

Általános genetika

Deák Veronika

Ez a jegyzet a felsőoktatás alapképzéseiben részt vevő, a genetikával – a középiskolai tanulmányok után – először ismerkedő hallgatók számára készült. A tananyag olyan képzésekhez igazodik, melyekben az általános genetikai tanulmányok megelőzik a molekuláris biológiai és bioinformatikai eszköztár megismerését, ezért ez a tananyag a biokémiai és sejtbiológiai alapok ismeretében elsajátítható. A könyv célja, hogy a genetikai alapok ismertetésével hozzásegítse az olvasót a genetika nyelvezetének és klasszikus eszköztárának megismeréséhez. A hangsúlyt az általános szabályszerűségek, mechanizmusok, összefüggések átadására helyezi. A genetikai szemlélet formálása céljából számos, tudománytörténeti szempontból klasszikus kísérletet mutat be, ezáltal is hangsúlyozva a modellszervezeteken végzett alapkutatás erejét és fontosságát. Minden tudományterületre, így a genetikára is igaz, hogy fejlődése nem áll meg. Ebben a jegyzetben is találkozunk letisztultabb és kevésbé letisztult témakörökkel, ezért több helyen a „mai ismereteink szerint” hangsúlyozásával találkozhat az olvasó. Terjedelmi korlátok miatt a genetika tudományterületének csak kiragadott szegmenseivel foglalkozunk. Ezt némileg ellensúlyozzák a könyvben fellelhető internetes hivatkozások, melyek segítségével az érdeklődők számos hasznos oktatási és kutatási elektronikus anyagban böngészhetnek.

Kulcsszavak: genetika, Mendel, öröklődés, kromoszóma, rekombináció, mutáció, DNS, RNS, transzkripció, operon, génkifejeződés, epigenetika

Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem



Semmelweis
Egyetem



Typotex Kiadó

2014

Általános genetika

Deák Veronika

Ez a jegyzet a felsőoktatás alapképzéseiben részt vevő, a genetikával – a középiskolai tanulmányok után – először ismerkedő hallgatók számára készült. A tananyag olyan képzésekhez igazodik, melyekben az általános genetikai tanulmányok megelőzik a molekuláris biológiai és bioinformatikai eszköztár megismerését, ezért ez a tananyag a biokémiai és sejtbiológiai alapok ismeretében elsajátítható. A könyv célja, hogy a genetikai alapok ismertetésével hozzásegítse az olvasót a genetika nyelvezetének és klasszikus eszköztárának megismeréséhez. A hangsúlyt az általános szabályszerűségek, mechanizmusok, összefüggések átadására helyezi. A genetikai szemlélet formálása céljából számos, tudománytörténeti szempontból klasszikus kísérletet mutat be, ezáltal is hangsúlyozva a modellszervezeteken végzett alapkutatás erejét és fontosságát. Minden tudományterületre, így a genetikára is igaz, hogy fejlődése nem áll meg. Ebben a jegyzetben is találkozunk letisztultabb és kevésbé letisztult témakörökkel, ezért több helyen a „mai ismereteink szerint” hangsúlyozásával találkozhat az olvasó. Terjedelmi korlátok miatt a genetika tudományterületének csak kiragadott szegmenseivel foglalkozunk. Ezt némileg ellensúlyozzák a könyvben fellelhető internetes hivatkozások, melyek segítségével az érdeklődők számos hasznos oktatási és kutatási elektronikus anyagban böngészhetnek.

Kulcsszavak: genetika, Mendel, öröklődés, kromoszóma, rekombináció, mutáció, DNS, RNS, transzkripció, operon, génkifejeződés, epigenetika

Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem



Semmelweis
Egyetem



SZÉCHENYI TERV

Typotex Kiadó

2014

Copyright © 2014-2019, Deák Veronika, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Creative Commons NonCommercial-NoDerivs 3.0 (CC BY-NC-ND 3.0)

A szerző nevének feltüntetése mellett nem kereskedelmi céllal szabadon másolható, terjeszthető, megjelentethető és előadható, de nem módosítható.

Szakmai lektor: Barna János

ISBN 978 963 279 175 3

Készült a [Typotex Kiadó](#) gondozásában

Felelős vezető: Votisky Zsuzsa

Készült a TÁMOP-4.1.2/A/1-11/1-2011-0079 számú, „Konzorcium a biotechnológia és bioinformatika aktív tanulásaért” című projekt keretében.

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



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

Kedves Olvasó!

Köszönjük, hogy kínálatunkból választott olvasnivalót! Újabb kiadványainkról, akcióinkról a www.typotex.hu és a facebook.com/typotexkiado oldalakon értesülhet.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
1.1. A genetikai információ molekuláris alapja	10
1.2. A genetikai analízis megközelítésmódjai.....	12
1.2.1. Előrehaladó genetikai analízis.....	12
1.2.2. Fordított genetikai analízis	13
1.3. A genetikában alkalmazott módszerek	14
1.4. Genetikai modellszervezetek	15
1.5. A gének és a környezet, geno- és fenotípus	16
1.5.1. A fejlődési zaj.....	18
2. Egygénes öröklődés	19
2.1. Mendel első törvénye: egyenlő szegregáció.....	20
2.2. Gének és kromoszómák.....	25
2.3. Az egygénes öröklődési mintázatok kromoszómális háttere	28
2.3.1. Mitózis.....	29
2.3.2. Meiózis	30
2.4. Nemi kromoszómákhoz kötött egygénes öröklődés	32
2.4.1. Kromoszómális ivar-meghatározási rendszerek	32
2.4.2. Az ivari kromoszómák szerepe emberben a nem meghatározásban.....	33
2.4.3. Az X kromoszóma inaktiváció.....	34
2.4.4. A cikk-cakk öröklésmenet.....	36
2.4.5. A kromoszómaelméletet bizonyító kísérlet	38
3. Gének független öröklődése. Mendel második törvénye	40
3.1. Mendel II. törvénye: a független öröklődés törvénye	42
3.2. A független öröklődés törvényének alkalmazásai	47
3.2.1. A független öröklődés törvényének alkalmazásai: geno- és fenotípusok keletkezésének becslése keresztezésekben	47
3.2.2. A független öröklődés törvényének alkalmazásai: tiszta vonalak (pure lines) létrehozása	48
3.2.3. Hibrid vigor.....	50
3.3. A független öröklődés kromoszómális háttere	51
3.4. Autoszómális és nemi kromoszómához kötött gének független hasadása	53
4. Kapcsoltság. Homológ rekombináció. Kapcsoltsági térképek.....	55
4.1. Kapcsoltság és intrakromoszómális rekombináció kimutatása genetikai eszközökkel	56
4.2. Az intrakromoszómális rekombináció citológiai kimutatása.....	59
4.3. A homológ rekombináció mechanizmusa	60

4.4. Kapcsoltsági térképezés (Linkage mapping).....	63
4.4.1. Kétpontos térképezés.....	64
4.4.2. Hárompontos térképezés.....	66
4.4.3. A kapcsoltsági és a fizikai térképek összeegyeztetése.....	68
5. A mendeli genetika kiterjesztése	72
5.1. A dominanciaviszonyok különböző változatai.....	73
5.1.1. Inkomplett dominancia.....	73
5.1.2. Kodominancia.....	74
5.1.3. A dominanciaviszonyok magyarázata.....	74
5.2. Többszörös allélizmus.....	75
5.2.1. Az allélizmus megállapítása vagy elvetése. A komplementáció.....	76
5.3. Letális allélok.....	78
5.4. Penetrancia és expresszivitás.....	80
5.5. Több gén hatása ugyanarra a jellegre.....	81
5.5.1. Két gén hatása ugyanarra a jellegre független útvonalon.....	81
5.5.2. Komplementer öröklésmenet.....	82
5.5.3. Duplikált gének öröklésmenete.....	83
5.5.4. Recesszív episztázis.....	84
5.5.5. Domináns episztázis.....	85
5.5.6. Egy biokémiai útvonal genetikai analízise.....	86
5.5.7. Egy genetikai útvonal episztázis analízise.....	91
5.6. Extranukleáris öröklődés.....	98
6. A DNS szerkezete és replikációja	101
6.1. A DNS mint genetikai anyag.....	102
6.1.1. A transzformáció felfedezése.....	102
6.1.2. A Hershey–Chase kísérlet.....	102
6.2. A DNS szerkezete.....	103
6.2.1. Mit tudtak a DNS-ről a Watson–Crick modell előtt?.....	103
6.2.2. A DNS szerkezetének Watson–Crick modellje.....	104
6.3. A DNS szintézise.....	107
6.3.1. A DNS replikáció jóslata.....	107
6.3.2. A szemikonzervatív replikáció bizonyítása.....	107
6.3.3. Replikációs villa.....	108
6.3.4. A DNS-polimerázok.....	109
6.3.5. A replikációs kezdőpont (origó).....	111
6.3.6. Szemidiszkontinuus replikáció.....	112
6.3.7. A replikáció további enzimeit.....	112
6.3.8. A két új szál szintézisét egyetlen pol III dimer végzi.....	115
6.3.9. A replikáció pontossága. Proof-reading repair.....	115
6.3.10. Vírus genomok gördülő gyűrű replikációja.....	116
6.3.11. Telomerek. Telomeráz.....	116
7. A génkifejeződés molekuláris alapjai.....	120
7.1. RNS intermedier léteire utaló korai kísérletek.....	120
7.2. Az RNS-molekulák sajátosságai.....	121
7.3. RNS-típusok.....	121

7.4. RNS-szintézis.....	122
7.4.1. A transzkripció lépései	123
7.4.2. Transzkripció iniciáció prokariótákban	124
7.4.3. Transzkripció elongáció prokariótákban	126
7.4.4. Transzkripció termináció prokariótákban	127
7.4.5. Transzkripció eukariótákban – áttekintés.....	128
7.4.6. Transzkripció iniciáció eukariótákban.....	129
7.4.7. Transzkripció elongáció, termináció és pre-mRNS-érés eukariótákban	131
7.4.8. Az eukarióta tRNS-ek érése	137
7.4.9. Az eukarióta rRNS-ek érése	138
7.5. A gének és a fehérjék kolinearitása	139
7.6. A genetikai kód	141
7.7. A genetikai információáramlás utolsó állomása: transzláció.....	143
7.7.1. rRNS-ek és tRNS-ek a transzlációban	143
7.7.2. mRNS-ek a transzlációban	147
7.7.3. A transzláció mechanizmusa.....	148
8. Mutációk.....	152
8.1. A mutációk csoportosítása	152
8.1.1. Pont- és kromoszóma-mutációk.....	152
8.1.2. Forward és reverz mutációk	152
8.1.3. Szomatikus és csíravonal mutációk.....	153
8.1.4. A mutációk fenotípus szerinti csoportosítása	154
8.1.5. Funkcióvesztéses és funkcionyeréses mutációk	155
8.2. A mutációk kialakulása.....	155
8.2.1. Mutációs ráta és mutációs gyakoriság.....	155
8.2.2. A Luria–Delbrück-féle fluktuációs teszt.....	156
8.2.3. Spontán mutációk.....	159
8.2.4. Indukált mutációk	161
8.3. Pontmutációk	163
8.3.1. A pontmutációk típusai	163
8.3.2. A pontmutációk hatása a géntermékre	163
8.4. A DNS hibáit javító (repair) mechanizmusok	166
8.5. Mutagén hatást (genotoxicitást) mérő rendszerek	167
9. A génkifejeződés szabályozása prokariótákban.....	170
9.1. A transzkripció iniciációjának szabályozása regulátor fehérjék által	170
9.2. A transzkripció iniciációjának szabályozása speciális szigma (σ) faktorok által ..	171
9.3. A transzkripció terminációjának szabályozása.....	172
9.4. Operonok és regulonok	172
9.5. A <i>lac</i> operon szabályozása.....	173
9.5.1. Negatív szabályozás és indukció a <i>lac</i> operonban	173
9.5.2. Pozitív szabályozás a <i>lac</i> operonban.....	175
9.5.3. A <i>lac</i> operon működésének felderítése	178
9.5.4. A <i>lac</i> operonon szerzett tudás hasznosítása napjainkban. A <i>lacZ</i> mint	
riporter gén.....	181
9.6. Az <i>ara</i> operon szabályozása	181
9.7. A <i>trp</i> operon szabályozása	182

10. A génkifejeződés szabályozása eukariótákban	185
10.1. A génkifejeződés szabályozásának szintjei.....	186
10.2. Transzkripcionális szabályozás	187
10.2.1. <i>Cisz</i> regulátor elemek: a promóter.....	187
10.2.2. Távolból ható <i>cisz</i> regulátor elemek: enhancerek, silencerek.....	188
10.2.3. <i>Transz</i> regulátor elemek: a transzkripció faktorok.....	189
10.3. Epigenetikai szabályozás	195
10.3.1. A dinamikus kromatin	195
10.3.2. DNS-metiláció	198
10.3.3. Szülői imprinting	199
10.3.4. Az emlősök X kromoszóma inaktivációja	200
10.3.5. Pozíciófüggő variegáció.....	201
10.4. Általánosan és nagy mennyiségben előforduló RNS és fehérje molekulák termelődésének szabályozása	202
10.5. Poszttranszkripcionális szabályozás.....	203
10.5.1. Differenciális mRNS-érés.....	203
10.6. Az mRNS degradációjának szabályozása.....	204
10.7. A gének kifejeződésének szabályozása kis RNS-ek által	204
10.8. Transzlációs és poszttranszlációs szabályozás	207
11. Felhasznált és ajánlott irodalom.....	208
12. Ábrák jegyzéke és forrása	211

1. Bevezetés

Mindennapos megfigyelés, hogy az egerek egér utódokat, az emberek pedig ember utódokat hoznak létre. Ami ebben döbbenetes, az az, hogy mind az egér, mind az ember fejlődése egyetlen sejtből, a spermium által megtermékenyített petesejtből létrejövő zigótából indul. A zigóták az egér és az ember esetében kísértetiesen hasonlítanak is egymásra. Minden többsejtű élőlény, növények és állatok egyaránt, fejlődési folyamaton mennek keresztül, melynek során egy sejtből kialakul a felnőtt egyed. Az egyedfejlődés során a nagyszámú sejtosztódásnak, illetve a differenciálódásnak köszönhetően különféle sejttípusok jönnek létre, melyek morfológiailag és biokémiaiilag is eltérőek (egyedi megjelenéssel és funkcióval bírnak, például vörsejtek, idegsejtek, izomsejtek stb.). A sejtek szövetekbe és szervekbe szerveződnek, melyek felépítése és funkciója az adott fajra jellemző. Egy szervezet biológiai sajátossága tehát egy fejlődési folyamat lépéseinek a végeredménye.

A megtermékenyített petesejtnek tartalmaznia kell a fejlődési programra vonatkozó információkat. Ez az információ az ivarsejteken (gamétákon) keresztül jut a szülőktől az utódokba. Bármilyen legyen is ennek az információnak a fizikai természete, bármilyen legyen a generációról generációra történő átjutásának módja, az információ hordozójának négy fontos tulajdonsággal rendelkeznie kell:

- **Képesség nagyszámú, különféle struktúra kialakítására**

A fejlődési programra vonatkozó információhordozónak rengeteg forma (sejt-, szövet-, szervtípus, különféle biokémiai folyamatok) létrehozására kell képesnek lennie, hogy meghatározza egy komplex szervezet minden részletét.

- **Képesség a sokszorozódásra (replikációra)**

A zigótából kifejlődött ivarérett egyed óriási számú gamétát hoz létre, melyek alkalmasak arra, hogy létrehozzák a következő generációt. Az információhordozó struktúra hű másolására van tehát szükség, mivel a másolatoknak sok-sok generáción keresztül kell átadódniuk és megőrződniük.

- **Képesség a változásra (mutabilitás)**

Egy faj egyedei nem teljesen azonosak (gondoljunk a különféle földrajzi rasszokra az ember esetében). A jelenkori európai ember őse több tízezer évvel ezelőtt vándorolt át Afrikából Euráziába, így a vándorlás körüli időben feltehetően az afrikai elődökre hasonlított. A későbbiekben sok-sok ponton megváltozott a fejlődési programra vonatkozó információ, melynek legszembetűnőbb következményei a külső jegyekben (bőr, haj) bekövetkező eltérések. Az információhordozó struktúra tehát változásra, azaz mutációk kialakulására képes.

Az evolúciós elmélet szerint a ma élő fajok közös ősi fajokból keletkeztek, karakterek sokaságának megváltozása során. Az egérnek és az embernek például kb. 75 millió évvel ezelőtt élt a közös őse. A múltban bekövetkező mutációk változást okoztak a genetikai információban, és ezek a változások generációról-generációra átöröklődtek. Egy mutáció okozhat kisebb eltéréseket (például bőrszín) és bizonyos struktúrákban bekövetkező nagyobb változásokat is (például

olyan tulajdonságok, melyek különböznek az egérben és az emberben). Több mutáció felhalmozódása eredményezheti egy teljesen új struktúra kialakulását is (például a gerincesek végtagja).

- **Képesség az információ kifejezésére**

Ahhoz, hogy egy autó elkészüljön, nem elég a tervrajz, szükség van a gyári gépekre, munkásokra, energiára. Ennek analógiájára mondhatjuk, hogy az élőlényekben jelen van olyan gépezet, mely a genetikai információ alapján a biológiai struktúrák sokaságát létrehozza. Az információ tehát lefordítódik. Továbbá az információ lefordítása az élőlény életének meghatározott szakaszában történik meg, és csak a szervezet bizonyos részein, míg más részein nem. Például a hemoglobin (a vérben található oxigénszállító fehérje) kémiai szerkezetére vonatkozó információ a magzati kor meghatározott szakaszában átfordításra kerül a csontvelőszövetekben, ugyanakkor az idegsejtekben nem.

A genetika mint tudományterület kialakulását Johann Gregor **Mendel** morvaországi szerzetes és apát munkásságához kötjük (1.1. ábra). Talán nincs még egy tudományterület, melynek kezdeteinél ennyire sziklaszilárdan egyetlen személy állna. Mendel 1865-ben publikálta az eredményeit, melyeket veteményborsó vonalak kontrollált keresztezéseivel ért el. Korának elképzeléseivel ellentétben Mendel arra a helyes következtetésre jutott, hogy a fejlődésre vonatkozó információkat a szülőktől az utódokba **diszkrét faktorok** közvetítik. Ma ezeket a diszkrét faktorokat géneknek nevezzük. A „gén” terminológia 1909-ből Wilhelm **Johannsen**-től származik. Egy organizmus teljes genetikai állománya az adott élőlény **genomja**. A genetika tudományterülete a genetikai információ működésével foglalkozik.



1.1. ábra: Johann Gregor Mendel apáti öltözékben (posztumusz portré)

A Mendel által leírt öröklődési faktorok fizikai természetére vonatkozó ismeretek csak a 20. század elején kezdtek felhalmozódni. Mint később látni fogjuk, fokozatosan világossá vált, hogy egy élőlény tulajdonságait meghatározó, a szülőktől az utódokra átöröklődő faktorokat a sejtmagban található kromoszómák tartalmazzák. Bizonyítást nyert, hogy a kromoszómák szétosztása az ivarsejtek képződésekor (a meiózis során)

párhuzamba állítható a Mendel által leírt öröklődési faktorok viselkedésével. A genetikai anyag kémiai szerkezete, és a genetikai információ kifejeződésének molekuláris háttere csak a 20. század közepétől kezdett ismertté válni. Ennek ellenére már a korai genetika eszköztárával is igen eredményesen lehetett tanulmányozni sokféle biológiai tulajdonságot, napjainkban pedig a kísérleti lehetőségek óriási tárháza áll rendelkezésre. Mivel az élő szervezetek szinte minden strukturális és funkcionális aspektusát a gének határozzák meg, ezért egy adott biológiai sajátság hátterében álló gén vagy gének azonosítása és szerepük felderítése igen jelentős lépés az egyes biológiai folyamatok megértésében. Ma a genetikusok nemcsak az öröklődési mechanizmusokkal, hanem mindenféle biológiai mechanizmusokkal foglalkoznak, és bármely, biológiai rendszerrel foglalkozó szakembernek járatosnak kell lennie a genetika tudományterületén.

