldatba tesznek sejteket, elektromos kisüléssel apró pórusokat nyitnak a sejthártyán, amelyeken át DNS molekulák áramlanak a sejtbe, amíg a pórusok nyitva vannak. Meglehetősen általános eljárás, hogy a DNS oldatot vékony kapillárissal injektálják be a sejtekbe, embriókba (16.9. ábra).



16.9. ábra. Módszer transzgén készítésére muslicában. A muslica ősivarsejtjei a pete citoplazma hátulsó végében alakulnak ki. Úgy, hogy a sarki plazmába érkező sejtmagvak körül kialakuló sejtek magukba zárják a sarki plazmát. A sarki plazmába injektált DNS molekulák bekerülnek az ősivarsejtekbe. Megmegesik, hogy DNS molekulák egyike-másika - a transzpozáz enzim hatására - beékelődik valamely ősivarsejt valamely kromoszómájába, és a továbbiakban a kromoszóma részeként, transzgénként öröklődik. A vastag fekete nyíl egy olyan ősivarsejtre mutat, amely egyik kromoszómájának része egy transzgén.

A sejtekbe juttatott DNS gyakorta nem válik a kromoszómák részévé. A benne kódolt genetikai információ ún. tranziens módon expresszálódik: addig kódolhatja fehérjék képződését, amíg le nem bomlik. A képződő fehérjék szerepe tanulmányozható.

Ha a DNS olyan szekvenciákat is tartalmaz, amelyek lehetővé teszik, hogy a DNS konstrukció a kromoszómák DNS-ébe inszertálódjon, meg-megtörténik, hogy a sejtekbe juttatott DNS részévé válik a kromoszómák DNS-ének, és mint transzgén öröklődik tovább, sejtről sejtre, generációról generációra (16.10. ábra).

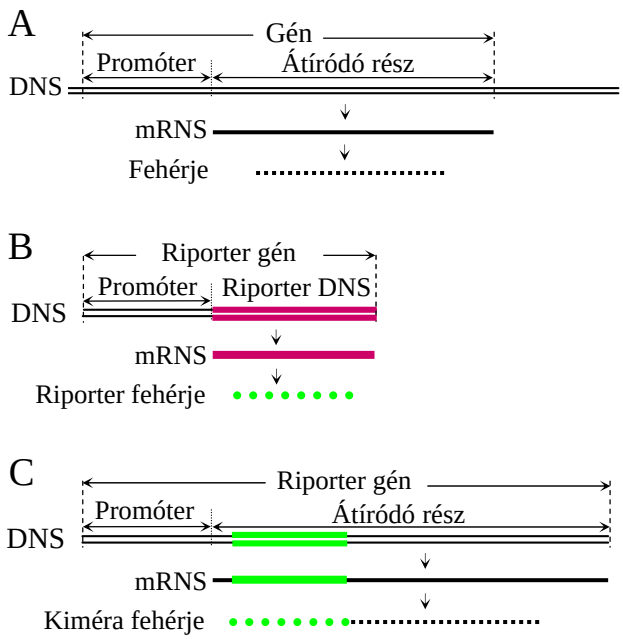


16.10. ábra. Egy tipikus transzgén szerkezete. A regulátor szekvencia szabályozza az expresszáltatandó gén „működését”. A marker gén a transzgén kényelmes felismerhetőségét teszi lehetővé. Az IR (angolul inverted repeat) az a szekvencia, amely a moblils genetikai elemek mobilitásáért felelős, pontosabban a DNS-be történő beékelődésükért.

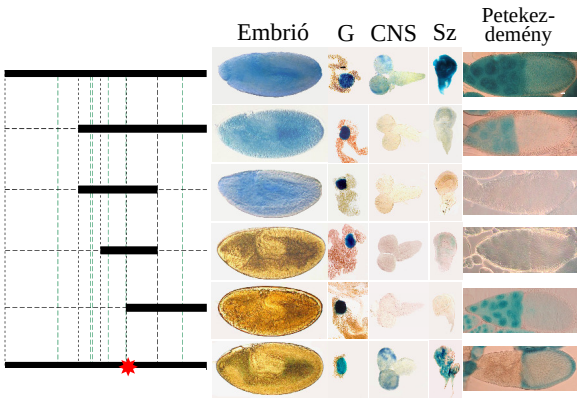
A transzgén olyan idegen eredetű DNS valamely élőlény valamely kromoszómájában, amely az értelmes ember céltudatos tevékenységének eredménye. A transzént hordozó élőlényeket szokás transzgénikus élőlényeknek nevezni. Ők egyben az ún. genetikailag manipulált organizmusok (GMO) egyik típusát alkotják.

A riporter (szonda) konstrukciókban valamely gén szabályozó (promóter) részét, vagy gyakorta annak jód meghatározott részeit olyan gének átíródó (strukturális) részével kombinálják (gyakran a cDNS-ével), amely terméke könnyen felismerhető (16.11. ábra). Az átíródó részt szokás riporter génnek nevezni. Minthogy az itt említett DNS konstrukciók által kódolt ún. riporter fehérjék megjelenési mintázatát valamely másik gén szabályozó része határozza meg, a riporter fehérje jelenléte alapján a tanulmányozandó gén expresszió-mintázatára lehet következtetni.

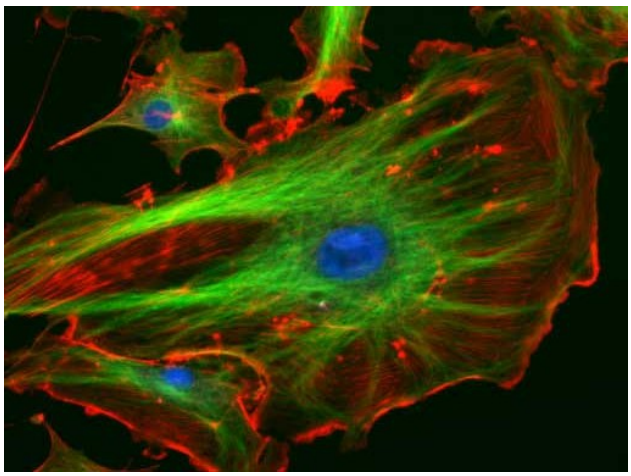
Riporter génként gyakran használják az *E. coli Lac* operonjának *LacZ* génjét, amely terméke - a β-galaktozidáz - az X-gal nevű színtelen vegyületből kékszínű, kényelmesen felismerhető terméket készít (16.12. ábra). Riporterként - egyebek mellett - használják pl. a szentjánosbogár egyik rokonának luciferáz génjét is, amely terméke - a luciferáz enzim - bontja luciferint, és közben luminszkál. A mostanság leggyakrabban használt riporter gén az *Aequorea victoria* medúzafaj *GFP* génje, amely a zölden fluoreszkáló protein (GFP, green fluorescent protein) képződését kódolja. Sőt, a *GFP* génnek vannak olyan mutáns változatai, amelyek kéken, sárgán, vagy vörösen „világítják ki" az óhajtott fehérjefeléleséget (16.13. ábra).



16.11. ábra. A Riporter gén típusok. Részletes magyarázat a szövegben. (A) A gén expresszióját a promóter (a szabályozó rész) szabályozza. (B) A promótert valamely riporter DNS-el kombinálva a kódolt fehérje expressziós mintázata a promóter szabályozása alatt áll. (C) Gyakori megoldás, hogy tanulmányozandó génbe pl. a GFP (Green Fluorescent Protein) képződését kódoló DNS szakaszt illesztik. A jelen példában a képződő ún. kiméra fehérje „ki van világítva". A riporter géneket sejtekbe, élőlényekbe juttatva tanulmányozható a vizsgált gén (itt A) expressziójának sajátosságai.



16.12. ábra. A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) Importin-β képződését kódoló *Ketel* génje promóterének itt kivastagított szakaszait az *E. coli LacZ* (riporter)génjével kombinálva volt megállapítható, hogy a promóter mely részében vannak azok a szekvenciák, és azokhoz milyen transzkripciós faktorok kapcsolódnak, hogy biztosítsák a *Ketel* gén szövet specifikus expresszióját biztosítják. A ✸ jel egy olyan *in vitro* indukált mutáció helyét mutatja, amely megszüntetette egy transzkripciós faktor kötőhelyét. (Lásd: Villányi et al., Mechanisms of Development **125**, 822, 2008.)



16.13. ábra. Az ábrán a mikrotubulusok zölden, a mikrofilamentek vörösen, a DNS kéken van „kivilágít-va" (http://www.newscientist.com/blog/-lastword/up-loaded_images/070815_life_glue_3-702898.jpg).

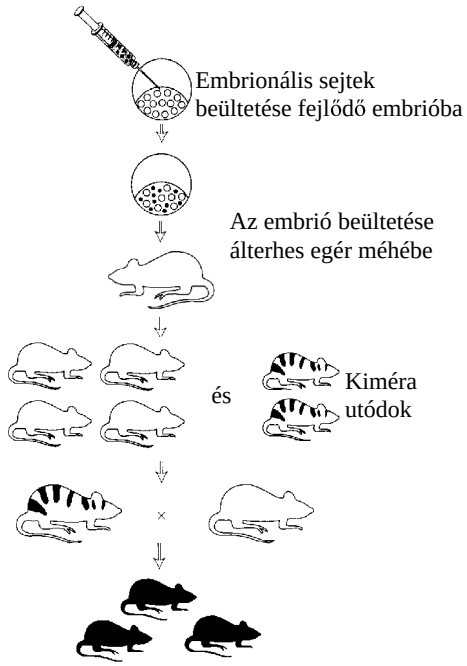
Transzgénikus élőlények

Meglehetősen gyakori, hogy baktérium gének erős promóterét kombinálják eukariota gének cDNS-ével, és transzformálnak mikroorganizmusokba, élesztőkbe, növényekbe vagy akár emlősökbe, azért, hogy bennük az idegen fehérjét termeltessék. Ma már génsebészeti eljárással készített rekombináns DNS alapján termeltetnek baktériumokban pl. emberi inzulint, növekedési hormont, vagy antigéneket vakcináláshoz,

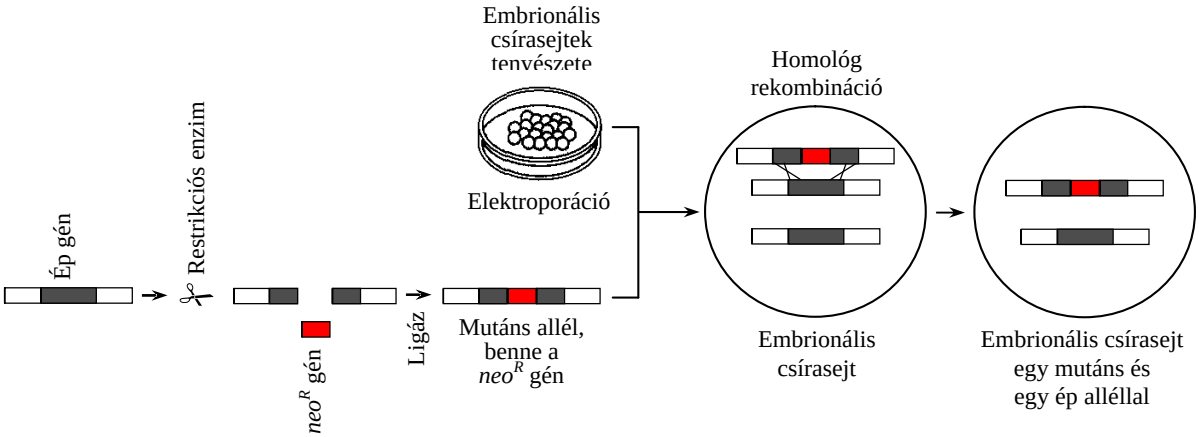
termesztenek olyan transzgénikus növényeket, amelyek pl. rovarokat mérgező fehérjéket szintetizál-nak és tartalmaznak. Léteznek olyan transzgénikus növények, amelyek valamilyen gyomirtó szerre rezisztensek, amelyek környezetéből a gyomokat a gyomirtó szerrel ki lehet irtani. Vannak olyan transzgénikus birkák, amelyek teje az ember egyik véralvadási faktorát tartalmazza. Sőt léteznek patkány méretűre növő, növekedési hormon transzgént hordozó egerek is…

Elvben az öröklődő betegségek is gyógyíthatók génsebészeti módszerekkel egy olyan folyamatban, amit *génterápiának* neveznek. DNS-el ugyanis elvileg bármely génfunkció hiányát pótolni lehet. Úgy, hogy a sejtekbe/élőlényekbe transzformálják az ép fehérjét kódoló gént. A génterápia rutinszerű eljárás prokariotákban, élesztőkben és Drosophilában. (Azzal a különbséggel, hogy ott nem nevezik génterápiának). A gerincesek legtöbb génje sokkal nagyobb, semhogy egyetlen vektorba beleférne: túlságosan hosszú az a DNS szakasz, amely mind a strukturális, mind pedig a génexpressziót szabályozó szekvenciákat magába foglalja. Talán a cDNS egy alkalmasan megválasztott promóterrel megoldja a problémát. Esetleg kis mesterséges kromoszómákba lesznek beépíthetőek nagy DNS blokkok, és a kis kromoszómák vektorként funkcionálhatnak. A nehézségektől függetlenül már emberben is folyamatban vannak az első biztató génterápiás próbálkozások.

A génsebészeti és sejtbiológiai módszerek azt is lehetővé teszik, hogy pl. egerek ép alléljait olyan mutáns allélokra cseréljék ki, amelyeket kémcsőben készítenek ún. *in vitro* mutagenezissel (16.14. és 16.15. ábra). Az ún. géncserés egerekben aztán tanulmányozható a mutáció szerepe, pl. az egyedfejlődésben. Azokat az egereket „knock out” egereknek szokás nevezni, amelyekben egy gén ép alléljét egy funkcióját vesztett allélra cserélték ki.



16.15. ábra. Módszer olyan egerek „készítésére”, amelyek homozigóták a 16.14. ábrán bemutatott, a „génkiütött” mutációra.



16.14. ábra. Módszer géncserére. Az ép gén DNS-ét két restrikciós enzimmel „felnyitjuk”. Miközben a génbe idegen eredetű DNS-t ékelünk, a gén elveszti funkcióját. Kódoljon a génbe illesztett DNS neomicin rezisztenciát (*neo*^{R}). Keverjük a rekombináns DNS-t össejtek tenyészetébe, majd elektroporációval tegyük lehetővé, hogy jussanak a sejtekbe DNS molekulák. A sejtek egyikében-másikában ritkán két homológ rekombináció következik be, amely esemény nyomán az ép allél a mutánsra cserélődik ki. Minthogy a mutáns allélt hordozó (arra heterozigóta) sejtek neomicinre rezisztensek, neomicin kezelés nyomán kiszelektálhatók, elszaporíthatók.

Az itt bemutatott „knock-out” egér példa a genetikailag manipulált organizmusok másik típusára: nem idegen eredetű gént hordoz, hanem céltudatos emberi tevékenység nyomán változott meg valamely génjének genetikai tartalma.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt nagyjából három évtizedben kifejlődött génsebészet nemcsak a DNS-en alapuló diagnózist tette lehetővé, hanem pl. transzgénikus élőlények előállítását, a génexpresszió szabályozás molekuláris szintű megértését, vagy származástani kapcsolatok megismerését. A molekuláris biológia alapvetően megváltoztatta az életről, az élővilágról alkotott elképzeléseinket. A történet természetesen csak mostanában kezdődött...

FORRÁSOK

1. Sadava, D., Life the Science of Biology, 386-404, 2011.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 208-234, 2000.
3. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. An Introduction to Genetic analysis, 365-462, 1999.
4. Gáspár Imre és Szabad János, Sejtalkotók a kémiai Nobel-díj fényében; kivilágított fehérjék. Élet és Tudomány **83**, 1478-1481, 2008.
5. Ringler András és Szabad János, A konfokális (lézer pásztázó) mikroszkóp. A biológia tanítása **7**, 4-7, 1999.

17. A SZAPORODÁS BIOLÓGIÁJA. ÉLŐLÉNYEK KLÓNOZÁSA.

Ivartalan és ivaros szaporodás. Élőlények klónozása. A diploid állapot jelentősége. Gének és a nemek. Ősivar sejtek és az ivarsejtek képződése. A megtermékenyülés. A testi sejtek szerepe.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2006. tavaszán

BEVEZETÉS

Az élőlények olyan stratégiákat „választanak", amelyek alkalmassá teszik őket az életben maradásra és szaporodásra az adott környezetben. A következő fejezet néhány, a szaporodással kapcsolatos jelenséget tekint át: a szaporodás típusait, a klónozás típusait, a gének, az ivarsejt-vonal és a testi sejtek szerepét, valamint a megtermékenyülés mechanizmusát.

A SZAPORODÁS TÍPUSAI

I. Ivartalan szaporodás, szaporítás

Vannak olyan élőlények, amelyek alkalmas környezeti feltételek mellett ivaros folyamatok nélkül képesek utódok létrehozására, ivartalanul szaporodnak. Az ivartalan szaporodás előnye, hogy az élőlények gyorsan és hatékonyan képesek az életteret betölteni, hasznosítani. Hátránya, hogy az utódok genetikailag a szülővel és egymással is azonos értékűek, a változó környezeti feltételekre azonos módon reagálnak, és esetleg valamennyien elpusztulhatnak.

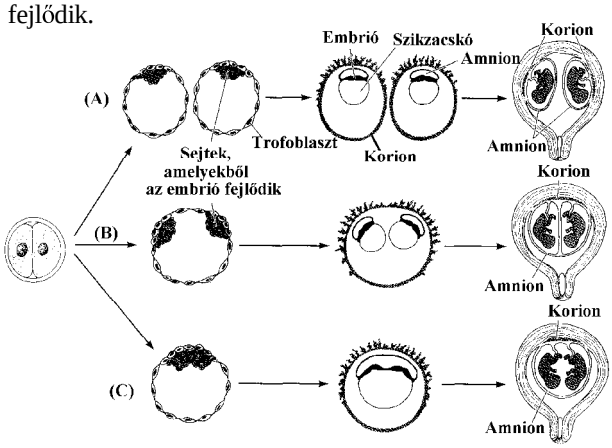
A *szűznemzés* során meg nem termékenyült petékből fejlődnek utódok. A levéltetvek kedvező körülmények között szűznemzéssel szaporodnak. Miután az életfeltételek kedvezőtlenné válnak, a levéltetvek ivarosan szaporodnak, genetikailag változatos utódokat képeznek.

1. Klónozás szervekből, szövetekből. Az ivartalan szaporodás természetes körülmények között is megtörténik. A *sarjadzás* és a *bimbózás* gyakori jelenség például a hidrák és sok növényfaj esetében. Vannak olyan állat és növény fajok, amelyek *regenerációval* képesek kipótolni az elveszett testrészeket. A darabokra szabdalt tengeri sünből nagyon sok tengeri sün regenerálódik, mintegy ivartalanul szaporodva. A regeneráción alapuló típusú ivartalan szaporodás gyakorta az ember közreműködésével valósul meg. Ismert példái a növények *dugványozása*, az *oltás* és a *szemzés* is, amely módszerekkel egyetlen kiváló tulajdonságú növény elszaporítható, klónozható. (A klón egyetlen élőlény ivartalan szaporodás/szaporítás révén képződött összes leszármazottja. A klónozás görög eredetű szó, és dugványozást jelent.)

2. Klónozás sejtekből. Növények regenerálása egyedi sejtekből néhány évtizede alkalmazott és bevált eljárás növények klónozására. (Lásd a 14.2. ábrát.) Az állatok „klónozódására", klónozása sejtből kiindulva három lehetőség ismert.

(1) Az ikresedés folyamata a még csak néhány sejtből álló embrió sejtjeinek elválasztódását, elválasztását jelenti, majd a sejtekből utódok képződését. Az ún. ikresedés folyamata természetes körülmények között is megtörténik (17.1. ábra). (Pl. némely övesállat faj nősténeyeinek mindig nyolc egypetéjű ikrei születnek.)

Az „ikresítés" során a csupán 2-4 sejtből álló embriók sejtjeit elkülönítik, majd a sejteket külön-külön béranyák méhébe ültetik, ahol a sejtekből élőlény fejlődik.



17.1. ábra. Az ember egypetéjű ikrek képződésének lehetséges mechanizmusai.

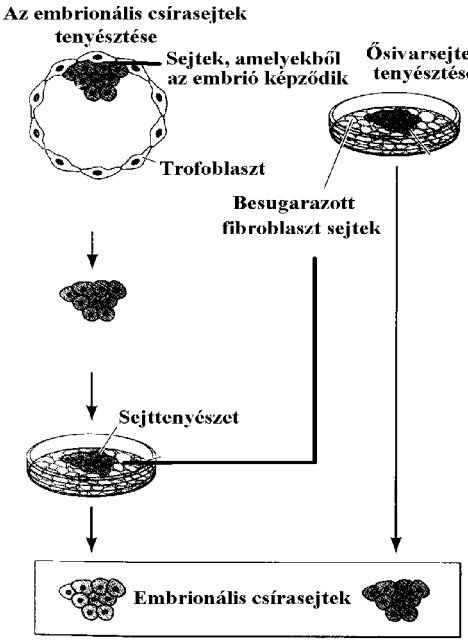
(2) Klónozás embrionális sejtekből. Az ikrek léte bizonyítja, hogy a néhány sejtből álló embriók sejtjei totipotensok, belőlük az élőlény testét alkotó valamennyi sejttípus differenciálódhat. Az elmúlt néhány évben dolgozták ki azokat ez eljárásokat, amelyek során úgy szaporítanak (i) embrionális csírasejteket (ES, embryonic stem cells) vagy embrionális ősivarsejteket (EG, embryonic germ cells) tápoldatban, hogy a sejtek megőrzik totipotens jellegüket (17.2. ábra). Az embrionális sejteket vissza lehet ültetni fejlődésben levő embrió sejtjei közé, ún. injekciós kimérákat lehet készíteni. (Lásd a 12. fejezetet). A beültetett sejtek a fejlődő embrió részévé válnak, és ha hozzá járulnak az ivarsejtvonal képződéséhez, belőlük ivarsejtek is származnak. Alkalmas keresztezések nyomán aztán olyan élőlények készíthetők, amelyek lényegében a sejttenyészetben levő sejtekből származnak (17.3. ábra).

Az embrionális sejtek haszna szerteágazó. Itt három példát említünk.

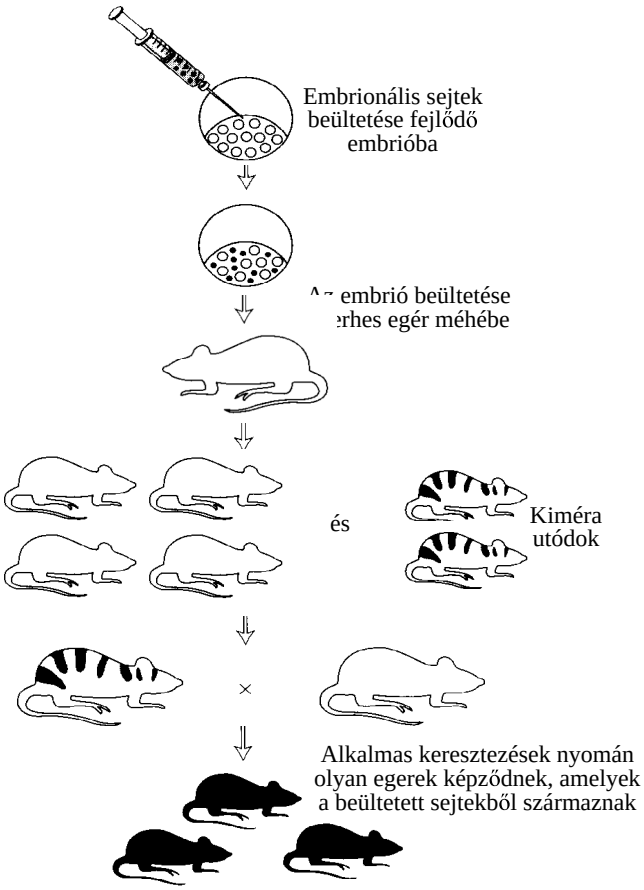
(i) Olyan közegben, amely a sejtdifferenciációt irányító növekedési faktort tartalmaz, a sejtek pl. olyan funkcionális idegsejtekké differenciálódnak, amelyekkel elpusztult idegsejteket lehet pótolni.

(ii) Az embrionális sejtek némelyikének kromoszómájába transzgént lehet inszertálni. (Pl. olyat, amelyben a β-laktoglobulin gén promótere az ember IX. véralvadási faktor génjének expresszióját szabályozza. A β-laktoglobulin promóter azt biztosítja, hogy a transzgén a tejmirigy sejtekben expresszálódik. Végeredményben a véralvadási faktor a tejben lesz, onnan izolálható és felhasználható a gyógyászatban.) Ha a transzgénnek része egy olyan gén is, amely biztosítja az embrionális sejtek rezisztenciáját valamilyen hatóanyaggal szemben, a sok millió embrionális sejt közül kiválasztható az a néhány, amely a transzgént tartalmazza. A transzgént tartalmazó sejt fejlődésben levő embrióba ültethető, a képződő injekciós kimérák pedig a fenti módon kezelhetők

(17.3. ábra). (Zárójelben jegyezzük meg, hogy transzgénikus élőlényeket úgy is lehet készíteni, hogy a DNS-t a frissen megtermékenyített petébe injektálják, a hím vagy a női pronukleuszba. Jó esetben az utódok 10-30%-a lehet transzgénikus.)



17.2. ábra. Az embrió csírasejtekből illetve az ősivarsejtekből embrionális sejtek olyan tenyészete készíthető, amelyben miközben korlátlanul osztódnak a sejtek, megőrzik totipotens jellegüket. (A besugárzott fibroblaszt sejtek nem képesek osztódni. Ők teremtenek alkalmas tápláló környezetet ahhoz, hogy a frissen izolált embrionális sejtek életben maradjanak és osztódjanak.)

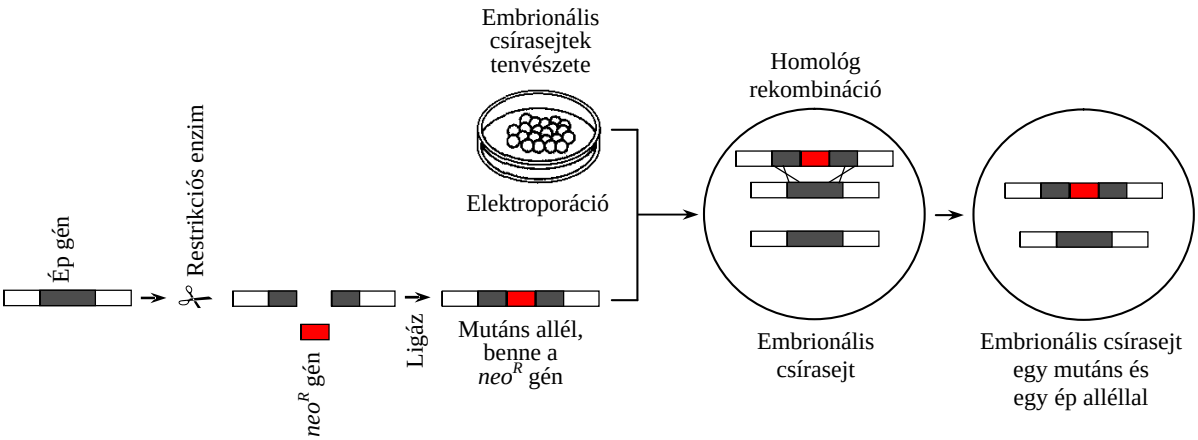


17.3. ábra. Az embrionális sejttenyészet sejtjei fejlődő embrió sejtjei közé ültethetők, injekciós kimérák készíthetők. A kimérák leszármazottai között olyanok is vannak (a feketék), amelyek az embrionális sejttenyészet sejtjeiből származtak.

(iii) Az ún. *géncserés* élőlényekben tetszés szerint kiválasztott gén ép alléljét cserélik ki olyan mutáns allélra, amelyet kémcsőben készítenek. A mutációt tetszés szerinti helyen lehet készíteni ún. *in vitro* mutagenezis módszerével PCR reakciók során (17.4. ábra). A mutáns allélt - és vele együtt egy ún. szelektáló markert - tartalmazó DNS-t először embrionális sejtek tenyészetébe viszik, a sejteket transzfektálják. (Transzfekció = eukariota sejtek transzformációja DNS-el.) A sejtek némelyikében homológ rekombináció játszódik le az ép és a mutáns allél között. A homológ rekombináció során az ép allél úgy cserélődik ki a mutáns alléra, hogy közben a szelekciós marker is a kromoszóma részévé válik (17.4. ábra). Az embrionális sejtek közül a szelektálható markerek alapján ki lehet válogatni azokat, amelyek a mutáns allélt hordozzák, belőlük injekciós kimérákat lehet készíteni, majd olyan élőlényeket, amelyek homozigóták arra a mutációra, amelyet kémcsőben készítettek a gén tetszés szerinti helyén. Mivel a mutáns allél többnyire a génfunkció vesztésével, „kiütésével" jár, a fent leírt technikával készített élőlényeket szokás „knock out" élőlényeknek is nevezni. A géncserés élőlények kiválóan alkalmasak génfunkciók *in vivo* tanulmányozására.

(3) Teratóma és teratokacinóma sejtek. Megesik, hogy az ősivarsejtek némelyike nem jut el az embrió gonádkezdeményeibe, hanem a testi sejtek között valahol megreked, él és osztódik. Az utódsejtek lényegében úgy viselkednek, mint az embrionális (EG) ősivarsejtek: miközben osztódnak, csaknem totipotensek maradnak. Olykor daganatot ún. teratómát képeznek. Ha a teratóma sejtek növekedési faktorral találkoznak differenciálódnak, és az élőlény testében jellegzetes szövetet képeznek (pl. fogat, csontot, porcot, bőrt szőrszálakkal). A teratóma sejtek nevüket jellegzetességük alapján kapták: a teratológia rendellenes egyedfejlődést jelent. A teratóma sejtek sejttenyészetben osztódnak, és lényegében úgy használhatók, mint az embrionális sejtek. A teratóma sejtek olykor rosszindulatú daganatok (teratokarcinómák) forrásai. A teratokacinómából izolált sejtek alkalmas tápközegben szaporíthatók, és nagyjából úgy használhatók, mint az embrionális sejtek. Különös, hogy miután a teratokarcinóma sejteket fejlődésben levő embrió sejtjei közé ültetik, a rákos sejtek „megszelídülnek", az embrió testének alkotóivá válnak, belőlük élőlény származtatható. Az embrionális, a teratóma/teratokarcinóma sejtek, az injekciós kimérák, a transzgénikus és a géncserés élőlények a biológia és az orvostudomány új perspektíváit nyitották meg.

3. Klónozás sejtmagból. A magasabb rendű állatok differenciálódott testi sejtjeiből annak ellenére nem lehet élőlényeket „készíteni”, hogy a sejtek tartalmazzák mindazt az örökítő anyagot, amely egy élőlény kifejlődéséhez és életéhez szükséges. Az elmúlt néhány évben dolgozták ki azokat a módszereket, amelyek során testi sejtek magját olyan petesejtbe ültetik be, amelynek a saját magját eltávolították. A művi úton létrehozott zigóták némelyikéből élőlény fejlődik. A művi úton készített embriókból embrionális sejtek tenyészetét lehet készíteni, és olyan feladatok megoldására használni, amint azt az előzőekben áttekintettük.



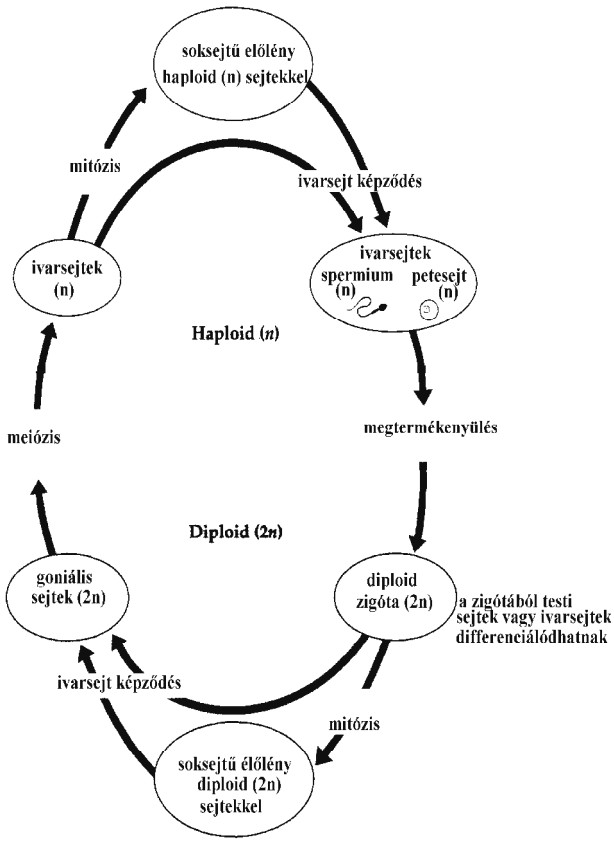
17.4. ábra. Technika géncserés élőlények készítésére. A *neo*^{r} gén inszerciója – homológ rekombináció során - (i) megszüntette az ép allél funkcióját és (ii) rezisztenciát biztosít neomicin ellen. Az elektroporáció során sok olyan apró lyuk képzőik a sejthártyán - elektromos kisülés nyomán -, amelyeken át DNS áramolhat be a sejtekbe, lehetőséget teremtve a homológ rekombinációra.

II. Ivaros szaporodás

Az ivaros szaporodás során ivarsejtek képződnek, és olvadnak össze a megtermékenyülés során az egymást követő nemzedékek folyamában (17.5. ábra). Az ivaros szaporodás a biztosítéka az élőlények sokféleségének, és alkalmazkodásának a változó környezeti feltételekhez. Amint azt a 7. és a 11. fejezetekben áttekintettük, az élőlények sokfélesége három forrásból származik. (i) A mutációk biztosítják a genetikai változékonyság alapjait. (ii) Az anyai és az apai eredetű kromoszómák független kombinálódása az első meiotikus osztódás során újfajta kromoszóma és genetikai kombinációk kialakulását eredményezi az ivarsejtekben és az utódokban. (iii) Az első meiotikus osztódás profázisában (annak pachitén szakaszában) a crossing over a homológ kromoszóma részek cseréjét, a szülői genetikai állományok további kombinálódását eredményezi, fokozva a genetikai sokféleséget.

A diploid állapot jelentősége

A genetikai sokféleség forrásának alapvető feltétele a diploid állapot: az anyai és apai genom együttes jelenléte a sejtekben. A diploid és a haploid állapot érdekes módon váltakozik az élőlények különféle típusaiban (17.5. ábra). A diploid állapot azonban nemcsak az anyai és apai eredetű kromoszómák és kromoszóma részek cseréjére ad lehetőséget, hanem (i) heterozigóta állapotban tart olyan mutációkat, amelyek bizonyos környezetben ugyan csökkentik az életképességet, de más körülmények között előnyösek lehetnek. A heterozigóta állapotban levő mutációk „megmérettetésére” az egymást követő generációk folyamán adódik lehetőség. (A rovarirtó szerekre rezisztens mutáns rovarok jellegzetes példák.) (2) A diploid állapot lehetővé teszi új mutációk kialakulását, új gének képződését is.



17.5. ábra. A haploid és a diploid szakaszok váltakozása a soksejtű élőlények életciklusai folyamán.

Nemek és az ivaros szaporodás; genetikai alapok

Az ivaros szaporodás alapvető feltétele a női és a hím nemek létezése. Milyen mechanizmusok biztosítják a két nem kialakulását? A különféle genetikai és környezeti mechanizmusok közül itt csak azt a genetikait tekintjük át, amely a magasabb rendű gerincesekre jellemző.

A nemek kialakulása lényegében egy ún. mester gén expressziójának következménye az embriógenezis korai szakaszában, emberben a terhesség hetedik hetében. Emberben (és nagyon sok más fajban) az ún. *TDF* (testis determining factor) gén szerepe kulcsfontosságú. A *TDF* gén az Y kromoszóma rövid karjának csúcsa közelében, az *SRY* (sex-determining region on the Y chromosome) régiójának része. A *TDF* gén azt a 223 aminosavból álló TDF fehérjét kódolja, amely egy transzkripciós faktor. Az Y kromoszómát hordozó embriókban a TDF transzkripciós faktor a differenciálatlan gonád kezdemények fejlődését a herékre jellemző irányába tereli. Hogy valóban az SRY-ban levő gén a hím fejlődési utat meghatározó mester gén azok a kromoszómálisan XX transzgénikus egerek bizonyítják, amelyek az *Sry* transzgént hordozzák: az XX; *Sry* egerek hímek. (Az XX; *Sry* egerek azért sterilek, mert nem hordozzák azokat az Y kromoszómához kapcsoltan öröklődő géneket, amelyek funkciója a spermium farok mozgásához szükséges.)

Emberben a *TDF* gén a terhesség hetedik hetében expresszálódik, és irányítja a fejlődést a hímekre jellemző útra. A TDF fehérje hatására a herében hím nemi hormonok képződnek, amelyek közül a tesztoszteron a legfontosabb. A továbbiakban a hím nemi hormonok irányítják a fejlődést a hímekre jellemző útra. TDF hiányában a fejlődés a női nemre jellemző utat követi.

***Tesztikuláris feminizáció, szex reverzális* és a pszeudohermafroditák**

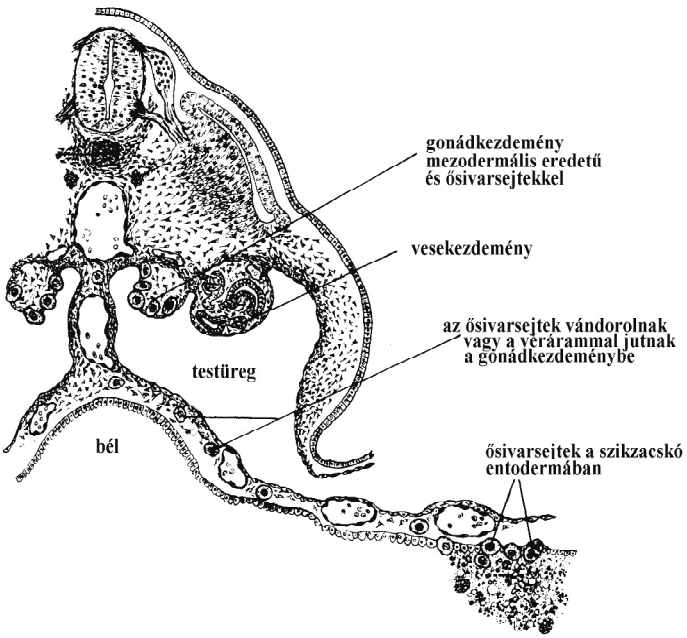
Ha a *TDF* gén nem expresszálódik, vagy funkcióképtelen TDF fehérjét kódol (pl. mutáció miatt), az XY emberek fejlődése a nőkre jellemző utat követi. Hasonló a helyzet akkor is, ha a tesztoszteron nem képes hatását kifejteni, pl. mert hiányoznak a tesztoszteront érzékelő receptorok és/vagy pl. mutációk miatt a tesztoszteron receptor komplex nem tudja hatását kifejteni. A tesztoszteronra reagáló gének egyike az X kromoszómához kapcsoltan öröklődő *DAX1* gén. A *DAX1* gén a szteroid hormon receptorok egyikét kódolja, funkciója a herék képződéséhez szükséges. A *DAX1* gén funkciójának hiányában az X^{DAX1^-}/Y hemizigóták a nőkre jellemző fejlődési utat követik. A női küllemű, de XY kromoszómákat hordozó élőlények alkotják a *pszeudohermafroditák* egyik típusát. (A pszeudohermafroditák olyan élőlények, amelyek kromoszómális és fenotipikus neme nem egyezik.)

Vannak olyan férfiak, akiknek sejtenként két X kromoszómájuk van, és nincs Y kromoszómájuk. Az illető férfiak egyik X kromoszómája vagy valamely autoszómája – mint az XX; *Sry* transzgénikus egerek is – az Y kromoszóma *SRY* régióját hordozza, benne a funkcionális *TDF* gént. A jelenséget szex-reverzálisnak nevezik.

Minthogy a TDF fehérje és a tesztoszteron autoszomális gének expresszióját is szabályozza, nem meglepő, hogy vannak az autoszómákhoz kapcsoltan öröklődő olyan mutációk is, amelyek befolyásolják a nemek differenciációját.

Az ivarsejt-vonal

Az ősivarsejtek, amelyekből majdan az ivarsejtek fejlődnek, az embriógenezis korai szakaszában különülnek azoktól az ún. testi sejtektől, amelyek a test többi részét alkotják. Az ősivarsejtek a szikzacskó entodermában ismerhetők fel először, és vándorolnak vagy jutnak a vérárammal azokba a gonádkezdeményekbe, amelyek mezoderma sejtekből állnak (17.6. ábra). A goniális sejtek diploidok, és mitotikusan osztódnak. A goniális sejtek alkalmas jel hatására elsődleges oo- illetve spermatocitákká fejlődnek (17.7. ábra). Az elsődleges oo- illetve spermatociták kezdik meg az első meiotikus osztódást. Emberben az elsődleges oociták az első meiotikus osztódás metafázisában várakoznak, akár 50 éven át. A második meiotikus osztódást elkezdő sejtek a másodlagos oo-, illetve spermatociták. A két meiotikus osztódás eredményeként négy haploid sejt képződik: a nősténykben a petesejt és három sarki test, a hímekben négy spermatida, amelyek spermiumokká érnek.

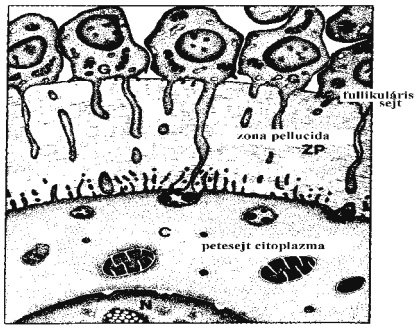


17.6. ábra. A csirke ősivarsejtek a szikzacskó entodermában ismerhetők fel, és onnan vándorolnak a gonádkezdeményekbe.

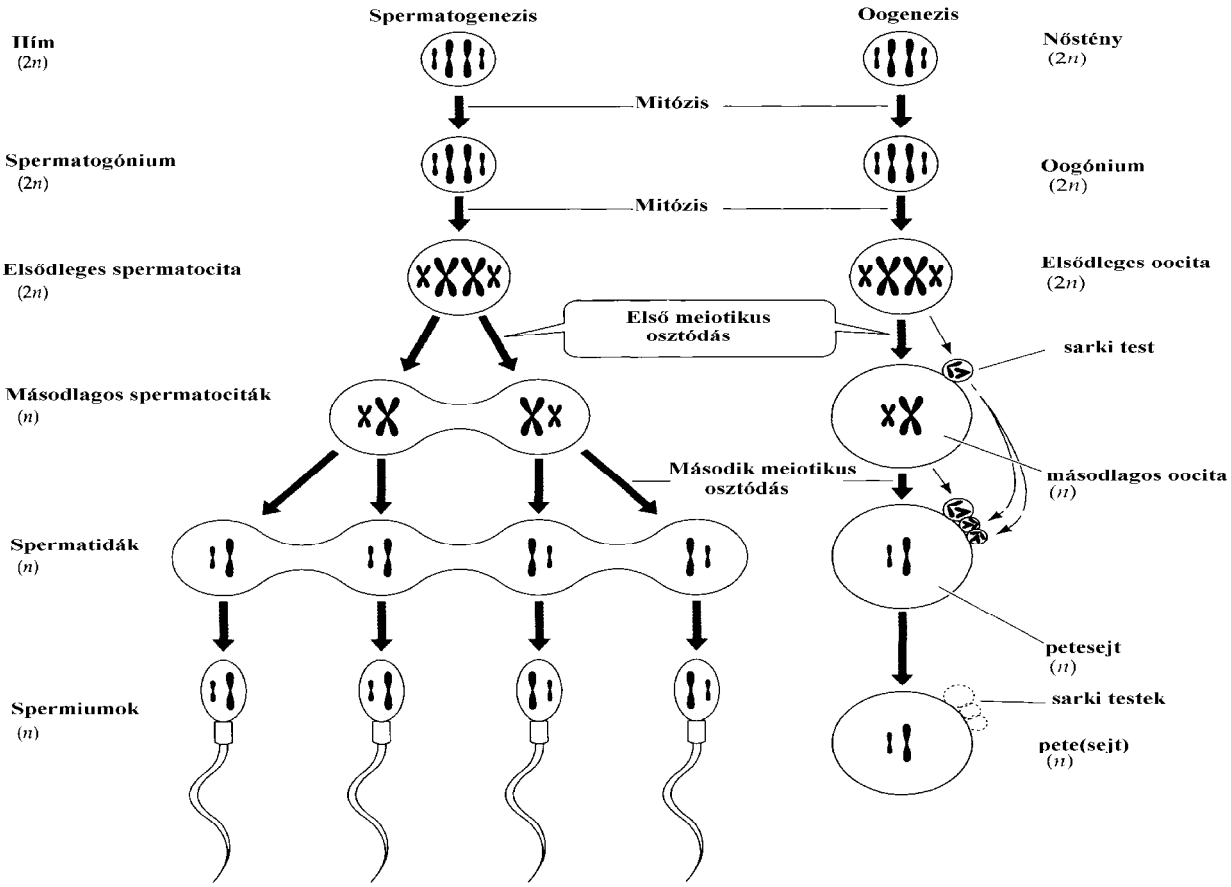
Megtermékenyülés

Az érett petesejtet védő burkok borítják: a kumulusz és a zona pellucida (17.8. ábra). A petesejt citoplazmájának felépítésében a follikuláris sejtek is kiveszik részüket (17.9. ábra). A megtermékenyülés folyamán a spermiumoknak a burkoló rétegeken kell áthatolniuk. A spermiumok áthatolását azok az emésztő enzimek segítik, amelyek az *akroszómában*, a spermiumok feji részét borító testecskében tároltak

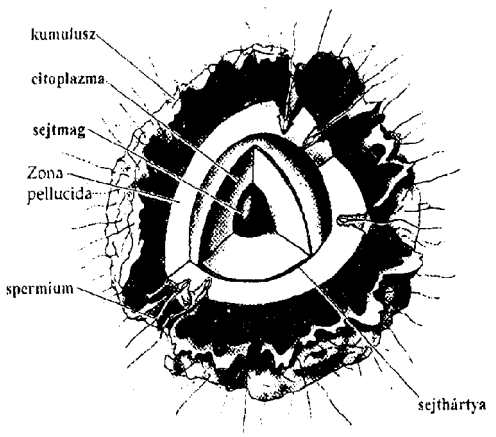
(17.10. ábra). A spermiumok az akroszómális reakció során vágnak „alagutakat” a petesejt membránja felé (17.11. ábra). A spermium és a petesejt egymásra találását a petesejtből származó anyagok és a petesejt felszínén levő spermium-kötő ún. spermium receptorok is segítik. A spermium-petesejt kapcsolat kialakulása nyomán olyan mikrofilamentum kötegek alakulnak ki, amelyek mentén a spermium magja bejut a petesejt citoplazmájába, hogy ott a nőstény pronukleusszal egyesüljön, kialakuljon a zigóta. A megtermékenyülést a spermium és a petesejt hártyáinak fúziója is segíti.



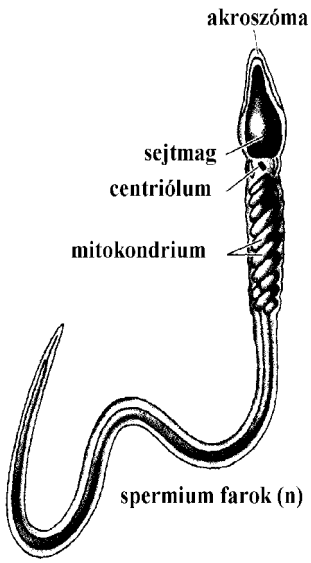
17.9. ábra. A follikuláris sejtek is kiveszik részüket az ember pete-sejt citoplazma képződéséből.



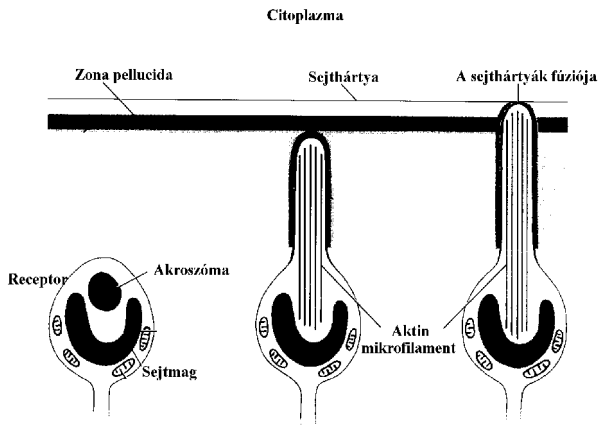
17.7. ábra. A goniális sejtektől az érett ivarsejtekig.



17.8. ábra. Az ember érett petesejtje és a petesejtet burkoló rétegek.



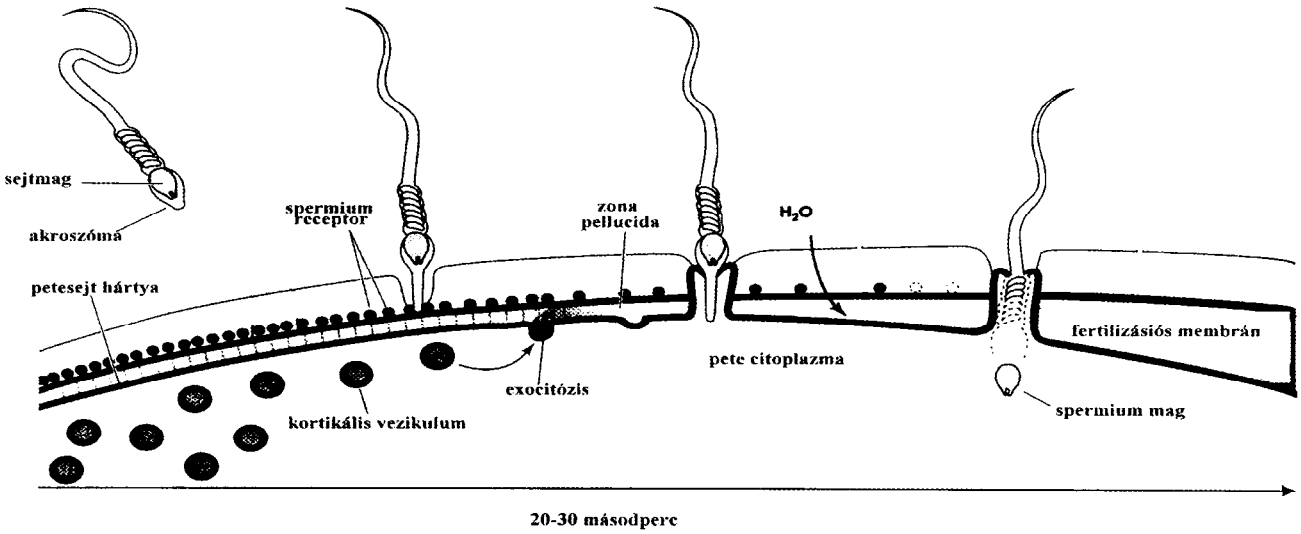
17.10. ábra. Egy spermium alkotóelemei sematikusan.



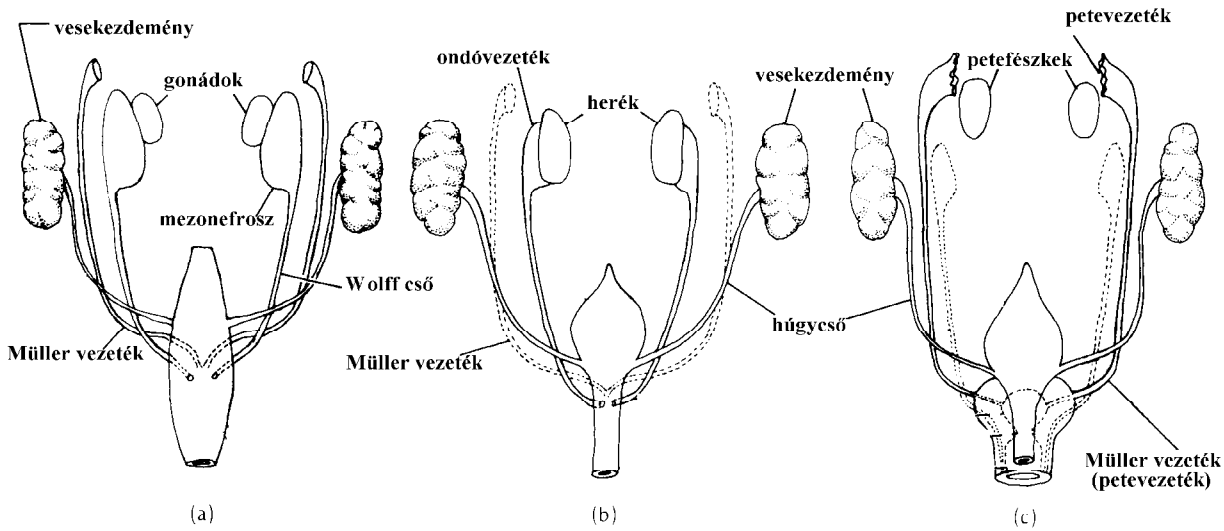
17.11. ábra. Az akroszómális reakció.

Védekezés a polispermia ellen

A spermium petesejt találkozás pillanatában a petesejt membránjának nyugalmi potenciálja -70mV-ról kb. + 10mV-ra változik. A spermium receptorok a membránpotenciál változása nyomán elvesztik funkciójukat (17.12. ábra), és nem tudnak további spermiumokkal kapcsolódni. A membránpotenciál csökkenés a polispermia elleni védekezés ún. *gyors* mechanizmusa, és a megtermékenyülést követő 1-3 másodperc alatt következik be. (Polispermia = egyetlen petesejt több spermiummal történő egyesülése.) A polispermia elleni védekezésnek van egy *lassú* mechanizmusa is (17.12. ábra). A lassú mechanizmus lényege a következő. A petesejt membránja alatti ún. kortikális hólyagocskák 20-30 másodperc alatt exocitózissal a sejten kívülre ürítik tartalmukat. A kortikális hólyagocskák tartalma lebomlik, vizet vesz fel, miközben kialakul az ún. fertilizációs membrán, amely a spermiumok részére átjárhatatlan.



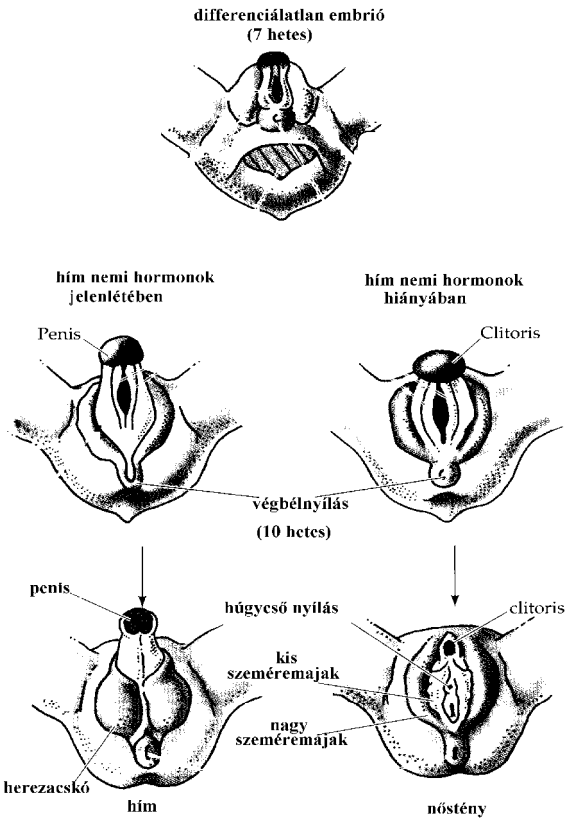
17.12. ábra. A polispermia elleni védekezés mechanizmusai.



17.13. ábra. A ivarjáratok képződésének sémája emlős embriókban.

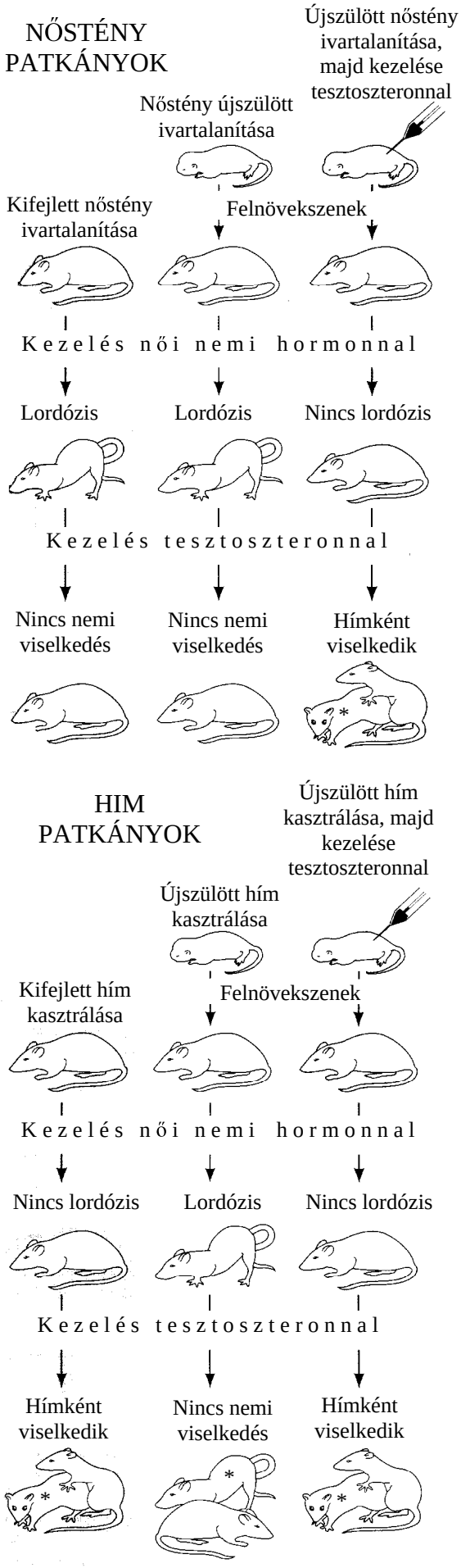
A testi sejtek szerepe

Az ivarjáratok. Az ivarsejteket célba jutását az ivarjáratok segítik. Az emberi embrió hetedik hetéig a majdani nőstény és a hím embriók ivarjáratai azonosak: mind az ún. Müller, mind pedig a Wolff cső (a mezonefrosz vezeték) jelen van (17.13. ábra). A hím nemi hormonok termelése után (ami a hetedik héten következik be) a kezdeti indifferens állapot megváltozik: a nőstény embriókban a Wolff vezeték sejtjei elhalnak, a Müller cső petevezetékké differenciálódik. Hímekben a Wolff cső spermium vezetékké differenciálódik, a Müller cső sejtjei elhalnak. A sejthalál programozott, és nőstényekben a hím nemi hormonok, hímekben a hím nemi hormonok hiánya indukálja. A programozott sejthalált *apoptózisnak* nevezik. Az apoptózisban az ún. *öngyilkos gének* termékei szerepelnek, olyan fehérjék, képződnek, amelyek a sejtek halált okozzák.



17.14 ábra. Az ember külső nemi szerveinek fejlődése.

A külső nemi szervek. A majdani nőstény és hím embriók hasonló külleme nemcsak az ivarjáratokra, hanem a külső nemi szervekre is jellemző (17.14. ábra). A tesztoszteron hatására kezdődik el a korábban differenciálatlan szervkezdemények fejlődése abba az irányba, amely a nőkre és a férfiakra jellemző. Azokat a szerveket, amelyek ugyanabból az embrionális szervkezdeményből fejlődnek, de küllemük és funkciójuk eltérő, *homológ szerveknek* nevezik. A nagy szeméremajkak és a herezacskó példa a homológ szervekre.



17.15. ábra. Patkányokban a tesztoszteron szükséges a hím nemi viselkedéséhez. (* = partner)

A szexuális viselkedés. Az ivaros szaporodás során a nőstényeknek és a hímeknek valamint az ivarsejtjeiknek egymásra kell találniuk. A nemi viselkedés a testi sejtek fontos funkciója. Amint azt a 17.15. ábrán összefoglalt kísérletek eredményei mutatják, a hím nemi viselkedésben a tesztoszteronnak van alapvető szerepe. A 17.15. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a hím nemi viselkedéshez a tesztoszteron hatására szükség van (1) a születés után, amikor ún. *bevésődés* (imprinting, kötődés) történik a központi idegrendszerben és (2) ivarérett korban is. Tesztoszteron hiányában a nőstényekre jellemző nemi viselkedési mintázat alakul ki.

ÖSSZEFOGLALÁS

Egyetlen élőlény sem örökéletű. A fajok továbbéléséhez szükség van a szaporodásra. Az ivaros szaporodás biztosítja azt a változékonyságot, amely esélyt ad arra, hogy a fajoknak legalább néhány egyede túlélje a természetes szelekciót. Az ivaros szaporodáshoz külön sejtvonal (az ivarsejtvonal) és sejtosztódási mechanizmus alakult ki az evolúció folyamán. A szaporodás törvényszerűségeinek megismerése nyomán dolgozták ki azokat az ún. klónozási eljárásokat, amelyek új lehetőségeket nyitottak az orvoslásban.

FORRÁSOK

1. Purves, W.K. és mtsi., Life the Science of Biology, 203-215, 848-888, 1090-1092, 1998.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi.. Genetic analysis, 69-71, 403-427, 1999.
3. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology (2000), 281-291, 254-257.
4. Gilbert, S.F. Developmental Biology (2000), 79-89, 362-363, 592-613.

18. AZ EGYEDFEJLŐDÉS GENETIKAI SZABÁLYOZÁSA.

Az anyai hatású gének szerepe. A sejtek közötti kölcsönhatás és a sejtek fejlődési programja. Embrionális indukció. Homeózis és atavizmus. Gének és a végtagok fejlődése.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2012. februárjában

BEVEZETÉS

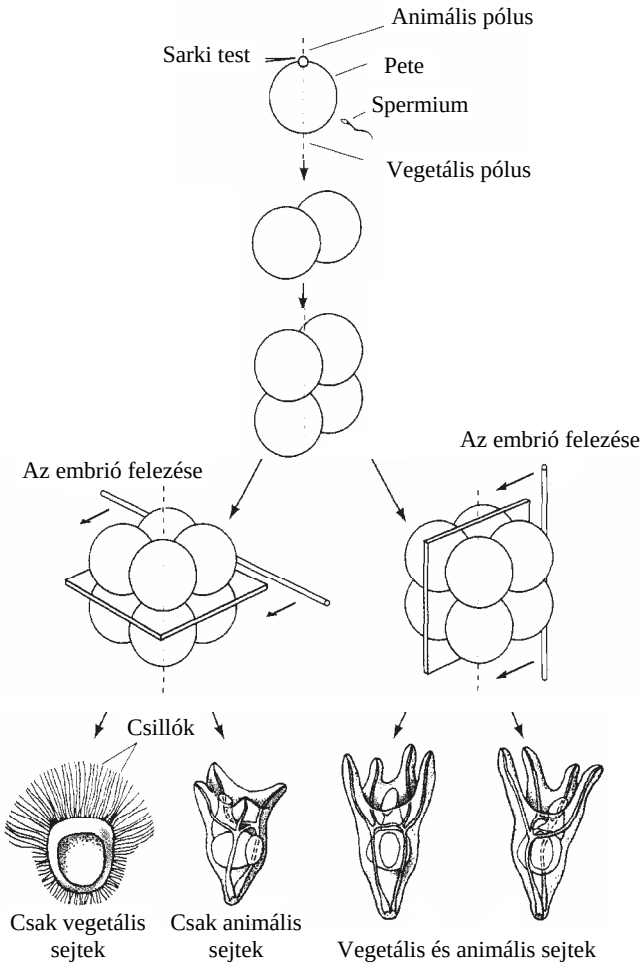
A soksejtű élőlények sejtjei meglehetősen állandó környezetben élik életüket. Génjeik legfontosabb „feladata" annak a fejlődési programnak a kibontakoztatása, amely eredményeként egyetlen sejtből, a zigótából, térben és időben létező élőlény fejlődik. Olyan élőlény, amely testét teljes harmóniában alkotják a különféle típusú és funkciójú sejtek milliárdjai. A jelen fejezetben először azokat az anyával és az apával kapcsolatos előfeltételeket tekintjük át, amelyek lehetőséget teremtenek a zigóta létrejöttéhez, és fejlődéséhez. Majd példákat említünk a sejtek közötti kommunikáció fontosságára. Különös figyelmet fordítunk a testszelvények azonosságát meg határozó homeotikus génekre, és áttekintjük az atavizmus genetikai alapjait. A fejezet végén a végtagok kialakulásának genetikai szabályozását is érintjük.

A kromoszóma imprinting

Amíg a kloakások és az erszényesek nőstény embrióinak sejtjeiben mindig az apai eredetű X kromoszóma inaktiválódik (és képez Barr testet), addig a méhlepényesek nőstény embrióinak testi sejtjeinek némelyikében az apai, másokban az anyai eredetű X kromoszóma inaktiválódik. A méhlepényesek placenta sejtjeiben azonban mindig az apai eredetű X kromoszóma inaktiválódik. Nyilvánvaló, hogy az emlősök sejtjeinek bizonyos típusai képesek különbséget tenni az anyai és az apai eredetű X kromoszómák között: a kromoszómák mintegy „meg vannak jelölve", beléjük van vésve leendő sorsuk, *imprintálva* vannak. Az imprinting teljes kromoszómákra, vagy kromoszóma részekre, olykor csak egy-egy génre terjed ki. Mind a nemi, mind pedig az autoszomák, vagy a bennük levő gének imprintálódhatnak. Az imprinting a hímekben és a nőstényekben egyaránt megtörténik, és gyakorta a gének időleges inaktiválását jelenti. Lényegében egy olyan mechanizmust, amely az egyedfejlődés adott szakaszában biztosítja az imprintált gének expresszióját. Az imprinting alapja a DNS metilálása, és/vagy specifikus fehérjék kapcsolódása a kromoszóma megfelelő szakaszaihoz.

Sejtkommunikáció és embrionális indukció

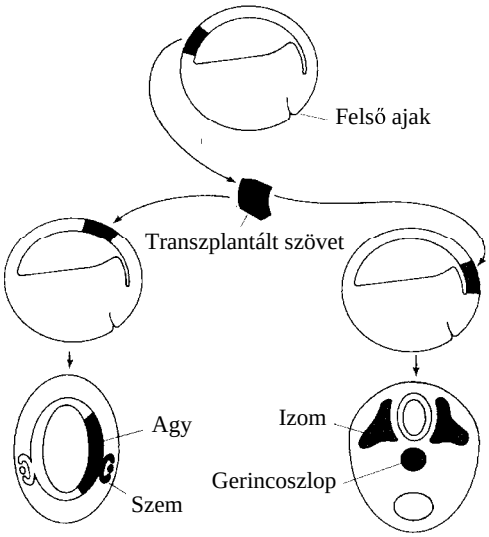
A soksejtű élőlények fejlődésének alapvető jellegzetessége a sejtek közötti kommunikáció. A kettéválasztott tengeri sün embrióból képződő fél embriókból csak akkor fejlődnek ép tengeri sünök, ha az ún. animális, és a vegetatív pólusról származó sejteket is tartalmaznak (18.1. ábra). Abnormálisan fejlődnek azok az embriók, amelyek vagy csak az animális, vagy csak a vegetatív pólusról származó sejtekből állnak. Az animális pólus helyét a sarki testek helyzete határozza meg (18.1. ábra).



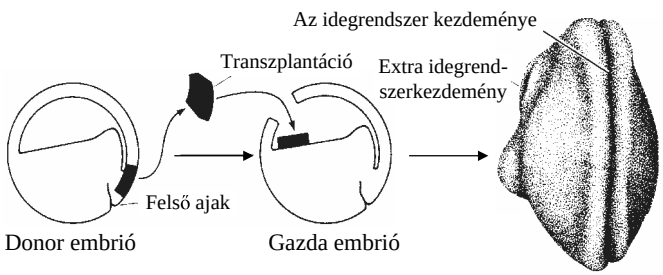
18.1. ábra. A sejtkommunikáció szerepe a tengerisün embriók fejlődésében.

A sejtkommunikáció fontosságát Hans Spemann és Hilde Mangold gőte embriókkal folytatott kísérletei elegánsan illusztrálták (1924). Ők a sötéten pigmentált *Triturus taeniatus*, valamint a nem pigmentált *Triturus cristatus* gőtefajok embrióit használták transzplantációs kísérletekben. A gőte embrióknak vannak olyan sejtcsoportjaik, amelyeket ha a szokott helyüktől eltérő helyre ültetik, az új helyüknek (pozicionális információjuknak) megfelelő fejlődési programot követik (18.2. ábra). Viszont vannak olyanok is, amelyek szokatlan (ún. ektopikus) helyre ültetve is az eredeti fejlődési programjukat valósítják meg. Sőt, a szomszédos sejtek fejlődési programját is meghatározzák. Közismert példa a gőte embriók felső ajka, amely ektopikus helyre ültetve extra velőcső képződését indukálja (18.3. ábra). A jelenség az ún. *embrionális indukció* klasszikus

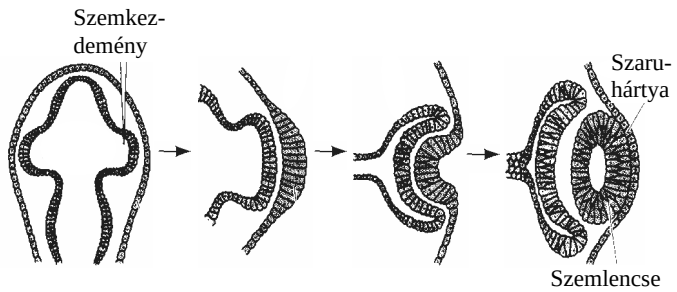
példája, alapja pedig az, hogy a valamilyen ligandot termelő sejtek szignáltranszdukció során határozzák meg a környező sejtek fejlődési programját. Az embrionális indukció további ismert példája a szemlencse kialakulása (18.4. ábra).



18.2. ábra. Vannak olyan sejtcsoportok, amelyek az átültetést követően az új pozíciójuknak megfelelő programot követik.



18.3. ábra. Egy gőte embrió felső ajka ektopikus helyre ültetve megtartja eredeti képességét, és egy olyan extra velőcső képződését indukálja, amely a szomszédos sejtekből fejlődik.



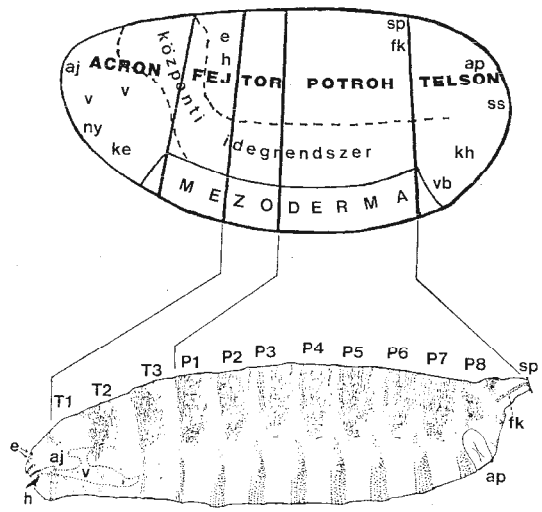
18.4. ábra. A szemlencse képződése az embrionális indukció jellegzetes példája.

Anyai hatás és az egyedfejlődés szabályozása

Az *anyai hatás*, amint azt egy korábbi fejezet bemutatta, azt jelenti, hogy a petesejtek citoplazmája olyan tényezőket tartalmaz (elsősorban mRNS és fehérje molekulákat), amelyek az oogenezis folyamán képződnek, és mindenek előtt az embriógenezis kezdeti szakaszát irányítják. Az anyai hatás tényezőinek szintézisét az anya génjei szabályozzák, és döntő szerepük van az embrió sejtek fejlődési programjának meghatározásában. Az anyai hatás fontosságát mutatja az a tény is, hogy sok állatfaj esetében az embrió génjei az embriógenezis kezdetén nem is expresszálódnak. Pl. a sejtmagjától (lényegében a sejtmagi génektől) megfosztott béka zigótákból képződő, néhány száz „sejtből" álló „lény" egy ebihalra emlékeztet. (Az ember embriójának néhány génje már a kétsejtes állapotban expresszálódik, ami természetesen nem jelenti azt, hogy az ember esetében az anyai hatás csupán a kétsejtes állapotig tart.)