Adott biológiai sajátság genetikai analízisének kulcsa a jelleget érintő **mutációk** (genetikai információban bekövetkező öröklődő változások) hatásának vizsgálata. Már a korai genetikai munkában felismerték és kihasználták a kutatók azt, hogy egy élőlényt röntgen sugárzással, vagy bizonyos kémiai anyagokkal kezelve nagy számú mutáció keletkezik. Sok mutáció okoz látható változást az élőlényekben. Némely esetben a látható változashoz a kromoszómák szerkezetében bekövetkező változásokat (meghatározott szakaszok kiesése vagy megduplázódása) tudtak kötni. Az egyes **mutáns változatokkal** (ún. törzsek) végzett kontrollált, jól megtervezett keresztezések segítségével olyan kulcskérdésekre kaptak választ például, hogy két függetlenül izolált mutáció különböző vagy azonos géneket érint-e, vagy hogy két vagy több mutáció kombinálásának (egy egyedben való megjelenésének) milyen fejlődési és élettani vonatkozásai vannak. Az efféle indukált mutációkkal végzett kísérletes technikák igen hatékony módszernek bizonyultak egy adott élőlény fejlődési, fiziológiai, biokémiai útvonalainak megértésében. Vegyünk egy példát! Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) az egyik jól ismert genetikai modellszervezet. Az 1920-30-as években olyan muslica mutánsokat izoláltak, melyeknél az antenna lábszerű struktúrává fejlődött. Más mutációk extra szárnypár megjelenését okozták, így a muslica két szárny helyett négy szárnyal rendelkezett. Az ilyen típusú, a szervek transzformációját (egymásba alakulását) eredményező mutációk tanulmányozásával sikerült feltárni például, miként fejlődnek a végtagok. Az új ismeretek rávilágítottak arra is, hogy a különféle élőlényekben a szárnyak, antennák és lábak egy fejlődésbiológiai alaprogram változatai, és az evolúció során képesek egymásba átalakulni.

Az 1920-as évektől nagyjából az 1950-es évekig tartó időszakban végérvényesen bizonyítást nyert, hogy a genetikai információ hordozója a DNS (deoxiribonukleinsav). A DNS kémiai szerkezetének feltárása (1953), és a genetikai információ kifejeződésének egyre mélyebb megértése óriási mértékben növelte a genetikai analízis magyarázóerejét az elmúlt évtizedekben. Rengeteg ismeretanyag halmozódott fel a gének kifejeződésének szabályozásáról, vagyis arról, hogy egy biokémiai szignál alapján a genetikai információ mely része, milyen időszakban, az élőlény mely sejtjeiben, hogyan és miért fejeződik ki.

Fontos hangsúlyozni, hogy egy élő szervezet életében nincs olyan időszak, amikor a genetikai információ kifejeződése szünetel. A sejteket felépítő és a különféle sejtfunkciókat végző molekulák folyamatosan képződnek. Ennek egyrészt az az oka, hogy az élőlény fiziológiai állapota folyamatosan változik, másrészt az, hogy a molekulák élete véges, így szükség van a pótlásukra. Az egyes sejtek élettartama is véges, tehát egy közel állandó sejtszámmal rendelkező szervezetnek osztódással kell az elpusztult sejtjeit

pótolnia, és az új sejt molekuláris összetételét a funkciójának megfelelően ki kell alakítania. Mindezek miatt a DNS replikációja, az ezzel járó mutációk képződése, és a genetikai információ kifejeződése egy élőlény teljes életében folyamatosan zajlik. Ezért a biológiai folyamatok genetikai hátterének tanulmányozása nem csupán az egyedfejlődés során (a zigótától a kifejlett egyed kialakulásáig), hanem az egyed teljes élethosszában igen nagy jelentőségű. Látni fogjuk újra és újra, hogy a genetikai analízis magyarázóereje utolérhetetlen a biológiai problémák hátterének feltárásában. A genetika nem csupán egy terület a biológián belül. A genetikai megközelítés olyan módszer, melynek segítségével egy élő szervezet csaknem minden tulajdonsága vizsgálható.

1.1. A genetikai információ molekuláris alapja

Egy élőlény felépülése és élettani működése legnagyobbbrészt **fehérjék** által történik – egyszerűen szólva: minden, amit a sejtben látunk, fehérje vagy annak terméke. A fehérjék szintézisére vonatkozó információt a DNS tárolja. A DNS két molekuláris fonal által kialakított kettős helikális struktúra (dupla hélix). A fonalak gerincét cukormolekula (deoxiribóz) és foszfát csoport alkotja, ezek egymással váltakozva következnek egymás után a láncban. Minden cukor-foszfát csoporthoz egy nukleotid bázis tartozik. A DNS-ben négyféle bázis fordul elő: adenin (A), timin (T), guanin (G) és citozin (C). A DNS kettős hélixében a cukor-foszfát gerinc a hélix külső részén található, a nukleotid bázisok pedig a hélix belsejében helyezkednek el. A két szálhoz tartozó bázisok szigorú szabályok szerint páronként kapcsolódnak hidrogén-hidakkal egymáshoz. A bázisok kémiai tulajdonságaiból és térkitöltésükből adódóan az adenin timinnel, a citozin pedig guaninnal párosodik. A párt alkotó bázisokat egymással **komplementernek** mondjuk. Ez a molekuláris struktúra valósítja meg az örökítőanyag szükséges funkcióit:

- **Nagyszámú struktúra kialakítására alkalmas információt tartalmaz**
Habár csak négyféle nukleotid bázis vesz részt a DNS szerkezetének kialakításában, ezek egy öröklődési egység (gén) hosszában bármilyen sorrendben elhelyezkedhetnek, és a gének bázisokban kifejezett hossza is változó lehet. Például tegyük fel, hogy egyik gén esetében a bázisok sorrendje egy szakaszon ...TTACGGACCT..., egy másik génnél ugyanezen a szakaszon ...GCATACGATC... nukleotid sorrend található. Ha az említett gének összesen 100 bázispár hosszúságúak (valójában ennél sokkal hosszabbak), akkor a lehetőségek száma 4^{100} (körülbelül 60 jegyű szám). Még ha figyelembe is vesszük azt, hogy a különböző szekvenciák nem jelentenek minden esetben eltérő genetikai információt (lásd később a kódszótár redundanciáját, 7.6. szakaszt), ez akkor is óriási számú különböző, azaz eltérő információtartalmú szekvenciát jelent.
- **Képesség a sokszorozódásra (replikációra)**
Mivel A csak T-vel, C csak G-vel párosodik, a kettős spirál egyik szálának bázis-sorrendje tökéletesen meghatározza a komplementer szál szekvenciáját. A DNS megkettőződésekor a kettős spirál mindkét szála mintaként szolgál az új szál szintéziséhez. A folyamatban az eredeti kettős spirállal teljesen megegyező két kópia dupla hélix képződik.
- **Mutabilitás**
A DNS megkettőződésekor nem megfelelő bázis is beépülhet, vagy kieshetnek bázisok, illetve beépülhetnek újak. Ha ilyen esemény történik, akkor a képződött új szál szekvenciája, majd a következő replikációkor a róla másolt szál szekvenciája eltér az eredeti szálétól, azaz öröklődő változás, mutáció keletkezik.

- **A genetikai információ átfordítása**

A négyféle bázisból kialakított szekvencia alapján a sejtnek meghatározott elsődleges szerkezettel (aminosavsorrenddel) rendelkező fehérjét kell előállítani. A DNS-molekula bizonyos szakaszai szignálként működnek a tekintetben, hogy az adott sejtfeleségben mely életszakaszban, milyen fiziológiás körülmények között, mely géneket szükséges fehérjévé fordítani. Hogyan használja egy sejt masinériája a bázisok szekvenciáját mind a fehérjék aminosavsorrendjét meghatározó, mind pedig a fehérjeszintézis helyére és idejére vonatkozó információként? A későbbiekben ezekre a kérdésekre is választ kapunk.

Egy protein aminosavsorrendjének meghatározása

A nukleotid szekvenciában tárolt genetikai információ aminosavsorrenddé történő átfordítása két egymást követő mechanizmussal történik: ez a transzkripció és a transzláció.

- **Transzkripció**

A DNS-ben kódolt genetikai információ a transzkripció (átírás) során hírvivő RNS-sé (messenger, mRNS) íródik át. Az RNS (ribonukleinsav) szintén cukorfoszfát gerincből és nukleotid bázisokból épül fel, akárcsak a DNS, de alapvető szerkezeti különbségük, hogy az RNS-ben a cukor ribóz (és nem dezoxiribóz), továbbá hogy az RNS timin bázis helyett uracilt tartalmaz. Az mRNS – a DNS-sel ellentétben – egyszálú polimer. A transzkripció során a DNS kettős szála lokálisan szétcsavarodik, és általában csak az egyik szál szolgál mintaként a komplementer egyszálú mRNS szintéziséhez. A DNS-ről átíródó mRNS-molekulát **transzkriptumnak** nevezzük. Ez az ún. elsődleges transzkriptum a transzkripciót követően módosulhat (eukarióták esetében), s ezeket a módosításokat szakas **érésnek** is nevezni. Az egyik legfontosabb ilyen módosítás az eredeti transzkriptum meghatározott szakaszainak (az intronoknak) a kivágása, így ezek a szakaszok nem fordítódnak át aminosavsorrenddé. Az érett mRNS a DNS „munkakópiájának” tekinthető, mely három fontos feladatot lát el:

- Megnöveli a genetikai információ kópiaszámát egy sejtben az adott időpillanatban. Egy kópia DNS-ről számos mRNS-másolat képződik, s egy mRNS-molekulát a sejt transzlációs apparátusa többször is felhasználhatja az adott fehérje szintézisére.
- Szállítja a genetikai információt a sejtmagban lévő DNS-től a sejt citoplazmájába, ahol a fehérjeszintetizáló apparátus található (eukarióta szervezeteknél).
- Az mRNS stabilitása és féléletideje szabályozza, hogy az adott fehérjéből mennyi termelődjön.

- **Transzláció**

Egy aminosav lánc szintézise a mRNS nukleotid szekvenciája alapján a transzláció (átfordítás) során történik. Hogyan határozza meg a négyféle bázis sorrendje, hogy a fehérjét alkotó húszféle aminosav milyen sorrendben épüljön be a peptidláncba? A mRNS információtartalma a transzláció során három nukleotidjával kerül leolvasásra. Ezeket a hármas csoportokat (tripleteket) **kodonoknak** nevezzük. Mivel három nukleotid pozícióban a négyféle nukleotidból 4^3 variáció lehetséges, a lehetséges kodonok száma 64. Ebből az következik, hogy egy aminosavat több kodon is kódolhat. Például az AUC, AUU és AUA kodonok mindegyike leucin aminosav beépítését határozza meg. Léteznek ún. STOP kodonok is (például UAG), melyek a transzláció befejező szignáljai.

A fizikai megfeleltetést a kodon és a hozzá tartozó aminosav között a kis méretű, speciális térbeli szerkezetű tRNS (szállító, transzfer RNS) molekulák végzik. A tRNS szekvenciájának kitüntetett része tartalmazza a kodonnal komplementer, ún. **antikodon** tripletet. A tRNS másik kitüntetett részéhez az adott kodonnak-antikodonnak megfelelő aminosav kapcsolódik. Ha a tRNS-hez kapcsolódik a megfelelő aminosav, akkor azt a tRNS-t töltöttnek nevezzük. Az aminosavak összekapcsolása az mRNS által meghatározott kódsorrend szerint a **riboszómák** segítségével zajlik. A riboszómák fehérjékből és RNS-ekből álló szupramolekuláris gépezetek (rRNS, riboszómális RNS). A riboszóma végigcsúszik az mRNS-láncon, és az egyes kodonoknál a komplementer antikodonnal rendelkező töltött tRNS által szállított aminosavat beépíti a készülő polipeptid láncba. Ez addig folytatódik kodonról kodonra, amíg a transzláció végét jelző STOP kodon nem következik. Itt a riboszóma leválik az mRNS-ről. A felhasznált, már nem töltött tRNS-molekulák recirkulálnak, azaz újra hozzájuk kapcsolódik az antikodonnak megfelelő aminosav. Egyszerre több riboszóma is haladhat az mRNS mentén.

A polipeptidtől a fehérjéig

A transzláció során keletkező aminosavszekvencia a polipeptid lánc, mely egy fehérje elsődleges szerkezetének felel meg. A biológiailag aktív fehérjék kialakulásához a polipeptidlánc meghatározott térszerkezet vesz fel. Ez a folyamat a **folding**. (A kifejezés magyar megfelelője, a hajtogatódás, nem használatos).

Génszabályozás

Egy élőlény teljes élete során (a zigóta állapottól a halálig) szükség van a genetikai információ kifejeződésének térbeli és időbeli szabályozására. A szabályozott működéshez szükséges információkat a genom tartalmazza. A genomot kitevő DNS legnagyobb része regulációs funkcióval rendelkezik. Minden esetben a sejt fiziológiai állapota, illetve a sejtet érő környezeti hatások határozzák meg, mely génekről képződjön transzkriptum.

1.2. A genetikai analízis megközelítésmódjai

A biológiai rendszerek tulajdonságai igen hatékonyan vizsgálhatóak **genetikai boncolással**. A genetikai boncolás kifejezés arra utal, hogy egy biológiai struktúra vagy folyamat részekre bontható, nem szikével, hanem átvitt értelemben, a jelleget érintő változatok, mutánsok által, felfedve a vizsgált tulajdonság kialakításának hátterében álló géneket. Az alkalmazott módszerek, illetve a megközelítési módok szerint kétféle technika használatos: az előrehaladó (forward) és a fordított (reverz) genetikai analízis.

1.2.1. Előrehaladó genetikai analízis

A forward genetikai vizsgálatok a kérdéses tulajdonságot érintő változatok (morfológiai vagy élettani) izolálásával kezdődnek. A biológiai változatok a genetikai vizsgálatok nyersanyagai.

A forward genetikai vizsgálatra felhasználhatók a természetben előforduló változatok. Egy fajon belül, annak populációiban, az egyes egyedek között számos tulajdonságban természetes módon előforduló változatok vannak jelen. Becslések szerint a szexuálisan szaporodó fajok populációiban a fehérjekódoló gének egyharmadában van jelen

olyan variáció az egyedek között, mely a fehérje aminosavsorrendjében lévő változásokat jelent. Ezeket a természetes variációkat genetikai **polimorfizmusoknak** nevezzük. Például egy rovarpopuláció egyedei között eltérés mutatkozhat egy rovarölőszerezrel szembeni érzékenységekben. A változatok vizsgálata elvezethet odáig, hogy azonosítják azt a gént, amely az élettani különbség hátterében áll. További vizsgálatokból kiderülhet, hogy a rovarölőszert hatástalanító meghatározott enzim változatairól van szó.

Forward genetikai analízist a leggyakrabban olyan – a kérdéses tulajdonságot érintő – **abnormális változat** felhasználásával végzik, mely ritka, a faj egyedeinek nagy részére nem jellemző. A ritka abnormális megjelenésű egyedet **mutánsnak**, a tulajdonság tekintetében normális, átlagos megjelenésű egyedeket pedig **vad típusnak** nevezzük. Legtöbbször laboratóriumi körülmények között – nagy energiájú sugárzással vagy bizonyos kémiai anyagokkal – növelik a mutációk képződésének esélyét. Egy tulajdonság kialakulása több ponton, több okból, többféleképpen megváltozhat. Ennek oka az, hogy a legtöbb tulajdonság kialakítása egymást követő molekuláris lépésekből áll, következésképpen több gén termékének együttes munkájától függ. Minél többféle rendellenes megjelenésű mutánsot sikerül találni egy jelleg vizsgálata során, annál több, a vizsgált folyamat hátterében álló gént azonosíthatunk.

Egy klasszikus példával, az ecetmuslica szemszínének kialakulásával szemléltetjük a forward genetikai boncolás alapjait. A vizsgálandó, azaz a „boncolás alatt álló” tulajdonság a példában a légy szemszíne. A kérdés az, hogy hány, mely gének terméke, és milyen módon alakítják ki a normál (tégla-vörös) szemszínt? A kutatók begyűjtöttek olyan mutánsokat, melyek különleges: tűzvörös, barna, fehér szemszínnel rendelkeztek. Úgy találták, hogy az egyes mutánsokban más-más gén érintett (ennek módját a későbbiekben tárgyaljuk). Megállapították azt is, hogy a tűzvörös és a barna megjelenést okozó génváltozatok kombinációja (egy egyedben való előfordulása) fehér szemszín kialakulásához vezet. Ebből arra következtettek, hogy a tégla-vörös szemszín kialakulásához kétféle pigmentanyag szükséges, a tűzvörös és a barna. A tűzvörös szemű mutánsban nem termelődik a barna pigment, a barna szemszínű mutánsban pedig nem termelődik a tűzvörös pigment. Ha egyik pigmentanyag sem termelődik, a légy fehér szemű. Ezekre a következtetésekre néhány jól megtervezett keresztezéssel, a genetikai törvényszerűségek ismeretében jutottak. Arra is rájöttek, hogy van egy harmadik gén, melynek hibája – függetlenül a másik két géntől – fehér szemszín kialakulásához vezet. E jelenség magyarázható úgy, hogy a pigment termelődés útvonalában e harmadik gén terméke a másik kettő „alatt” (downstream) hat, befolyásolhatja például a színanyagok lerakódását. A génváltozatok további kombinálásával a vizsgált biokémiai útvonal egyre precízebben feltárható. Az analízis utolsó stádiuma az egyes génváltozatok DNS-szintű vizsgálata. A DNS-változás okozhat a fehérje szerkezetében bekövetkező változást, vagy befolyásolhatja például a fehérje termelődésének mértékét.

1.2.2. Fordított genetikai analízis

A fordított genetikai analízis egy ismert genetikai változás hatását vizsgálja. Első lépésben a DNS-t meghatározott helyen és módon molekuláris genetikai eszközökkel megváltoztatják, majd ennek következményeit tanulmányozzák az élőlény felépítésének különböző szintjein.

1.3. A genetikában alkalmazott módszerek

A gének tanulmányozása hatékony eszköz a biológiai rendszerek megismerésében. A legfontosabb módszereket az alábbiakban foglaljuk össze:

- **A vizsgált folyamatot érintő mutációk izolálása**
Minden mutáns gén felfedi a vizsgált folyamat egy komponensét, és az együttesük pedig megmutatja, hogy mely fehérjék vesznek részt az adott folyamatban.
- **A vad típus és mutánsok kontrollált keresztezéséből származó utódok analízise**
Ezzel a módszerrel azonosíthatjuk a géneket, meghatározhatjuk kromoszómális elhelyezkedésüket, és az öröklődési mintázatokat.
- **A sejt biokémiai folyamatainak genetikai analízise**
Az élet alapvetően kémiai reakciók összessége. Evvel a módszerrel arra keressük a választ, hogy miként befolyásolja a sejt működését egy adott génmutáció, és ebből az információból következtetünk a gén eredeti funkciójára.
- **Mikroszkópos eszközök**
Ezzel a módszerrel vizsgálható a kromoszómák szerkezete. Az újabb technikákkal megjelölhetők a gének vagy azok termékei, ezáltal mennyiségük, sejtbeli lokalizációjuk mikroszkóppal vizualizálható.
- **A DNS direkt vizsgálata**
A molekuláris szintű vizsgálatok nagy részéhez szükséges, hogy a vizsgálandó DNS-szakasz nagy mennyiségben rendelkezésre álljon. A rekombináns DNS-technológia (**génklónozás**) eszköztárát széles körben alkalmazzák DNS-molekulák felszaporítására. Ez esetben *in vivo* (élő szervezetben, baktériumokban) történik az adott DNS-fragment felszaporítása. Bizonyos korlátozásokkal használható DNS-sokszorosításra a polimeráz láncreakció (PCR, polimerase chain reaction), amely *in vitro* (élő szervezetet nem igénylő, kémcsőben zajló) módszer. A gén analízisének fontos pontja a DNS szekvencia meghatározása. A DNS szekvenciájának analízisét számos élőlény esetében a teljes genomra kiterjesztették. Ezzel új terület jött létre a genetikán belül, a **genomika**, mely teljes genomok struktúráját, funkcióját, evolúcióját vizsgálja. Az **összehasonlító genomika** különböző fajok teljes genomjának összehasonlításával foglalkozik. A genomika területéhez szorosan kapcsolódik a **bioinformatika**, hiszen ilyen nagy mennyiségű adat tárolása és elemzése komputeres eszközök nélkül elképzelhetetlen.
- **Próbák alkalmazása**
A genetika területének legfontosabb makromolekuláit (DNS, RNS, fehérjék) specifikus jelölőkkel, ún. próbákkal lehet vizualizálni. Ezek a próbák specifikus kölcsönhatás révén csak a keresett makromolekulához kötődnek a vizsgált biológiai mintában. A próbákat valamilyen módon megjelölik (például radioaktív atomok vagy fluoreszcens részek beépítésével), hogy a számunkra fontos molekula könnyen észlelhetővé váljon.

1.4. Genetikai modellszervezetek

„Ami igaz a *coliban*, igaz az elefántban” – jelentette ki Jacques **Monod**, Nobel-díjas tudós, az operonelmélet leírója.

Bár ez a megállapítás csak részben állja meg a helyét, jól kifejezi azt, hogy az élő szervezetek működése, főleg molekuláris szinten, sok hasonlóságot mutat. Mivel technikai vagy etikai ok folytán számos élőlény nem vizsgálható, a genetikai (és molekuláris biológiai, biokémiai) ismereteink nagy része viszonylag kisszámú modellszervezet tanulmányozásából származik. A modellszervezetek által feltárt mechanizmusok zöme általános, azaz érvényes a rokon fajok nagy csoportjára. Egyetlen szervezetben nem vizsgálható minden biológiai kérdés, ezért van szükség több, az egyes nagyobb taxonómiai csoportokat képviselő modellszervezetre. Előnyös, ha a választott élőlény kis testméretű, könnyen fenntartható, rövid a generációs ideje, sok utódot hoz létre és a kontrollált keresztezések könnyen kivitelezhetőek. Ezen okok miatt az emlősök genetikájának tanulmányozására előnyösebb az egér, mint például az elefánt.

A tudománytörténet első genetikai modellszervezete a Mendel által tanulmányozott veteményborsó (*Pisum sativum*). Segítségével Mendel az élővilág nagy részére általánosan érvényes öröklődési szabályszerűségeket tárt fel.

További genetikai modellszervezetek

- **Vírusok** (és ezek egy csoportja, a bakteriofágok)
Vizsgálatukból származik a DNS fizikai és kémiai szerkezetére vonatkozó ismereteink nagy része, továbbá a DNS replikáció és a mutáció képződés alapvető mechanizmusainak feltárása.
- **Prokarióták**
Ezek egysejtű szerveződésű haploid életformák. A legfontosabb modell a csoportban az *Escherichia coli* baktérium.
- **Eukarióták**
Élesztők (*Saccharomyces cerevisiae*)
Fonalas gombák (*Neurospora crassa*)
A baktériumok, élesztők, fonalas gombák fontossága viszonylag egyszerű, könnyen tanulmányozható biokémiai rendszerük miatt kiemelkedő a genetikában.
Soksejtű szervezetek. Bizonyos folyamatok (a sejtek, szövetek, szervek differenciálódása, a testrészek kialakulása) csak e modellszervezeteken tanulmányozhatóak. Legfontosabb soksejtű eukarióta modellszervezetek az alábbiak:
Lúdfű (*Arabidopsis thaliana*)
Ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*)
Laboratóriumi fonalféreg (*Caenorhabditis elegans*)
Zebradánió (*Danio rerio*)
Egér (*Mus musculus*)

A legfontosabb genetikai modellszervezetek teljes genom szekvenciája ismert.



1.2. ábra: Genetikai modellszervezetek (felső sor balról jobbra: fágok, kukorica, laboratóriumi fonalféreg, zebradánió; alsó sor: baktériumok, egér, muslica, lúdfű).

1.5. A gének és a környezet, geno- és fenotípus

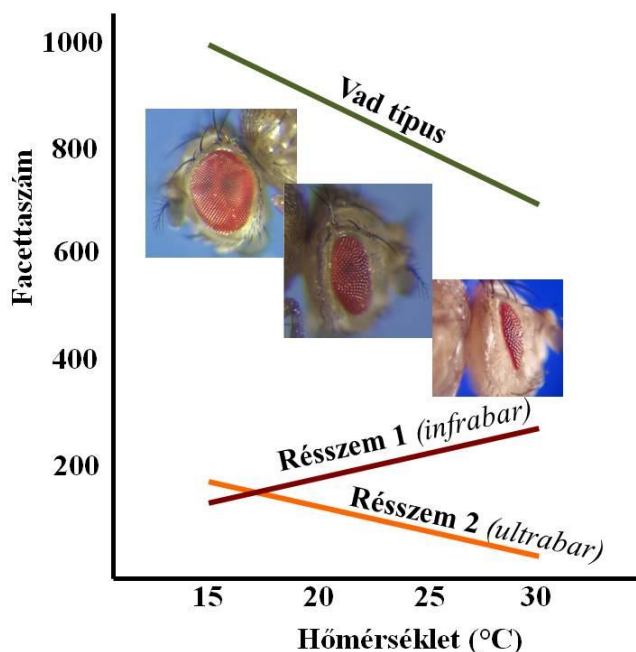
Hogy különbséget tehessünk az öröklődő gének és a fejlődés során létrejövő sajátságok között, a kutatók megalkották a **genotípus** és a **fenotípus** fogalmát. A genotípus leírja a gének összességét, amit egy egyed örökölt, míg a fenotípus leírja az egyed morfológiájának, fiziológiájának, viselkedésének minden vonatkozását. A genotípus lényegében állandó az élet folyamán, míg a fenotípusok legnagyobb része változik. Ha két egyed génjei megegyeznek, azonos genotípusuk van, ha a megjelenésük egyezik meg, azonos fenotípusról beszélünk. A gyakorlatban általában részleges fenotipikus leírással foglalkozunk (például a szem színének leírásával), és nem az egyed összes génjéről beszélünk, hanem annak egy géncsoportjáról (például a szem pigmentjeit kialakító génekről). Amikor geno- vagy fenotípust említünk, általában mindig csak **részleges geno- és fenotípust** kell ezen érteni, ami csak az éppen vizsgált néhány jelleget vagy gént foglalja magában.

Döntően a gének szabják meg azt, hogyan nézzen ki egy adott élőlény. Ez a **genetikai determináltság**. A szülők az ivarsejtjeikben tovább adják az utódaiknak azokat a speciális ismereteket, amelyek segítségével a környezet anyagaiból hozzájuk hasonló élőlényeket hozhatnak létre. A „speciális ismeretek” gének formájában vannak jelen a megtermékenyített petében. A gének és a petesejt együttes információi alapján alakul ki a faj egy egyede. Nincs olyan környezet, melyben egy oroszán ló utódokat hozna létre. Az erdőben, ugyanazon környezetben, a makk mindig tölgyfává, a mohaspóra pedig mohává fejlődik. A genetikai program úgy képzelhető el, mint egy tervrajz. Analógiaként mondhatjuk, hogy ugyanazon építőanyagokból különböző tervrajz alapján más-más épület építhető. Tehát a gének okozzák és tartják fenn a különbséget a fajok között, és a fajon belül az egyedek között. Azonos környezeti hatások mellett A terv (genotípus) alapján A élőlény, B terv (genotípus) alapján pedig B élőlény fejlődik.

A gének azonban nem önmagukban határozzák meg egy szervezet működését, a környezetnek is jelentős szerepe van ebben. Elméletileg két azonos genotípusú egyed fejlődhet különbözőképpen eltérő környezetben, illetve két eltérő genotípus fejlődhet azonos módon is a környezettől függően. A valóságban az egyedek általában sem génjeikben, sem környezetükben nem egyeznek teljes mértékben.

1. példa

A muslica szemének fejlődését a genotípus mellett a környezet is jelentősen befolyásolja. A vad típusú legyek összetett szemét alkotó facetták száma a tartási hőmérséklet függvényében (15 és 30 °C között) 1000-700 között változik (1.3. ábra). Ha megvizsgálunk két szemméret mutánst, melyek szeme az alacsonyabb facettaszám miatt kisebb, tehát úgynevezett résszeműek (ezeket *infrabar* és *ultrabar* mutánsoknak nevezték el), akkor azt tapasztaljuk, hogy az *infrabar* genotípus esetén a facettaszám 180-280 között, az *ultrabar* genotípusnál pedig 190-60 között változik a hőmérséklet függvényében (1.3. ábra).



1.3. ábra: A vad típusú és két szemméret mutáns muslica reakciónormája

A genotípus, a környezet és a fenotípus összefüggéseit grafikusan ábrázolva kapjuk a **reakciónormát**.

A fenti példában a vad típusú muslicák reakciónormája minden vizsgált hőmérsékleten (azaz környezetben) eltér a mutánsok reakciónormájától, vagyis a **reakciónormák nem átfedőek**. Ugyanakkor, van olyan környezet (16 °C), melyben a két mutáns ugyanúgy fejlődik, tehát az *infrabar* és *ultrabar* mutánsok reakciónormája átfedő. Ebből következik, hogy **genotípust a fenotípussal azonosítani csak jól definiált környezetben lehet**. A genetikai vizsgálatokban lehetőség szerint kerülni kell az átfedő reakciónormával rendelkező mutánsok alkalmazását. Előnyösebb a nem átfedő reakciónormával rendelkező törzsek vizsgálata, mert esetükben a fenotípusból egyértelműen következik a genotípus.

2. példa

A közönséges cickafark (*Achillea millefolium*) növényen vizsgálták az egyes genotípusok reakciónormáit. Hét különböző genotípusú növényt dugványozással szaporítottak (lényegében klónoztak, így a genotípusuk biztosan azonos), és minden genotípust háromféle környezetben (három különböző tengerszint feletti magasságban) neveltek. A növények magasságát vizsgálták mint fenotípust. A hét genotípus reakciónormái nagymértékben átfedtek. Ez a kísérlet is alátámasztja, hogy a természetben a reakciónormák a leggyakrabban átfedők, illetve példázza, hogy a genotípust csak szigorúan körülírt környezetben lehet a fenotípussal azonosítani.

1.5.1. A fejlődési zaj

Láthattuk, hogy a tulajdonságok a gének tervrajza alapján, de a környezettel kölcsönhatásban bonyolult egyedi fejlődéstörténet során alakulnak ki. Ebben némi szerep még a véletlennek is jut. Ezt a véletlenszerű hatást fejlődési zajnak nevezzük. Példa erre az, hogy a vad *Drosophila* két szemében is lehet kisebb eltérés a facetták számában, holott azonos a genotípus és azonos a környezet.

2. Egygénes öröklődés

Egy gén felfedezése mérföldkőnek számít a biológiai folyamatok vizsgálatában. A gén (gének) azonosítását követően további kutatások során felderíthető, hogy pontosan mely lépésben és hogyan vesz részt az adott gén egy adott tulajdonság kialakításában. A génazonosítás egyik leggyakoribb módja az egygénes öröklődési mintázat azonosítása. Ebben a fejezetben ezzel az öröklődési mintázattal foglalkozunk. Az ilyen öröklődési mintázat viszonylag egyszerűen detektálható meghatározott módon kivitelezett kontrollált keresztezésekkel. Az analízisben központi szerepük van a mutánsoknak, vagyis az olyan egyedeknek, melyek a vizsgálat tárgyát képező tulajdonság normális formájától eltérést mutatnak. Egy tulajdonság normális formáját vad típusnak nevezzük (ez a „vadonban”, vagyis a természetben fellelhető egyedek leggyakoribb megjelenési formája). A genetikai analízis útja a következő: 1) a vizsgált tulajdonság tekintetében vad típusú egyed (például piros virágú növényt) párosítanak a faj olyan egyedével, mely e tulajdonságban mutáns megjelenési formát mutat (például piros helyett fehér virágú); 2) e keresztezés utódait egymás között párosítják; 3) a második párosítás utódai között megállapítják a vizsgált tulajdonság két megjelenési formáját mutató (ebben a példában piros és fehér virágú) egyedek arányát. Meghatározott arány (erről később lesz szó) esetén megállapítható az egygénes öröklődés. Ez esetben a vad tulajdonság egy gén vad típusú formája által meghatározott, a mutáns tulajdonság pedig ugyanezen génnek egy másik formája által, melyben az adott gén területén egy mutációs esemény folytán megváltozott a DNS-szekvencia. E gén mutáns változata tehát lehetővé tette, hogy a vizsgált tulajdonság (itt a virágszín) kialakításában részt vevő egyetlen gént azonosítsunk. Más szóval egy mutáns génváltozat ráirányítja a figyelmet egy biológiai folyamat hátterében álló elemre, azaz egy génre. További – például a virágszín tekintve a vad típustól eltérő megjelenésű – mutánsok analízisével számos további „virágszín-gén” azonosítható hasonló genetikai boncolással.

Minden génazonosítási munka kiindulási lépése az adott kutatás középpontjában álló biológiai folyamatban érintett mutánsok megtalálása, izolálása. Ezt nevezik a kutatók a **mutánsparc** létrehozásának. Ez leggyakrabban vizuális szűréssel (screening) történik egy adott faj egyedeinek nagyszámú csoportjából. Egy tulajdonság kialakulása (például egy növényben a virág fejlődése) sokféleképpen megváltozhat. Minél többféle rendellenesen fejlődő mutánst sikerül találni egy vizsgálat során, annál több, a vizsgált folyamat hátterében álló gént azonosíthatunk.

Az egygénes öröklődésre vonatkozó ismeretek alkalmazása nemcsak az alapkutatásokban, hanem az alkalmazott genetikai kutatásokban is nagy szerepet kap. Például számos emberi betegség hátterében egyetlen gén mutáns változata áll. Az egygénes öröklődési mintázat felismerése családfaanalízissel történik, további munkával molekuláris szinten azonosítható a gén, szerepének pontos megismerése pedig elvezethet új terápiás eszközök kidolgozásához. A mezőgazdasági ágazatokban szintén fontos az egygénes öröklődésre vonatkozó ismeretek alkalmazása. Például gyakran előfordul,

hogy egyetlen gén megváltozása jobb táplálkozási tulajdonságok, vagy a betegségekkel szembeni nagyobb ellenállóképesség kialakulásához vezet. Ilyen előnyös mutációkat sok esetben felhasználnak a termesztett növényfajták és a tenyésztett állatfajták nemesítése során.

Az egygénes öröklődés szabályszerűségeit Gregor Mendel tárta fel az 1860-as években. Mendel Ágoston-rendi szerzetes volt a morvaországi (ma a Cseh Köztársaság területe) Brünn (Brno) városában. A kolostor kertjében végezte kísérleteit veteményborsó növényekkel. A mendeli analízis a mai napig alkalmazott kísérleti megközelítés prototípusának tekinthető. Mendel munkásságának zseniális vonása, hogy úgy végzett genetikai analíziseket, hogy nem ismerte a gének molekuláris természetét, nem tudta, hogy a gének hogyan befolyásolják az egyes tulajdonságok kialakulását, hogyan adódnak át sejttről sejtire. Ma már tudjuk, hogy a gének nagy része fehérjéken keresztül végzi feladatát. Azt is tudjuk, hogy a gének a kromoszómák részei, melyek precízen másolódnak és adódnak át az utódsejtekbe. Ahhoz, hogy az egygénes öröklődés alapjait megértsük, először tekintsük át Mendel erre vonatkozó munkásságát, majd pedig a gének és a kromoszómák viszonyára vonatkozó mai ismereteket.

2.1. Mendel első törvénye: egyenlő szegregáció

Mendel a kísérleteihez *Pisum sativum* (veteményborsó) növényeket használt. Praktikus választás volt ez a részéről, hiszen ez a növény viszonylag könnyen szaporítható, és sokféle változatát be lehetett szerezni a kertészetekből. Ezek a változatok szolgáltatták a mutánsparkot a genetikai vizsgálatokhoz. Fontos kiemelni, hogy Mendelt nem a borsónövény meghatározott tulajdonságai érdekelték, nem végzett genetikai boncolást, hanem egy sokkal általánosabb kérdést tett fel, nevezetesen azt, hogy milyen szabályszerűségek szerint jutnak át generációról generációra az egyes tulajdonságokat meghatározó öröklődési faktorok.

Mendel hét tulajdonság öröklődését vizsgálta. Minden egyes tulajdonság esetében két, egymástól jól megkülönböztethető formát szerzett be (lásd ezeket zárójelben az alábbi felsorolásban). Ma úgy mondjuk, hogy minden egyes tulajdonság esetében két-két fenotípust vizsgált. A Mendel által vizsgált sajátosságok:

1. borsószem színe (sárga vagy zöld)
2. borsószem alakja (sima vagy ráncos)
3. hüvely színe (sárga vagy zöld)
4. hüvely alakja (felfújott vagy becsípett)
5. virág színe (lila vagy fehér)
6. növény magassága (magas vagy alacsony)
7. virágos hajtás elhelyezkedése (axiális vagy terminális)

Mendel kísérleteihez **tiszta vonalakat** használt. Ez azt jelenti, hogy a szóban forgó fenotípus tekintetében az adott vonal egyedeinek utódai ugyanazt a fenotípust mutatják, elméletileg végtelen számú generáción keresztül. Például a sárga szemű vonal esetében az utódok sok-sok generáción keresztül mindig sárga szemű magvakat hoznak.

A borsóval végzett kontrollált keresztezések meglehetősen nagy munkával járnak. A növény hímnős virágokkal rendelkezik (Pillangósvirágúak családja), így két tiszta vonal keresztezése úgy kivitelezhető, hogy az egyik növény virágaiból a portokokat még pollenérés előtt el kell távolítani (ez lesz az anya a keresztezésben), majd a másik növény (apa a keresztezésben) pollenjeit finom ecsettel át kell helyezni az előző növény bibéjére. Önmegtermékenyítéshez pedig egyszerűen hagyni kell a polleneket egy virágon belül a saját bibére szóródni.

Mendel mind a hét tulajdonságpárra vonatkozóan elvégzett egy több generációs keresztezési sort, az alábbiak szerint:

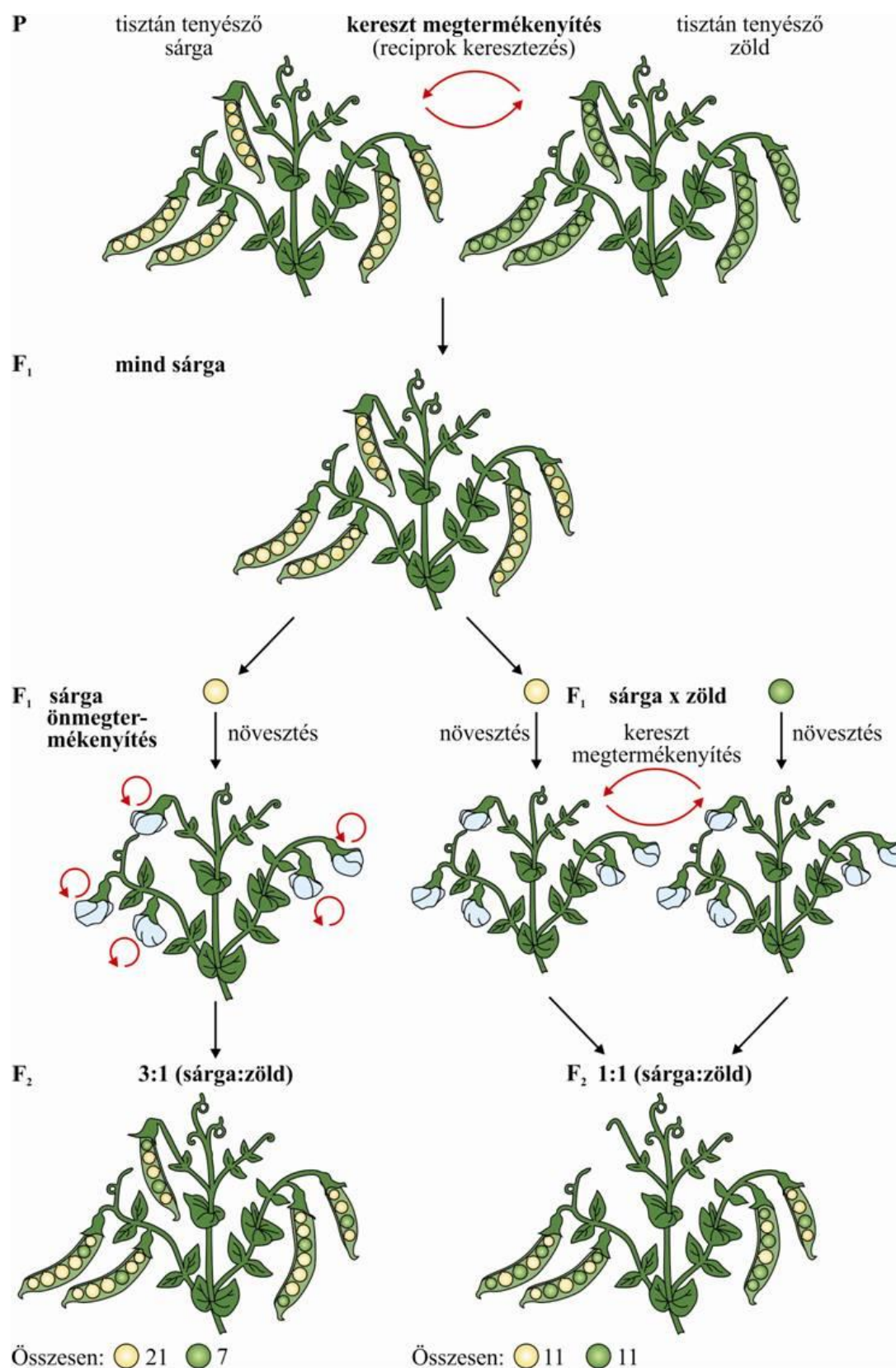
- egy tulajdonságban két eltérő fenotípusú tiszta vonalat keresztezett egymással; ezt szülői generációnak nevezte (P, *parental*=szülő); a keresztezést mindkét irányba elvégezte, vagyis egyik esetben az egyik, másik esetben a másik fenotípusú növényt választotta anyának
- megvizsgálta az utódok fenotípusát a vizsgált jelleg tekintetében; az első utódnemzedéket F1-nek (F, *filial*=utód) nevezte el
- az F1 nemzedék egyedeit önmegtermékenyítéssel tovább szaporította
- megvizsgálta a következő generáció, azaz az F2 utódok fenotípusát

A keresztezések eredményeit a 2.1. táblázat foglalja össze, egy konkrét keresztezést pedig a 2.1. ábra szemléltet.