A muslica (*Drosophila melanogaster*) embriók génjei csupán a blasztoderma (hólyagcsíra) stádiumban kezdenek expresszálódni, az egyedfejlődésnek abban a stádiumában, amelyben az embrió teste már kb. 5600 sejtből áll, a sejtek fejlődési programja pedig már többé-kevésbé meghatározott. Nyilvánvaló, hogy a sejtek fejlődési programját anyai eredetű tényezők határozzák meg. Mik azok a tényezők? Mikor és hogyan kerülnek a petesejt citoplazmájába? Hogyan határozzák meg az embrió sejtek fejlődési programját?

Ha egy Drosophila blasztoderma néhány sejtjét ultraibolya fénnyel elpusztítják, a kifejlődő lárvák testének megfelelő része hiányzik. Az elpusztított sejtek és a hiányzó lárva struktúrák alapján lehet megszerkeszteni az ún. *blasztoderma sorstérképet*: egy olyan térképet, amely megmutatja, hogy mely blasztoderma sejtből a lárva vagy az imágó testének mely része fog kifejlődni (18.5. ábra).



18.5. ábra. A Drosophila blasztoderma sorstérkép. Érdemes megfigyelni, hogy a sorstérképen a fej és a tor szelvények olyan sejtekből fejlődnek, amelyek távol esnek a blasztoderma elülső végétől.

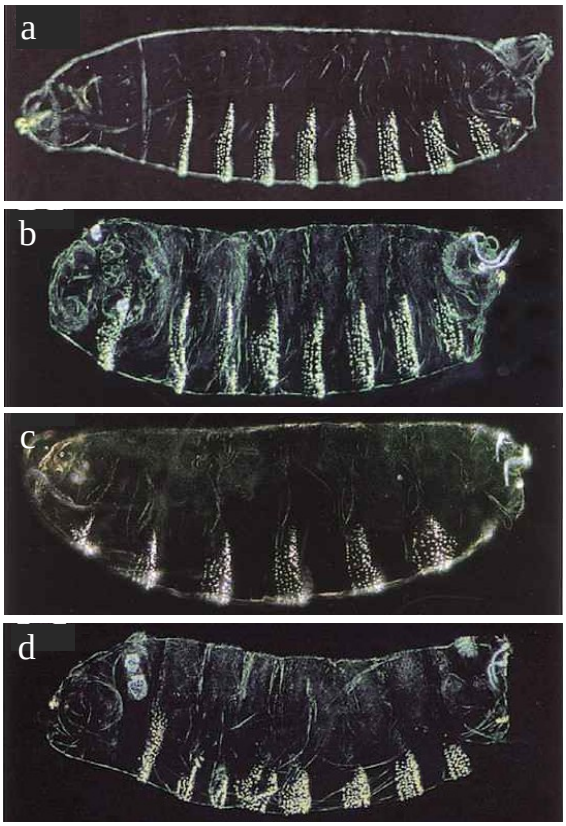
Ha egy Drosophila pete elülső részébe beleszúrunk, és egy kevés citoplazmát kiengedünk a pete legelülső részéből, a „meglékelt” petében olyan embrió fejlődik, amelynek hiányzik a feje és a tora (18.6. ábra). A „lékeléses” kísérlet eredménye azt jelzi, hogy (i) a pete elülső részében olyan anyai eredetű tényező van, amely meghatározza a fej és a tor fejlődését, valamint azt is, hogy (ii) a tényező hatása messze terjed.

Ha valóban van a muslica peték elülső részében a „fejséget” meghatározó anyag, akkor azt az anya valamely génje szintetizálja és helyezi a petébe. Vagyis az anya génjei között kell olyannak lenni, amely a „fejséget” meghatározó anyag szintézisét kódolja. A „fejség” gén funkcióját pedig mutációval meg lehet szüntetni. A mutációra homozigóta nőstényektől várhatóan olyan, küllemre ép peték származnak, amelyekből azonban hiányzik a „fejséget” meghatározó tényező. A petékben fejlődő embrióinak nem képződik fejük, amiért ők a petén belül elpusztulnak. A mutáns nőstények tehát sterilek lesznek. A gondolatmenet megfordítható: azokat a géneket, amelyek az anyai hatás anyagait kódolják, a nőstények sterilitását okozó ún. nőstény-steril (*fs*) mutációkkal lehet azonosítani. A „fejséget” kódoló gént olyan *fs* mutációkkal, amelyek bár megengedik peték képződését, ám a petékben a fej hiánya miatt elpusztulnak az embriók. Nos, a Drosophilának három olyan génje van, amelynek mutációi megfelelnek a fenti elvárásnak: a *bicoid* (*bcd*), az *exuperantia* és a *swallow*. Közülük annak az ép *bicoid* génnek a szerepe kulcsfontosságú, amelyet a *bcd* mutációk azonosítanak.

A *bcd* gén klónozása után derült ki, hogy a *bicoid* mRNS az ép peték citoplazmájának elülső részében lokalizált. Ott, ahonnan a petékből a szúrást követően kifolyt egy csepp citoplazma. A *bicoid* mRNS alapján röviddel a blasztoderma stádium előtt képződnek Bicoid fehérje molekulák. Akkor, amikor eldől a blasztoderma sejtek sorsa. A Bicoid fehérje koncentrációja magas a pete elülső részében, fokozatosan csökken - egy *gradiens* mentén - a pete közepe felé. A pete hátsó harmadában nincs Bicoid fehérje. A Bicoid fehérje a sejtmagvakban van, jelezve, hogy ott tölt be szerepet. A Bicoid fehérje egy olyan *transzkripciós faktor*, amely szabályozza a zigóta génjeinek expresszióját. A Bicoid fehérje az ún. *morfogének* egyike, olyan molekula féleség, amely közvetlenül meghatározza a sejtek fejlődési programját.

A zigóta génjei

Ha a Bicoid fehérje valóban szabályozza a zigóta valamely génjének expresszióját, akkor szabályozott gén funkcióját mutációval meg lehet szüntetni. A Bicoid-szabályozott gén funkciójának hiányában arra lehet számítani, hogy a mutáns embriónak nem képződik feje, és elpusztul. A fejnélküliség fenotípusa azonban nem az anya, hanem az embrió genotípusától függ. A Drosophila génjei között mindössze egy olyan van, az ún. *hunchback* (*hb*) gén, amelynek mutációi megfelelnek a fenti elvárásnak: a *hb*/*hb* mutáns embrióknak nem képződik fejük és elpusztulnak (18.6. ábra). A *hb* mutáció az ún. *zigotikus letális mutációk* jellegzetes példája: a zigóta valamely génfunkciójának hiánya a zigóta pusztulásához vezet.

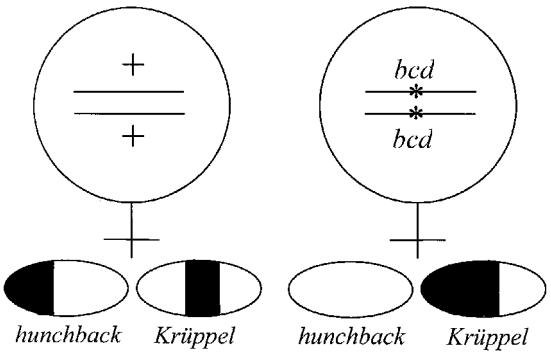


18.6. ábra. Egy vadtípusú Drosophila embrió kutikulája, felül a fej a jellegzetes struktúrákkal (a). Fejnélküli embriók fejlődnek a pete elején „meglékelt” vadtípusú (b), a *bcd*/*bcd* mutáns nőstények petéiben (c). Nem képződik fejük a *hb*/*hb* zigotikus letális mutációra homozigóta Drosophila embrióknak sem (d).

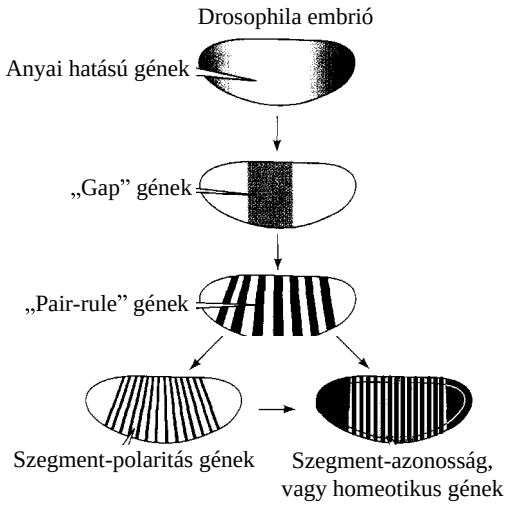
A *hb* gén azokban a sejtekben fejeződik ki, amelyekből a fej és a tor fejlődik (18.7. ábra). A *bcd*/*bcd* mutáns nőstények embrióiban nem expresszálódik a *hb* gén, jelezve, hogy a Bicoid fehérje valóban „bekapcsolja” a *hb* gént, annak pozitív regulátora. A *Krüppel* gén, amelynek funkciója a fej és a tor mögötti szelvények képződéséhez szükséges, a *bcd*/*bcd* mutáns nőstények embrióiban az elülső sejtekben is expresszálódik, jelezve, hogy a Bicoid fehérje a vadtípusú embriókban megakadályozza a *Krüppel* gén expresszióját, annak negatív regulátora (18.7. ábra).

Azért, mert a *hunchback* és a *Krüppel* gének funkciójának hiányában az embrió testének nagy szakaszai hiányoznak, a *hunchback* és a *Krüppel* géneket, és még néhány továbbit, *„gap” géneknek* nevezik (18.8. ábra; 18.1 táblázat). A gap gének termékei is transzkripciós faktorok. A gap gének termékei az ún. *„pair-rule” gének* expresszióját szabályozzák (18.1. táblázat). A pair-rule gének testszelvény párok kialakulását szabályozzák. Bármely pair-rule gén funkciójának hiányában testszelvény párok hiányoznak. A pair-rule gének termékei olyan transzkripciós faktorok, amelyek az ún. *szelvény polaritás* gének expresszióját szabályozzák. A szelvény polaritás

gének a szelvényeket elülső és hátulsó részekre osztják. A szegment polaritás gének szabályozzák az ún. *homeotikus gének* expresszióját. A homeotikus gének termékei a testszelvények azonosságát határozzák meg. Lényegében tehát az embrió sejtek fejlődési programja fokozatosan specifikálódik, egymásra épülő génaktivitás lépések eredményeként (18.8. ábra).



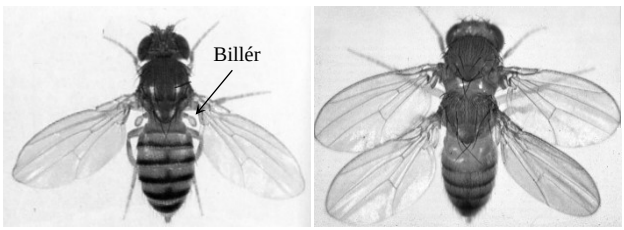
18.7. ábra. A *hunchback* és a *Krüppel* gének expresszió-mintázata vadtípusú és *bcd*/*bcd* mutáns nőstények embrióiban.



18.8 ábra. A testszelvények azonossága egymást követő génaktivitás-mintázat alapján fokozatosan alakul ki.

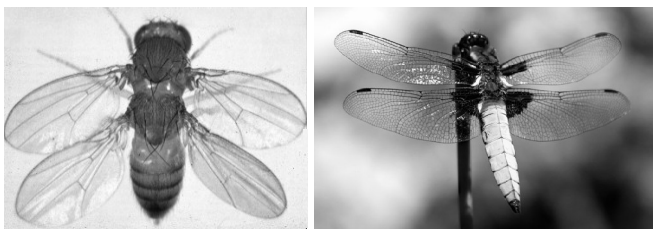
Homeózis és atavizmus

A homeotikus gének létére azoknak a muslica mutánsoknak a vizsgálata nyomán derült fény, amelyeknek két pár szárnyuk van (18.9. ábra). A vadtípusú muslica második torszelvényéből egy pár szárny, a harmadikból egy pár billér (rezgő, haltéra) fejlődik. Az ún. *Bithorax* génkomplexben bekövetkező mutációk némelyike nyomán $T_3 \rightarrow T_2$ transzformáció történik: a második torszelvény sejtjei harmadik torszelvényként viselkednek, ami következményeként négyszárnyú muslica fejlődik (18.8. ábra). A négyszárnyúságot okozó mutáció a muslicának azt a génjét azonosítja, amely meghatározza a T_3 szelvény sejtjeinek azonosságát. A mutáns muslicákban, az ép gén hiányában, a sejtek azt a fejlődési programot hajtják végre (itt a második torszelvényre jellemzőt), amelyhez nincs szükség az ép gén funkciójára. (A homeo görög szó. hasonlót jelent.) Azt a jelenséget, amely során valamely testtáj helyett egy másik testtájra jellemző fejlődik, *homeózisnak* nevezik. A *bithorax* mutációk az ún. *homeotikus mutációk* jellegzetes példái, a homeotikus mutációk pedig azokat a *homeotikus géneket* azonosítják, amelyek a testszelvények azonosságát határozzák meg. (Zárójelben jegyezzük meg, hogy ismertek olyan környezeti hatások, amelyek eredményeként olyan fenotípus alakul ki az élőlényekben, amely valamely homeotikus mutációra jellemző. A jelenséget *fenokópiának* nevezik. A fenokópia nem öröklődik. A fenokópia a teratogenezis egyik formája. A teratológia pedig a rendellenes egyedfejlődés tudománya.)



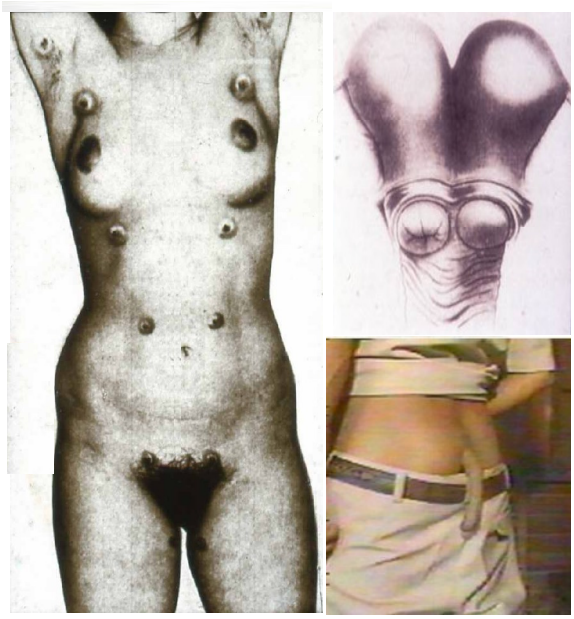
18.9. ábra. A vadtípusú Drosophila harmadik torszelvényéből billérek fejlődnek. A *bithorax* mutációk következtében a harmadik torszelvény sejtjei a második torszelvényre jellemző fejlődési utat követik, a mutáns muslicáknak két pár szárnyuk képződik.

A négyszárnyú muslicák emlékeztetnek a muslicák őseire (18.10. ábra). Azokra a négyszárnyú rovarokra, amelyekből a kétszárnyúak (köztük a Drosophila fajok) a törzsfejlődés során kialakultak. A négyszárnyúságot eredményező mutáció az *atavizmus* klasszikus példája: a törzsfejlődés korábbi szakaszára jellemző állapot kialakulása mutáció miatt.



18.10. ábra. A négyszárnyú mutáns muslica egyik négyszárnyú ősére emlékeztet, és egyben példa az atavizmus jelenségére.

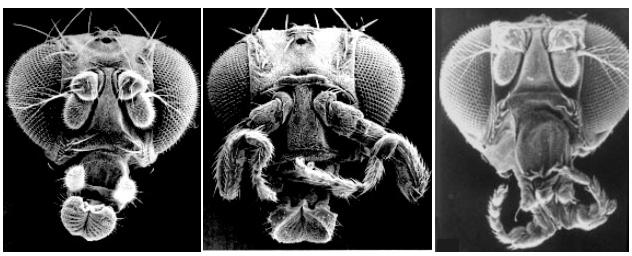
Természetesen az atavizmus az emberekben is előforduló jelenség. A polythelia (többmellbimbójúság), az uterus bicornis (a kétszarvú méh), farok kifejlődése az atavizmus jellegzetes példái emberben (18.11. ábra).



18.11. ábra. Az atavizmus néhány ismert példája emberben: a sokmellbimbójúság, a kétszarvú anyaméh, a farok.

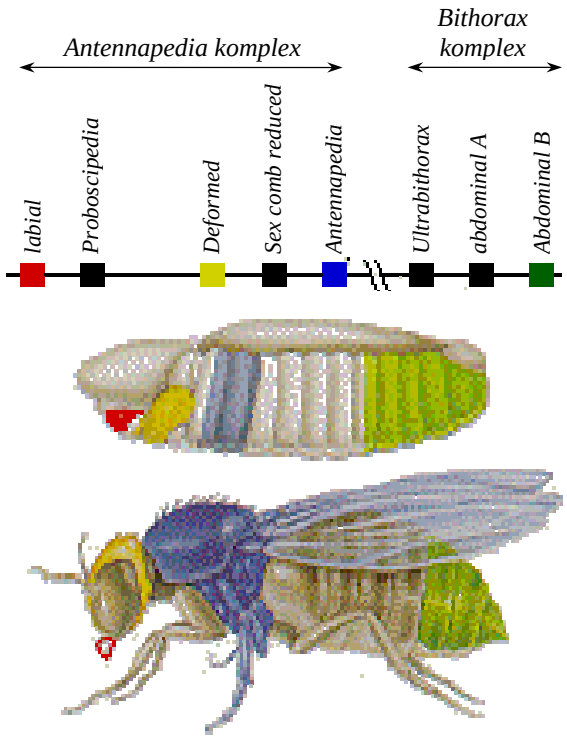
Homeobox és a homeodomén

A muslica homeotikus génjeit úgy ismerték meg, hogy mutációkkal azonosították őket (18.12. ábra). A homeotikus mutációk genetikai analízise megmutatta, hogy a muslicának nyolc homeotikus génje van. A nyolc gén két génkomplexbe szerveződött: az *Antannapédia* (*ANT-C*) és a *Bithorax* (*BX-C*) komplexekbe (18.13. ábra). Az *ANT-C* komplexet öt, a *BX-C* komplexet három gén alkotja (18.13. ábra). A kromoszómának azt a részét, amely az *Antennapédia* és a *Bithorax* komplexeket tartalmazza szokás homeotikus génkomplexnek (*Hom-C*) nevezni. Különös, hogy a testszelvények kialakulását szabályozó homeotikus gének ugyanabban a sorrendben helyezkednek el a kromoszóman, mint amilyen sorrendben azok a testszelvények követik egymást, amelyek szelvények képződését szabályozzák (18.12. ábra).

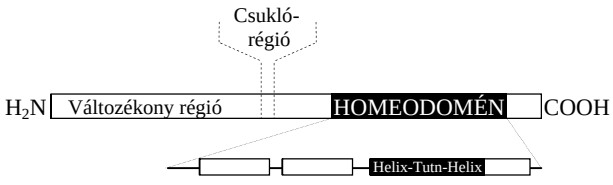


18.12. ábra. A muslica *Antennapedia* és *proboscipedia* mutációi homeotikus géneket azonosítanak.

A muslica minden homeotikus génjét megklónozták, majd meghatározták az őket alkotó bázispárok szekvenciáját. A szekvenciák összehasonlítása során derült arra fény, hogy minden homeotikus génnek része egy 180 bázispárból álló szakasz, az ún. *homeobox*. (Box = evolúciósan erősen konzervált DNS szakasz. Homeo-, mert a homeotikus gének része.) A homeobox a homeotikus fehérjék 60 aminosavból álló funkcionális motívumát kódolja, az ún. homeodomént (18.14. ábra). A homeodomén a homeotikus fehérjéknek az a része, amellyel a DNS-hez kötődnek. A homeodoménnak pedig része az a hélix-turn-hélix motívum, amelyről egy korábbi. fejezetben szóltunk. A homeotikus fehérjék is transzkripciós faktorok, és az embrió sejtekben az olyan gének expresszióját szabályozzák, amelyek nyomán a szelvényeket alkotó sejtek elnyerik azonosságukat.



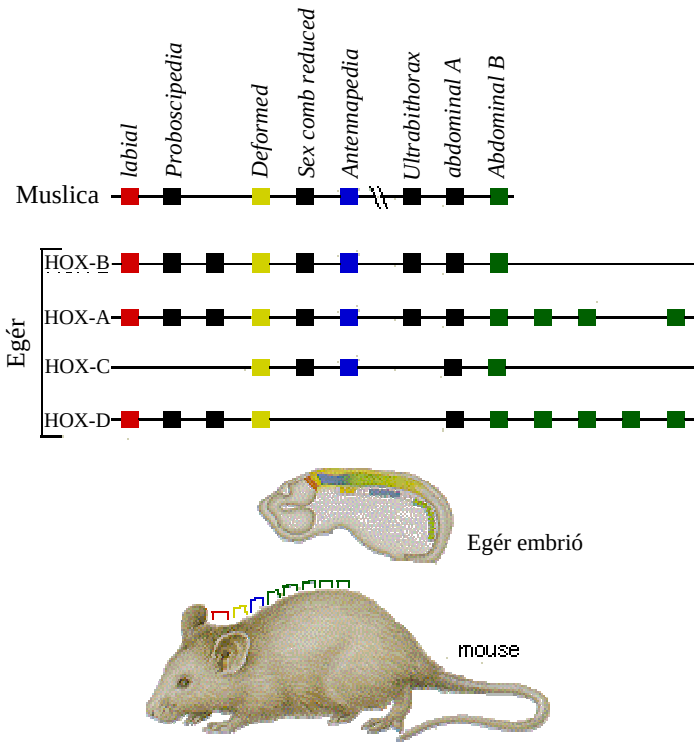
18.13. ábra. A muslica homeotikus génjei, és azok a testtájak (embrióban, valamint a kifejlett imágóban), amelyek azonosságát meghatározzák.



18.14. ábra. A homeoproteinek szerveződési sémája.

A gerincesek homeotikus génjei

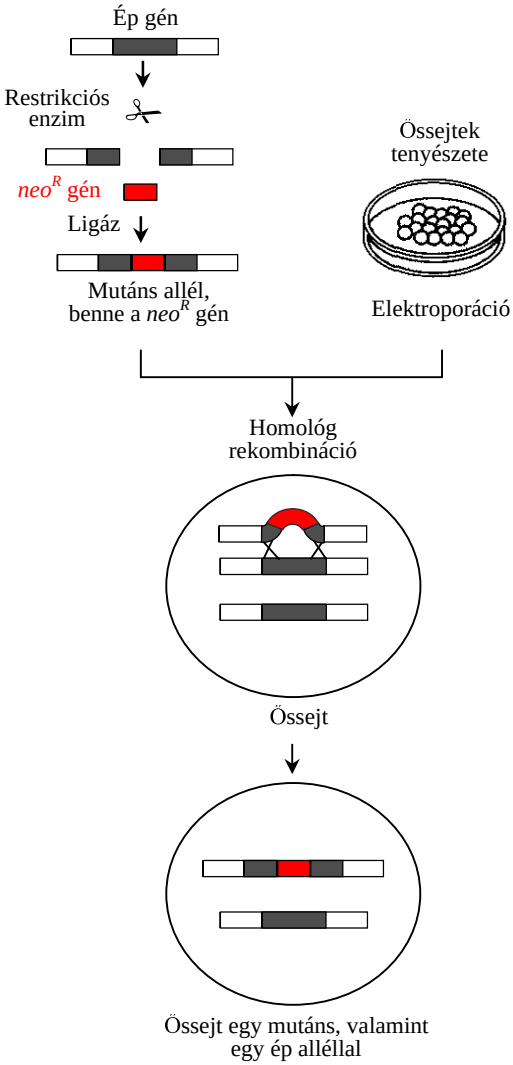
A homeoboxot DNS próbaként használva derült ki (Southern analízisek során), hogy a homeobox csaknem változatlan formában jelen van a gerincesek genomjaiban. A homeoboxból kiindulva lehetett megismerni a gerincesek homeotikus génjeit, az ún. *Hox* géneket. A gerincesek homeogénjeit magába foglaló komplex neve a *HOX-C*. A *HOX-C* a gerincesekben többé-kevésbé négy kópiában van jelen (18.15. ábra). Különös, hogy a *HOX-C*-ken belül nemcsak a gének sorrendje ugyanaz, mint a Drosophilában, hanem a gének testtáj szerinti expresszió-mintázata is (18.15. ábra). A Drosophila és a gerincesek homeotikus génjeinek szerveződése szép példa a testszerveződés evolúciós konzerváltságára.



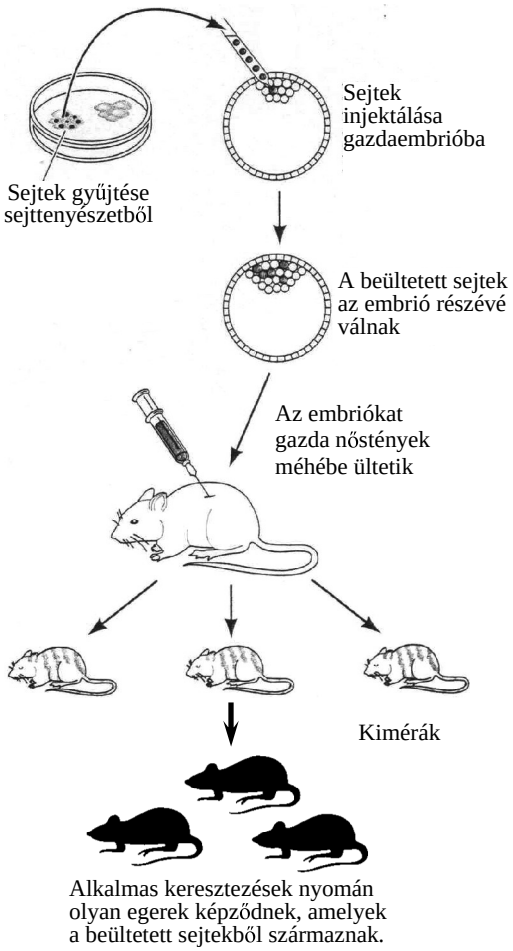
18.15. ábra. A testszelvények azonosságát meghatározó gének szerveződése muslicában (felül) és egérben (alul). Az egér *Hox* génjei négy komplexbe szerveződtek.

***In vitro* mutagenezis, géncserés egerek és fejlődési rendellenességek**

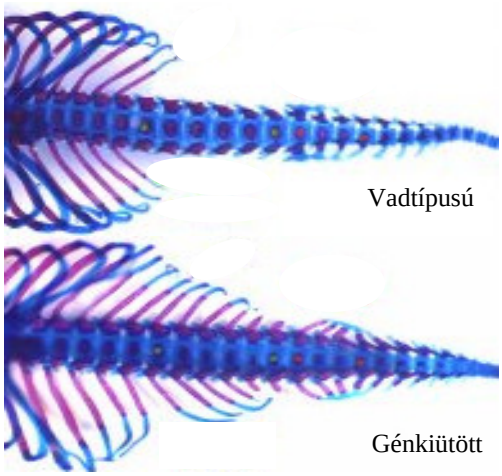
A homeotikus gének funkciójának megértését nagyban segítette azoknak a technikának a kidolgozása, amellyel *géncserés* és *transzgénikus* egerek készíthetők. Azokban az ún. *knock out* (génkiütött) egerekben, amelyekben valamely ép homeotikus gént annak mutáns alléljára cseréltek, jellegzetes fejlődési rendellenességek alakulnak ki (18.16 – 18.18. ábrák). A mutánsok vizsgálata alapján olyan fejlődési rendellenességek genetikai alapjaira derült fény, amelyeket bár régről ismernek a szakemberek, de nem értették kialakulásuk mechanizmusát. A mutáció és a mutációval kapcsolatos fejlődési rendellenesség alapján nemcsak a fejlődési rendellenesség molekuláris alapjaira derült fény, hanem lehetőség nyílt a rendellenességet okozó mutációk prenatális diagnosztikájára is.



18.16. ábra. Az ún. génkiütés technikája. Ún. *in vitro* mutagenezis során valamely ép gén funkcióját úgy szüntetik meg, hogy belé egy másik gént illesztenek. (Itt a *neo*^{R} gént, amely neomicinnel szembeni rezisztenciát biztosít.) A rekombináns DNS-t őssejtek tenyészetébe viszik, és pl. elektroporációval érik el, hogy a DNS molekulák a sejtekbe jussanak. Ha valamely sejtben kettős homológ rekombináció következik be, az ép gén a mutáns allélra cserélődik ki, és a sejt neomicinre rezisztenssé válik. Utódsejtjei kiszelektálhatók.



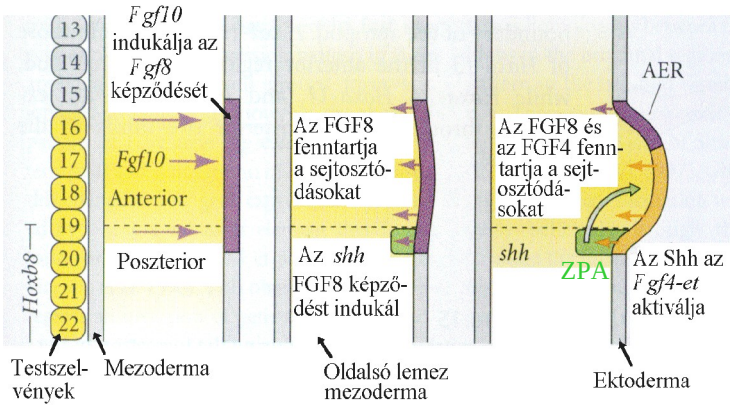
18.17. ábra. Az injekciós kimérák szerepe olyan egerek készítésében, amelyek a homozigóták a génkiütött allélra.



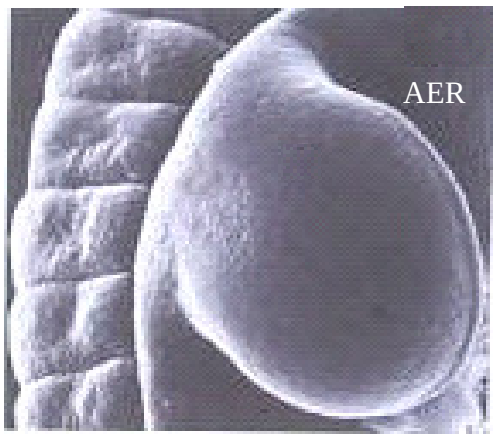
18.18. ábra. Jellegzetes vázrendszer rendellenességek fejlődnek ki azokban a knock out egerekben, amelyekből hiányzik a *Hox10* gének funkciója.

A végtagok fejlődése

Azt, hogy a végtagkezdemények az embriók elülső-hátulsó tengelyének mely pontján alakulnak ki, a *Hox* gének határozzák meg. Az elülső végtagok pl. az első torakális szelvényben alakulnak ki. Ott ahol a *Hox 6* gén expresszálódik (18.19. ábra). A *Hox* gének termékeinek hatására a laterális mezoderma sejtek a 10-es jelű fibroblaszt növekedési faktort, FGF10-et választank ki (18.19. ábra). (FGF = fibroblast growth factor.) A testszelvényekből mioblasztok vándorolnak a végtagkezdeménybe. A mezoderma és a mioblaszt sejtek az ektoderma alatt gyülemlenek, és együttesen egy végtagkezdeményt képeznek (18.18. ábra). A mezodermális eredetű sejtek FGF10-et választanak ki. (Extra végtagok képződnek azokban az embriókban, amelyek végtagkezdemény ektodermája alá FGF10-el töltött apró műanyag labdacsokat ültetnek.) A végtagkezdemények növekedéshez retinsavra is szükség van.



18.19. ábra. Modell, amely a végtagkezdemény kialakulásának molekuláris mechanizmusát szemlélteti.



18.20. ábra. Egy végtagkezdemény, peremén az AER (apical ectodermal ridge).

Azt, hogy egy végtagkezdeményből elülső, vagy hátulsó végtag fejlődik, az határozza meg, hogy bennük a *Tbx5*-ös (az elülsőkben) vagy a *Tbx4*-es (a hátulsókban) gén fejeződik ki. (A *Tbx* gének termékei transzkripciós faktorok, jellegzetes DNS-kötö funkcionális motívummal.) A *TBX5*-ös gén funkcióvesztéses mutációira homozigóta emberek az ún. Holt-Oram szindrómát mutatják: elülső végtagjaik csak részben fejlődnek ki, valamint szívfejlődési rendellenességek is jellemzők rájuk (18.21. ábra).

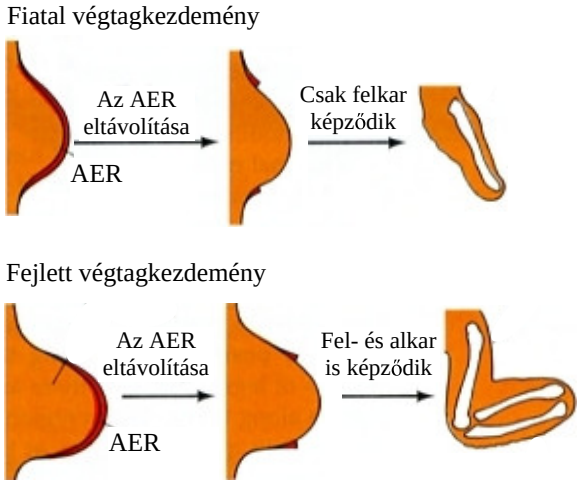
18.21. ábra. Holt-Orem szindrómás gyermekek.

A végtagok képződése során a sejtek jellegzetesen differenciálódnak a (1) közeli-távoli (proximális-disztális), (2) az elülső-hátulsó (anterior-poszterior) és (3) a felső-alsó (dorzális-ventrális) tengelyek mentén. Az elmúlt néhány évben váltak ismertté azok a molekulák és mechanizmusok, amelyek nyomán a végtagokat alkotó sejtek differenciálódnak, és vált világossá néhány fejődési rendellenesség molekuláris mechanizmusa.

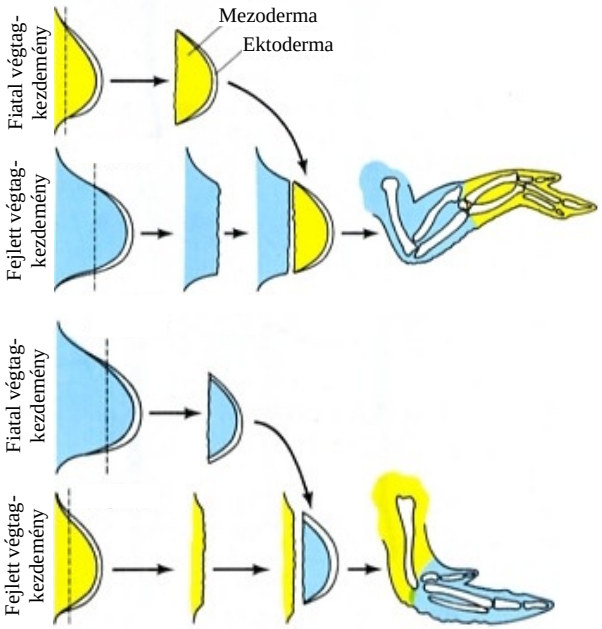
(1) Differenciáció proximális-disztális irányban

A proximális-disztális irányú differenciációt a végtag-kezdeményt övező epidermális perem, az ún. apikális ektodermális perem (AER, apical ectodermal ridge), valamint az FGF fehérje család különféle típusai szabályozzák. Az AER szerepét két megfigyelés bizonyítja. (i) Minél idősebb végtagkezdemény AER-jét távolítják el, a végtag disztális elemeiből, annál több képződik (18.22. ábra). (ii) A különböző korú végtagkezdemények egymásra történő transzplantációja nyomán olyan végtagkezdemények képződnek, amelyek azt mutatják, hogy minél több időt töltenek a perem alatti mezodermális eredetű sejtek az AER hatása alatt, a végtag annál nagyobb részének szintézisére válnak képessé (18.23. ábra). A kérdés az, hogy milyen molekuláris mechanizmusok rejlenek az AER, és a mögötte levő sejtek differenciációja mögött.

Az AER differenciációját az FGF10-es molekula indukálja (18.19. ábra). Az FGF10 arra ösztökéli az AER sejteket, hogy az FGF8-as jelű növekedési faktort választják ki. Az FGF8 egyrészt mitózisra ösztökéli az AER alatti sejteket, másrészt nem engedi azt, hogy porcszövetté differenciálódjanak.



18.22. ábra. A végtagok proximális-disztális irányú differenciációját az AER szabályozza.

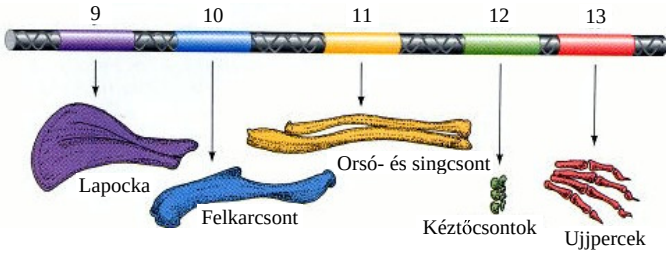


18.23. ábra. A különböző korú végtagkezdemény részek átültetése nyomán rendellenes szerkezetű végtagok képződnek, jelezve az AER szerepét. Minél több időt tölthetnek a sejtek az AER hatása alatt, annál hosszabb részét képezhetik a végtagnak.

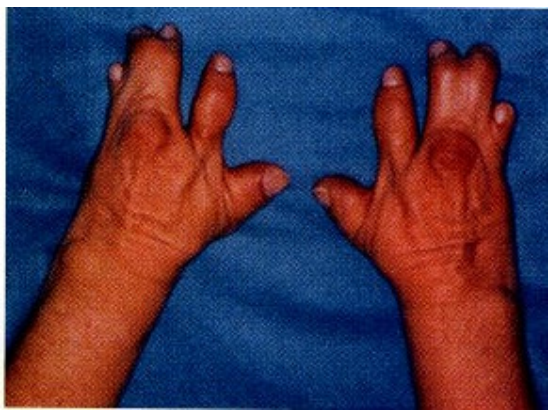
A gátolt, és/vagy hibás AER funkció nyomán születtek az 1950-es években az ún. contergan bébik, illetve alakul ki az ún. „split hand – split foot” szindróma (18.24. ábra).

18.24. ábra. Contergan bébik, és „split hand – split foot” szindróms kéz, illetve lábfej.

Azt, hogy egy végtagkezdemény mely részében milyen sejtek differenciálódjanak, a *Hox* gének határozzák meg (18.25. ábra). Arra, hogy mely *Hox* génnek mi a szerepe valamely végtag rész kialakulásában, két megközelítés nyomán derült fény. (i) *In situ* hibridizációval meghatározták, hogy mely *Hox* gén a végtagkezdemény mely részében expresszálódik. (ii) A *Hox* gének expressziós mintázata alapján olyan géncserés egereket készítettek, amelyekből hiányzott a „kiütött” *Hox* gén aktivitása. A szerepére vannak „emberi” példák is: a *Hox D13*-as mutáns allélra homozigóta emberek ujjai rövidek, összeolvadtak (18.26. ábra).



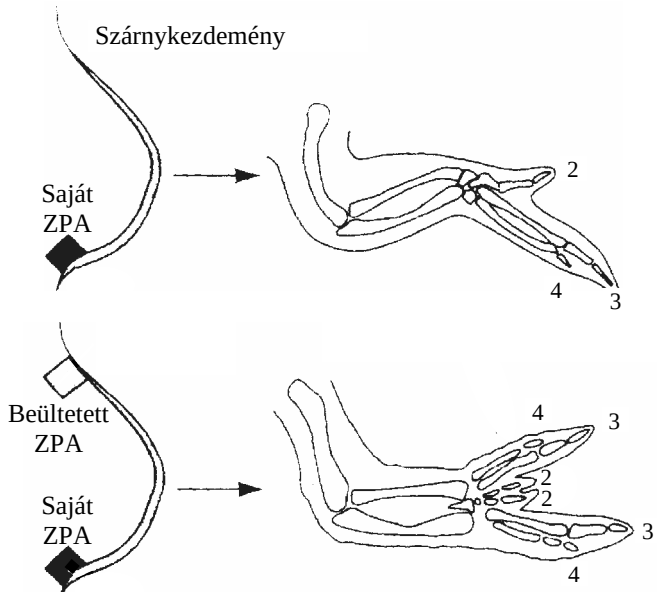
18.25. ábra. Összefüggés a *Hox* gének expressziója és a felkar egyes alkotóinak képződése között.



18.26. ábra. A *HOX D13* mutáns allélra homozigóta ember kézfejei.

(2) Differenciáció az elülső-hátulsó irányban

Az elülső-hátulsó irányú differenciációt az ún. polarizáló aktivitású sejtcsoport (ZPA, zone of polarizing activity) irányítja. A ZPA egy kis mezodermális eredetű sejtcsoport a végtagkezdemény hátulsó sarkában (18.19. ábra). A sejtek sorsa attól függ, hogy a végtag kezdeményben milyen helyet foglalnak el, milyen a *pozicionális információ* azon a helyen, ahol a sejtek vannak. Lesznek olyan sejtek, amelyek apoptózissal elhalnak, másokból ujjak fejlődnek. Az ujjak típusát a ZPA-tól mért távolság határozza meg (18.27. ábra). Ha ugyanis a végtagkezdemény elülső tövébe egy ZPA-t ültetnek, a végtagon tükörszimmetria szerint képződnek ujjak (18.27. ábra).

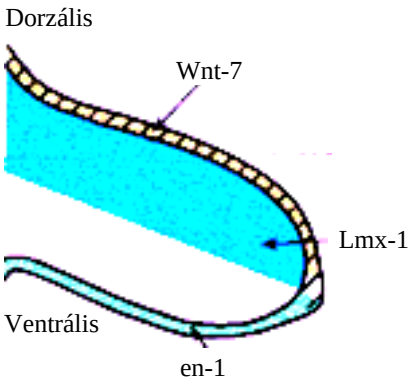


18.27. ábra. Az ujjak differenciációját a ZPA sejtcsoport szabályozza. A saját és a beültetett ZPA tevékenységének eredményeként két negyedik, két harmadik és két második tükörszimmetrikusan elrendezett ujj képződik a csirke szárnyban.

A ZPA sejtjeiben a *Sonic hedgehog* gén expresszálódik a *Hox 6* és a *Hox 8* génnek átfedésének területén (18.19. ábra). (A *Sonic hedgehog* gén a Drosophila *hedgehog* génjének gerincesekben meglevő homológja. A Drosphila *hedgehog*, génje az ún. szegment polaritás gének egyike.) A *Sonic hedgehog* gén expresszióját az FGF8 jelű fehérje indukálja, amely a AER terméke (18.19. ábra). Bár minden AER sejt termel FGF8-at, a *Sonic hedgehog* gén csak azokban a sejtekben expresszálódik, amelyekben a *Hox 6*-os gén is aktív, vagyis csak a ZPA sejtekben. A ZPA sejtekben képződő shh fehérje nyomán képződnek azok a BMP2 és BMP7 fehérje molekulák, amelyek diffúziója meghatározza a sejtek pozícióját és sorsát a végtag-kezdeményekben.

(3) Differenciáció a dorzális-ventrális irányban
A felső-alsó (tenyér-kézfej, lábfej-talp) irányú differenciációt az az ektoderma határozza meg, amely a végtagkezdemény dorzális felszínét borítja. Két alsó felszíne képződik annak a végtagnak, amely kezdeményéről eltávolítják a felső epidermisz réteget, és két felső felszíne képződik annak a végtagnak, amely kezdeményében a ventrális epidermiszt dorzálisra cserélik.

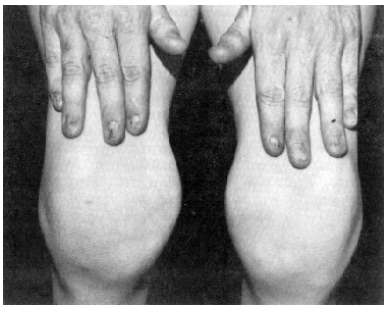
A felső-alsó irányú differenciáció kulcsfontosságú tényezője a Wnt-7 jelű fehérje (18.28. ábra): azok a géncserés egereknek, amelyek a *Wnt-7* gén funkcióvesztéses típusú mutáns alléljaira homozigóták, a „kézfejük" helyett is „tenyerük" képződik. (A Wnt fehérje család tagjai a sejtek közötti jeltovábbítás alighanem legősibb eszközei. A Wnt fehérjéket azok a gének kódolják, amelyek nevüket a Drosophila *wingless* szegment polaritás génjéről és annak humán *integrated* nevű homológjáról kapták.)



18.28. ábra. A végtagkezdemény felső-alsó irányú differenciációját szabályozó fehérjék.
.

A Wnt-7 fehérje az *Lmx1* gént aktiválja a dozális epidermisz alatti mezodermális sejtekben. Az Lmx-1 fehérje egy olyan transzkripciós faktor, amely a végtagkezdemény sejtek felső-alsó irányú differenciációját szabályozza. A *Lmx1* gén funkcióvesztéses alléljaira homozigóta emberek az ún. köröm-patella szindrómát mutatják: végtagjaik dorzális sejtjei ventrálisként viselkednek, ami miatt nem képződnek körmeik és térdkalácsaik (18.29. ábra).

Lényegében tehát ismertek azok a molekulák, amelyek meghatározzák a végtagkezdemény sejtek azonosságát, sorsát. A végtagkezdemény végeiben a BMP fehérjék hatására sejtek csoportjai pusztulnak el – apoptózissal –, hogy szomszédságukban ujjak képződjenek. (A BMP - bone morphogenetic proteins – fehérjék arról a tulajdonságukról kapták nevüket, hogy csontképződést is képesek indukálni. Má már tudott, hogy a BMP fehérjéknek más funkcióik is vannak: a sejtosztódás szabályozása, apoptózis, sejtvándorlás és sejtdifferenciáció.) A BMP fehérjéknek pl. szerepe van abban a sejthalálban, amely nyomán a sing- és az orsócsont képződik.



18.29. ábra. A köröm-patella szindrómás embereknek végtagkezdeményeiben - a *Lmx1* gén mutációi miatt - elmarad a sejtek differenciációja a felső-alsó irány mentén, ami miatt nem fejlődnek körmeik és térdkalácsaik.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bár az ivaros szaporodás nyomán képződő élőlények élete a megtermékenyüléssel kezdődik, az egyedfejlődés feltételei már az ivarsejtek képződése folyamán megteremtődnek: (i) az anyai hatás tényezői alapvető fontosságúak az embrionális sejtek fejlődési programjának meghatározásában, (ii) a kromoszóma imprinting pedig előre programozza sok gén expresszióját. A sejtek fejlődési potenciálja fokozatosan bontakozik ki a sejtek differenciációja folyamán. A sejtek közötti kölcsönhatás alapvető fontosságú a sejtek fejlődési programjának meghatározásában. A testszerveződést befolyásoló Drosophila mutációk alapján derült fény a szelvényezettség molekuláris és evolúciós vonatkozásaira. A géncserés egerekkel kapcsolatos mutáns fenotípus alapján megértettük néhány fejlődési rendellenesség genetikai alapjait. Bizonyos, hogy bármely soksejtű élőlény testének kialakulása olyan szövevényes génaktivitás-mintázat nyomán képződik, amelynek ma már ismerjük néhány mozzanatát. Az itt leírtak természetesen csak rövid bepillantást nyújtanak a fejlődésbiológia egyik gyorsan fejlődő ágába.

FORRÁSOK

1. Griffiths, A.J.F. és mtsi., Genetic analysis, 415-451, 2008.
2. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 426-461, 921-933, 2007.
3. Kenyon, K.L. Patterning the anterior-posterior axis during Drosophila embryogenesis. In: Principles of Developmental Genetics (Moody, S.A. ed), 173-200, 2007.
4. Yang, Y, Formation of vertebrate limbs. In: Principles of Developmental Genetics (Moody, S.A. ed), 847-865, 2007.
5. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology, 950-998, 2007.
6. Gilbert, S.F. Developmental Biology, 263-303, 305-342, 523-546, 2003.

19. SEJTVÁZ ÉS SEJTMOZGÁSOK.

Mikrotubulusok. Molekuláris motorok és az intracelluláris transzport. A csillók és a flagellumok mozgása. Aktin mikrofilamentek és szerepeik.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, 2011. tavaszán.

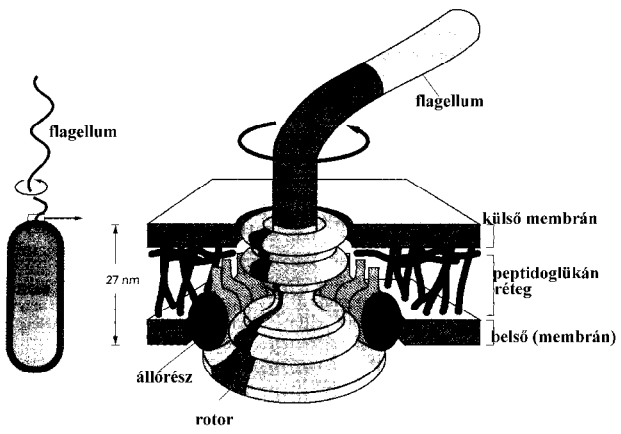
BEVEZETÉS

A környezeti feltételekhez való alkalmazkodás fontos mozzanata a mozgás. Hogy mozognak a baktériumok? Milyen megoldásokat találtak az eukariota élőlények sejtalkotóik és/vagy testük mozgatására? Melyek azok a molekuláris szerkezetek, amelyek lehetővé teszik a mozgásokat? A következő fejezet azokat az ismereteket foglalja össze dióhéjban, amelyek a mozgással kapcsolatosak.

A baktérium flagellumát turbina hajtja

A baktériumok külső és belső (sejt) membránjai közé olyan szerkezet illeszkedik, amely a flagellumot 180 fordulat/sec fordulatszámmal forgatja (19.1. ábra). A rotor forgásához szükséges energia a két membrán közötti térből a citoplazmába áramló protonok energiájából származik. A protonokat a belső membránba illeszkedő ún. proton pumpák szivattyúzzák ki a sejt belsejéből. A proton pumpákat ATP működteti.

A baktériumok elején olyan ún. kemotaxis receptorok vannak, amelyekkel a baktérium érzékeli az ígéretes tápanyagforrásokat, valamint a kellemetlen környezeti hatásokat is. A receptorok úgy vezérlik a „turbinát", hogy a baktérium elérhesse a tápanyagot, illetve elmenekülhessen a kellemetlen hatásoktól. A baktériumok tudják változtatni rotoruk forgási irányát.



19.1. ábra. A baktérium flagellumot forgató „turbina" szerkezete.

Sejtváz és sejtmozgások

Az eukariota sejtek sokkal nagyobbak, mint prokariota társaik. Az eukariota sejtek szerkezetét elsősorban a sejtváz biztosítja. A sejtváz fehérje molekulák polimerjeiből álló szerkezet. Négy komponense van.

1. A mikrotubulusok (MT-ok) olyan 24 nm átmérőjű csövecskék, amelyeket tubulin molekulák polimerjei alkotnak.
2. A mikrofilamentek (MF-ok) 7 nm átmérőjűék, és globuláris aktin molekulák polimerjeiből állnak.
3. Az intermediális filamentumok átmérője kb. 10 nm. Különböző típusaik mindegyike fehérje molekulák polimerjeiből áll.
4. A mikrotrabekuláris hálózat, amelyet kb. 6 nm átmérőjű filamentumok alkotnak, a sejtalkotókat rögzíti a citoplazmában.

A sejtváz alkotói közül a MT-ok és a MF-ok instabilak: könnyen képződnek (polimerizációval), és könnyen lebomolhatnak (depolimerizációval). A sejtmozgásokban a MT-oknak, és a MF-oknak van fontos szerepe. Az intermediális filamentumok és a mikrotrabekuláris hálózat térben és időben biztosítja a stabil szerkezetet.

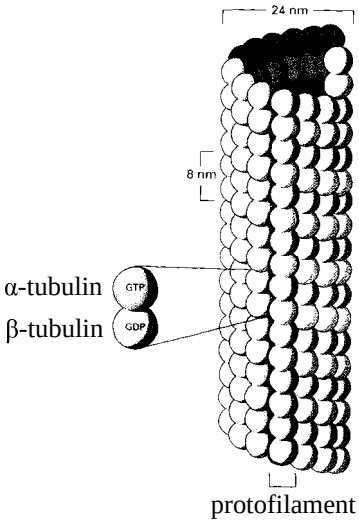
MIKROTUBULUSOK

A zigóták centroszómája a megtermékenyülés során spermium alapi testeként „érkezik". A spermiummal „érkező" centriólum a petesejt citoplazmájából toborozza azokat az anyagokat, amelyekkel kiegészülve a sejtközpontot vagy centroszómát alkotja. A MT-ok képződését a sejtközpontok (centroszómák, alapi testek) szervezik. (A centroszómákat és az alapi testeket szokás MTOC-nek, mikrotubulus organizáló centrumnak nevezni.) A MT-ok α- és β-tubulin molekulák dimerjeiből épülnek fel polimerizációval és „szerelődnek szét" depolimerizáció során (19.2. ábra). A MT-ok azonos módon épülnek fel és funkcionálnak az egysejtű és a magasabb rendű eukariotákban. A tubulinokat kódoló gének evolúciósan erősen konzerváltak. (Az ember genomjában hat α- és hat β-tubulin gén van.)

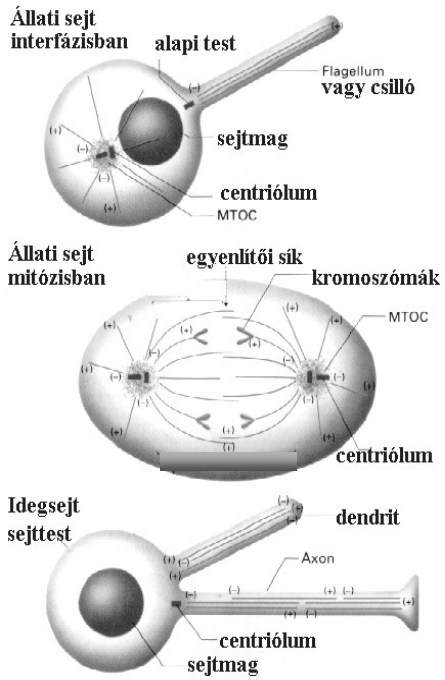
Megegyezés szerint a MT-ok negatív (−) vége a centroszóma vagy az alapi test felől van, a pozitív (+) vége a citoplazmában, az axon vagy a csilló végében. A MT-ok a következő szerkezeteket képezik (19.3. ábra).

- A sejtciklus interfázisában a sejtek egyik szerkezeti elemét adják, valamint pályát az anyagszállításhoz.
- A sejtosztódások során azt a magorsó fonal rendszert képezik, amely a kromoszómák szegregációjához szükséges.
- A MT-ok képződése nyomán alakulnak ki a dendritek és az axonok, amelyekben a MT-ok biztosítják a pályát az ún. axonális transzporthoz.
- MT-ok vannak a csillók belsejében.
- MT nyalábok vannak pl. a melanofórokban, a pigment rögöcskéket tartalmazó sejtekben.

Valamennyi MT-ra, vagy MT kötegre jellemző, hogy olyan pályákat alkotnak, amely mentén *motor fehérje molekulák* (mechanoenzimek) haladnak, miközben terhet szállítanak.



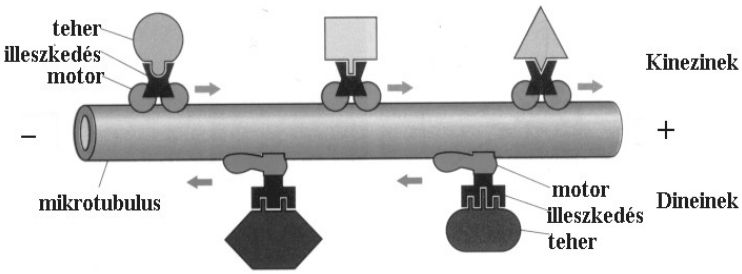
19.2. ábra. A mikrotubulusok α- és β-tubulin molekulák dimerjeinek polarmerzációja nyomán képződnek.



19.3. ábra. A különféle MT-ok képződését a centroszóma és az alapi test szervezi.

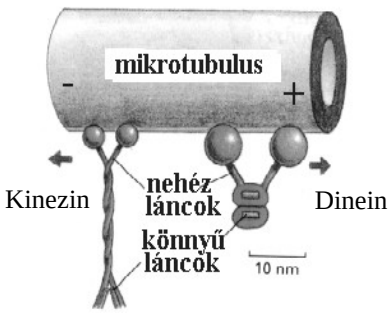
A molekuláris motorok

A motor molekulák, miközben valamely pálya mentén haladnak, az ATP-ben tárolt energia rovására terhet szállíthatnak. A MT-ok mentén mozgó motor fehérje molekuláknak két típusa van: a **kinezinek**, valamint a **dineinek**. A kinezinek a – → +, a dineinek fordítva, a + → – irányban haladnak a MT-ok mentén (19.4. ábra).



19.4. ábra. A kinezinek a mikrotubulusok mentén a +, a dineinek a – vég felé haladnak, miközben terhet szállíthatnak.

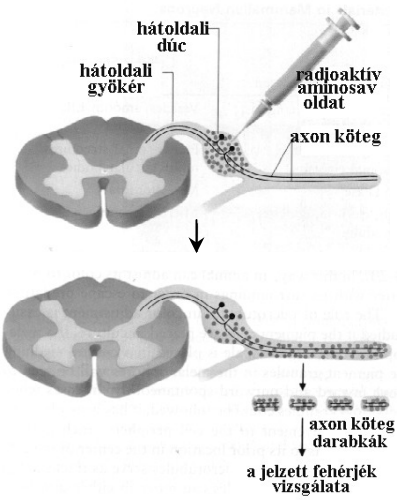
Egy-egy molekuláris motort több fehérje alegység alkot (19.5. ábra). Az alegységek biztosítják a motor molekulák kapcsolódását a MT-okhoz, valamint a szállítandó teherhez. Miközben ATP-t hidrolizálnak, a molekuláris motorok elmozdulnak a MT-ok mentén. A motor molekulákat két nehéz (a dineineket olykor három), valamint könnyű láncok alkotják (19.5. ábra). (A dineineknek közepes méretű fehérje láncok is alkotói.) Egy nehéz láncnak globuláris feji, valamint α-hélixből álló farki része van. A motor molekulák a globuláris feji részen keresztül kapcsolódnak a MT-okkal. A motorok globuláris része felelős az ATP molekulák hidrolíziséért. A nehéz láncok α-hélixből álló farki részei kettős fonattá rendeződnek. A fonatoknak egyrészt nagy a szakító szilárdságuk, másrészt rugalmasak. Ideális szerkezetek erő kifejtésére, terhek cipelésére.



19.5. ábra. A kinezin és a dinein motor molekulákat nehéz, könnyű (a dineineket közepes méretűek is) alegységek alkotják.

Az axonális transzport

Az axonális transzport során kinezin molekulák szállítanak anyagot az axonok mentén az idegsejtek testi részéből a szinapszisokhoz (19.6. ábra). A fordított irányú anyagszállítást a dinein molekulák végzik. Ha egy hátoldali ganglionba radioaktívan jelzett aminosav oldatot injektálnak, az idegsejtek a jelölt aminosavakat beépítik az újonnan képződő fehérje molekulákba (19.6. ábra). A radioaktívan jelzett fehérjék különféle típusai az axon mentén továbbítódnak. Ha valamennyi idő elteltével megvizsgáljuk az axon különféle darabkáit, bennük különböző jelzett fehérje féleségek létére derül fény.



19.6. ábra. Az axonális transzport sebességének meghatározása. Magyarázat a szövegben.

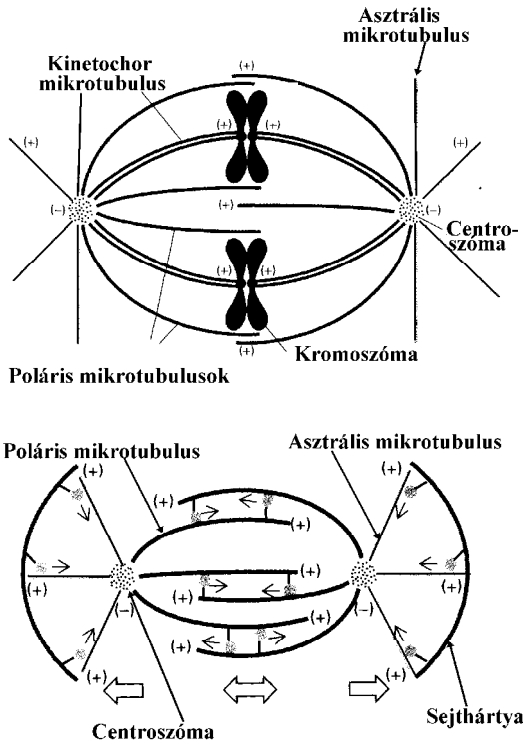
A jelzett fehérje-mintázat alapján meghatározható az axonális transzport sebessége. A vizsgálatok eredményeit a 19.1. táblázat foglalja össze. Nyilvánvaló, hogy a különféle komponensek szállításának sebessége nagyon eltérő. Az olyan komponensek szállítása gyors, amelyekből sokra van szükség, és amelyek gyorsan lebomlanak. Az acetilkolin-eszteráz enzimet kis hólyagocskákba csomagolva szállítják a kinezin molekulák. A hosszabb élettartamú molekulákat csak lassan szállítják a kinezinek.

19.1. Az axonális transzport hatékonysága.

Az anyagszállítás sebessége	Szállított anyag
Gyors 250-400 mm/nap	Glükoproteinek, glükolipidek, acetilkolineszterázzal töltött hólyagocskák, granulumok
Közepes; 50 mm/nap	ATP-áz, mitokondriumok
Lassú 0,2-1,0 mm/nap	Neurofilamentum fehérjék, mikrotubulus és intermediális filamentum komponensek

Az orsófonalak

A MT-okból álló orsófonalak a sejtosztódások kezdetén képződnek. A MT-okhoz motor fehérjék, valamint különféle fehérje molekulák is kapcsolódnak. A kromoszómák szegregációja a MT-ok, a motor fehérjék és a MT-okhoz kapcsolódó fehérje molekulák összehangolt funkciójának az eredménye. A *kinetochor* mikrotubulusok a dinenin motor molekulán és a kinetochoron keresztül kapcsolódnak a metafázisos kromoszómák centromerjéhez. (19.7. ábra.) A dinein molekulák a kinetochor MT nyaláb mentén szállítják a kromoszómákat. A szállítás közben olyan erők képződnek, amelyek a sejt belseje felé húzzák a centroszómákat (19.7. ábra). A kompenzáló ellenerők, amelyek a centroszómát helyben tartják, két forrásból erednek. (i) Az *asztrális* MT-ok + vége dienin molekulákon keresztül kapcsolódik a sejthártyához. Az asztrális MT-okat és közvetve a centroszómát a dinein molekulák húzzák a sejthártya felé. (ii) Ott, ahol a *poláris* MT-ok átfedik egymást, kinezin motor molekulák tolják szét a poláris mikrotubulusokat, távol tartva egymástól a centroszómákat (19.7. ábra).



19.7. ábra. A mikrotubulusok képződését a centroszóma szervezi. A centroszómák helyzetét az asztrális mikrotubulusokhoz és a sejthártyához kapcsolódó dineinek, valamint a poláris mikrotubulusokat széttoló kinezinek stabilizálják.

A kolhicin, a vinblasztin, a vinkrisztin növényi alkaloidák. Megakadályozzák a MT-ok funkcióját, közvetve pedig a kromoszómák szegregációját a mitózis ana- és telofázisában. Végeredményben lehetőséget teremtenek arra, hogy a sejtciklus metafázisában megálljon a sejtciklus, és meg lehessen vizsgálni a kromoszómákat. A taxol (a tiszafa alkaloidja) stabilizálja a MT-okat.

Példák az anyagszállításra

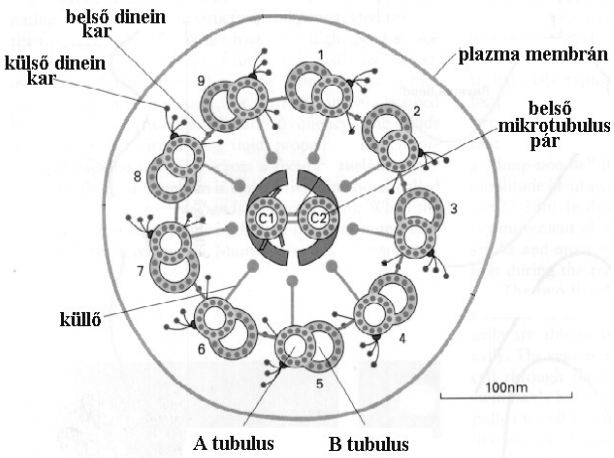
A színüket gyorsan változtatni tudó élőlények speciális sejtjeiben, a melanofórokban, membránnal burkolt pigment rögöcskéket szállítanak a MT-ok mentén a dineinek és a kinezinek. Mélyül a sejtek színe, miközben a granulumok a sejtfelszín közelébe szállítódnak, és halványul, miközben a granulumok a sejtek belsejébe jutnak. A melanofórokban levő MT-ok és motor molekulák funkciója idegi és hormonális szabályozás alatt is áll. A halak pikkelyeiben és a kétéltűek bőrsejtjeiben levő melanofórok funkciói a legismertebbek.

A MT-okhoz kapcsolódó motor molekulák szállítják az endoplazmatikus retikulumot és a Golgi apparátust alkotó hólyagocskákat, és fontos szerepük van a szekrécióban is. Ők szállítják az epitéliális sejtek apikális végébe azokat a Golgi készülékből származó hólyagocskákat, amelyek tartalma majdan exocitózissal a sejten kívülre ürül.

A csillók és a flagellumok mozgása

A csillók 0,25 μm átmérőjű sejtnyúlványok. Lehetővé teszik az eukariota egysejtűek és a csak néhány sejtből álló élőlények helyzetváltoztatását. A magasabb rendű élőlényekben, ahol a csillókat tartalmazó sejtek rögzítettek, a csillók folyadékot vagy szilárd részecskéket mozgatnak. Pl. a légutakban váladékot, a petevezetékben a petesejtet illetve a zigótát. A flagellumok a csillókhoz hasonló szerkezetű sejtnyúlványok. Belőlük kevesebb van sejtenként, és hosszabbak a csillóknál. A flagellumok sok egysejtű élőlény, vagy pl. a spermiumok mozgását biztosítják. Fontos szerepük van egyebek között a szivacsok életében.

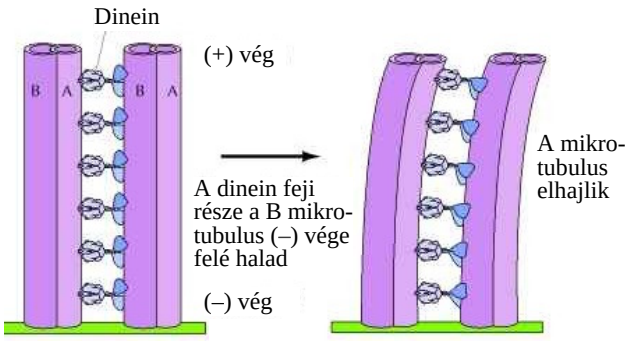
Egy csilló (falgellum) keresztmetszetén jól látszik, hogy bennük a MT-ok különlegesen szervezettek: a csilló kerülete mentén kilenc, a belsejében egy MT pár fut (19.8. ábra).



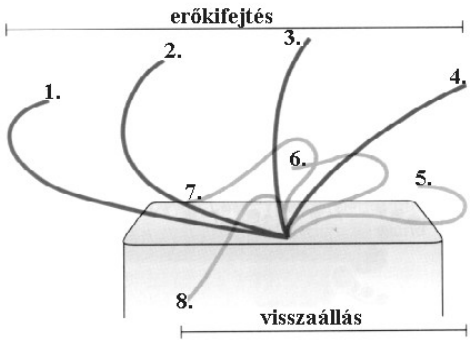
19.8. ábra. A csillók szerkezete egy keresztmetszeti képen.

A szerkezetet axonémának nevezik. A külső MT párok egyike (az ún. *A* tubulus) teljes. A másik (a *B* tubulus) részleges. Az *A* tubulushoz ún. csilló dinein molekulák vannak rögzítve. Alkalmas jel hatására, amely a csilló központi részéből származik, a csilló dineinek a szomszédos MT pár *B* tubulusával teremtenek kapcsolatot. Miközben a dineinek a szomszédos MT mentén „araszolnak”, a csilló elhajlik (19.9. ábra).

Természetesen a csillók nem össze-vissza csapkodnak, hanem meghatározott mintázat szerint (19.10. ábra). A csillók működését elsősorban a hálózatosan összekapcsolt alapi testek, a belső forgó MT pár szabályozza. Egy csillót kb. 200 különféle típusú fehérje molekula alkot, amelyek közül csak néhány funkcióját ismerjük.



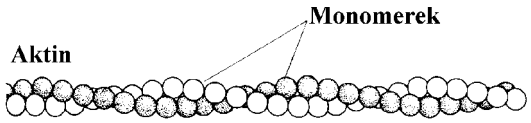
19.9. ábra. Az *A* MT-hoz rögzített dinein molekulák „araszolása” a szomszédos MT *B* tubulusa mentén a csilló elhajlását eredményezi.



19.10. ábra. Egy csilló „működésének” munka (1-4) és visszaálló (5-8) szakaszai.

MIKROFILAMENT (MF)

A MF-ok alapvető szerkezeti eleme az aktin globuláris fehérje. A MF-ok aktin molekulák kettősszálú polimerjei (19.11. ábra). Az aktin az eukariota sejtek legnagyobb mennyiségben jelenlevő fehérje félesége. (Nem izom sejtekben a sejtek összes fehérjéjének 1-5, izomsejtekben 5-10 százaléka.) Az aktin molekulák kb. 375 aminosavból állnak. A különféle típusaik szintézisét evolúciósan erősen konzervált gének kódolják. (Emberben hat.) Az aktin molekulák megfelelő tényezők jelenlétében 9 nm átmérőjű MF-okká polimerizálódnak (19.10. ábra).

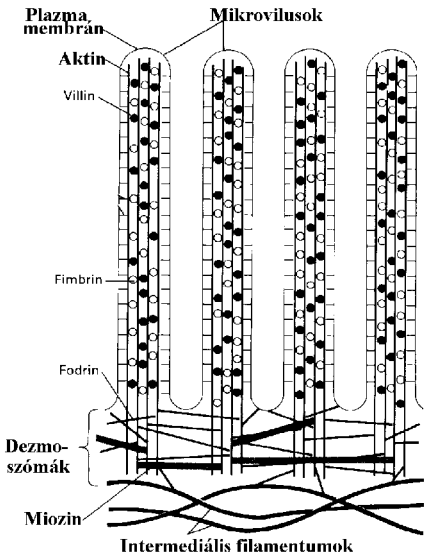


19.11. ábra. Egy aktin MF szerkezete.

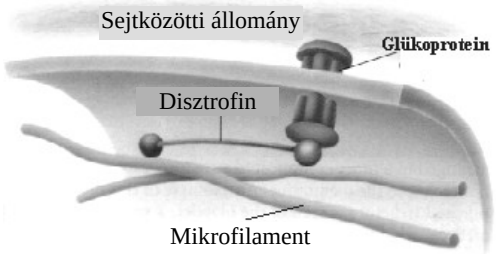
Mikrofilamentek, mint szerkezeti elemek

Az aktin MF-ok kettős szerepet töltenek be a sejtek életében: (i) szerkezeti elemek és/vagy (ii) pályák a miozin motor molekulák mozgásához. A bélboholy sejtekben a MF-ok jellegzetes fehérje molekulákkal (villin, fimbrin, fodrin) kapcsolódva biztosítják a sejtek jellegzetes nyúlványainak stabilitását (19.12. ábra). A MF-ok azokkal az intermediális filamentu-

mokkal is kapcsolatban vannak, amelyek a sejtek stabilitását és mechanikai hatásokkal szembeni ellenálló képességét biztosítják. A MF-ok szoros kapcsolatban állnak azokkal a szerkezetekkel is, amelyek a sejt belseje és külseje között teremtenek kapcsolatot (19.12. ábra). A kapcsolat lényege a szilárdság és a rugalmasság, a sejteknek az a képessége, hogy az alakváltozások során ne sérüljön meg a sejthártya, és maradjon épen a kapcsolat a sejt belseje és a sejten kívüli szerkezetek között. A disztrofin molekula különösen az izomsejtek életében fontos. Hiányában elpusztulnak az izomsejtek, elsorvadnak az izomok, és végül meghal az élőlény (19.13. ábra). (Az ember ismert génjei közül a disztrofint kódoló a legnagyobb: kb. 2,3 millió bázispárból áll.)