2.1. táblázat: Hét tulajdonságpár öröklődési mintázata Mendel kísérleteiben

Szülői fenotípusok	F1	F2	F2 fenotípus arány
1. sárga × zöld szem	mind sárga	6022 sárga; 2001 zöld	3,01 : 1
2. sima × ráncos szem	mind sima	5474 sima; 1850 ráncos	2,96 : 1
3. zöld × sárga hüvely	mind zöld	428 zöld; 152 sárga	2,82 : 1
4. felfújtt × becsípett hüvely	mind felfújtt	882 felfújtt; 299 becsípett	2,95 : 1
5. lila × fehér sziromlevél	mind lila	705 lila; 224 fehér	3,15 : 1
6. magas × alacsony szár	mind magas	787 magas; 277 alacsony	2,84 : 1
7. axiális × terminális virágos hajtás	mind axiális	651 axiális; 207 terminális	3,14 : 1

A reciprok keresztezésekből származó F1 utódok mindig ugyanazt az eredményt adták, tehát függetlenül a keresztezés irányától, az összes vizsgált jelleg tekintetében az F1 generáció minden tagja az egyik szülő fenotípusát mutatta (például sárga magszínű). Az F1 önmegtermékenyítéséből származó F2 generációban mindkét szülői fenotípus megjelent: $\frac{3}{4}$ arányban az egyik (amelyik fenotípust az F1 összes egyede mutatott, például sárga magszínű) és $\frac{1}{4}$ arányban a másik (amelyik fenotípus az F1 generációban nem mutatkozott, például zöld magszínű). Az a szülői fenotípus, amelyik eltűnt az F1-ben, újra megjelent az F2-ben, ami arra utal, hogy e fenotípus kialakításáért felelős genetikai elem jelen volt, de nem fejeződött ki az F1 egyedekben.



2.1. ábra: A sárga és zöld magszín öröklődésének szemléltetése

Mendel tovább vizsgálta az F2 egyedeket is önmegtermékenyítéssel. Azt tapasztalta, hogy az F2-ben $\frac{1}{4}$ arányban megjelenő egyedek (például a zöld magvúak) tisztán tenyésztettek (tehát a következő generációkban is zöld magot hoztak). Az F2-ben $\frac{3}{4}$ arányban megjelenő egyedek (például a sárga magvúak) viszont kétféleképpen viselkedtek: $\frac{1}{3}$ -uk tisztán tenyésztett (a következő generációkban is sárga magot hozott), $\frac{2}{3}$ -uk pedig – az F1 egyedekhez hasonlóan – 3:1 arányban hoztak utódokat ($\frac{3}{4}$ sárga, $\frac{1}{4}$ zöld mag).

További informatív keresztezés az volt, amikor Mendel az F1 egyedeket keresztezte azzal a tiszta vonalú szülővel, melynek fenotípusa eltűnt az F1-ben, majd újra megjelent az F2-ben (például a zöld mag). Ekkor az utódok 1:1 arányban mutatták a kétféle fenotípust ($\frac{1}{2}$ sárga : $\frac{1}{2}$ zöld magszínű lett) (2.1. ábra).

A fentiekben bemutatott 3:1 és 1:1 arány általánosnak bizonyult, a magszínen kívül az összes többi, Mendel által vizsgált tulajdonságpair esetén érvényesült. Nem túlzás kijelenteni, hogy a genetika tudományának születése annak volt köszönhető, hogy Mendel tökéletesen átgondoltan végezte a munkáját, precízen feljegyezte az eredményeit, felismerte a számarányok fontosságát, megismételte a kísérleteket, briliáns módon segítségül hívta az eredményei értelmezéséhez a matematikát, és modellt épített. Modellje helytállónak bizonyult, mert tökéletesen alátámasztotta és előrejelezte a kísérletes eredményeket.

Mendel öröklődésre vonatkozó modellje mai terminológiával megfogalmazva az alábbi megállapításokat foglalja magába:

1. Egy öröklődési faktor, azaz **gén** szükséges egy tulajdonság kialakításához.
2. Minden növényegyed két példányát tartalmazza ennek a génnek, azaz az egyedekben minden gén párban van jelen.
3. Egy gén két formáját az adott gén **alléljainak** nevezzük; a magszín génjének egyik allélját *Y*-nal jelöljük (a *yellow* = sárga angol kifejezés kezdőbetűjéből), ez az allél áll a sárga magszín háttérében, a másik allélt pedig *y*-nal jelöljük, ez felelős a zöld magszín kialakításáért.
4. Egy növény bármely kombinációban hordozhatja egy gén két allélját, azaz lehet: *Y/Y*, *y/y*, *Y/y* (a / jel jelöli, hogy az általa elválasztott allélok egy gén változatai).
5. A *Y/y* növények fenotípusa megmutatja azt, hogy melyik génváltozat dominál (erősebb, uralkodik a másik felett). Mivel a *Y/y* növények fenotípusa sárga magszín, ezért a *Y* a **domináns** allél, és *y* a **recesszív** allél.
6. A génpár tagjai a meiózis során szétválva jutnak a gamétákba: a gaméták egyik fele a génpár egyik tagját, másik fele a génpár másik tagját hordozza. Ez **Mendel első törvénye**, melyet az **egyenlő szegregáció törvényeként** is ismerünk.
7. Az ivarsejtek tehát minden génnek csak egy allélját tartalmazzák.
8. Megtermékenyítéskor a gaméták véletlenszerűen fuzionálnak, függetlenül attól, hogy mely allélokat hordozzák.

A továbbiak megértéséhez meg kell ismerkednünk az alábbi fogalmakkal is:

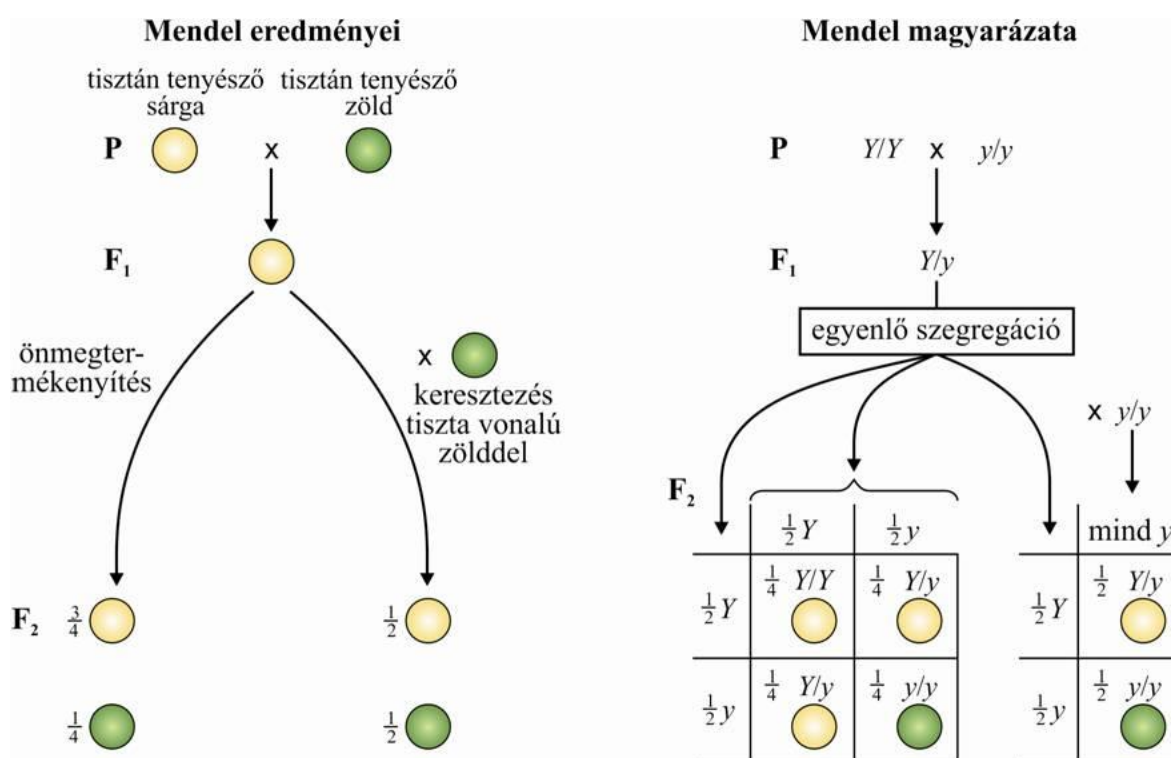
Zigóta: a hím és a női ivarsejt összeolvadásából keletkező első sejt, amelyből a többsejtű egyed kifejlődik.

Homozigóta egy génpárra nézve az az egyed, amely az adott gén ugyanazon két allélját tartalmazza.

Heterozigóta egy génpárra nézve az az egyed, amely egy gén két különböző allélját hordozza (egy génben heterozigóta egyedre használatos még a **monohibrid** kifejezés, illetve két gén tekintetében heterozigóta egyedre a **dihibrid** kifejezés).

Egy egyed lehet homozigóta domináns (például Y/Y), heterozigóta (például Y/y), vagy homozigóta recesszív (például y/y). A fenotípus alapjául szolgáló allélkombinációt **genotípus**nak nevezzük (tehát Y/Y , Y/y , y/y genotípusok).

A 2.2 ábra bemutatja, hogy Mendel egyenlő szegregációra vonatkozó törvénye miként magyarázza a fent ismertetett számarányokat. A szülői tiszta vonalak homozigóták: egyik szülő Y/Y genotípusú, ami sárga magszínű fenotípussal párosul, a másik szülő y/y genotípusú, ami zöld magszínt határoz meg. Ezen vonalak egyike csak Y , másik csak y allélt tartalmazó gamétákat hoz létre (ezért tenyésznek tisztán). Ha e két vonalat keresztezik egymással, akkor az F_1 utódgeneráció minden tagja heterozigóta (Y/y). Mivel Y a domináns allél, ezért minden F_1 egyed sárga színű magokat terem. Az F_1 egyedek önmegtermékenyítése (jelen esetben egymás közti keresztezése is) $Y/y \times Y/y$ keresztezést jelent (ez egy **monohibrid keresztezés**). A Y/y genotípusú egyedek gamétaképzése során (a borsó kétivarú virágában hím és nőivarú gaméták egyaránt keletkeznek) a Y és y allélok egyenlően szegregálódnak, azaz a gaméták egyik fele Y , másik fele y allélt tartalmaz. A hím és női gaméták random találkoznak. Ennek megfelelően az F_2 generációban keletkező geno- és fenotípusok a következők lesznek: $\frac{1}{4}$ Y/Y – homozigóta domináns, tisztán tenyésztő sárga magvú; $\frac{2}{4}$ Y/y – heterozigóta, sárga magvú; $\frac{1}{4}$ – homozigóta recesszív, tisztán tenyésztő zöld magvú. Láthatjuk, hogy a 3:1 fenotípus arányhoz 1:2:1 genotípus arány társul.



2.2. ábra: Egy tulajdonságpár öröklődése és magyarázata

Itt vezessük be a $Y/-$ („nagy ipszilon per valami”) genetikai jelölést, melyben a kötőjel bármelyik allél lehet. Ennek a jelölésnek azért van jelentősége, mert a domináns Y allél, a másik alléltól függetlenül, egységesen sárga fenotípushoz vezet. A monohibrid keresztezésből származó számarány tehát kétféleképpen is felírható:

- $\frac{1}{4} Y/Y$ $\frac{2}{4} Y/y$ $\frac{1}{4} y/y$

vagy

- $\frac{3}{4} Y/-$ $\frac{1}{4} y/y$

Megjegyezzük, hogy az allélok egyenlő szegregációja ugyan csak a heterozigóta egyedek gamétaképzésekor detektálható, de természetesen a homozigóta egyedekben is érvényes ($\frac{1}{2} Y$: $\frac{1}{2} Y$, illetve $\frac{1}{2} y$: $\frac{1}{2} y$).

Az eddigiek alapján az is megérthető, hogy az $F_1 Y/y$ heterozigóta (sárga magvú) és a tiszta vonalú y/y (zöld magvú) növények keresztezéséből miért és hogyan keletkeznek 1:1 arányban sárga magvú (Y/y), illetve zöld magvú (y/y) utódok (2.2. ábra). Mivel a y/y szülő csak y allélt hordozó gamétákat képez, ezért az utódok geno- és fenotípusát az határozza meg, hogy a másik, a Y/y heterozigóta szülő felől melyik allélt kapja. Megfelelően nagyszámú utód esetén a Y/y és a y/y genotípusok az utódpopulációban közelítenek az 1:1 arányhoz.

Fontos hangsúlyozni, hogy Mendel a fenti munkájával nem a borsó bizonyos tulajdonságainak genetikai hátterére volt elsősorban kíváncsi, mégis azonosított egy olyan gént, amely a borsószem színéért felel (ez az Y gén), valamint a többi jelleg tekintetében további géneket is. Ez a példa tökéletes volt arra, hogy lássuk: egy biológiai sajátság kialakításának hátterében álló gén(ek) azonosításában az egygénes öröklődés szabályainak ismerete, és az egygénes öröklődés tényének felismerése igen jelentős egy keresztezési kísérletsorban.

Mendel munkásságával megelőzte a korát, eredményeit korának tudóstársadalma nem értette. Az általa leírt szabályszerűségeket 1900-ban egymástól függetlenül újra publikálta három kutató, Carl **Correns**, Hugo de **Vries** és Erich von **Tschermak**. A tudománytörténet ezeket a munkákat **Mendel törvényeinek újrafelfedezéseként** tartja számon. Rövid időn belül számos élőlényen tesztelték, és találták érvényesnek Mendel öröklődésre vonatkozó törvényeit.

Ma már tudjuk, hogy az egyenlő szegregáció törvénye a kromoszómák meióziszban mutatott szegregációjából fakad. A következőkben ezért áttekintjük az egygénes öröklődés kromoszómális alapjait.

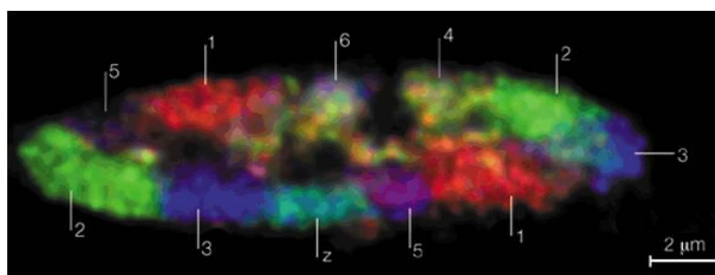
2.2. Gének és kromoszómák

Ebben a fejezetben a későbbiek megértéséhez szükséges fogalmakkal ismerkedünk meg.

Egy élőlény teljes genetikai információját (DNS-ét) az adott szervezet **genomjának** nevezzük. Eukarióta szervezetekben a DNS döntő része a sejtmagban helyezkedik el. Ez a sejtmagi DNS meghatározott egységekre osztott, s ezek az egységek alkotják a **kromoszómákat**. Az egy fajba tartozó szervezetekre meghatározott számú és megjelenésű kromoszómák jellemzők. A legtöbb állat és növényfaj **diploid** (jele: $2n$), ami azt jelenti, hogy testi sejteik két komplett génkészlettel, és ennek megfelelően két azonos kromoszóma szettel rendelkeznek. Az ivarsejtekre egyszeres, **haploid** (jele: n) kromoszóma készlet jellemző. Embernél $n=23$, és $2n=46$.

Egy élőlény haploid genomjának bázispárokban (bp) kifejezett mérete a **C-érték**. A humán genom C-értéke: $3,3 \times 10^9$ bp. Általánosságban igaz, hogy a nagyobb rendszertani csoportok között a komplexitásnak megfelelően változik a minimális haploid genom mérete (minél komplexebb a csoport, annál nagyobb a genom mérete). Ki kell azonban emelni, hogy egyes taxonómiai csoporton belül – látszólag indokolatlanul – túl nagy az egyes fajok genomméretének a különbsége. Ezt a jelenséget illetik a **C-érték paradoxon** kifejezéssel. A méretbeli eltérések egyrészt bizonyos genomrészek mennyiségi különbségeiből fakadnak (ezek: intergénikus (gének közötti) szakaszok, a génekben található nem kódoló szakaszok (intronok), mozgó genetikai elemek), további oka lehet a poliploidia (többszörös genomkészlet).

A diploid élőlények sejtmagjában lévő azonos megjelenésű kromoszóma-párok tagjait **homológ kromoszómáknak**, vagy egyszerűen **homológoknak** nevezzük. A homológ kromoszómák azonosak abban a tekintetben, hogy ugyanazokat a géneket tartalmazzák ugyanolyan elrendeződésben, de a DNS-szekvenciájuk nem teljesen azonos, s a köztük lévő eltérések adják az egy fajon belül fellelhető genetikai variációt. Diploidokban tehát minden gén párban található. Fontos megjegyezni, hogy a testi sejtekben a homológ párok fizikailag nem állnak párba, hanem a sejtmagon belül meghatározott, nem feltétlenül egymáshoz közeli territóriumot foglalnak el (2.3. ábra).

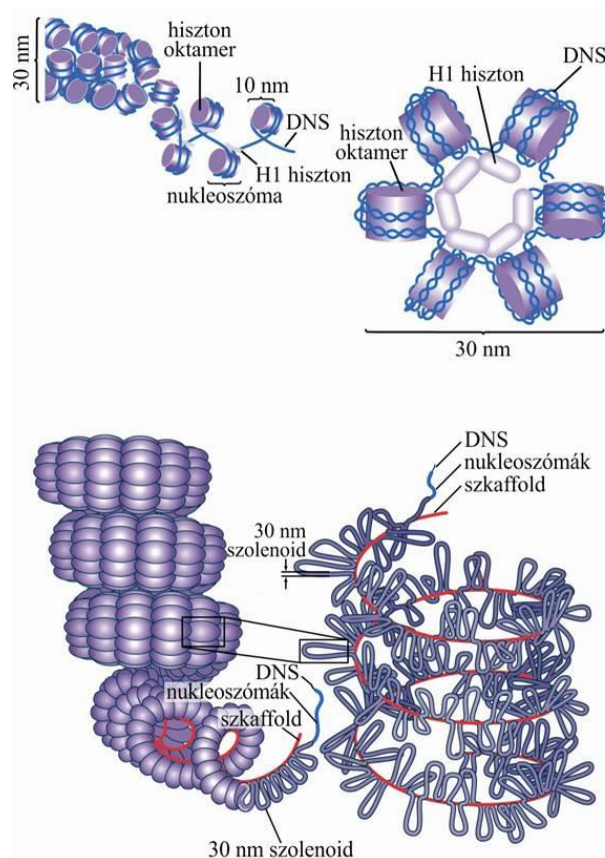


2.3. ábra: Interfázisos kromoszómák által elfoglalt territóriumok csirke diploid sejtmagban (az egyes homológokat eltérő fluoreszcens festés jelöli)

A haploid eukarióta szervezetek (például gombák, algák) sejtmagja egy kromoszómaszettet tartalmaz. A haploidok fontos szerepet töltenek és töltöttek be a genetikai kutatásokban mint modellszervezetek, hiszen genetikai vizsgálatuk egyszerűbb, mint a diploid szervezeteké.

Minden kromoszóma egy DNS molekulából áll (kivéve a sejtosztódást megelőző megkettőződött állapotot). Ha a sejtmagi teljes DNS-t agaróz gélelektroforézissel analizáljuk, a sávok száma megfelel a haploid kromoszómaszámnak (a homológ párok DNS-e azonos méretüknél fogva egy sávként jelenik meg). A sejtmagban lévő DNS-molekulák hossza nagyságrendekkel meghaladja a kromoszómák méretét. Az ember 23 kromoszómáját alkotó DNS hossza összesen nagyjából 1 m (!) hosszúságú. A DNS tehát tömören csomagolt állapotban van jelen a kromoszómákban (2.4. ábra). A csomagolt szerkezet kialakításában a DNS mellett bázikus oldalláncokkal rendelkező **hiszton** fehérjék vesznek részt. A hisztonok több bázikus oldalláncú aminosavat (arginint, lizint, hisztidint) tartalmaznak, és a pozitív töltéseknek köszönhetően elektrosztatikus kölcsönhatás jöhet létre a negatív töltésekkel rendelkező (foszfát csoportok) DNS-molekulával. A hiszton fehérjék a leginkább konzervált (hasonló aminosavsorrenddel rendelkező) fehérjék közé tartoznak, távoli rokon fajokban is csak csekély eltéréseket mutatnak, hosszúságuk 100 aminosav körüli. A tömörülés legkisebb egysége a **nukleoszóma**, mely hiszton-oktamer (8 hiszton fehérje) köré csavarodott DNS-szakasz.