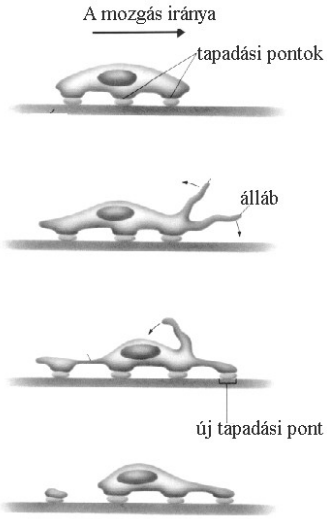
19.12. ábra. A MF mint szerkezetei elem stabilizálja a bélboholy sejtek nyúlványait.



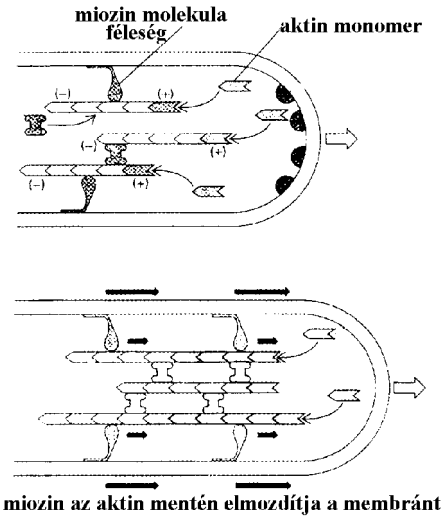
19.13. ábra. A MF fontos alkotója azoknak a szerkezeteknek, amelyek a sejtek belseje és külseje között teremtenek kapcsolatot.

Az amőboid mozgás

Az amőboid mozgás során ún. állábak (lamellopódiumok) képződnek, pl. az amőbák vagy a fagocitózisra képes fehérvérsejtek testén (19.14. ábra). Az álláb úgy alakul ki, hogy aktin molekulák polimerizációja nyomán MF-ok képződnek a sejt adott pontján. A MF-okhoz olyan speciális miozin molekulák kapcsolódnak, amelyek a sejthártyához kötöttek (19.15. ábra). A miozin molekulák a MF-okhoz kapcsolódnak, és miközben megváltozik alakjuk, elmozdulnak a MF mentén. Természetesen magukkal húzzák a sejthártyát, és végeredményben az egész sejtet. Az elmozdulás alapja a miozin és a MF közötti ismétlődő, amolyan araszoló jellegű elmozdulás. Az elmozdulás alapját az ATP-ben raktározott energia biztosítja.



19.14. ábra. Az amőboid mozgás sematikus ábrázolása.



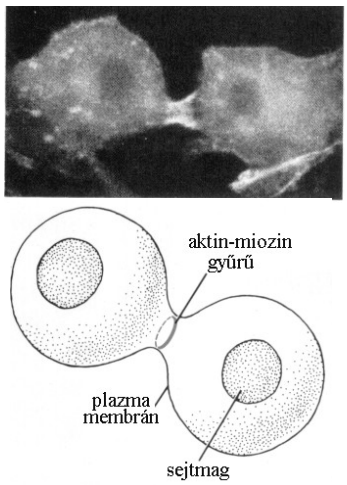
19.15. ábra. Az állábak MF-ok képződésére vezethető vissza. Az amőboid mozgás alapja pedig a sejthártyához kapcsolódó speciális miozin molekula fejek araszolása a MF-ok mentén.

Példák a MF-ok szerepére

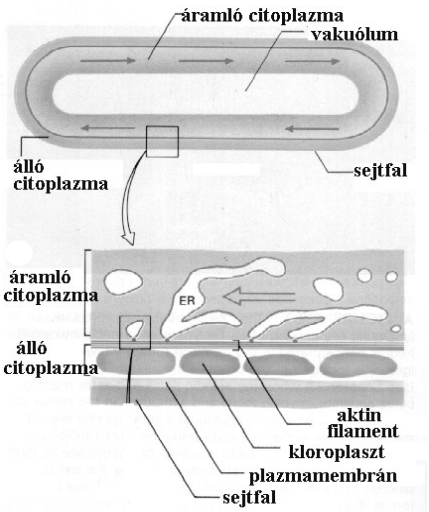
A MF-ok fontos szerepet játszanak gasztruláció során is, amikor a blasztoderma sejtek némelyikében a MF-ok megrövidülnek, ami miatt a sejtek a hólyagcsira belsejébe türemkednek (19.16. ábra). A leánysejtek elkülönülése a mitózis végén aktin gyűrű és miozin molekulák kölcsönhatásának az eredménye (19.17. ábra). A citoplazma áramlását néhány növényfaj

esetében MF-ok és a citoplazmába ágyazott miozin molekulák kölcsönhatása biztosítja, értelme pedig a kloroplasztokban képződött szerves anyagok eljuttatása a sejt minden részébe (19.18. ábra).

19.16. ábra. A gasztruláció alapja a MF-ok megrövidülése némely hólyagcsira sejtben.



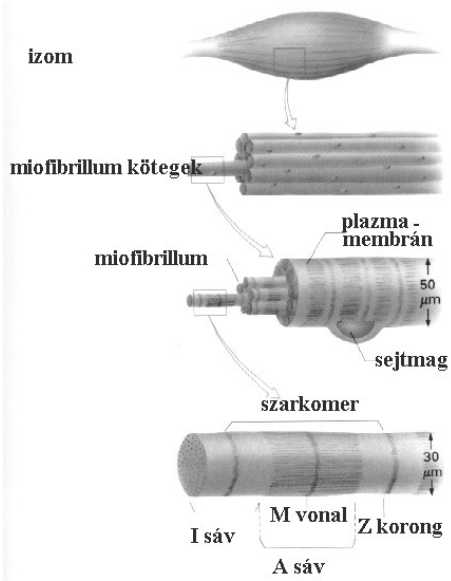
19.17. ábra. A leánysejtek elkülönülése egy MF gyűrű és miozin molekulák kölcsönhatásának az eredménye.



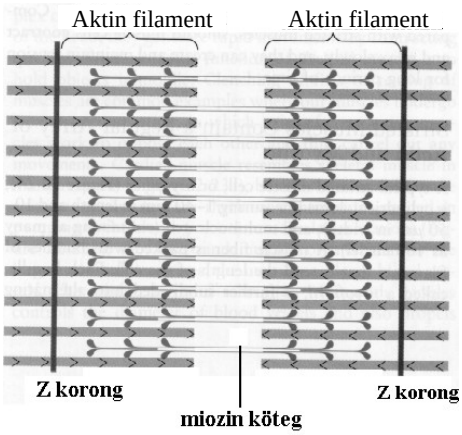
19.18. ábra. A citoplazma áramlás alapja is a MF-ok és a miozin molekulák közötti kölcsönhatás.

Az izomműködés molekuláris alapjai

Egy izmot izomsejtek, az izomsejteket pedig izomrostok sokasága alkot (19.19. ábra). Az izom alapvető szerkezeti és funkcionális egysége a szarkomer. A szarkomer két szomszédos Z lemez közötti szakasz. (A Z lemezeket speciálisan szerveződött jellegzetes fehérje molekulák alkotják.) A Z lemezhez csatlakoznak a Z lemezekre merőlegesen álló aktin MF-ok. Az aktin MF-ok közé illeszkednek a miozin molekula kötegek (19.20. ábra). Úgy, hogy egy miozin köteg hat MF-al tud kapcsolatot teremteni. Az izom összehúzódás alapja a miozin kötegek araszoló elmozdulása a MF-ok mentén. Az araszoló mozgás során a miozin nyalábok közelebb húzzák egymáshoz a Z lemezeket, miközben megrövidül a szarkomer, összehúzódik az izom.



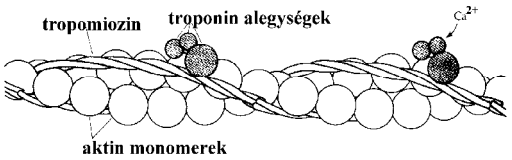
19.19. ábra. Egy izom felépítése vázlatosan.



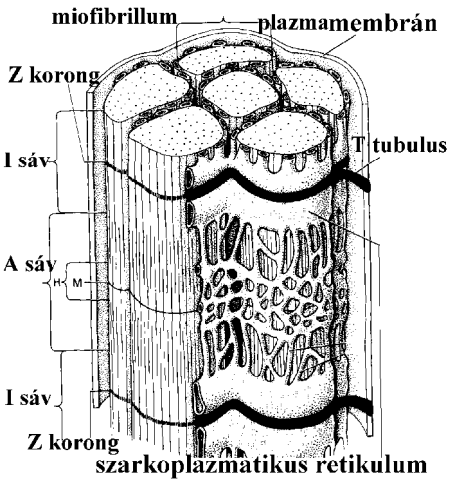
19.20 ábra. A MF-ok és a miozin nyalábok helyzete.

Az aktin MF-ok árkaiba tropomiozin molekula fonatok illeszkednek, nagy szakítószilárdságot és rugalmasságot biztosítva (19.21. ábra). A komplexhez troponin molekulák is kapcsolódnak. A troponin molekulák fedik el azokat a helyeket, amelyekhez a miozin molekulák feji részei kapcsolódhatnak. A

kapcsolódó helyek azután válnak szabaddá, miután a troponin molekulákat Ca^{2+} ionok elmozdítják a miozin kötőhelyekről. A Ca^{2+} ionok a szarkoplazmatikus retikulumból szabadulnak ki, miután egy, az idegrendszerből eredő jel hatására az idegsejt membránpotenciálja lecsökken (19.22. ábra). A membránpotenciál csökkenés az ún. T csatornákon át továbbítódik a sejtek belsejébe (19.22. ábra). (A T lemez a sejthártya betüremkedése a sejtbe.) A membránpotenciál csökkenés áttevődik a szarkoplazmatikus retikulum membránjára, ahol kinyílnak a membránba épült Ca^{2+} csatornák. A kiáramló Ca^{2+} ionok elmozdítják a troponin molekulákat. A miozin molekulák most kapcsolódhatnak a MF-okkal, és elkezdődhet az izom összehúzódása. Az izom összehúzódása akkor fejeződik be, amikor a Ca^{2+} ionok visszakerülnek a szarkoplazmatikus retikulumba (19.22. ábra).

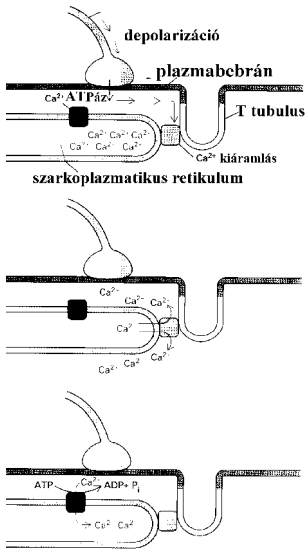


19.21. ábra. Az aktin, a tropomiozin és a troponin molekulák kapcsolódása.

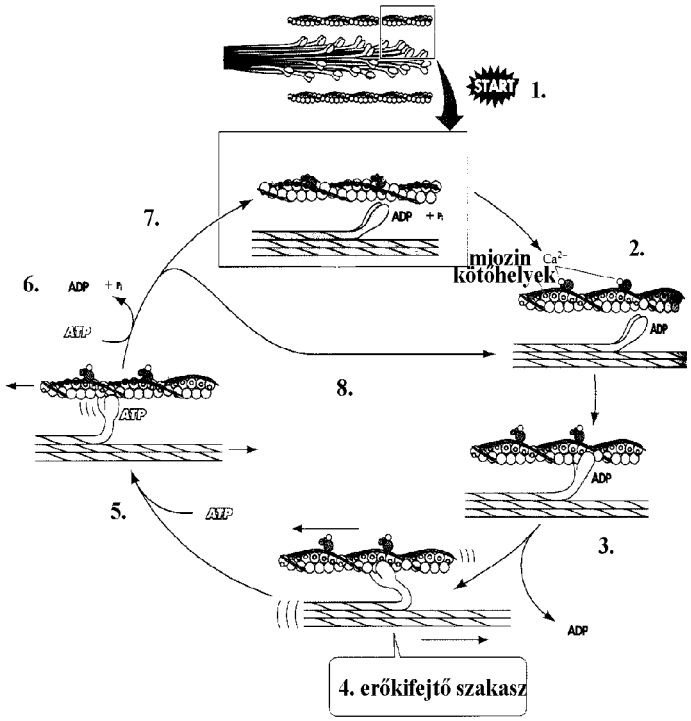


19.22. ábra. Egy izomsejt szerkezete sematikusan.

Az izomösszehúzódás fontosabb mozzanatai a következők (19.23. ábra). Az ADP-vel kapcsolódó miozin azután kapcsolódhat a MF-al, miután a Ca^{2+} ionok felszabadítják a MF-ok miozin kötő helyeit. Az ADP-vel kapcsolódó miozin molekulák feji része kötődik a MF szabaddá vált kötő helyeihez. A kötődés közben a miozin fej elválik az ADP-től, a miozin fejhez kötődve marad. Miközben megváltozik a miozin molekula konformációja, a miozin maga felé húzza az aktin MF-ot. A következő lépésben a miozin molekula ATP-vel kapcsolódik, leválik a MF-ról, és konformációja visszatér az kiindulási állapotba. A visszatérés során az ATP hidrolizál, az ADP a miozin fejhez kötődve marad. A rendszer készen áll egy újabb ciklusra (19.23. ábra).



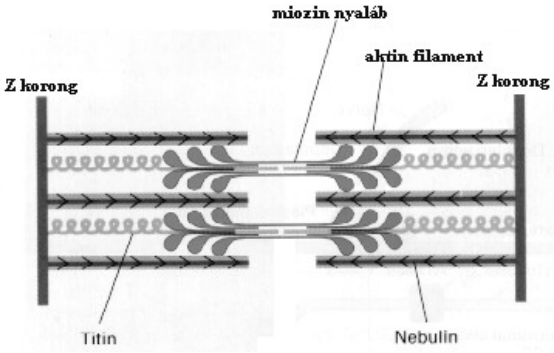
19.22. ábra. Az axonon érkező ingerület hatására a szarkoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} ionok ürülnek, majd pumpálódnak vissza a szarkoplazmatikus retikulumba.



19.23. ábra. Az izom összehúzódás lépései. Magyarázat a szövegben.

Az ATP tehát az összehúzódott állapot megszűntetéhez, a kiindulási állapotba való visszatéréshez szükséges. ATP hiányában az izmok összehúzódva maradnak. A jelenséget hullamerevségnek nevezik. A ciklusok addig ismétlődnek, ameddig Ca^{2+} ionok vannak az izomsejt citoplazmájában. Az izomösszehúzódás alapja lényegében tehát nem más, mint a miozin molekula-köteg „araszolása” a MF-ok mentén az ATP-ben tárolt energia rovására.

A szarkomerek stabilitását és rugalmasságát olyan fehérje molekulák is segítik, mint a titin és a nebulin (19.24. ábra). A titin az ismert legnagyobb fehérjék egyike: a molekula tömege $3x10^6$ Da.



19.24. ábra. A titin és a nebulin egy szarkomeren belül.

ÖSSZEFOGLALÁS

A biológiai mozgások alapja lényegében nem más, mint molekuláris motor fehérje (kinezin, dinein és miozin) molekulák elmozdulása a sejtváz két komponense, a mikrotubulusok és a mikrofilamentek mentén. A mozgás energiáját az ATP biztosítja. A mozgás lényegében olyan apró araszoló lépések sorozata, amelyek alapja fehérje molekulák ismétlődő kölcsönhatása. A sejteken belüli szállítás esetében a motor molekulák szabadon elmozdulhatnak a MT vagy a MF pálya mentén. Az egész sejt és a szervezet elmozdul, ha a motor molekula valamely része rögzítve van, mint pl. a csillók, a flagellumok és az izmok esetében. A mozgásrendszer komponensei evolúciósan erősen konzerválták, és lényegében olyan „csúcstechnikák", amelyek sokszorosan kiállták a természetes szelekció rostáját.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 82-84, 95-100, 218-220, 1006-1018, 2011.
2. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology, 751-847, 2000.
3. Alberts, B. és mtsi. Essential Cell Biology, 513-545, 1998.

20. BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK ÉS SEJTKOMMUNIKÁCIÓ

A sejthártya szerkezete. Kapcsolat a sejtek között. Anyagáramlás a sejthártyán keresztül. A sejthártya funkciói.

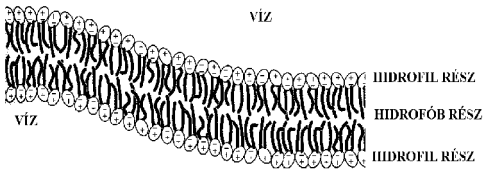
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán

BEVEZETÉS

A biológiai membránok képződése az élet kialakulásának egyik alapvető feltétele volt. A membránok egyrészt elkülönítik a sejt belsejét a külvilágtól, másrészt szelektív kapcsolatot biztosítanak a sejt belseje és a környezete között. A sejthártyákhoz kapcsolódó szerkezetek biztosítják a sejtek közötti kapcsolatot. A sejthártya sok olyan alapvető életfolyamathoz szükséges, amely a sejtek szintjén valósul meg. A jelen fejezet a sejthártya szerveződésével, a sejtek kapcsolódásával foglalkozik. Áttekint néhány, a sejthártyával kapcsolatos életjelenséget is.

A sejthártya szerkezete

A sejthártya alapja egy kb. 4 nm „vastag” kettős foszfolipid réteg (20.1. ábra). A membrán belsejét a foszfolipidek hidfrofób szénhidrogén oldalláncai alkotják. A membrán külső részein a foszfolipidek hidrofil részei helyezkednek el.

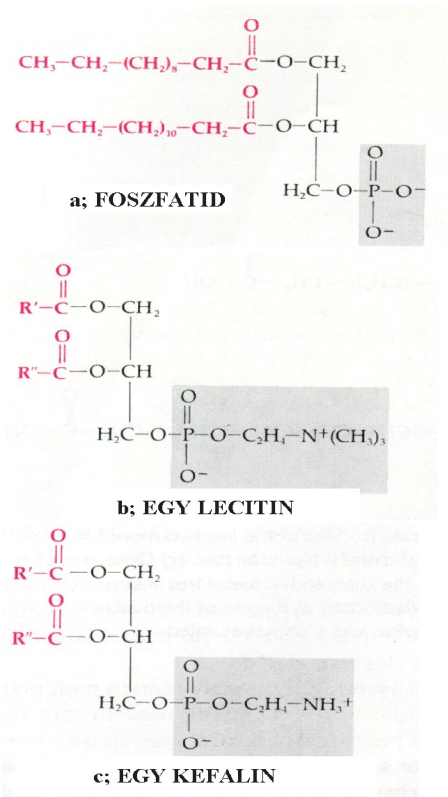


20.1. ábra. A sejthártyák alapja két foszfolipid réteg.

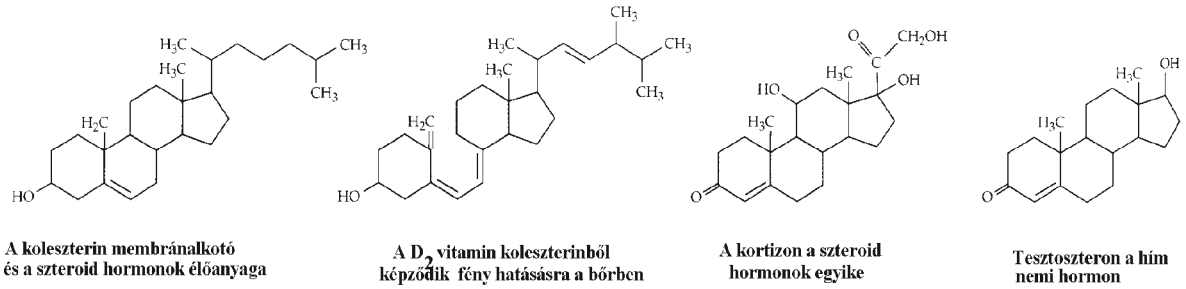
A foszfolipidekben a glicerinhez két zsírsav kapcsolódik (észter kötéssel), és vagy egy foszforsav maradék (a foszfatidokban), vagy a foszforsav maradék valamint egy kolin (a lecitinekben), vagy egy etanolamin (a kefalinokban; 20.2. ábra). Minél több a telítetlen kettős kötés a zsírsav oldalláncban, és minél több a telítetlen zsírsavak aránya a membránban, annál folyékonyabb a membrán. A membránok koleszterint is tartalmaznak (20.3. ábra). A koleszterin a membránokban a telítetlen zsírsavakhoz kapcsolódik, és a membránok fluiditását befolyásolja. A membránfluiditás-változásnak fontos szerepe van a hőmérséklethez való alkalmazkodásban.

A sejthártyáknak a fehérjék is fontos alkotói (20.4. és 20.5. ábra). (A vörösvérsejt hártya kb. 50%-a fehérje.) A membránfehérjéknek a következő fontosabb típusai vannak.

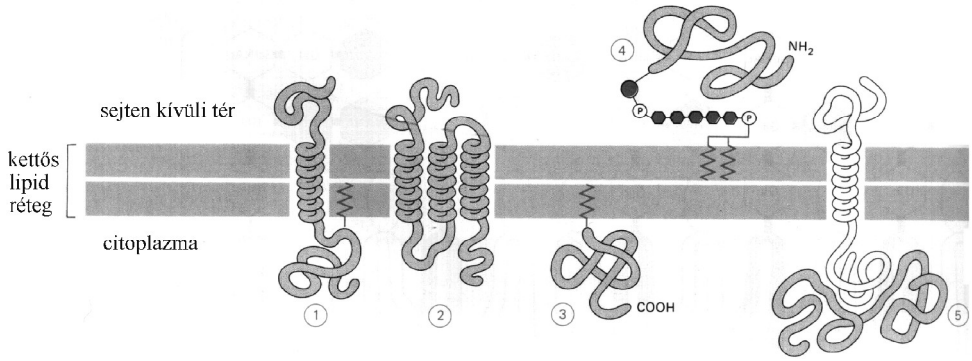
Az ún. transzmembrán fehérjékre az jellemző, hogy egy, vagy több olyan doménja (funkcionális egysége) van, amelyek átívelnek a sejthártyán (20.6. ábra). A transzmembrán domén lényegében egy olyan α-hélix, amely 25 hidrofób vagy semleges jellegű aminosavból áll. Egy-egy aminosav 0,15 nm-t ad az α-hélixhez, a 25 aminosav összesen mintegy 4 nm-t. Annyit, amennyi a hártya foszfolipid része. A fehérje azon részeiben, amelyek a transzmembrán doménnal szomszédosak, gyakoriak a pozitív töltésű lizin és arginin aminosavak. A pozitív töltésű oldalláncok stabilizálják a fehérje molekulát. Gyakoriak az olyan fehérje molekulák, amelyeknek hét transzmembrán doménja van. Jellegzetes példái az ioncsatornák, olyan „szelepek” a sejthártyákon, amelyeken nyitott állapotban ionok áramlanak át. (Lásd a 25. előadás anyagát.)



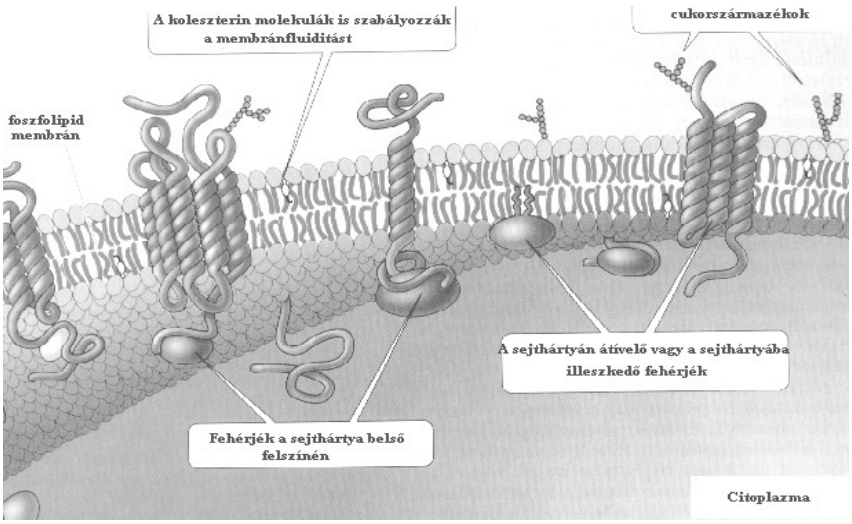
20.2. ábra. Három foszfolipid féleség.



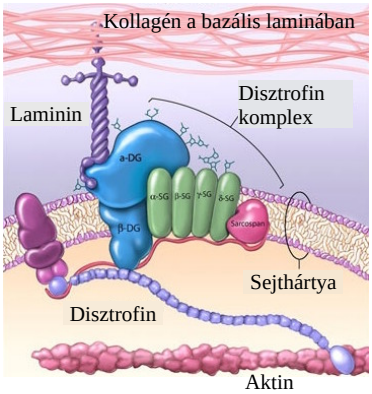
20.3. ábra. A koleszterin és néhány származéka.



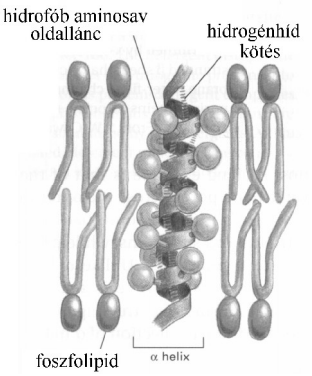
20.4. ábra. A membránfehérjék különféle típusai.



20.5. ábra. A sejthártya felépítése sematikusan.



20.7. ábra. Szerkezet, amely kapcsolatot teremt a sejt belseje és külseje között.



20.6. ábra. Egy transzmembrán motívum szerkezete.

A transzmembrán fehérjék teremtenek kapcsolatot a sejten belüli szerkezetek (többnyire az aktin mikrofilamentumok) és az extracelluláris mátrix között. A membránon átívelő kapcsolat erős és rugalmas: biztosítja a sejthártya integritását, és a kapcsolatot a sejten kívüli molekulákkal (20.7. ábra). A transzmembrán fehérjék külső, ún. receptor (antenna) része gyűjti össze a sejthez érkező információkat, és juttatja a sejten belülre a szignáltranszdukció során. A molekula citoplazmatikus részének enzimatikus aktivitása van, és pl. az ún. G fehérjéket módosítják. Úgy, hogy a jel tovább haladjon a sejt belsejébe. (Lásd később).

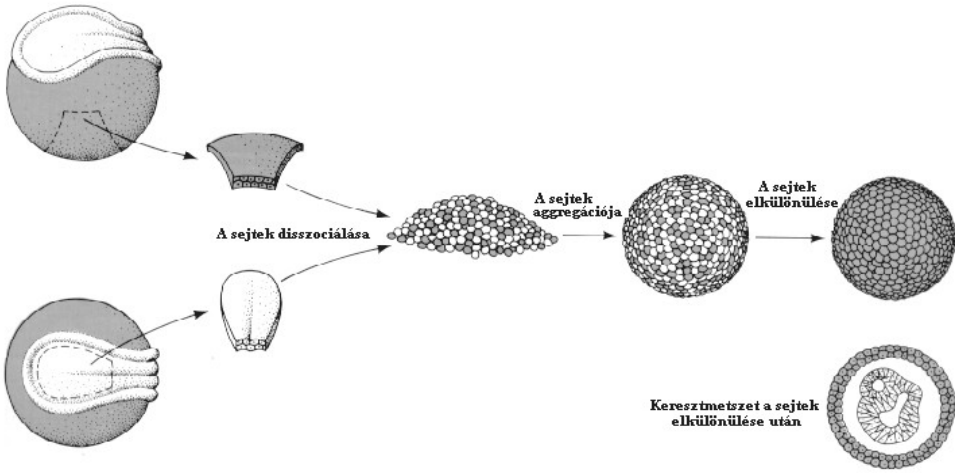
Sok fehérje belülről kapcsolódik a sejthártyához (20.4. és 20.5. ábra). Közülük az ún. G-fehérjék a legfontosabbak. A G fehérjék a jeltovábbító kaszkád kulcsfontosságú elemei. (A G-fehérjék szerepével a máshol foglalkozunk.)

A sejthártya külső felszínéhez kapcsolódó fehérjékhez gyakorta kapcsolódnak különféle cukor származékok (20.4. és 20.5. ábra). Némelyikük címkeként adja a sejtek arculatát, mások a sejtekhez érkező jelek felfogásában és továbbításában játszanak szerepet, ismét mások a sejtek között, vagy a sejten kívüli állománnyal (extracelluláris mátrix) teremtenek kapcsolatot. A hasonló típusú sejtek felszínén olyan molekulák vannak (az ún. cadherin fehérjék, Ca^{2+}-függő adhéziós molekulák), amelyek segítik a hasonló jellegű sejtek egymásra találását (20.8. ábra).

Kapcsolat a sejtek között

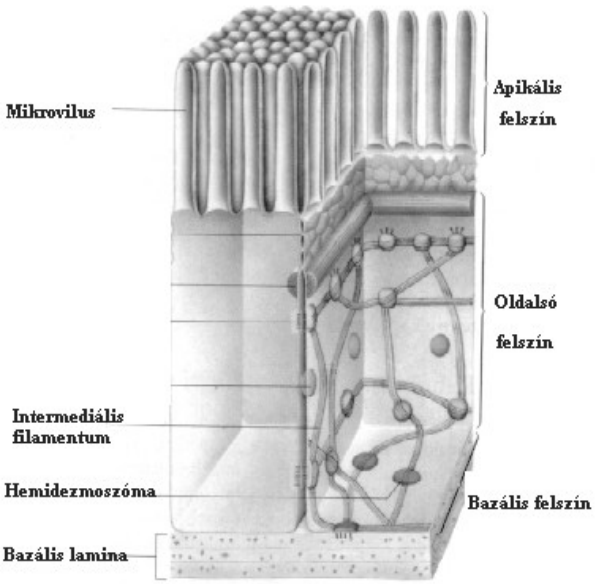
A soksejtűek sejtjei közötti kapcsolatot speciális szerkezetek (ún. junkciók) biztosítják. A sejteket összekapcsoló szerkezetek erősek, rugalmasak és különféle típusaik vannak (20.9. ábra).

1. Az ún. **szoros kapcsolatok** (tight junctions) szegecsként kapcsolják össze a sejteket. Nem teszik lehetővé az anyagáramlást a szomszédos sejtek között. Különösen azok között a sejtek között gyakoriak, amelyek izolálják a testüregeket.

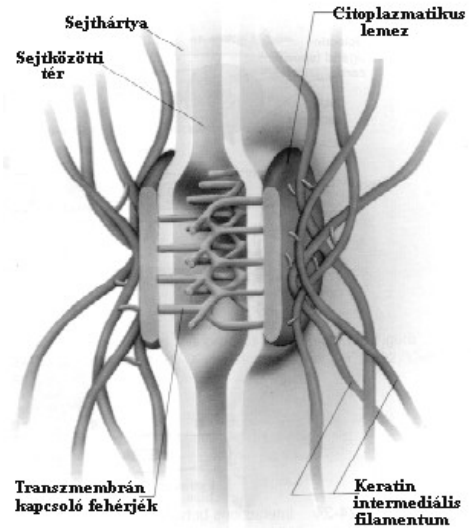


20.8. ábra. A sejtek felszínén olyan molekulák vannak, amelyek segítik a sejtek egymásra találását egy sejthalmazban.

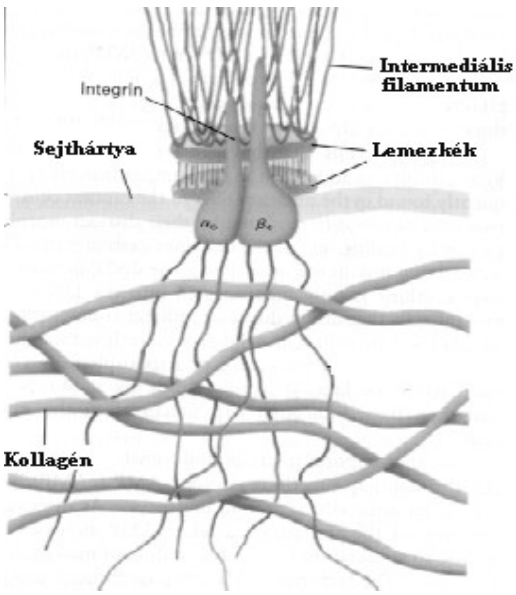
2. A **tapasztó kapcsolatok** (adherence junctions) övként futnak körbe főleg az epiteliális sejtekben a szoros kapcsolatok alatt (20.9. ábra).
3. A **dezmoszómák** a szomszédos sejteket kapcsolják össze. Pontszerű kapcsolatot teremtenek a sejtek között (20.10. ábra).
4. Az ún. *hemidezmoszómák*, a sejteket az alaphártyához (a bazális membránhoz), egy sejten kívüli molekula-hálózathoz rögzítik (20.11. ábra).
5. Az ún. **rés kapcsolatok** úgy tartják össze a szomszédos sejteket, hogy citoplazmáik között közvetlen kapcsolat lehet (20.9. és 20.12. ábra). Egy rés kapcsolatot hat konnexin molekula alkot. Minden egyes konnexin molekulának négy transzmembrán doménja van. A réskapcsolatok nyílhatnak és csukódhatnak. Ha nyitva vannak, késedelem nélkül jut át rajtuk egyik sejtből a másikba az ingerület. Nem véletlen, hogy réskapcsolatokat elektromos szinapszisoknak is nevezik.
6. A **plazmadezmaták** lényegében plazma hidak a növények szomszédos sejtjei között.



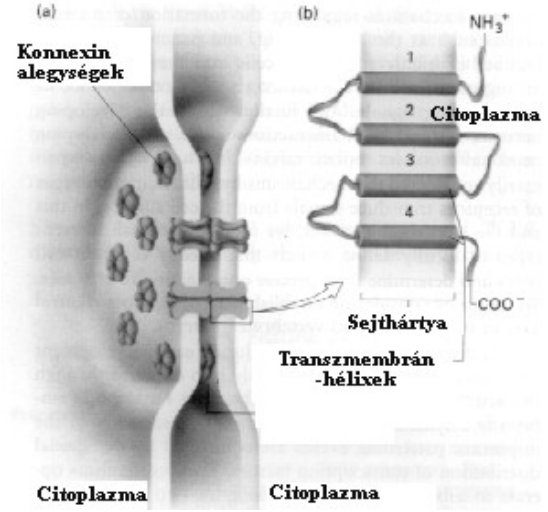
20.9. ábra. A sejtek közötti kapcsolatok típusai.



20.10. ábra. Egy dezmoszóma molekuláris szerkezete.



20.11. ábra. Egy hemidezmoszóma szerkezete.

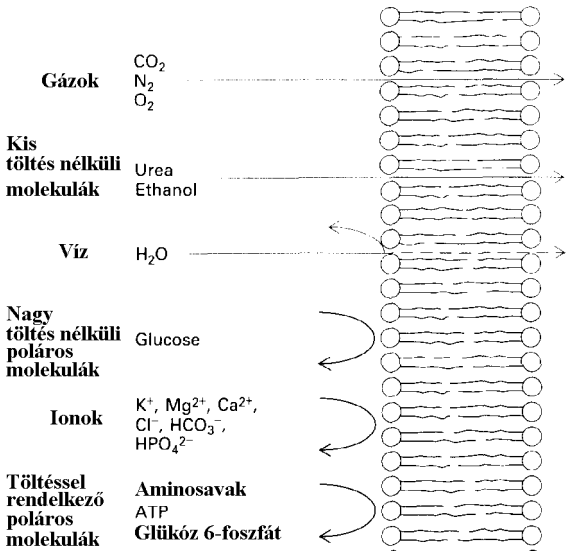


20.12. ábra. A rés kapcsolatok szerkezete.

A sejten kívüli állomány

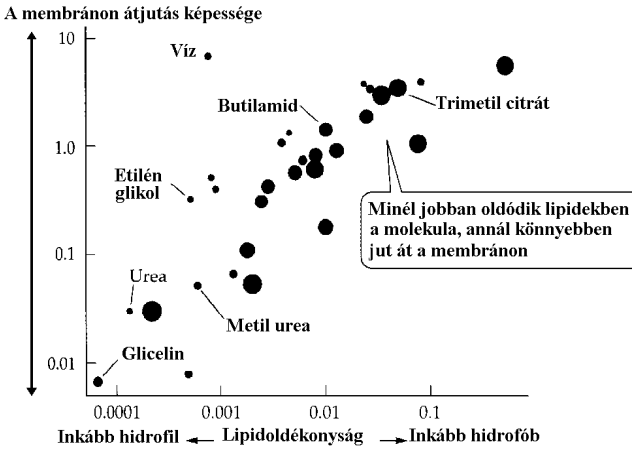
A sejten kívüli állomány (az ún. extra cellular matrix, ECM) olyan sejten kívüli molekulák szövevényét jelenti, amely a szövetek erősítésében, a szűrésben (a vesében a szűrlet képzése során) vagy a sejtek adhéziójában játszik szerepet. Az ECM-nek az alak és a molekuláris szerveződés szerint sok típusa van. Egyik típusuk az alaphártya, amelyhez pl. az epiteliális és az izom sejtek kapcsolódnak. Az ECM fontos alkotója a kollagén, az a rostokká szerveződő protein, amely az állatvilágban a legnagyobb gyakorisággal előforduló fehérje típus (20.11. ábra). A kollagén molekulák exocitózissal kerülnek a sejten kívülre, ahol az alapegységekből szerelődnek össze hármas fonatokká. A fonat minden egyes szálát kollagén molekulák polimerje alkotja.

Anyagszállítás membránokon keresztül



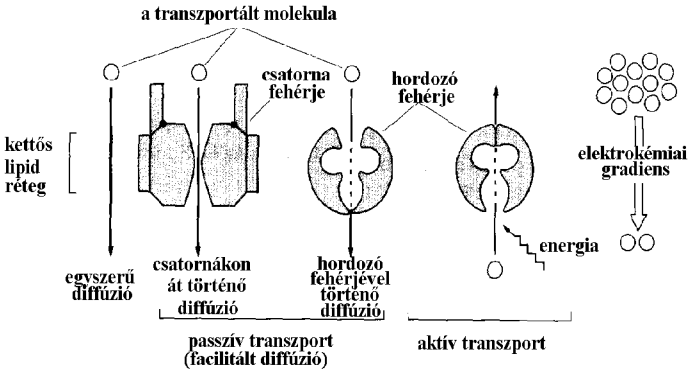
20.13. ábra. Különféle anyagok átjutási képessége mesterséges lipid membránon (BLM-en).

A BLM-en (bimolekuláris vagy black lipid membránon), amely csak foszfolipid molekulákból áll, a gázok, a hidrofób molekulák, a töltés nélküli kis molekulák, valamint a kis poláros természetű molekulák könnyen átjutnak (20.13. ábra). Minél jobban oldódik valamely molekula lipidekben, annál könnyebben jut át egy lipid membránon (20.14. ábra). A nagyobb poláros molekulák és az ionok nem jutnak át a csak foszfolipidekből felépülő membránokon.



20.14. ábra. A lipidoldékonyság és a lipid membránon átjutás közötti kapcsolat.

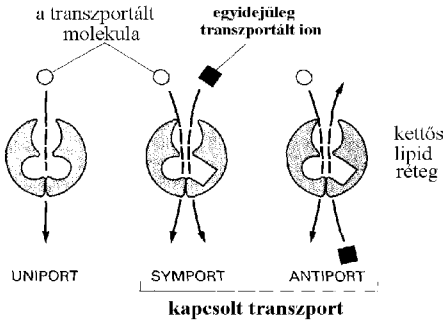
A tapasztalat viszont az, hogy a nagyobb poláros természetű molekulák és az ionok is átjutnak azokon a biológiai membránokon, amelyek nemcsak foszfolipideket, hanem fehérje molekulákat is tartalmaznak. Az ionok, valamint a hidrofil molekulák átjutásában minden a membránok fehérje molekulái játszanak szerepet. A biológiai membránokon keresztül történő anyagtranszportnak két formáját szokás elkülöníteni (20.15. ábra).



20.15. ábra. A fehérje molekulák a membránokon át történő anyagszállítás fontos szereplői.

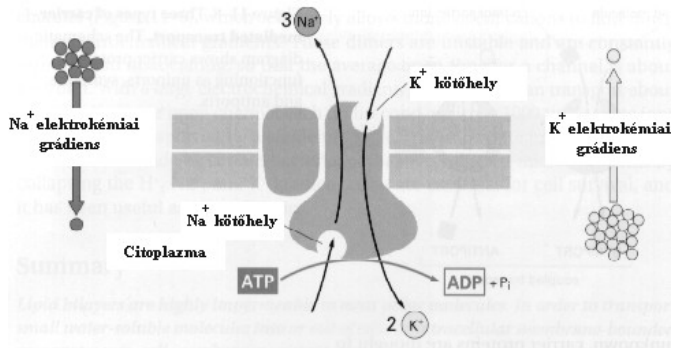
A passzív transzporthoz nincs szükség energiára. A passzív transzport azt jelenti, hogy a membránba épült és kinyíló csatornákon, szelepeken át a koncentráció gradiensnek megfelelő irányban áramlanak be anyagok a sejtekbe (20.15. ábra). A

szabad diffúzió esetében pl. ionok áramlanak át a csatornákon. A hordozó (carrier) molekulától függő esetben egy, a membránba épült fehérje molekula mintegy „bezsilipeli” a molekulákat a sejtbe. A hordozó molekulától függő diffúziónak három típusát szokás elkülöníteni, attól függően, hogy hányféle molekula szállítása valósul meg, illetve a molekulák ugyanazon, vagy ellenkező irányban jutnak át a membránon (20.16. ábra).

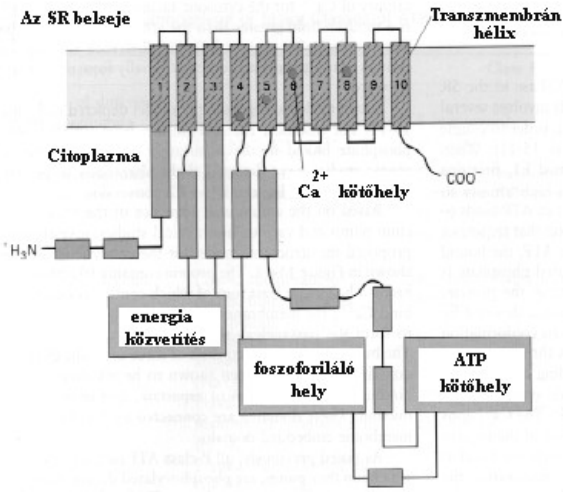


20.16. ábra. A hordozó molekulától függő diffúzió típusai.

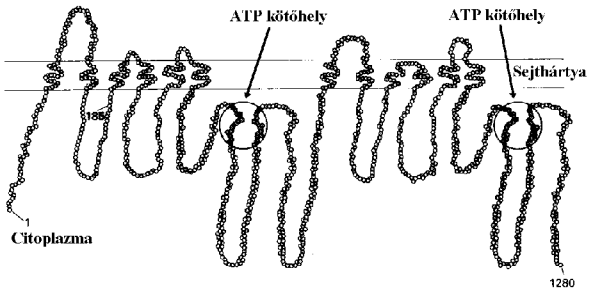
Az **aktív transzport** során fehérje molekulák az ATP-ben raktározott energia felhasználásával juttatnak át molekulákat a membránon (20.15. ábra). Az aktív transzport esetében az anyagszállítás koncentráció gradienssel szemben valósul meg. Az aktív transzport jól ismert példája az ún. Na^+-K^+ pumpa, egy olyan membránba épült fehérje, amely az ATP energiájának segítségével miközben három Na^+ iont pumpál ki a sejtből, két K^+ iont juttat be a sejtbe (20.17. ábra). A szarkoplazmatikus retikulumból az izomsejtek citoplazmájába jutó Ca^{2+} ionokat az ún. Ca^{2+} pumpa szivattyúzza vissza a szarkoplazmatikus retikulumba. A szarkoplazmatikus retikulum membránba épült Ca^{2+} pumpa tíz transzmembrán domént, ATP-kötő, energiageneráló és további funkcionális egységeket tartalmaz (20.18. ábra). Az MDR (multidrog resistance) fehérje is a sejtmembránba épült. A különféle hatóanyagokat (köztük a citosztatikumokat) pumpálja ki a sejtekből (20.19. ábra).



20.17. ábra. A Na^+-K^+ pumpa funkció sematikus ábrázolása.



20.18. ábra. A Ca^{2+} pumpa moduláris felépítése.



20.19. ábra. Az MDR fehérje szerkezete.

A membránok szerepe az energiatermelésben

Egy élő sejt membránjának kettős foszfolipid rétege 3,75 nm „vastag”. A membrán külső és belső oldala között 60-90 mV a nyugalmi membrán-potenciál értéke. A membrán szigetelő képessége kiváló: a 90 mV/3,75 nm érték $2{,}4 \times 10^5$ V/cm-nek felel meg. A kiváló szigetelő képesség potenciális lehetőség energianyerésre is: ha a membrán két oldalán felhalmozódott töltés különbséget apránként le lehetne vezetni, és pl. ATP-ben lehetne raktározni, úgy meg lehetne oldani a sejtek energiaellátását. A membránokba épült ATP szintetáz enzim azt az energiát építi be ATP-be, amelyet a bennük átáramló H^+ ionokból nyer. A protonok azért áramlanak át az ATP szintetázban levő csatornán, mert a membrán két oldalán a H^+ ionok koncentrációja eltérő. Az eltérő H^+ ion koncentráció kialakítására három megoldást ismerünk.

1. Az archebaktérium fajok sejthártyájába bakteriorodopszin molekulák épülnek. A bakteriorodopszin molekulák lényegében protonpumpák: az elnyelt fényenergiát arra használják, hogy protont szivattyúzzanak a sejt belsejéből a sejten kívülre.
2. A fotoszintetizáló élőlényekben a fényenergia olyan proton pumpákat „működtet”, amelyek protont szivattyúznak a kloroplasztok belsejébe a fotoszintézis folyamán.
3. A mitokondriumokban a szerves anyagok oxidációjából származik az az energia, amellyel a proton pumpák H^+ ionokat juttatnak a mitokondrium belsejéből a mitokondrium két külső és belső membránja közötti térbe.

Az eltérő H^+ ion koncentrációban rejlő energia hasznosulásának is három módja ismeretes.

1. Az ATP-szintetáz tevékenysége révén ATP-be épül be, hogy kielégítse a sejtek szerteágazó energia igényét. (Lásd a 3.14. ábrát.)
2. Meghajtja a baktériumok membránjába épült turbinát. (Lásd a 2.3. ábrát.)
3. A mitokondrium ún. menedék csatornáin át hővé disszipálódik, biztosítva az állandó hőmérsékletű élőlények hőenergia igényét.

Egy bizonyos: minden biológiai energiatermelő rendszer funkciója membránokkal kapcsolatos, és a membránok kiváló töltésszigetelő képességén alapul.

ÖSSZEFOGLALÁS

A membránok a sejteknek azok a kulcsfontosságú alkotói, amelyek arculata kettős: bizonyos anyagokat áteresztenek, másokat nem. A szelektív áteresztő képességük teszi lehetővé a sejtek belsejének viszonylagos állandóságát. A sejthártyák és a hozzá kapcsolódó szerkezetek gyűjtik össze a sejtekhez érkező információt, és feldolgozásra a sejt belsejébe továbbítják. A membránok biztosítják az eukariota sejteken belül a különféle kompartmentek elkülönülését, hogy az egyes kompartmentekben a kémiai reakciók hatékonyan menjenek végbe. A membránoknak alapvető szerepe van az energiatermelő folyamatokban is.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 54-57, 106-147, 2011.
2. Karp, G., Cell and Molecular Biology, 121-178, 259-327, 329-387, 2008.
3. Alberts, B. és mtsi. Essential Cell Biology, 365-425, 2004.
4. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 751-847, 2000.

21. HORMONOK ÉS SZEREPÜK.

Feromonok. A hormonok felfedezése. A hormonok osztályozása. A hormonok hatásmechanizmusa. A másodlagos hírvivők. A napi ritmus és a belső óra.

A fejezetet Szabad János állította össze 2005. őszén

Bevezetés

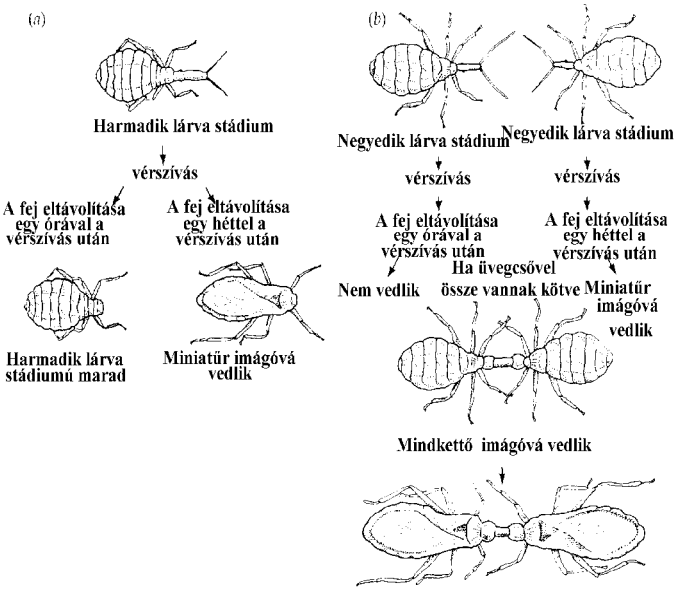
Az élőlényeket folyamatosan érik a környezetükből érkező hatások, és olyanok is, amelyek forrása a saját szervezetük. Az élőlények érzékelik a hatásokat, és úgy igyekeznek alakítani szervezetük funkcióit, hogy életben maradhassanak. A környezeti hatások *gyors* észlelése, a jel feldolgozása és a válasz megszervezése az idegrendszer feladata. A *lassú* és hosszabb ideig tartó válaszok kémiai természetű jelekkel történnek. Természetesen a gyors és a lassú mechanizmusok között szoros kapcsolat van. Az ún. vegyi szabályozás egyik típusát a *feromonok* jelentik, olyan kémiai jelek, amelyek az egy fajba tartozó élőlények közötti jelzéseket biztosítják. A soksejtű élőlények sejtjei közötti belső harmónia megteremtésében a *hormonok* játszanak szerepet, olyan molekulák, amelyek kis koncentrációban a képződésük helyétől olykor nagyon távol és hatékonyan fejtik ki hatásukat. Hogy derült arra fény, hogy vannak hormonok? Hogyan hangolják át a feromonok és a hormonok a sejtek és az élőlények életét? Melyek a hormonhatás alapjainak molekuláris mechanizmusai? Hogyan segítenek a hormonok összhangot teremteni a környezeti feltételek és a szervezet között? Hogyan "működik" a belső óra és szabályozza a napi ritmust? A 21. fejezet a fenti kérdésekre válaszokat keres, megjegyezve, hogy a hormonokkal és szerepükkel elsősorban a biokémia és az élettan foglalkozik részletesen.

A feromonok

Az egy fajba tartozó élőlények a percekig, órákig vagy napokig tartó jelzéseket kémiai természetű szaganyagokkal, *feromonokkal* oldják meg. Pl. a selyemlepke (*Bombus mori*) nőstények speciális mirigyeiből kiáramló bombikolint a hímek csápjaiban levő receptorok érzékelik, és késztetik arra a hímeket, hogy megkeressék a nőstényeket, velük párosodjanak. A feromonokkal megva-lósuló kommunikáció előnye, hogy olcsón kivitelezhető, átterjed a természeti akadályo-kon, sokáig és sötétben is hat. Hátránya viszont, hogy információ tartalma kicsi, és nem túl könnyen lokalizálható. Mégis, a feromonokkal megvalósított kommunikáció kiválóan alkalmas az olyan célokra, mint pl. a territórium határok megjelölése, vagy a nemek egymásra találása. A mesterségesen előállított feromonokat hatékonyan használ-ják a rovarkártétel elleni védekezésben a környezetkímélő ún. feromon csapdákkal.

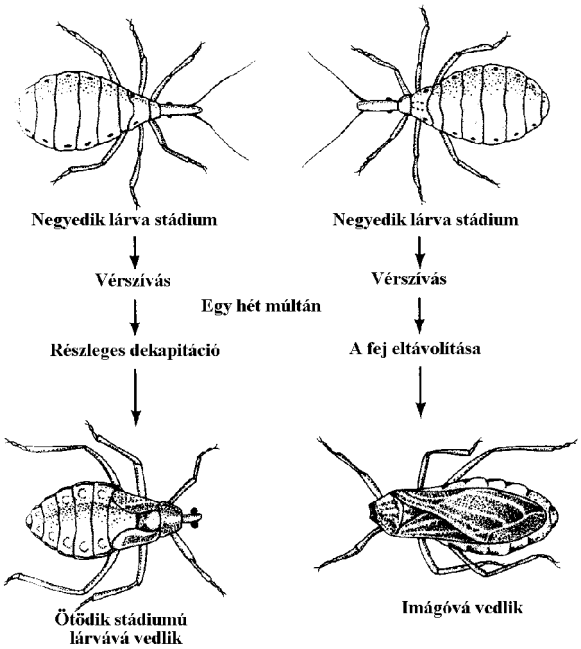
Bizonyítékok a hormonok létére

A *Rhodnius* vérszívó poloska a kifejlődéssel fejlődő rovarfajok egyike: a petéből kikelő *Rhodnius* lárva csaknem olyan, mint egy kis szárnyatlan adult. Az ötödik vedlés után (bábállapot nélkül) fejlődik ivarérett imágóvá. Ha egy harmadik stádiumú lárva vért szívhat, alig több mint egy hét multán negyedik stádiumú lárvává vedlik. Ha a vérszívás után egy órával levágják a harmadik stádiumú lárva fejét, a fejnélküli lárva harmadik stádiumban marad. (Páradús környezetben akár egy évig is). Ha azonban a lárva fejét a vérszívás után csak egy hét multán távolítják el, a harmadik stádiumú lárva miniatűr imágóvá vedlik, kihagyva a negyedik és az ötödik lárva stádiumokat (21.1. ábra). Mi történt az egy hét alatt? Milyen hatásra viselkedik a lefejezett lárva minden sejtje imágóként? Az idegrendszerben bekövetkező változások hatására? Miért hagyja ki a lárva a negyedik és az ötödik stádiumokat? A kérdéseket Sir Vincent Wigglesworth válaszolta meg a XX. század elején. Negyedik stádiumú lárvákat engedett vért szívni. Az egyik csoportban a *Rhodnius* poloskák fejét egy óra múlva levágta. A fejüktől megfosztott poloskák megmaradnak a negyedik lárva stádiumban. A másik csoportban vérrel táplálkozott poloskák fejét csak egy hét múlva vágta le. A második csoportban a fejnélküli poloskák miniatűr imágókká vedlettek, kihagyva az ötödik lárva stádiumot. Ha a két csoport egy-egy poloskáját fiziológiás sóoldattal telt üvegcsövecskével összekötötte, a fejnélküli lárvák mindegyike miniatűr imágóvá vedlett (21.1. ábra). Az is, amely megmaradt volna a negyedik lárva stádiumban. Az üveg csőben semmilyen jele sem volt idegsejt nyúlványoknak, jelezve, hogy az egy hét multán lefejezett lárvákból olyan anyagok diffundáltak át az egy nap után lefejezettekbe, amelyek képződési helyüktől távol, kis koncentrációban fejtették ki drámai hatásukat. A hatást, mint később látni fogjuk, egy rovar hormon, a vedlési hormon okozta.



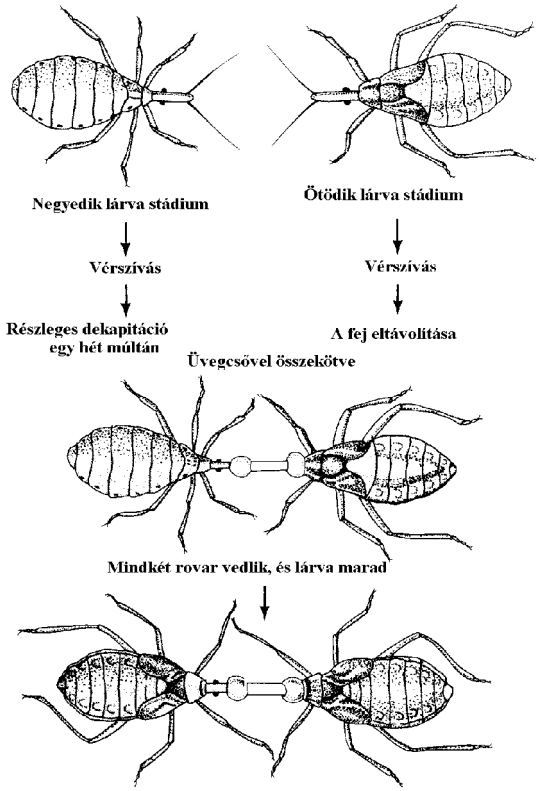
21.1. ábra. A dekapitált lárvákkal végzett kísérletek hívták fel a figyelmet a fejből eredő hormonok szerepére a vedlésben.

Különös, hogy a vérszívás után egy héttel részlegesen dekapitált lárvák ötödik stádiumú lárvákká vedlettek (21.2. ábra). Sőt, amikor a részlegesen dekapitált lárvát egy olyannal kötötte össze V. Wigglesworth, amely a negyedik lárva stádiumot kihagyva imágóvá vedlett volna, mindkét lárva ötödik stádiumú lárvává vedlett (21.3. ábra). A részleges dekapitáció eredményei azt jelzik, hogy a fej torfelőli részében van annak a hormonnak a forrása, amely juvenilis (fejlődő, lárva) stádiumban tartja a rovarokat. A *juvenil hormon* (JH) forrás eltávolítása (a teljes dekapitálás) nyomán fejtheti ki hatását a *vedlési hormon*.

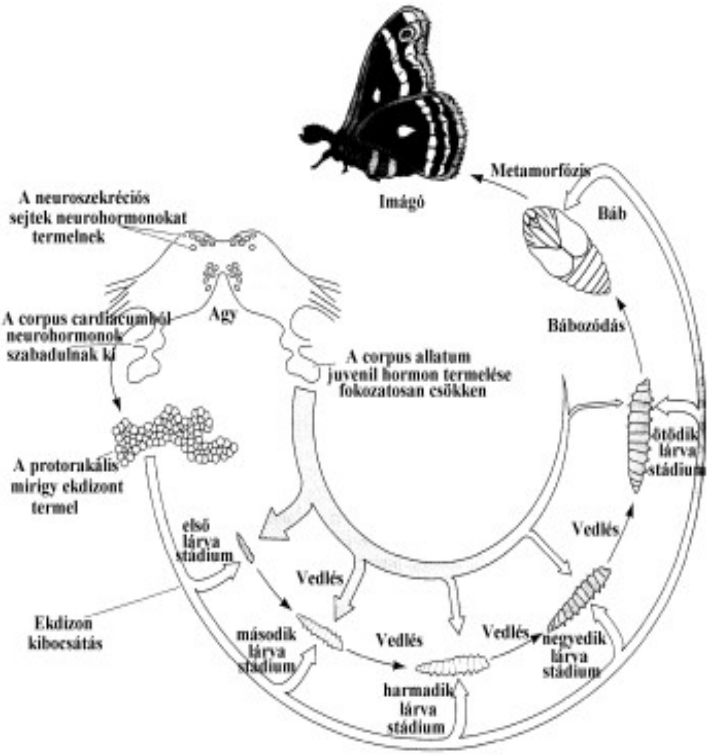


21.2. ábra. A fej torfelőli részében a lárva állapotot fenntartó tényező van.

A *Rhodnius* poloskákon bemutatott séma általános érvényű a rovarok életében. A központi idegrendszer neuroszekréciós sejtjeiben termelt neurohormonokat a corpus cardiacum tárolja, és bocsátja ki alkalmas hatás (pl. táplálkozás) nyomán (21.4. ábra). A neurohormonok serkentik a protorakális mirigyet a vedlési hormon, a szteroid természetű *ekdizon* termelésére. Az ekdizon vedlést indukál, miután koncentrációja jelentősen megemelkedik a szervezetben. Ha a JH koncentrációja is magas, az egyik lárva stádiumot a következő követi. Ha ellenben a JH koncentrációja kicsi, vagy imágóvá (a kifejlődéssel fejlődő rovarok), vagy bábbá vedlenek a (teljes átalakulással fejlődő) utolsó lárva stádiumú rovarok. (A bábokban egy további vedlés történik, amely eredményként imágók képződnek.) A JH a corpus allatum terméke (21.4. ábra). A JH termelés mértéke folyamatosan csökken a lárvális élet folyamán. A JH forrás eltávolításával az ekdizon indukálta vedlés érthető módon miniatűr imágók képződéséhez vezet. A rovarhormonok és hatásmechanizmusuk ismeretében is lehet csökkenteni a rovar populációk méretét. Az ún. JH antagonisták (a JH-val ellentétes hatású vegyületek) hatására a lárvák idő előtt steril és csökkent életképességű imágókká vedlenek. A JH szinergista (a JH-val azonos hatású) vegyületek jelenlétében viszont az utolsó stádiumú lárvák nem bábbá vagy imágóvá vedlenek, hanem extra stádiumú lárvává, amelyek elpusztulnak.



21.3. ábra. A lárvaállapotot fenntartó tényező is hormon természetű.

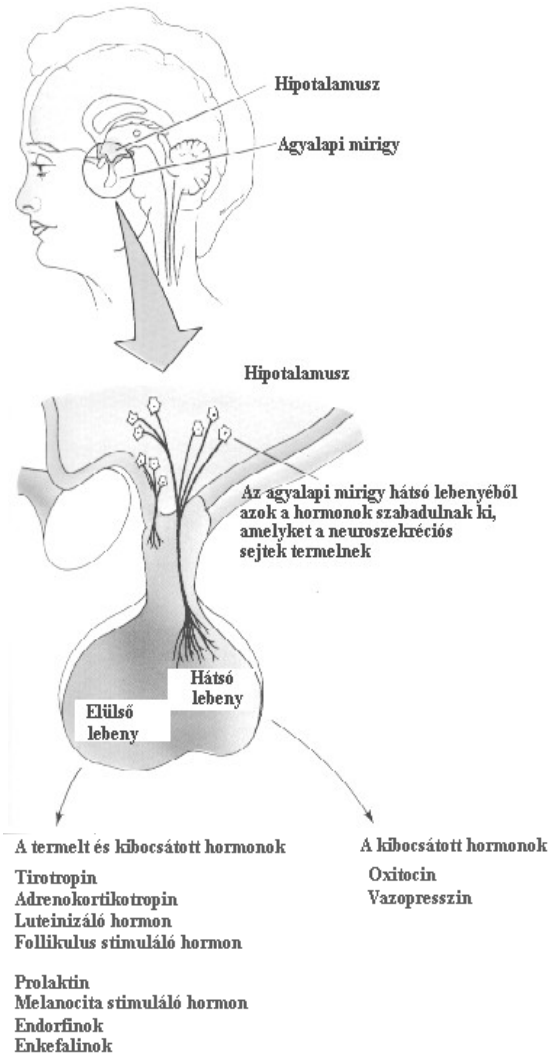


21.4. ábra. A rovarok hormonrendszerének felépítése.

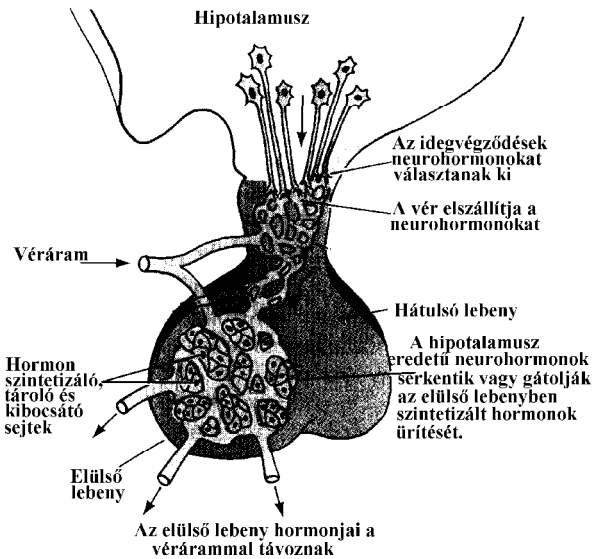
Érdemes megfigyelni a hormon rendszer "építkezését". A neuroszekréciót folytató sejtek a központi idegrendszer elemei. Szerepük alapvető fontosságú az ideg- és a hormonális rendszer közötti harmónia megteremtésében. A neuroszekréciós sejtek termékei gyakorta olyan kis sejtcsoportok funkcióját szabályozzák, amelyek termékei hormonok, és amely hormonok vagy közvetlenül hatnak a szervezet sejtjeire, vagy további hormon(oka)t termelő sejtek funkcióját szabályozzák (21.4. és 21.5. ábra).

Az ember hormonrendszerének felépítése, a hormonhatás molekuláris természete

Az ember hormonrendszere a rovarokéhoz hasonló felépítésű (21.5. ábra), és nagy általánosságban a következő szintekből áll. 1. A **neuroszekréciós sejtek** a központi idegrendszer hipotalamusz részének alkotói. Termékeik az ún. neurohormonok. [A neurohormonok természetének megismerése, mert koncentrációjuk csekély, nem volt egyszerű. R. Guillemin and A. Schally 270 ezer birka hipotalamuszából izolált 1 mg TRH-t (tireotropin-kibocsátó hormont). A TRH hatására az agyalapi mirigy elülső lebenyének néhány sejtje tirotropint termel. A tirotropin pedig a pajzsmirigy aktivitását fokozza; 21.1. táblázat.] 2. A neuroszekréció termékei az **agyalapi** mirigybe jutnak (21.6. ábra). Vagy (i) az agyalapi mirigy hátsó lebenyébe, ahol tárolódnak és majdan szekretálódnak (az oxitocin és a vazopresszszin), vagy (ii) az agyalapi mirigy elülső lebenyének sejtjeit késztetik hormonok szintézisére. 3. Az elülső lebeny négy hormonja, az ún. –trop hormonok (a tirotrop, az adrenokortikotropin, a luteinizáló és a follikulus stimuláló), **hormon termelő mirigyek** funkcióját szabályozzák. Az elülső lebeny további hormonjai (a növekedési hormon, a prolaktin, a melanocitastimuláló hormon, az endorfinok és az enkefalinok) közvetlenül hatnak a célsejtekre (21.1. táblázat). 4. A hormontermelő mirigyek hormonjai közvetlenül a **célsejtekre** hatnak. A hormonhatás sémája nem általános. Az oxitocin és a vazopresszin lényegében két neurohormon, és közvetlenül hatnak a célsejtekre. Vannak olyan hormonok is, amelyek képződését a központi idegrendszer közvetlenül nem befolyásolja. Vannak olyan hormonok, amelyek szervekké tömörült sejtekben képződnek, mások szétszórtan a szervezet különböző helyein. Vannak olyan hormonok, amelyek módosított aminosavak, mások különféle méretű peptidek, kisebb vagy akár 200 ezer Da tömegű fehérjék. A hormonok egy hányada szteránvázas vegyület, koleszterin származék (21.7. ábra). Egy bizonyos: valamennyi hormon nagyon kis koncentrációban nagyon nagy hatást tud kifejteni.



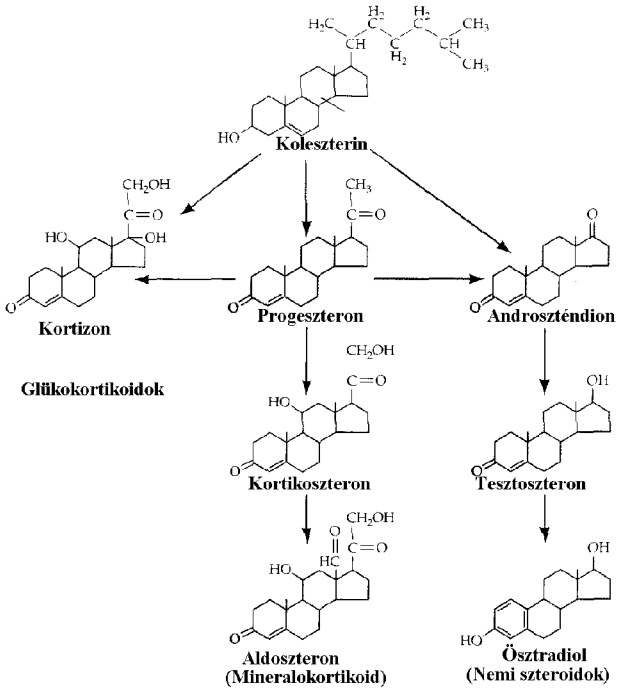
21.5. ábra. Az ember hormonrendszerének első két szintje: a hipotalamusz neuroszekréciós sejtjei és az agyalapi mirigy.



21.6. ábra. Az agyalapi mirigy szerveződése és funkciói.

21. 1. táblázat. Az ember hormonjainak természete és néhány fontosabb jellemzője.

A HORMON	TERMÉSZETE	FUNKCIÓJA
Neurohormonok a hipotalamuszból		
Tirotropin elválasztást stimuláló hormon	Tripeptid	Tirotropin kibocsátást indukál az agyalapi mirigy elülső lebeny néhány sejtjéből
Gonadotropin elválasztást stimuláló hormon	Peptid	A follikulus stimuláló hormon és a luteinizáló hormon kibocsátását indukálja
Prolaktin elválasztást stimuláló hormon	Peptid	Porlaktin kibocsátást indukál
Prolaktin elválasztást gátló hormon	Peptid	Megakadályozza a prolaktin kibocsátást
Szomatosztatin	Peptid	Megakadályozza a növekedési hormon kibocsátást, gátolja a tirotropin kibocsátást
Növekedési hormon elválasztást stimuláló hormon	Peptid	Indukálja a növekedési hormon kibocsátást
Adrenokortikotropin elválasztást stimuláló hormon	Peptid	Az adrenokortikotropin kibocsátást indukálja
Hormon, amely gátolja a melanocita stimuláló hormon elválasztást	Peptid	A mealoncita stimuláló hormon elválasztását gátolja
Az agyalapi mirigy hátulsó lebenyének hormonjai		
Oxitocin	Peptid	Méhizom összehúzódás, tejürítést indukál. Az anya-gyermeke bevéső dés egyik tényezője
Vazopresszin	Peptid	A vérnyomás növelése az erek összehúzásával, vízvisszaszívás a vesében (antidiuretikus hormon)
Az agyalapi mirigy elülső lebenyének hormonjai		
Növekedési hormon	Fehérje	Fokozza a fehérje molekulák szintézisét, serkenti a növekedést
Prolaktin	Fehérje	Tejtermelés
Melanocita stimuláló hormon	Peptid	Serkenti a bőr pigmentáltságát
Endrofinok és enkefalinok	Peptidek	A fájdalom érzékelés csökkentése. A szervezet saját ópioidjainakk egyik csoportja
Hormonok belsőelválasztású mirigyekből		
Pajzsmirigy Tiroxin	Jódozott dipeptid	Fokozza a sejtanyagcserét
Kalcitonin	Peptid	Csökkenti a csontok, és növeli a vér kalcium tartalmát
Mellék pajzsmirigy Parathormon	Fehérje	Növeli a csontok, és csökkenti a vér kalcium tartalmát
Csecsemőmirigy Timozinok	Peptidek	Fokozzák a T limfociták aktivitását az immunválaszban
Hasnyálmirigy Inzulin	Fehérje	Segíti a glükóz felvételét a sejtekbe, serkenti a glükogén képződést Segíti a glükogénbontást, növeli a vércukor szintet
Glükagon	Fehérje	Gátolja az inzulin és a glükagon kibocsátást, csökkenti a felszívódást a bélből
Szomatosztatin	Peptid	valamint a szekréciót
Mellékvesevelő Adrenalin és noradrenalin	Módosított aminosavak	Emeli a vércukor szintet, fokozza a pulzust, az izmok vérellátottságát
Mellékvese kéreg Glükokortikoidok	Szteroid	(Pl. a kortizol) Gyulladásgátlók. Csökkentik a cukoranyag cserét, fokozzák a fehérjék és a zsírok anyagcseréjét
Mineralokortikodok	Szteroid	(Pl. az aldoszteron) Fokozza a vesében a K^+ ionok kiválasztását valamint a Na^+ ionok reabszorpcióját
Petefészek Ösztrogének	Szteroid	A női nemi jellegeket fejlesztik ki és tartják fenn
Progeszteron	Szteroid	Fenntartja a terhességet, részt vesz a másodlagos női nemi jellegek fenntartásában
Here Androgének	Szteroid	(Pl. a tesztoszteron) Kialakítják és fenntartják a hím nemi jellegeket, szükségesek a spermium képződéshez
Tobozmirigy Melatonin	Módosított aminosav	A napi életritmus szabályozója
Hormonok a szervezetben "szétszórt" sejtekből		
Gyomor Gasztrin	Peptid	Stimulálja a gyomornedv elválasztást, a gyomormozgást és a táplálék megemésztését
Vékonybél Szekretin	Peptid	Serkenti a bikarbonát kiválasztást a hasnyálmirigy járatokban
Kolecisztokinin	Peptid	Stimulálja az emésztő enzimek kiválasztását a hasnyálmirigyben és a májban
Enterogasztrin	Peptid	Stimulálja az emésztő enzimek kiválasztását a hasnyálmirigyben és a májban Serkenti az epehólyag összehúzódást
Szív Kamra nátrium antidiuretikus hormon	Peptid	Fokozza a Na^+ ionok kiválasztását.
Vese Eritropoetin	Fehérje	Fokozza a vérképző csírasejtek osztódását
Legtöbb sejt Prosztaglandinok	Peptidek	Fokozzák a simaizmok összehúzódását
Példa a helyi hatású hormonokra		
Tüdő, máj, gyomor-nyálkahártya Hisztamin	Hisztidin származék	Tágítja a véredényeket. A gyulladás mediátora. Az allergiás reakciók résztvevője



21.7. ábra. A szteroid hormonok koleszterinből származnak.

A növekedési faktorok

A hormonok jellegzetes csoportját képezik az ún. növekedési faktorok (angolul growth factor, GF): olyan fehérje molekulák, amelyek hatásukat nagyon kis koncentrációban fejtik ki, és vagy a vérárammal jutnak képződésük helyéről oda, ahol hatásukat kifejtik, vagy a sejtek között diffundálva. Növekedési faktoroknak szokás őket nevezni, mert hatásukban közös, hogy vagy a sejtek osztódását, számbeli növekedését indukálják, vagy a sejtek differenciációját. A növekedési faktorok csak bizonyos típusú sejtek osztódását indukálják (21.2. táblázat). A növekedési faktorok szerepe alapvető fontosságú az embrionális indukció folyamán, amikor a kitüntetett sejtekből (mint pl. a ZPA sejtjei) származó növekedési faktorok irányítják más sejtek osztódását és differenicációját. (Lásd a 18.15. ábrát.) A növekedési faktorok szerepe nagyon fontos a daganatok képződésében. (Lásd a 23. fejezetet.) Ma már a gyakorlatban használják a rekombináns DNS technológiával készített növekedési faktorokat sejtek, szövetek regenerációjának serkentésére, és arra is, hogy a sejteket differenciációját a kívánt irányba tereljék.

21.2. táblázat. Néhány ismert növekedési faktor és jellemzője.

Növekedési faktor (GF)	Funkció
PDGF (platelet-derived growth factor)	A kötőszövet sejtek és némely neuroglia sejttípus osztódását serkenti.
EGF (epidermal growth factor)	Sok sejttípus osztódását serkenti. Jel az embrionális indukció során.
IGF-1 (insulinlike growth factor -1)	Serkenti a sejtanyagcserét. Segíti a sejtek életben maradását. Más növekedési faktorokkal együtt általános sejtosztódást serkentő hatása van.
TGF-β (transfroming growth factor β)	Sejttípustól függően segíti, vagy gátolja más növekedési faktorok hatását. Szabályozza némely sejttípus differenciációját. Jel az embrionális indukció során.
FGF (fibroblast growth factor)	Sok sejttípus osztódását serkenti. Gátolja különféle csírasejt típusok osztódását. Jel az embrionális indukció során.
Interleukin-II	Serkenti az aktivált T limfociták osztódását.
NGF (nerve growth factor	Különféle idegsejt típusokban serkenti a nyúlványok képződését és fennmaradását.
Eritropoetin	Serkenti a vörös sejtek prekurzor sejtjeinek osztódását és differenciációját.
Interleukin-III	Serkenti különféle típusú vérsejtek osztódását és életben maradását.

A hormonhatás osztályozása

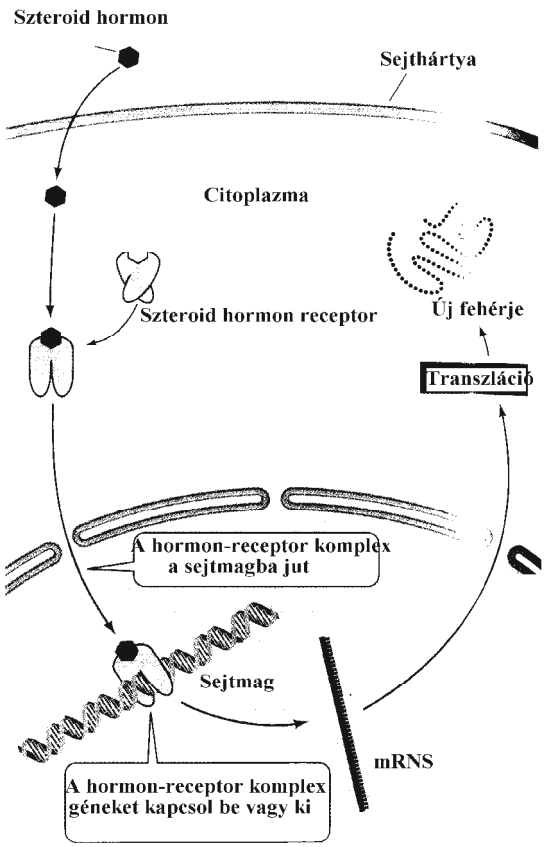
A soksejtű élőlények sejtjei közötti harmónia megteremtésének egyik fontos tényezője a sejtek közötti kölcsönhatás. (Lásd a 18. fejezetet.) A másik tényező alapját olyan kémiai természetű jelek biztosítják, amelyek jelzéseket továbbítanak a sejtek között: a jeladó sejtek jeleket bocsátanak ki, amely jeleket az arra alkalmas sejtek előbb észlelnek, majd reagálnak rájuk. A jelzés mechanizmusa hat mozzanatot foglal magába. (1) A jel molekulák szintézisét és (2) kibocsátását. (3) A jel eljutását, eljuttatását a kibocsátás helyétől a célsejtekig. (4) A jel „észlelését" speciális „antennákkal", receptor fehérje molekulákkal. (5) A sejt anyagcseréjének áthangolódását, és végül (6) a jel eltávolítását a szervezetből.

A magasabb rendű élőlényekben a sejtek közötti jeltovábbító mechanizmusokat a hatótávolság alapján három típusba szokás sorolni. (I) Az ún. **endokrin** jelzés során hormon molekulák továbbítanak jeleket a véráram révén az egymástól olykor nagyon távol levő jeladó és célsejtek között. (II) Az ún. **parakrin** jelzés

során a jeladó és a célsejt egymás közelségében van. A kémiai szinapszisokon át, valamint a növekedési faktorokkal megvalósuló jeltovábbítás a parakrin jelzés jellegzetes példái. (III) Az **autokrin** jelzés során a sejtek azokra a jelekre reagálnak, amelyeket saját maguk bocsátanak ki. Számos növekedési faktor autokrin módon fejti ki hatását. A folyamatnak különös jelentősége van a daganatok növekedése során. A fenti osztályozás némileg mesterséges, mert ismertek olyan jeltovábbító molekulák, amelyek többféle jelzés típus résztvevői.

A hormonok hatásmechanizmusa

A hormonok olyan *elsődleges hírvivő* molekulák, amelyek hírt, információt közvetítenek a szervezet egyik helyéről a másikra. A lipidoldékony és a vízoldékony hormon molekulák eltérő mechanizmussal juttatják el információjukat a célsejtekhez.

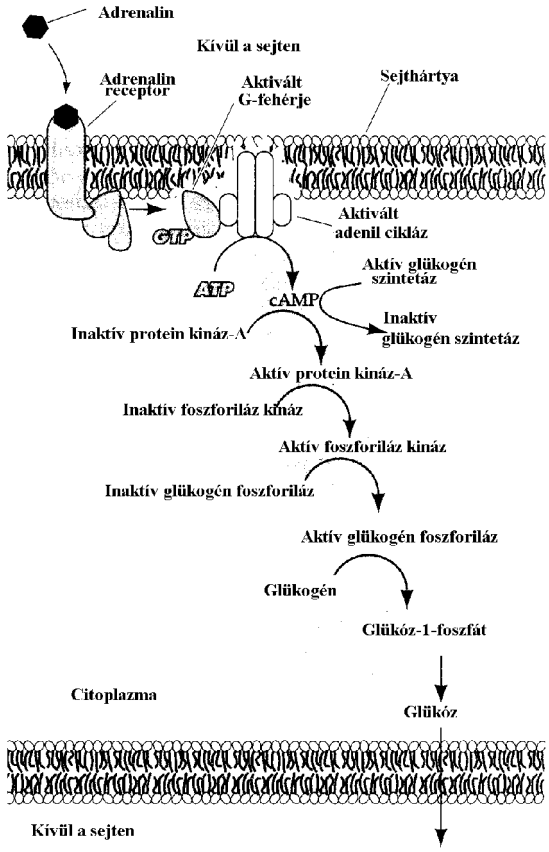


21.8. ábra. A szteroid hormonok hatásának sematikus ábrázolása.

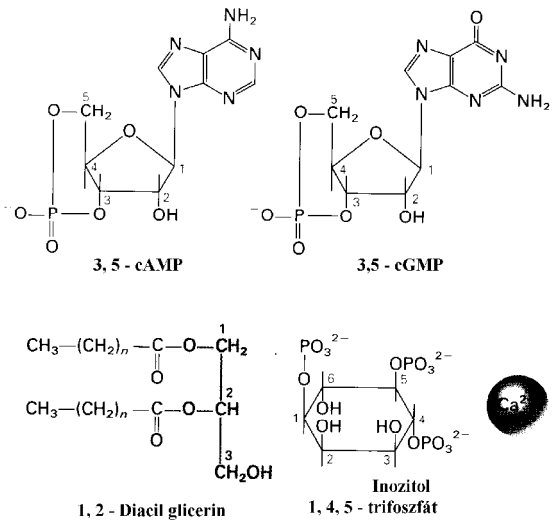
1. A lipidoldékony hormonok (mint pl. a szteroid hormon molekulák) könnyen átdiffundálnak a sejthártyán (21.8. ábra; lásd a 14. fejezetet). Ha vannak a sejt citoplazmájában ún. szteroid hormon receptor fehérje molekulák, szteroid hormon-szteroid hormon receptor komplexek képződnek (lásd a 14.14. ábrát). A komplexek a sejtmagba importálódnak, ahol transzkripciós faktorként viselkednek: a DNS specifikus szekvenciáival kapcsolódva bizonyos géneket be-, más géneket kikapcsolnak. Végeredményben a szteroid hormon megváltoztatja a sejtek expressziós mintázatát, és az egész élőlény jellegét. Természetesen csak az ún. *kompetens* sejtek képesek reagálni a szteroid hormonokra. Azok a sejtek kompetensek, amelyek citoplazmájában vannak szteroid hormon receptorok. A szteroid hormonok alapvető fontosságúak a nemi jelleg kialakításában és fenntartásában, a szénhidrát anyagcserében, a sóháztartásban és a rovarok vedlésében is.

2. A vízoldékony hormon molekulák nem tudnak átdiffundálni a sejthártyán. A kompetens sejtek felszínén hormon-specifikus receptorok vannak. (21.9. ábra; lásd a 14.15. ábrát). A receptorok transzmembrán fehérjék sejten kívülre érő részei. A hormon molekula egyfajta *ligand*. Olyan molekula, amely specifikus sejtfelszíni receptorral képes kapcsolatot teremteni. A legegyszerűbb esetben a ligand-receptor kapcsolat nyomán megváltozik a transzmembrán fehérje szerkezete, és sejthez hormon formájában érkezett „hír", információ a *szignál-transzdukicó* során a sejten belülre jut. (Bonyolultabb esetekben a ligand-receptor kölccsönhatást követően a receptor fehérje molekulák komplexei képződnek, amelyek lefűződnek a sejthártyáról és a citoplazmába kerülnek, hogy hatásukat ott fejtsék ki.) A receptor fehérje változása nyomán az információ a G-fehérje komplexekre tevődik át (21.9. ábra). A G-fehérje előbb GTP-vel kapcsolódik, majd a G fehérjéből kiválik a GTP-vel kapcsolódott alegység, és adenil cikláz enzim molekulákat aktivál. Az adenil cikláz ATP-ből ciklikus AMP (cAMP) molekulákat készít (lásd a 13.9. ábrát).

A cAMP az ún. *másodlagos hírvivők* jellegzetes példája (21.10. ábra). A másodlagos hírvivők az elsődleges hírvivők (a hormonok) nyomán képződő olyan molekulák, amelyek jeleket továbbítanak a sejteken belül. A másodlagos hírvivők a jeleket három helyre továbbíthatják. (i) A sejtmagba, áthangolva a sejt génexpressziós mintázatát (lásd a 14.15. ábrát). (ii) A citoplazmába, mint pl. az adrenalin esetében, hogy az adrenalin receptort tartalmazó májsejtekből - különféle enzimatikus reakciók nyomán - glükóz kerüljön a vérkeringésbe (21.9. ábra). (iii) A sejthártyákba épült ioncsator-nákhoz, hogy azok nyitásával megváltozzon a membránpotenciál. (Lásd a 26. fejezetet.)



21.9. ábra. Az adrenalin hatásmechanizmusa a vízoldékony hormonok hatásának jellegzetes példája.



21.10. ábra. A másodlagos hírvivők.

A szignáltranszdukció eseményei kaszkádszerűen követik egymást. Egy receptor molekula több G-fehérjével kapcsolódik. Egy G-fehérje alegység több adenil cikláz enzimet aktivál. Egy adenil cikláz sok cAMP molekulát készít, stb. A szignáltranszdukciós kaszkád ismeretében értető, hogy a hormonok nagyon kis koncentrációban (10^{-8}-10^{-12} mol/l) hatnak.

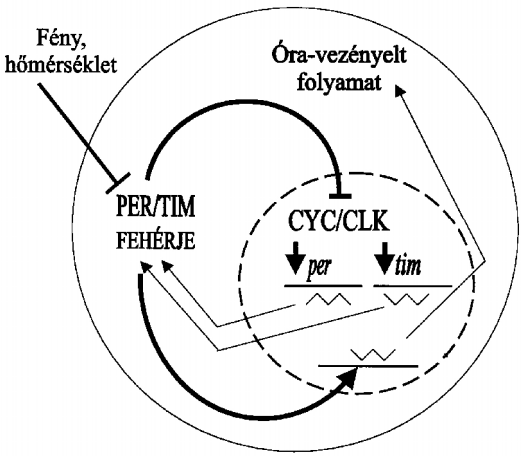
Az elmúlt években derült arra fény, hogy ugyanazt a receptor fehérjét az élőlények különböző fajai más-más szignáltranszdukciós kaszkádban használják. A legközismertebb példa a prolaktin/prolaktin receptor rendszer. A prolaktin az emberben a tejtermelést és a tejelválasztást (nőkben), valamint a herék hormon-termelését (a férfiakban) serkenti. Lazacokban az ozmotikus egyensúlyt biztosítja, midőn a lazacok tengervízből édesvízbe vagy fordítva vándorolnak. A prolaktin a békákban szaporodási reakciót indukál, a galambokban pedig serkenti a begytej elválasztást. Sőt az is ismert, hogy egyazon ligand-receptor pár egy szervezeten belül a sejttípustól függően különféle reakciót képes véghezvinni.

Belső óra és a napi ritmus

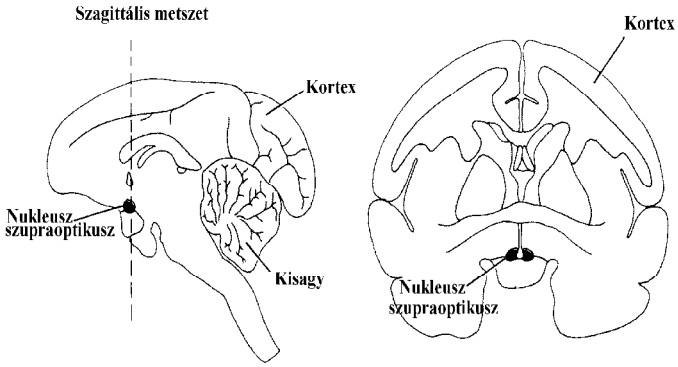
Mindannyiunknak természetes életünk szabályos ún. *napi ritmust* követő folyása. A napi ritmust szabályozó ún. *belső óra* molekuláris mechanizmusra a genetikai boncolás módszere alapján derült fény az 1980-as években. A kísérletsorozat gondolatmente a következő. A muslicák életében is van napi ritmus. Ha napi ritmus genetikai szabályozás alatt áll, úgy a szabályozó gének funkcióját mutációkkal meg lehet szüntetni. A mutációra homozigóta muslicák életéből hiányozni fog a napi ritmus, őket fel lehet ismerni. Az itt említett elv alapján mutagenezis kísérletekben mutációkkal azonosították a muslica *period* (*per*) és *timeless* (*tim*) ún. óragénjeit, valamint a *cycle* (*cyc*) és a *clock* (*clk*) géneket, amelyek az óragének funkcióját szabályozzák (21.11. ábra). Az óragének termékei egyrészt gátolják a *cyc* és a *clk* gének expresszióját, másrészt olyan gének funkcióját szabályozzák, amelyek – a hormonális rendszer révén – napi ritmust mutató életfolyamatokat irányítanak. Annak az oszcillátornak, amely az óragének aktivitását meghatározza, 24 óra a periódus ideje. Ismertek azok a környezeti tényezők is - mindenek előtt a fény, de a hőmérséklet is -, amelyek úgy szabályozzák a belső órát és a napi ritmust, hogy módosítják a Per és a Tim fehérjék aktivitását.

A muslica és a *Neurospora crassa* penészgomba napi ritmusát szabályozó gének ismeretében izolálták az egér és az ember óragénjeit. Arra is fény derült, hogy a belső óra alapvető mechanizmusa a különféle fajokban lényegében azonos. Azt is meghatározták, hogy az óragének mely sejtekben expresszálódnak. Emberben a belső óra a nucleus supraopticusban "ketyeg" (21.12. ábra), szabályozza a *melatonin* hormonnal, a hipotalamuszon, az agyalapi mirigyen és a hormonrendszeren keresztül az élőlények napi ritmusát. (A melatonint, a napi életritmust szabályozó hormont, a gyógyászatban is alkalmazzák.)

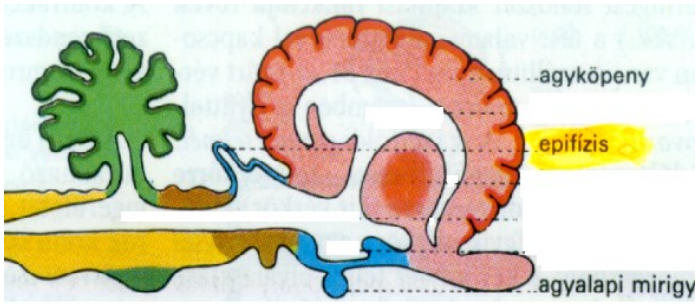
A belső óra fénnyel történő szabályozását az az ún. parietális szem (tobozmirigy vagy epifízis) biztosítja, amely a hüllők sok fajában jól felismerhető (21.13. ábra). A belső óra funkcióját fénnyel is lehet állítani. (A Per fehérje élettartama magyarázza azt a tényt, hogy az élőlények belső órája sötétben is napokon át biztosítja a napi ritmust.) A belső óra az alapja az élőlények olyan csodálatra méltó képességének, mint pl. a postagalambok hazataláló képessége vagy a madarak vándorlása.



21.11. ábra. A belső óra „lelke” egy olyan oszcillátor, amely a *per* és *tim* óragének, és az ő expressziójukat szabályozó *cyc* és *clk* gének, illetve termékeik között fennáll. Az oszcillátor „kicsatolásai” – lényegében a Per és a Tim fehérjék - további gének expresszióját szabályozzák, maghatározva az életfolyamatok napi ritmusát. A Per és a Tim fehérjék, közvetve pedig a belső óra aktivitását, a környezeti feltételekhez lehet „állítani”.



21.12. ábra. Az ember belső órája a nukelusz szupraoptikuszban van.



21.13. ábra. Sok hüllőfajban az epifízis szemként funkcionál és szabályozza a belső órát.

ÖSSZEFOGLALÁS

A soksejtű élőlények a testüket alkotó sejtek közötti belső harmónia megteremtésére olyan rendszert fejlesztettek ki, amely "lassú" komponense - a hormonális rendszer - kevés molekulával és nagyon hatékonyan visz üzenetet valamely központból a test távoli részeibe. A sejtekben olyan, a különféle receptorok használatán alapuló rendszerek működ-nek, amelyekkel a sejtek "veszik" az üzeneteket, és úgy hangolják át funkcióikat, hogy az egész szervezetnek hasznos legyen. A hormonrendszer a környezethez való alkalmazkodás fontos eszköze, szoros összhangban az idegrendszerrel. Nyilvánvaló, hogy a hormonok nemcsak az állatvilág, hanem a növények és - különösen a feromonok - az alacso-nyabb rendű élőlények életét is szabályozzák.

FORRÁSOK

1. Purves, W.K. és mtsi., Life the Science of Biology, 823-856, 1095-1097 és 1100-1108, 1998.
2. Alberts és mtsi., Essential Cell Biology, 481-512, 1998.
3. Dunlap, J.C., Common threads in eukaryotic circadian systems. Current Opinion in Genetics and Development, **8**, 400-406, 1998.
4. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology, 848-909, 2000.

22. A SEJTCIKLUS GENETIKAI SZABÁLYOZÁSA.

Sejtméret. A sejtciklus szakaszai. Kontroll pontok és szabályozó tényezők. Kromoszóma-, citoplazma- és a centroszóma ciklus. A *cdc* mutációk és jelentőségük. Ciklinek és Cdk-k. Telomeráz és a sejtek öregedése.

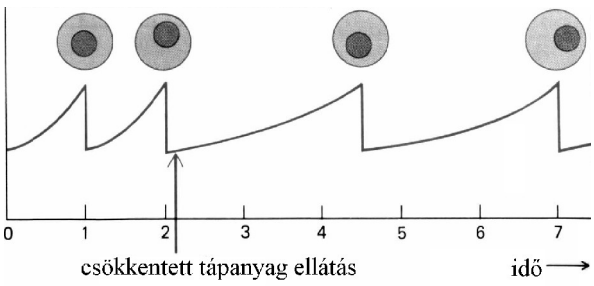
A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán.

BEVEZETÉS

A soksejtű élőlények testét alkotó sejtek nagyon sok sejtosztódás eredményeként jönnek létre. Egy felnőtt ember testében minden másodpercben milliónyi új sejt képződik. A leánysejtek nagyon hasonlítanak az anyasejthez: ugyanannyi kromoszóma és centroszóma van bennük, és többnyire osztoznak az anyasejt citoplazmáján. A sejtosztódások folyamán a sejtek ugyanazokat az eseményeket ismétlik: a sejtek életének van egy ciklusa, az ún. sejtciklus. Mi szabja meg a sejtek méretét? Honnan tudják a sejtek, hogy osztódniuk kell? Hogyan kétszerezik meg kromoszóma állományukat és osztják szét "igazságosan" a leánysejtek között? Melyek azok a molekuláris tényezők, amelyek a sejtosztódások ciklikus menetét szabályozzák? Hogyan lehet megismerni a sejtciklust szabályozó tényezőket? Meddig osztódnak a sejtek? Van kapcsolat a sejtosztódások és az élőlények öregedése között? A jelen fejezet célja az, hogy az itt felsorolt kérdésekre válaszoljon.

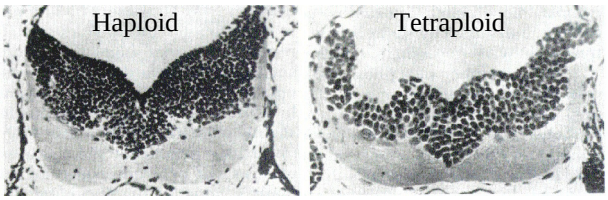
A sejtek mérete és osztódása közötti kapcsolat

Közismert, hogy a sejtek mérete egy osztódást követően növekszik (22.1. ábra). Ha térfogatuk elér egy maximális értéket, a sejtek osztódnak. Az osztódást a sejt mérete határozza meg, nem pedig a tápanyag-ellátottság mértéke (22.1. ábra). (Zárójelben jegyezzük meg, hogy vannak kivételek. Közismert példa a béka zigóták ún. hasadási osztódása, amely során a sejtek térfogata osztódásonként felére csökken.)



22.1. ábra. Miután térfogatuk maximális értéket ért el, a sejtek osztódnak. Az osztódás kezdete csak a sejt méretétől függ. Független a tápanyag-ellátottság mértékétől.

Honnan "tudják" a sejtek, hogy mekkorára nőhetnek, illetve milyen méret elérése után kell osztódniuk? Bár a pontos válasz nem ismert, úgy tűnik, hogy a sejtekben konstitutívan expresszálódik egy *A* gén, amely terméke gátolja a *B* gén expresszióját. (Az *A* gén terméke nem örökéletű. Valamennyi idő elteltével lebomlik.) *B* gén terméke a sejtosztódás elkezdő-déséhez szükséges. A sejt növekedése során az *A* gén termékének koncentrációja fokozatosan csökken, majd miután egy kritikus érték alá esik, megszűnik a *B* génre kifejtett gátló hatása. A *B* gén expressziója nyomán kezdődhet el a sejtosztódás. A fenti elképze-lés helyességét az a megfigyelés is alátámaszthatja, hogy pl. a haploid szalamandrák utóagyát sokkal több kis sejt alkotja, mint ahány nagy sejt van a tetraploid szalamandrák

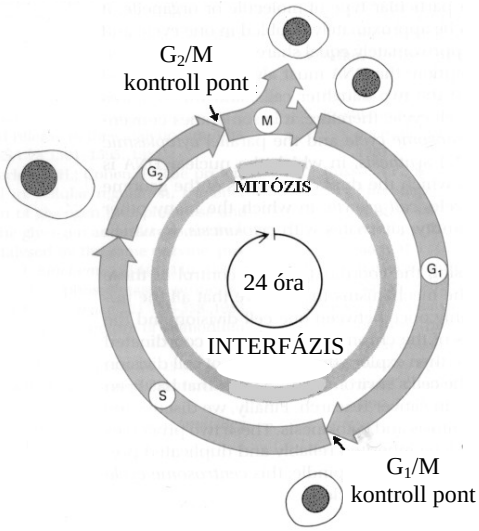


utóagyában (22.2. ábra).

22.2. ábra. A haploid szalamandrák utóagyában (baloldalon) a kis sejtek nagyjából ugyanakkora területet töltenek ki, mint a tetraploid szalamandrák nagy sejtjei (jobboldalon).

A sejtciklus szakaszai

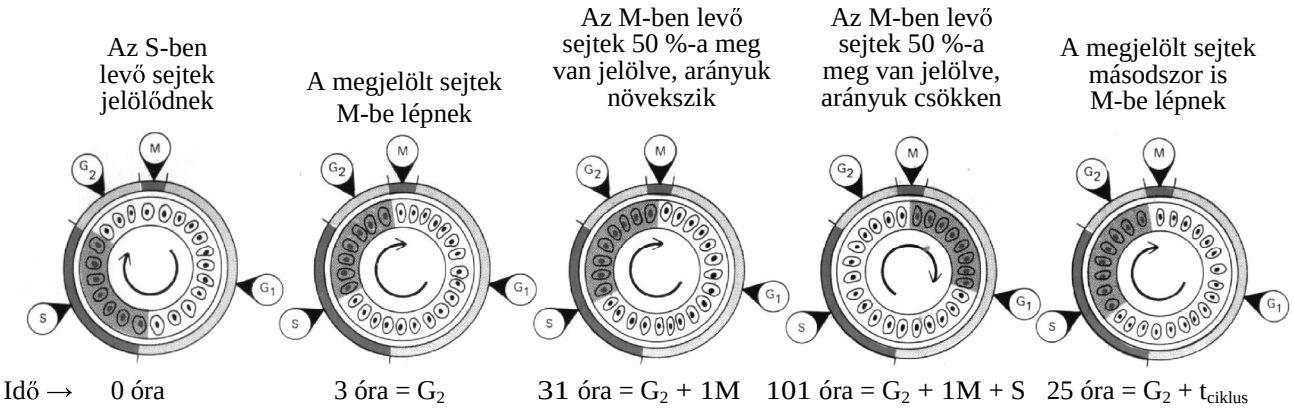
A sejtciklus azt jelenti, hogy a sejtek életében az osztódások és az osztódásra készülődések szakaszai periodikusan követik egymást. A sejtciklus osztódás fázisát, a mitózist, M-el jelölik (22.3. ábra). A két mitózis közötti szakaszt *interfázisnak* nevezik. Az interfázis talán legfontosabb szakasza az S, vagy szintézis szakasz, amely során a kromoszómák a DNS replikációja nyomán megkettőződnek. Az M és az S fázisokat a G (angolul gap) szakaszok választják el: az M és az S között a G_1, az S és az M között a G_2 (22.3. ábra). A G_1 olykor nagyon hosszúra nyúlik, mint pl. az idegsejtek esetében. A hosszúra nyúlt G_1-et szokás G_0-al jelölni. (Megjegyezzük, hogy pl. a béka embriók hasadási osztódásai jószerivel csak M és S fázisokból állnak.)



22.3. ábra. A sejtciklus szakaszai. Két M közötti szakasz, az interfázis G_1, S és G_2 szakaszokra oszlik.

A G_1/S valamint a G_2/M átmenetek a sejtciklus fontos szabályozási pontjai.

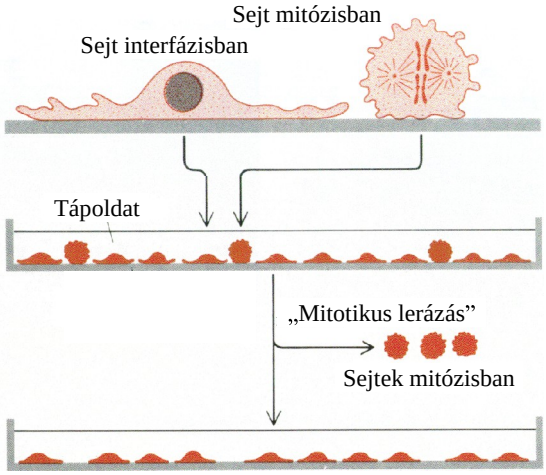
A sejtciklus egyes szakaszainak időtartamát szellemes módszerrel állapították meg (22.4. ábra). Egy ún. pulzus jelölés során ^{3}H-timidint adtak rövid időre olyan sejttenyészethez, amelyben a sejtek a sejtciklus különböző szakaszaiban voltak. A ^{3}H-timidin csak az éppen replikálódó DNS-nek válik alkotójává, és lényegében csak az S fázisban levő sejtek jelölődnek. Miközben a sejtek élték életüket, a sejttenyészetből mintákat vettek, és kromoszóma preparátumokat készítettek. A preparátumokat az autoradiográfia módszerével vizsgálták. G_2-nyi idő multán válik a ^{3}H-timidinből eredő jel az M fázisú sejtek részévé. G_2 + M idő elteltével valamennyi, az M fázisban levő sejt tartalmaz jelölést. És így tovább. Annak az időnek a meghatározásával, amely ahhoz szükséges, hogy a jelölés újból az M fázisú sejtek részévé váljon, illetve, hogy a jelölés elhagyja az M sejteket, meghatározható a sejtciklus egyes szakaszainak hossza. Az ember eredetű sejtek tenyészetében a G_2, az M, az S és a G_1 szakaszok hossza rendre kb. 3, 1, 7 és 11 óra, nagyjából egy nap. A különféle sejttípusok esetében elsősorban a G_1 szakasz időtartama széles határok között változik.



22.4. ábra. Módszer a sejtciklus szakaszok hosszának megállapítása.

Sejtfúziók; SPA, MDF, re-replikációs blokk és MPF

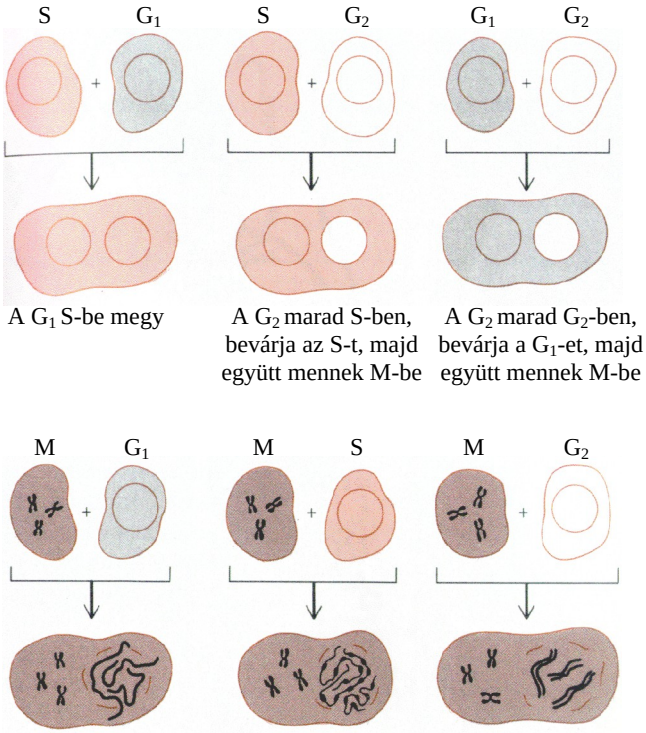
Arra a tényre, hogy sejtciklus egyes szakaszi jól elhatárolhatók, és bennük jellegzetes események történnek, az ún. sejtfúziós kísérletekből derült fény. A kísérletek során olyan sejteket fuzionáltak, amelyek-ben a sejtek a sejtciklus különböző stádiumaiban voltak, majd a fúzió után a két sejtmag viselkedését tanulmányozták. A sejtfúziós kísérletekhez olyan ún. szinkron sejttenyészetekre van szükség, amelyekben a sejtek a sejtciklus azonos stádiumában vannak. A sejttenyészet szinkronizálásának alighanem legegy-szerűbb módja az ún. "mitotikus lerázásos" módszer (22.5. ábra). A módszer lényege az, hogy az M fázisú sejtek legömbölyödnek, és alig tapadnak a tenyész-dény aljához. Rázással könnyen elkülöníthetők az interfázisban levő sejtektől (22.5. ábra). A sejtciklus szakaszok hosszának ismeretében lehet olyan sejttenyészetet készíteni, amelyben minden sejt pl. S fázisban van.



22.5. ábra. A sejtciklus M fázisában levő sejtek legömbölyödnek, és könnyen elválaszthatók az interfá-zisban levő sejtektől, amelyek az edény aljához tapadnak.

Nos, a G_1 és az S-fázisú sejtek fúziója után a G_1-es sejt S fázisba lép. Akkor is, ha éppen befejezte az M fázist. A G_1+S fúziós kísérletek eredményei azt mutatják, hogy az S-fázisú sejtek citoplazmájában olyan tényező van, amely az S fázis elkezdődéséhez és fenntartásához szükséges. A citoplazmatikus faktor neve *SPA*, S fázis aktivátor (angolul S phase activator). Normális körülmények között a G_1 stádiumú sejtek addig vesztegelnek a G_1/S fázis határán, amíg bennük SPA képződik. Mivel a G_1/S határ szerepe kitüntetett a sejtek életében, *restrikciós pontnak* (élesztőkben *start*) nevezik, hisz' lényegében a sejtciklus olyan szabályozási pontja, ahol a sejtciklus megállítható, ahonnan indítható (22.3. ábra). A G_1/S határon "átlendült" sejtek befejezik az S fázist, és eljutnak a következő szabályozási pontig, a G_2/M határig.

Különös, hogy ha egy S-stádiumú sejtet G_2 stádiumúval fuzionáltatnak, a G_2-ben levő sejt megmarad a G_2 stádiumban, nem hat rá az SPA. (Az S-ben levő sejt befejezi az S és a G_2 fázisokat, majd a két sejtmag együtt lép az M fázisba). A G_2 + S fúziós kísérletek eredményei azt jelzik, hogy (i) a G_2 sejtekben van egy olyan tényező, amely megakadályozza, hogy a kromoszómák újból replikálódjanak. A jelenség a *re-replikációs blokk*, értelme pedig az, hogy az S fázis során a kromoszómák egyszer, és csakis egyszer replikálódjanak. A re-replikációs blokkért felelős tényezőket bár nem ismerjük, biztos, hogy a kromoszómákhoz kötöttek. (ii) A G_2+S fúziós kísérleteknek van egy további fontos tanulsága. A G_2 stádiumú sejtek addig maradtak a G_2 stádiumban, amíg a velük fuzionált S társsejtek fel nem zárkóztak hozzájuk, el nem érték a G_2/M határt. Bizonyosra vehető, hogy az S sejtekben van egy citoplazmatikus tényező, az *MDF*, a mitózis késleltető faktor (angolul mitosis delaying factor), amely megakadályozza, hogy a G_2 sejt idő előtt az M fázisba lépjen (22.3. és 22.6. ábrák).



A G_1 S-be megy

A G_2 marad S-ben, bevárja az S-t, majd együtt mennek M-be

A G_2 marad G_2-ben, bevárja a G_1-et, majd együtt mennek M-be

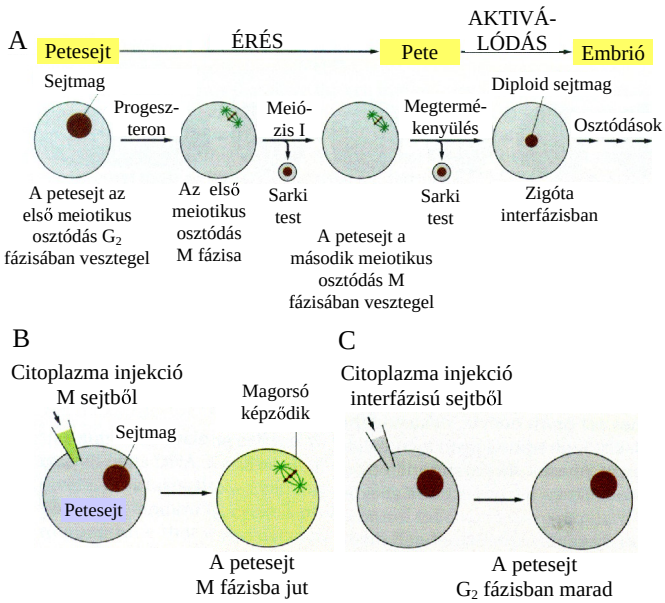
A G_1, az S és a G_2 sejtek M-be mennek.
A kromoszómák idő előtt tömörödnek.

22.6. ábra. A sejtciklus különféle stádiumaiban levő sejtek sorsának alakulása a sejtek fúziója után.

Nagy meglepetést keltettek azok a kísérletek, amelyekben M fázisú sejteket fuzionáltattak a sejtciklus más stádiumaiban levő sejtekkel (22.6. ábra). Az M sejtekkel fuzionáltatott sejt, lett légyen az G_1, S vagy G_2 stádiumú, rövidesen az M fázisba lépett. Azt a faktort, amely az M fázisú sejtek citoplazmájában van és mitózist indukál *MPF*-nek, mitózist promótáló faktornak nevezik.

Az MPF neve korábban maturáció promótáló faktor volt. Azért, mert az MPF segíti az éretlen petesejtek érését, maturációját (22.7. ábra). A *Xenopus laevis* békafaj petéinek képződése során az elsődleges oociták az első meiotikus osztódás G_2 stádiumában vesztegelnek. Progeszteron hatására megérnek: befejezik az első meiotikus osztódást, és eljutnak a második meiotikus osztódás metafázisába, ahol fejlődésük ismét "elakad" (22.7. ábra). A második meiotikus osztódás a megtermékenyülést követően fejeződik be, majd rövidesen elkezdődik az embriógenezis, az ún. hasadási (angolul: cleavage) osztódások sorozatával. Ha a meiózis-II metafázisban veszteglő másodlagos oocita citoplazmájának kis részét a meiózis-I G_2 stádiumban veszteglő elsődleges oocitába injektálják, a G_2-ben veszteglő sejt megérik, és progeszteron nélkül is eljut a meiózis-II metafázisába (22.7. ábra). Azért, mert a másodlagos oocita citoplazmájában MPF van. A G_2-ben veszteglő *Xenopus* elsődleges oocita tehát alkalmas rendszer MPF kimutatására: bármely fajból származó MPF kiválóan helyettesíti a *Xenopus* MPF-et.

Lényegében tehát a sejtek életében mitózisok és interfázisok ismétlődnek. A sejtciklus folyását és irányát citoplazmatikus (MPF, MDF, MPF) és kromoszómákkal kapcsolódó tényezők (re-replikációs blokk) biztosítják. A tényezők molekuláris természetének megismeréséről később szólunk.



22.7. ábra. (A) A *Xenopus* oociták fejlődésének fontosabb "állomásai". (Részletesen lásd a szövegben.) (B) Ha az injektált citoplazma tartalmaz MPF-et, az elsődleges oocita megérik, és eljut a meiózis-II metafázisáig. (C) Ha nincs az injektált citoplazmában MPF, a Xenopus elsődleges oocita a meiózis-I G_2 stádiumában vesztegel.

A kromoszóma ciklus

Az ismétlődő sejtciklusok során tökéletes harmóniában történnek az események. Az áttekinthetőség kedvéért szokás a sejtciklust (i) kromoszóma, (ii) centroszóma és (iii) citoplazma ciklusokra tagolni.

(i) A kromoszóma ciklus lényegében a DNS replikációját, leánykromatidák képződését, valamint a kromoszómák igazságos elosztását jelenti a mitózis során a leánysejtek között. (A replikációról és a sejtosztódásokról egy korábbi fejezetben szóltunk.) A replikáció az S fázis folyamán történik. A DNS replikációja mind pro- mind eukariotákban szemikonzervatív módon történik, és két irányban halad a DNS mentén. A replikáció sebessége prokariotákban kb. 500, eukariotákban kb. 50 nukleotid másodpercenként. Prokariotákban egyetlen helyen kezdődik, az ún. replikációs origóban, nem messze attól a helytől, ahol a kromoszóma a sejthártyához kapcsolódik. Eukari-otákban a replikáció egyszerre több ponton kezdődik. Az S fázis kezdetén elsőként a "háztartási gének" DNS-e replikálódik, mert ott a DNS polimeráz kényelmesen hozzáférhet a DNS-hez. A heterokroma-tin és a Barr test kondenzált kromatinja az S fázis vége felé replikálódik. Annak a kb. $3x10^5$ bp-ből álló génkomplexnek a replikációja, amely egyfajta immun-globulin szintézisét kódolja, egyszerre több ponton kezdődik az S fázis kezdetén azokban a sejtekben, amelyek az ellenanyagok szintézisében szorgoskod-nak. Azokban a sejtekben viszont, amelyekben a fenti gén nem expresszálódik, a gén replikációja az S fázis vége felé történik meg, egy olyan pontból kiindulva, amely a génen kívül van. Egy biztos: az S fázis során minden kromoszómális DNS szakasz egyszer, és csakis egyszer replikálódik.

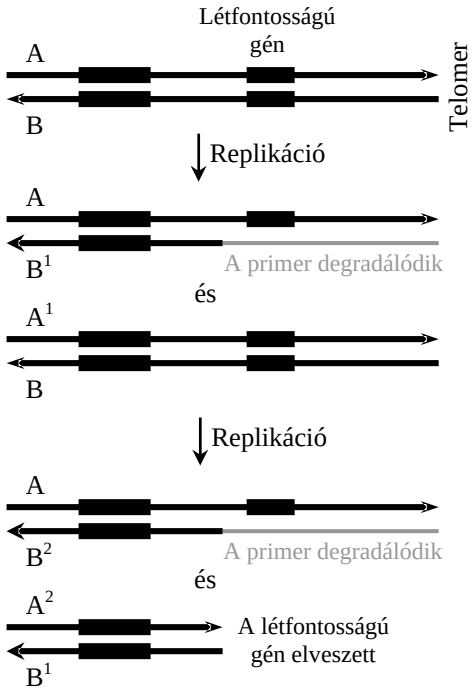
A replikáció befejeztével kezdődhet csak a sejtciklus G_2 szakasza. A G_2 fázisban a kromatin szuperteker-cselődik, elkezdődik a sejtosztódások során megismert metafázisos kromoszómák kialakulása.

Vajon vannak olyan DNS szakaszok, ahol a DNS replikációja elkezdődik? Egy kísérletsorozatban élesztő DNS-hez DNS polimerázt adtak. Bár a polimeráz a DNS-hez kötődött, a replikáció nem kezdődhetett el, mert a rendszer nem tartalmazott deoxi nukleotid trifoszfátokat. A rendszerbe most DNS-t bontó endonukleáz enzimet tettek. A DN-áz a DNS minden olyan szakaszát elbontotta, amelyet a polimeráz nem védett meg. Az enzimek inaktiválása és eltávolítása után a megmaradt DNS szakaszokat szekvenálták. Kiderült, hogy az élesztőkben van egy 11 bázispárból álló ún. autonom módon replikálódó szekvencia (ARS), ahol a DNS replikációja elkezdődik. Az ARS konszenzus szekvencia a következő: A(T)TTTATA(G)TTTA(T). Nem véletlen, hogy az ARS - a TATA boxhoz hasonlóan - A=T bázispárokban gazdag. Az ARS-eknél választható szét könnyen a DNS két szála, kezdődhet a replikáció. Az ARS szekvenciák a DNS kb. 100 bázispárnyi szakaszán csoportosulnak, és egy replikációt iniciáló fehérje ismeri fel őket.

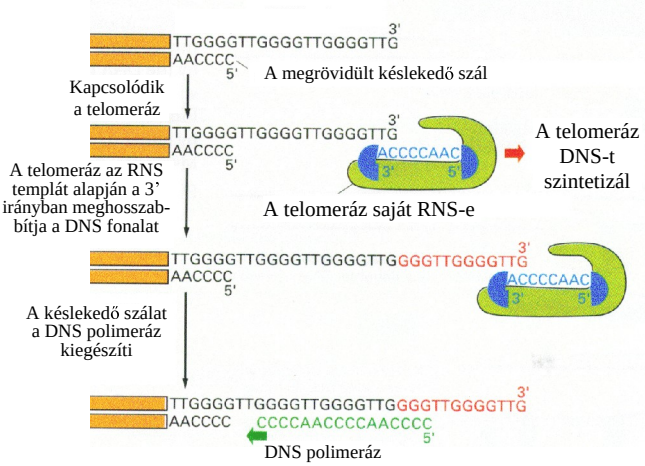
A telomer rövidülés

Az eukarioták kromoszómáiban a DNS fonalak nem zárulnak gyűrűbe. A replikáció mechanizmusának ismeretében arra lehet számítani, hogy az ismétlődő replikációk során a késlekedő szál egyre rövidebb lesz, és az egymást követő replikációk során a kromoszómák rövidülnek. A kromoszómák rövidülése során létfontosságú gének veszthetnek el, ami miatt a sejtek elpusztulnak (22.8. ábra). A kromoszómák végein levő telomerek funkciója a rövidülés megakadályozása, illetve a telomer rövidülés révén a sejtek élettartamának szabályozása (22.9. ábra).

A telomerekben egy rövid DNS szekvencia (emberben GGGTTA) tandem módon ismétlődik. A telomer rövidülést az ún. *telomeráz* enzim küszöböli ki. A telomeráz a szülői szálhoz kapcsolódik, és azt 5'→3' irányban meghosszabbítja (22.8. ábra). Templát szál hiányában telomeráz úgy szintetizálja meg az ismétlődő egység újabb darabját, hogy közben templátként azt az RNS-t használja, amely része a telomeráznak (22.8. ábra). Lényegében tehát a telomeráz tartalmazza azt az RNS-t, amely a telomer szekvencia szintéziséhez szükséges. A telomeráz tevékenység nyomán a szülői szál annyira hosszabbodik meg, hogy a DNS polimeráz kiegészítheti a késlekedő szálat (22.8. ábra).



22.8. ábra. A telomer rövidülés nyomán gének vesznek el.



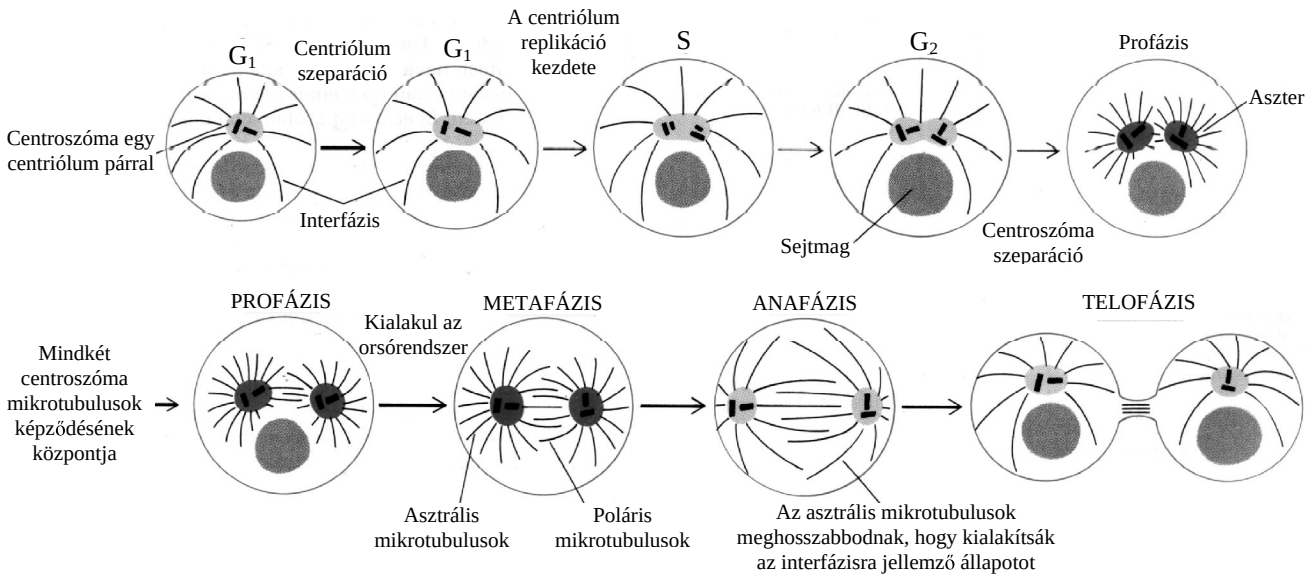
22.9 ábra. A telomer replikációjának mechanizmusa.

A telomeráz hiányzik a testi sejtek bizonyos típusaiból. Bennük a sejtosztódások előrehaladtával fokozatosan rövidülnek a telomerek. A telomer hossz egyben megszabja a lehetséges sejtosztódások számát is. A sejt élete akkor ér véget, amikor a DNS rövidülése a telomer mögé ér, és a DNS-ből létfontosságú funkciójú gének vesznek el. A *telomer rövidülés* az öregedés egyik fontos tényezője. A telomeráz gén expresszálódik az őssejtekben, valamint a csírasejtekben, amely sejtek a differenciálódott és elpusztult sejteket pótolják. A csírasejtek tehát korlátlan számú osztódásra képesek. Sajnálatos módon a telomeráz enzim funkcionál a tumor sejtekben is, biztosítva azok korlátlan osztódását.

A centroszóma és a citoplazma ciklus

A centroszóma ciklus lényegében azt jelenti, hogy a sejtben olyan "szerkezetek" képződnek, amelyek biztosítják a replikálódott kromoszómák elrendeződését a sejt egyenlítői síkjában, a kromoszómák szegregációját a mitózis végén, valamint a leánysejtek elkülönülését. A mitózisban alapvető fontossága van a centroszómáknak, amelyek szervezik a mikrotubulusokból álló magorsófonal-rendszer kialakulását (22.10. ábra).

A sejtek a rájuk jellemző funkciót az interfázis folyamán végzik. A sejtciklus mitózis szakaszában a sejtek csak az osztódással közvetlenül kapcsolatos funkciókat látják el. (Azok a sejtek, amelyek nem függeszthetik fel funkciójukat nem is osztódnak. A szívizom sejtek végigkísérnek bennünket életünk végéig. Vannak sejtek, amelyek poliploidokká válnak, ismét más sejtek - mint pl. a muscica nyálmirigy sejtjei - politenizálódnak, miközben bennük óriáskromoszómák képződnek.)



22.10. ábra. A centroszóma ciklus eseményei.

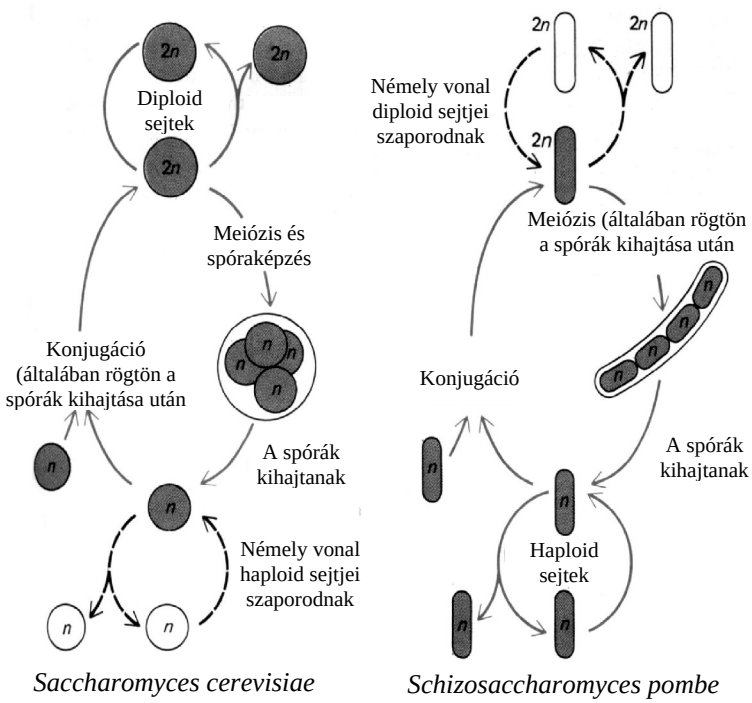
A citoplazma ciklus során az anyasejt citoplazmája a leánysejtek között oszlik meg. Úgy, hogy mindkét utódsejtbe kerül centroszóma vagy pl. mitokondriumok.

A sejtciklus genetikai boncolása

Hogyan lehetne megismerni az SPF, az MPF és a sejtciklus további szereplőinek molekuláris természetet? A megoldást két élesztőfaj és az ún. genetikai boncolás módszere jelentette. Az élesztők azok az egysejtű eukariota élőlények, amelyekkel a sejtciklus kényelmesen követhető (22.11. ábra). Ha a sejtciklus folyását szabályozó tényezők fehérjék, az őket kódoló géneket mutációkkal azonosítani lehet. A szabályozó tényezőkben indukált, a funkció vesztésével járó mutációk következményeként a sejtek életképtelenek. Az ún. kondicionális letális mutációkkal viszont egyszerűen lehetett azonosítani a sejtciklus szabályozásában részvevő, ún. *cdc* géneket. (Angolul cell-division-cycle, *cdc*.) [A kondicionális letális mutáció azt jelenti, hogy a mutánsok permisszív (megengedő, az életfolyamatokat lehetővé tevő) környezeti feltételek mellett, pl. 25 ^{o}C-on, életben maradnak és osztódnak. Restriktív körülmények között viszont, pl. 37 ^{o}C-on, elpusztulnak. Az is várható, hogy a sejtciklus génjeikben mutáns élesztők fejlődése restriktív hőmérsékleten a G_1/S illetve a G_2/M határon áll meg. Azon pontok valamelyikén, amelyeknek szerepe van a sejtciklus szabályozásában. Mutage-nezis kísérletek során ki lehetett válogatni az élesztő fajok ún. *cdc* mutánsait. A *cdc* mutánsok lényegében eszközök: olyan géneket azonosítanak, amelyeknek szerepe van a sejtciklus szabályozásában. Hogyan lehetne megismerni a *cdc* mutációkkal azonosított gének molekuláris funkcióit?

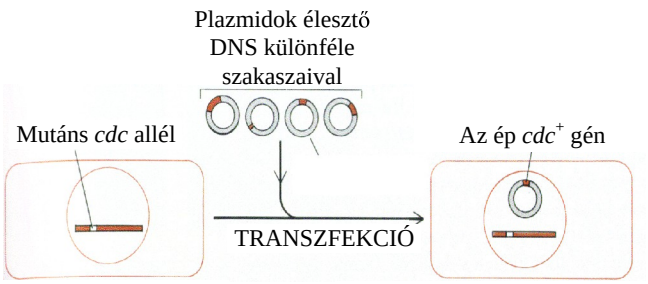
Készítsük el valamely *cdc* mutáns élesztő sejtek tenyészetét (22.12. ábra). Vigyünk az élesztő sejtekbe (transzfekcióval) plazmidokat. Tartalmazzák a plazmidok az élesztő genom különböző szakaszait. Tegyük az élesztő tenyészetet restriktív hőmérsékletre. Nyilvánvaló, hogy csak az olyan élesztő sejtek fognak

osztódni, telepeket képezni, amelyek a plazmidban tartalmazzák a *cdc* mutációnak megfelelő ép (cdc^+) gént (22.12. ábra). Ezek az élesztő sejtek elszaporíthatók, belőlük izolálhatók a plazmidok, a plazmidokból kinyerhető a cdc^+ gént tartalmazó DNS szakasz, majd megismerhető a gén molekuláris funkciója. Az élesztő cdc^+ gének ismeretében derült arra fény, hogy a cdc^+ gének evolúciósan erősen konzerváltak, csakúgy, mint a sejtciklus-szabályozás mechanizmusa.



Saccharomyces cerevisiae *Schizosaccharomyces pombe*

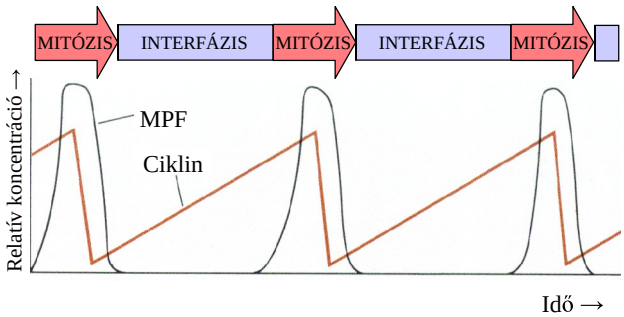
22.11. ábra. A sarjadzó (*Saccharomyces cerevisiae*), valamint a hasadó (*Schizosaccharomyces pombe*) élesztőgombák életciklusai.



22.12. ábra. Séma a *cdc* mutációkkal azonosított ép cdc^+ gének klónozására.

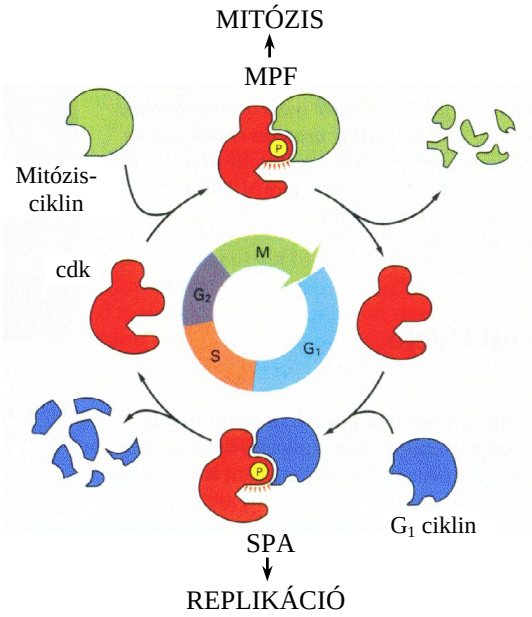
Sejtosztódás a molekulák tükrében

A fenti élesztő fajok *cdc* mutációiból kiindulva lehetett megismerni azokat a molekulákat, amelyek a sejtciklus szabályozás meghatározói. A hasadó élesztő *cdc13* jelű génje pl. egy olyan fehérjefeléséget kódol, amely koncentrációja ciklikusan változik a sejtciklus folyamán (22.13. ábra). Kézenfekvő, hogy a fehérjét *ciklin*nek nevezték el. A ciklinek koncentrációja az M fázis végén nagyon alacsony, az interfázis során fokozatosan emelkedik, majd a metafázistól kezdve rohamosan csökken (23.13. ábra.) A csökkenés oka az, hogy a ciklin molekulák N terminális vége közelében olyan jelt hordoznak, amelyet az ún. proteaszómák ismernek fel, hogy aztán és degradálják a ciklineket. (A proteaszómák olyan fehérje alegységekből álló komplexek, amelyek elbontják a fehérje molekulákat.) A *cdc13* ciklin a fő mitotikus ciklin, a ciklin család B jelű tagja. És nem csak az élesztők, hanem a többi ekariota fajban is. A hasadó élesztő *cdc2* (sarjadzó élesztőben *cdc28*) génjének terméke az ún. *ciklin-dependens-protein-kináz* (= Cdk) fehérje féleségek egyike. A Cdk-k folyamatosan jelen vannak a sejtciklus folyamán. A ciklinekkel kapcsolódva képez-nek olyan funkcionális fehérje komplexeket, amelyek más molekulák foszforilálása révén fejtik ki hatásukat (23.14. ábra). Emberben az SPA a Cdk4 és a ciklin D komplexe. A Cdk4/ciklin D foszforilálja pl. azokat a fehérjéket, amelyek aktivi-tása nyomán elkezdődik a DNS replikációja. Ember-ben az MPF a Cdk2 és a ciklin B komplexe. A Cdk2/ciklin B komplex kináz aktivitása nyomán szerelődik szét a sejtmaghártya, szuperteker-cselődik a kromatin, hogy metafázisos kromoszómák képződjenek. Az előző komplexek aktivitásának csökkenése nyomán a foszfatáz gének aktivitása nyer teret. A foszfatázok hasítják le a fehérjékről a kinázok által beépített foszfát csoportokat, hogy folytatódjon a sejtciklus.



22.13. ábra. A ciklin B koncentráció és az MPF aktivitás változása a sejtciklus során.

Nem meglepő, hogy a Cdk/ciklin komplexeknek szerepe kiemelkedő a daganatsejtek osztódásában. Bizonyos típusú emlőrák sejtek ciklin D koncentrációja túlságosan magas. Közismertek a funkcióneréses típusú mutáns ciklin molekulákkal kapcsolatosak daganatok. A mutáns ciklinek akkor is aktiválják a Cdk4-et, amikor az inaktív. A rákos daganatoknak kb. felében sérült az ún. p53-as gén funkciója. A p53 fehérje gátolja a Cdk4 aktivitását. A gátló hatás hiányában a Cdk4 az S fázisok beindítására a sejtciklus folytatására, osztódásokra készteti a sejteket, és végeredményben daganatok képződhetnek.



22.13. ábra. A sejtciklus szabályozásban résztvevő molekulák és szerepük a sejtciklus szabályozásában.

Az itt említett esetek példák a sejtciklus szabályozás olyan hibáira, amelyek a sejtosztódásra kifejtett gátló hatás megszűnésének következményei. Olyan sejtciklus hiányosságok is ismeretesek, amelyek következtében a sejtek elvesztik osztódó képességüket. A Werner szindrómás emberek egy olyan recesszív mutációra homozigóták, amely miatt sejtjeikbol hiányzik egy DNS helikáz enzim aktivitása (22. 14. ábra.) A helikáz az ép sejtekben a kromatint, illetve a DNS két szálát tekeri szét, megteremtve a replikáció lehetőségét. A Werner szindrómás emberek korán öregszenek, mert sejtjeik nem osztódnak. Az egészséges erekből izolált fibroblaszt sejtek tápoldatban akár ötvenszer is osztódhatnak (22.1 táblázat). A Werner szindrómás emberek fibroblaszt sejtjei viszont egyáltalán nem, vagy csak néhányat osztódnak.

22.1. táblázat. A különböző eredetű fibroblaszt sejtek osztódó képessége

A donor sejtek forrása	Hányat osztódnak a sejtek?
Magzat	~ 50
40. éves ember	~ 40
80. éves ember	~ 30
Werner szindrómás ember	≈ 0

Az a tény, hogy testünkben a sejtek nem korlátlanul osztódnak azt jelzi, hogy sejtjeink “tudnak egymásról”, kommunikálnak egymással: a sejtosztódásnak nemcsak sejten belüli szabályozói vannak, hanem bizonyosan sejten kívüliek is. A sejten kívüli tényezők közül az érintkező sejtek közötti kommunikáció, valamint a sejtosztódásokat serkentő hormonok és/vagy növekedési faktorok szerepe a legfontosabb. A sejtek közötti kommunikáció és a sejtosztódások kapcsolatának fontosságát bizonyítja az a tény, hogy a sejttenyészetekben mindaddig osztódnak a tenyészedény aljára letapadt sejtek, amíg szabad felület áll rendelkezésükre. A sejtosztódások megszűnnek az ún. *kontakt gátlás* nyomán, miután a sejtek kitöltötték a rendelkezésre álló felületet és érintkeznek egymással. A sejtek csak akkor kezdenek ismét osztódni, ha szomszédjaikat elvesztik (22.15. ábra). A kontakt gátlás jelentéségéről a következő fejezet szól bővebben.

22.14. ábra. Werner szindrómás ember.

22.15. ábra. Az egymással érintkező sejtek nem osztódnak, jelezve a sejtkommunikáció jelentőségét a sejtosztódás szabályozásában.

ÖSSZEFOGLALÁS

A soksejtű élőlények testét alkotó sejtek milliárdjai csak akkor alkothatják az élőlények testét, ha a sejtosztódások pontos szabályozó mechanizmus szerint történnek. Csak azok a sejtek osztódnak, csak akkor, csak úgy és csak annyit, amelyekben alkalmas molekulák képződnek és funkcionálnak, és amelyeket a sejtek külső környezete osztódásra ösztökél. A sejtciklus szabályozás molekuláris törvényszerűségeinek ismeretében érthetjük meg és remélhetjük gyógyítani azokat a betegségeket, amelyek alapja a sejtciklus rendellenes szabályozása.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 209-235, 2011.
2. Karp, G., Cell and Molecular Biology, 570-615, 2008.
3. Griffiths, A.J.F. és mtsi., An Introduction to Genetic Analysis, 42-57, 287-291, 2008.
4. Lodish, és mtsi., Molecular Cell Biology, 18-20, 781-791, 841-902, 2007.
5. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 611-658, 2004.

23. A DAGANATKÉPZŐDÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA.

A daganatok klonális eredete. Kapcsolat a DNS változása és a daganatképződés között. Protoonkogének és onkogének. Tumor szuppresszor gének.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, 2011. tavaszán.

BEVEZETÉS

A fejlett országokban az emberek mintegy 13 százalékának az élete ér véget rákos megbetegedés következtében. A rák olyan rosszindulatú daganat, amely a szervezetben szétszóródott, zabolátlanul osztódó sejtek összessége. Hogyan képződnek a daganatok? Hogyan alakulnak rákossá? Milyen molekuláris természetű eseménynek nyomán kezdenek a sejtek kontrollálatlan osztódások sorozatába? Melyek azok a gének, és milyen természetűek azok a genetikai változásaik, amelyek nyomán a sejtek daganatos jelegűekké válnak? Mi azoknak a géneknek a funkciója, amelyek mutációja rákos daganatok képződéséhez vezethet? A következő fejezet célja a fenti kérdések megválaszolása.

A daganatok nevezéktana

A tumor (daganat, neoplazma) fékezhetetlenül osztódó sejtek összessége. A tumort *benignusnak* ("jóindulatúnak") nevezik, amíg a zabolátlanul osztódó sejtek együtt maradnak. A tumort *malignusnak* ("rosszindulatúnak") nevezik, miután a zabolátlanul osztódó sejtek szétszóródnak a szervezetben, és áttéteket, ún. metasztázisokat, másodlagos tumorokat képeznek. (Egy daganat „jóindulatúnak” csak nagy jóindulattal nevezhető, mert csak idő kérdése, hogy „rosszindulatúvá” váljon.) A rosszindulatú tumorokat szokás *rákos daganatnak*, nevezni. Egyes rákos daganatok felemésztik a szervezet erőforrásait, mások elfedik a légzőhámot, ismét mások véredényeket zárnak el és okozzák az élőlény pusztulását.

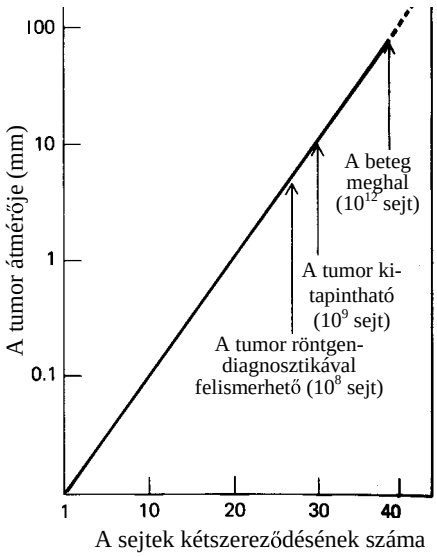
Az epiteliális (endo- vagy ektodermális eredetű) rákos daganatokat *karcinómának* nevezik. A daganatok kb. 90%-a karcinóma. A *szarkóma* a kötőszöveti (mezodermális) eredetű rákos daganatok neve. A leukémia típusú daganatok a szarkómák egyik típusát jelentik, azt az állapotot, amely során a vér fehérvérsejtjeinek száma a szokásos soksorosa (23.1. táblázat).

23.1. táblázat. A daganatok egyfajta osztályozása.

A daganat forrása	Benignus daganat	Malignus daganat	Eredet
Epiteliális sejtek	Adenóma	Karcinóma	Epitélium, mirigyek
		Adenokaricnóma	
Kötőszövet	Kondróma	Szarkóma	Kötőszövet
		Kondorszarkóma	Porc
	Melanóma	Melanoszarkóma	Bőr, pigmentsejtek
		Leukémia	Fehérvérsejtek

A daganatok kialakulása, detektálhatósága

A tumor már kb. 10^8 sejtből áll, amikor a röntgensugárzáson alapuló diagnosztikával kimutatható (23.1. ábra). Amikor már kitapintható, centiméternyi, és kb. 10^9 sejtet tartalmaz. A rákos beteg halálakor kb. 10^{12} daganat sejt van testében (23.1. ábra). A kialakulástól a beteg haláláig a daganatos sejtek populációja kb. negyvenszer kétszereződik meg. A daganatsejtek hisztológiai módszerekkel biztonsá-gosan elkülöníthetők az ép sejtektől. A daganatos megbetegedések gyógyítására akkor jó az esély, ha a daganatot ideje korán felismerik, és lehetőség szerint eltávolítják.



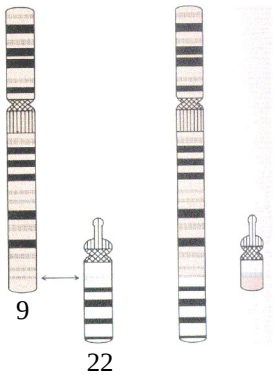
23.1. ábra. Egy tipikus tumor növekedésének jellemzői.

A daganatok klonális eredete

Hogyan képződnek a daganatok? Egy vagy több sejtből erednek? A daganatok eredetének ismerete segíthet a daganatok ellenei védekezésben. A lent felsorolt megfigyelések alapján biztosra vehető a daganatok klonális eredete, vagyis az, hogy egy daganat összes sejtje egyetlen egy sejt leszármazottja. Az egyetlen sejtben, illetve leszármazottaiban sorozatban bekövetkező öröklődő változások eredményezik azt, hogy a daganatsejtek túlnövik a nem daganatos jellegű társaikat. A daganatok klonális eredetére négy bizonyítékot sorolunk fel.