1 nukleoszómára 160 bp jut, a DNS kettős hélix két fordulatot tesz a hiszton oktamer körül, a nukleoszóma átmérője 10 nm. A nukleoszómák további, többszintű csavarulása alakítja ki a **kromatint**, a kromoszómák anyagát. A nukleoszómákat a (kb. 200 aminosav hosszú) H1 nevű hiszton kapcsolja össze 30 nm-es **szolenoid** tekerccsé, melyben csavarulatoként hat nukleoszóma helyezkedik el. A 30 nm átmérőjű szolenoid hurkokat alakít ki egy központi fehérje vázhoz (**scaffold**, vagy magyar átírásban szkaffold) kapcsolódva. A scaffold szerkezete kevésbé ismert, a **topoizomerázII** és más, ún. **nemhiszton fehérjékből** épül fel. A SAR (= *scaffold attachment region*) szakaszok azok a részek a DNS mentén, melyek a scaffoldhoz kapcsolódásban vesznek részt. Két SAR közötti szakasz nagyságrendileg és nagy általánosságban néhány tízezer bp hosszúságú. A gének a SAR-ok között helyezkednek el (2.4. ábra).



2.4. ábra: A kromatin szerveződése

A kromoszómák hossza mentén a kromatin kompaktsága (azaz a tömörülés mértéke) eltérő. A DNS-sel reagáló festékek ennek megfelelően különböző intenzitással festik a kromoszómák egyes részeit. A leginkább festődött szakaszoknál a DNS szorosabban csomagolt állapotban van jelen, ilyen kromoszómaszakasz például a **centromer**, ahol a kromatin jellemzően összeszűkül. A centromernek fontos szerepe van a sejtosztódás során a kromoszómák szegregálódásában. A szorosan csomagolt kromatinszerkezetet **heterokromatinnak**, a lazább szerkezetet **eukromatinnak** nevezzük. Bizonyos kromoszómák sajátos régiója a **nukleólusz organizátor** (NOR régió). Ezek a laza kromatin szerkezetű szakaszok riboszómális RNS-géneket tartalmaznak, melyek folyamatosan, és nagy mennyiségben íródnak át. Környezetükben az rRNS-ek nagy számban vannak jelen. Ez a funkcionális egység a nukleólusz (sejtmag-

vacska) része, ahol a riboszómák összeszerelése zajlik. A kromoszómák további kitüntetett részei az azok végein található **telomer** szakaszok. A telomerek szerkezeti védelmi szerepe rendkívül fontos, és a replikációs mechanizmusuk egyedi (erről később szólnunk részletesebben). Bizonyos festési eljárásokkal a kromoszómák erősebben és gyengébben festődő keresztirányú **sávozottság**ot mutatnak. Ez a mintázat fontos támpontot nyújt a kromoszómaszerkezeti eltérések vizsgálatában. A sávozottság kromatinszerkezeti mintázatot tükröz.

A **gén**ek a kromoszómák DNS-ének RNS-re átíródó szakaszai. Egy gén vagy egyéb kitüntetett genomszakasz helyét a kromoszómán az adott gén vagy szakasz **lókusz**ának (latin *locus* = hely) nevezzük. A gének száma az egyes fajokban ezres nagyságrendű, az egysejtű gomba *Saccharomyces cerevisiae* kb. 6000 génnel, az ember kb. 20000 fehérjekódoló génnel rendelkezik. (Megjegyezzük, hogy a humán genom ezen kívül tartalmaz még körülbelül 23000 nem fehérjekódoló gént, ezekről különféle típusú RNS-termék képződik, valamint körülbelül 14000 ún. pszeudogént, melyek a fehérjekódoló génekhez hasonlóak, de az evolúció során felhalmozódott mutációk következtében nem funkcióképesek. A legújabb eredmények alapján a humán genomnak körülbelül a 80%-a íródik át RNS-re. A folyamatosan frissülő génszámok megtalálhatók az alábbi internetes oldalon: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/StatsTable.)

A gének közötti **át nem íródo régiók** (NTS, non transcribed spacers) mennyisége, hossza, DNS-összetétele fajonként igen változó. Az utóbbi idők kutatásainak megdöbbentő eredménye, hogy eukariótákban az intergénikus régiók nagy részét mobilis DNS-elemek, ún. **traszpozális elemek** teszik ki. A mozgó genetikai elemek nagyban hozzájárulnak a genetikai állomány átrendeződéséhez, az azonban máig sem világos, hogyan képesek a genomok ezt tolerálni.

Az egyes eukarióta genomokra jellemző további érdekes kérdés a génekben lévő **intronok** száma és mérete. Az intronok nemkódoló szakaszok, melyek a gének kódoló szakaszai között helyezkednek el. Az intronok is átíródnak, de poszttranszkripcionálisan kivágódnak az RNS-ből. Míg az egyes fajokban a gének kódoló szakaszának (**exonjainak**) hossza szembetűnően szűk mérattartományba esik (1-3 kbp = kilobázis-pár), addig az intronok száma és mérete igen tág határok között változik. Egy extrém példa az emberi disztrofin gén (melynek hibája okozza az izomdisztrofia nevű betegséget): a gén kódoló szakaszait 78 darab intron szakítja meg, melyek együttes hossza 2500 kbp.

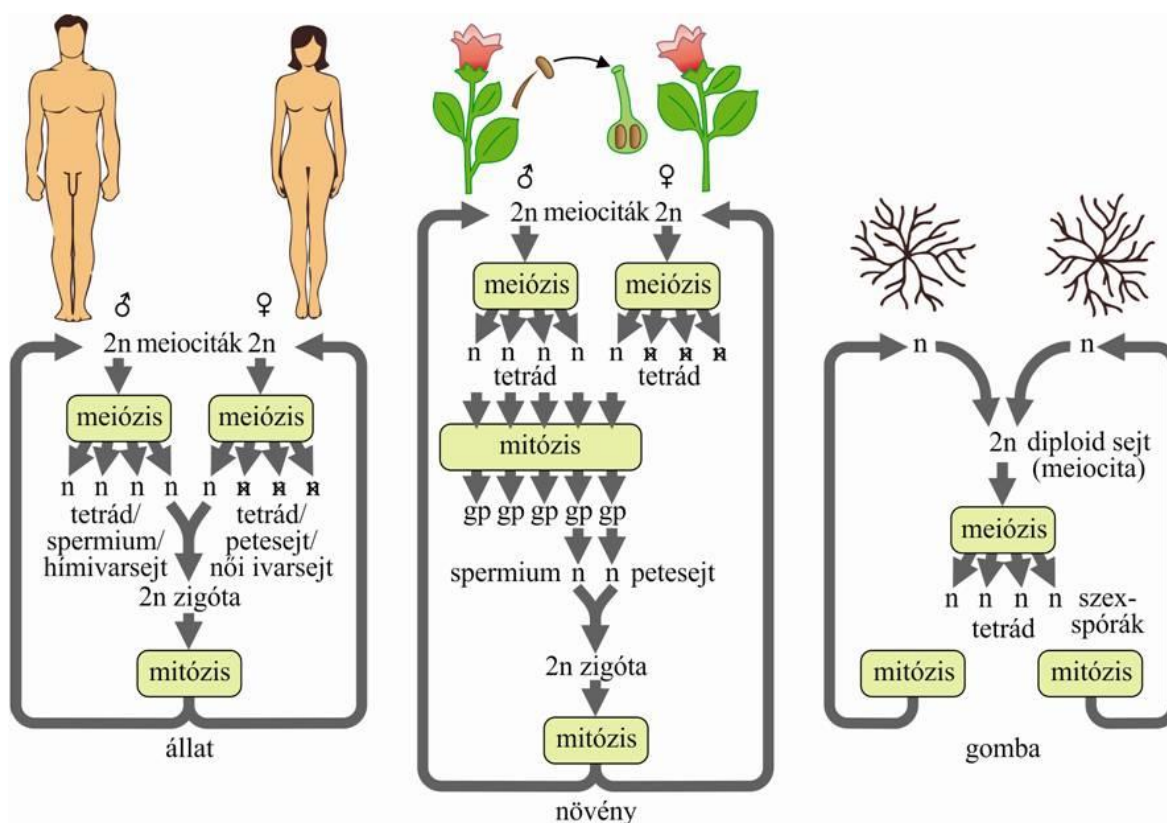
2.3. Az egygénés öröklődési mintázatok kromoszómális háttere

Mendel tehát megállapította, hogy egy génpár tagjai egyenlően szegregálnak a gamétaképződés során. A gamétaképződés hátterében álló szubcelluláris eseményekről Mendel idejében még semmit nem lehetett tudni. Ma már ismert, hogy a génpárok kromoszómapárokon helyezkednek el, és a kromoszómapárok tagjai szegregálnak a meiózis során, az általuk hordozott génekkel együtt.

Ismételjük át a sejtosztódás genetikai szempontból fontos eseményeit! Ahhoz, hogy megértsük a gének szegregációjának sejtbíológiai hátterét, világosan látnunk kell a hasonlóságokat és a különbségeket az eukarióta sejtekre jellemző kétféle sejtmagi osztódásforma között. A **mitózis** a szomatikus sejtekre jellemző osztódási formának a sejtmagot érintő szakasza. Mitózis diploid és haploid sejteknél is lehetséges. Eredménye-

képpen egy kiindulási sejtől két utódsejt (gyakori kifejezés erre még a leánysejt) keletkezik, melyek genetikai állományuk tekintetében teljesen azonosak egymással és a kiindulási sejtrel. Összefoglalva a mitózist a genetikai állomány szempontjából: $2n \rightarrow 2n + 2n$ vagy $n \rightarrow n + n$.

A **meiózis** a szexuálisan szaporodó élőlények speciális diploid sejtjeire, a **meiocitákra** jellemző sejtmagi osztódási forma. A meiocitákból származnak az ivarsejtek: növényekben és állatokban ezek a spermiumok és a petesejtek, gombáknál és algáknál pedig a szexspórák. A 2.5. ábra áttekintést nyújt az állatok, növények és gombák életciklusáról, rávilágítva a mitózis és meiózis szerepére.



2.5. ábra: A mitózis és meiózis szerepe állat, növény és gomba szervezetekben

A diploid meiocitákból két egymást követő osztódással keletkezik négy haploid utódsejt (tetrad). A genetikai állomány szempontjából a meiózis négy haploid utódsejt kialakulását jelenti egy kiindulási diploid sejtől, két egymást követő osztódás során: $2n \rightarrow n + n + n + n$.

A mitózis és meiózis történéseit leegyszerűsítve, a genetikai állomány szempontjából tekintjük át.

2.3.1. Mitózis

A mitózist megelőzően, a sejtciklus S (=szintézis) fázisában megtörténik a teljes sejtmagi DNS-állomány replikációja, és ezzel a teljes kromatinállomány megkettőződése. Ekkor minden egyes kromoszómának megfelelő kromatin két teljesen azonos példányban van jelen a sejtmagban. Ismét kiemeljük, hogy a kromatin állomány a sejtciklus nagy részében enyhén kondenzált formában van jelen. A sejtmagi osztódás idejére történik meg az a nagyfokú kondenzáltság, melyben a kromatinállomány mikroszkóposan

megfigyelhető diszkrét struktúraként, azaz kromoszómákként láthatóvá válik. A mitózisba lépve tehát már minden egyes kromoszóma megkettőződött formában van jelen. Az egymással teljesen azonos kópiákat **testvérkromatidáknak** nevezzük. A testvérkromatidák a centromer részüknél fogva fizikailag össze vannak kapcsolódva. A két testvérkromatidát ebben az állapotban **diád**-nak (a kettő szó görög megfelelőjéből) nevezzük. A mitózis során a testvérkromatidák egymástól szétválva jutnak az utódsejtekbe (2.6. ábra).

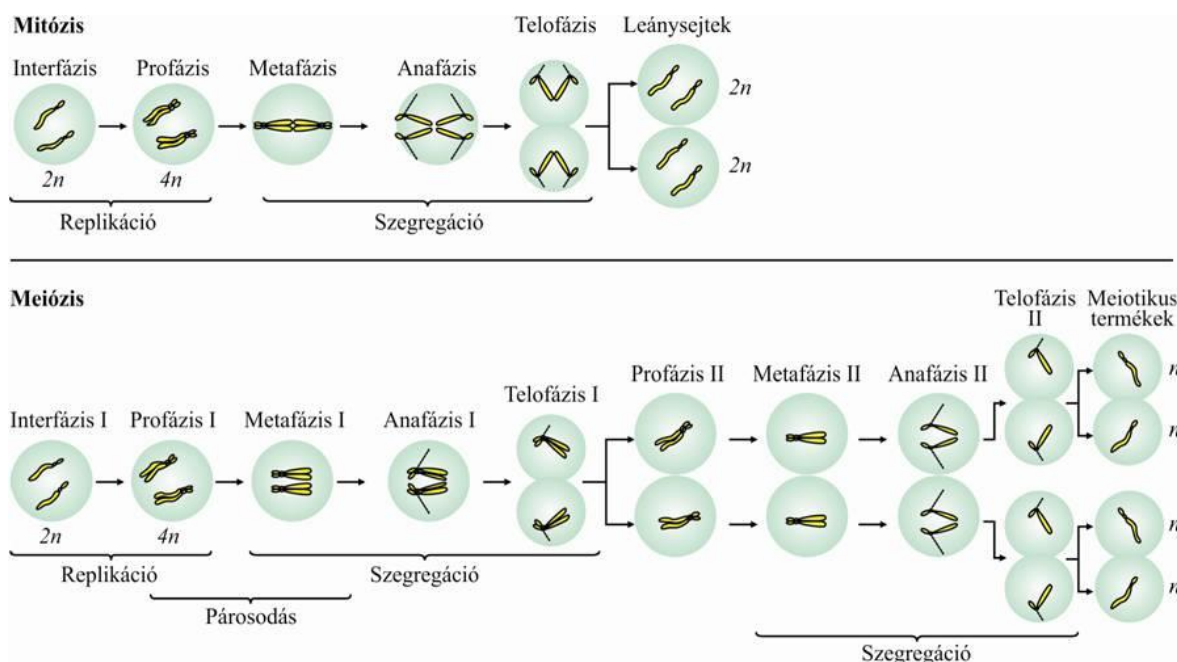
2.3.2. Meiózis

A mitózishoz hasonlóan itt is megtörténik a replikáció az S-fázisban. A kromoszómák tehát itt is kétkromatidás (diád) formában lépnek az első meiotikus osztódásba.

Az első fontos eltérés a meiózis és mitózis között az, hogy a meiózis első osztódásának profázisában a homológ kromoszómapárok fizikailag párosodnak. Ekkor tehát kialakul egy két diádból (összesen négy kromatidából) álló komplex (szinapszis, tetrád, bivalens). A homológok precíz párosodását egy DNS-ből és fehérjékből álló struktúra, a **szinaptonémás komplex** biztosítja. A tetrádok száma megegyezik a homológ kromoszómapárok számával. Fontos kiemelni már most (később részletesebben is foglalkozunk a témával), hogy ebben a tetrád állapotban történnek meg a kromatidák közötti átkereszteződések (**crossing over**). Az átkereszteződő részek citológiaiilag is láthatóak akkor, amikor a tetrád kezd felbomlani, és már csak az átkereszteződő részekeken kapcsolódnak egymással a kromatidák. Azt a pontot, ahol az átkereszteződés látható, **kiazmának** is (a görög kiazma, kereszt szóból) nevezzük. A crossing over során a nem-testvér kromatidák között szakaszok cserélődnek ki, s ennek következményeként új allélkombinációval rendelkező (ún. **rekombináns**) kromatidák jönnek létre. A mechanizmust **homológ rekombinációnak** nevezzük. Legújabb ismereteink szerint a crossing over megtörténte a homológok precíz szegregációjának is előfeltétele, mely folyamat az osztódás következő fázisában zajlik. Az első meiotikus osztódás során a tetrádokat alkotó két diád (azaz két kétkromatidás homológ) egyike az egyik, másika a másik utódsejtbe kerül. Itt tehát – a mitózissal ellentétben – a testvérkromatidák nem válnak szét a centromerüknél fogva, hanem együtt szegregálódnak az első meiotikus osztódáskor. Az első osztódás során létrejött két utódsejtben minden kromoszómából csak egy darab lesz jelen, mégpedig kétkromatidás, rekombináns formában. A második meiotikus osztódást nem előzi meg DNS-replikáció. Az idáig a centromerüknél végig együtt álló testvérkromatidák ebben az osztódási lépésben válnak szét, és kerülnek külön utódsejtekbe. A második meiotikus osztódás befejeztével tehát négy darab olyan sejt keletkezik, melyek az anyasejt diploid kromoszóma szerelvényének a felét tartalmazzák, tehát haploidok ((2.6. ábra).

Összefoglalva a meiózist genetikai szempontból – az egyszerűség kedvéért – egyetlen kromoszómapárral rendelkező ($2n = 2$) diploid anyasejt esetén:

- kiindulás: két homológ, azaz egy homológ pár (két darab egykromatidának megfelelő két DNS-molekula)
- replikáció: két diád (két darab, egyenként kétkromatidának megfelelő, négy DNS-molekula)
- párosodás: egy tetrád (négy DNS-molekula)
- az első osztódást követően: egy-egy diád mindkét utódsejtben (két DNS-molekula sejtenként)
- a második osztódást követően: egy homológ (egy db egykromatidának megfelelő, egy DNS-molekula)



2.6. ábra: A mitózis és meiózis áttekintése

Tekintsük át, hogyan feleltethetőek meg a meiózis szabályszerűségei Mendel első törvényének! Vegyünk egy A/a heterozigóta egyedet. Mi történik az egyes allélokkal a meiózis fázisaiban?

- kiindulás: egyik homológ hordozza a „ A ”, másik pedig a „ a ” allélt
- replikációt követően: egyik diád „ AA ”, másik diád „ aa ”
- párosodás: „ $A/A/a/a$ ” tetrad
- első osztódást követően: egyik sejt „ AA ”, a másik pedig „ aa ” (a crossing over ezt az allélkombinációt módosíthatja, de ez a végső arányokon nem változtat)
- második osztódást követően: négy sejt, közülük kettő „ A ”, kettő pedig „ a ”

Tehát egy A/a heterozigóta genotípusú meiocita meiotikus termékei: $\frac{1}{2} A$ és $\frac{1}{2} a$ allélt tartalmazó haploid sejtek, ami megfelel a Mendel által megfogalmazott egyenlő szegregáció törvényének.

Az egyénes öröklődés szabályszerűségének ismerete két irányban is alkalmazható:

- Utódok fenotípus arányaiból következtetünk a szülők genotípusára,
- Ismert genotípusú szülők utódainak fenotípus arányait előre jelezhetjük.

A mezőgazdasági nemesítésben mindkét irányú eljárás általánosan alkalmazható. Embereknél hasznos annak megállapítására, hogy az utód milyen valószínűséggel örököl egy egyénes betegséget. További gyakori probléma, ha egy domináns fenotípust mutató egyed genotípusa ismeretlen (homozigóta domináns vagy heterozigóta, sematikusan $A/-$). Ilyenkor tesztelő keresztezéssel (test cross), azaz homozigóta recesszív egyeddel keresztezve a domináns fenotípusú egyedet az ismeretlen genotípus könnyen azonosítható:

$$P: A/- \times a/a$$

- Ha F1-ben minden utód domináns fenotípusú (A/a genotípus), akkor az ismeretlen genotípusú szülő homozigóta volt.
- Ha F1-ben $\frac{1}{2}$ domináns fenotípus (A/a genotípus) és $\frac{1}{2}$ recesszív fenotípus (a/a genotípus), akkor az ismeretlen genotípusú szülő heterozigóta volt.

Amennyiben nem áll rendelkezésre a tesztelő (homozigóta recesszív) szülő, akkor egyszerűen az ismeretlen genotípus beltenyésztéséből származó utódarányból következtetünk a genotípusra.

A tesztelő keresztezés alkalmazását a későbbiekben is látni fogjuk komplexebb genotípusok elemzésekor.

2.4. Nemi kromoszómákhoz kötött egyénes öröklődés

2.4.1. Kromoszómális ivar-meghatározási rendszerek

Eddig a „szabályos” kromoszómákról, az ún. autoszómákról beszéltünk, amelyek a genetikai állomány nagy részét kiteszik. A legtöbb állat és növényfajban a nemek kialakulásával összefüggésben álló speciális kromoszómapár is jelen van. Ezeket ivari vagy szexkromoszómáknak nevezzük. Az ivari kromoszómák az autoszómákkal megegyező módon szegregálódnak a meiózis során, de az általuk hordozott gének esetében az utódok fenotípus aránya az autoszómális génekhez képest eltérő.

A legtöbb állatfaj és sok növényfaj ivari dimorfizmust mutat (vannak női ivarú és hím ivarú egyedek). A legtöbb esetben az ivar kromoszómálisan meghatározott (Léteznek egyéb szexdeterminációs rendszerek is, melyekre itt nem térünk ki.).