(1) Egy daganat valamennyi sejtjében ugyanaz az X kromoszóma inaktiválódik. Azokban a nőkben, akik heterozigóták az X kromoszómához kapcsoltan öröklődő *G6PD*$^-$ recesszív mutációra, vagy egyik daganatsejt sem festődött a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) enzim aktivitásán alapuló festés során (mert bennük az ép G6PD$^+$ gént hordozó X kromoszóma inaktiválódott), vagy mindegyik festődött (mert bennük a *G6PD*$^-$ mutá-ciót hordozó *X* kromoszóma inaktiválódott). Ha a daganatsejtek több sejt leszármazottai lennének, közöttük festődők és nem festődők egyaránt lennének.

(2) Ismertek olyan krónikus mielogén leukémia esetek, amelyekben minden rákos fehérvérsejt hordozta a 9↔22 kromoszómák közötti reciprok transzlokációt (23.2. ábra). Ugyanakkor a 9↔22 reciprok transzlokáció az ép fehérvérsejtek egyikében sem volt jelen. A különböző mielogén leukémiás emberekből származó tumor sejtek DNS-ének szekvencia analízise megmutatta, hogy a bár a transzlokáció egy rövid DNS szakaszon belül történt a különböző emberek daganatos sejtjeiben, ám egy-egy ember minden daganatos sejtjében ugyanabban a pontban. Az itt említett megfigyelés egyben azt is jelzi, hogy a daganatok képződésnek DNS szintű változás az oka, hiszen a 9↔22 transzlokáció minden sejtben daganat képződését eredményezte. Valószínű, hogy a 9., vagy a 22. kromoszómához kapcsoltan öröklődő gén mutációja révén.



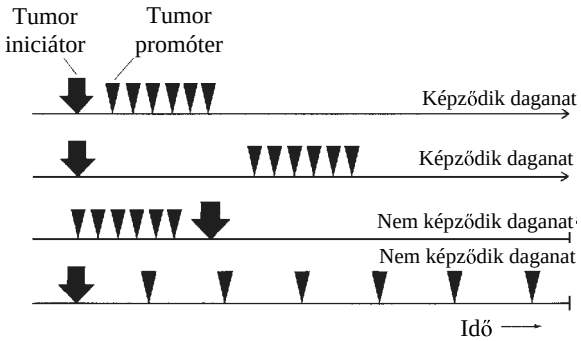
23.2. ábra. A 9↔22 kromoszómák közötti reciprok transzlokáció itt bemutatott típusa gyakorta krónikus mielogén leukémiák forrása.

(3) Az akut leukémia bizonyos típusaiban minden daganatos sejtben három 21. kromoszóma van. Ugyanakkor az ép fehérvérsejtek mindegyikében csak kettő, jelezve, hogy a 21. kromoszóma triszómiája és a daganat képződése között kapcsolat van. Az itt említett megfigyelésben két dolog is különösnek tűnhet. (i) Bár mindhárom 21. kromoszóma minden génje ép, a sejtek mégis daganatossá válnak. A magyarázat a géndózis viszonyok megbomlása: a 21. triszómiás sejtekben valamely 21. kromoszómához kapcsolt gén termékéből 50%-al több van, mint a diploid sejtekben. A géntermék szokottnál nagyobb koncentrációja a sejtciklust a szabályozatlan sejtosztódás irányába hangolja. (ii) Különös, hogy bár a Down-szindrómás emberek halálokai között gyakori az akut leukémia, bár gyakorta évtizedeket élnek. A magyarázat az, hogy - amint azt hamarosan áttekintjük - a rákos daganatok több esemény nyomán képződnek. A 21. kromoszóma triszómiája csak egy a sok közül.

(4) A meningeomás daganatok között vannak olyanok, amelyek esetében a daganatos sejtek mindegyikében csak egyetlen 22. kromoszóma van. Az ok már ismert: a géndózis viszony megváltozása.

Minden daganat alapja genetikai változás

A fenti említett tények nemcsak a daganatok klonális eredetét bizonyítják, hanem azt is jelzik, hogy a mutációk - az örökítő anyagban bekövetkező öröklődő változások - lehetnek a daganatok leggyakoribb forrásai. Valóban, minden mutagén (mutációt indukálni képes tényező) egyben rákkeltő (karcinogén) is. (Csak néhány olyan tényezőt ismerünk, amely bár karcinogén, de nem mutagén.) A mutagéneket szokás *tumor iniciátoroknak* is nevezni. A *tumor promóterek* viszont olyan tényezők, amelyek a sejtosztódások serkentésével segítik a daganatok kialakulását (23.3. ábra). Egy bizonyos: a mutációk különféle típusainak alapvető szerepe van a daganatok képződésében.

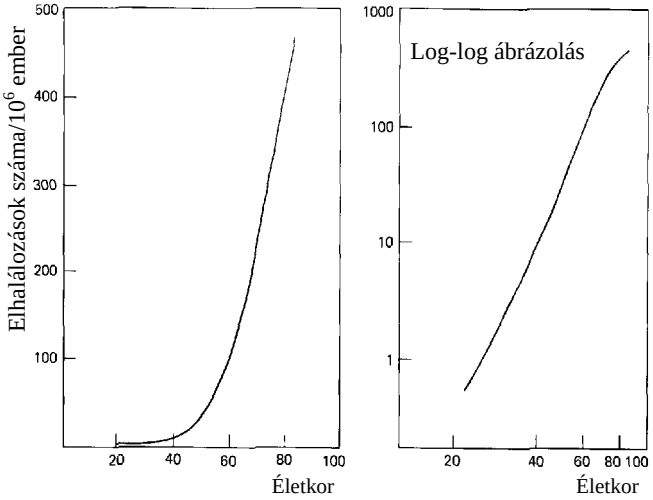


23.3. ábra. A tumor iniciátor (mutagén, karcinogén) és a tumor promóter hatás időbeli kapcsolata a daganatképződés szempontjából.

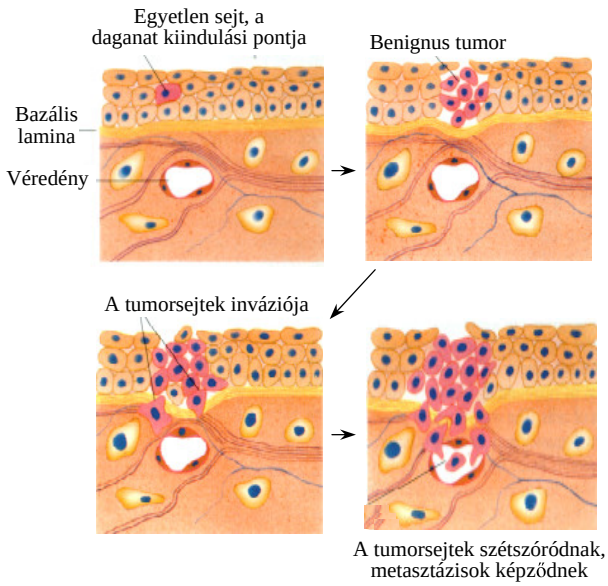
Egy daganat kialakulásához több esemény szükséges

Egy ember testében élete során mintegy 10^{16} sejtosztódás történik. (Egy felnőtt ember testét nagyjából 10^{14} sejt alkotja.) A spontán mutációk gyakorisága mintegy 10^{-6}/gén/sejtciklus. Lényegében tehát minden génünk-ben 10^{10} mutáció következik be életünk során. Azok-ban is, amelyeknek a sejtosztódásokat szabályozzák. Az itt említett adatok ismeretében tulajdonképpen csoda, hogy nem hal meg minden ember rákos daganat következtében, vagy hogy egyáltalán megszületik. A különös helyzet magyarázata az, hogy egy daganat kialakulásához több esemény szükséges. Az esemé-nyek számára a következő jelenségből lehet következ-tetni. Az USA-ban egy évben vastagbélrákban elhunyt emberek életkor szerinti eloszlása exponenciális össze-függést mutat (23.4. ábra). (A daganatos megbetege-dések az időskori betegségek jellegzetes példái.) Az adatokat logaritmikusan ábrázolva az összefüggés "linearizálható". Az egyenes meredekségi tényezője 5, vagyis a vastagbélrák kialakulásához öt független esemény bekövetkeztére van szükség (23.4. ábra). Az események száma a különféle daganatok esetében 3-7 között változik. A daganat képződéséhez vezető események nem egyszerre következnek be, hanem egymás után, és ugyanabban a sejtvonalban (23.5. ábra). Nagyjából a következő séma szerint. Az első esemény eredményeként egy sejtpopuláció valamelyik sejtje korlátlan osztódásba kezd, és benignus tumort képez. A második esemény következményeként a sok

daganatsejt közül egy képessé válik arra, hogy a bazális membránt emésztő enzimeket termeljen. A harmadik esemény után egy újabb sejtvonalon belüli sejt és utódsejtjei arra lesznek képesek, hogy a vérkeringésbe kerüljenek. A negyedik esemény nyomán válnak valamely sejt leszármazottai képessé arra, hogy az immunrendszer hatását kikerülve megtelepedjenek, metasztázisokat (áttéteket) képezzenek, és végeredményen rákos daganatok alakuljanak ki.

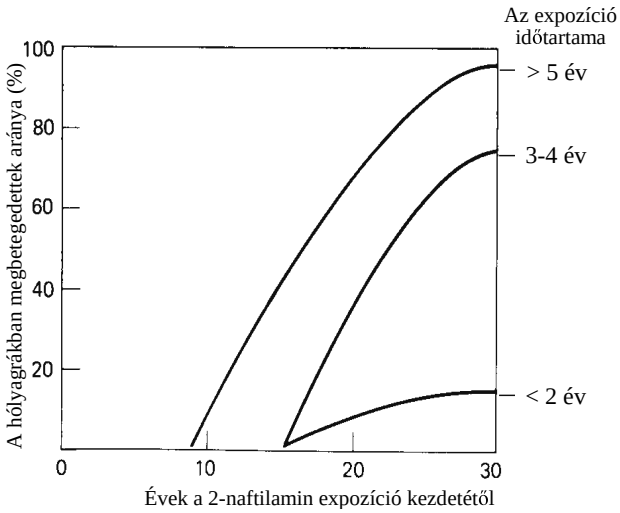


23.4. ábra. Az USA-ban egy évben vastagbélrákban elhunyt emberek korszerinti eloszlása (A). A log-log ábrázolással linearizált összefüggés meredekségi tényezője = 5 (B).



23.5. ábra. A rákos daganat kialakulásához ugyanabban a sejtvonalban egymás után bekövetkező független események vezetnek.

Nyilvánvaló, hogy a független események bekövetkezéséhez időre van szükség. A karcinogének hatása csak hosszú évek után nyilvánul meg (23.6. ábra). Azokban az emberekben pl., akik 3-4 éven át 2-naftilaminnal dolgoztak, a 2-naftilaminnal történt első találkozásukat követő tizenötödik (!) évben alakult ki az első hólyagrák (23.6. ábra). Harminc év multán viszont az emberek 75%-ában fejlődött ki rákos daganat. A hosszú "inkubációs" periódus a daganatképződés fontos jellemzője. Hirosimában az atombomba robbanását követő 5-8 év elteltével lettek gyakoriak a leukémiás megbetegedések. A dohányzással kapcsolatos tüdőrák "inkubációs" ideje 18-20 év. Minél korábban kezd valaki dohányozni, és minél erősebb dohányos, annál rövidebb az inkubációs idő. Az is nyilvánvaló, hogy a csökkent reparációs kapacitású emberekben (Xeroderma pigmentosum, Bloom szindróma) gyakoribbak a daganatos megbetegedések, mint azokban, akik reparációs kapacitása nagy.



23.6. ábra. A karcinogén-expozíció és a daganatképződés közötti kapcsolat: a 2-naftilamin hatása a hólyagrák kialakulása.

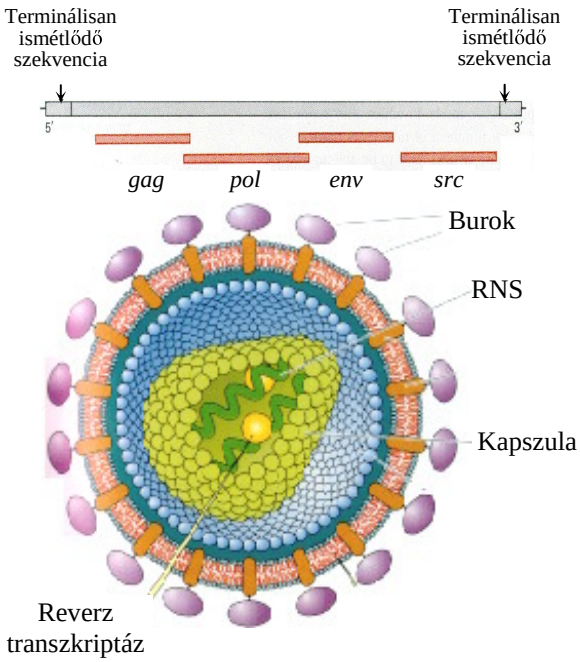
A DAGANATKÉPZŐDÉS MOLEKULÁRIS GENETIKÁJA

Onkogének és proto-onkogének

A daganatképződés molekuláris alapjainak megértése során olyan kérdésekre keresünk választ, mint pl. melyek azok a gének, amelyek mutációja daganatok képződéséhez vezet? Milyen típusú mutációk eredményezik daganatok kialakulását? Mi az ép allélok szerepe a sejtek életében? A kérdések megválaszolása alighanem a daganatkeltő Rous szarkóma vírussal kezdődött. A Rous szarkóma vírus a retrovírusok egyike (23.7. ábra).

A Rous szarkóma vírus daganatképző változata (i) csirkékben kötőszöveti daganatot okoz, valamint (ii) sejttenyészetben a csirke fibroblaszt sejtek tumoros transzformációját. Mutagenezis kísérletek során “meg lehetett szelídíteni” a daganatképző Rous szarkóma vírust: mutációkkal el lehetett rontani a vírusnak azt az ún. *onkogénjét*, amely szarkómaképződést indukál (23.7. ábra). A szakirodalomban a Rous szarkóma vírus onkogénjének *v-src* a jele. (A *v* betű a vírus eredetre, az *src* a szarkómára utal.) Azok a vírusok, amelyek a *v-src* onkogén funkcióvesztéses típusú mutációját ($v\text{-}src^0$) mutációját hordozták, elvesztették daganatképző képességüket. Miután klónozták a *v-src* gént kiderült, hogy a *v-src* onkogén lényegében a

csirke genomjából származó, ép src^+ gén mutáns változata. Sőt az is kiderült, hogy az ép src^+ gén része minden eukariota genomnak (lásd a 23.2. táblázatot és a 23.9. ábrát). Az src^+ gén egy olyan 60 kDa tömegű citoplazmatikus fehérjét kódol, amelynek tirozin kináz aktivitása van, és a szignáltranszdukciós, jelátviteli kaszkád része.



23.7. ábra. A daganatkeltő Rous szarkóma vírus genom szerveződése (felül) és egy retrovírus szerkezete (alul). A terminálisan ismétlődő szekvenciák annak a DNS-nek az inszerciójához illetve transzpozíciójához szükségesek, amelyek a vírus RNS-rol a reverz transzkriptáz tevékenysége nyomán képződnek. A *gag*, a *pol* és az *env* gének rendre a kapszula fehérjéket, a reverz transzkriptáz enzimet, valamint a burok fehérje molekuláinak képződését kódolják. Az *src* (pontosabban a *v-src*) gén az onkogén.

Az ép src^+ gén a *proto-onkogének* jellegzetes példája. Olyan gén, amely ép funkciójára szükség van a sejtekben, és amely mutációjának eredményeként daganatképző mutáns allél, az onkogén képződik (23.7. ábra). Ha az src^+ proto-onkogénben ugyanaz a mutáció következik be, mint ami a *v-src* allél képződéséhez vezetett, az src^+ proto-onkogén olyan ún. *c-src* celluláris onkogénné alakul, amely a sejt sajátja, és amely éppen úgy daganatképződést okoz, mint a *v-src* mutáció.

Az onkogén képződését eredményező mutációk természetét a következő megfigyelések alapján érthetjük meg. (i) Miután csirke fibroblaszt sejteket a daganatképző Rous szarkóma vírusokkal fertőzik, bár a sejtekben a *v-src* allél mellett két ép src^+ proto-onkogén is jelen van, mégis megtörténik a tumoros transzformáció, a sejtek daganatos jellegűekké válnak. Nyilvánvaló, hogy a *v-src* mutáció domináns. (ii) A *c-src* mutációt hordozó daganat sejtek is hordozzák a src^+ allélt. (iii) Azokban a kísérletekben, amelyekben onkogéntől tumorosan transzformálódott sejteket ép sejtekkel fuzionáltattak, a hibrid sejtek úgy viselkedtek, mint a daganatos sejtek. Lényegében tehát az onkogének nem mások, mint a proto-onkogének domináns, funkcionyeréses alléljai. A funkcionyeréses jelleg azt jelenti, hogy az onkogének által kódolt fehérjék funkcióképesek, és olyan funkciót látnak el, amely daganatok képződéshez vezet. Az onkogének tehát a proto-onkogénekből domináns, funkcionyeréses mutációk „eredményeként" képződnek. (A *v-src* tehát az src^+ domináns, funkcionyeréses allélja. A funkcionyeréses mutációk jellegzetes példájáról – az i^s mutációról - korábban szóltunk.) Ezen a helyen említjük meg a domináns mutációk osztályozásának egy lehetséges módját (23.2. táblázat).

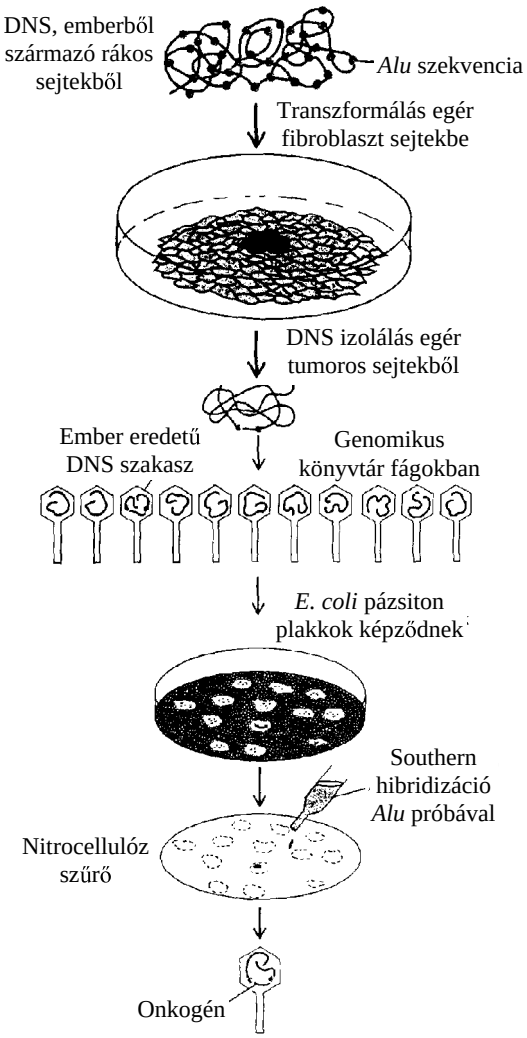
23.2. táblázat. A domináns mutációk osztályozása.

A domináns (*D*) mutáció típusa		Genotípus	A mutáns fenotípus
Dózisfüggő	Haplo-elégtelen	*D*/+	Észlelhető
		D/+/Dp^+	Nem észlelhető
	Triplo-abnormális	+/+/Dp^+	Észlelhető
		+/–/Dp^+	Nem észlelhető
Funkció-nyeréses	Antimorf (domináns negatív)	*D*/+	Észlelhető
		D/+/Dp^+	Csökkent erősségű
	Neomorf	*D*/+	Észlelhető
		D/+/Dp^+	Változatlan erősségű

D valamely domináns mutáció szimbóluma.
– egy deficiencia, vagy egy null allél szimbóluma.
Dp^+ egy olyan duplikáció szimbóluma, amelynek része az ép (+) gén.

A *v-src* onkogén, valamint az src^+ proto-onkogén molekuláris funkciójának megismerése nyomán merült fel az igény további onkogének és proto-onkogének izolálására. Az onkogének megismerésére kiváló lehetőséget kínál az ún. NIH-3T3 egér fibroblaszt sejtek tenyészete (23.8. ábra).

Az onkogének, illetve a proto-onkogének megismerésére kidolgozott módszer a következő (23.8. ábra).. Izoláljunk DNS-t pl. ember eredetű hólyagrák sejtekből, és hasítsuk a DNS-t fragmentekre. Vigyük be a DNS fragmenteket (transzfekcióval) NIH-3T3 sejtekbe. Csak az a fibroblaszt sejt fog tumorosan transzformálódni és korlátlanul osztódni, amelybe az onkogént tartalmazó DNS került. Izoláljunk most DNS-t a tumorosan transzformált NIH-3T3 sejtekből, és klónozzuk be az egér DNS-t fágokba: készítsünk egy genomikus könyvtárat (23.8. ábra). A következő feladat annak a fágklónnak az azonosítása, amely az ember eredetű DNS-t, benne az onkogént, tartalmazza. Az ember eredetű DNS azonosítására - Southern analízis nyomán - a mérsékelten repetitív *Alu* szekvencia alkalmas. Az *Alu* szekvencia egy, az emberre specifikus retropozon származék, amely szétszórtan alkotja a humán genomnak 5-10 %-át. Az *Alu* szekvencia alapján kikereshető a fágkönyvtárból az alkalmas klón, izolálható az onkogén, majd megismerhető a proto-onkogén molekuláris funkciója is.



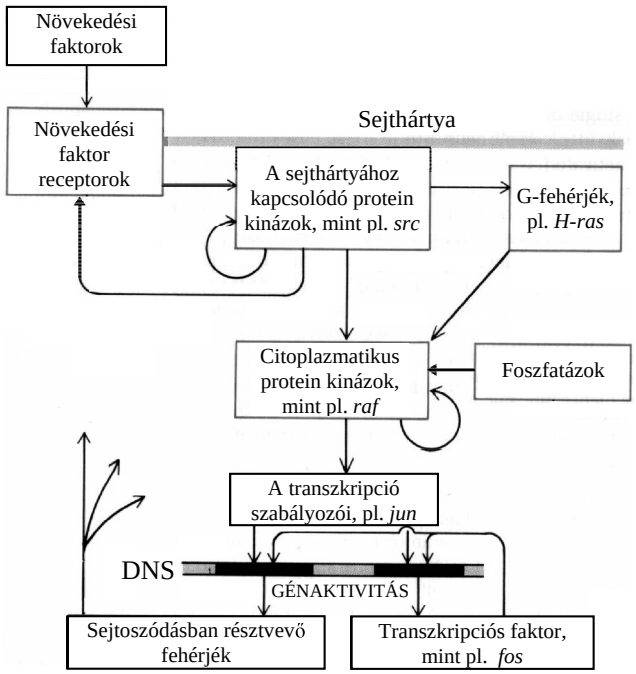
23.8. ábra. Módszer humán onkogének izolálására. (Magyarázat a szövegben.)

Az NIH-3T3 és más, itt be nem mutatott módszerek alapján ismerték meg az ember kb. háromszáz proroonkogénjét és funkcióikat (23.3. táblázat; 23.9. ábra). A proto-onkogének molekuláris funkcióinak megismerése után derült ki, hogy a proto-onkogének termékei a sejtkommunikáció, a szignáltranszdukció, a sejtciklus szabályozás, valamint a génexpresszió szabályozás különféle elemeit kódolják (23.9. ábra). Arra is fény derült, hogy a proto-onkogének többnyire olyan génfunkciókat kódolnak, amelyek serkentik a sejtosztódásokat.

Mivel a domináns, funkciónyeréses mutációk nyomán bekövetkező proto-onkogén → onkogén átalakulás, és a tumoros transzformácó a testi sejtekben következik be, nem öröklődik az utódgenerációkra.

23.3. táblázat. Néhány onkogén és proto-onkogén jellemzői.

Onkogén	A proto-onkogén funkciója	A forrás	A tumor típusa
abl	Protein kináz (tirozin)	Egér	Pre-B-sejt leukémia, szarkóma
erb-B	Receptor tirozin kináz, az epidermális növekedési faktor (EGF) receptora	Csirke	Eritroleukémia, fibroszarkóma
fos	Transzkripciós faktor	Egér	Oszteoszarkóma
jun	Sejtmagi fehérje	Csirke	Fibroszarkóma
myc	Sejtmagi fehérje	Csirke	Szarkóma, mielóma, karcinóma
H-ras	G fehérje	Patkány	Szarkóma, eritroleukémia
K-ras	G fehérje	Patkány	Szarkóma, eritroleukémia
raf	Citoplazmatikus protein kináz	Sokféle	Karcinóma
ras	Protein kináz (tirozin)	Csirke	Szarkóma



23.9. ábra. A proto-onkogének sejtfunkciói.

A tumor szuppresszor gének

Általános tapasztalat, hogy sejtjeink nem osztódnak korlátlanul. Ha pl. egy tápedény alját egy rétegben benőtt sejtekből egy sávnyit eltávolítunk, a szabaddá vált felszín szomszédságában élő sejtek rövidesen osztódni kezdenek, és utódsejtjeik hamarosan elfoglalják a szabad felszínt. Miután nincs további szabad hely, megszűnnek a sejtosztódások. Miért, hiszen bőven van hely a tápoldatban? Az ún. *kontakt gátlás* miatt, azért, mert a szomszédos sejtek kommunikálnak, megakadályozzák a sejtek osztódását. Kell tehát, hogy legyenek olyan gének is,

amelyek termékei fékezik, szuppresszálják a sejtosztódásokat. A sejtosztódásokat az ún. *tumor szuppresszor gének* termékei tartják kordában. Valamely tumor szuppresz-szor gén funkciójának hiányában - az. ún. tumor szuppresszor mutációra homo- vagy hemizigóta sejtek-ben - a sejtek nem tartalmaznak olyan tényezőt, amely a proto-onkogének hatását fékezhetné, és következés-képpen tumoros jellegű transzformáció történik, kezdődhet, majd folytatódhat a zabolátlan sejtosz-tódás.

Az ember elsőként megismert tumor szuppresszor génje az ún. *retinoblasztóma* (rb^+) gén. Az *rb*/*rb* (vagy az *rb*/– hemizigóta) sejtekből hiányzik az rb^+ ép gén aktivitása, ami a retina daganatos elváltozásához, retinoblasztómához vezet. Az rb^+ gén a 13. kromoszómához kapcsoltan öröklődik. Terméke egyrészt (i) Zn-ujjakat tartalmaz, amivel a DNS-hez kötődik, és mint transzkripciós faktor funkcionál, másrészt (ii) fehérjékhez is képes kötődni, köztük proto-onkogének által kódolt fehérjékhez, valamint olyanokhoz is, amelyek a ciklinek funkcióján keresztül a sejtciklust szabályozzák. Miközben a proto-onkogéneknek csaknem mindegyike ismert, a tumor szuppresszor gének megismerése nehéz, munkaigényes feladat. Egy biztos: a tumor szuppresszor gének mutációi öröklődnek, és gyakorta a gyermekkor daganatos megbetegedéseit okozzák.

Valamely tumor szuppresszor mutációra heterozigóta (m/m^+) ember esetében lényegében csak idő kérdése, hogy a valamely sejtjében olyan genetikai esemény játszódjon le, amely az ép m^+ allél elvesztése nyomán *m*/*m* vagy *m*/– sejt képződéséhez vezet. Az *m*/*m* vagy *m*/– sejtből aztán daganat képződhet. (Természetesen *m*/*m* vagy *m*/– állapot kialakulhat az m^+/m^+ emberek valamely sejtjében is. Annak azonban kicsi az esélye, hogy ugyanabból a sejtből mindkét m^+ allél elvesszen.)

Az m^+ allél az m/m^+ a következő genetikai események nyomán veszhet el a sejtekből (23.10. ábra).

(1) Kromoszómavesztés. A sejtek rendellenes kromoszóma szegregáció (nondiszjunkció) során és úgy is veszíthetnek kromoszómát, hogy a sejtosztódás ana- vagy telofázisában a kromoszóma a sejt egyenlítői síkjában marad, ahol enzimek fragmentálják, elemésztik. Szerencsére a kromoszóma hiány többnyire a sejt pusztulásával jár.

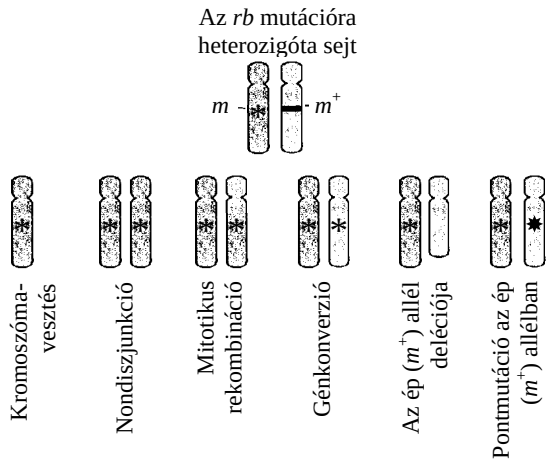
(2) Nondiszjunkció. Megtörténhet, hogy a mitózis során ún. kettős nondiszjunkció következik be: a metafázisban levő homológ kromoszómák egyike az egyik, másika a másik leánysejtbe jut. (Úgy, amint a kromoszómák az első meiotikus osztódás során szegregálnak.) A nondiszjunkció nyomán az egyik leánysejt *m*/*m* lesz.

(3) Mitotikus rekombináció nyomán képződik *m*/*m* sejt.

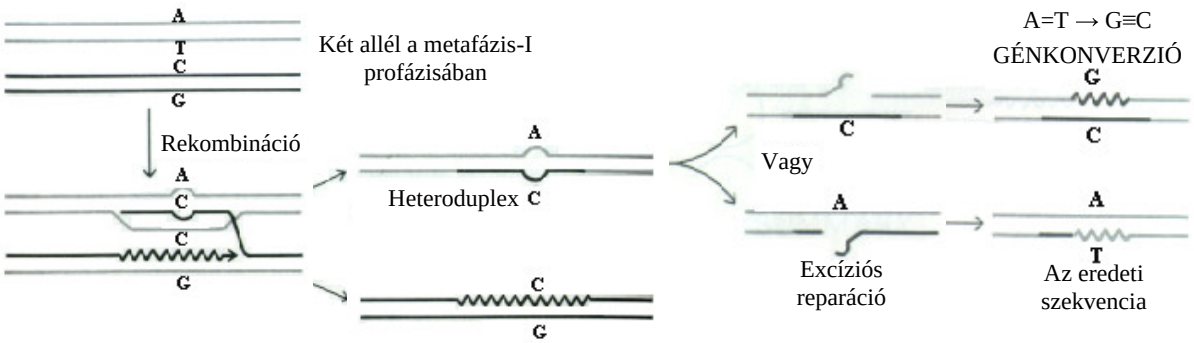
(4) Génkonverzió nyomán az m/m^+ sejt *m*/*m*-é alakul, az m^+ allél *m*-é konvertálódik. A génkonverzió során előbb úgy játszódik le rekombináció két allél között, hogy heteroduplex képződik (23.11. ábra). A heteroduplexek reparációja nyomán alakulhat az egyik allél olyanná, mint amilyen a másik, következik be a génkonverzió (23.11. ábra).

(5) Deficiencia nyomán elveszhet az m^+ allél.

(6) Az m^+ allélban mutáció következhet be, és új m' funkcióképtelen allél, *m*/*m*' sejt képződhet.



23.10. ábra. Események, amelyek során az ép m^+ tumor szuppresszor gén elveszhet az m/m^+ sejtekből.



23.11. ábra. A génkonverzió nyomán az egyik allélra jellemző A=T bázispár helyére a rekombináció és az össze nem illő AC bázispár reparációja nyomán a másik allélra jellemző G≡C bázispár kerül: az A=T allél G≡C-vé konvertálódik.

A diploid állapot egyik jelentősége az, hogy ha valamely sejtben valamelyik tumor szuppresszor allél elveszti funkcióját, az ép allél (m^+) ellátja a funkciót, és a sejt nem osztódhat korlátlanul. Az esély arra, hogy ugyanabban a sejtben az mindkét ép (m^+/m^+) allélban mutáció következik be kicsi, de nem nulla. Gyakorlati példaként a retinoblasztómát említhetjük: az rb/rb^+ emberek szemében gyermekkorban képződnek daganatok, és többnyire mindkét szemben. Az rb^+/rb^+ emberekben ritkák a retinoblasztóma daganatok, és csak az egyik szemben szoktak kialakulni az életkor kései szakaszaiban.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az egészséges szervezetben, mint annyi minden más folyamat, a sejtosztódások is egyensúlyban vannak. Az egyensúly két ellentétes hatású géncsalád funkciójának az eredménye: egyrészt a proto-onkogének termékei serkentik, másrészt a tumor szuppresszor gének termékei gátolják a sejtosztódásokat. A tumorok képződésre két alapvető lehetőség van: (i) a proto-onkogénekben bekövetkező domináns, funkciónyeré-ses mutációk nyomán olyan onkogén mutáns allélok képződnek, amelyek funkciója daganat kialakulásához vezethet. (ii) A tumor szuppresszor gének funkció-jának vesztésével járó recesszív mutációk indukciója, és a génfunkció elvesztése valamely sejtből.

Minthogy a proto-onkogén → onkogén mutációk testi sejtek DNS-ében következnek be, nem öröklődnek az utódgenerációkra. A tumor szuppresszor gének mutációi ellenben öröklődnek. Jelenlétüket az jellemzi, hogy bizonyos típusú tumorok családi halmozódást mutatnak.

Az ép proto-onkogének és az ép tumor szuppresszor gének termékei a sejtkommunikáció, a sejtciklus szabályozás szereplői, biztosítják a sejtosztódások szabályozott menetét. A mutagének, amelyek hatása véletlenszerű, a sejtosztódás szabályozásában érintett ún. sejtosztódás génekben is indukálnak mutációkat, változtatják meg a gének funkcióit, eredményezik daganatok kialakulását. Becslések szerint a daganatok képződéséhez vezető mutációk legkevesebb 90%-át olyan mutagének okozzák, amelyek a környezet-szennyezés, az "áldásos" emberi tevékenység nyomán jutnak környezetünkbe. A daganatos megbetegedések megelőzésének leghatékonyabb módszere a környe-zetszennyezés mértékének csökkentése, a különféle vegyszerek megfontolt alkalmazása. A daganatot okozó környezetszennyező tényezők alighanem ”leghatékonyabb” komponense a dohányzás, illetve a dohányfüst különféle alkotói. És a dohányosok még fizetnek is érte… Ha kialakultak, a daganatos betegsé-gek gyógyításának legfontosabb módja a korai felis-merés, és kezelés. Nem hangsúlyozhatjuk kellően a rákszűrések fontosságát, különösen az idősödő ember-társaink esetében. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy az immunrendszer szerepe alapvető fontosságú az újonnan képződött daganatok eliminálásában a szerve-zetből. A csökkent működésű immunrendszer – akár a folytonos stressz, vagy az immunszuppresszáló hatások miatt – nem akadályozza meg a daganatok képződését, rákbetegség kialakulását.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 136-137, 230-233, 284-319, 2011.
2. Griffiths, A.J.F. és mtsi., An Introduction to Genetic Analysis, 547-550, 2008.
3. Karp, G., Cell and Molecular Biology, 663-692, 2008.
4. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 1109-1150, 2007.
5. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 726-739, 2004.

24. AZ IMMUNRENDSZER BIOLÓGIÁJA.

Nem-specifikus védekezés. Az immunrendszer. A humorális és a sejtes immunválasz. Immunizáció, vakcináció és az immunológiai memória. Klonális szelekció. Immuntolerancia. A saját és az idegen megkülönböztetése. Az immunglobulinok. Az ellenanyag sokféleség genetikai alapjai. Az immunrendszer betegségei.

A fejezetet Szabad János állította össze 2006. úszén

BEVEZETÉS

A heterotróf élőlények életéhez olyan szerves anyagokra van szükség, amelyeket eredendően az autotróf élőlények készítettek. Az élőlényeket támadó patogének (vírusok, baktériumok, gombák, sok egysejtű eukariota valamint féreg) olyan körülményeket keresnek, amelyek között folytathatják életüket. Természetes, hogy a megtámadott élőlények védekeznek. Milyen mechanizmusokkal védekeznek az élőlények a patogének ellen? Mi a nem-specifikus és a specifikus védekezései mechanizmusok lényege? Milyen mechanizmusok alapján képződnek a patogének ellen védő ellenanyagok? A jelen fejezet célja a patogének elleni védekezési mechanizmusok rövid áttekintése. Megjegyezzük, hogy az immunrendszer élettani és klinikai vonatkozásainak részleteivel más tantárgyak foglalkoznak. Itt elsősorban a molekuláris biológiai történésekre fordítunk figyelmet.

A NEM-SPECIFIKUS VÉDEKEZÉSI MECHANIZMUSOK

A patogéneknek életben maradásuk érdekében be kell hatolni a megtámadott élőlénybe, ott életben kell maradniuk, el kell szaporodniuk, miközben felkészülnek a következő élőlény megtámadására. Nyilvánvaló, hogy a megtámadott élőlények védekeznek a patogének ellen. Az ún. **nem-specifikus védekezési mechanizmusok** olyan megoldások összességét jelentik, amelyek nemcsak egyfajta, hanem mindenféle patogén ellen védik az élőlényeket. A nem-specifikus védekezési mechanizmusok legfontosabb elemei a következők.

- A *bőr* olyan ellenálló réteget képez az élőlény külső felszínén, amelyen a patogének nem, vagy csak nehezen tudnak áthatolni.
- A *saját flóra* a testünkkel együtt élő baktérium és gomba populációt jelenti. A saját mikroorganiz-musaink a testünk külső felszínén, valamint a belső felszín azon a részein élnek, amelyekkel a külvilágból érkező patogének érintkezhetnek. A saját flóra élőlényei olyan anyagokat termelnek, amelyek távol tartják a patogéneket.
- A *nyálka* a látó, a légző, az emésztő és az urogenitális rendszer bizonyos részeiben képződik. A könnyben, a nyálban és az orrváladékban ún. *lizozim* enzim van. A lizozim megtámadja a baktérium sejtek falát, védtelenné téve a baktériumokat. Itt jegyezzük meg, hogy a váladékok olyan ún. IgA immunglobulin molekulákat is tartalmaznak, amelyek az immunrendszer termékei és specifikusan hatnak bizonyos patogének ellen.
- A *fagociták* a fehérvérsejtek olyan típusai, amelyek felismerik, bekebelezik, majd lizoszomális enzimeikkel elroncsolják a mikroorganizmusokat.
- A *természetes ölő sejtek* a fehérvérsejtek olyan ősi típusai, amelyek a vírusokkal fertőzött, valamint a daganatos sejtek bizonyos típusait pusztítják el.
- A *gyulladások* fertőzések, sérülések és égések helyén képződnek. A gyulladások helyén a véredények kitágulnak, faluk áteresztővé válik, felgyülemlik a vérplazma, megemelkedik a hőmérséklet, megjelennek a fagociták és az ellenanyagok. Csupa olyan körülmény, amely a patogének pusztulásához vezet.
- A *láz* magas testhőmérséklet előállításával biztosít a patogének szaporodásához kedvezőtlen feltételt.
- A *harc a vasért* mechanizmus azt jelenti, hogy az egészséges szervezetben nincsenek szabadon hozzáférhető vas ionok, mert fehérje molekulákkal kapcsolódnak. Minthogy vas ionokra a patogéneknek is szükségük van életükhöz, a szabad vas ionok hiánya korlátozza a patogének szaporodását.
- Az *interferonok* olyan kb. 160 aminosavból álló glükoproteinek, amelyeket a vírussal fertőzött sejtek termelnek. Az interferon molekulák más sejtek felszíni receptoraihoz kötődnek, és vírusellenes enzimek szintézisét indukálják.
- A *komplement rendszert* kb. húsz különféle típusú fehérje alkotja. A komplement rendszer fehérjéi három különböző feladatot látnak el. (i) Segítik az idegen sejtek ellenanyag-függő szétesését. (ii) A fagocitákat a fertőzés helyére vonzzák, és (iii) fokozzák az endocitózis hatékonyságát a fagocitákban.

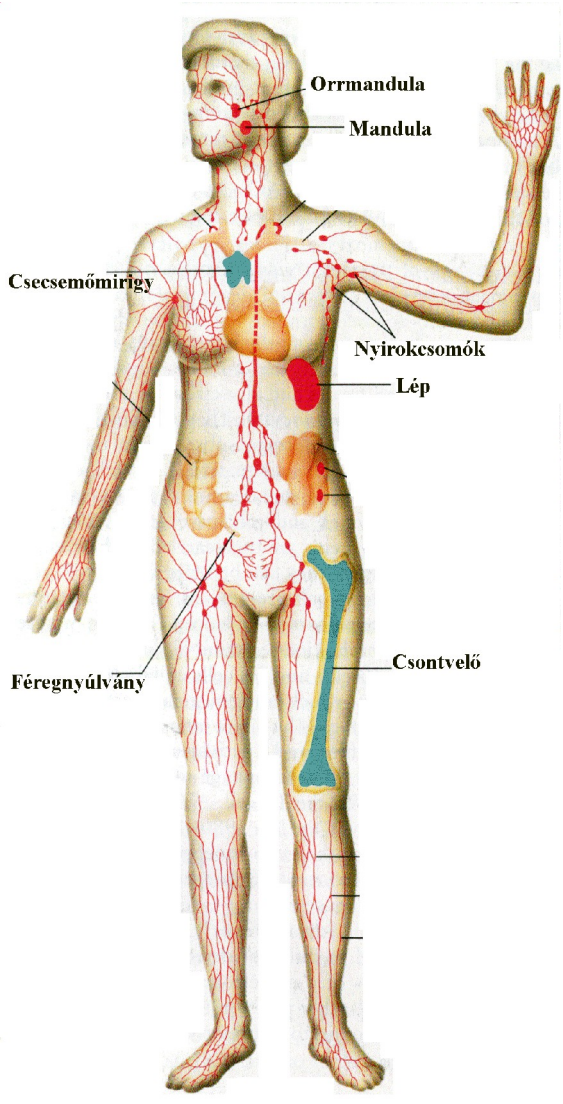
Bár a jelen fejezet az immunrendszerről és olyan élőlényekről szól, amelyeknek van immunrendszere, említésre érdemes két olyan nem-specifikus védekezési rendszer, amelyekkel a növények védekeznek a patogének ellen, illetve az egysejtű élőlények biztosítják életfeltételeiket. Olyan rendszerek, amelyeket ismerünk, és használunk a gyógyászatban a patogének elleni védekezés során.

- A *fitoelaxinok* olyan kis fehérje molekulák, amelyekkel a növények védekeznek a patogének ellen.
- Az *antibiotikumok* olyan különféle kémiai természetű molekulák, amelyeket a baktériumok és a gombák termelnek. Az antibiotikumok úgy biztosítanak életteret a mikroorganizmusoknak, hogy megakadályozzák vetélytársaik szaporodását, illetve elpusztítják őket.

24.1. táblázat. Az emberi vérsejtek típusai és fontosabb jellemzői.

Sejttípus	Funkció	Sejtszám/ml
Vörösvérsejt	O_2 és CO_2 szállítás	$5x10^9$
Fehérvérsejtek		
Granulociták		
Neutrofil granulociták	Fagocitálnak, elroncsolják a baktériumokat.	$5x10^6$
Eozinofil granulociták	Roncsolják a nagyobb parazitákat, modulálják az allergiás és a gyulladásos reakciókat.	$2x10^5$
Bazofil granulociták	Hisztamint és bizonyos immunreakcióban szerotonint választanak ki.	$4x10^4$
Monociták	Makrofágokká differenciálódnak. A makrofágok fagocitálnak, miközben elroncsolják a mikroorganizmusokat, az idegen testecskéket és az elöregedett sejteket. Szabályozzák a többi fehérvérsejt aktivitását.	$4x10^5$
Limfociták		
B sejtek	Az ellenanyag termelő és a memória sejtek forrásai.	$2x10^6$
T sejtek	Elpusztítják a vírussal fertőzött, a mutációkat hordozó és az idegen sejteket. Szabályozzák a többi fehérvérsejt aktivitását.	$1x10^6$
Természetes ölő sejtek	Ölik a vírussal fertőzött, az idegen, valamint a daganatos sejtek bizonyos típusait.	$1x10^5$
Vérlemezkék	A megakariociták származékai, a véralvadás szereplői.	$3x10^8$

Megjegyzés: egy emberben mintegy 5 liter vér van, ami a testsúly 7%-a. A vér térfogatának 45%-a vörösvérsejt, 1%-a fehérvérsejt. A vér folyékony része a vérplazma.



24.1. ábra. Az immunrendszer legfontosabb elemei.

A SPECIFIKUS VÉDEKEZÉSI MECHANIZMUS: AZ IMMUNRENDSZER

A specifikus védekezési rendszer olyan patogéneket küszöböl ki specifikusan, mint pl. a vírusok, a baktériumok, a gombák és a férgek. A specifikus védekezési rendszer három feladatot lát el. (i) *Felismeri* a patogént, (ii) specifikusan *eliminálja*, és (iii) *emlékszik* is rá. Az emlékezés azt jelenti, hogy a patogénnel történő ismételt találkozások során a szervezet hatékonyan küzdi le a patogént, ellenálló, immunis a patogénnel szemben

Az immunrendszer elemei

Az immunrendszer legfontosabb elemei a fehérvérsejtek és a nyirokrendszer különféle alkotói (24.1. táblázat és 24.1. ábra). Az ember vérének 1 ml-e kb. $7x10^6$ fehérvérsejtet, és mintegy $5x10^9$ vörösvérsejtet tartalmaz. A vörös és a fehérvérsejtek a csontvelőben levő csírasejtekből származnak. Funkcióikat a B limfociták a csontvelőben, a T limfociták a csecsemőmirigyben (a tímuszban) nyerik el. A specifikus védekezés a különféle fehérvérsejtek összehangolt működésének eredménye (24.1. táblázat). A különféle fehérvérsejtek közötti összhangot a *citokinek* teremtik meg. A citokinek olyan, a fehérvérsejtek által kiválasztott növekedési faktor természetű molekulák, amelyeknek szerepe van bizonyos típusú daganatos sejteket elpusztításában is.

Immunizáció és az immunológiai memória

Ha valaki életében először találkozik egy patogénnel, néhány nap múlva olyan ún. *ellenanyagok* lesznek a vérében, amelyek specifikusan felismerik a patogént, és azt megsemmisítik (24.2. ábra). Ha másodszor találkozik a patogénnel (i) az ellenanyag koncentráció rövidebb idő alatt és

(ii) sokkal nagyobb értéket ér el vérében, mint az első találkozás alkalmával (24.2. ábra). A szervezet mintegy "emlékszik" arra, hogy már találkozott a patogénnel: gyorsabban és hatékonyabban küzdi le a patogént, mint az első találkozás során. Az első találkozás nyomán a szervezet *immunizálódott* a patogénnel szemben.

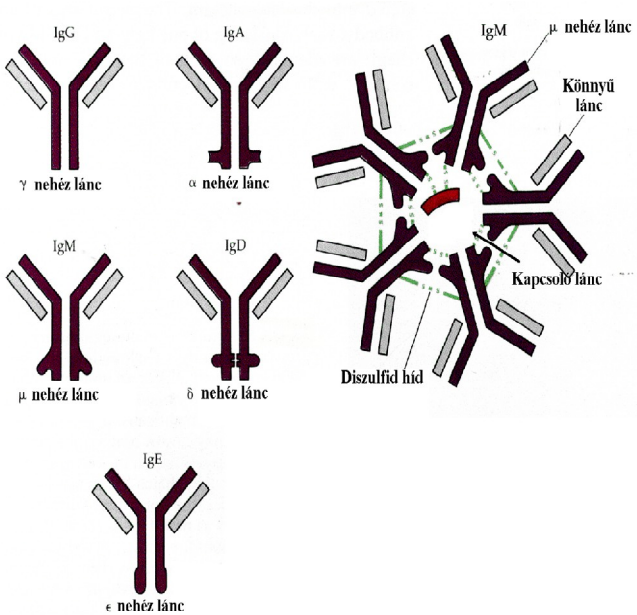
24.2. ábra. Az ellenanyag koncentráció alakulása valamely patogén elleni küzdelemben az első és a második találkozás után. A másodlagos reakció nyomán az ellenanyag koncentráció nagyságrendekkel haladhatja meg a korábbi értéket.

A jelenség ismerete alapján lehet legyengített patogéneket vagy azok fehérjéit bejuttatni a szervezetekbe a *vakcináció* során. (Akut fertőzés esetén, vagy pl. kígyómarás után egy másik élőlényben előre megtermeltetett, vagy a monoklonális technikával készített ellenanyagot szokás a szervezetbe juttatni az ún. *passzív immunizáció* során.) Vajon milyen események vezetnek az ellenanyag képződéséhez? Mi az immunológiai memória alapja?

Klonális szelekció és az ellenanyag képződés mechanizmusa

A fenti kérdésekre Niels K. Jerne és MacFarlane Burnet adott választ az 1950-es évek közepén. Szervezetünkben naponta kb. 10^8 B sejt képződik. A B sejtek felszínén olyan receptorok vannak, melyek valamely patogén fehérjével, az ún. *antigénnel* képesek specifikusan kapcsolódni. Egy B sejt felszínén csak egyféle antigén receptor van, de nagyon sok kópiában. A B sejtek felszínén levő receptorok nem az antigén hatására alakulnak ki, hanem a B sejtek differenciálódása, érése során – amint azt később áttekintjük – az élővilágban egyedülálló folyamat során.

A B sejtek felszínén levő receptor fehérjék az ellenanyagok vagy immunglobulinok ún. IgM osztályába tartoznak (24.2. táblázat, 24.3. ábra). A milliónyi B sejt közül csak az teremthet kapcsolatot az antigénnel, amelynek antigén receptorai (az IgM molekulák) az antigénhez illeszkednek. A sok sok B sejt közül az antigénnel reagáló B sejt kiválasztását szokás **klonális szelekciónak** nevezni (24.4. ábra). Azok a B sejtek, amelyek nem találkoznak antigénnel néhány nap multán - apoptózissal - elpusztulnak. A "kiválasztott" B sejt differenciálódik. Némely utódsejtje *plazmasejtté*, mások *memóriasejtekké* alakulnak. A plazmasejtek az elsődleges immunválasz során IgG típusú ellenanyagot választanak ki a vérbe (24.3. ábra). Az egyfajta ellenanyagot termelő plazmasejtek és a memóriasejtek egyetlen B sejt leszármazottai, egy klónt alkotnak.

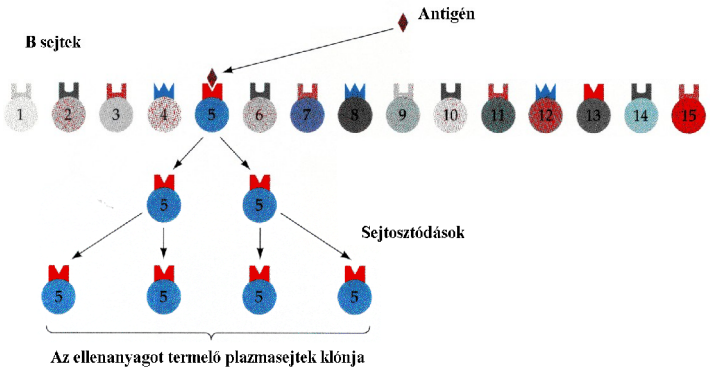


24.3. ábra. A különféle típusú immunglobulinok szerkezete.

Az ellenanyag molekulák az antigén molekulákkal kapcsolódnak, azokat inaktiválják, hogy az antigén-ellenanyag komplexek fagocitózissal megsemmisüljenek. Az elsődleges immunválasz során termelt ellenanyag az IgM osztályba tartozik. Az IgG molekulák pedig úgy őrzik meg ugyanazt az antigén specificitást, amely az IgM ellenanyagnak volt jellemzője, hogy nem a sejthártya részei, hanem a vérplazma alkotói. A patogén elleni küzdelem során az immunglobulin termelésben ún. *osztályváltás* következett be. A plazmasejtek a patogén leküzdését követő néhány nap multán - apoptózissal - elpusztulnak. Ugyanakkor a B sejt más származékai *memóriasejtekké* differenciálódnak. A memóriasejtek életünk végéig elkísérnek bennünket. A memóriasejtekből a patogénnel történő újabb találkozások nyomán plazmasejtek differenciálódnak. A plazmasejtek a másodlagos immunválasz során elsősorban az IgG osztályba tartozó ellenanyagot termelnek (24.2. táblázat).

24.2. táblázat. Az ellenanyagok főbb típusai és funkciói.

Immunglobulin osztály	Funkció	Nehézlánc
IgM	Antigén receptor a B és a memória sejtek sejthártyájában.	μ
IgD	Az érett B sejtek sejthártyájának alkotója. A B sejtek aktiválódásának fontos résztvevője.	δ
IgG	A másodlagos immunválasz legbőségesebb terméke. Átjut a placentán és védi a magzatot. A plazma immunglobulinok 80%-a.	γ
IgE	A hízósejtek és az eozinofil granulociták felszínén vannak. Antigénnel találkozva hisztamin kibocsátást eredményez. A gyulladás és némely allergiás reakció mediátora. A paraziták (férgek) elleni védekezés eszköze.	ε
IgA	Nyálka, nyál, könny, tej és más testváladék egyik komponense.	α



24.4. ábra. A klonális szelekció során az a B sejt differenciálódik plazmasejtekké és memória sejtekké, amely sejtfelszíni receptora - egy IgD típusú immunglobulin - az antigénnel kapcsolódik.

Az antigén felmutatás: a makrofágok és a T_H segítő T sejtek

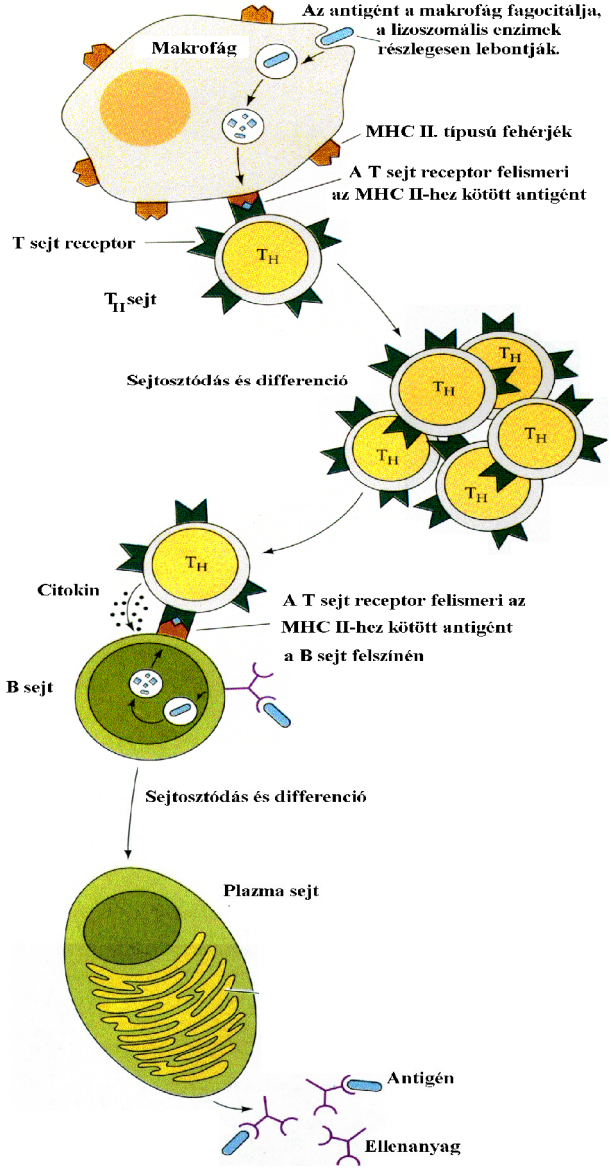
A fenti fejezet az antigén-receptor kapcsolatnak csupán a lényegét mutatta be. A valóságban a folyamat bonyolultabb. A B sejtek csak akkor aktiválódnak, ha az antigén (vagy annak egy szakasza, az ún. antigén determináns) egyidejűleg van jelen a B sejtnek, és annak az ún. T_H segítő (helper) T sejtnek felszínén, amely segíti a B sejt funkcióját (24.5. ábra). Az *antigén felmutatás* (prezentáció) folyamata azzal kezdődik, hogy az antigént valamely makrofág fagocitózissal bekebelezi. Az antigént a makrofágok lizoszomális enzimei elbontják. Az antigén töredékek előbb az ún. MHC komplex második típusú fehérjéivel kapcsolódnak, majd felbukkannak a makrofágok felszínén: az antigén mintegy *felmutatódik* a többi fehérvérsejtnek.

[Egy megjegyzés: az egerek MHC (angolul major histocompatibility complex) génkomplexe zömmel olyan sejtfelszíni fehérjéket kódol, amelyek meghatározzák a sejtek arculatát. Az MHC komplexet több mint 50 gén alkotja. Mindegyik polimorf, némelyiknek több mint 70 allélja ismert. Az egér MHC ember megfelelője a HLA (angolul human leukocyte antigen) génkomplex. A szervátültetések sikere a HLA allélok egyezésétől függ. Minél több HLA allélban egyezik a donor és a recipiens, annál nagyobb az esély arra, hogy az átültetett szervet a recipiens szervezete befogadja.] A T_H sejtek felismerik a makrofágok felszínén levő antigént. A T_H sejteket azok az ún. citokin molekulák aktiválják, amelyek növekedési faktor természetűek, és amelyeket a makrofágok választanak ki környezetükbe. A T_H sejtek is citokineket választanak ki, amelyek serkentik a T_H sejtek osztódását. Mindeközben az antigén kapcsolódik a B sejtek felszínén levő receptorokkal, endocitózissal a B sejtbe kerül, majd mint a makrofágokban is, részlegesen degradálódik. A degradálódott antigén az MHC fehérjékkel a B sejt felszínére jut, ahol a T_H sejtekkel kapcsolódik. A B sejt és a T_H sejtek kölcsönhatása nyomán felszabaduló citokinek hatására a B sejtek osztódnak, plazma- és memória sejtekké differenciálódnak. A plazma sejtek választják ki az ellenanyagokat (24.5. ábra). A memória sejtek emlékeznek az antigénre.

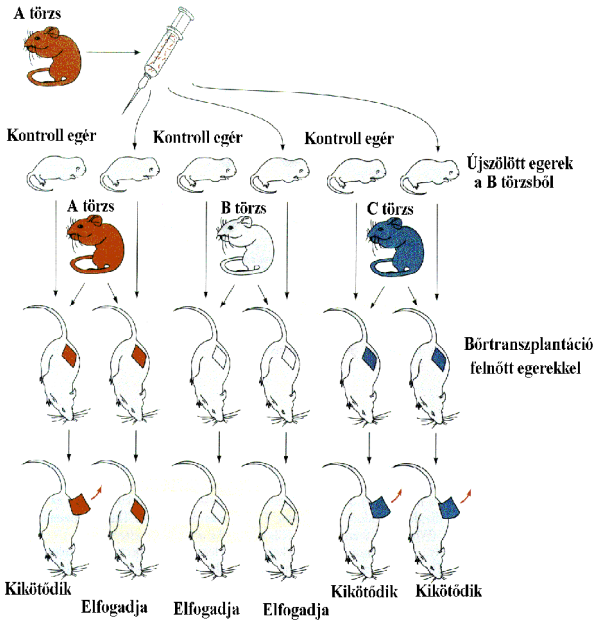
Az immuntolerancia

Vajon velünk születik a patogének elleni specifikus védekező rendszer (az immunrendszer)? Vagy életünk során alakul ki az a képességünk, hogy immunológiai eszközökkel védekezünk a patogének ellen? A választ az *immuntolerancia* jelenségének megismerése adta meg. Az immuntoleranciára a kétpetéjű ikerborjakban megfigyelt különös jelenség nyomán derült fény. A borjak nem küzdenek testvérük vérsejtjeit ellen, azokat sajátjukként fogadják el.

Az immuntolerancia jelenségét részletesen azokban a kísérletekben ismerték meg, amelyekben beltenyésztett törzsekből származó egerek között végeztek bőrátültetéseket (24.6. ábra). (Az ún. törzset azok az élőlények alkotják, amelyek generációkon át folytatott beltenyésztés eredményei, és lényegében egypetéjű ikreknek tekinthetők.) Ha ***B*** újszülött egerekbe ***A*** egerek fehérvérsejtjeit injektálják, a felnőtt ***B*** egerek az ***A*** egerek átültetett bőrfoltocskáját tolerálják (24.6. ábra). A kontroll ***B*** egerek, amelyekbe nem injektáltak ***A*** sejteket, kilökik az ***A*** bőrfoltot. Természetesen a ***B*** egerek elfogadják a ***B*** bőrt és kilökik a ***C*** bőr darabkát, függetlenül attól, hogy injektáltak beléjük ***A*** sejteket vagy sem (24.6. ábra). Az immuntolerancia jelensége megmutatta, hogy (i) az immunrendszer funkciója fokozatosan alakul ki életünk során, és azt is, hogy (ii) az immunrendszer képes különbséget tenni a saját és az idegen fehérjék között. Az immunrendszer az emberben a születés utáni első év táján alakul ki. Addig az anyatej IgA molekulái védik gyermekeinket a patogénektől.



24.5. ábra. Az antigén felmutatás mechanizmusa.



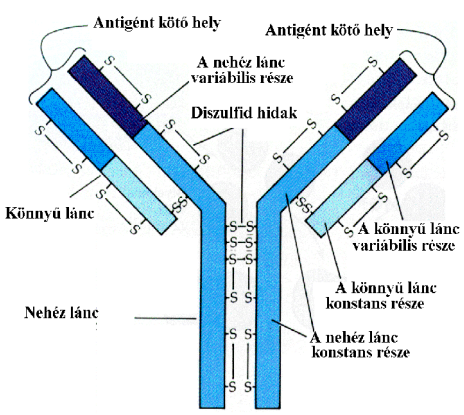
24.6. ábra. Kísérlet az immuntolerancia létezésének bemutatása.

Különbségtétel saját és idegen között: klonális deléció és a T_S sejtek szerepe

Szerveztünkben tízezer szám vannak különféle fehérjék. Hogyan tesz különbséget az immunrendszer a saját és az idegen között? A kérdés annál indokoltabb, mert a saját és az idegen fehérje gyakorta nagyon hasonló. Bár a kérdés még nem tisztázott, valószínű, hogy két mechanizmusnak van szerepe a saját és az idegen antigének közötti különbségtételben. (i) A *klonális deléció* értelmében azok a még éretlen B sejtek, amelyek a csontvelőben saját antigénnel találkoznak a programozott sejthalál "módszerével" elpusztulnak. (ii) Vannak olyan ún. szuppresszor T_S sejtek, amelyek „ismerik” a szervezet saját antigénjeit. . Ők akadályozzák meg, hogy a B és a T_H sejtek egymásra találjanak, és azok a B sejtek aktiválódjanak, amelyek a saját antigén ellen termelhetnének ellenanyagokat. Bár a naponta képződő 10^8 B limfocita mintegy 90%-a a fenti két mechanizmus miatt elpusztul, mégis oly’ sok különféle B sejt érik meg szervezetünkben, hogy egyetlen antigén sem kerülheti el az immunrendszer figyelmét. Olykor mégis megesik, hogy az immunrendszer a saját antigént idegenként ismeri fel, megtámadja, és ún. autoimmun betegség alakul ki.

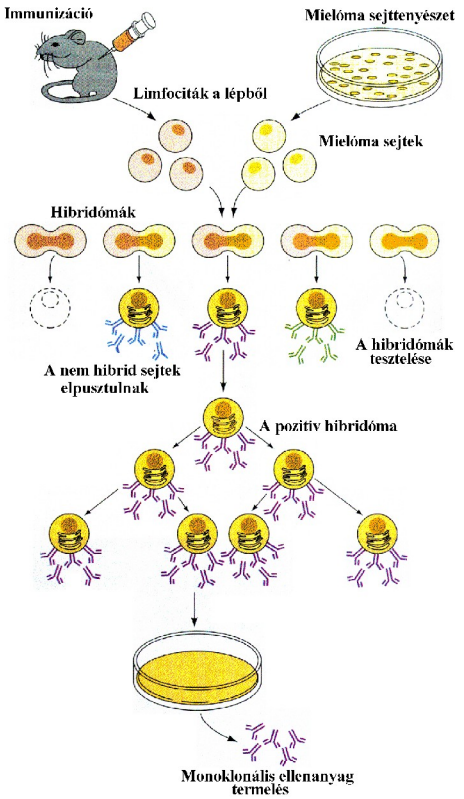
Az ellenanyagok szerkezete

Milyen molekulák az ellenanyagok? Hogyan ismerték meg őket? Az ellenanyagok vagy immunglobulinok (Ig) szerkezetét G. A. Edelman és R. M. Porter tárta fel az 1960-as években. Az ellenanyag molekulák fehérjék, és őket egyenként két azonos nehéz, valamint két azonos könnyű lánc alkotja (24.7. ábra). A nehéz és a könnyű láncok tömege kb. 55 és kb. 23 kDa. A nehéz láncokat és a könnyű láncokat diszulfid hidak kötik össze, ugyanúgy, mint a nehéz és a könnyű láncokat. A nehéz és a könnyű láncnak egyaránt van konstans és variábilis része. A variábilis részek biztosítják az antigén specificitást, a konstans rész pedig az immunglobulin típusát, osztályát (24.2. táblázat). Vannak olyan IgD, IgM, IgG és IgA molekulák, amelyek variábilis, antigén specifikus részei azonosak, a konstans részük viszont különböző. A különféle típusú molekulák az ún. *osztályváltás* során képződnek.



24.7. ábra. Egy immunglobulin molekula szerkezete.

A monoklonális ellenanyagok



24.8. ábra. Eljárás monoklonális ellenanyag készítésére

C. Milstein és G. Köhler az 1970-es években dolgozta ki azt az eljárást, amely alapján ún. *monoklonális ellenanyagok* készíthetők. A módszer lényege a következő. Egy-egy plazmasejt csak egyféle ellenanyagot termel, de csak rövid él. A mielóma sejtek bizonyos típusai viszont bár korlátlanul osztódnak, nem termelnek ellenanyagot. A kétféle sejt fúziója nyomán képződő ún. *hibridóma* sejtek örökéletűek, és csak egyféle ellenanyagot termelnek. Immunizáljunk egereket pl. kevéske kobratoxinnal (24.8. ábra). A B sejtek némelyike a klonális szelekció során felismeri a kobratoxint, és plazmasejtté differenciálódik. Vegyük ki az egér lépét, a limfociták gyülekezési helyét, és izoláljunk belőle limfocitákat. Fuzionáljuk az izolált limfocita sejteket daganatos plazmasejtekkel, és készítsünk hibridómákat. Tegyük a sejteket úgy kis edénykékbe, hogy mindegyikbe egy-egy hibridóma kerüljön. Néhány nap multán vizsgáljuk meg, hogy a hibridómák melyike termel ellenanyagot az antigén ellen. Minthogy az ellenanyagot termelő valamennyi hibridóma sejt egyetlen plazma sejt leszármazottja (klónja), az ellenanyagot szokás monoklonális ellenanyagnak nevezni. A megfelelő hibridóma sejt utódsejtjei tápfolyadékban korlátlan mértékben elszaporíthatók, és nagy mennyiségben termelnek ellenanyagot. Az ellenanyag pl. passzív immunizáció során "kisegítheti" annak az embernek a szervezetét, akit pl. kobra mart meg. A monoklonális ellenanyagok használata forradalmasította a diagnosztikai lehetőségeket, hisz' velük nyomnyi mennyiségű anyagok detektálhatók, pl. a Western blot, az ELISA (angolul: enzyme-linked immuno adsorbent assay), az immuncitológia vagy a FISH (angolul: fluorescence in situ hybridization) technikákkal.

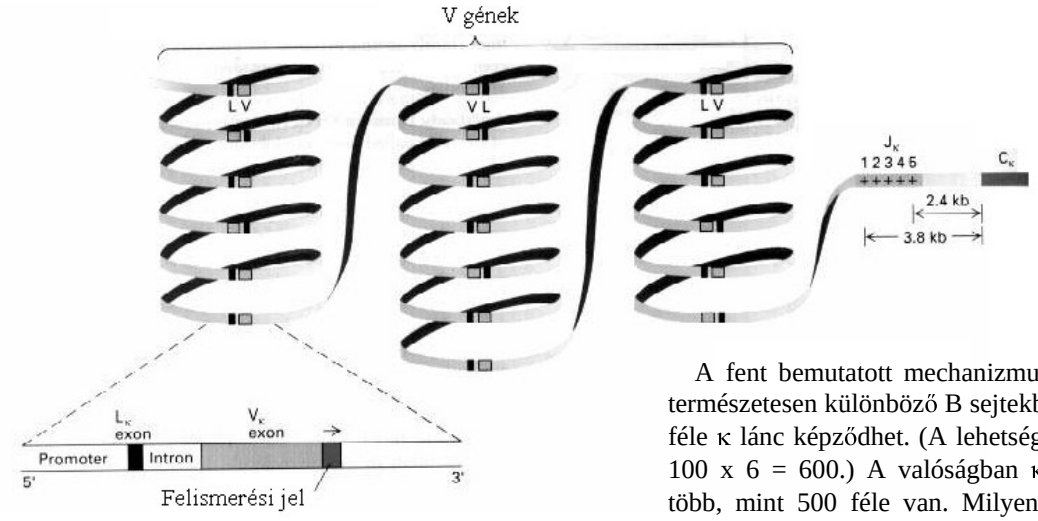
Az ellenanyagok sokféleségének genetikai alapjai

Minthogy az ellenanyagok nehéz és könnyű lánca is fehérje, nyilvánvaló, hogy szintézisüket gének kódolják. Melyek az immunglobulinokat kódoló gének jellegzetességei? Szervezetünkben életünk során kb. 10^{11} különféle ellenanyag képződik, a nehéz és a könnyű láncok kombinálódásával. Az ellenanyagok sokfélesége meglepő, hisz' a humán genomot mindössze" csak kb. $3x10^9$ bázispár alkotja. Hogyan lehet a $3x10^9$ bázispárból álló genommal úgy kódolni 10^{11} különféle ellenanyag képződését, hogy más genetikai funkciókra is maradjon kódoló DNS?

Mint korábban említettük, egy B sejt felszínén csak egyféle antigén receptor van. Lévén a B sejtek diploidok arra számíthatnánk, hogy felszínükön az anyai és az apai eredetű allélok termékei egyaránt jelen vannak. A várakozásokkal szemben egy B sejt felszínén csak egyfajta antigén receptor van. (De nagyon sok kópiában.) Annak oka, hogy csak az egyik allél terméke jelenik meg az ún. *allélkizárás*: a B sejt differenciálódása során az Ig molekulák szintézisét kódoló génkomplexek egyike hetero-kromatinizálódik, inaktiválódik, a másik aktív marad. Az inaktiváció olyan mechanizmus szerint történik, amint ahogy az egyik X kromoszóma inaktiválódik (és képződik Barr test) a gerincesek XX embrióiban. (Lásd a 12. fejezetet).

Az ellenanyagok csillagászati sokfélesége a gének átrendeződése, és a az ún. hipermutabilitás eredményeként alakul ki. Azokban a csírasejtekben, amelyek csontvelőben vannak, és amelyek leszármazottaiból a B sejtek differenciálódnak, három génkomplex van. A könnyű láncok képződését két génkomplex kódolja: a κ láncok képződését kódoló a 2. (24.9. ábra), a λ láncok képződését kódoló a 22. kromoszóma része. A nehéz láncok képződését kódoló gének a 14. kromoszóma részei.

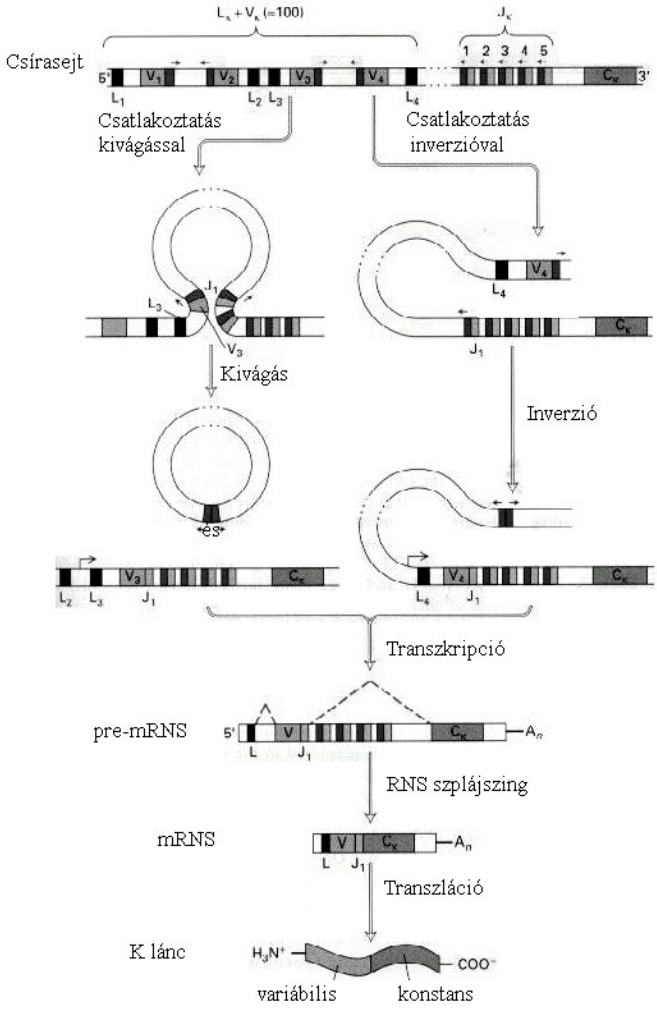
Az a funkcionális gén, amely a κ könnyű láncok képződését kódolja azokból a DNS szakaszokból alakul ki, amelyek a 2. kromoszóma DNS-ében csaknem 800 kbp-nyi részt foglalnak el (24.9. ábra). A 740 kbp-nyi szakaszon tandem elrendeződésben mintegy 100 ún. V_κ gén van. A V_κ gének valamelyike a DNS átrendeződése után annak a funkcionális génnek lesz az a része, amely a κ jelű könnyű lánc variábilis részét kódolja. Egy-egy V_κ gén kb. 400 bp hosszú, és mintegy 7 kbp-nyira van a szomszédjától (24.9. ábra). A 100 V_κ géntől 3’ irányban 20 kbp-nyira öt ún. J_κ, „csatlakozó” (joining) gén van. Egy-egy J_κ gén mindössze 30 bp-ból áll. Az öt J_κ gén együtt 1,4 kbp-nyi DNS-t foglal el. Kissé lentebb (3’ irányban) 2,4 kbp-nyira következik az egyetlen C_κ gén, amely a κ lánc konstans részét kódolja (24.9. ábra). Miként alakul ki az itt említett génekből az a funkcionális gén, amely egyfajta κ lánc képződését kódolja?



24.9. ábra. Azoknak a géneknek az elrendeződése az ember gonomjában, amelyekből az a funkcionális gén alakul ki, amely az immunglobulinok κ típusú könnyű láncát kódolja. Az ábra bal alsó oldala a egy $V_κ$ gén szerveződését mutatja.

A B sejt érése során a fent említett DNS átrendeződik. Az átrendeződés során a $V_κ$ gének egyike a $J_κ$ gének valamelyikéhez csatlakozik. A csatlakozás véletlenszerű: bármely $V_κ$ gén bármely $J_κ$ génhez csatlakozhat. A csatlakozást egy ún. *hely-specifikus rekombináz* enzim végzi. A hely-specifikus rekombináz két ún. felismerési helyen kapcsolódik a DNS-hez. Az egyik felismerési hely az egyik „kiválasztott" $V_κ$ gén 3' végénél van (24.9. ábra), a másik valamely $J_κ$ gén 5' végénél. A rekombinációnak két eredménye lehet. (i) Ha a csatlakozó $V_κ$ és $J_κ$ gének iránya azonos a DNS-ben, a két gén közötti szakasz kivágódik, és miközben egy kis deficiencia képződik, kialakul a κ lánc képződését kódoló gén (24.10. ábra). (ii) Ha a csatlakozó $V_κ$ és $J_κ$ gének iránya ellentétes, a helyspecifikus rekombináz tevékenységének eredményeként egy inverzió képződik. Bármely esemény is következik be, egy olyan új gén alakul ki, amelyben egy $V_κ$, egy $J_κ$ és a $C_κ$ gének egyetlen funkcionális génné egyesülnek. Az újonnan kialakult gén az immunglobulinok könnyű láncának κ típusát kódolja. (Az átrendeződésből kimaradt gének vagy elvesznek, vagy inakiválódnak,) A $V_κ$, a $J_κ$ és a $C_κ$ szakaszok egyesülésük után közösen íródnak át, miközben pre-mRNS molekulák képződnek. A pre-mRNS-ek szplájszingja során képződnek azok az mRNS molekulák, amelyek alapján a κ jelű fehérje molekulák szintetizálódnak. A κ láncoknak variábilis és konstans részük van (24.7. és 24.10. ábrák). (A $J_κ$-nak megfelelő fehérje szakasz is része a variábilis régiónak.)

A fent bemutatott mechanizmus eredményeként - természetesen különböző B sejtekben - 100 x 5 = 500 féle κ lánc képződhet. (A lehetséges λ láncok száma 100 x 6 = 600.) A valóságban κ láncokból sokkal több, mint 500 féle van. Milyen okok miatt? A κ láncoknak a vártnál nagyobb változatossága három további esemény következménye.

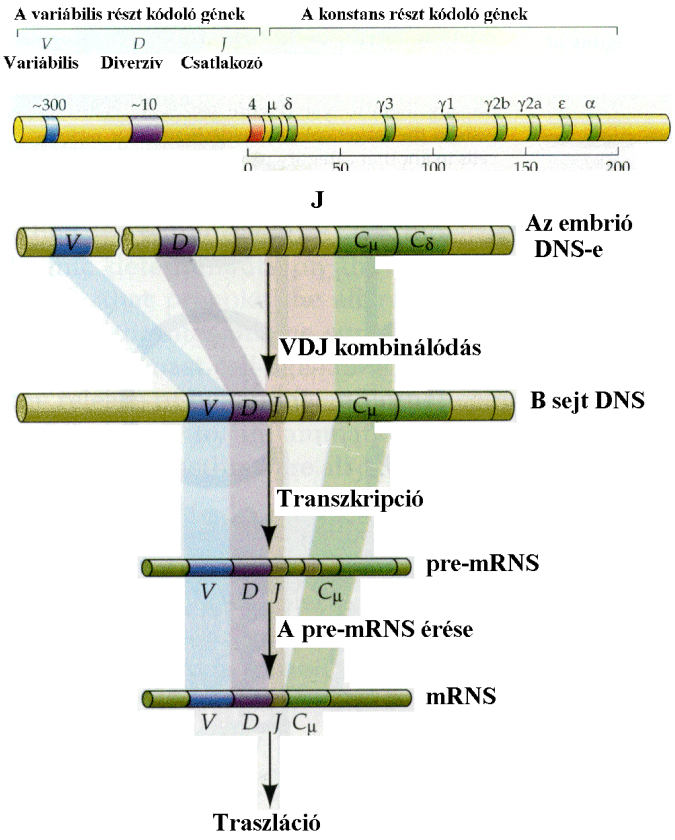


24.10. ábra. A κ könnyű immunglobulin láncot kódoló gén kialakulásának, és a κ lánc képződésének mechanizmusa.

(1) A V_κ és a J_κ szakaszok egyesülése pontatlan: az átrendeződés során a V_κ, és a J_κ gének csatlakozó részeiből különböző számú nukleotida vész el.
(2) Sőt, a V_κ és a J_κ szakaszok csatlakozása előtt egy ún. terminális transzferáz enzim a még szabad DNS végekhez véletlenszerű sorrendben nukleotidokat illeszt. Aligha véletlen, hogy a fenti két esemény az újonnan képződő génnek pontosan azt a szakaszát érinti, amely az immunglobulinnak azt a részét kódolja, amely az antigénnel kapcsolódik. Az előbb említett események véletlenszerűen történnek, és minthogy az újonnan képződő génnek azt a részét érintik, amely a képződő mRNS nyitott leolvasási keretét kódolja nem meglepő, hogy a V_κ+J_κ csatlakozások 2/3-ad része olyan leolvasási keretet eredményez, amely nem teszi lehetővé teljes hosszúságú κ láncok képződését. Bár a fenti „megoldás" pocsékolásnak tűnhet, a κ (és a többi) láncok nagy változatossága mégis „megéri" a szervezetnek, hogy a B sejtek 2/3-a eleve alkalmatlan annak a funkciónak az ellátására, amelyért képződött.
(3) Az immunglobulin génekben a mutációk gyakorisága nagyságrendekkel magasabb, mint a DNS egyéb részeiben. Amíg a spontán mutáció gyakorisága kb. 10^{-9}/bázispár/replikáció, addig az immunglobulinokat kódoló gének képződése során a mutációk gyakorisága 10^{-3}(!)/bázispár/replikáció. Az ún. hipermutabilitás tovább fokozza az immunglobulinok sokféleségét.

Az a mechanizmus, amely alapján a nehéz láncok képződnek meglehetősen hasonló a fent elmondottakhoz. A géncsaládban emberben nagyjából 300 V (variábilis), 10 D (diverzív), 4 J (kapcsoló, joining) és 8 C (konstans) gén van (24.11. ábra). A nehéz láncot kódoló funkcionális gén képződése során egy-egy véletlenszerűen kiválasztott V, D és J szakasz csatlakozik a fent bemutatott séma szerint, miközben kialakul a nehéz láncot kódoló funkcionális génnek az a szakasza, amely a variábilis részt kódolja. (A többi V, D és J gén vagy elvész, vagy inaktiválódik.) Az új gén variáblis részéhez a DNS-nek az a szakasza csatlakozik, amelynek része a nyolc ún. konstans gén (24.11. ábra). Az újonnan képződött gén transzkrip-ciója nyomán először pre-mRNS képződik. A pre-mRNS érése során kivágódnak a felesleges szaka-szok. Az érett mRNS pedig csak egyfajta nehéz lánc szintézisét kódolja (24.11. ábra)

A nehéz láncokat kódoló DNS szakaszok véletlenszerű kombinációja alapján 100 V.x 30 D x 6 J = 1800 különféle nehéz lánc képződhet. (Természetesen egy B sejtben csak egyféle.) A nehéz és a κ könnyű láncok véletlenszerű kombinációja alapján 18000 x 500 = 9 millió különféle immunglobulin molekula képződhet. A nehéz és az λ típusú könnyű láncok kombinációjaként pedig 1800 x 600 = 10,8 millió. Összesen tehát csaknem 20 millió olyan immunglobulin molekula képződhet, amelyek különböző antigénekkel képesek kapcsolódni. Ha azokat a mechanizmusokat is figyelembe vesszük, amelyek a variabilitást fokozzák, érthető, hogy milliárdszám képződnek a szervezetünkben olyan antigén receptorok, amelyek biztosítják az immunrendszer hatékonyságát a patogének elleni küzdelemben.



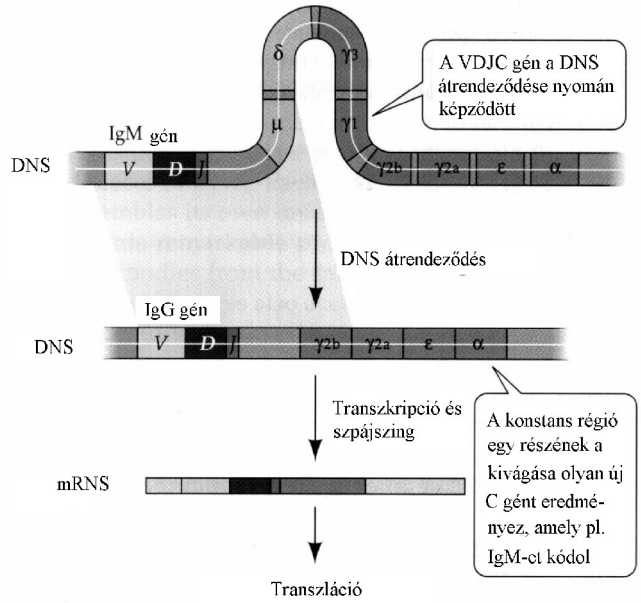
24.11. ábra. A V, a D, a J valamint a C gének elrendeződése a humán genomban (felül). Annak a DNS átrendeződésnek a sematikus ábrázolása, amely nyomán az a funkcionális gén kialakul, amely az immunglobulin molekula nehéz láncát kódolja (alul.).

Az osztályváltás molekuláris alapjai

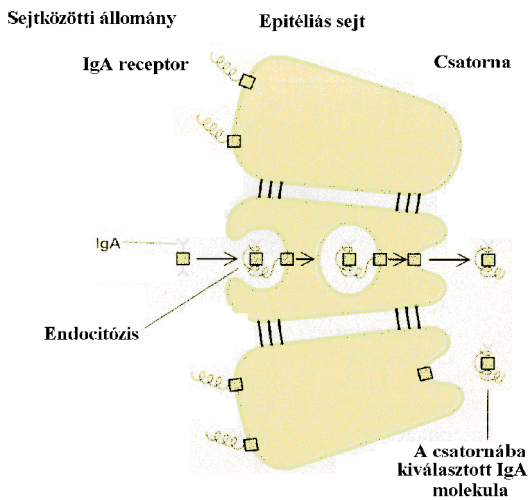
A B sejt életének korai szakaszában először IgM típusú receptor molekulák képződnek. Az IgM molekulák átívelnek a sejthártyán, és az antigén felismerésben töltenek be fontos szerepet (24.3. ábra, 24.2. táblázat). Az IgM molekulák nehéz láncának konstans részét az újonnan kialakult gén konstans régiójának μ szakasza kódolja (24.12. ábra). Kérdés, hogy miként lesz a sejthártyán átívelő IgM molekulából olyan, pl. IgG molekula, amely miközben megőrzi antigén specificitását, a vérplazma részévé válik.

A B sejt érése és az elsődleges immunválasz során a gén konstans részének különféle szakaszai kihurkolódnak és elvesznek, lehetővé téve, hogy a génnek az a szakasza, amely a nehéz lánc variábilis részét kódolja a konstans régió újabb szakaszaival (δ, γ, ε vagy α) kombinálódjon, és az IgM-től eltérő típusú (IgD, IgG, IgE vagy IgA) ellenanyag molekulák képződjenek, osztályváltás történjen (24.12. ábra). (A folyamat irreverzibilis.) Az osztályváltás eredménye az, hogy miközben az ellenanyag megőrzi antigén specificitását, megvál-

tozik funkciója. Amíg pl. az IgG a vérplazma alkotója, addig az IgA-nak olyan képessége van, hogy a tejmirigy, valamint a test némely csatornáját burkoló sejtek fel tudják venni, a sejten át tudják szállítani, majd a tejbe illetve a testváladékba üríteni az IgA molekulákat (24.13. ábra).



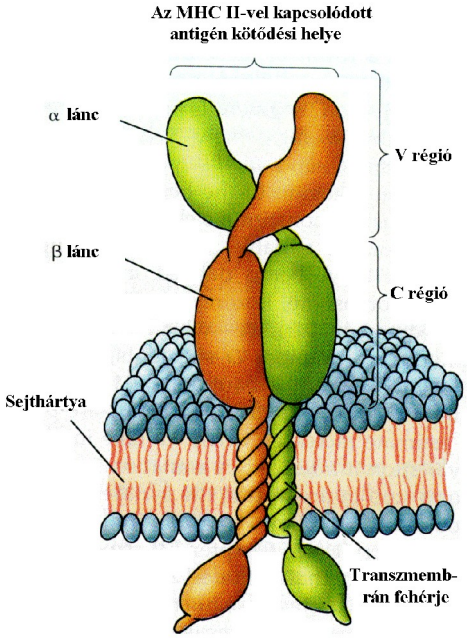
24.12. ábra. Az osztályváltás mechanizmusa.



24.13. ábra. Az IgA molekulákat alkalmas receptort tartalmazó sejtek, felveszik, átszállítják a sejteken, és a sejt túlsó oldalán pl. a tejmirigy csatornába ürítik.

T sejtek és a sejtes immunválasz

A B limfociták legnagyobb mennyiségű terméke, az IgG, a vérplazmában oldott állapotban küzd a patogének ellen, és az ún. humorális immunrendszer fontos komponense. A T sejtek, amelyekről itt csak említést teszünk, a sejtes (celluláris) immunrendszert alkotják. A T limfociták patogének ellen küzdő eszközei a T sejt receptorok (24.14. ábra). A T sejt receptorok a T sejtek sejthártyáján átívelő fehérje molekulák (24.14. ábra). A T sejteknek három típusát szokás elkülöníteni. (i) A T_C citotoxikus T sejtek elpusztítják a vírussal fertőzött és a daganatos sejtek zömét. (ii) A T_H sejtek az immunválasz kialakulását segítik (24.5. ábra). (iii) A T_S szuppresszor T sejtek gátolják a B és a T sejtek funkcióját, a saját-idegen antigének megkülönböztetésének fontos eszközei. A T sejt receptorok ahhoz hasonló módon alakulnak ki, mint az Ig molekulák.



24.14. ábra. A T sejt receptorok olyan antigén-specifikus fehérje molekulák, amelyek a T sejtek sejthártyájába illeszkednek.

Az immunrendszer betegségei

Az immunrendszer betegségeit eredetük alapján a következően szokás osztályozni.

1. Az *immundeficiencia* a B és/vagy a T sejtek hiányát jelenti vagy öröklődő vagy, szerzett ok miatt. A HIV (humán immundeficiencia vírus) a szerzett immundeficiencia szindrómát (AIDS) okozza. A HIV vírus fertőzés következményeként a T_H sejtek, membránjukban a HIV vírus köpenyfehérjével, összeolvadnak, elvesztik funkciójukat, és végeredményben megszűnik a szervezet védekező képessége.
2. A limfociták különféle típusainak korlátlan osztódása nyomán alakulnak ki a leukémiák. A korlátlan osztódás nemcsak egy onkogén tevékenysége nyomán alakulhat ki, hanem úgy is, hogy meghibásodik az a mechanizmus, amely programozott sejthalállal pusztítaná el a limfocitákat, miután teljesítették funkciójukat.
3. Az autoimmun betegségek alapja az, hogy az immunrendszer a saját antigéneket idegenként ismeri fel, és eliminálni igyekszik a szervezetből. A reumaszerű izületi gyulladás, a farkasfoltosság, a bélhurut bizonyos fajtái, az izomgyengeség és a sclerosis multiplex bizonyos típusai az autoimmun betegségek legismertebb példái.
4. Az allergia az IgE molekulák rendellenes működésének a következménye.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az evolúció során az élőlények olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyekkel védik testük integritását a patogének ellen. A nem-specifikus rendszer különféle elemei biztosítják a folyamatos védelmet. Az immunrendszer állandó készenlétben áll: a B és a T sejtek termelése során állandóan, véletlenszerűen és bőséges választékban készít olyan fehérjéket, amelyek a patogének elleni specifikus védelem eszközei. A specifikus védekezési rendszer jellegzetességeivel részletesen az immunológia foglalkozik. Itt csupán az immunrendszer néhány mozzanatát vettük szemügyre. Az immunrendszer molekuláris funkcióinak megismerése alapján nemcsak különféle betegségek gyógyítása vált lehetségessé (gondoljunk csak a szervátültetésekre), hanem sok betegséget meg lehet előzni. Az ellenanyagok használata révén pedig olyan technikákat lehetett kifejleszteni és alkalmazni, mint pl. a Western blot, az ELISA vagy az immunhisztológia.

FORRÁSOK

1. Purves, W.K. és mtsi., Life the Science of Biology, 400-428, 1998.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 70-71, 189-191, 315-319, 2000.

25. AZ IDEGSEJTEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA.

Neuronok és szinapszisok. Membrán és akciós potenciál. Ioncsatornák. Neurotranszmitterek és receptorok.

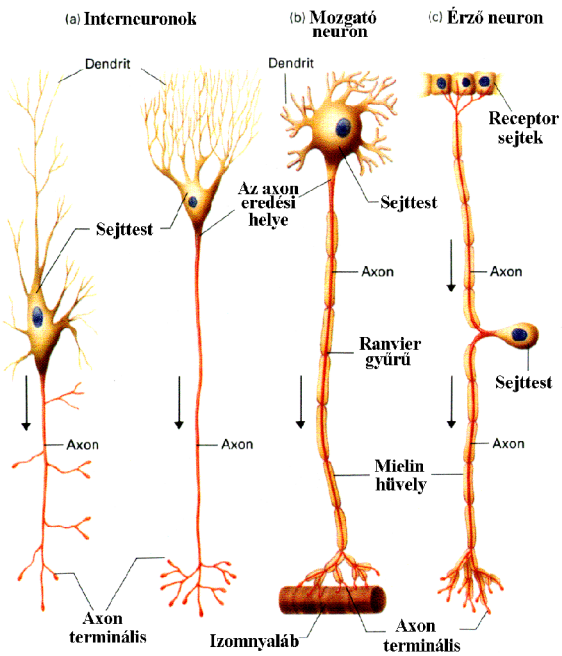
A fejezetet Szabad János állította össze 2006. őszén

BEVEZETÉS

Az élőlényeket folyamatosan érik a külső és a belső környezetből érkező jelek, ingerek. Az élőlények a jeleket felfogják, feldolgozzák, majd olyan válaszokat szerveznek, amelyek alapján tovább élhetik életüket. A hormonális és az immunrendszer viszonylag lassan reagál a változó környezeti feltételekre. A gyors reakciókat az idegrendszer szervezi. Az idegrendszer az állatvilágra jellemző szervrendszer. Alapvető funkcionális egysége a neuron. Az idegsejtek szinapszisokkal érintkeznek más sejtekkel, végzik tevékenységüket. Melyek az idegsejtek jellemzői? Hogyan továbbítanak jeleket? Mi a jelek természete? Milyen események játszódnak le egy idegsejt funkciója során? A jelen fejezet célja az idegsejtek molekuláris funkciójának megismerése a fenti kérdések megválaszolásán át.

Az idegsejt

Az idegsejt az idegrendszer funkcionális egysége (25.1. ábra). Az ember idegrendszerét kb. 10^{12} neuron alkotja, legtöbbjük interneuron. Bár alakjukat illetően módfelett különbözőek, közös jellemzőjük, hogy valamennyiüknek van (i) sejtteste, (ii) nyúlványaik, axonok és dendritek, és (iii) szinapszisokkal kapcsolódnak más sejtekhez. A sejtalkotók funkciói rendre a következők.

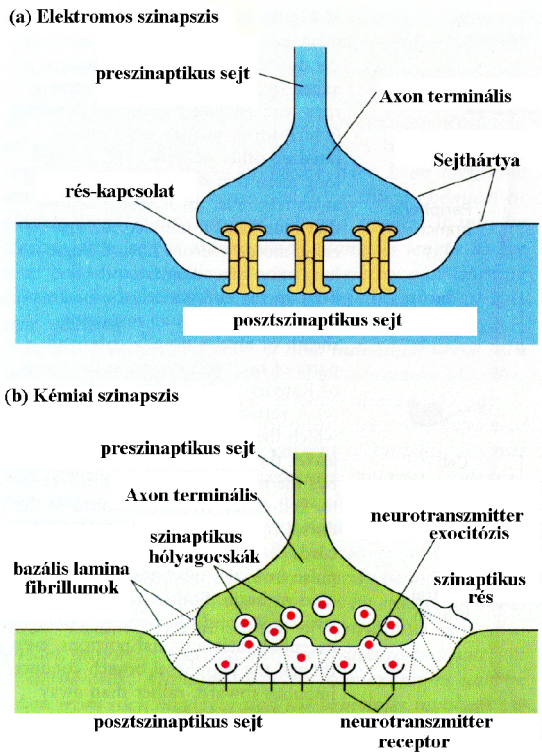


25.1. ábra. Az ember idegsejtjeinek jellegzetes típusai. A nyilak az ingerület vezetésének irányát mutatják.

A **sejttestben** szintetizálódik minden olyan molekula, amely az idegsejt alkotója, bármilyen messze is legyen a sejt testétől. A sejttestben szintetizálódott molekulák az axonális transzport során kerülnek pl. az axon terminálisba, illetve az axon terminálisból vissza a sejttestbe. Az axonális transzport folyamán kinezin motor molekulák szállítják a különféle anyagokat a sejttestből az axonok végeibe, illetve dineinek vissza a sejt testi részébe. (Lásd a 19. előadás anyagát.) A sejttest egy kis komputer: a beérkező jeleket analizálja, átalakítja, és szükség szerint akciós potenciált generál. Az akciós potenciál képződésében különleges szerepe van az axon eredési helyén levő dombocskának (25.1. ábra).

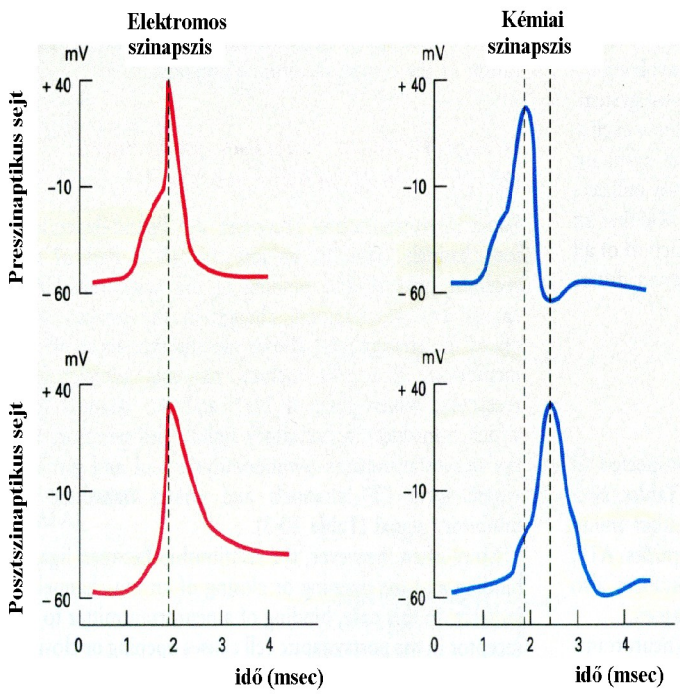
Az **axonok** és a **dendritek** a mikrotubulusok képződése során kialakuló olyan nyúlványok, amelyeken át a neuron más sejtekhez kapcsolódik. A dendritek jeleket gyűjtenek és továbbítanak a sejttesthez. Az axonok jeleket továbbítanak a sejttesttől a szinapszisokig. Az axonokat gyakran Schwann sejtek nyúlványai borítják. (Részletesebben lásd az anatómia és az élettan előadások anyagát.)

A **szinapszisok** révén az idegsejtek egymással, az izmok vagy a mirigyek sejtjeivel teremtenek kapcsolatot. A szinapszisoknak két típusa van. (1) Az *elektromos* szinapszisok lényegében a rés-kapcsolatok (angolul gap junctions), közvetlen összeköttetést biztosítanak a sejtek között (25.2. ábra). Az elektromos kapcsolatokon a jel késedelem nélkül, de ugyanakkor változatlan formában jut egyik sejtből a másikba (25.3. ábra). Az elektromos szinapszisok különösen a hideg vízben élő halfajokban gyakoriak.



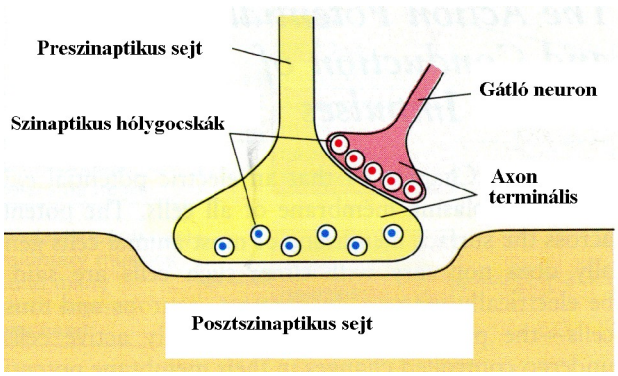
25.2. ábra. Egy elektromos és egy kémiai szinapszis szerkezete vázlatosan.

(2) A *kémiai* szinapszisokon kémiai jelekkel jut át az információ egyik sejttől a másikhoz. A kémiai szinapszis preszinaptikus részében (az axon terminális részben) apró szinaptikus hólyagocskákba vannak töltve az ún. *neurotranszmitter* molekulák (25.2. ábra). Az akciós potenciál megérkezte nyomán az axon végben megnő a Ca^{2+} koncentráció, a szinaptikus hólyagocskák tartalma exocitózissal a szinaptikus résbe ürül. A neurotranszmitter molekulák alkalmas receptorral kapcsolódnak, hogy aztán a jel a posztszinaptikus sejten haladjon tovább. Természetesen a hólyagocskák ürítése, a neurotranszmitter molekulák kapcsolódása a receptorral, a szignáltranszdukció időbe telik. Érthető, hogy jel a kémia szinapszisokon kb. 0,5 msec alatt jut át egyik sejtről a másikra (25.3. ábra). Ugyanakkor a kémiai szinapszisok lehetőséget biztosítanak a jel módosítására. Például, az ún. gerjesztő szinapszisok a posztszinaptikus sejt mebránjának depolarizációját okozzák. A gátló szinapszisok viszont hiperpolarizációt okoznak, gátolják az akciós potenciálok generálását. Sőt, a különféle szinapszisok kapcsolata valamint a neurohormonok is befolyásolhatják a szinapszisok funkcióit (25.4. ábra).



25.3. ábra. Akciós potenciál átvitele elektromos és kémiai szinapszisokkal egyik sejtből a másikra.

A kémiai szinapszisok további jellemzője, hogy egy axon végben többféle neurotranszmitter is lehet, bár egy szinaptikus hólyagocskában mindig csak egyféle neurotranszmitter van. A szinapszisokban olyan molekuláknak is vannak, amelyek a neurotranszmittereket elbontják, ismét „üzemképes” állapotba hozva a szinapszist. A neurotranszmittereket bontó enzimek közül alighanem az acetilkolin-eszteráz a legismertebb, az az enzim, amely nagy hatékonysággal bontja az acetilkolin molekulákat. A szinapszisokban elbomló molekulák újrahasznosításra ismét a sejtekbe kerülnek, ahol aztán vagy az axon végben, vagy a sejttestbe szállítás után válnak ismét használhatóvá.

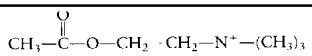
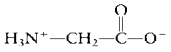
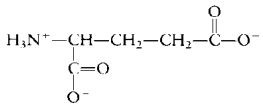
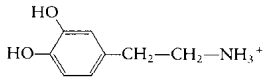
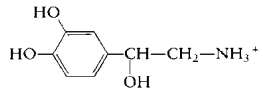
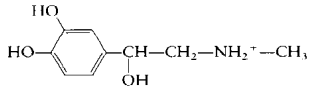
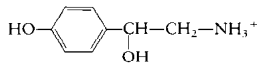
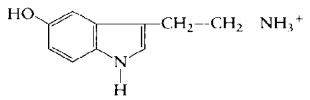
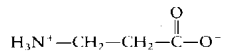
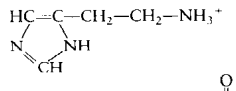
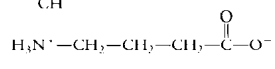
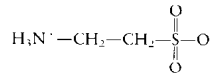


25.4. ábra. A szinapszisok kapcsolata módosíthatja a szinapszisok funkcióit.

A neurotranszmitterek

A neurotranszmitterek olyan szerves molekulák, amelyek a szinaptikus hólyagocskákból kavantumokban ürülnek a szinaptikus résbe, hogy ott az alkalmas receptorral kapcsolódva kifejtsék hatásukat. Kémiai természetüket illetően a neurotranszmitterek sokfélék (25.1. és 25.2. táblázat). Vannak közöttük viszonylag egyszerű szerves molekulák, mint pl. az acetilkolin, a glicin, az ATP és más purin valamint aminosav származékok. Más neurotranszmitterek peptidek, és egyben neurohormonként is funkcionálnak. A neurohormonok módosítják az idegsejtek válaszoló képességét a neurotranszmitterekre. Az adrenalin és a noradrenalin nemcsak hormon, hanem neurotranszmitter is. Lényegében nagyon sok ligand-receptor rendszer alkalmas szinapszis funkció betöltésére, ha a szinapszis rendelkezik a ligandot (a neurotranszmittert) bontó képességgel is.

25.1. táblázat. A neurotranszmitterek egyik csoportja: kis molekulák.

Neurotranszmitter	Kémiai szerkezet	A neurotranszmitter jellege
Acetilkolin		
Glicin		**Aminosav**
Glutaminsav		**Aminosav**
Dopamin		**Tirozin származék**
Noradrenalin		**Tirozin származék**
Adrenalin		**Tirozin származék**
Oktopamin		**Tirozin származék**
Szerotonin		**Triptofán származék**
β- alanin		**Aszparaginsav származék**
Hisztamin		**Hisztidin származék**
γ-amino-vajsav (GABA)		**Glutaminsav származék**
Taurin		**Glicin származék**

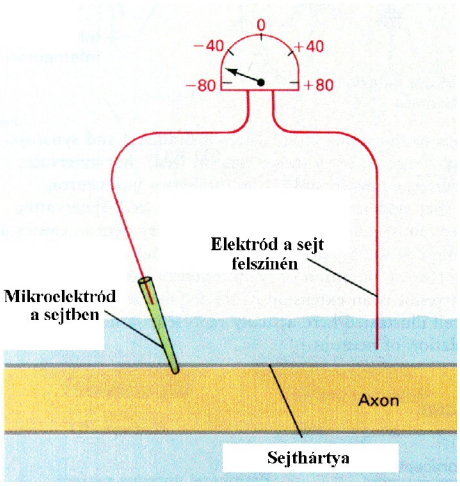
25.2. táblázat. A neurotranszmitterek másik csoportja neuropeptidként is funkcionál.

Neurotranszmitter	Felépítés*
β-endorfin	YGGFMTSEKSQTPLVTLLFKNAIILNAYKKGE
Met-enkefalin	YGGFM
Leu-enkefalin	YGGFL
Szomatosztatin	AGCKNFFWLTFTSC
Luteinizáló hormont kiválasztó hormon	pEHWSYGLRPG–NH_2
Tirotropin kiválasztó hormon	pGUP–NH_2
Neurotenzin	PGLYENLPRRPYIL
Angiotenzin I	DRVYIHPFHL
Angiotenzin II	DRVYIHPF
Vazoaktív intesztinális peptid	HSDAVFTDNYTRLRLEMAVLLTLNSILN–NH_2

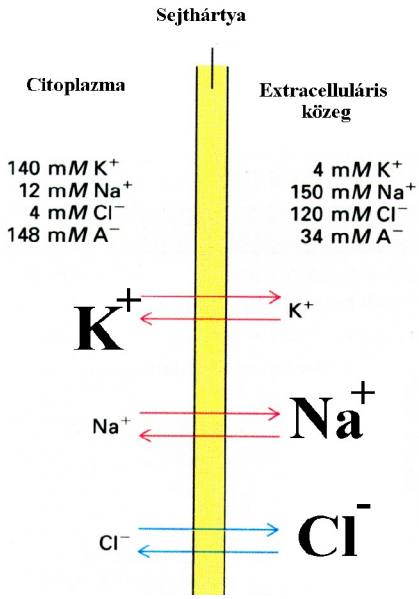
* Egybetűs aminosav kódok. A C-terminálishoz olykor –NH_2 csoport kapcsolódik. Az N terminális olykor pirol (p) gyűrűs szerkezetű. Az enkefalinok, a β-endorfinnal egyetemben az ún. természetes ópiátok. Az idegrendszerben termelődnek és a fájdalomimpulzusokat továbbító neuronok funkcióját gátolják. Az ópium és származékai, mint pl. a morfium, a természetes ópiátok hatását mutatják. Rendszeres használatunk során szenvedélybetegség alakul ki.

Membrán vagy nyugalmi potenciál

A nyugalmi állapotú neuronok citoplazmájának belseje negatív töltésű a sejt külsejéhez képest: a membrán belső és külső felszíne közötti elektromos feszültség mintegy –60 mV (25.5. ábra). A nyugalmi vagy membrán potenciál oka a kationok és az anionok egyenlőtlen megoszlása a sejthártya két oldalán (25.6. ábra). Az ionkoncentrációk és a Nernst egyenlet alapján számított ún. elektrokémiai potenciál (E) értéke –91 mV, jó egyezést mutat a mért membrán potenciál értékekkel. (A Nernst egyenlet $E = RT/ZF \times \ln K_k/K_b$, ahol K_k és K_b rendre az ion külső és belső koncentrációját jelöli, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, F a Faraday állandó, Z pedig a vegyérték.) A Na^+ és a K^+ ionok egyenlőtlen eloszlásáért azok a Na^+ - K^+ pumpák felelősek, amelyek a sejthártyába illeszkednek, és miközben ATP-t „fogyasztanak”, ciklusonként 3 Na^+ és két K^+ iont juttatnak át a membránon. (Lásd a 20.17. ábrát.)



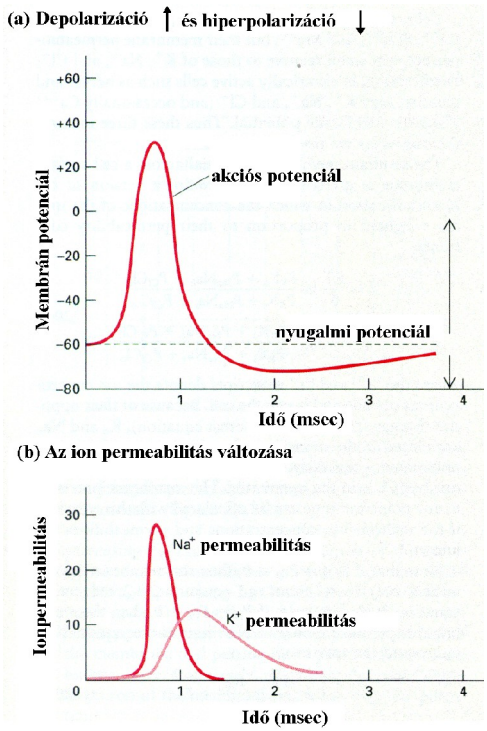
25.5. ábra. A membrán (nyugalmi) potenciál mérése.



25.6. ábra. Az anionok és a kationok koncentrációja különböző a sejthártya két oldalán. Az A^- jel elsősorban a fehérjék negatív töltéseit jelöli.

Az akciós potenciál

A membránpotenciál egy jel áthaladásnak pillanatában hirtelen lecsökken, a membrán depolarizálódik. Sőt, a membrán belseje rövid időre pozitív töltésűvé válik a sejt külsejéhez képest (25.7. ábra). A depolarizáció oka minden bizonnyal az, hogy az ionkoncentráció kiegyenlítődik a membrán két oldala között. A kérdés az, hogy vajon milyen esemény nyomán válik a membrán permeábilissé az ionokra?

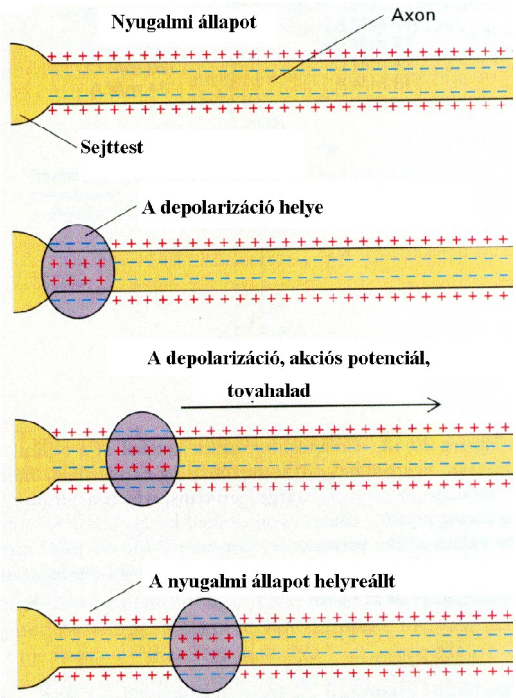


25.7. ábra. A membránpotenciál (a) valamint a membránon átáramló Na^+ és K^+ ionok mennyiségének (b) változása a membrán egy adott pontján az idő függvényében.

A magyarázat az ún. **feszültség-szabályozott ioncsatornákban** rejlik. A membrán depolarizációja nyomán ún. ion csatornák nyílnak ki. A Na^+ csatornákon Na^+ ionok ömlenek be passzív diffúzióval a sejtbe, a K^+ csatornákon át pedig K^+ ionok szöknek ki a citoplazmából. (Lásd 20. előadás anyagát.) Mivel a Na^+ és a K^+ csatornák a feszültség csökkenése nyomán nyílnak, funkcionálnak, feszültség-szabályozott (ion)csatornáknak nevezik őket. A csatornák mindössze 0,5-1,5 msec-ig vannak nyitva, majd zárulnak (25.7. ábra). Miközben nyitva van, egy Na^+ csatornán kb. hatezer Na^+ ion halad át. A Na^+ ionok áramlásával kapcsolatos áramerősség 10^{-12} amper. Miután zárultak a csatornák, néhány msec-ig hiperpolarizálódik a membrán mielőtt helyreáll a nyugalmi potenciál (25.7. ábra). A hiperpolarizáció oka a Na^+ - K^+ pumpák tehetetlenségében rejlik.

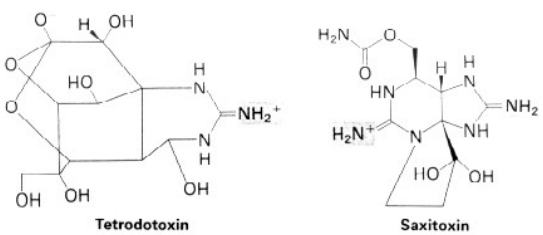
A membránpotenciál csökkenése nyomán a szomszédos Na^+ és a K^+ csatornák is nyílnak, és lecsökken a mebránpotenciál. Miközben a csatornák becsukódnak, a szomszédos csatornák nyílnak, csukódnak és így tovább (25.8. ábra). Végered-

ményben tehát egy depolarizációs hullám terjed végig az axon mentén. Az axon mentén végigterjedő membránpotenciál csökkenést nevezik **akciós potenciálnak**. Az akciós potenciál az a jel, amellyel az idegsejtek kommunikálnak. Hogyan keletkezik az akciós potenciál?



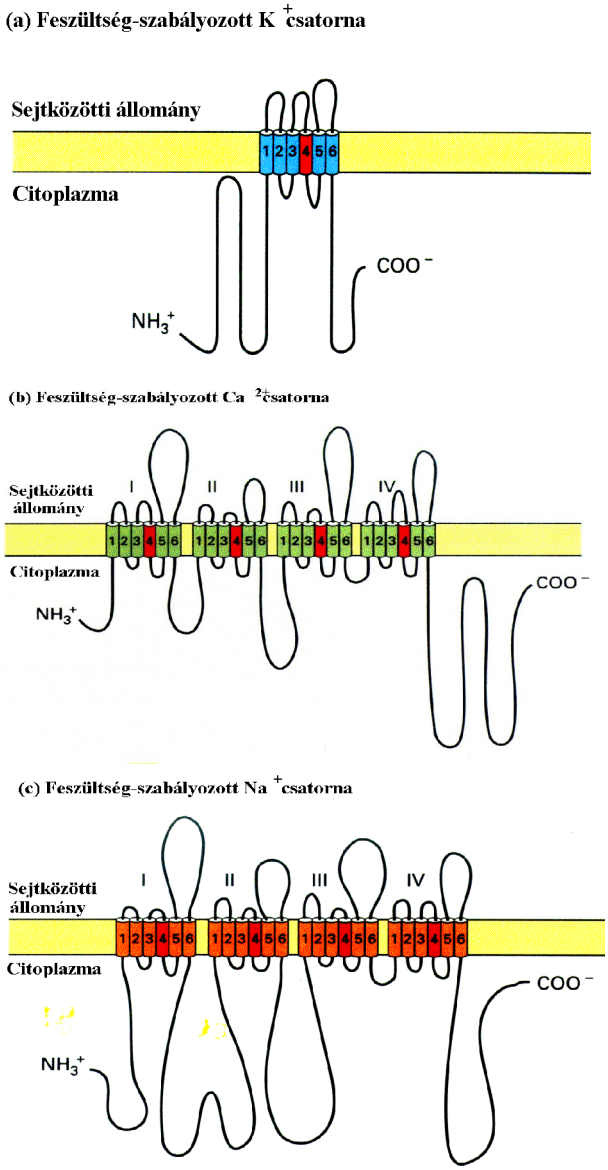
25.8. ábra. Az akciós potenciál az axon dombocskák tövében ered, és lényegében nem más, mint egy depolarizációs hullám tovaterjedése az axon mentén.

Az axonok eredési helyén - a dombocskákban - olyan speciális csatornák vannak, amelyek a sejttestben hozott döntések nyomán nyílnak, depolarizálják a membránt. A membrán depolarizációja vezet aztán a Na^+ és a K^+ csatornák nyílásához, a depolarizációs hullám, az akciós potenciál tovagördüléséhez (25.8. ábra). A tintahal 600 μm vastag óriás axonjának minden μm^2-én kb. 500 feszültség-szabályozott Na^+ csatorna van. A tintahal óriás axonján 12 m/sec (43,2 km/óra) sebességgel halad az akciós potenciál. A mielinnel burkolt axonokban az ún. Ranvier befűződésekben 10^4 Na^+ csatorna van μm^2-enként. A mielinnel burkolt axon mentén mintegy szökellve, gyorsan halad az kciós potenciál: egy 12 μm átmérőjű axon mentén 12 m/sec sebességgel.



25.9. ábra. A Na^+ csatornákhoz specifikusan kötődő két neurotoxin szerkezeti képlete.

A feszültség-szabályozott ioncsatornák szerkezete

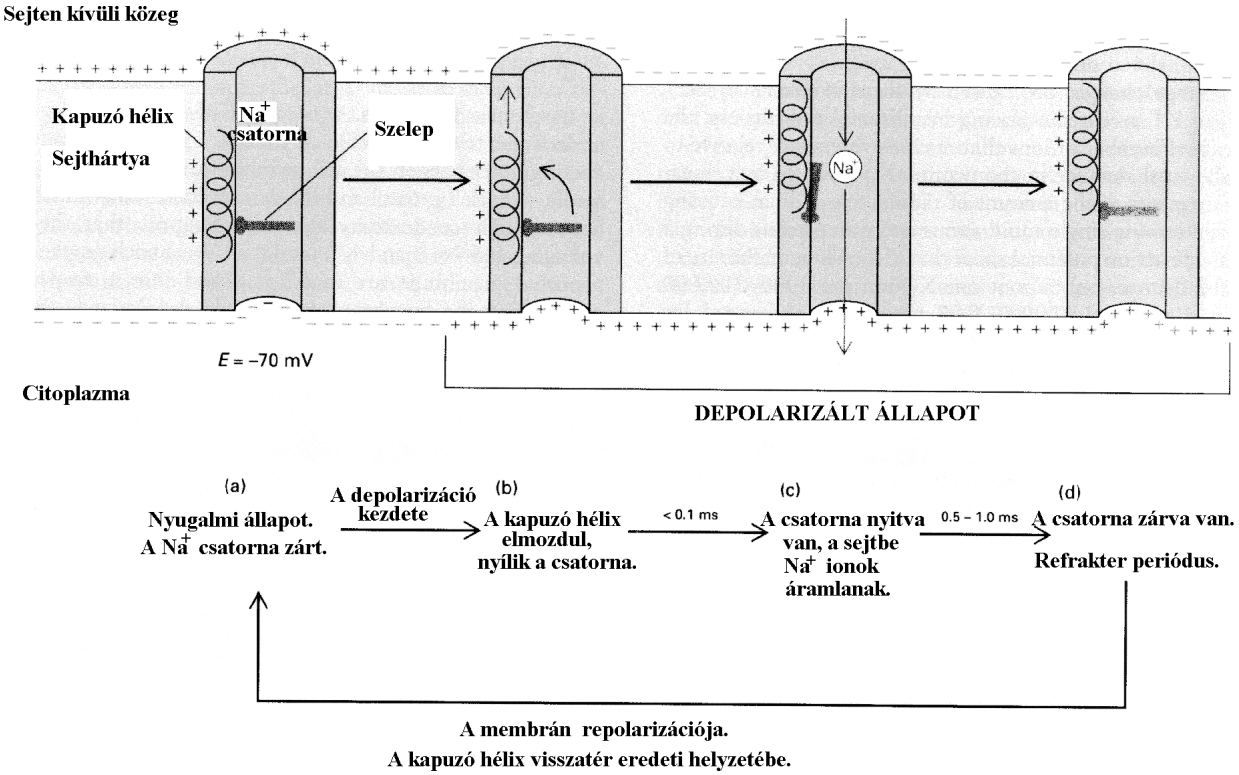


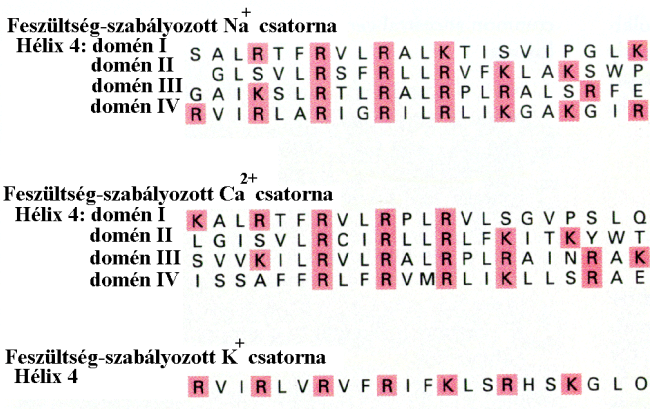
25.10. ábra. A feszültség-szabályozott ioncsatornák szerkezete.

A Na^+ csatorna szerkezetére a csatorna affinitás kromatográfiás tisztítása nyomán derült fény. Két neurotoxin, nevezetesen a fugu tengeri hal tetrodotoxinja, valamint egy vörös ostoros moszat saxitoxinja, specifikusan kötődik a Na^+ csatornákhoz (25.9. ábra). A neurotoxinnal kapcsolódó Na^+ csatorna fehérjék izolálhatók, tanulmányozhatók. A Na^+ csatorna egy kb. 250 kDa tömegű fehérje, 4x6 transzmembrán doménnal, sejten belüli és sejten kívüli szakaszokkal (25.10. ábra). A transzmembrán domének közül a 4., az ún. *kapuzó hélix* szerepe kitüntetett. A kapuzó hélix nyugalmi állapotban a membrán citoplazma felüli részében van (25.11. ábra). A depolarizáció hatására a kapuzó hélix a membránnak abba részébe ugrik, amely a sejten kívüli térrel határos. A kapuzó hélix helyváltoztatása közben a Na^+ csatorna kinyílik, rajta Na^+ ionok diffundálhatnak át. Mintegy 0,5 msec multán a kapuzó hélix eredeti helyére kerül, és közben a

csatorna zárul (25.10. ábra). A kapuzó hélixnek van egy ún. *refrakter periódusa*: néhány msec-ig nem reagál a membránpotenciál csökkenésre. A refrakter szakasz azért fontos, mert a depolarizáció (az akciós potenciál) nem haladhat visszafelé az axonon a sejttest felé. Természetes körülmények között az akciós potenciál az axon dombocskától az axon vég felé halad. A kapuzó hélix refrakter periódusa biztosítja tehát azt, hogy az axonok mentén az akciós potenciál csak egy irányba halad.

szerepére azokban a kísérletekben derült fény, amelyekben *in vitro* (hely-specifikusnak is nevezett) mutagenezis során a Na^+ csatorna gén lizin és arginin kódjait úgy változtatták meg, hogy töltés nélküli aminosavat kódoljon. A mutáns génről mRNS molekulákat képeztettek, majd a mutáns mRNS molekulákat az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petéibe injektálták (25.13. ábra). A mutáns mRNS transzlációja nyomán képződő fehérje molekulák a petesejt sejthártya részévé válnak, ahol funkciójuk az ún. patch-clamp technikával tanulmányozható. (A





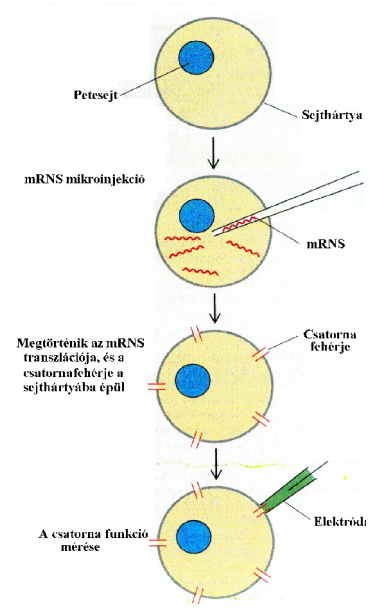
25.11. ábra. A kapuzó hélix szerepe egy Na^+ csatorna életében.

A kapuzó hélixek molekuláris analízise mutatta meg, hogy az α-hélix molekularész minden harmadik aminosava lizin (K), vagy arginin (R). A csatorna belsejébe tehát olyan aminosav oldalláncok nyúlnak, amelyeknek + töltése van (25.12. ábra). A + töltések

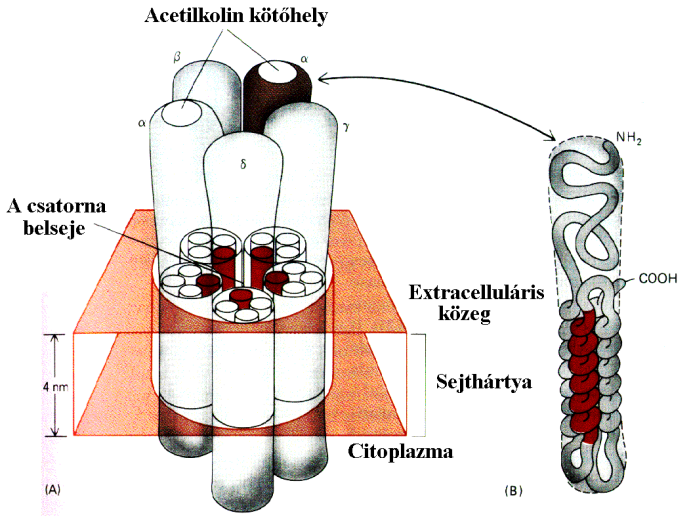
patch-clamp technika egy olyan kis folt területén képes mérni az átfolyó áram erősségét, amelyen mindössze egyetlen csatorna van.) A mutáns fehérjék vizsgálata megmutatta, hogy minél több lizint és arginint helyettesít neutrális aminosav, annál kevésbé funkcionál a Na^+ csatorna, bizonyítva a pozitív töltésű oldalláncú aminosavak szerepét nemcsak a kapuzó hélix, hanem a Na^+ csatornák életében.

A ligand-szabályozott csatornák

Világos, hogy a jel (akciós potenciál) továbbításában a feszültség-szabályozott csatornák szerepe alapvető. Mi történik a szinapszisokban? Hogyan alakul át a kémiai, neurotranszmitterek formájában jelenlevő jel olyan akciós potenciállá, amely a posztszinaptikus sejten tovaterjed? A szinapszisokban olyan ún. **ligand-szabályozott csatornák** vannak, amelyek a kémiai jeleket akciós potenciállá alakítják. Legjobban azoknak a csatornáknak a funkcióját ismerjük, amelyek működését az acetilkolin szabályozza. Itt a ligand-szabályozott csatornák két típusát ismerjük meg.



25.13. ábra. Módszer a mutáns Na^+ csatorna fehérjék funkciójának tesztelésére.

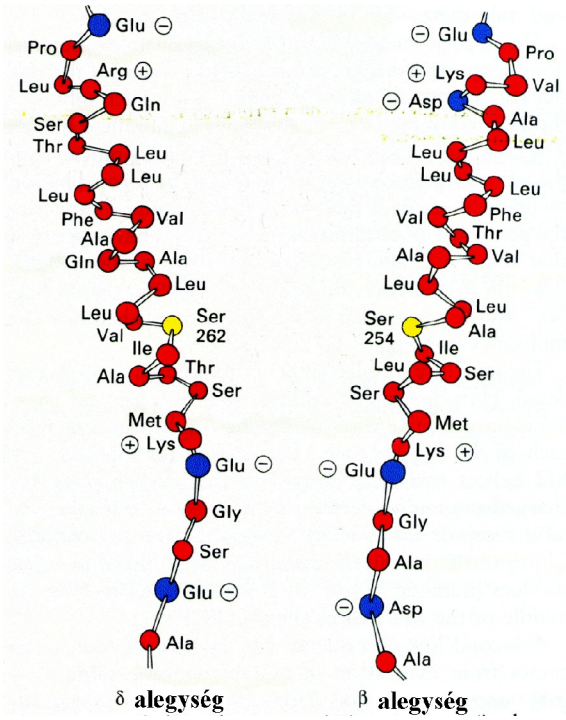


25.14. ábra. A nikotin típusú acetilkolin receptor.

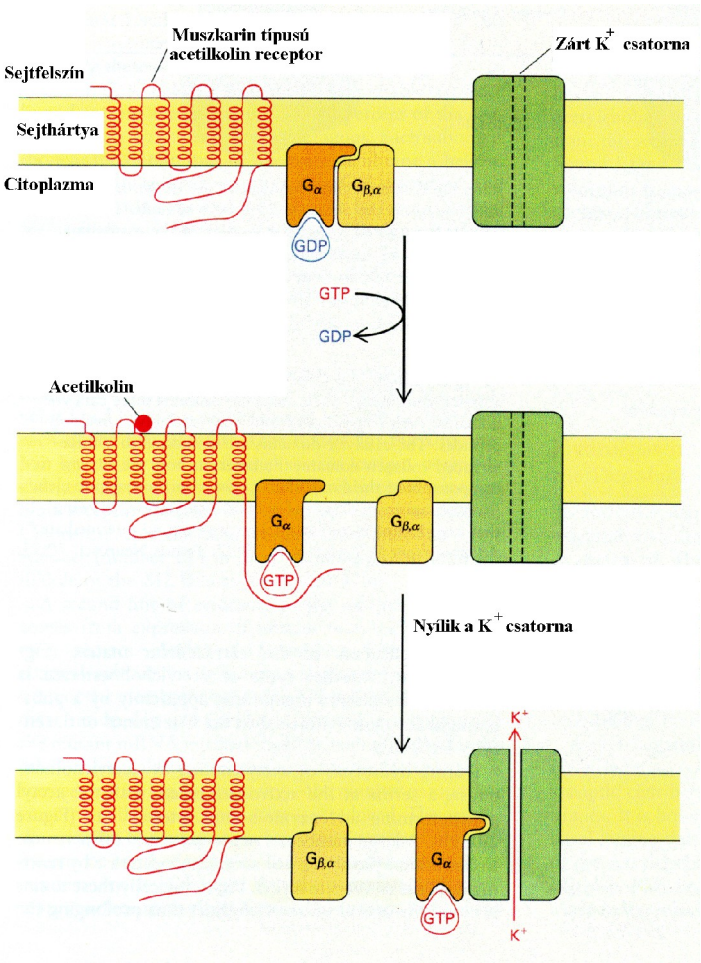
(1) Az ún. *nikotin típusú acetilkolin receptor* lényegében egy olyan ioncsatorna, amely acetilkolinnal és nikotinnal is aktiválható, kinyitható. A nikotin típusú acetilkolin receptor szerkezetét is affinitás kromatográfiával határozták meg. A kígyóméregben levő α-bungarotoxin specifikusan kötődik a nikotin típusú acetilkolin receptorokhoz, lehetővé téve a receptor tisztítását. A receptort az elektromos angolna elektromos készülékéből izolálták, majd ismerték meg egyebek között emberben is. A receptor öt alegységből áll (25.14. ábra). Az acetilkolin az α-alegységekhez kötődik. A kötődés nyomán nyílik ki a csatorna, és áramolhatnak át rajta egyszerre Na^+ és a K^+ ionok. A csatorna több msec-ig nyitott, miközben rajta 15-30 ezer ion áramlik át. A Na^+ és a K^+ ionok be- illetve kiáramlása nyomán lecsökken a membránpotenciál, kinyílnak a szomszédos feszültség-szabályozott Na^+ és a K^+ csatornák, és végeredményben akciós potenciál képződik.

A részletes vizsgálatok azt is megmutatták, hogy az öt alegység mindegyike négy transzmembrán domént tartalmaz. A transzmembrán domének közül azoknak a szerepe kitüntetett, amelyek a csatorna belsejét bélelik (25.14 és 24.15. ábra). Amint azt az *in vitro* mutagenezis kísérletek eredményei megmutatták, az aminosavak közül azok szerepe meghatározó, amelyek oldalláncának negatív töltése van (glutaminsav, aszparaginsav). A harci gázok pedig a csatorna belsejébe nyúló szerinek oldalláncait módosítva fejtik ki áldatlan hatásukat.

(2) Az ún. *muszkarin típusú acetilkolin receptorok* acetilkolinnal és muszkarinnal is aktiválhatók. Az acetilkolint kötő receptor egy hét transzmembrán motívumot tartalmazó fehérje molekula (25.16. ábra). A receptor citoplazmatikus része egy G fehérjéhez kapacsolódik. A ligand-receptor kölcsönhatás eredményeként szignáltranszdukció játszódik le. A GTP-vel kapcsolódó G-fehérje alegység K^+ csatornákat nyit ki. A K^+ csatornákon K^+ ionok áramlanak ki megváltoztatva a membránpotenciált. A muszkarin típusú acetilkolin receptorok a gátló jellegű szinapszisokban gyakoriak, emberben a szívben.



25.15. ábra. A nikotin típusú acetilkolin receptor csatorna bélését alkotó hélixek közül kettőnek az aminosav szekvenciája.



25.16. ábra. Egy muszkarin típusú acetilkolin receptor felépítése és funkciója vázlatosan.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatvilág evolúciója során fejlődött ki az a szervrendszer, az idegrendszer, amelynek speciálisan differenciálódott sejtjei, a neuronok, információt gyűjtenek, dolgoznak fel, és szerveznek alkalmas válaszokat. A neuronok elektromos jelekkel kommunikálnak egymással és a célsejtekkel. Az elektromos jel, az akciós potenciál. A neuronok funkciója mögött olyan fehérje molekulák állnak, amelyek a sejthártya két oldalán levő - elsősorban a Na^+ és a K^+ - ionok koncentrációjának változtatásával biztosítják az idegsejtek funkcióját. Elsősorban a kémiai szinapszisok, a sejtek közötti speciális kapcsolatok teszik lehetővé a jelek módosítását. Egy bizonyos: az idegrendszer „bevált” rendszer a környezettel kapcsolatos gyors változások megvalósítására.

FORRÁSOK

1. Purves, W.K. és mtsi., Life the Science of Biology, 311, 903-926, 1998.
2. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 385-407, 1998.
3. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 912-951, 2000.

26. AZ ÉRZÉKELÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA. A VISELKEDÉS GENETIKÁJA.

A mechanikai, kémiai és fényingerek érzékelése. Az érzékszervek molekuláris biológiája. A viselkedés. Ösztön és tanulás. A viselkedés genetikája. A memória. Belső óra.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán

BEVEZETÉS

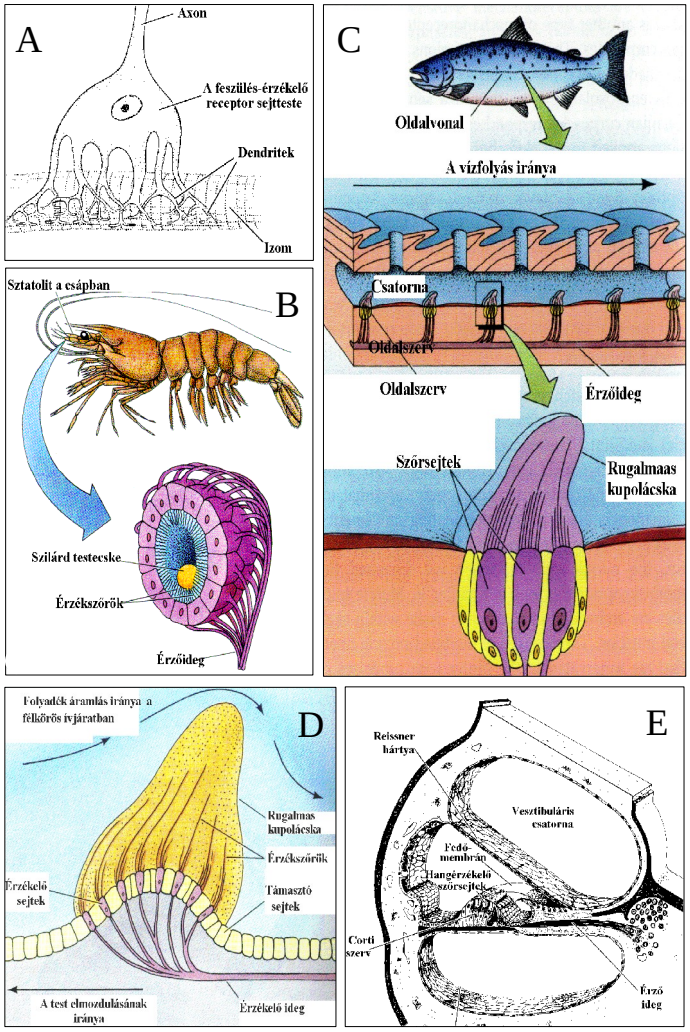
A magasabbrendű élőlényekben olyan érzékszervek vannak, amelyekkel érzékelik mindazokat a környezeti jeleket, ingereket, amelyeknek életük szempontjából jelentősége van. Az ingereket ingerületté alakítják, olyan elektromos jelellé, amelyeket az idegrendszer fel tud dolgozni. Az ingerek alapján szervez az idegrendszer olyan válaszokat, amelyek segítik az alkalmazkodást a változó környezeti feltételekhez. Az alkalmazkodással kapcsolatos megnyilvánulásokat viselkedésnek nevezik. Vannak olyan viselkedés-mintázatok, amelyeket az élőlények automatikusan, ösztönösen végeznek. Másokat életük során tanulnak meg, és emlékeznek rájuk. Az érzékeléssel és a viselkedéssel kapcsolatban egész sor olyan kérdés merül fel, amelyek megválaszolásra érdemesek. Hogyan érzékelik az élőlények a környezeti hatásokat? Hogyan alakítják át a mechanikai, kémiai és fény formájában érkező jeleket akciós potenciállá? Milyen mechanizmusok szerint viselkednek az élőlények? Milyen mechanizmus alapján tanulnak, és emlékeznek az őket ért környezetei hatásokra? A jelen fejezet célja rövid bepillantás (i) az érzékelés molekuláris biológiájába, (ii) a viselkedés genetikájába, (iii) a rövid távú memória molekuláris természetébe, valamint (iv) a belső óra „szerkezetébe”.

AZ ÉRZÉKSZERVEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJA

1. Mechanoszenzorok

A mechanoszenzorok mechanikai hatásokat alakítanak át akciós potenciállá és továbbítanak a központi idegrendszerbe “feldolgozásra”. A mechanoszenzorok, legyenek bármely élőlény bármely szervében, ún. *feszülés-érzékeny ioncsatornákat* tartalmaznak: a sejthártyába illeszkedő olyan fehérje molekulákat, amelyek a membránt ért mechanikai hatásokra kinyílnak, rajtuk ionok áramolhatnak át, lecsökkentve a membránpotenciált. A membránpotenciál csökkené-se nyomán nyílnak a szomszédos feszültség-szabályozott ioncsatornák, hogy az érzéksejtből akciós potenciál induljon az idegrendszer központja felé.

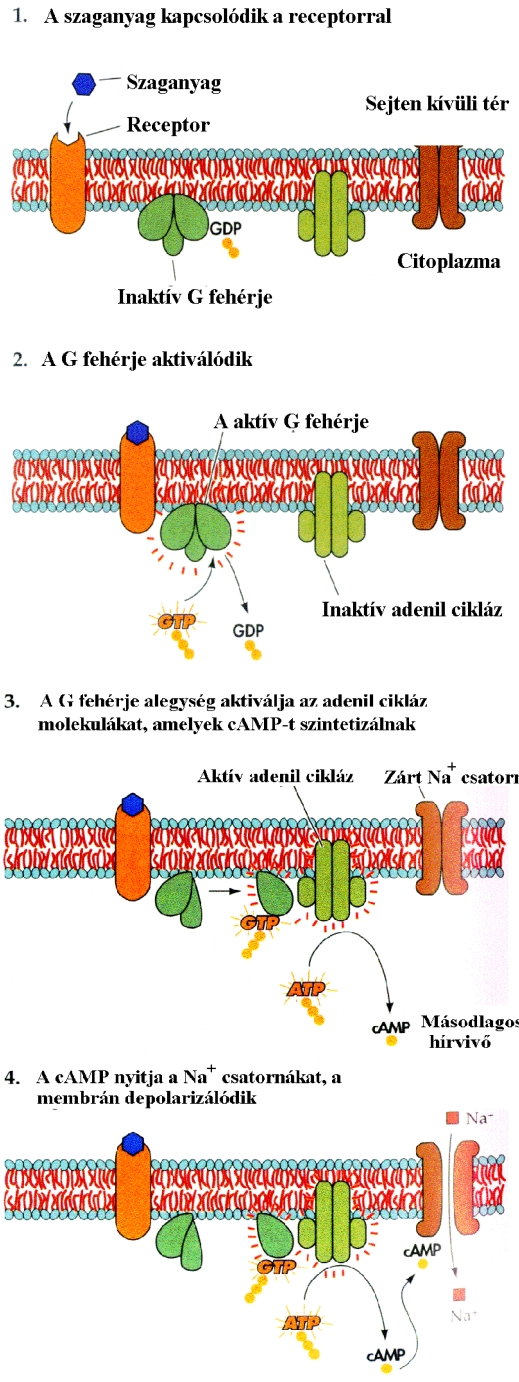
A mechanoszenzorokra a következő példákat említjük (26.1. ábra). Mechanikai ingerek érzékelésére specializálódott idegsejtek érzékelik az izomsejtek mozgását, és védik az izmokat a túlzott feszüléstől. A *szőrsejtek* a mechanikai ingerek érzékelésére specializálódott idegsejtek. Nyúlványaik nagyon sok feszülés-érzékeny csatornát tartalmaznak, ami révén módfelett alkalmasak arra, hogy mechanikai hatásokat érzékeljenek. Ismert példa a rákok sztatolitja, a halak oldalszerve, valamint az érzéksejtek az ember félkörös ívjárataiban. Talán a legismertebb példa a hangérzékelés mechanizmusa a belső fülben. Hanghullámok hatására a fedő membrán megfelelő része rezonál, rezgésbe jön, és hozzáér a közelében levő szőrsejtekhez, nyitja bennük a felszülés-érző csatornákat, akciós potenciált, ingerületet kelt, amely aztán a központi idegrendszerbe jut.



26.1. ábra. Példák a mechanoszenzorokra. (A) Az izmok feszességét olyan feszülés-érző csatornákat tartalmazó mechanoreceptor sejtek jelzik a központi idegrendszernek, amelyek az izomrostokhoz tapadnak. (B) A rákok helyzetérzékelő szerveiben, sztatolitjaiban, a szőrsejtek mechanoreceptorait szilárd testecske ingerli. (C) A halak oldalszerveikkel érzékelik környezetük mechanikai jellegű változásait. (D) Az ember félkörös ívjáratainak mechanorecptorai módfelett emlékeztetnek azokra, amelyek a halak oldalszerveiben funkcionálnak. (E) Az ember hallószervében a fedőmembrán alakítja át a hanghullámokat mechanikai rezgésekké, amelyeket a szőrsejtek alakítanak ingerületté.