A nemi kromoszómákkal kapcsolatos első megfigyelést 1891-ben Hermann **Henking** tette. Egy rovar (*Pyrrhocoris*, poloska) sejtmagban figyelt fel egy páratlan, erősen festődő képletre, amelyet **X testnek** nevezett el. Clarence Erwin **McClung** ismerte fel, hogy az X test valójában kromoszóma. Innen származik az **X kromoszóma** elnevezés. McClung azt is észrevette, hogy a nősténynek eggyel több kromoszómája van, mint a hímnak, és ezt kapcsolatba is hozta a nem meghatározásával. Más rovarok hímjeiben és nőstényeiben azonos számú kromoszómákat láttak: a hímekben egy X és egy kisebb, más alakú kromoszómát (ezt az ABC következő betűjéről **Y kromoszómának** nevezték el), a nőstényekben pedig két X kromoszómát. A hímekben és nőstényekben tehát rendhagyó (egyes fajokban pár nélküli, más fajokban pedig heteromorf) kromoszómák találhatók.

Nettie Maria **Stevens** és Edmund Beecher **Wilson** megfigyelték, hogy az X és az Y kromoszómák a gaméta képződés során nem jutnak ugyanabba az ivarsejtbe, az egyik ivarsejtbe X, a másikba Y kerül. A nőstény ivarsejtjeinek mindegyike egy X kromoszómát kap. Ebből arra következtettek, hogy mivel a nemi jellegek ugyanúgy öröklődnek, mint más tulajdonságok, azokat a kromoszómák közvetítik.

Háromféle, ivari kromoszómákon alapuló, nem-meghatározást ismerünk:

1. **XX-X0**
2. **XX-XY**
3. **ZZ-ZW**

Az XX-X0 nem-meghatározás

- a nőstények két X kromoszómát (XX) hordoznak
- a hímek egy X kromoszómát (X0-lal jelöljük, ahol 0 jelöli a másik ivari kromoszóma hiányát) hordoznak

Ivarsejt képződésekor a nőtényekben minden petesejtbe kerül egy X kromoszóma, a hímekben pedig a spermiumok egyik felébe kerül X, a másik felébe nem. Vagyis az ivari kromoszómák tekintetében a petesejtek egyfélék, a spermiumok kétfélék.

Ennek megfelelően a nőtények a **homogamétás** (egyforma gamétájú), a hímek pedig a **heterogamétás** (kétféle gamétájú) nem. Az utódok nemét a hímvarsejt szabja meg. Ez a rendszer jellemző sok rovarfajra.

Itt említjük meg, hogy a fontos genetikai-fejlődésbiológiai modellszervezet, a laboratóriumi fonalféreg (*Caenorhabditis elegans*) hermafrodita egyedei XX ivari kromoszómával rendelkeznek, így az egy egyedben termelődő hím és női ivarsejtek is egy X kromoszómát tartalmaznak. Hím egyedek a természetes populációban ritkán, de előfordulnak, melyek XO ivari kromoszómákkal rendelkeznek (A ritka előfordulás oka az, hogy az XX kromoszómák hiba folytán nem szegregálódnak, aminek következtében XX és 0 ivarsejtek jönnek létre; Ez utóbbiak egy normál, X kromoszómával rendelkező ivarsejttel fuzionálva hozzák létre az XO hím egyedeket).

Az XX-XY nem-meghatározás

- a nőtények XX nemi kromoszómákkal rendelkeznek (homogamétás: a petesejtek mindegyike X kromoszómát hordoz)
- a hímek XY nemi kromoszómákkal rendelkeznek (heterogamétás: a spermiumok fele X, másik fele Y kromoszómát hordoz)

Az utód nemét a spermium szabja meg. Ez a rendszer jellemző az emlősökre (az emberre is), az egyik fontos genetikai modellszervezetre, a muslicára (*Drosophila melanogaster*), továbbá a kétlaki növényekre (például Fehér mécsvirág, *Melandrium album*).

Az X és Y kromoszómák citológiaiailag jól megkülönböztethetők: az Y kromoszóma jóval kisebb az X-nél. Mindkét kromoszóma tartalmaz **homológ** (hasonló) és nem-homológ (**differeciális**, megkülönböztető) részeket. A nem-homológ szakaszok olyan géneket hordoznak, amelyeknek nincs megfelelője a másik nemi kromoszómán. A nem-homológ szakaszokra eső gének **hemizigóta** (pár nélküli) állapotban vannak a hímekben. Az X és Y kromoszóma a homológ szakaszaik mentén képesek párosodni a meiózis I. profázisában, és ennek köszönhetően kromoszómapárként viselkedve külön utódsejtekbe szegregálódnak. Tehát annak köszönhetően, hogy az X és az Y heteromorf kromoszómák mendeli módon szegregálódnak az ivarsejt képzés során, az X és Y kromoszómát hordozó spermiumok fele-fele arányban jönnek létre.

A ZZ-ZW nem-meghatározás

- a hímek ZZ nemi kromoszómákkal rendelkeznek (homogamétás nem)
- a nőtények ZW nemi kromoszómákkal rendelkeznek (heterogamétás nem)
(Ez a fordítottja annak, amit az XX-XY nem-meghatározás esetén láthattunk.)

Ez a rendszer jellemzi a madarak, lepkék, ezen kívül a hüllők, kétélűek, halak egy részének ivari meghatározottságát.

2.4.2. Az ivari kromoszómák szerepe emberben a nem meghatározásban

Az emberre az XX-XY ivari kromoszómás nem-meghatározás jellemző. Hogy pontosabban megértsük az ivari kromoszómák szerepét a nemek kialakításában, tekintsünk át néhány rendellenességet, melyek az ivari kromoszómákkal kapcsolatosak.

A **Turner-szindrómás** személyek **XO** ivari kromoszómákkal rendelkeznek. A nőkre jellemző nemi sajátosságokat mutatnak, de általában sterilek. Az újszülött lányok között 1/3000 gyakoriságban fordul elő a rendellenesség. További jellemzőik: alacsony növésűek, vaskosak, hajuk a homlokukba nő, gyakran bőrrredő húzódik a nyakuk mindkét oldalán, szellemi képességeik általában normálisak.

Triplo-X-szindrómás (XXX) személyek 1/1000 gyakorisággal születnek. Ez az ivari kromoszómarendellenesség nem jár súlyos abnormális állapottal, de a szellemi visszamaradottság gyakoribb, mint az XX nők között. Általában magas, karcsú alkatú, fertilis nők.

A **Klinefelter-szindróma (XXY)** 1/1000 gyakoriságú a fiú újszülöttek között. Női másodlagos nemi jellegeket mutatnak, általában magasak, arcszőrzetük ritka, intelligenciájuk normális.

A fentiek alapján emberben az ivari kromoszómák szerepéről az alábbi megállapításokat tehetjük:

- Az X kromoszóma nélkülözhetetlen géneket hordoz mindkét nem számára. Az X kromoszóma teljes hiánya emberben az élettel összeegyeztethetetlen.
- Egyetlen Y kromoszóma elegendő a férfiasság kialakulásához, még akkor is, ha több X kromoszómával együtt fordul elő (lsd. Klinefelter-szindróma). A férfi nemi jellegeket meghatározó géneket az Y kromoszóma hordozza.
- Az Y kromoszóma hiánya női jelleget eredményez.
- Mindkét nemi kromoszóma fontos termékenységi géneket hordoz. A nők termékenységéhez két X kromoszóma szükséges. A férfiak termékenységéhez szükséges és elégséges egy Y kromoszóma.
- Az X kromoszóma hordoz olyan géneket, melyekből kettőnél több káros hatású mindkét nemben.

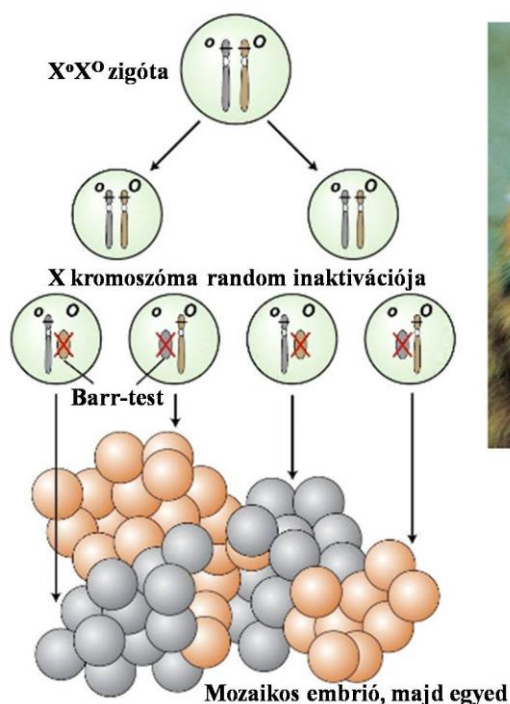
Az ember „férfi-meghatározó” génje

A férfi jellegekhez tehát az Y kromoszóma jelenléte nélkülözhetetlen. Előfordulnak Y kromoszóma nélküli, két X kromoszómát hordozó férfiak. Ezekben a férfiakban az Y kromoszóma egy kis darabja beékelődött az X kromoszómába. A férfi jelleghez nem szükséges tehát a teljes Y kromoszóma, annak elég egy kis darabja. Ez a kromoszóma szakasz hordozza az SRY (*sexdetermining region on Y* vagy *sex reversal on Y*) gént. Ez a gén a főkapcsoló. A SRY hatására a gonádkezdemény herévé fejlődik. A here az androgén hormont, a tesztoszteront és a Müller-féle gátló faktort termeli. A tesztoszteron jelenlétében a férfi jellegek kifejlődnek, a Müller-féle gátló anyag hatására a női szaporító vezeték visszafejlődik. A SRY hiányában a gonádkezdeményből petefészek lesz, és női jellegek alakulnak ki. Egérben a SRY gén beültetése XX embrióba hím fejlődését váltja ki.

2.4.3. Az X kromoszóma inaktiváció

Az XX egyedekben az X kromoszómához kötött gének dózisa kétszerese az XY (illetve az XO) egyedekéhez képest, mely dóziskülönbség kompenzálódik. A dóziskompenzáció az élővilágban többféle mechanizmussal is megvalósulhat az ivari kromoszómakon lévő gének aktivitásának befolyásolásával. Emlősöknél a nőstényekben a kompenzáció az egyik X kromoszóma inaktiválásával valósul meg (lásd még a génkifejeződés szabályozásáról szóló [10.](#) fejezetben). Az inaktiválás a korai embrionális fejlődés alatt történik (2.7. ábra). Az inaktivált X heterokromatikus röggként látszik, amelyet Barr-testnek

nevezünk (a hímek sejtjeiben nincs Barr-test). Az inaktiváció által vezet az X kromoszómán lévő gének elcsendesítéséhez (kifejeződésük, átírásuk csökkentéséhez), hogy az adott X kromatin erősen „csomagolt”, heterokromatin szerkezetet vesz fel. Véletlenszerű, hogy egy adott embrionális sejtben a kettő közül melyik X kromoszóma inaktiválódik, és az erre vonatkozó információ a további sejtosztódások során az utódsejteknek átadódik. Ennek az lesz a következménye, hogy a nőivarú emlős egyedek testében nagyobb összefüggő sejtcsoportokban (ún. szektorok) egyik vagy másik X aktív illetve inaktív, vagyis etekintetben a nőivarú egyedek mozaikosak. A mozaicizmus az X-hez kötött gének heterozigóta genotípusa esetében a fenotípusban is megnyilvánulhat. Erre egy látványos példa a teknőctarka fenotípusú macska. (Vörös-fekete foltos; sokszor fehér bundaszínű szektorok is előfordulnak a testen, de ennek hátterében egyéb ok áll.) Ha vörös-fekete foltos macskát látunk, szinte biztosak lehetünk abban, hogy az nőtény, mely heterozigóta egy X kromoszómához kötött bundaszín gén (*O*, orange, vörös) alléljaira: *O/o* genotípus. A vörös és fekete szektorokat az X kromoszóma váltakozó inaktivációja okozza: az *XO*/(*XBarr*) szektorok fenotípusa fekete a *O* allél miatt, az (*XBarr*)/*Xo* szektoroké pedig vörös a *o* allél miatt.

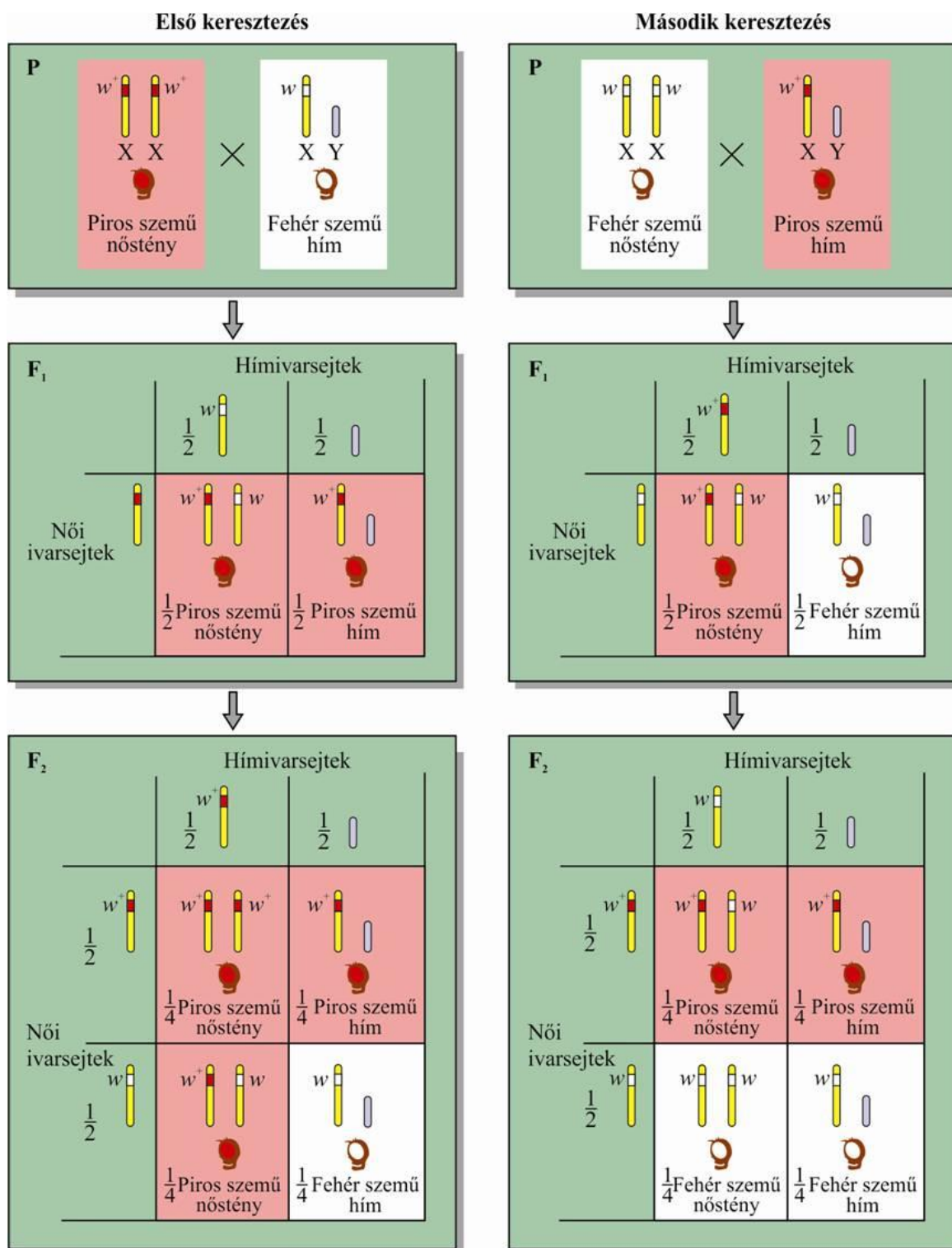


2.7. ábra: Az X kromoszóma inaktiváció mozaikos fenotípust okoz

Emberben az X-hez kötött *aed* génre (az *anhydrotic ectodermal dysplasia* kifejezésből, mivel recesszív allélja verejtékmirigy hiányt okoz) heterozigóta nőkben (*aed/aed+*) szintén megfigyelhető a szomatikus mozaicizmus.

2.4.4. A cikk-cakk öröklésmenet

Mendel borsókísérleteiben a reciprok keresztezések mindig azonos eredményt adtak. Az ivari kromoszómákhoz kapcsolt jellegek esetében a keresztezés irányától függően eltérő utódokat látunk. Az XX-XY nem-meghatározáshoz tartozó utód hímek az apjuktól öröklik az Y, az anyjuktól pedig az X kromoszómájukat. Az utód nőtények egyik X kromoszómája az apától, a másik az anyától származik. Nézzük meg egy egyszerű példán, hogyan alakul az utódok fenotípusa attól függően, hogy milyen volt a szülők genotípusa egy X kromoszómán lévő génben (2.8. ábra). A példában bemutatott X kromoszómális gén a *white* gén (*Drosophilá*-ban). A vad típusú w^+ allél domináns a recesszív w alléllal szemben. A vad allél vad szemszínhez vezet (téglavörös, vagy egyszerűbben mondva piros), a w allél pedig homozigóta (nőtényekben), illetve hemizigóta (hímekben) formában fehér szemszín kialakulását okozza. Ha tiszta vonalú piros szemű nőtényt ($X w^+/X w^+$ genotípus) – mely a homogamétás nem – keresztezzük fehér szemű hímmel ($X w/Y$), akkor az összes utód nemtől függetlenül piros szemű lesz. Ebből következik, hogy a piros szemszín domináns. Ám ha elvégezzük a reciprok keresztezést, tehát fehér szemű nőtényt ($X w/X w$) keresztezünk piros szemű hímmel ($X w^+/Y$), akkor az utódok az **ellenkező nemű szülő fenotípusát** mutatják: a nőtények piros szeműek ($X w^+/X w$), a hímek pedig fehér szeműek ($X w/Y$). Ezt nevezzük cikk-cakk öröklésmenetnek.



2.8. ábra: Cikk-cakk öröklésment a muslica X nemi kromoszómáján lévő white gén példáján

A ZZ-ZW ivari kromoszómális rendszerben hasonlóképpen öröklődnek a Z kromoszómán lévő gének. Például így öröklődik az *Abraxas* araszó lepke sötét-világos színe, vagy a házityúk kendermagos mintázata. Figyeljünk fel arra, hogy ebben a rendszerben a homogamétás nem a hím nem (ZZ), itt tehát akkor látjuk a cikk-cakk öröklésmentet, ha a hím szülő mutatja a recesszív jelleget. Ezek a hímek a heterogamétás (ZW) nőstény utódaiknak kizárólagosan örököltik át a Z kromoszómát, és a rajta lévő recesszív allélt.

Törvényszerűség tehát az, hogy a cikk-cakk öröklésmenet akkor tapasztalható, ha a homogamétás szülő recesszív homozigóta, és a heterogamétás szülő hordozza a domináns allélt.

2.4.5. A kromoszómaelméletet bizonyító kísérlet

Most már eleget tudunk ahhoz, hogy megismerjük azt a nagy jelentőségű munkát, melyet Thomas Hunt **Morgan** és egyik tanítványa, Calvin **Bridges** végzett, és mellyel kétséget kizáróan bizonyítást nyert a kromoszómaelmélet, azaz, hogy **a gének a kromoszómák részei**. Megjegyezzük, hogy a Morgan által létrehozott „*Drosophila*-iskola” (Columbia University, fly room) a múlt századelőn az egyik legnagyobb genetikai fellelő volt. Itt tevékenykedett Bridges mellett Alfred Sturtevant, aki a kapcsoltsági térképek szerkesztésében végzett úttörő munkát, valamint Herman J. Müller, aki az indukált mutagenézis területén alkotott nagyot. Morgan a kromoszómák öröklődésben játszott szerepének vizsgálataért 1933-ban Nobel-díjat kapott.

Azt, hogy a géneket a kromoszómák hordozzák, korábban már más kutatók is sejtették. Egy logikus érvelés szerint a petesejtnek és a hímivarsejt kell tartalmazniuk a géneket, mivel ugyanolyan mértékben járulnak hozzá az utódok fenotípusának kialakításához. Morfológiájuk arra enged következtetni, hogy a géneknek a sejtmagban kell lenniük, mert ennek mérete hasonló a kétféle ivarsejtben, egyébként viszont drámaian különbözik egymástól a két sejtfeleség. A sejtmagban pedig a kromoszómák találhatók. A bizonyításhoz konkrét kromoszómákhoz kötött konkrét gének generációkon történő nyomkövetésére volt szükség. A Bridges által végzett kísérletekben az X-kromoszómához kapcsolt *white* gén töltötte be ezt a genetikai marker szerepet (legalábbis erősen valószínűsíthető módon, melyet az alábbi kísérletsor igazolt is).

Bridges a cikk-cakk öröklésmenet kapcsán figyelt fel arra, hogy ha sok fehér szemű nőtényt és piros szemű hímet keresztezett, akkor a nagyszámú piros szemű nőtény és fehér szemű hím utód között 0,1% gyakoriságban megjelentek fehér szemű nőtények és piros szemű hímek is. Ez utóbbiakat „elsődleges szokatlan utódok”-nak nevezte el. Hogyan magyarázható a szokatlan utódok megjelenése? A szokatlan nőtények olyan fenotípusúak (fehér szeműek), mint az anyjuk. Az apjuktól nem kaphattak *w+* allélt, mivel ez domináns, és ezért nem lehetne fehér a szemük. Az sem lehetséges, hogy csak egy X kromoszómájuk (X⁰) van, mivel akkor nemi jellegük nem női lenne (ez a muslica ivarmeghatározási rendszerére jellemző), hanem hím. Vagyis, mindkét X kromoszómájukat az anyjuktól kellett kapniuk. Bridges úgy okoskodott, hogy az elsődleges szokatlan nőtények abban az esetben kaphatták mindkét X kromoszómájukat az anyjuktól, ha azok a meiózis során osztódási hiba miatt nem szegregáltak, és a petesejtbe egy helyett két X kromoszóma került. Ezt a jelenséget nem-szétválásnak, vagy **nondiszjunkciónak** nevezik. Ha a meiózis során az egyik meiotikus termékbe két homológ kromoszóma jut (itt XX), akkor a másik termékbe egy sem kerül (itt 0). Ha ezeket a petesejteket szabályos kromoszómakészletű spermiumok termékenyítik meg, akkor XXX, XXY, X⁰ és Y⁰ kromoszómájú zigóták keletkeznek. Az XXX és Y⁰ muslicák nem életképesek. Az XXY és az X⁰ genotípusúak életképesek. Az XXY termékeny nőtény, az X⁰ steril hím. Az elsődleges szokatlan hímek valóban sterilnek bizonyultak, és szemszínük piros, mivel X kromoszómájukat a *w+* alléllal apjuktól örökölték. Ezek a megfigyelések a nondiszjunkció lehetőségét igazolták.

A továbbiakban Bridges azt vizsgálta, hogyan viselkednek az elsődleges kivétel XXY nőtények az öröklésmenetben. Az XXY nőtény négyféle ivarsejtet képezhet. Az XXY szétválhat XX és Y, illetve X és XY kromoszómákra. Ezek a petesejtek a vad típusú hímek

X és Y kromoszómát hordozó spermiumaival találkoznak. Punnett tábla segítségével megjósolhatjuk a lehetséges utódok genotípusát, nemét, életképességét és szemszínét. A keresztezés utódai között, a cikk-cakk öröklésmenetnek megfelelően, megjelentek a várt piros szemű nőstények és fehér szemű hímek. Ezenkívül megjelentek „másodlagos szokatlan utódok” is: a fehér szemű nőstények és a piros szemű hímek. Mindkét nemű másodlagos szokatlan utódok fertilisnek bizonyultak. Az utódok megfelelték a Punnett táblából jóslt kimeneteknek. A normális piros szemű nőstények $XwXw+$ és $XwXw+Y$, a fehér szemű hímek XwY és $XwYY$ genotípusúak. A másodlagos szokatlan utódok között a fehér szemű nőstény $XwXwY$, a piros szemű hím $Xw+Y$ genotípusú. Két várt kategória (XXX, YY) nem jelent meg, mivel ezek nem életképesek. Mindez igazolja, hogy az elsődleges kivételes utódok nondisjunkcióval jöttek létre. Bridges megvizsgálta a másodlagos szokatlan utódok kromoszómáit, és azt találta, hogy azok sejtjeiben valóban XXY és XY kromoszómák vannak. További citológiai vizsgálatok is alátámasztották az elmélet helyességét.

A genetikai és a citológiai vizsgálatok eredményei tehát összhangban voltak egymással, és együttesen bizonyították, hogy a *white* gén az X kromoszómán van. A felfedezés jelentősége abban áll, hogy ha a gének a kromoszómákon vannak, akkor a kromoszómákat alkotó anyagok egyike (DNS vagy fehérjék) a gének anyaga. A témát a DNS mint örökítő anyag tárgyalásakor folytatjuk.

3. Gének független öröklődése. Mendel második törvénye

Az előző fejezetekben megismerkedtünk egy adott gén öröklődésének szabályszerűségeivel. Mit tapasztalunk, ha két vagy több gén öröklődését vizsgáljuk egyszerre? Két gén öröklődése lehet egymástól független, vagy két gén öröklődhet kapcsoltan („egymástól függő módon”). Most az első esettel foglalkozunk, és egyúttal megismerkedünk Mendel második törvényével. A kapcsolt öröklődés egy következő fejezet témája lesz.

Több gén együttes vizsgálatának legfontosabb alkalmazása a növény- és állatnemesítésben van, de az alapkutatásban a különféle genotípusú laboratóriumi törzsek létrehozásában is elengedhetetlen ezen ismeretek alkalmazása.

Nézzünk egy példát a rizs kapcsán! A világ különböző pontjain keletkeztek olyan rizs vonalak, melyek egyenként más-más gén valamilyen előnyös tulajdonságú allél-párjával rendelkeztek, például:

- sd1* recesszív allél, mely a növénynek alacsony termetet kölcsönöz, így az ellenállóbb lesz az erős szélnek, s a növény relatíve több energiát tud befektetni a termés létrehozásába
- se1* recesszív allél, mely azt eredményezi, hogy a növény szélesebb spektrumban képes alkalmazkodni a fényviszonyokhoz
- Xa4* domináns allél, rezisztenciát okoz bakteriális fertőzésekkel szemben
- bph2* recesszív allél, rezisztenciát okoz rovarkártevőkkel szemben
- Snb1* domináns allél, melynek hatására a növény jól tolerálja a nagy esőzések miatti víz alá merülést

Felmerülhet az igény arra, hogy a fenti előnyös tulajdonságokat egyesítsék egyetlen vonalban. Ehhez első lépésként be kell szerezni mind az öt tiszta vonalat. (Emlékezzünk rá, hogy tiszta vonal egy adott tulajdonság tekintetében az az egyed, mely a tulajdonság kialakításában részt vevő gén azonos alléljait hordozza, vagyis homozigóta.) A kívánt allélkombináció eléréséhez először páronként keresztezik a vonalakat. Az F1 generáció már hordozza mindkét allélt, s mindkettőt heterozigóta formában, például

$$P \quad sd1/sd1 \cdot se1^+/se1^+ \quad \times \quad sd1^+/sd1^+ \cdot se1/se1$$

$$P \text{ gaméták} \quad sd1 \cdot se1^+ \quad \text{és} \quad sd1^+ \cdot se1$$

$$F1 \text{ mind } sd1/sd1^+ \cdot se1^+/se1$$

A tisztán tenyésztő dupla mutáns vonal (*sd1/sd1* · *se1/se1*) létrehozásához az F1 nemzedéket önmegtermékenyítéssel tovább kell szaporítani. Milyen törvényszerűségek érvényesek ekkor? Ez – kissé leegyszerűsítve – attól függ, hogy a két, a keresztezésben szerepet játszó lókus azonos vagy különböző kromoszómákon helyezkedik-e el. Ha az utóbbi eset áll fenn, akkor a független öröklődés szabályszerűségei lesznek

érvényesek a kétszeresen heterozigóta F1 egyedek ivarsejtképzésekor. Mivel az egyik (*sd1*) illetve a másik (*se1*) lókuszt hordozó két homológ kromoszómapár egymástól függetlenül viselkedik a meiózis során, az általuk hordozott lókuszhoz tartozó allélpárok is egymástól függetlenül szegregálódnak az ivarsejtekbe.

Ebben a fejezetben láthatjuk, hogyan ismerhetjük fel a független öröklődést, illetve azt, hogy a független öröklődés szabályszerűségeinek ismerete miként hasznosítható törzsek létrehozásában, akár a mezőgazdasági nemesítésben, akár az alap kutatásban.

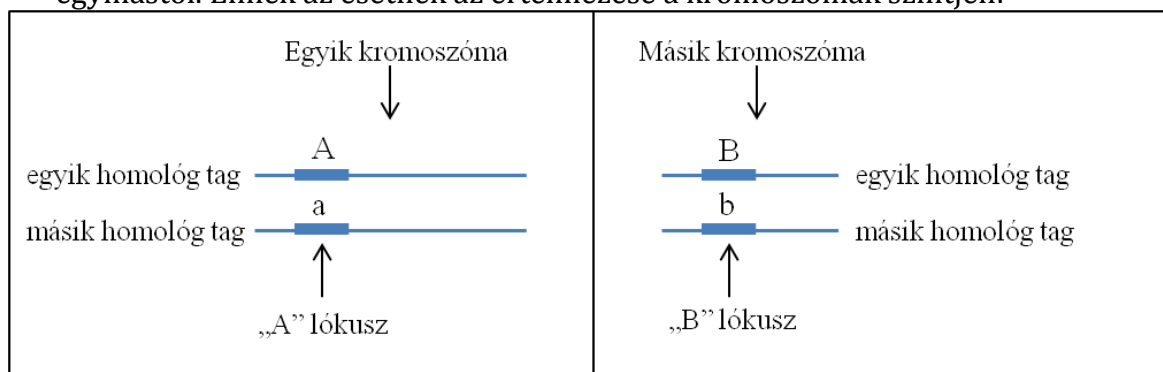
Mielőtt ismertetjük Mendel második, a független öröklődés törvényéhez vezető kísérleteket, ismerkedjünk meg néhány fontos genetikai jelöléssel!

Ha egy diploid szervezet genotípusának leírásakor két (vagy több) gént tüntetünk fel, akkor:

- Pontosvesszőt teszünk az allélpárok közé, ha a gének különböző kromoszómákon helyezkednek el, például:

$$A/a; B/b$$

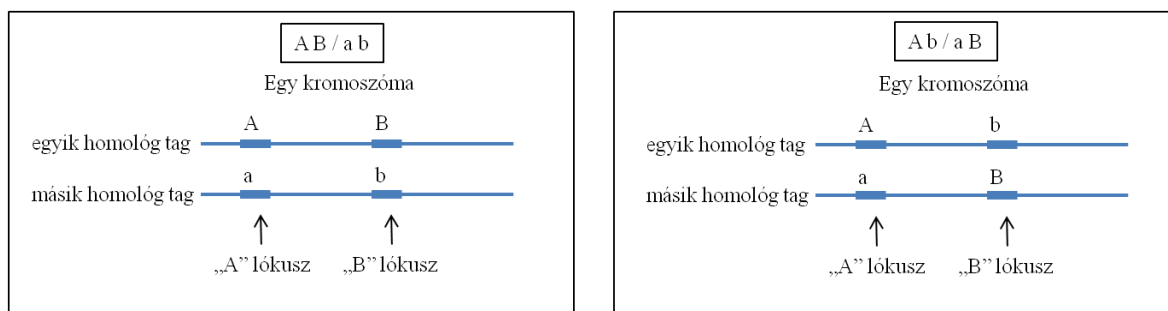
Egy allélpárt, mint azt korábban ismertettük, egymástól törtvonallal („perjellel”) választunk el. A perjel lényegében egy homológ kromoszómapár tagjait választja el egymástól. Ennek az esetnek az értelmezése a kromoszómák szintjén:



- Ha a szóban forgó két lókusztól tudjuk, hogy azonos kromoszómán helyezkednek el, akkor a gének egyik allélját a perjel egyik oldalára sorba írjuk, a gének másik allélját pedig a perjel másik oldalára, például:

$$A B / a b \quad \text{vagy} \quad A b / a B$$

Vegyük észre, hogy bár mindkét fenti genotípus *A* és *B* gén tekintetében heterozigóta, a két jelölés mégis megmutat egy lényeges különbséget a két genotípus között: azt, hogy a két gén alléljait milyen kombinációban hordozza az egyik, illetve a másik homológ kromoszóma tag. A fenti két esetet sematikusán, a kromoszómák szintjén az alábbiak szerint ábrázolhatjuk:



A továbbiakban fontos lesz, hogy ezt a jelölésmódot értelmezni és alkalmazni tudjuk.

- Ha a keresztezés felírásakor nem tudjuk, hogy két gén különböző vagy azonos kromoszómán helyezkedik-e el, akkor egy ponttal választjuk el a két allélpárt, például:
 $A/a \cdot B/b$

Ahogy egy génre nézve heterozigóta egyedet (A/a) **monohibrid**nek is nevezhetünk, úgy két génre nézve heterozigóta egyed pedig ($A/a \cdot B/b$) a **dihibrid**. A dihibrid keresztezés két tulajdonságpárra nézve heterozigóta egyedek keresztezését (vagy dihibrid egyed önmegtermékenyítését) jelenti.

3.1. Mendel II. törvénye: a független öröklődés törvénye

A legtöbb keresztezésben, melyet Mendel a veteményborsóval végzett, két tulajdonságpárban különböző tiszta vonalakból indult ki, vagyis két jelleget vizsgált egyszerre. Szerencsés módon, a Mendel által vizsgált jellegek háttérében álló gének egymástól függetlenül öröklődtek (különböző kromoszómán, vagy egy kromoszómán távol helyezkedtek el a lókusztok, lásd még a Kapcsoltságról szóló [4.](#) fejezetben). Ez tette lehetővé, hogy Mendel felismerje azt a genetikai törvényszerűséget, mely két függetlenül öröklődő génre érvényes.

Az első, Mendel által együtt vizsgált két tulajdonságpár a borsószem színe (sárga vagy zöld) és a borsószem alakja (gömbölyű vagy ráncos) volt. Korábban már láttuk, hogy a sárga és a zöld szemszín esetén a sárga dominál a zöld felett (emlékeztetőül: Y/Y sárga $\times y/y$ zöld $\rightarrow F_1 Y/y$ mind sárga), a monohibrid keresztezés ($Y/y \times Y/y$) utódai között pedig 3:1 fenotípusarányban keletkeznek sárga és zöld magok (3 $Y/-$: 1 y/y).

A szem alakjának öröklődését önmagában vizsgálva Mendel hasonló eredményt kapott. A domináns fenotípus a gömbölyű, a recesszív pedig a ráncos, és az F_2 -ben 3:1 gömbölyű:ráncos arányt kapott.

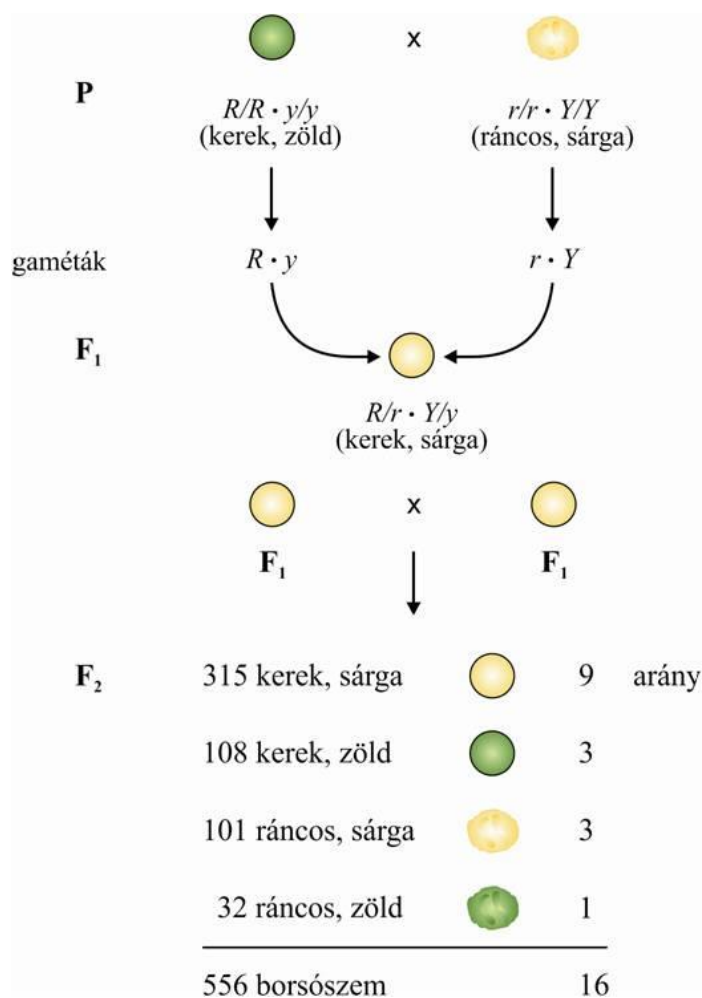
Nézzük, mi történik a két jelleg együttes vizsgálatakor (3.1. ábra)!

A keresztezésbe vitt szülői tiszta vonalak geno- és fenotípusa:

$$\begin{array}{ccc} R/R \cdot y/y & \times & r/r \cdot Y/Y \\ \text{gömbölyű, zöld} & & \text{ráncos, sárga} \end{array}$$

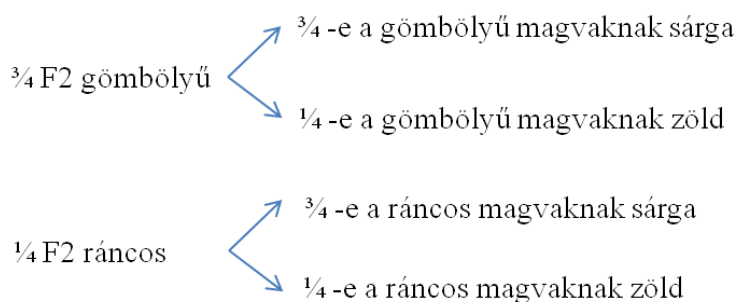
Ezek a szülők $R \cdot y$, illetve $r \cdot Y$ gamétákat hoznak létre. A gaméták fúziójából létrejövő F1 nemzedék (az anyai szülőn termő magok) genotípusa egységesen $R/r \cdot Y/y$ (dihibrid), fenotípusuk pedig – a dominanciáknak megfelelően – gömbölyű-sárga. Ezután Mendel beltenyészte az F1 magokból nevelt egyedeket (F1 *inter se*, vagyis „egy-más között”), és megvizsgálta az F2 generációt is. Az F2 magok fenotípusa négyféle volt, a következő arányok szerint:

9/16	gömbölyű-sárga
3/16	gömbölyű-zöld
3/16	ráncos-sárga
1/16	ráncos-zöld



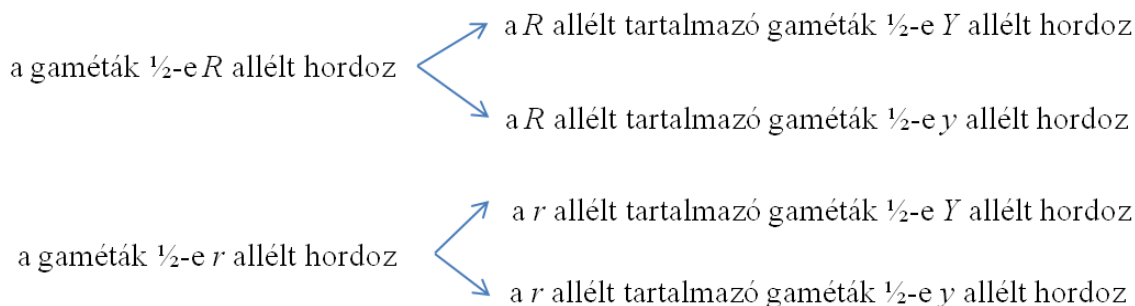
3.1. ábra: Két tulajdonságpár öröklődése Mendel kísérletében

Mendel sok más tulajdonságpárra is elvégezte a fenti keresztezési sémát, és a dihibrid F2 9:3:3:1 fenotípusos számarány általánosnak, törvényszerűnek bizonyult. Az eredmények értelmében ez a számarány egy további öröklődési mintázat, mely mögé Mendel egy máig helytálló elméletet dolgozott ki. Ha az F2 generációt újra átvizsgáljuk, csak az egyik, illetve a másik jellegre, akkor mindkét esetben látjuk a monohibrid F2 3:1 fenotípusos számarányt. Mendel ezt zseniálisan felismerte, és megállapította, hogy a 9:3:3:1 számarány két 3:1 számarány random kombinációja. Ágdiagrammal egyszerűen szemléltethetjük ezt a két random kombinálódó 3:1 számarányt:



Ez megfelel egy alapvető statisztikai törvényszerűségnek: két független esemény együttes bekövetkezésének valószínűsége egyenlő a külön-külön vett bekövetkezési valószínűségük szorzatával. Így kapjuk meg a $9/16 : 3/16 : 3/16 : 1/16$ arányt. Más-képp fogalmazva: ha két esemény együttes bekövetkeztének valószínűsége megegyezik a külön-külön vett bekövetkezési valószínűségek szorzatával, akkor a két esemény egymástól független. Ez a gondolatmenet vezette Mendelt az öröklődés második alaptörvényének megfogalmazásához: **a különböző génpárok tagjai a gamétaképződés során egymástól függetlenül válnak szét (szegregálnak)**. Mai tudásunk szerint pontosítva a törvényt: **a különböző kromoszómapárokon** (vagy ugyanazon kromoszómán egymástól távol, lásd erről a [4.](#) kapcsoltság témakörében írtakat) **elhelyezkedő gének a meiózis során egymástól függetlenül szegregálnak**.