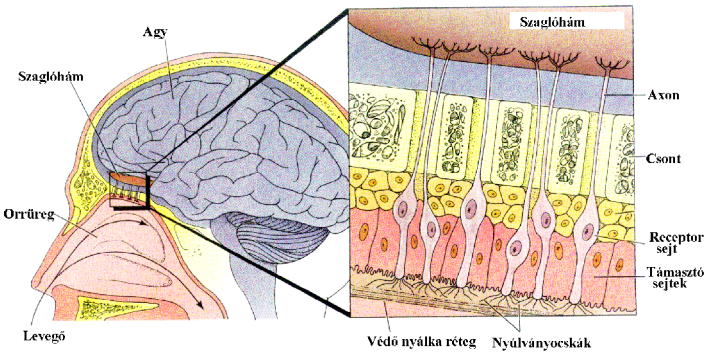
2. Kemoszenzorok

A kemoszenzorok olyan érzéksejtek vagy érzékszervek, amelyek (i) specifikusan észlelik a környezet bizonyos molekuláit, és (ii) hatásukra akciós potenciált generálnak. A kemoszenzorok funkciójának elvi alapja a ligand-receptor kölcsönhatást követő szignáltransz-dukció, amelyet ioncsatornák nyitódása, csukódása, membrán depolarizáció és akciópotenciál képződés követ (26.2. ábra). A kemoszenzorok olyan sejteket tartalmaznak, amelyek sejthártyájában speciális receptor fehérjék vannak. A receptor fehérjék képesek kapcsolódni különféle típusú molekulákkal, kémiai természetű ingerekkel. A kemoszenzoroknak két típusa van. (i) A légnemű vegyületek érzékelést a szagló, (ii) a vízben oldottakét az ízlelő szervek végzik.



26.2. ábra. A kemoszenzorok funkciójának molekuláris mechanizmusa.

(i) A **szaglószerv** alapját gerincesekben azok az idegsejtek biztosítják, amelyek hámsejtek közé ékelődnek (26.3. ábra). (Egy kutyának kb. $4x10^7$ szagló neuronja van.) Finom nyúlványaik az orrüregbe nyúlnak, és vékony nyálka réteg védi őket. Hogy "működnek" a szagló neuronok? A szaganyag (ligand) receptor kölcsönhatás nyomán szignáltranszdukció játszódik le (26.3. ábra). A G fehérjék aktiválódását követően másodlagos hírvivő molekulák képződnek, és nyitnak Na^+ csatornákat. Végeredményben akciós potenciál képződik. A környező világ gazdag szaganyagokban. Vajon hasonlóan sokféle receptor molekula létezik, mint ahány szaganyag? A legújabb kutatások olyan nagy géncsaládok létére derítettek fényt, amelyek a szaganyag receptorok szintézisét kódolják. A szaglósejtekből annál több akciós potenciál ered, minél erősebb a szaginger.



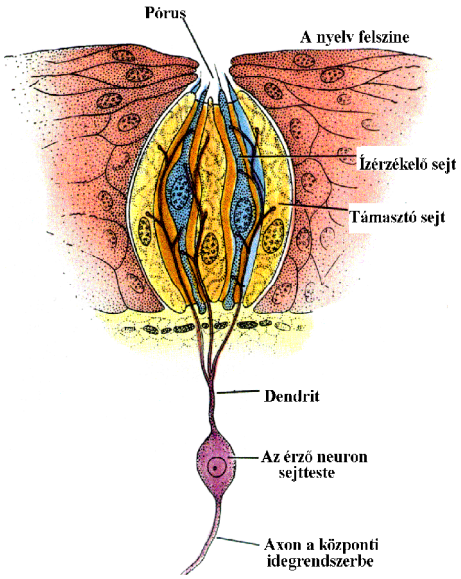
26.3. ábra. A szaglóhám szerkezeti felépítése.

Az 1990-es években Linda Buck és Richard Axel (Nobel-díj 2004-ben) az egér genomban kb. ezer olyan gént azonosított, amelyek ún. szaglás receptor fehérjék képződését kódolják. (Az ún. szaglás receptor gének a genom kb. 3%-át teszik ki.) A receptor gének mindegyike a szaglóhámban, és csak néhány sejtben expresszálódik. A szaglóhám minden sejtjében a szagreceptor fehérjéknek csak az egyike van jelen. (Az emberben genomjában mintegy háromszáz olyan gén van, amelyek szaglás receptor fehérjék képződését kódolják.)

(ii) Az **ízlelőszerv** alapját olyan differenciálódott epiteliális sejtek alkotják, amelyek felszínén, mint a szaglósejtek felszínén, speciális receptor molekulák vannak (26.4. ábra). Az ízérző sejteknek, amelyek az ízlelő bimbók egyik alkotói, olyan nyúlványaik vannak, amelyek nagyobbítják a receptorokat tartalmazó felszínt. A ligand-receptor kölcsönhatás alapján az érzékelő sejtek szinapszisokon keresztül kapcsolódnak azokhoz a neuronokhoz, amelyek ingerületet továbbítanak a központi idegrendszerbe. Bár ízlelő bimbóinkkal négyféle ízt érzünk (édes, sós, savanyú és keserű), az édes és a keserű ízeken belül különbségeket tudunk tenni. Az élelmiszerek ízének sokfélesége az ízlelő és a szagló szervek funkciójának együttes eredménye.

A nyelv hámja, és vele az ízlelő bimbók is, gyorsan kopik. Erős gyomorrontás esetén lelökődik, és néhány napra elvesztjük ízérző képességünket. Az érző neuron úgy indukálja a regenerálódó hám némely sejtjének differenciációját, hogy új érzéksejtek és ízlelő bimbók képződnek.

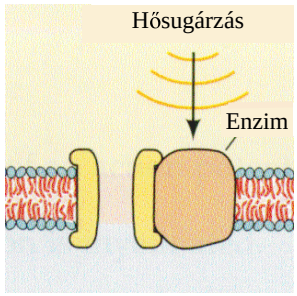
Megjegyezzük, hogy vannak olyan ún. belső receptorok is, amelyek pl. a cukor, a só vagy a víz koncentrációját érzékelik a szervezetben. Az ő funkciójuk alapvető fontosságú a belső környezet állandóságának (homeosztázisának) biztosításában.



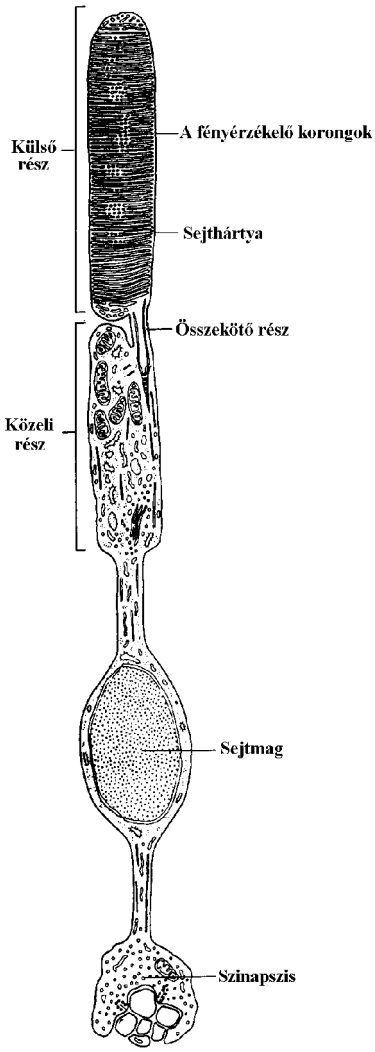
26.4. ábra. Egy ízlelő bimbó szerkezeti felépítése.

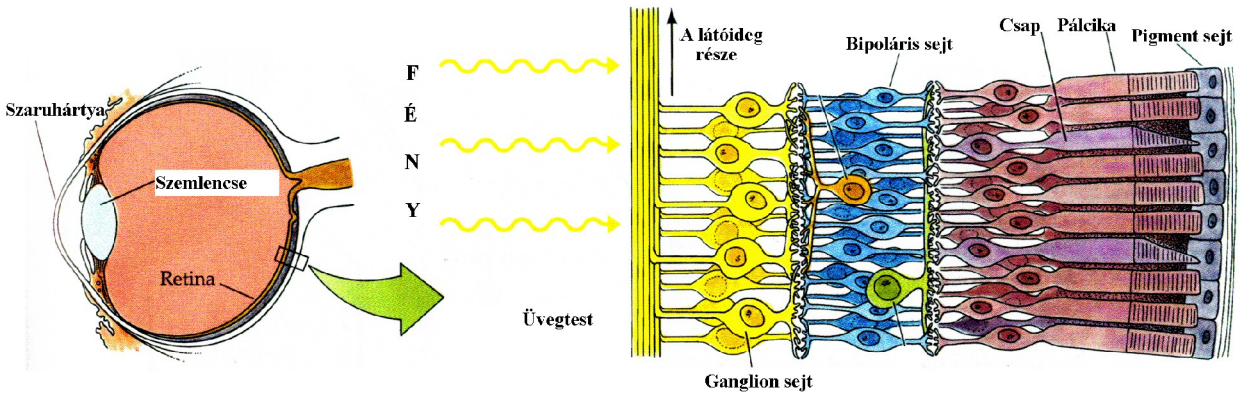
3. A fény érzékelése

A fényérzékelő szervek az elektromágneses sugárzás olyan hullámhosszúságú részét alakítják ingerületté, amelyet a bennük levő fényérzékelő molekulák abszorbeálnak. Közülük alighanem a hőérzékelő receptorok a legegyszerűbbek (26.5. ábra). Az infravörös sugárzást olyan fehérje molekulák nyelik el, amelyek ioncsatornához kapcsolódnak, annak funkcióját befolyásolják. A kígyók ún. gödör szervében a sok hőérzékelő sejt képet alkot, a környezethez való alkalmazkodás nagyszerű példájaként.



26.5. ábra. A hősugárzást érzékelő receptorban egy, a hősugárzást érzékelő enzim molekula szabályozza egy ioncsatorna funkcióját, akci-ós potenciál képződését.

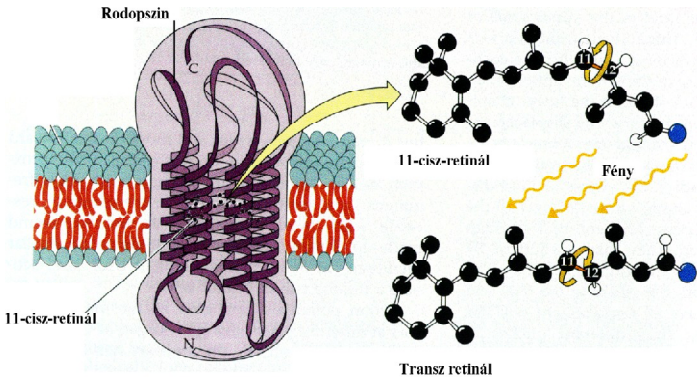




26.6. ábra. Egy emberi szem vázlatos szerkezete.

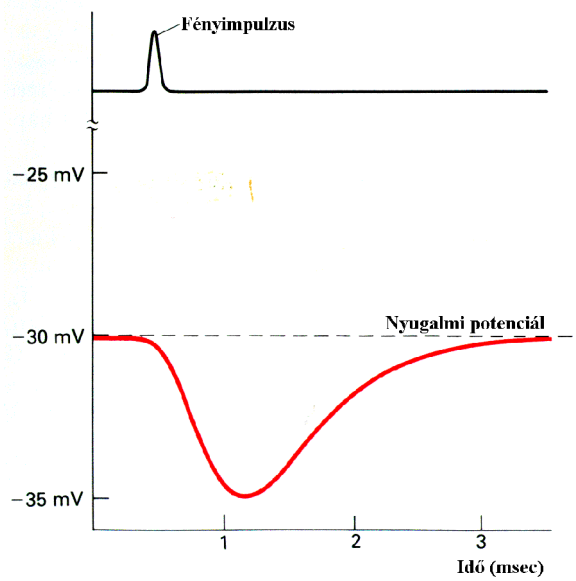
A fényérzékelő szervek közül alighanem az ember szeme a legismertebb. A retina alkotói - egyebek között - a speciálisan differenciáldott fényérzékelő sejtek, a csapok és a pálcikák (26.6. ábra). Különös, hogy a csapok és a pálcikák sötétben depolarizáltak: membránpotenciáljuk az idegsejtekre jellemző -70 mV helyett csak -30 mV (26.7. ábra). Azért, mert a csapok és a pálcikák sejthártyájában a Na^+ csatornák egy része nyitva van. Fény hatására a csapok és a pálcikák hiperpolarizálódnak, mintha becsukódnának a Na^+ csatornáik. Úgy tűnik, mintha a csapok és a pálcikák fordítva működnének, mint a korábban megismert receptor sejtek, amelyekben inger hatására depolarizá-cio történik. Hogyan "működnek" a fotoreceptor sejtek?

A pálcika sejtekben olyan pénztekercsszerűen elrendezett korongok ezrei vannak, amelyek *rodopszint*, fényérzékelő pigmentet tartalmaznak (26.8. ábra). Az ember egyetlen pálcika sejtjében kb. $4x10^7$ rodopszin molekula van. A rodopszin molekulák a 400-600 nm hollámhosszúságú sávban abszorbeálják a fényt. A rodopszin az opszin transzmembrán fehérje és a hozzá kapcsolódó 11-cisz-retinál komplexe: a 11-cisz-retinál kovalensen kötődik az opszin egyik lizin aminosav oldalláncához (26.8. ábra). Fény hatására a 11-cisz-retinál transz-retinállá alakul, izomerizálódik, a fény energiája atomi szintű mozgást valósít meg. A képződő intermedier a meta-rodopszin II, vagy *aktivált opszin*, amelyben az opszin transz-retinállal kapcsolódik. Az aktivált opszin képződése gyors és hatékony: az elnyelt foton kevesebb, mint 10 msec alatt aktiválja az opszint, és 500 nm-en, a rodopszin fényelnyelési maximumán, a fotonoknak kb. 20%-a indukál szignáltranszdukciót. A 11-cisz-retinál spontán izomerizációja ritka: ezer-évente egy, vagyis a fényérzékelő rendszer ún. jel/zaj aránya kiváló.

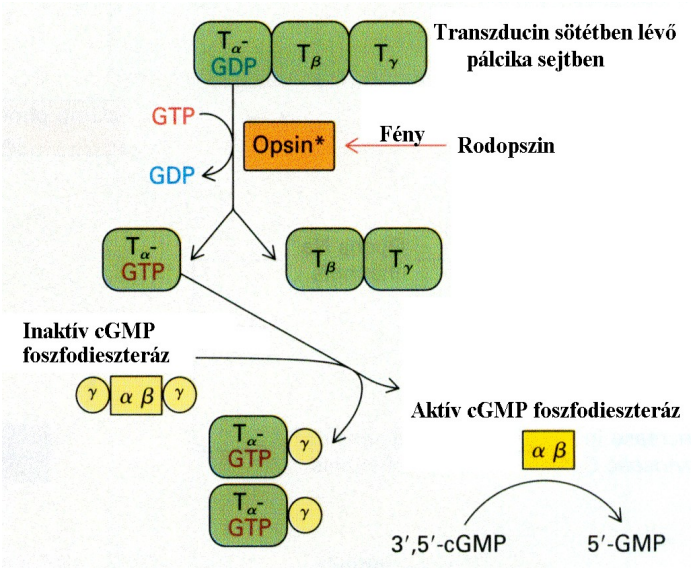


26.8. ábra. A rodopszin szerkezete és funkciója.

Az aktivált opszin instabil, spontán disszociál opszinra és transz retinálra. (A transz-retinált enzimek 11-cisz-retinállá alakítják, hogy opszinnal kapcsolódva újra kezdődhessen a ciklus.) A fény érzékelése tehát egy cisz-transz izomerizációval kezdődik. Az aktivált opszin a *transzducint*, egy speciális G fehérjét aktivál (26.9. ábra). A transzducin GTP-vel kapcsolódott T_α-GTP alegysége aktiválja az inaktív formában jelenlevő *cGMP foszodieszteráz* enzim molekulákat (26.9. ábra). A cGMP foszfodieszteráz enzim molekulák elbontják azokat a cGMP molekulákat (inaktív GMP-vé alakítják), amelyek a pálcika sejtek membránjába ékelődött Na^+ csatornákat nyitva tartják, és sötétben a pálcika sejtek depolarizációját okozzák. Érthető tehát, ha fény hatására záródnak a Na^+ csatornák, hiperpolarizáció történik. A hiperpolarizáció az a jel, amelyet a csapokhoz és a pálcikákhoz kapcsolódó sejtek érzékelnek és a központi idegrendszerbe továbbítanak (26.9. ábra).

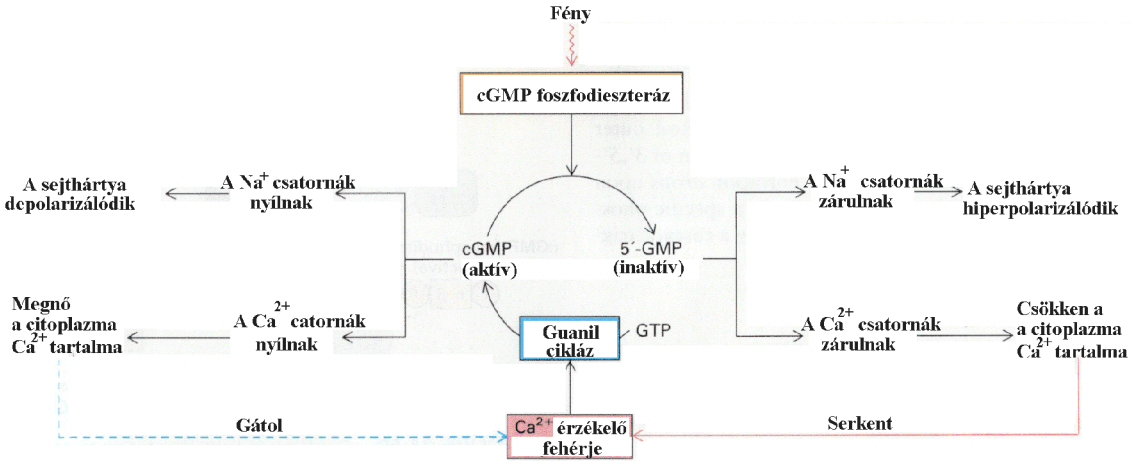


26.7. ábra. A pálcika sejt sötétben depolarizált, membrán potenciálja -30 mV. Fény hatására a membrán hiperpolarizálódik.



26.9. ábra. A transzducin és a cGMP foszfodieszteráz szerepe a fényérzékelésben.

A fent bemutatott rendszer roppant hatékony. Egyetlen aktivált opszin molekula nyomán kb. 500 foszfodieszteráz molekula aktiválódik. Egyetlen foszfodieszteráz molekula másodpercenként kb. 4000 cGMP-t bont el. Nem véletlen tehát, hogy egyetlen abszorbeált foton hatása nyomán mintegy 1 mV-nyival hiperpolarizálódik a pálcika sejtek membránja, hatékonyan biztosítva a fényérzékelést. Hogyan alakul vissza a rendszer eredeti állapotába?



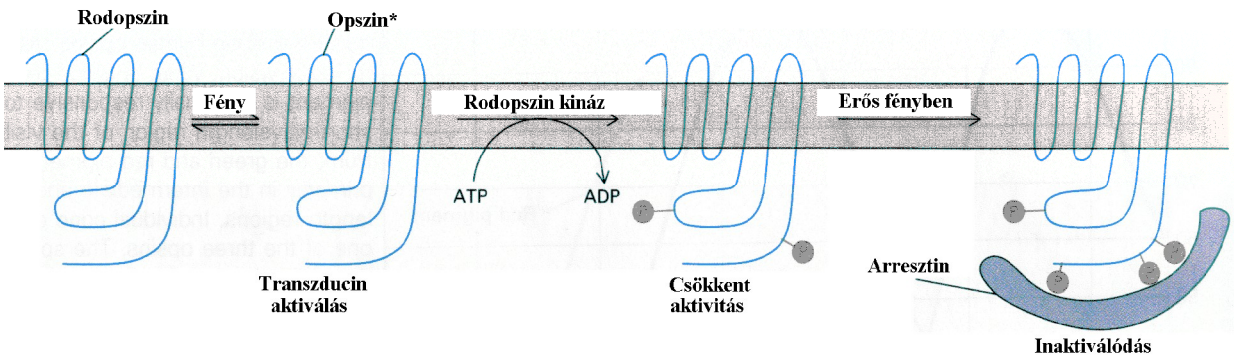
26.10. ábra. Mechanizmus, amely a guanil cikláz enzim aktivitásának szabályozása révén járul hozzá a fényadaptációhoz.

A T_α-GTP alegységeknek GTP-áz aktivitása van, ami miatt a T_α-GTP molekulák lassacskán T_α-GDP-vé alakulnak. A T_α-GDP kapcsolódik a T_β és a T_γ alegységekkel, helyreállítva az eredeti állapotot (26.9. ábra). A transzducin visszaalakulása nyomán inaktiválódnak a cGMP-foszfodieszteráz molekulák, és miközben a guanil cikláz enzim GTP-ből cGMP-t szintetizál, visszaáll a sejtekre jellemző cGMP koncentráció, nyílnak a Na^+ csatornák, a pálcika sejt depolarizálódik, felkészül a fény érzékelésére.

A fényadaptáció molekuláris alapjai

A pálcikák funkciója csodálatra méltó: a fényintenzitás öt nagyságrendnyi változása mellett is funkcionálnak. Melyek a fényadaptáció mechanizmusai? A pupilla szűkülése mellett további mechanizmusok is vannak.

(1) Az első alapja a *guanil cikláz* enzim aktivitásának szabályozása (26.10. ábra). A gunail cikláz enzim készíti GTP-ből azokat a cGMP molekulákat, amelyek nyitva tartják a Na^+ csatornákat, lehetővé téve a sejthártya depolarizáltságát sötétben. A guanil cikláz enzim aktivitását a Ca^{2+} ionok gátolják. Sötétben a cGMP molekulák nemcsak a Na^+, hanem a Ca^{2+} csatornákat is nyitva tartják. A citoplazma magas Ca^{2+} ion koncentrációja gátolja az adenil cikláz enzim aktivitását, végeredményben biztosítva a cGMP olyan koncentrációját, amely a pálcika sejteket a fény érzékelésére alkalmas állapotban tartja. Fényben, amikor aktiválódnak a cGMP foszfodieszteráz molekulák és csökken a cGMP koncentráció, nemcsak a Na^+ csatornák zárulnak, hanem a Ca^{2+} csatornák is. A Ca^{2+} csatornák zárulása nyomán csökken a Ca^{2+} ion koncentráció a sejtekben (a Ca^{2+} pumpák tevékenysége következményeként) és fokozódhat a guanil cikláz enzim aktivitása. A guanil cikláz enzim aktivitása nyomán növekszik a cGMP koncentráció, és a cGMP molekulák kinyitják a Na^+ csatornákat.



26.11. ábra. A rodopszin kináz szerepe a fényadaptációban.

Végeredményben tehát a pálcika sejtekben a cGMP koncentráció független a fény intenzitásától, és alkalmas a fényintenzitásban bekövetkező kis változások érzékelésére (26.10. ábra).

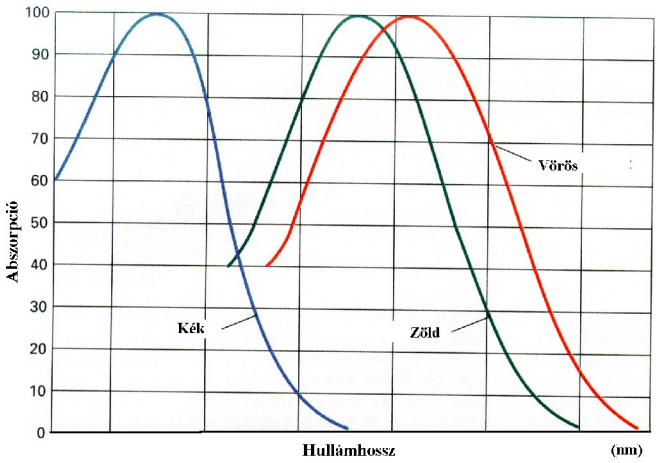
(2) A fényadaptáció másik fontos komponense a *rodopszin kináz enzim*. Az aktív opszin olyan molekula, amely tirozin oldalláncait a rodopszin kináz enzim foszforilálja (26.11. ábra). Minél nagyobb a fényintenzitás, annál gyakrabban aktív az opszin molekula, annál nagyobb az esély arra, hogy a rodopszin kináz foszforilálja az opszin molekulát. Minél több foszfát csoport kapcsolódik az opszin molekulához, annál kevésbé aktiválható. A minden lehetséges helyén foszforilált opszin molekula inaktív, hozzá az arresztin nevű fehérje kapcsolódik, amely inaktív formában tartja a rodopszin molekulákat (26.11. ábra). Sötétben foszfatáz enzim molekulák távolítják el a foszfát csoportokat, apránként aktiválva az opszin molekulákat.

A színlátás molekuláris alapjai

Az ember szemében három féle csap sejt van. Mindegyikük különféle típusú rodopszint tartalmaz. A három rodopszin típusnak fényelnyelési maximuma a spektrum kék, zöld és vörös részében van (26.12. ábra). A csapok lényegében a pálcikákhoz hasonlóan funkcionálnak, a színlátás élménye pedig a háromféle csapból származó jel együttes hatására alakul ki.

A csapok opszinjai ugyanazzal a 11-cisz-retinállal kapcsolódnak, mint a pálcika sejtekben. A csapok opszinja hasonlít egymásra és a pálcika sejtek opszinjára is. A különféle opszin típusok abszorpciós spektruma azért különböző, mert bennük a 11-cisz-retinállal más-más aminosav oldalláncok kapcsolódnak. A kék opszint kódoló gén emberben a 7. kromoszómához kapcsoltan öröklődik. A vörös és a zöld opszin gének az X kromoszómához kapcsoltan öröklődnek, egymás szomszédságában vannak, de ellentétes irányban. A vörös és a zöld opszin gének egy evolúciós skálán nem túl régen történt géndublikáció eredményeként jöhettek létre, hisz' 98%-ban azonosak. (Zárójelben jegyezzük meg, hogy amíg a Dél-Amerikában élő majmoknak csak egy opszin génjük van az X kromoszómájukon, addig az afrikai és az ázsiai majmoknak - mint az embernek is - kettő.) Olykor megtörténik, hogy a két egymás mellett levő opszin gén között a meiózis folyamán egyenlőtlenül játszódik a crossing over. Az egyenlőtlen crossing over eredményeként olyan X kromoszómák képződhetnek, amelyek egyikén csak egyetlen vörös (vagy zöld) opszin gén van, a másikén két zöld (vagy vörös) opszin gén. A vörös-zöld színtévesztés oka többnyire valamelyik opszin gén hiánya.

Jól ismert a vörös opszin gén polimorfizmusa is, ami miatt a színlátó emberek a színes tárgyakat más színűeknek látják. Az olyan vörös opszin változatnak, amelynek a 180. aminosava alanin, 530 nm-nél van az abszorpciós maximuma. Az alanin a negyedik transzmembrán domén része és kapcsolatban van a 11-cisz-retinállal. Más változatokban a 180. aminosav szerin, az abszorpciós maximum pedig 560 nm-nél van. A "szerines" allélra hemizigóta férfiak szemei érzékenyebbek a vörös fényre, mint azoké, akik az "alaninos" változatot hordozzák. A különbség alapja egyetlen nukleotid különbség a DNS-ben.



26.12. ábra. Az ember háromféle szín látásáért felelős opszinjainak abszorpciós spektruma.

A VISELKEDÉS ALAPJAI

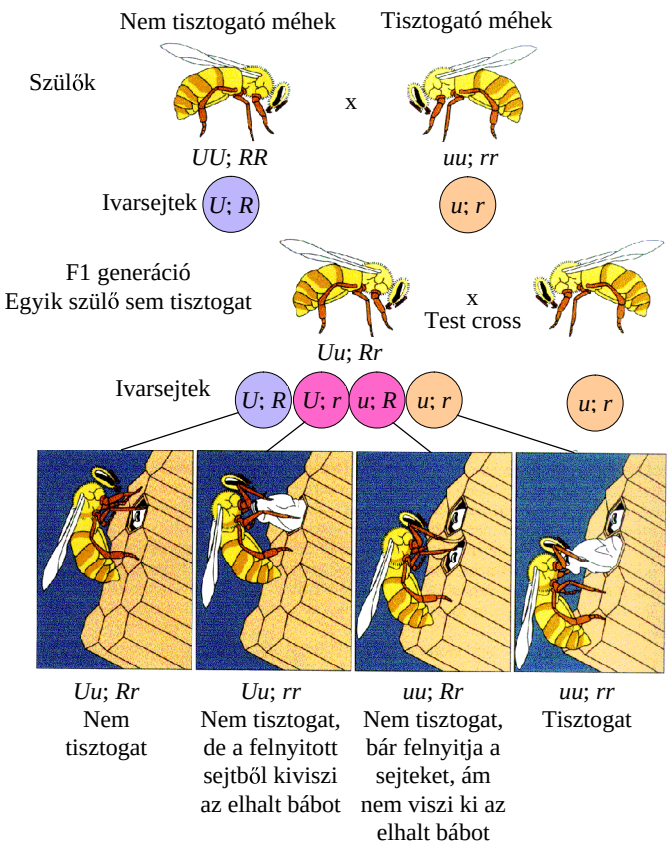
Az ösztönös viselkedés

Amint azt korábban említettük, a viselkedés külső vagy belső ingerekre adott válaszreakciók összessége. Tapasztalati tény, hogy vannak olyan viselkedési reakciók, amelyeket nem kell tanulni az élőlényeknek, azokat *ösztönösen* hajtják végre. Az ösztönös viselkedést gyakorta *kulcsingerek* váltják ki, egy-egy olyan jel, amely észlelését követően az élőlények ösztönös viselkedés-mintázatot hajtanak végre. Kulcsinger pl. a vörösbegyek begytollának vörösödése: az idős hímeknek látva a "serdülő" vörösbegy hímek vörösödő begytollazatát elüldözik a fiatal hímeket. A kulcsingerre további példák bőségesen vannak az állatvilágban. Az a hím nyeri el a nőstények tetszését és szerzi meg a párosodás jogát, amely a leghatékonyabban mutat kulcsingert a nőstényeknek: legszínesebb, leghosszabbak a farktollai, legszebben énekel stb.

Az ösztönös reakciók egyes lépései meghatározott sorrendben követik egymást: az első bekövetkeztét az összes többi megállíthatatlanul követi. Két példát említünk. (i) A Drosophila (mint nagyon sok más faj) hímek udvarlási mintázata különféle elemekből áll. Udvarlás során a hím az egyes elemeket meghatározott sorrendben mutatja: követi a nőstényt, közben egyik szárnyát kitárja, rezegteti, a fajra jellemzően énekel. Potrohát meggörbíti, megkísérli a párosodást, párosodik, majd leválik a nőstényről. Az egyes viselkedési mintázatok lineáris sorrendben követik egymást: bármely elem kiesése nyomán a következő lépések elmaradnak. (ii) Egy pókfaj nősténye kb. 6400 lépésben sző kokont petéinek. Ha a pók megszőtte a táska fenekét és odább teszik, megszövi a táska oldalát, beletojja petéit - amelyek kipotyognak a fenék nélküli táskából -, majd megszövi a táska tetejét, lezárja a táskát, és mint aki jól végezte dolgát, távozik. Ha a táskakészítést éppen elkezdett pókot egy már elkészült táska fenékre helyezik, tovább folytatja saját

táskája szövését. Nem veszi észre, hogy az első esetben nincs feneke a táskának, a második esetben pedig azt, hogy feleslegesen szövi a táska fenekét. A pókháló, a táska anyaga, fehérje. Ha a pókba fehérje szintézist gátló anyagot injektálnak, a pók pantomín művészként szövi meg táskáját, anélkül, hogy potrohát egyetlen milliméternyi háló elhagyná. Az ösztönös viselkedés mégis kitűnő megoldás az élőlények életében. Olyan viselkedés-mintázat, amely bevált az evolúció folyamán, amelyet nem kell és nem is lehet valamelyik társtól ellesni, hisz' nincs rá sem lehetőség, sem idő.

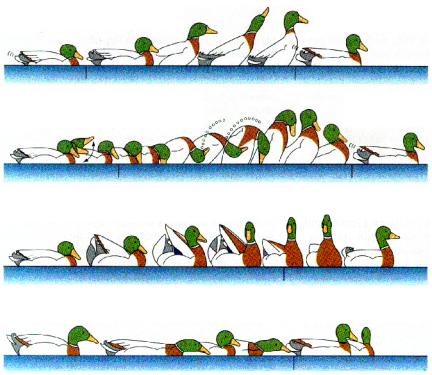
A viselkedés genetikája



26.13. ábra. A méhek nem tisztogatás tulajdonsága a Mendel szabályoknak megfelelően öröklődik.

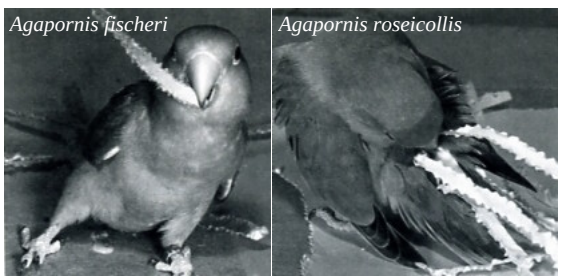
Az ösztönök veleszületett viselkedés-mintázatok. Minden bizonnyal genetikailag meghatározottak. Ha valóban vannak genetikailag meghatározott viselkedés-mintázatok, lehetnek közöttük olyanok is, amelyeket csak egy vagy két gén határoz meg, mely esetekben a viselkedés-mintázat öröklődése követi a Mendel szabályokat. A méhek tisztogató viselkedése példa a viselkedés öröklődő típusára (26.13. ábra). Az *uu*; *rr* méhek tisztogatnak: előbb felnyitják azokat a lépsejteket, amelyben elpusztult a báb, majd az elhalt bábokat kiviszik a kaptárból. Az *U* domináns allélt hordozó méhek nem tisztogatnak: nem nyitják fel a lépsejteket az elhalt bábok felett. A felnyitott sejtből viszont kiviszik az elhalt bábokat. Az *R* domináns mutációt hordozó méhek sem tisztogatnak, mert bár felnyitják az elhalt bábokat tartalmazó sejteket, nem viszik ki a kaptárból az elhalt bábokat. A fent említett két tulajdonság a Mendel szabályokat követve öröklődik, bizonyítva, hogy vannak olyan viselkedés típusok, amelyek öröklődése genetikailag meghatározott (26.13. ábra).

A tulajdonságok öröklődésének genetikai meghatározottságát a hibrid élőlények viselkedése is szépen bizonyítja. Két példát említünk. (i) Konrad Lorenz írta le, hogy a gácsérok udvarlása különféle viselkedés elemek mintázata (26.14. ábra). A viselkedés mintázat jellemző a különféle kacsafajokra. A kacsafajok hibrid gácsérjai, amelyek két kacsafaj egy-egy génkészletét hordozzák, a két kacsafaj udvarlási elemeinek kavalkádját mutatják be. Sőt, gyakran további kacsafajokra jellemző elemeket is. A hibrid gácséroknak nem azért nincsenek utódai, mert sterilek, hanem azért, mert udvarlási viselkedés-mintázatukkal nem vívják ki egyik kacsafaj tojóinak tetszését sem, és bár intenzíven udvarolnak, hoppon maradnak.



26.14. ábra. A tőkés réce gácsér udvarlási mintázatának jellegzetes elemei.

(ii) Az *Agapornis roseicollis* papagájok úgy építenek fészket, hogy a fészeképítő anyagot farktollaik közé tűzik, és viszik épülő fészkükhöz (26.15. ábra). Az *Agapornis fischeri* faj papagájai a csőrükben szállítják a fészeképítő anyagot. A két faj hibridjei a farkuk közé tűzik az építőanyagot (mint ahogy azt az *A. roseicollis* teszi), de nem engedik el (mint ahogy az *A. fischeri* teszi). A hibridek görcsbe merednek, eszméletüket vesztik. Évek telnek el, amíg megtanulják, hogy el kell engedni a farktollak közé illesztett építőanyagot.



26.15. ábra. Két Agapornis faj eltérő fészeképítési viselkedése.

Bevéső dés, kötődés

Az ösztönös viselkedés különleges esete a *bevéső dés*: az életkor korai szakaszában valamilyen jelre bekövetkező olyan esemény, amely kihat az élőlény egész életére. Három példát említünk a bevéső dés szerepére.

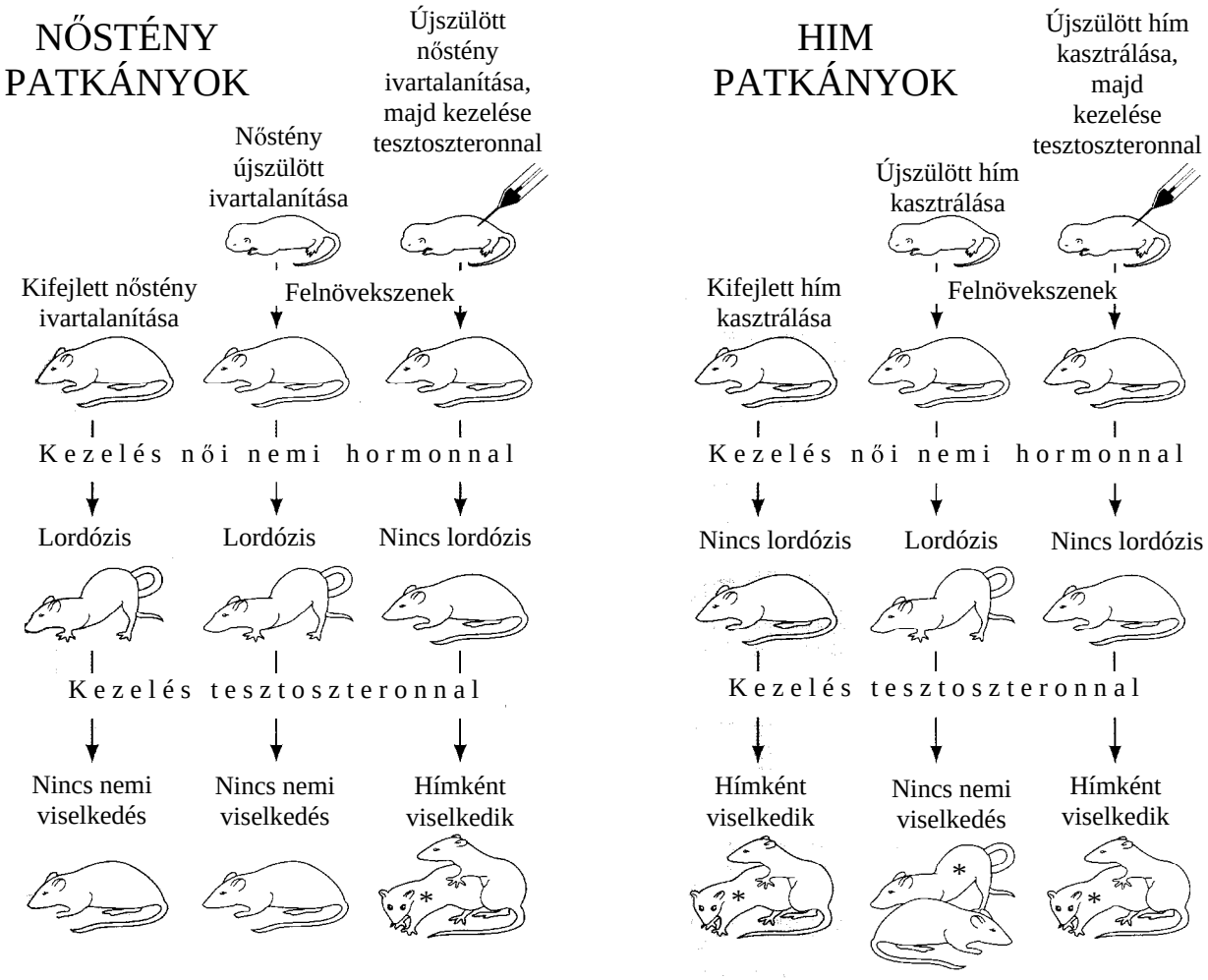
(i) A születés utáni néhány nap folyamán a tesztoszteron úgy alakítja pl. a patkányok központi idegrendszerét, hogy felcseperedvén az a hímekre jellemző nemi viselkedést biztosítja (26.16. ábra).

(ii) Az anya-utód kötődés alapja a szülés során megemelkedő oxitocin koncentráció. Az oxitocin nem csak a méhizomzat összehúzódását eredményezi, hanem "érzékenyített" állapotba hozza a központi idegrendszer megfelelő részeit. "Érzékenyített" állapotában szagingerek alapján tanulja meg pl. az újszülött bárány és anyja, hogy ők összetartoznak, véső dik be (imprintálódik) az anya-utód kapcsolat.

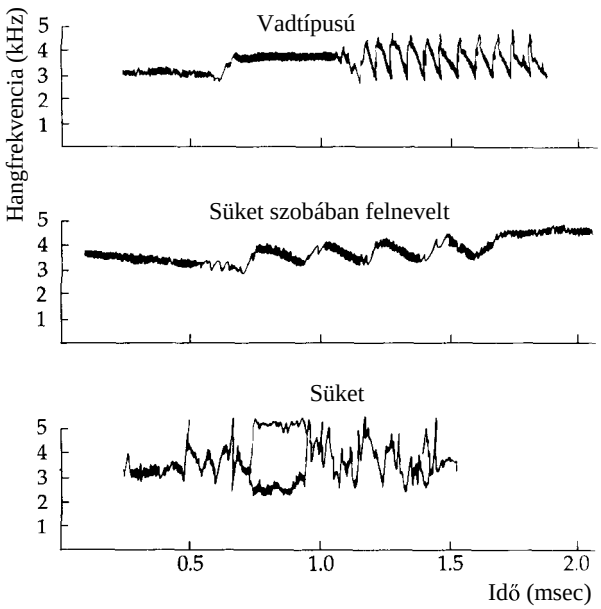
(iii) A tojásból kikelő pl. kiskacsák az első mozgó tárgyat szüleiknek fogadják el, és követik felnőtt korukig.

A tanult viselkedés

A viselkedés mintázat gyakorta úgy alakul ki, hogy az ösztönös alapokra tanult elemek épülnek. Az ösztönös elem az itt használt értelemben hajlamot is jelent: képességet a tanulásra. A mondandó lényegét szépen mutatja az énekes madarak ének-mintázata. Annak a hímnek a szonogramja, amelyet a szülei neveltek fel, jellegzetes mintázatot mutat (26.17. ábra). (A szonogram a madárhang frekvencia eloszlását mutatja az idő függvényében.) Az ún. süket szobában felnevelt hímek úgy nevelkedtek, hogy nem hallhatták apjuk énekét. Bár énekelnek, de zagyván, jelezve a tanulás fontosságát a madarak éneklésében. A megsüketített madarak is énekelnek, de hangjuk jellegtelen (26.17. ábra). A megsüketített veréb "esete" azon tényezők fontosságára hívja fel a figyelmet, amelyek az élőlény belsejéből származnak. Belső tényező pl. a tesztosz-teron vagy az oxitocin, sőt a motiváció is: az érdeklődés valami megismerésére, megtanulására.



26.16. ábra. A nemi hormonok hatása a szexuális viselkedésre. (A *-al jelölt patkányok partnerek a kezelt patkányok szexuális viselkedés-típusának megállapításához.)



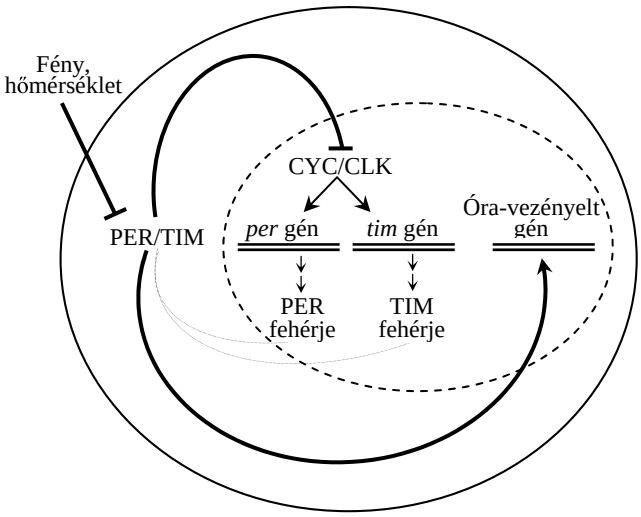
26.17. ábra. Három különféle hím veréb szonogramja.

A memória molekuláris alapjai

A tanulás lényegében azt jelenti, hogy az élőlények saját tapasztalásaik alapján olyan jártasságra tesznek szert, amellyel hatékonyan illeszkedhetnek környezetükbe, életben maradhatnak, szaporodhatnak. Fontos követelmény, hogy az élőlények emlékezzenek a tapasztalások eredményeire, legyen memóriájuk. Életben maradásukhoz az szükséges, hogy a kellemetlen következményekkel járó környezeti hatásokat elkerüljék, a hasznosakat ismételhessék. A *memória* lényegében az emlékezés képessége korábbi tapasztalásokra, olyan ismeretek összessége, amelyek birtokában az élőlények hatékonyan hasznosíthatják környezetük javait. Milyen molekuláris történések biztosítják az emlékezés és a tanulás alapját? A kérdéshez az ún. genetikai boncolás módszerével jutottak közelebb a szakemberek. Mutagenezis kísérletek során azonosították a muslica (*Drosophila melanogster*) olyan mutációit, amelyek megbutították a muslicákat. A vadtípusú muslicák néhány próbálkozás után emlékeznek arra, hogy egy berendezésben a kék fény felé haladva táplálék várja őket, a vörös fényt követve viszont kellemetlen elektromos sokkhatás éri őket. A mutagenezis után kiválogathatók a buta mutáns muslicák. Azok, amelyek nem emlékeznek a kék és a vörös fénnyel kapcsolatos élményeikre. A buta mutációkkal azonosított gének klónozhatók, megismerhető molekuláris funkciójuk. A *dunce*, a *rutabaga*, a *turnip* stb. mutációk olyan géneket azonosítanak, amelyeknek a szignáltranszduk-cióban, vagy a neutrotranszmisszióban van szerepe. A mutánsok és biokémiai vizsgálata alapján derült arra fény, hogy a rövidtávú memória alapját olyan események adják, mint speciális citoplazmatikus fehérjék foszforilációja, és bizonyos típusú szinap-szisok funkciója. A hosszú távú memória alapja pedig új mRNS-ek és fehérje féleségek szintézise, újfajta, és hosszútávra szóló kapcsolatok kialakulása sejtek között. Igaz lehet tehát a közmondás: ismétlés a tudás anyja...

A belső óra és a napi ritmus

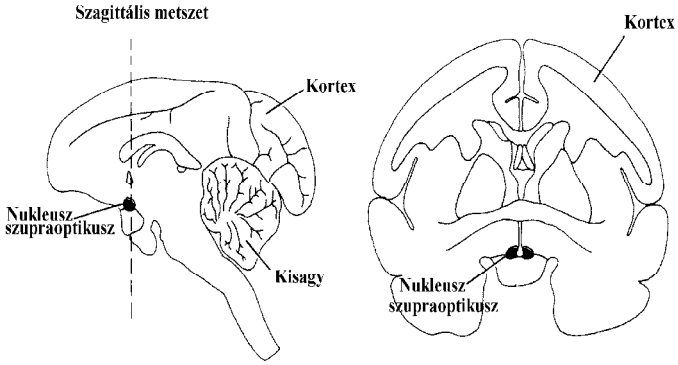
A világ legtermészetesebb dolga, hogy életünk folyása szabályos, ún. *napi ritmust* követ. A napi ritmust szabályozó ún. *belső óra* molekuláris mechanizmusra először muslicában, a genetikai boncolás módszere alapján derült fény az 1970-es évektől kezdődően. A módszer lényege a következő. A muslicák életében is van napi ritmus. Ha napi ritmus genetikai szabályozás alatt áll, úgy a szabályozó gének funkcióját mutációkkal meg lehet szüntetni. A mutációk nyomán a mutáns muslicák életéből hiányzik a napi ritmus, fel lehet ismerni őket, és a mutáns allélokból kiindulva meg lehet ismerni az ép gének funkcióját. Az itt említett elv alapján azonosította Ronald J. Konopka és Seymour Benzer 1971-ben a muslica *period* (*per*) génjét, majd mások a *timeless* (*tim*) gént, a másik ún. óragént, valamint a *cycle* (*cyc*) és a *clock* (*clk*) géneket, amelyek az óragének funkcióját szabályozzák (26.18. ábra). A *per* és a *tim* óragének termékei egyrészt gátolják a *cyc* és a *clk* gének expresszióját, másrészt olyan gének funkcióját szabályozzák, amelyek (a hormon rendszer révén) a napi ritmust mutató életfolyamatokat irányítják. Annak az oszcillátornak, amely az óragének aktivitását meghatározza, nagyjából 24 óra a periódus ideje. Ismertek azok a környezeti tényezők is - elsősorban a fény és a hőmérséklet -, amelyek úgy szabályozzák a belső órát és a napi ritmust, hogy módosítják a Per és a Tim fehérjék aktivitását (26.18. ábra).



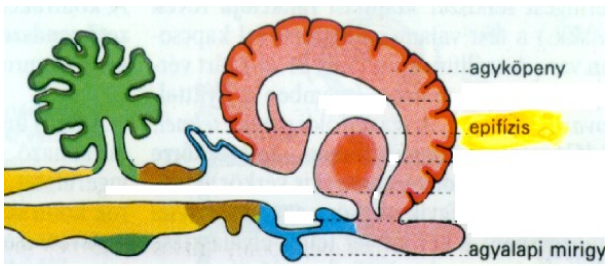
26.18. ábra. A belső óra „lelke” egy olyan oszcillátor, amely a *per* és *tim* óragének, és az ő expresszió-jukat szabályozó CYC (Cycle) és a CLK (Clock) fehérjék között fennáll. A PER/TIM fehérjék fékezik a *cycle* (*cyc*) és a *clock* (*clk*) gének aktivitását, közvetve pedig a belső óra ritmusát. A PER/TIM fehérjék révén a belső órát, a környezeti feltételekhez lehet „állítani”. Az oszcillátor „kicsatolásai” – a PER/TIM fehérjék aktivitás révén - további gének expresszióját szabályozza, maghatározva az életfolyamatok napi ritmusát.

A muslica és a *Neurospora crassa* penészgomba napi ritmusát szabályozó gének ismeretében izolálták az egér és az ember óragénjeit. Arra is fény derült, hogy a belső óra alapvető mechanizmusa a különféle fajokban lényegében azonos. Azt is meghatározták, hogy az óragének mely sejtekben expresszálódnak. Emberben a belső óra a nucleus supraopticusban "ketyeg" (26.19. ábra), szabályozza a *melatonin* révén, a hipotalamuszon, az agyalapi mirigyen és a hormonrendszeren keresztül az élőlények napi ritmusát. (A melatonint, a napi életritmust szabályozó hormont, a gyógyászatban is alkalmazzák.)

A belső óra fénnyel történő szabályozását az az ún. parietális szem (tobozmirigy vagy epifízis) biztosítja, amely a hüllők sok fajában jól felismerhető (26.20. ábra). A belső óra funkcióját fénnyel is lehet állítani. (A PER fehérje élettartama magyarázza azt a tényt, hogy az élőlények belső órája sötétben is napokon át biztosítja a napi ritmust, bár némi késéssel.) A belső óra az alapja az élőlények olyan csodálatra méltó képességének, mint pl. a postagalambok hazataláló képessége vagy a madarak vándorlása.



26.19. ábra. Az ember belső órája a nukelusz szupraoptikuszban van.



26.20. ábra. Sok hüllőfajban az epifízis "szemként" funkcionál és szabályozza a belső órát.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az élőlények érzékszerveikkel észlelik a környezeti hatásokat, és azokra nemcsak válaszolnak (viselkednek), hanem emlékeznek is. A válaszok ösztönös részében benne van az ősök évmilliókon át szerzett, génekben rögzült "tapasztalata". A viselkedés alapjai azok a tapasztalások is, amelyeket az élőlény saját maga tanult meg és emlékszik is rá. Bármennyire tűnjenek is bonyolultnak a viselkedés különféle formái, azok értelme a környezethez való alkalmazkodás, az életben maradás és a szaporodás.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 964-1005, 1113-1139, 2011.
2. Lodish, H. és mtsi., Molecular Cell Biology, 1025-1039, 2007.

27. A POPULÁCIÓK BIOLÓGIÁJA

Polimorfizmus. A Hardy-Weinberg arányok. Természetes szelekció. Génáramlás. Genetikai sodródás. Fajképződés.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán.

BEVEZETÉS

A polimorfizmus, az élőlények sokfélesége, a világ legtermészetesebb dolga. A ritkán, de folyamatosan bekövetkező mutációk, a genetikai rekombináció és a kromoszómák szegregációja a meiózis folyamán adják az élőlények változékonyságának alapjait. A 27. fejezet az élőlények változékonyságával foglalkozik a populációk, a népesség szintjén, valamint a természetes szelekció szerepével az élővilág fejlődésében. A populációgenetika kapcsolatot teremt a klasszikus és a molekuláris genetika valamint az evolúciós biológia között. Tárgya a népességen belüli változékonyság forrásai, és hogy miként vezet a populációkon belüli időbeli természetes szelekció az evolúciós változásokhoz. A populációgenetika alapjait R.A. Fisher, S. Wright és J.B.S. Haldane teremtette meg az 1930-as évek elején.

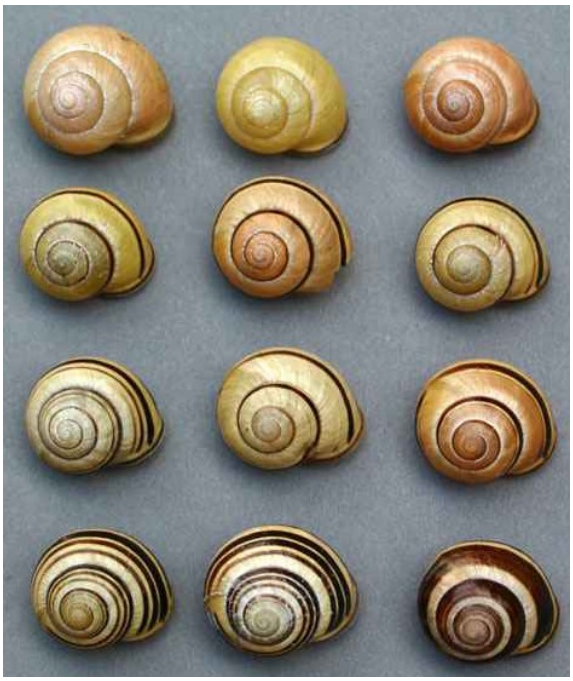
A genetikai változékonyság (polimorfizmus)

Tudjuk, hogy genetikai szempontból mindannyian egyediek vagyunk. A genetikai variabilitás, a sokféleség az élet velejárója, és az evolúció alapja. Egy tulajdonság polimorf, ha egy lokusznak (génnek) különféle alléljai léteznek egyidejűleg egy populációban. A polimorfizmust különböző szinteken észlelhetjük.

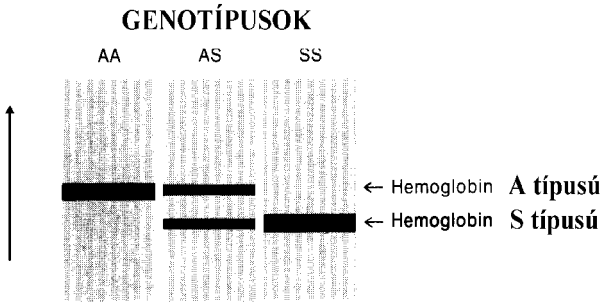
(1) A morfológiai polimorfizmus egy faj egyedeinek különféle alaki formáját jelenti. Szemléletes példaként a ligeti csiga (*Cepaea nemoralis*) csigaház sávozottságát említjük (27.1. ábra). A sávozottságot egyetlen gén különböző alléljai kódolják. A csigaház megjelenési formái még sokfélébbek, ha a lehetséges alapszíneket is figyelembe vesszük.

(2) A metafázisos kromoszómák vizsgálata alapján vált nyilvánvalóvá az ún. kromoszóma polimorfizmus, amely elsősorban inverziók, transzlokációk és duplikációk jelenlétét jelenti a populációkban. A kromoszóma polimorfizmus valószínűleg a kromoszóma evolúció fontos állomása. Tudjuk, hogy a genetikai tulajdonságok alapja a fehérje és a DNS molekulákban rejlik.

(3) A molekuláris polimorfizmus alapja a fehérjék és a DNS szintjén detektálható sokféleség. A fehérje, vagy ismertebb nevén enzimpolimorfizmus, ugyanazon fehérje féleség különféle formáinak együttes létezését jelenti egyazon populációban. A különböző fehérje formák, az *allozimek*, elektroforézissel elkülöníthetők, megkülönböztethetők. Az allozimek kimutatása nem csak a populációbiológiában, hanem az orvosi gyakorlatban is jelentőséggel bír: gondoljunk csak a vércsoport antigénekre, vagy a β-globin normális és sarlósejtes vérszegénységet okozó formáira (27.2 ábra). A polimorfizmus ma már egyre inkább a DNS szintjén szokás vizsgálni.



27.1. ábra. A csigaház sávozottsága a morfológiai polimorfizmus jellegzetes példája.



27.2. ábra. A β-globin ép (A) és mutáns (S, sarlósejtes vérszegénységet okozó) formái példák a fehérje szinten detektálható polimorfizmusra.

A populációk Mendeli genetikája.

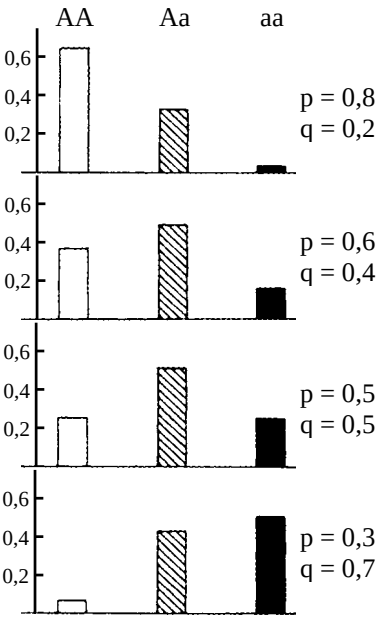
A Hardy-Weinberg arányok

A tulajdonságok öröklődésének legegyszerűbb esetét, a Mendel szabályokat, egy korábbi fejezetben tekintettük át. Mendel kísérleteiben *p*, a domináns (*A*), valamint *q*, a recesszív (*a*) allél gyakorisága egyaránt 0,5 volt (27.1. táblázat). (A populáció-genetikában az allél gyakoriságot génfrekvenciának nevezik.) Bizonyos, hogy $p + q = 1$. A p és q értékek alapján a különböző genotípusok arányát könnyen ki lehet számolni: $AA = p^2$; $Aa = 2pq$ és $aa = q^2$. természetesen $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. A formulában a gyakoriságokat ún. Hardy-Weinberg arányoknak nevezik, alkotóik tiszteletére.

27.1. táblázat. Az ivarsejtek és az utódok típusa és gyakorisága Aa szülőkben és utódaikban.

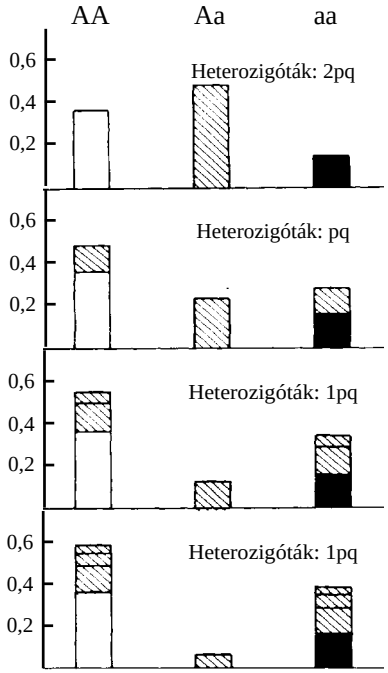
Az ivarsejtek genotípusa és *gyakorisága*	A *p*	a *q*
A *p*	AA p^2	Aa *pq*
a *q*	Aa *pq*	aa q^2

Egy populációban az allélok gyakorisága rendszerint különbözik az ideális 0,5-től. Nyilvánvaló, hogy minden egyes *p* értékhez egy jellegzetes Hardy-Weinberg arány tartozik (27.3. ábra). Az allélok gyakorisága egy ideális, ún. Hardy-Weinberg típusú populációban ugyanaz az utódokban, mint a szülői generációban, és mindaddig változatlan marad, amíg a párzások véletlenszerűen történnek, nem képződnek, és is vesznek el allélok. (Tudott, hogy a testmagasság tekintetében nem, a vércsoport jellegek alapján az emberi populációk Hardy-Weinberg populációknak tekinthetők). Természetesen, ha p=0,5 és q=0,5, a Hardy-Weinberg arányok a következők: $AA=p^2$=0,25; $Aa=2pq$=0,5 és $aa=q^2$=0,25, amint az a Mendel törvényekből következik (27.3. ábra).



27.3. ábra. Az *AA*, *Aa* és *aa* élőlények arányai egy populációban különböző *p* és *q* értékeknél. A p = 0,5 és a q = 0,5 felel meg a mendeli keresztezéseknek.

A *beltenyésztés* bár fokozza a homozigóta genotípusok gyakoriságát, nem változtatja meg az allélok gyakoriságát a populációban (27.4. ábra). (A beltenyésztés szokásos gyakorlat az állat- és növénynemesítésben.)



27.4. ábra. A beltenyésztés eredményeként a homozigóták gyakorisága anélkül növekszik a populációban, hogy változna az allélok gyakorisága. Az egymást követő generációk önmegtermékenyítés eredményei.

Különböző génfrekvenciájú populációk összeolvadása nyomán egyetlen generáció után kialakul a Hardy-Weinberg egyensúly. Tételezzük fel, hogy az *A* lokuszra a genotípusok gyakorisága a következő: *AA*=0,5; *Aa*=0,2 és *aa*=0,3 (27.2. táblázat), és a Hardy-Weinberg arányoknak nem megfelelő gyakoriságok. Az utódok genotípusának arányait három lépésben határozzuk meg. 1. A lehetséges párosodási kapcsolatokat a 27.2. táblázat foglalja össze. 2. Határozzuk meg a különféle genotípusok arányait az utódgenerációban az egyes lehetséges kombinációkra (27.3. táblázat). 3. Összesítsük az azonos genotípusok relatív gyakoriságát az utódokban (27.3. táblázat). Nyilvánvaló, hogy bármilyenek legyenek is a szülői genotípusok gyakoriságai, a véletlenszerű párzások nyomán az utódokban a különféle genotípusok nyomban a Hardy-Weinberg arányoknak megfelelő gyakoriságban jelennek meg.

27.2. táblázat. A különféle típusú párosodások gyakorisága egy olyan populációban, amelyben a párosodások véletlenszerűen történnek, és amelyben a genotípusok gyakorisága a következő:

AA = 0,5; *Aa* = 0,2 and *aa* = 0,3.

Anyai genotípus	Apai genotípus		
	AA 0,5	*Aa* 0,2	*Aa* 0,3
AA 0,5	*AA* x *AA* 0,25	*AA* x *Aa* 0,1	*AA* x *aa* 0,15
Aa 0,2	*AA* x *AA* 0,1	*Aa* x *Aa* 0,04	*Aa* x *aa* 0,06
Aa 0,3	*aa* x *AA* 0,15	*aa* x *Aa* 0,06	*aa* x *aa* 0,09

27.3. táblázat. Az utódok genotípusának gyakorisága. A gyakoriságok az utódok, valamint szüleik szerint vannak csoportosítva. A különféle párosodás-típusok gyakorisága a 27.2. táblázatból származik. A fordított irányú keresztezések gyakoriságai össze vannak adva.

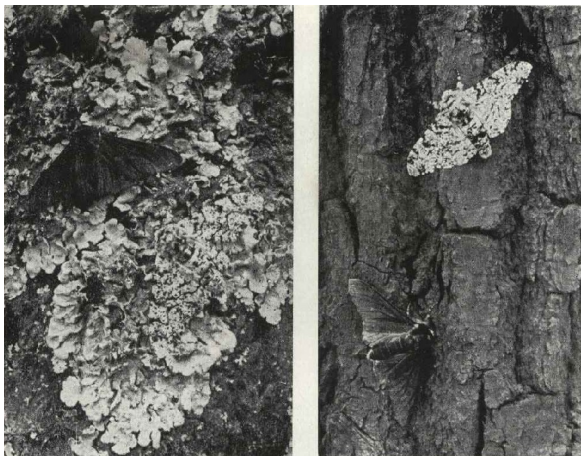
Szülői genotípus		Az utódok genotípusa és gyakorisága		
A párosodás		*AA*	*Aa*	*Aa*
Típusa	Gyakorisága			
AA x *AA*	0,25	0,25		
AA x *Aa* *Aa* x *AA*	0,20	0,1	0,1	
AA x *aa* *aa* x *AA*	0,30		0,30	
Aa x *Aa*	0,04	0,01	0,02	0,01
Aa x *aa* *aa* x *Aa*	0,12		0,06	0,06
aa x *aa*	0,09			0,09
Összesen	1,00	0,36	0,48	0,16

Természetes szelekció

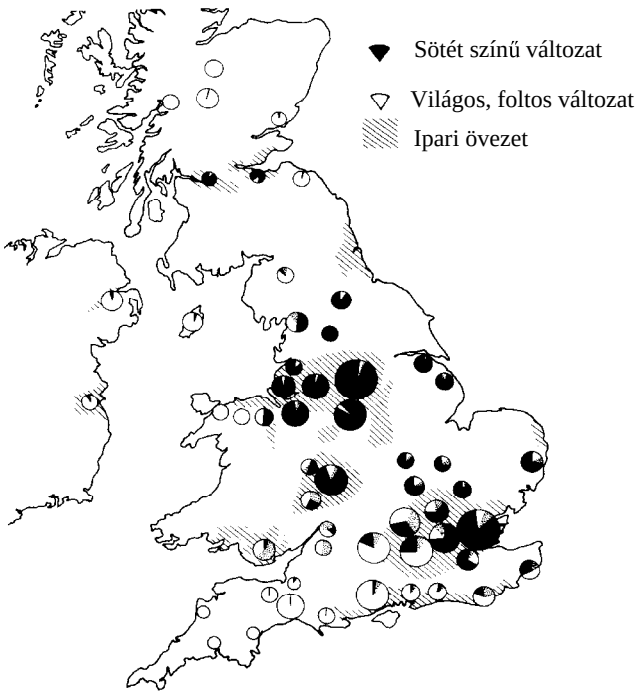
A természetben a különböző geno- és fenotípusú élőlényeknek nem azonosak az esélyei a túlélésre és a szaporodásra. Charles Darwin (1808-1882) ismerte fel először, hogy az evolúciós változások alapja a természetes szelekció (1859). A **természetes szelekció** azt jelenti, hogy egy adott környezetben (1) nem minden élőlény él túl és szaporodik. (2) Minthogy az élőlények különbözőek, az egyiknek jobbak az esélyei a túlélésre, mint a másiknak. (3) Az utódok többnyire ugyanazokat a tulajdonságokat öröklik, amelyek segítették a szüleik túlélését, szaporodását. (4) Generációról generációra növekszik azon tulajdonságok gyakorisága, amelyek lehetővé teszik a túlélést, szaporodást. Végeredményben a természetes szelekció eliminálja a populációkból az előnytelen allélokat és megőrzi az előnyösöket. (A **mesterséges szelekció** az ember által, emberi szempontok szerint megvalósított szelekció, amely célja a termesztett és dísznövény és állatfajták, baktérium és gombatörzsek előállítása.)

A fentieket jól szemlélteti a nyírfaszender (*Biston betularia*) világos és sötét formáinak esete. Nem szennyezet környezetben a fák törzseit szürkésfehér zuzmók borítják. A fehéres szürke háttéren a szender világos változata szinte észrevehetetlen és nem esik a madarak áldozatául (27.5. ábra). A világos alapon a fekte változat (a fekete allélra homozigóta) feltűnő, nincs esélye a túlélésre, szaporodásra. A környezetszenynyezés következményeként a zuzmók elpusztulnak, a fák törzse sötét színű lesz. A sötét háttéren a fekete lepkék nehezen észrevehetők, jók az esélyeik a túlélésre, szaporodásra. A sötét háttéren a fehér lepkék szembetűnők, és hamarosan a madarak áldozatául esnek. Nem meglepő, hogy az iparosodott körzetekben a sötét, a nem szennyezettekben a világos változatok az elterjedtek (27.6. ábra).

A *biológiai fitnesz* (alkalmasság, alkalmazkodó képesség) az egyedek genotípusa valamint az életképesség és a szaporodóképesség közötti kapcsolatot jellemzi. A fitnesz egyben mérőszám is: annak mértéke, hogy a szülők milyen mértékben járulnak hozzá a következő generáció génkészletéhez. A fitnesz egyszerre függ a génektől (alléloktól) és a környezettől (27. 7. ábra).

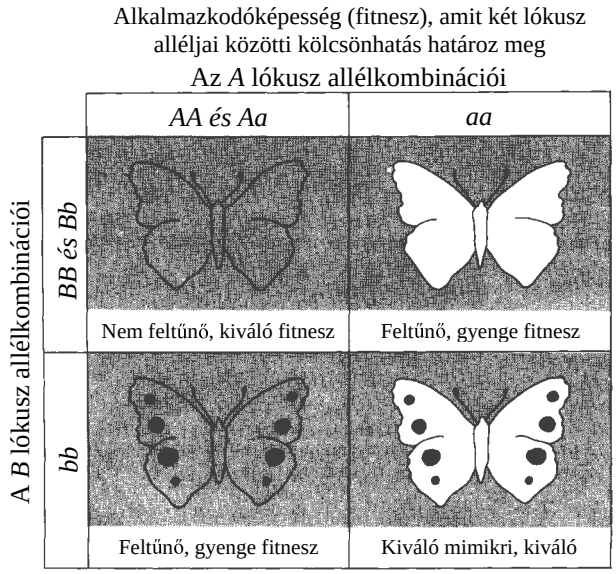


27.5. ábra. A nyírfaszender világos változata feltűnő a sötét háttéren, de alig észrevehető a zuzmóval borított fa törzsén. A sötét változat a sötét háttéren nehezen észrevehető, a világosan szembetűnő.



27.6. ábra. A nyírfaszender világos és sötét változatainak eloszlása szennyezett és tiszta környezetben.

Az *adaptáció* olyan képesség, tulajdonság, amely különösen alkalmas arra, hogy hordozója túléljen és szaporodjon. Bizonyos, hogy az emberi medence és a két lábon járás az emberré válás fontos mozzanata, adaptáció a környezethez. Hasonlóan a csigaház mintázata és színe is segíti a környezethez való alkalmazkodást. A *kamuflázs* (rejtőzködés, álcázás) és a *mimikri* (utánzás, más, elsősorban mérgező vagy ragadozó élőlény külső megjelenési formájának felvétele) az adaptáció fontos része.



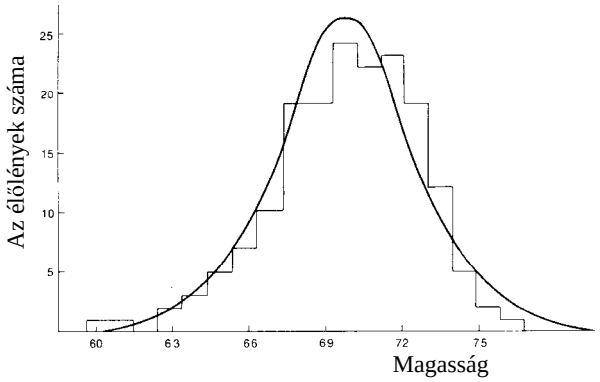
27.7. ábra. A genotípusok és a fitnesz közötti kapcsolat.

Végeredményben tehát a természetes szelekció következménye az allélok gyakoriságának változása az időben. Az allélok elveszhetnek vagy rögzülhetnek (mint az egyetlen allél) a populációban. Bizonyos, hogy egy evolúciós változás első eseménye az *allél-szubsztitúció*, mechanizmusa a következő: mutáció → új allél → az allélgyakoriság változása természetes szelekció miatt → allél szubsztitúció. A sarlósejtes vérszegénység esete szépen illusztrálja az elmondottakat. Maláriamentes környezetben a Hb^S/Hb^S : Hb^S/Hb^F : Hb^F/Hb^F arány 0 : 1 : 1. (Hb^S és Hb^F a mutáns, valamint a vadtípusú allélokat jelenti). Malária-ával fertőzött helyeken az arány Hb^S/Hb^S : Hb^S/Hb^F : Hb^F/Hb^F arány 0 : 1 : 0,8, mert a heterozigóták kissé ellenállóbbak a malária-ával szemben, mint azok, akik nem hordozzák a sarlósejtes vérszegénység mutációját. Hasonló megfontolások érvényesek a rovarölő, valamint a gyomirtó szerekkel szembeni rezisztenciára is.

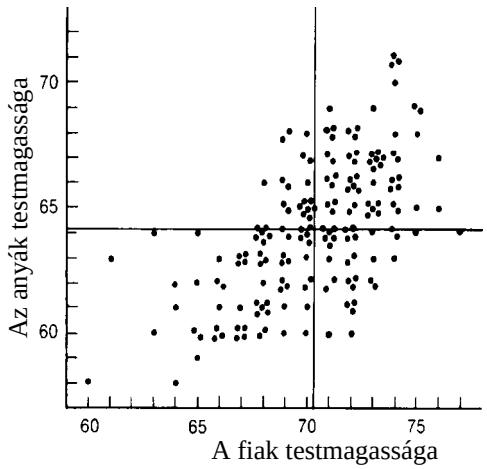
Folytonos eloszlást mutató tulajdonságok

A fentiekben olyan tulajdonságokkal foglalkoztunk, amelyeket egy vagy két gén alléljai határoztak meg. Számos olyan tulajdonságot is ismerünk, amelyet sok gén együttesen határoz meg. A testmagasság (27.8. ábra), a tej zsírtartalma, a répa cukortartalma a legismertebb olyan példák, amelyek *poligénikusan* meghatározottak, sok gén sok allélja együttesen befolyásolja a tulajdonság kialakulását. A *poligén* olyan polimorf gének együttese, amelyek egy folytonos eloszlást mutató tulajdonságot határoznak meg.

A genetikai tényezők szerepét a folytonos eloszlást mutató tulajdonságok (mint pl. a testmagasság) öröklődésében a következő két megfigyelés igazolja. (1) A többé-kevésbé egyenes arány az anyák és fiaik testmagasága között (27.9. ábra). (2) A csíranövények szárhosszának eloszlása a *Nicotiana longiflora* dohányfaj rövid és hosszú hibridjeinek esetében (27.10. ábra). Bár a variáció nagyobb az F2 generációban, mint az F1-ben, mégis ugyanazon középérték körül változik. Az F2 szub-populációk utódjai szüleik átlagértékeihez hasonló érték körüli folytonos eloszlást mutatnak (27.10. ábra).



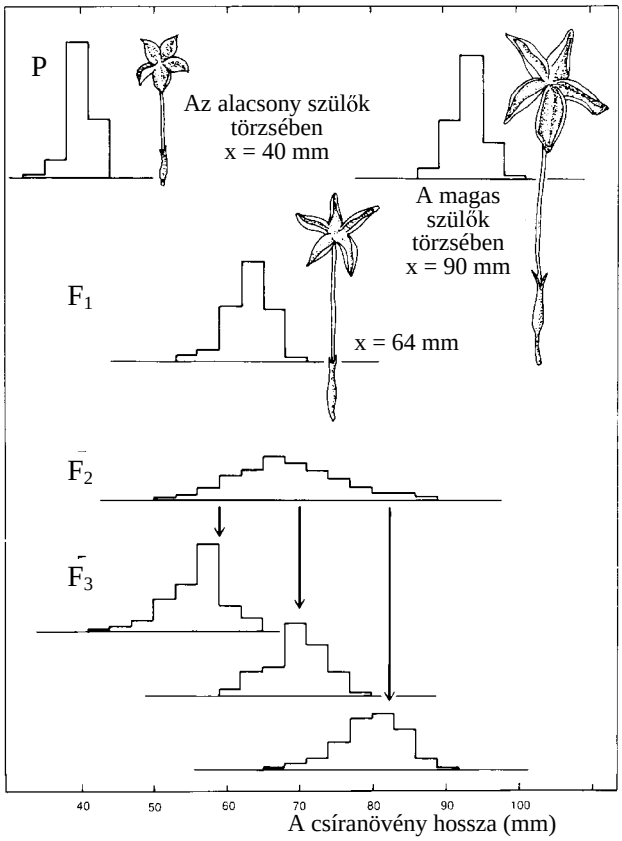
27.8. ábra. A testmagasság folytonos eloszlása a poligénikus tulajdonságok közismert példája.



27.9. ábra. Az anyák és fiaik testmagassága közötti csaknem lineáris kapcsolat a genetikai tényezők szerepét jelzi a testmagasság meghatározásában.

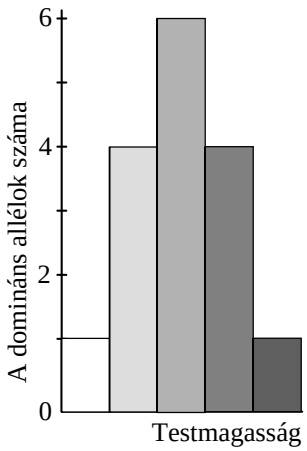
A klasszikus mendeli genetika és a folytonosan változó tulajdonságok közötti kapcsolat könnyen bizonyítható. Állítsuk elő el egy ún. kétfaktoros domináns/recesszív keresztezés F2 generációját, úgy, amint azt a 7.3. táblázatban tettük: *Aa*; *Bb* x *Aa*; *Bb*. Tételezzük fel, hogy (1) pl. a testmagasságot a domináns allélok száma határozza meg és hogy (2) az *A* és a *B* domináns allélok azonos mértékben járulnak hozzá a testmagassághoz. Az F2 generációban az *aa*; *bb* kombináció határozza meg az alapmagasságot (27.11. ábra). A 0, 1, 2, 3 és 4 domináns allélt hordozó egyedek száma rendre 1, 4, 6, 4 és 1, és tipikus *normális eloszlást* mutat (27.11. ábra). Természetesen minél több allél határoz meg egy tulajdonságot, annál folytonosabb az eloszlás.

Általánosságban érvényes az a megállapítás, hogy a poligénikusan öröklődő tulaj-donságokat genetikai és környezeti hatások is meghatározzák. A *heritabilitás* a genotípus szerepének mértéke az utódok fenotípusának változékonyságban. A heritabilitás egy olyan mérőszám, amely adott időben, valamely tulajdonságot illetően jellemző a populációra. A poligénikusan öröklődő tulajdonságokat a környezet is befolyásolja (klíma, a táplálék mennyisége, minősége, a betegségek stb.)



27.10. ábra. A csíranövények magasságának alakulása rövid és hosszú növények hibridjeiben.

Az ivarsejtek genotípusa	Az ivarsejtek genotípusa			
	a; b	*A; b*	*a; B*	*A; B*
a; b	*aa; bb*	*Aa; bb*	*aa; Bb*	*Aa; Bb*
A; b	*Aa; bb*	*AA; bb*	*Aa; Bb*	*AA; Bb*
a; B	*aa; Bb*	*Aa; Bb*	*aa; BB*	*Aa; BB*
A; B	*Aa; Bb*	*AA; Bb*	*Aa; BB*	*AA; BB*



27.11. ábra. A 0-4 domináns (*A* és *B*) allélt hordozó növények eloszlása jellegzetes normális eloszlást követ az *Aa*; *Bb* x *Aa*; *Bb* keresztezésből származó utódokban.

A természetes szelekció nyomán természetesen megváltozhat az allélok gyakorisága minden olyan lokuszban is, amelyek egy folytonos eloszlású tulajdonságot határoznak meg. A változások mértéke a szelekció intenzitásával, hatékonyságával, valamint a lokusz genetikai változékonyságával arányos.

Mutációk és a génáramlás

A populációk csak nagy megközelítéssel ideálisak. Az allélok gyakorisága bár többnyire csak lassan, de folyamatosan változik a populációkban a mutációk, a génáramlás és a természetes szelekció következtében. (A génáramlás allélok elterjedését jelenti populációk között.) Bizonyos, hogy a mutációk az új allélok és minden genetikai változékonyság forrásai, az evolúciós változások alapanyagai. A spontán mutációk gyakorisága alacsony. A Tay-Sachs mutációé pl. $1{,}1 \times 10^{-5}$. (A Tay-Sachs betegség alapja egy autoszomális recesszív mutáció a hexozaminidáz enzimet kódoló génben. Az enzim hiánya gyermekkori fekete hályogot, gyengeelméjűséget okoz.) Az USA népességének ismeretében ott évente kb. 77 új mutáns allél képződik.

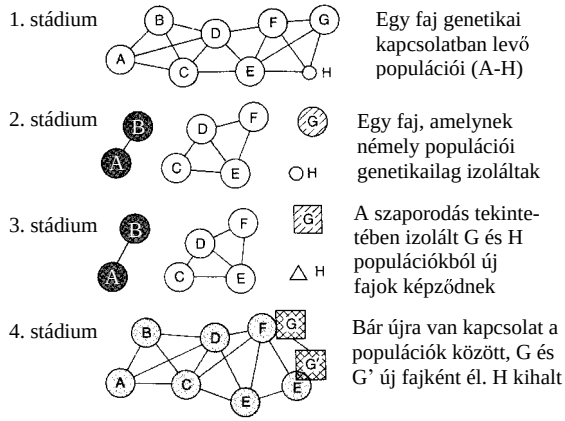
A mutációk nagy többsége hátrányos hatású. Az új allél evolúciós sorsa az allél relatív alkalmasságától függ. A természetes szelekció kiküszöböli az alkalmatlan allélokat a populáció génkészletéből, vagyis az evolúció nem csupán új allélok felbukkanását jelenti. Az új allélnak előbb el kell terjedni és a leggyakrabb változattá kell válnia. Az alélok némelyike adaptív lehet új, megváltozott környezeti feltételek között. Bizonyos, hogy a populációk válasza az új környezeti feltételekhez már előzően létező allélokon múlik.

Genetikai sodródás és az evolúciós változások

A populációk allél gyakorisága, génkészlete véletlenszerű események következtében változik. Következésképpen az evolúciós változások a különféle alternatív lehetőségek bekövetkeztének valószínűségét jelentik. (Tudjuk, hogy az élet esélyek sorozata.) A *genetikai sodródás* (drift) az allélgyakoriságok véletlenszerű fluktuációját jelenti.

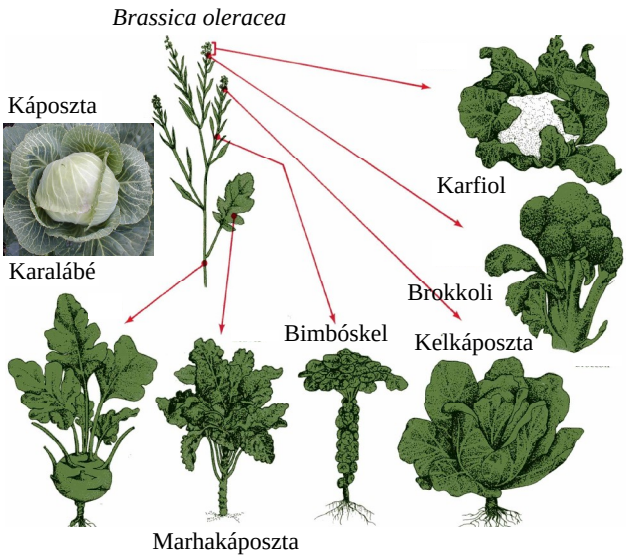
Megtörténik, hogy a populáció mérete hirtelen lecsökken, és a túlélő populáció génkészlete nagyon különbözik az eredetiétől. A genetikai sodródás történhet az ún. *alapító hatás* esetében is, miközben két vagy néhány élőlényből egy új populáció alakul ki. (A telepesek, vagy pl. a verebek esete az USA-ban). A genetikai sodródás során allélszubsztitúció és rögzülés egyidejűleg több alléllal is megeshet. A génkészletben bekövetkező véletlenszerű változásokat a természetes szelekció úgy irányítja, hogy a legadaptívabb allélkombinációkat hordozó élőlények élhetnek túl és szaporodhatnak. Bizonyos, hogy az evolúciós változások valószínűségű természetűek.

A genetikai sokféleség és a fajképződés



27.12. ábra. A fajképződés egy lehetséges mechanizmusa.

A biológiai evolúció alapjai azok a változások, amelyek az élőlények populációinak genetikai diverzitásában, összetételében történnek. A nyírfaszender esete szép példa a genetikai változásra a megváltozott környezeti feltételek mellett. A változó környezeti feltételek során halmozódó genetikai változások vezetnek új fajok képződéséhez. A *fajképződéshez* legalább két genetikai változás szükséges: (1) szaporodási (reprodukciós) izoláció és (2) alkalmazkodás az új környezeti feltételekhez. A *reprodukciós izolációnak* több típusa ismeretes, úgy mint ökológiai, etológiai, mechanikai és fiziológiai (27.12. ábra). Az evolúciós értelemben közeli fajok között ugyan képződhetnek hibridek, de azok életképessége csökkent és csaknem mindig sterilek. Bizonyos, hogy a fajképződés sokkal lassabb folyamat, mint az egy emberöltő alatt érzékelhetnénk.



27.13. ábra. Ki gondolná, hogy a káposzta, a karalábé, a marhakáposzta, a bimbóskel, a kelkáposzta, a brokkoli és a karfiol a vadkáposztából (*Brassica oleracea*) nemesítés (mesterséges szelekció) eredményeként képződött?

Az ember léte, terjeszkedése a Földön alaposan megváltoztatta az élőlények környezeti feltételeit. Sőt, a *mesterséges* szelekció, a genetikailag módosított élőlények révén olyan élőlény-változatokat hozott létre, amelyek neki tetszenek, illetve olyanokat, amelyekből hasznot húz (27.13. ábra).

ÖSSZEFOGLALÁS

Bár a különféle fajok nagyon különbözőknek tűnhetnek, nagyon sok olyan jellemzőjük van, amelyek arra utalnak, hogy minden, a Földön valaha élt faj egyetlen közös őstől származik. Az élőlények sokféleségének alapját a mutációk adják. Az élőlények őrzik mindazt a genetikai variabilitás, amely túlélte a természetes szelekció rostáját. Bizonyos, hogy valamennyien az evolúció győztesei vagyunk ...

IRODALOM

1. Sadava D. és mtsi., Life, the Science of Biology, 440-463, 1167-1184, 2011.
2. Griffith A.J.F. és mtsi., Introduction to Genetic Analysis, 603-714, 2008.
3. Fistrom, J.W. and Clegg, M.T., Principles of Genetics, 135-146, 452-485, 1989.
3. Rédei P.G., Genetika, 631-701, 1987.

28. AZ ÉLŐVILÁG EVOLÚCIÓJA ÉS AZ ÉLETFELTÉTELEK.

Evolúció a molekulák tükrében. Környezet és környezetszennyezés. Az eltartó képesség. A népesség és jellemzői.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze 2011. tavaszán

BEVEZETÉS

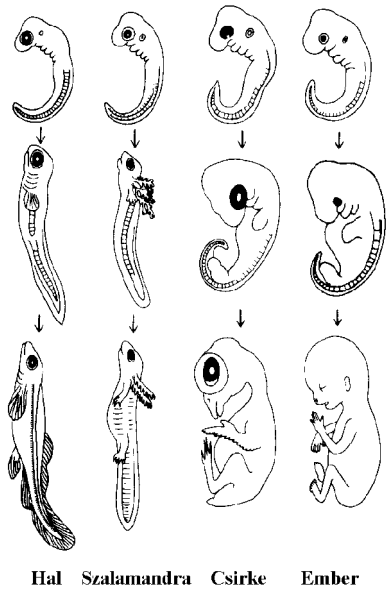
Mindünknek természetes, hogy itt éljük életünket a Földön. Abban a környezetben, amelybe beleszülettünk. Nyilvánvaló, hogy életünk, élményvilágunk térben és időben is erősen korlátozott. Mégis, már bizonyára sokan vetettük fel a következő kérdéseket. Kik vagyunk? Honnan származunk? Mi a szerepünk a világban? Milyen feltételek között éljük életünket? Miként alakul a népesség sorsa? A zárófejezet célja a fenti kérdések megválaszolása. Annak megmutatása, hogy csupán apró állomások vagyunk abban az életfolyamban, amelyben nagyon sok utassal kell úgy osztoznunk a Föld javaiban, hogy maradjon belőle az utánunk jövőknek is.

EVOLÚCIÓ A MOLEKULÁK TÜKRÉBEN

Az előadás-sorozat első fejezetének a következő fontos üzenetei voltak: az élet minden bizonnyal itt, a Földön keletkezett, egyszer, kb. 4 milliárd évvel ezelőtt, és a Földön valaha élt valamennyi élőlény az ún. progenota (a proto-sejt) leszármazottja. A Földön valaha élt valamennyi élőlény az *evolúció* eredménye. Annak a folyamatnak, amely az örökítő anyag folytonos változása és a természetes szelekció révén hozta és hozza létre a sokszínű élővilágot. Az élővilág sokféleségét természetesnek fogadjuk el, és bizony az élőlények sokféle alakja, szerveződöttsége és életmódja alapján alig hihető, hogy minden élőlény egyetlen közös őstől származott. A következőkben olyan molekuláris természetű bizonyítékokat sorolunk fel, amelyek az élőlények közös eredetét mutatják. Megjegyezzük, hogy az élőlények közös eredetét bizonyító jellemzőkre a korábbi fejezetek is említettek példákat. Emlékeztetőül idézzünk fel néhányat.

- Minden élőlény örökítő anyaga DNS.
- A DNS minden ma ismert esetben szemikonzervatív módon történik.
- A DNS-ben tárolt genetikai információ azonos módon, a transzkripció és a transzláció során bomlik ki. A
- A genetikai kód univerzális.
- Vannak olyan DNS szakaszok és fehérje motívumok, amelyek alacsonyabb és magasabb rendű élőlényekben egyaránt megvannak. (Pl. a TATA box, a hélix-kanyar-hélix motívum.)
- Azonos, vagy nagyon hasonló pl. a biológiai membránok, az ioncsatornák szerkezete és funkciója,
- vagy pl. a szignáltranszdukció, a génexpresszió szabályozásának mechanizmusa.

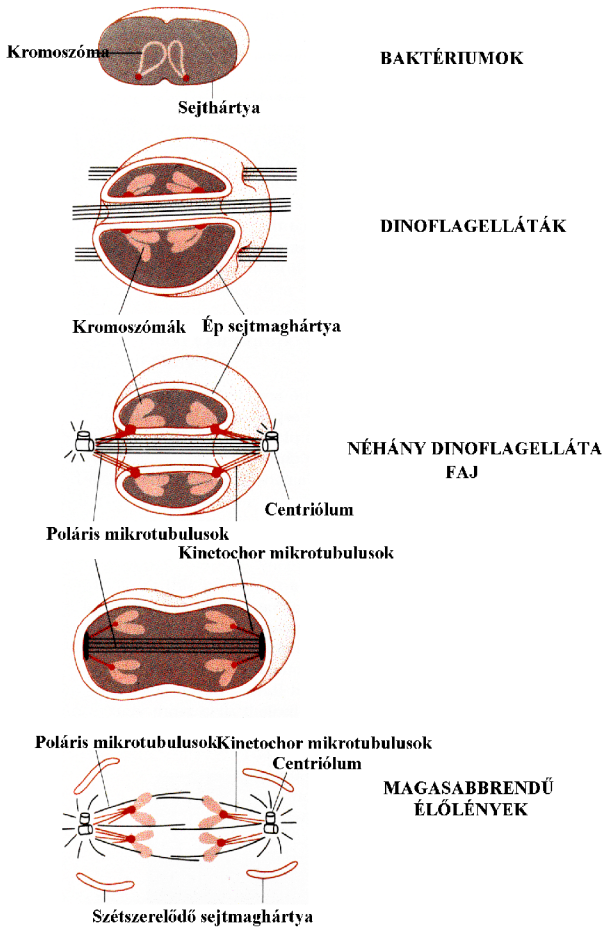
Az élőlények közös eredetére először a fossziliák vizsgálata alapján gondoltak. (Lásd az 1. fejezet anyagát.) Ernst Haeckel (1899) a gerincesek embrióinak hasonlósága alapján következtetett a gerincesek közös eredetére és fogalmazta meg híres következtetését: a gerincesek egyedfejlődésük folyamán főbb vonásaikban megismétlik törzsfejlődésük fontosabb állomásait (28.1. ábra).



28.1. ábra. A különféle gerinces állatok embriói nagyfokú hasonlósága közös eredetükre utal. A fiatal embriók mérete nagyjából azonos. Az egyedfejlődés későbbi stádiumaiban az embriók mérete nagyon különböző lehet.

A mitotikus apparátus evolúciója

Az élővilág közös eredetét szépen mutatja annak a mitotikus apparátusnak a fejlődése is, amely a replikáció nyomán képződő új DNS kettős spirálok (kromoszómák) "igazságos" elosztást biztosítja a leánysejtek között (28.2. ábra). A legegyszerűbb esetben, a prokariotákban, a kromoszómák a sejthártyához kapcsolódnak. A sejthártya lefűződése biztosítja a baktérium kromoszómák szegregációját. Bár a kétostoros Dinoflagelláta eukariota egysejtűekben vannak mikrotubulusok (MT-ok) és át is ívelnek a sejtmagon átívelő „alagutakon", a kromoszómák mégis a sejtmaghártyához kapcsolódva szegregálódnak. Más Dinoflagelláta fajokban a kromoszómák kinetochorja-ikkal kapcsolódnak a sejtmaghártyához. Ugyanahhoz a ponthoz, ahová a kinetochor MT-ok (28.2. ábra). A kromoszóma szegregáció a sejtmaghártya és a kinetochor MT-ok pontosabban a dineinek közös erőfeszítésének eredménye. Élesztőkben egyetlen kinetochor MT kapcsolódik a kromoszómákkal a sejtmagon belül és veszt részt a dineinekkel együtt a kromoszómák szegregációjában. Anélkül, hogy a sejtmaghártya lebomlana. A mitotikus apparátus emberre is jellemző formája, amely a sejtmaghártya lebomlásával és újraalakulásával jár, az evolúció késői szakaszában alakult ki (28.2 ábra).

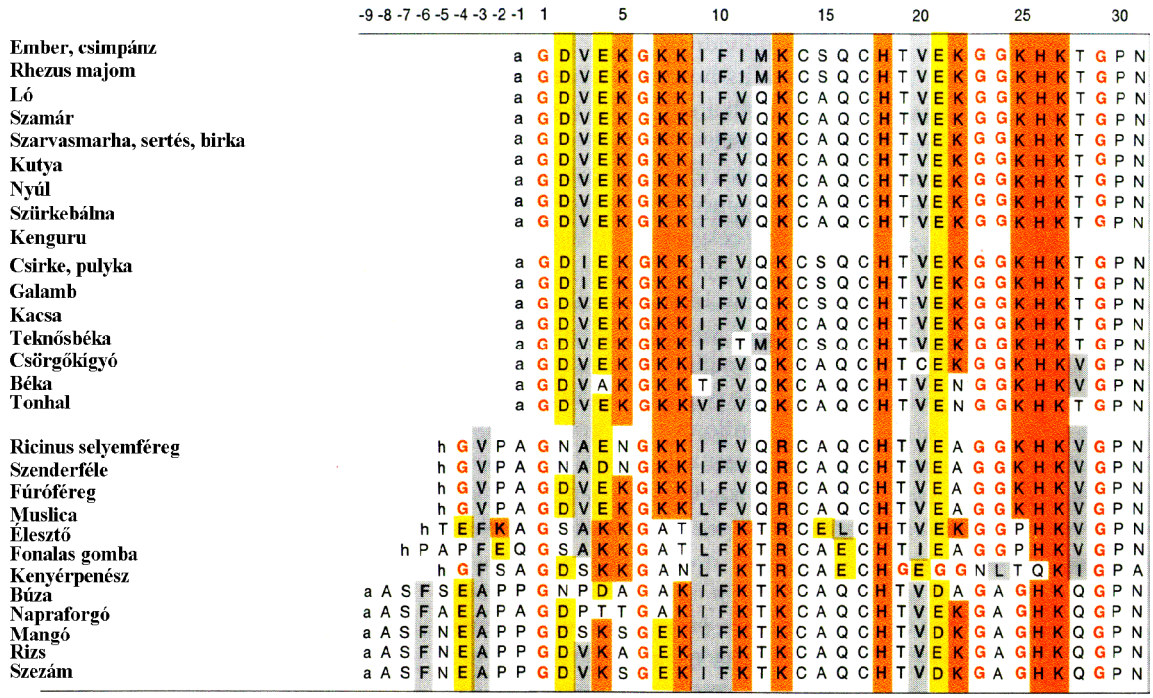


28.2. ábra. A mitotikus apparátus evolúciója.

Evolúció az aminosav szekvencia tükrében

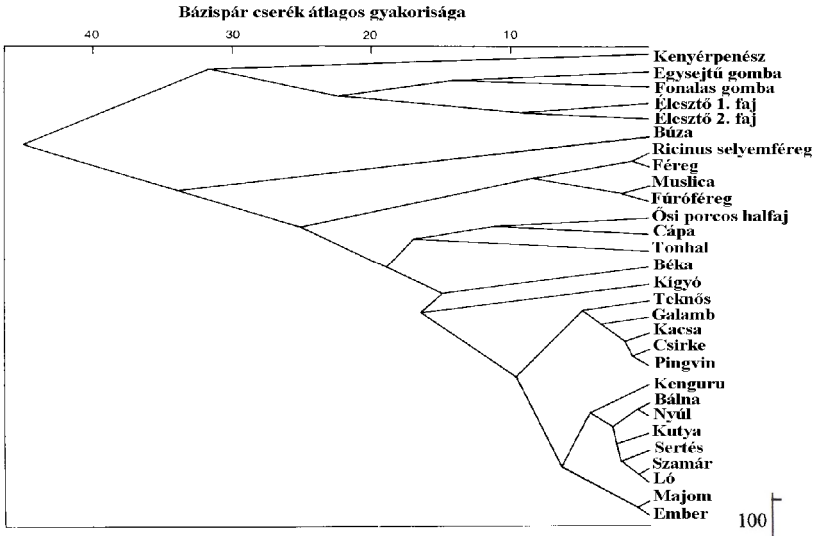
Az evolúció molekuláris szintű tanulmányozására azután nyílt lehetőség, miután meg lehetett határozni a fehérjéket alkotó aminosavak, majd jóval később a nukleinsavak nukleotid sorrendjét, valamint nagyteljesítményű számítógépek és alkalmas programok készültek a szekvenciák vizsgálatára. (Először az inzulin aminosav sorrendjét határozták meg 1955-ben.) Az elsőként vizsgált fehérjék egyike volt az a citokróm c, amely a légzési lánc egyik eleme.

A 28.3. ábra harminchárom faj citokróm c aminosav sorrendjének egy részletét mutatja. Az aminosav szekvencia analízise nyomán érdekes következtetésekre jutottak a szakemberek. (1) Az aminosav sorrend hosszú szakaszokon át azonos olyan evolúciósan távoli fajokban, mint pl. a rizs és a ló. Az esély arra, hogy egy fehérjében, pl. a KCAQCHTVEK aminosav sorrend véletlenszerűen kialakuljon = $(1/20)^{10}$, lényegében nulla. (A 13-23. helyek közötti tíz aminosav; 28.3. ábra.) Mégis, a KCAQCHTVEK aminosav sorrend a 33 faj közül tízben változatlan formában van meg, jelezve, hogy a KCAQCHTVEK szekvencia nem a véletlen műve, hanem egy olyan szekvencia, amely "bevált" az evolúció folyamán és megőrződött. (2) A citokróm c kulcsfontosságú pozícióiban ugyanaz az aminosav van minden fajban. Az “állandó" aminosavak meghatározó fontosságúak a molekula szerkezetében és/vagy funkciójában. Természetesen a gondolatmenet fordítva is igaz: a fehérje molekula szerkezetében/funkciójában azon aminosavak fontosak, amelyek az evolúció folyamán megőrződtek, konzerválódtak.

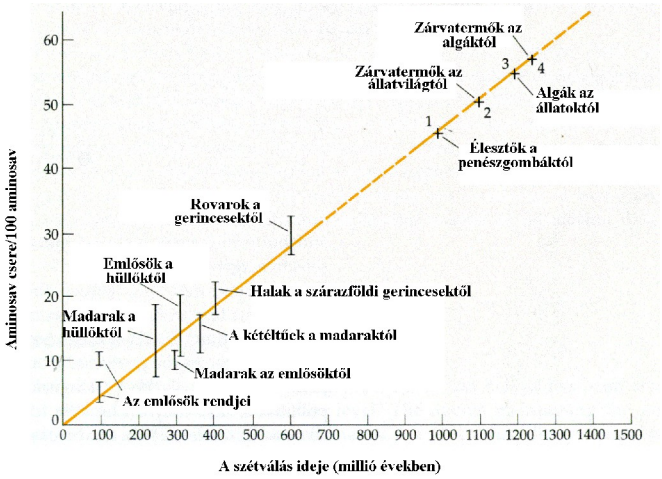


28.3. ábra. A citokróm c-t alkotó aminosav szekvenciák különféle fajokban. A betűk az aminosavak egybetűs kódját jelentik.

(3) A fontos helyeken hasonló természetű aminosavak is lehetnek, amelyek halk mutációk következményei: a 13. helyen pl. lizin (K) vagy arginin (R) van. (4) Nyilvánvaló, hogy minél több helyen azonosak az aminosavak (vagy azonos természetűek), annál közelebbi rokonságban vannak a fajok. Az aminosav egyezés alapján rokonsági kapcsolatokra lehet fényt deríteni (28.4. ábra). Sőt, az aminosavak cseréjét eredményező spontán mutációk gyakorisága alapján azt is meg lehet határozni, hogy a különböző fajok hány éve különültek el egymástól (28.5. ábra).

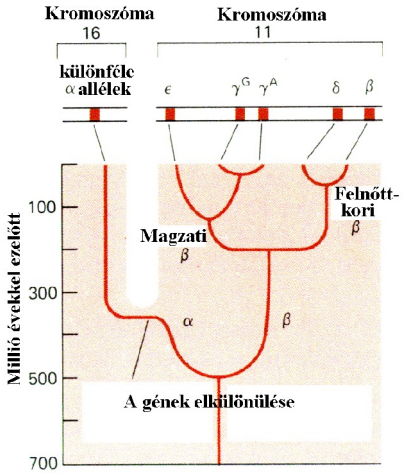


28.4. ábra. A citokróm c aminosav szekvenciák hasonlósága/különbözősége alapján rokonsági viszonyok állapíthatók meg a különféle fajok között.

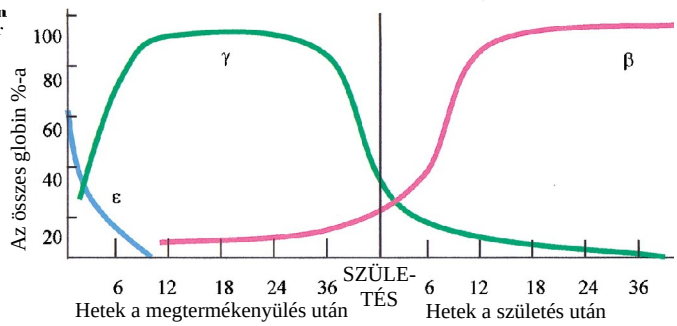


28.5. ábra. A élőlény csoportok leszármazási kapcsolatainak időbeni alakulása a citokróm c aminosav szekvenciák összehasonlítása alapján.

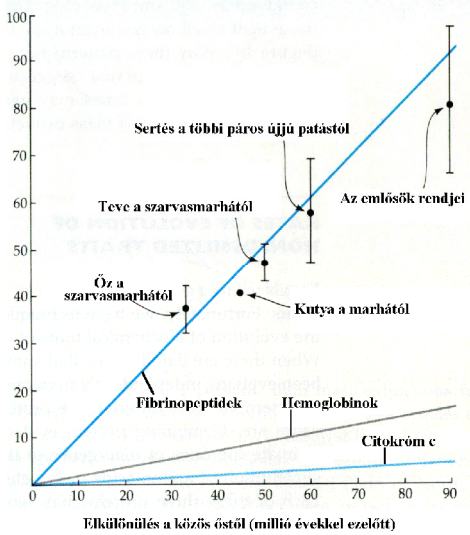
A különböző fehérje féleségek aminosav szekvenciáinak összehasonlítása alapján további érdekességekre derült fény. A hem csoporttal kapcsolódó, az oxigén szállításában valamilyen szerepet betöltő valamennyi fehérje molekula egyetlen közös *globin* őstől ered (28.6. ábra). Attól, amely az evolúció során először. kb. 1 - 1,5 milliárd évvel ezelőtt alakult ki. Akkor, amikor a légkör O_2 koncentrációjának emelkedése nyomán lehetőség kínálkozott előbb a légzés, majd a soksejtűség kialakulására. Az ősi globin gén duplikációjával és mutációjával jöttek létre azok a ma ismert változatok, amelyek különféle funkciókat töltenek be az egyedfejlődés különféle stádiumaiban és a különféle szervekben (28.7. ábra).



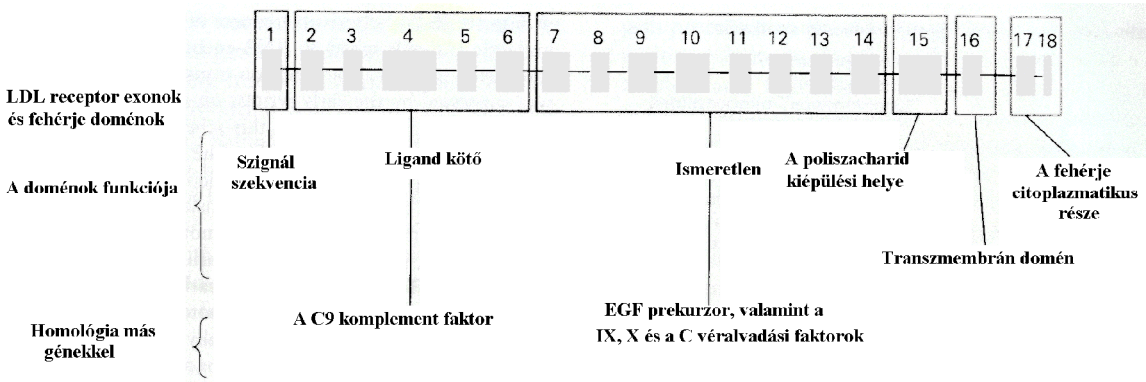
28.6. ábra. A globin gének leszármazási viszonyai.



28.7. ábra. A globin fehérje család expressziós mintázata az ember egyedfejlődése során.



28.8. ábra. A különféle fehérje családok evolúciója eltérő sebességgel halad.



28.9. ábra. A kis sűrűségű lipoprotein (LDL) receptor génben olyan különféle funkcionális motívumok vannak, amelyek másféle fehérje féleségeknek is részei.

Arra is fény derült, hogy a különféle fehérje családok az evolúció során eltérő sebességgel változnak. Amíg a régi, "ősi" fehérjék evolúciója lassú, a nem túl régen kialakult fehérje féleségek evolúciója gyors (28.8. ábra).

A különféle fehérje családok összehasonlítása nyomán derült fény arra, hogy vannak olyan funkcionális motívumok, az ún. *domének*, amelyek különféle funkciót betöltő fehérje molekulának lehetnek részei. Jellegzetes példaként említettük a homeodomént és a transzmembrán domént. Egy fehérjében gyakorta többféle domén is előfordulhat, gyakran több kópiában (28.9. ábra). A háttérben elsősorban az ún. *exon keveredés*, a mobilis genetikai elemek és az egyenlőtlen crossing over áll. Olyan genetikai mechanizmusok, amelyek átrendezik az örökítő anyagot, és különféle DNS szakaszok véletlenszerű kombinációja révén hoznak létre új DNS szakasz kombinációkat, köztük géneket is. Ha a gének kiállják a természetes szelekció rostáját, az evolúció megőrzi az új géneket. Ha viszont haszontalannak bizonyulnak, elvesznek.

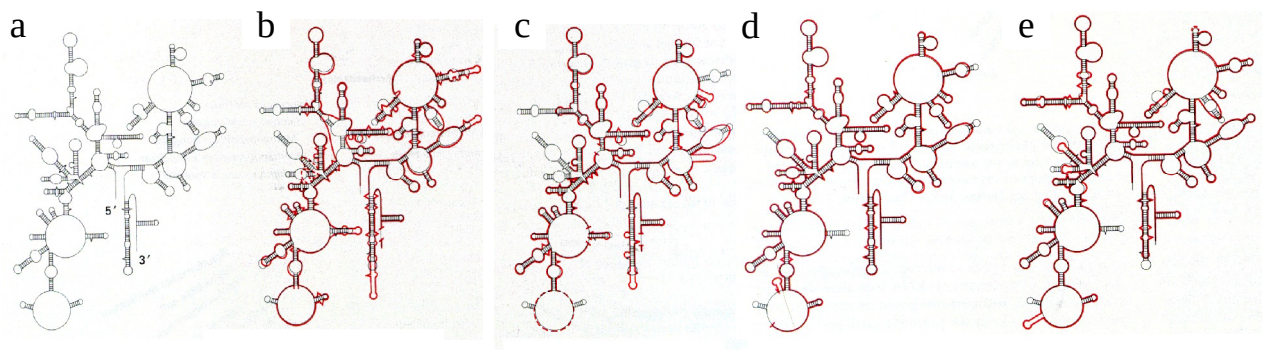
28.10. ábra. A 16S és a 18S rRNS-ek térbeli szerkezete nagyon hasonló a különféle fajokban; a: *E. coli*, b: *Xenopus laevis* (afrikai karmos béka), c: pékélesztő, d: kloroplaszt, e: egy archaebaktérium faj.

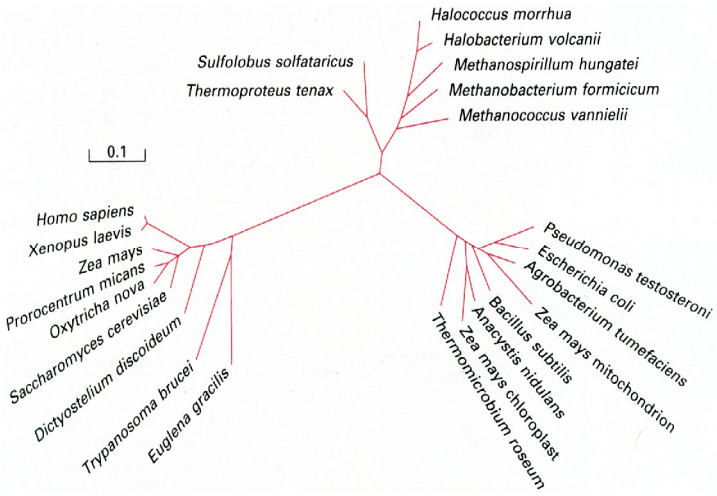
Evolúció a nukleinsav szekvenciák tükrében

A fehérje molekulák aminosav sorrendje mögött a nukleinsavak nukleotid szekvenciája áll. Ám amíg az aminosav szekvencia meghatározására az 1950-es évek közepétől voltak módszerek, a nukleinsavak szekvenálására alkalmas módszereket csak 1977-ben (Sanger módszere) illetve 1980-ban (Maxam és Gilbert módszere) közölték. Időközben a számítógépes szekvencia analízis lehetőségei is ugrásszerűen nőttek. Ma a szekvencia analízisek döntő többsége a nuklein-sav szekvenciákon alapul. Az evolúció azon jellem-zőire, amelyeket a nukleinsav szekvenciák alapján ismertünk meg, a következő példákat említjük.

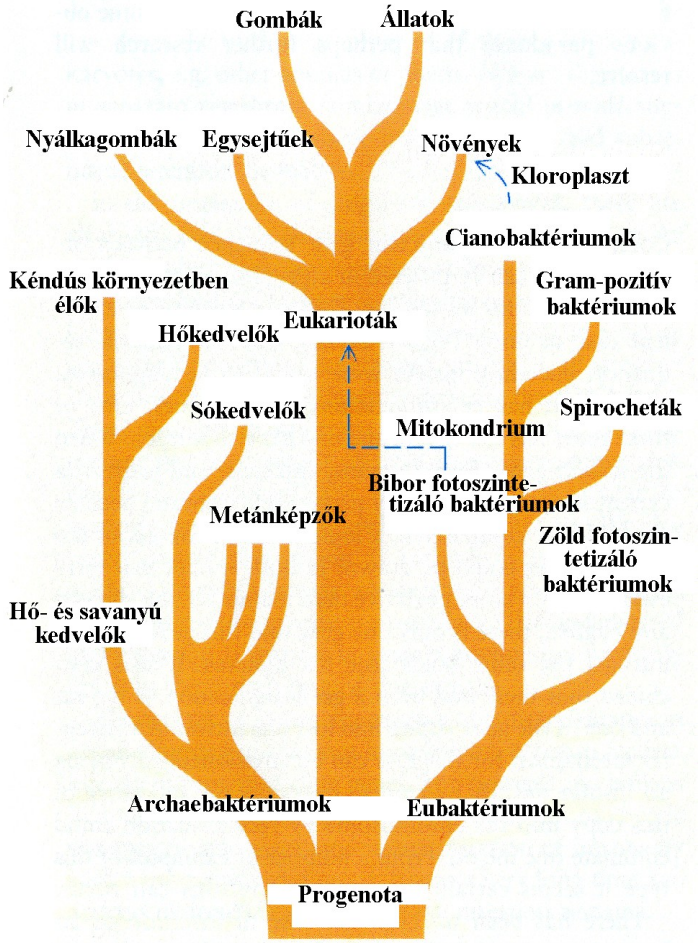
1. Származás viszonyok az rRNS szekvenciák tükrében

A 16S illetve a 18S rRNS a kis riboszóma alegységek alkotója, pro-, illetve eukariotákban. A kétféle rRNS szerkezete, amint az a komplementer nukleotid szekvenciák alapján meghatározható, minden élőlényben nagyon hasonló (28.10. ábra). A 16S illetve a 18S rRNS szerkezet hasonlósága bár szép bizonyíték az élőlények közös eredetére, nem tükröz származási viszonyokat. A 16S és 18S rRNS-ek nukleotid szekvenciák összehasonlítása alapján viszont világosan kiderült, hogy az élőlények három nagy származási vonalat alkotnak (28.11. ábra): (i) archaebaktériumok (ősbaktériumok), (ii) valódi baktériumok és (iii) eukarioták. A 16S és a 18S rRNS-ek nukleotid szekvenciája alapján az is kiderült, hogy a mitokondriumok és a kloroplasztok valódi baktérium eredetűek, vagyis a kétféle sejt organellum eredetére vonatkozó ún. endoszimbionta hipotézis minden bizonnyal igaz. A mitokondriumok a bíbor fotoszintetizáló baktériumok, a kloroplasztok pedig a cianobaktériumok leszármazottai. Az rRNS-ek szekvencia analízise alapján állították össze azt a törzsfát, amelyet a 28.12. ábra mutat.





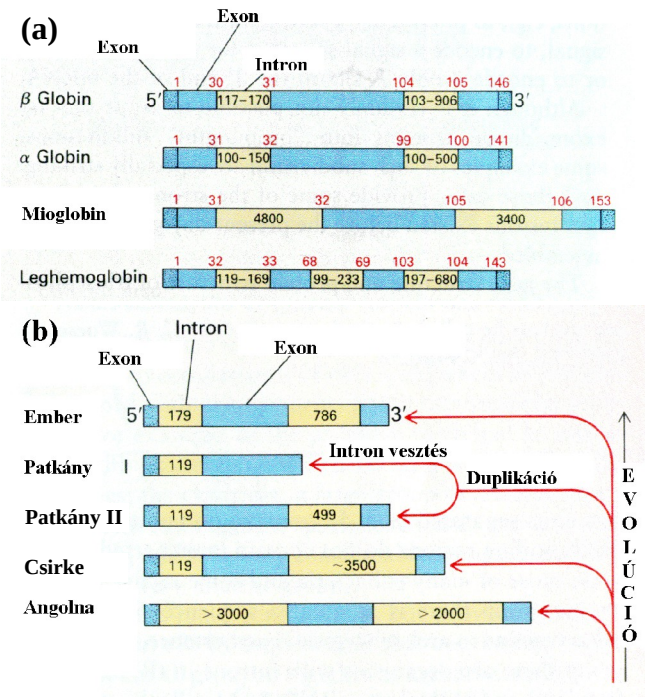
28.11. ábra. Származási viszonyok a 16S illetve a 18S rRNS nukleotid szekvencia alapján.



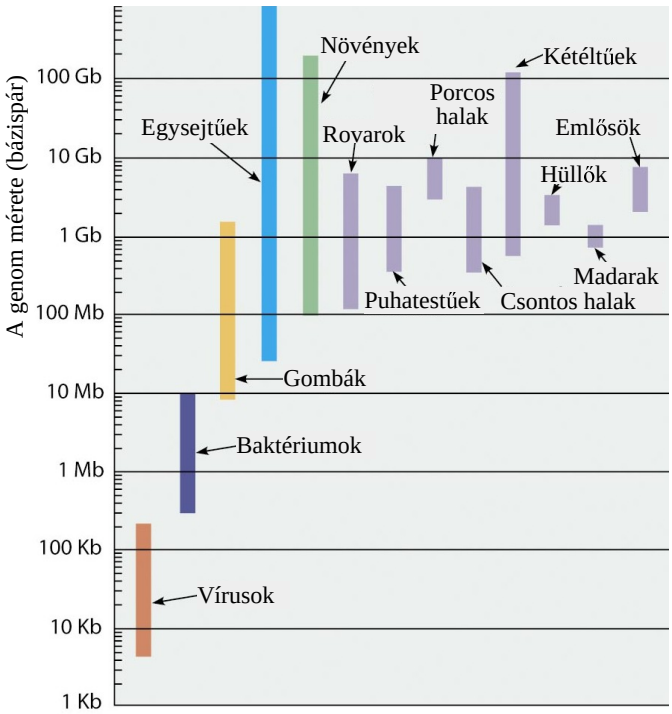
28.12. ábra. Az rRNS nukleotid szekvenciák alapján összeállított törzsfa.

2. Evolúció az intronok tükrében

A DNS analitikai módszerek (Southern analízis, restrikciós térképezés, PCR, szekvenálás) egyszerűsödése nyomán vált lehetőség azoknak a DNS szakaszoknak az izolálása és szekvenálása, amelyek ugyanazt a fehérje féleséget kódolják a különféle fajokban. A szekvencia vizsgálatok alapján egyebek között a következő két fontos jelenségre derült fény. (i) Az intronok a rokon fehérjékben többnyire ugyanabban a pozícióban vannak (28.13. ábra). (ii) A törzsfejlődés során az intronok rövidülnek, sőt el is veszhetnek. Példaként az inzulin gént említjük (28.13. ábra). Nyilvánvaló, hogy nem veszhetnek el azok az intronok, amelyekben gének vannak, és azok sem, amelyeknek a génexpresszió szabályozásában van szerepük. Várható, hogy nemcsak az intronok, hanem a gének közötti nem kódoló szakaszok is elvesznek az egymást követő generációk folyamában, és csökken a genomok mérete. És valóban, az élőlények közül a baktériumok genomja a legkisebb. A baktériumok generációs ideje percekben mérhető. A végtelenül sok generáció során volt alkalmuk megszabadulni a felesleges szekvenciáktól. Ugyanakkor a növények és némely kétéltű faj genomja nagyon nagy (28.14. ábra).



28.13. ábra. (a) Az intronok többnyire ugyanabban a pozícióban vannak. Az ábra az ember különféle globin génjeit, valamint a pillangósvirágúak leghemoglobin génjét mutatja. (b) Az inzulin gén szerkezete négy fajban. Az oszlopok feletti számok annak a bázispárnak a pozícióját jelölik, ahol az intron kezdődik. Az oszlopokban levő számok a bázispárok számát mutatják az intronokban. A patkány evolúciós vonalán az inzulin gén duplikálódott. A két inzulin gén egyikéből az egyik intron elveszett.



28.14. ábra. Genom méret az élőlények különféle csoportjaiban.

3. Az Éva és az Ádám hipotézis

Amint azt fent említettük, a szekvencia, valamint és a spontán mutáció gyakoriságának ismeretében nemcsak rokonsági viszonyok állapíthatók meg, hanem azok időbeni alakulása is. A mitokondriális DNS (mtDNS) a következő okok révén alkalmas származási viszonyok felderítésére: (i) a mtDNS anyai eredetű. (ii) A mitokondriumok DNS molekulái között nem játszódik le crossing over. (iii) A mtDNS-nek nincs reparációja. (iv) A mtDNS-ben van egy olyan 1 kbp-nél kissé hosszabb szakasz, amely nem kódolja RNS-ek szintézisét. Az utóbbi szakaszon anélkül következnek be mutációk, hogy befolyásolnák a mtDNS funkcióját. A különféle ember típusok mtDNS-ének vizsgálata alapján fogalmazódott meg az ún. Éva hipotézis, melynek fontosabb megállapításai a következők: (i) az emberfaj (*Homo sapiens*) kb. 200 ezer éve alakult ki, (ii) mintegy tucatnyi alapító emberből. Nagyjából hasonló következtetéseket engedtek meg azok az Ádám hipotézis néven ismert vizsgálatok is, amelyek alapja az Y kromoszóma DNS egy szakaszának nukleotid szekvenciája. (Az Y kromoszóma apai eredetű, nem vesz részt crossing overben, és mert csak kevés gént tartalmaz, bőven vannak rajta olyan DNS szakaszok, amelyekben indukált mutációk nem befolyásolják a hímek életképességét, fertilitását.)

Evolúció és a genetikai kód

Ma még nem teljesen világos, hogy miként alakult ki a DNS, annak különféle szekvenciái és a genetikai kód. Valószínű, hogy a prebiotikus körülmények között képződött RNS típusú molekulák katalizálták azokat a reakciókat, amelyek az első élőlény kialakulásához vezettek. Bár az RNS molekulák meglehetősen instabilak, bennük rejlik az RNS → DNS átalakulás lehetősége, annak a molekula típusnak a képződése, amely stabil, és ma minden élőlény örökítő anyaga. Az RNS → DNS átalakulásra két lehetőség látszik: (i) RNS minta alapján reverz transzkriptáz aktivitású enzimek szintetizálnak DNS-t. (ii) Az ún. ribonukleotid reduktáz enzimek képesek a ribóz 2' -OH csoportjának oxigénjét eltávolítani, a ribózt deoxiribózzá alakítani. A metil transzferáz enzimek egyik fajtája pedig -CH_3 csoportokat tud "illeszteni" az uracilok 5. szénatomjához, az uracilokat timinné alakítva. Volt tehát lehetőség DNS kialakulására. Bár a fent említett három enzimféleség aktivitása mindannyiunkban kimutatható, szerepük a DNS képződésében ismeretlen.

Nehéz kérdés a genetikai kód kialakulásának módja. Az a tény, hogy a leginkább hidrofób természetű aminosavak kodonjának második bázisa pirimidin (jelesen U), a leginkább hidrofileké purin bázis (jelesen A) azt jelzi, hogy a genetikai kódokban a második bázis a legfontosabb, és alighanem a legősibb (28.15. ábra). Megválaszolásra várnak viszont olyan alapvető kérdések, mint pl. miért éppen három bázisból áll a genetikai kód? Miért "lötyög" (degenerált) a genetikai kód? Miért nem átfedő, és miért szünetmentes? Miként alakult ki a transzláció mechanizmusa? Bizonyos viszont, hogy a DNS szekvenciák alapján lehetőség van az evolúció sok jellemzőjének a megismerésére. Nem véletlenül gondolja sok szakember, hogy mi vagyunk a legjobb fosszíliák DNS-ünkkel, benne az elmúlt évmilliók nyomaival…

Első nukleotid (5′ vég)	Második nukleotid U	C	A	G	Harmadik nukleotid (3′ vég)
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (Met)	Ala	Glu	Gly	G

Hidrofób ← → Hidrofil

28.15. ábra. Az mRNS kodonok és a kódolt aminosavak természete közötti kapcsolat azt jelzi, hogy evolúciósan a genetikai kódok második tagja a legősibb.

ÉLETFELTÉTELEK A FÖLDÖN

A életfeltételek fokozatosan alakultak ki a Föld 4,5 milliárd évnyi története során. Biztos, hogy a fotoszintézis alapvető fontosságú volt a mai életkörülmények kialakulásában: egyrészt kivonta a légkörből annak a CO_2-nek nagyon nagy többségét (és lettek belőle szén, kőolaj és földgáz telepek), ami az üvegházhatás egyik komponense, másrészt O_2-t eredményezett, ami lehetővé tette az ózon pajzs kialakulását, az oxigén használatán alapuló légzést, ami a magasabb rendű élőlények kialakulásának alapvető feltétele.

Az életfeltételek folyamatosan változtak, és változnak ma is. Az élet lényegében a Föld felszíne mentén egy vékonyka rétegre szorítkozik. Az ember tevékenysége révén nemcsak az élőlények, hanem a környezeti feltételek is változtak, változnak. Itt csak utalunk a mesterséges szelekcióra, a különféle mérgező szerekkel szemben rezisztens baktériumokra, rovarokra és növényekre. Sajnos, az emberiség rutintalansága, mohósága, hanyagsága sok olyan káros hatással volt a környezetre, amely az élővilág - benne az ember - sorsát is fenyegette, fenyegeti. Ha megismerjük a környezet és az élővilág kapcsolatát, olyan körülményeket teremthetünk nemcsak magunknak, hanem leszármazottainknak és más élőlényeknek is, amelyek között biztonságban élhetjük, élhetik életüket. A környezetre vonatkozó ismereteinket a légkör, a vizek és szárazföld szempontja alapján tekintjük át, hangsúlyozva a három élettér rész kölcsönhatását.

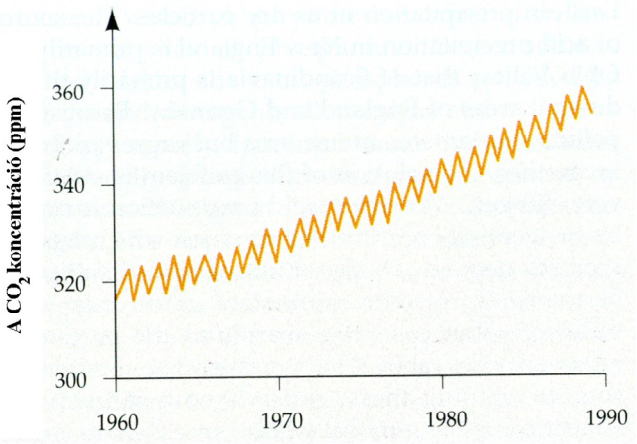
Légkör

A Föld légkörét 78% N_2, 21% O_2, 0,03% CO_2 és nyomnyi mennyiségű további komponensek alkotják. Földünk átlagos hőmérséklete +17°C. (Légkör nélkül a Föld hideg bolygó lenne -18°C-os átlagos hőmérséklettel. Az élet nélküli Föld 95% CO_2-al és 3% N_2-el a légkörében olyan forró lenne, mint a Vénusz.) A légkört alapvetően három veszély fenyegeti.

(1) *Az ózon réteg vékonyodása.* Az ultraibolya sugárzás hatására játszódik le az $O_2 \rightarrow O_3$ reakció, amely eredményeként a sztratoszférában kialakul az az ózon pajzs, amely elnyeli a Fölre érkező ultraibolya sugárzás zömét. A halogénezett szénhid-rogének, elsősorban a freon (hűtőszekrényekből, spraykből, a légkondicionálókból) roncsolja az ózon pajzsot. Az ózon réteg vékonyodása, az ún. ózon lyuk képződése nyomán a Föld felszínét intenzív ultraibolya sugárzás éri, amely miatt (i) a korábbinál sokkal gyakoribbá válnak a timin dimerek képződésén alapuló mutációk. Mutációk következnek be egyebek mellett a sejtosztódásokat szabályozó génekben is, ami miatt gyakorivá váltak pl. a bőrrákos megbetegedések. (ii) Az ózon lyuk alatt csökkennek a termésátlagok: már 30%-os csökke-nésről is szóltak tudósítások.

(2) *Az üvegházhatás.* A Föld felszínét érő sugárzás egy része visszaverődik, másik része elnyelődik. Az elnyelődött rész egy része hővé alakul, és a beérkezőnél hosszabb hullámhosszon kisugárzódik a világűrbe. A hősugárzást nem engedi át az üveg (a fólia) és melegíti az üvegházat. A hősugárzást a CO_2 is elnyeli. A légkör CO_2 koncentrációja folyamatosan emelkedik, elsősorban a fosszilis szén elégetése miatt, fokozva az üvegházhatást, általános felmelegedést okozva (28.16. ábra). A CO_2 koncentráció emelkedés fontos tényezője annak a fotoszintetizáló kapacitásnak a csökkenése is, amely CO_2-t hivatott kivonni a levegőből. Közülük az esőerdők területének megállíthatatlannak tűnő fogyatkozása a legsajnálatosabb tényező. Nemcsak a fotoszintetizáló kapacitás csökkenése miatt, hanem azért is, mert az esőerdők pusztulásával olyan fajok sokasága vész el, amelyeket még csak meg sem ismerhetett az emberiség.

Az üvegház hatás másik fontos tényezője a metán, amely hatékonyabban növeli az üvegházhatást, mint a CO_2. A kérődző állatok emésztő rendszerében élő metánképző baktériumok sok metánt termelnek. Még sohasem élt annyi szarvasmarha Földünkön, mint napjainkban. Tiszta szerencse, hogy vannak metánbaktériumok is, amelyek elégetik a metánt. Igaz, az égés egyik terméke CO_2.



28.16. ábra. A légkör CO_2 koncentrációja folyamatosan emelkedik.

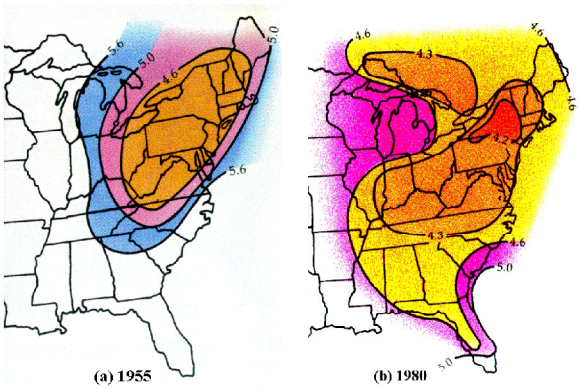
(3) *A savas esők.* Elsősorban a fosszilis anyagok elégetése és a robbanómotorok tevékenysége folytán olyan kén- és nitrogén oxidok kerülnek a levegőbe, amelyek a vízben oldódva savas esőként hullanak a földre (28.17. ábra). A savas eső miatt főleg a talaj mikroorganizmusai pusztulnak el. A mikroorganizmusok pusztulása nyomán aztán olyan élőlények is elhalnak, mint pl. a tölgyfák, és aztán azok is, amelyek élete a tölgyfától függ. Szomorú, hogy a savas esők, mint ahogy a freon vagy a CO_2, nem ismerik az országhatárokat.

Víz

Tévedés azt hinni, hogy a Földön korlátlan mennyiségben van víz, és ivóvíz. Tény az is, hogy a vizek élővilága módfelett érzékeny a környezetszennyezésre. Az *eutrofizáció* során olyan nitrogén és foszfor jut fölös mennyiségben a tavakba, amely alapján burjánozni kezd a tavak élővilága. Az élőlények elfogyasztják a vízben oldott oxigént. Az

oxigén fogyása sok élőlény pusztulásához vezet. Az elpusztult élőlények bomlása során mérgező bomlástermékek (pl. H_2S) képződnek, és végső soron az élő tó bűzös posvánnyá változik. Költséges munkával a folyamat megfordítható, helyreállítható az eredeti állapot. Fontosabb azonban a megelőzés: annak megakadályozása, hogy mindenek előtt foszfort tartalmazó vegyületek kerüljenek a tavakba. A foszfor az az elem, amely normális körülmények között korlátozza az édesvízi élőlények számát. A foszfor tartalmú mosószerek, műtrágyák illetve az őket tartalmazó szennyvizek bizony biztos lépések az eutrofizáció felé.

A part menti algák termelik azt a dimetil szulfidot (kiszáradásuk ellen), amely gócként szerepel az esőképződés során. A környezetszennyezés nyomán elpusztuló algák az esők elmaradásához, sivatagosodáshoz vezetetnek.



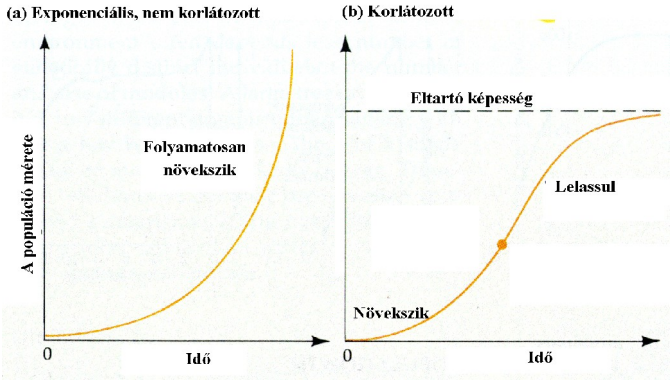
28.17. ábra. A felszíni vizek elsavanyodása az USA keleti iparvidékének környékén.

Talaj

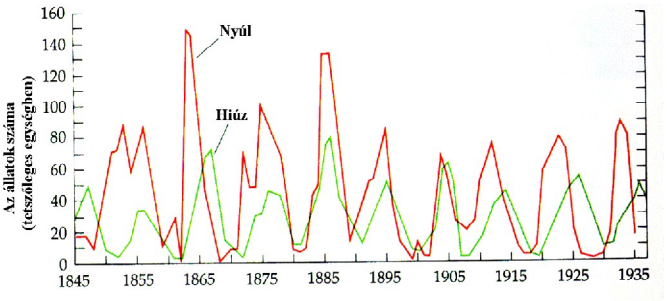
Bár Földünk felszínének 1/4-e szárazföld, a művelhető rész aránya csekély. A talaj egy olyan életközösség, amely szerepe alapvető fontosságú nemcsak a mezőgazdasági termelés, hanem az egész élővilág szempontjából. A tarvágások, az avarégetés, a herbicidek évtizedekre szóló károsodást okozhatnak a talaj élővilágában.

A környezet eltartó képessége

Ha egy edény húslevesbe egyetlen baktériumot teszünk, majd a baktériumok számát az idő függvényében vizsgáljuk, azt tapasztaljuk, hogy a baktérium populáció mérete exponenciálisan, korlátlanul növekszik (28.18. ábra). A lehetőség elméleti, mert egy idő multán kimerülnek a környezet javai, és az élőlények száma állandósul a környezetben. Azt a maximális egyedszámot, amely egy adott környezetben, egy időben élhet, nevezik a környezet eltartó képességének (28.18. ábra). Természetesen az egyedszám időben egy átlagérték körül oszcillál (28.19. ábra). A környezet eltartó képességét olyan tényezők határozzák meg, mint a rendelkezésre álló táplálék mennyisége, a fészkelő és a búvó helyek, a betegségek, a ragadozók, a közösségi kölcsönhatások stb. Alapvető fontosságú alighanem a táplálék mennyisége. A kártevők populációit legkönnyebben úgy lehet minimális szinten tartani, ha csökkentjük a rendelkezésükre álló táplálék mennyiségét.



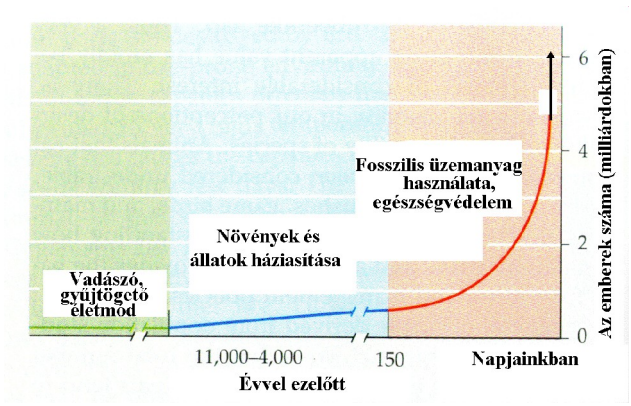
28.18. ábra. Egy populáció méretének növekedése nem korlátozott (a) és korlátozott (b) feltételek között.



28.19. ábra. A hiúz és a nyúl populáció mérete Kanadában 1945 és 1935 között bár egy-egy átlagérték körül váltakozott, állandó maradt.

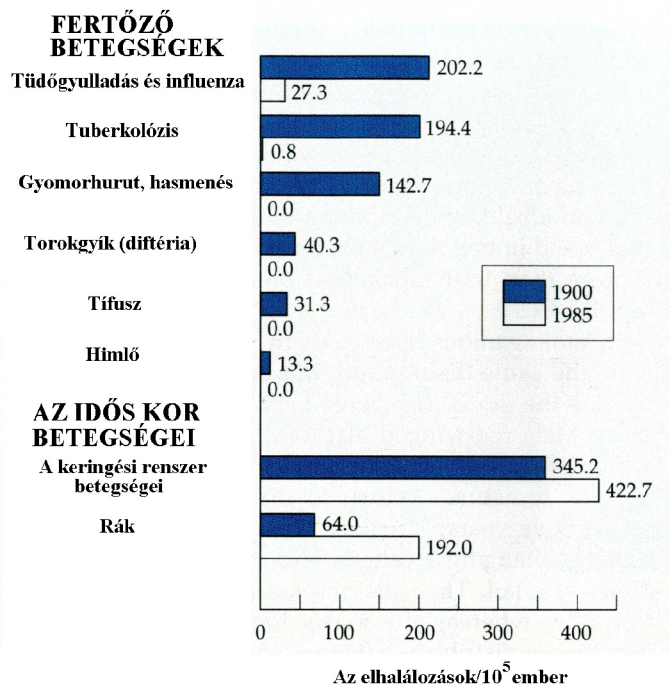
Az emberpopulációk jellemzői

Az emberek száma azután kezdett exponenciálisan növekedni, miután az ember saját maga növelte meg környezete eltartó képességét (28.20. ábra): Harminc ezer éve még mindössze kb. 3 millió ember élt a Földön. Még tízezer éve, az utolsó jégkorszak végén is csak 5 millió. A növények és az állatok háziasítása (mesterséges szelekció) révén a jégkorszakot követő ötezer év alatt megsokszorozódott az emberek száma, és elérte a 100 milliót. A fosszilis eredetű üzemanyag használata a mezőgazdaságban, az ipari forradalom, a vakcinálás, az antibiotikumok, a modern gyógyászati eljárások, a személyes higiénia fejlődése mind olyan tényezők, amelyek fokozták környezetünk ember-eltartó képességét, és egyben lehetőséget biztosítanak a tartalmasabb életre is. Ma, becslések szerint 6,92 milliárd ember él a Földön, a valaha élt emberek fele!



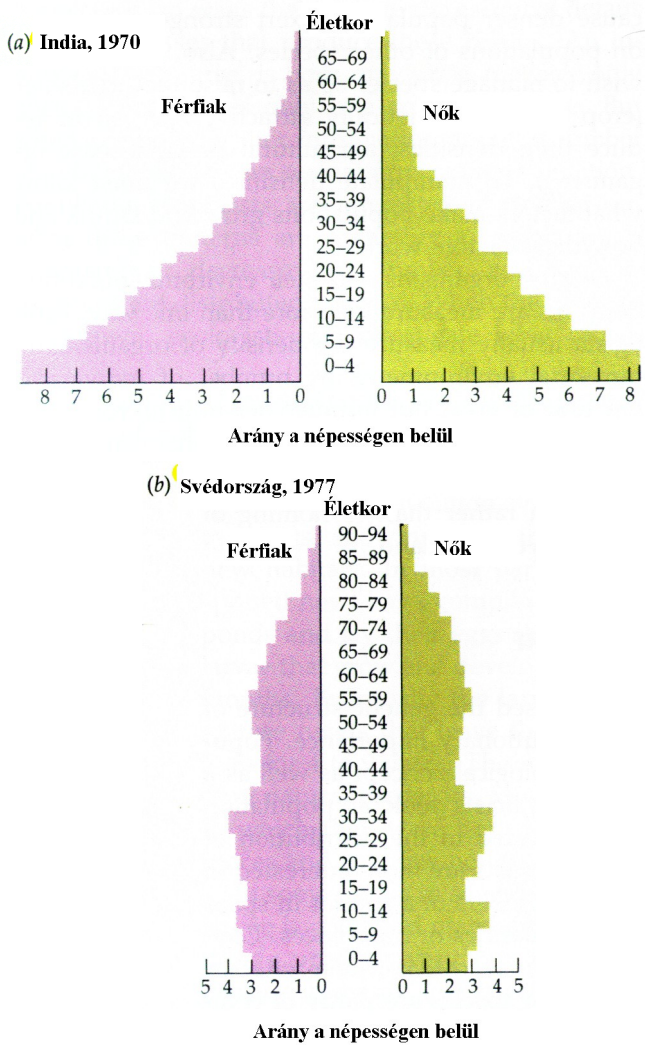
28.20. ábra. Az ember népesség növekedése az idő függvényében

Az eltartó képesség növekedése mellett jelentős változások történtek nemcsak az emberek életében, hanem a népességen belül is. Amíg 1900-ban az USA-ban a halál okok között vezető szerepet játszottak a fertőző betegségek, addig szerepük 1985-re elhanyagolhatóvá vált (28.21. ábra). Ugyanakkor előtérbe kerültek az idős kor jellegzetes betegségei: a keringési rendszer megbetegedései, a rákos daganatok és társaik. Csakhogy amíg a patogének elleni védekezés viszonylag könnyű és olcsó, addig a belőlünk fakadó betegségek elleni küzdelem keserves és drága.



28.21. ábra. Az elhalálozások okai az USA-ban, 1900-ban és 1985-ben.

Az eltartó képesség növekedése nyomán nemcsak a Föld népessége nőtt meg, hanem megváltozott - mindenek előtt az iparilag fejlett országokban - a népesség korszerinti eloszlása is (28.21. ábra). Miközben csökkent (elsősorban Európában) a születések aránya, a legtöbb ember megéli azt az életkort, amelyben előtérbe kerülnek az időskori betegségek. Az is tény, hogy az életkor meghosszabbításának költségei nagyok.



28.22. ábra. A népesség életkor szerinti eloszlása Indiában, 1970-ben és Svédországban, 1977-ben.

A MEGŐRZÉS BIOLÓGIÁJA

Az a környezet, amelybe beleszülettünk, sok milliárd éves fejlődés eredménye. Igaz ugyan, hogy az ember tevékenysége során sokat alakított környezetén, ám a beavatkozások nem voltak mindig sikeresek, szerencsések. Elszomorító a szemetelés, a környezet-szennyezés soha nem látott mértéke, a termőtalaj pusztulása, az elsivatagosodás, az esőerdők kivágása, sok faj elvesztése a Föld élővilágából. A meggondolatlan beavatkozásokra példa a karcinogének áldatlan szerepe (a rákos daganatoknak kb. 90%-át környezetszennyező anyagok okozzák), a freon ózonréteg ritkító hatása, a szeméthegyek, a rezisztens baktériumok, rovarok és gyomnövények stb. stb. Hogy mi a megoldás? Hogyan lehet hat milliárd embernek enni adni, és tartalmas életfeltételeket biztosítani? Alighanem úgy, hogy vigyázunk környezetünkre, megtanítjuk embertársainkat környezetünk értékeinek megbecsülésére. Ne feledjük: kötelességünk környezetünk értékeinek megőrzése, hogy majdan átadhassuk az utánunk jövőknek.

ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink élővilága mintegy négymilliárd éves fejlődés eredménye. A földi életfeltételek azoknak a kölcsönhatásoknak az eredményei, amelyek az élővilág és környezete között folyamatosan történtek, történnek. Az ember balsikerű és megfontolatlan tevékenysége révén különösen az elmúlt nagyjából 150 év során olyan károkat okozott és okoz, amelyek nemcsak a környezet, hanem az élővilág – benne az ember – létét is fenyegetik. A modern ismeretek alapján értettük meg, hogy kik vagyunk, honnan és hogyan jöttünk, és hogy mi a szerepünk a Földön. Ismereteink birtokában nemcsak arra lehetünk képesek, hogy megóvjuk a természet értékeit, hanem arra is, hogy tartalmas és egészséges életet éljünk. Nemcsak mi, hanem mindazon fajok, akikkel együtt éljük életünket. Itt, Földünkön.

FORRÁSOK

1. Sadava, D. és mtsi., Life the Science of Biology, 426-536, 1140-1259, 2011.
2. Alberts, B. és mtsi., Essential Cell Biology, 3-33259-262, 301-310, 487-523, 703-709, 2004.