A $9:3:3:1$ arány a gaméták szintjén is levezethető. Ezt is szemléltethetjük ágdiagrammal:

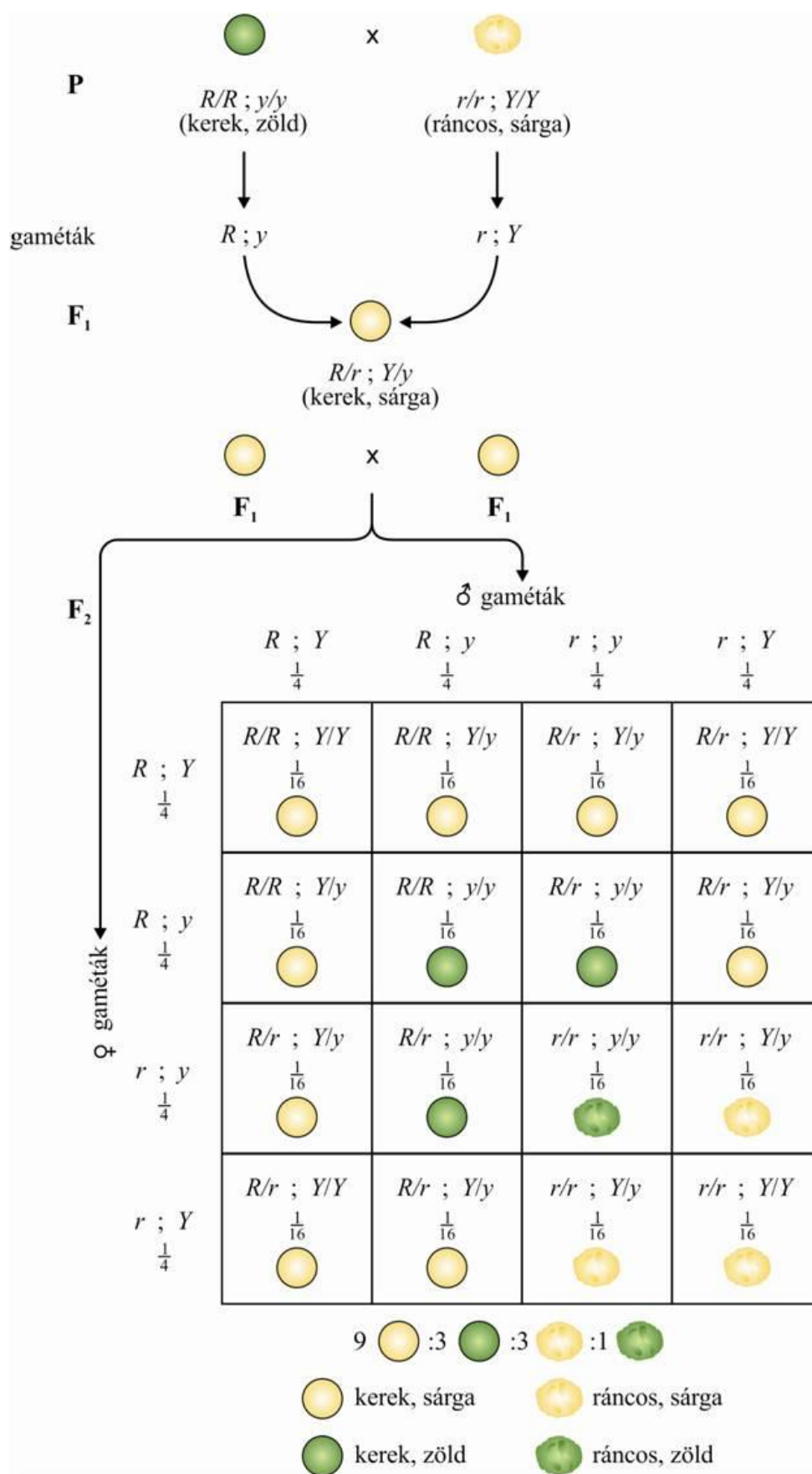


A két génpár tekintetében tehát egy dihibrid egyedben négyféle gaméta keletkezik egyenlő arányban, ha a két gén szegregálása egymástól független:

- $\frac{1}{4} R;Y$
- $\frac{1}{4} R;y$
- $\frac{1}{4} r;Y$
- $\frac{1}{4} r;y$

Vegyük észre, hogy itt egyszerre alkalmaztuk Mendel első és második törvényét (I. – egy génpár tagjai szegregálnak a meiózis során, a gaméták egyik fele a génpár egyik tagját, másik fele a génpár másik tagját kapja; II. – két génpár tagjai egymástól függetlenül szegregálnak az ivarsejtképződés során).

A négyféle genotípus a női és a hímivarú gamétákra egyaránt jellemző. A gaméták random párosodásából – elegendően nagyszámú F2 utód esetén – kirajzolódik a dihibrid keresztezésekre jellemző $9:3:3:1$ fenotípusos arány. Punnett táblázatban ábrázolva áttekinthető formában tüntethetők fel a négyféle genotípusú hím és női gaméták random fúziójából keletkező utód genotípusok, valamint az egyes genotípusoknak megfelelő fenotípusok (3.2. ábra).



3.2. ábra: Egy dihibrid öröklésmenet szemléltetése Punnett táblázattal

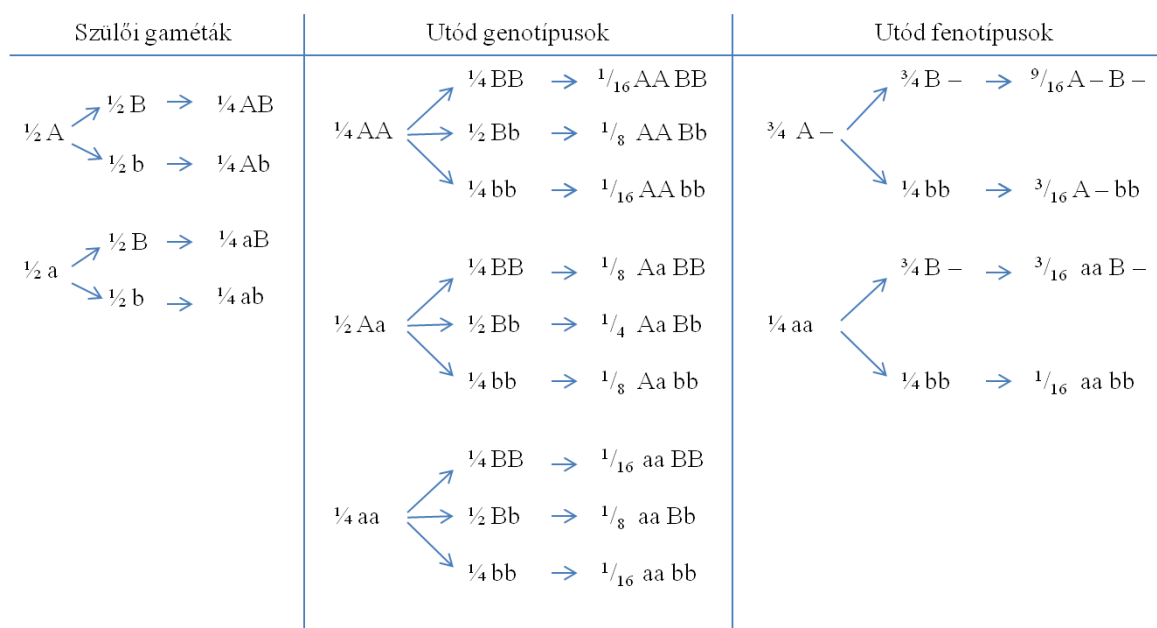
© Deák Veronika

3.2. A független öröklődés törvényének alkalmazásai

3.2.1. A független öröklődés törvényének alkalmazásai: geno- és fenotípusok keletkezésének becslése keresztezésekben

A klasszikus genetikai analízis kétféle irányban is lehetséges: 1) egy utódnemzedék fenotípusos arányaiból következtetünk a szülők genotípusára (és az öröklődés módjára), 2) ismert genotípusú szülők keresztezéséből származó utódok geno- és fenotípus arányait előre meg tudjuk becsülni. Ez utóbbira nézve kétféle módszer alkalmazását már megismertük: a Punnett tábla és az ágdiagram (vagy villás elágazás) módszerét. Egy vagy két gén vizsgálata esetén a Punnett tábla jól alkalmazható, de a szerkesztése jóval időigényesebb a villás elágazás módszernél akkor, ha kettőnél több gén öröklődési mintázatát szeretnénk felírni. Gondoljunk bele, hogy dihibrid szülők keresztezésekor a gaméták típusainak száma 4 (azaz 2^2), tehát a Punnett tábla 16 (azaz 4×4) cellát tartalmaz. Trihibrid keresztezésnél a gaméta féleségek száma szülőnként 8 (azaz 2^3), a Punnett tábla celláinak száma pedig 64 (azaz 8×8). A villás elágazás módszerével egyszerűbben és gyorsabban írhatjuk fel, állapíthatjuk meg a gaméták, illetve az utódok várható geno- és fenotípus arányait. Egy dihibrid keresztezéssel szemlélítve (3.4. ábra):

$$A/a ; B/b \times A/a ; B/b$$



3.4. ábra: A villás elágazás módszerének alkalmazása utódok geno- és fenotípusának becslésére

Minden gén esetében háromféle genotípus keletkezik, tehát a lehetséges genotípusok száma dihibrid keresztezésekben 3^2 , trihibrid keresztezésekben 3^3 és így tovább. A lehetséges fenotípusok száma pedig – mivel egy gén esetén kétféle lehet –, 2^2 dihibrid, 2^3 trihibrid stb. keresztezésekben.

Ha egy keresztezésben több gént tekintünk egyszerre, és ezek egymástól függetlenül öröklődnek, akkor egy bizonyos genotípussal rendelkező utód keletkezési valószínűségét a teljes utódpopulációban egyszerű statisztikai számítással becsülhetjük. Ekkor a független eseményeket külön-külön tekintjük, és a szorzási szabályt alkalmazzuk.

Például a

$$A/a; b/b; C/c; D/d; E/e \times A/a; B/b; C/c; d/d; E/e$$

keresztelés utódai között $a/a; b/b; c/c; d/d; e/e$ genotípusú utód

$$\frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{256} \text{ valószínűséggel keletkezik,}$$

$$\text{mert } P(A/a \times A/a \rightarrow a/a) = \frac{1}{4}; P(b/b \times B/b \rightarrow b/b) = \frac{1}{2} \text{ stb.}$$

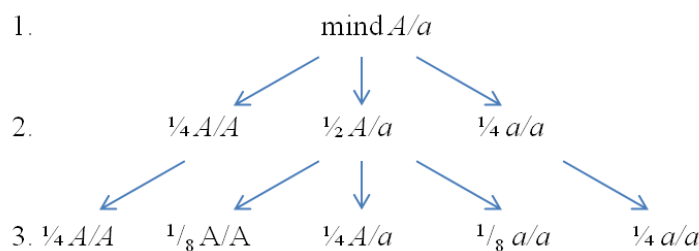
Ez a módszer a geno- és fenotípusok arányainak előrejelzésére egyaránt alkalmazható.

Vajon hány utódra van szükség ahhoz, hogy a kívánt geno- vagy fenotípusú egyed legalább egyszer előforduljon? A fenti példánál maradva, a négyszeresen homozigóta recesszív utód keletkezésének a valószínűsége $\frac{1}{256}$. Ez azonban nem jelenti azt, hogy 256 utód között biztosan lesz egy megfelelő genotípusú egyed. Gyakorlati szempontból a kérdést úgy célszerű feltenni, hogy mekkora elemszámú mintára van szükség ahhoz, hogy 95%-os biztonsággal megkapjunk legalább egy darab megfelelő genotípusú egyedet (a 95%-os konfidencia-érték általánosan alkalmazott a biológiai tudományterületeken). Először adjuk meg a nem megfelelő genotípusú egyedek keletkezésének valószínűségét, ami $1 - (\frac{1}{256}) = \frac{255}{256}$. Ezt a valószínűségi értéket kiterjesztve n darab-számú mintára azt kapjuk, hogy a „sikertelenség” valószínűsége: $(\frac{255}{256})^n$. Annak valószínűsége, hogy legalább egy „sikeres” minta (a megfelelő genotípusú) legyen n darab minta között: $1 - (\frac{255}{256})^n$. 95%-os konfidencia szintnél: $1 - (\frac{255}{256})^n = 0,95$. Az egyenlet megoldásával $n=765$ értéket kapunk, vagyis ekkora utódszámban célszerű gondolkodnunk ahhoz, hogy megkapjuk a négyszeresen homozigóta genotípusú egyedet.

3.2.2. A független öröklődés törvényének alkalmazásai: tiszta vonalak (pure lines) létrehozása

Egy génre nézve homozigóta egyed az adott gén tekintetében tiszta vonalú egyed. A tiszta vonalak az alap kutatásban és a gyakorlatban is kiemelkedően fontosak. A tiszta vonalú egyedek szaporításakor sok-sok generáción keresztül változatlanul fennmarad az adott genotípus (és a hozzá rendelhető fenotípus), tehát a tiszta vonalak konstans genetikai források. A legfontosabb genetikai modellszervezetekre létrehoztak olyan nemzetközi törzscentrumokat (stock center), melyekben fenntartják, és igény esetén a kutatók rendelkezésre bocsátják az összes már publikált változat bármelyikét. Hasonló törzscentrumok léteznek a mezőgazdaságban hasznosított növény- és állatfajtákra is.

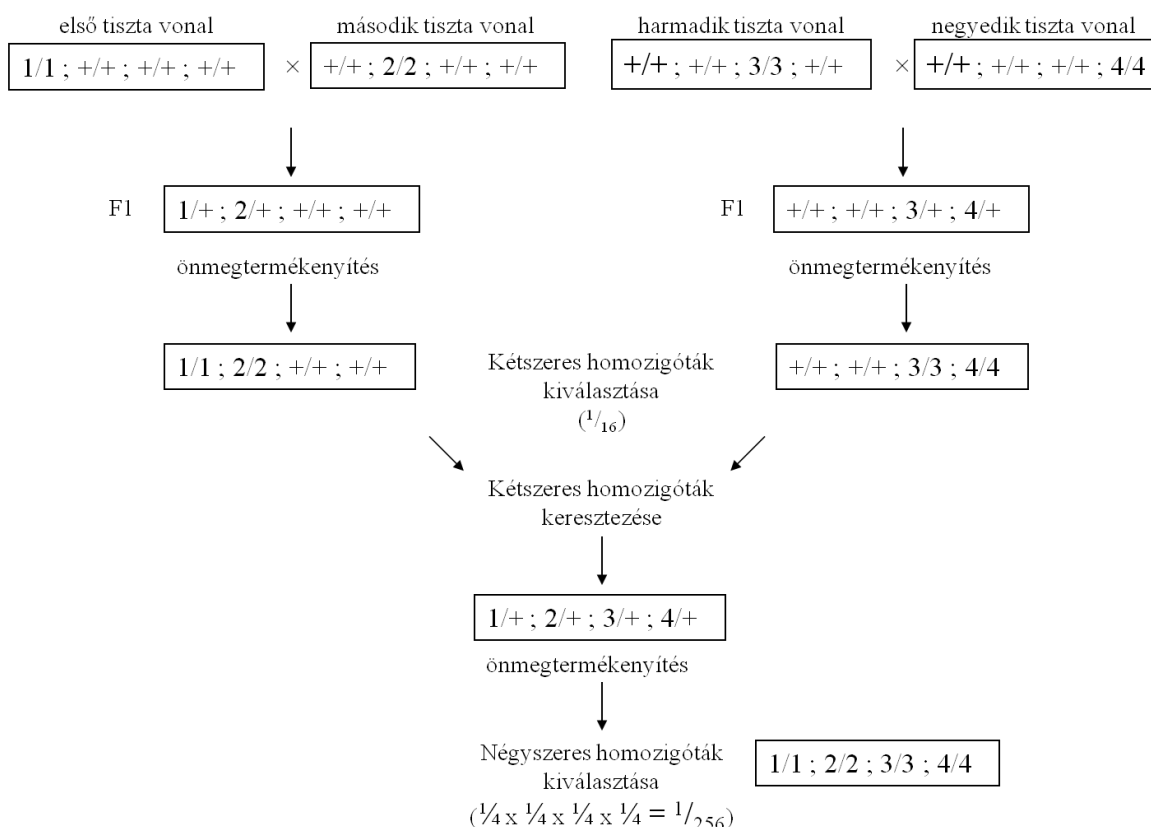
A tiszta vonalak több generáción keresztüli önmegtermékenyítéssel hozhatók létre (magasabbrendű állatok esetében önmegtermékenyítés nem jöhet szóba, ehelyett azonos genotípusú egyedek keresztezése történik). Egy egyszerű példát véve, azaz egy gént nézve A/a genotípusú egyed önmegtermékenyítésekor a következő generációban a heterozigóták aránya felére, az azt követő generációban negyedére csökken és így tovább. Nyolc generáció alatt a heterozigóták aránya $(\frac{1}{2})^8 = \frac{1}{256}$, vagyis kb. 0,4% lesz (3.5. ábra):



3.5. ábra: Beltenyésztés során a heterozigóták aránya generációról generációra csökken, a homozigóták aránya pedig nő

Ha 256 darab függetlenül öröklődő gén mindegyikére nézve heterozigóta egyedet önmegtermékenyítéssel nyolc generáción keresztül szaporítunk, akkor a nyolcadik generációban átlagosan mindössze egy gén marad heterozigóta formában ($1/256$) a 256 génből. A módszer tehát eredményesnek tekinthető tiszta vonalak létrehozásához.

Nézzünk egy olyan nemesítési sémát, melynek célja egy négyszeresen homozigóta növényvonal létrehozása. A négy gént mindenütt azonos sorrendben írjuk fel. + jel jelöli a vad allélt minden gén esetén, a mutáns allélokat pedig – melyeket homozigóta formában egyesíteni kívánunk – 1, 2, 3, 4 számokkal jelöljük. Itt négy olyan tiszta vonalból indulunk ki, melyek egy-egy gén különleges (előnyös) alléljait tartalmazzák, és a cél a négy előnyös tulajdonság egyesítése egy vonalban. Egy lehetséges nemesítési séma (3.6. ábra):



3.6. ábra: Egy négyszeresen homozigóta növényvonal nemesítési sémája

Az így létrehozott, több előnyös tulajdonságot hordozó tiszta vonalak (*superior pure lines*) kényelmesen fenntarthatók, szaporíthatók sok-sok generáción keresztül.

3.2.3. Hibrid vigor

A mezőgazdaságban a tiszta vonalak mellett igen elterjedten alkalmaznak hibrid egyedeket (3.7. ábra). A hibrideket két beltenyésztett vonal keresztezéséből hozzák létre. Az F1 hibrid generáció (lényegében sokszorososan heterozigóta) a szülői vonalakhoz képest lényegesen jobb paraméterekkel rendelkezik (nagyobb a mérete, a terméshozama, az életképessége). A többszörös heterozigótaság eme általános előnyeit nevezik hibrid vigoroknak. A hibrid vigor hátterében álló molekuláris okok nagyrészt tisztázatlanok. Egy lehetséges magyarázata a következő: A beltenyésztés során nő a homozigótaság (sok gén kerül homozigóta formába), és ez a populációban jelenlévő káros vagy hátrányos recesszív allélokra is érvényes lehet. Két függetlenül beltenyésztett vonalnál a véletlen játéka folytán nem ugyanazoknak a géneknek a káros recesszív alléljai kerülnek homozigóta formába, és keresztezésükkor a legtöbb gén heterozigóta állapotba jut, csökkentve ezáltal az így létrejött hibridben a recesszív előnytelen allélok fenotípusos kifejeződését. A hibrid vetőmag előállításának költsége magas, hiszen évről évre fenn kell tartani a szülői beltenyésztett vonalakat, és mindig újra elő kell állítani a szülői vonalak keresztezésével a hibrid vetőmagot (vagy állatok esetén a hibrid egyedeket). A gazdák szempontjából a hibridek további előnytelen sajátossága, hogy az F1-t követő generációkban mérséklődik, illetve kiegyenlítetlenné válik a hibrid vigor, hiszen az F1 hibrid meiózisa során sokféle allélkombináció jön létre, és az utódoknak csak egy kis hányada rendelkezik a hibridhez hasonló mértékű heterozigótasággal. Például egy tetrahibrid keresztezésben 81-féle (azaz 3^4) genotípusú utód keletkezik, és e négy gén független öröklődése esetén az F1-gyel megegyező tetrahibrid ($A/a; B/b; C/c; D/d$) utódok aránya mindössze $(\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$ (6%). A $A/-; B/-; C/-; D/-$ genotípus pedig $(\frac{3}{4})^4 = \frac{81}{256}$, azaz kb. 30%-ban várható.



3.7. ábra: Hibrid kukorica (középen) a két beltenyésztett szülői vonallal (két szélén)

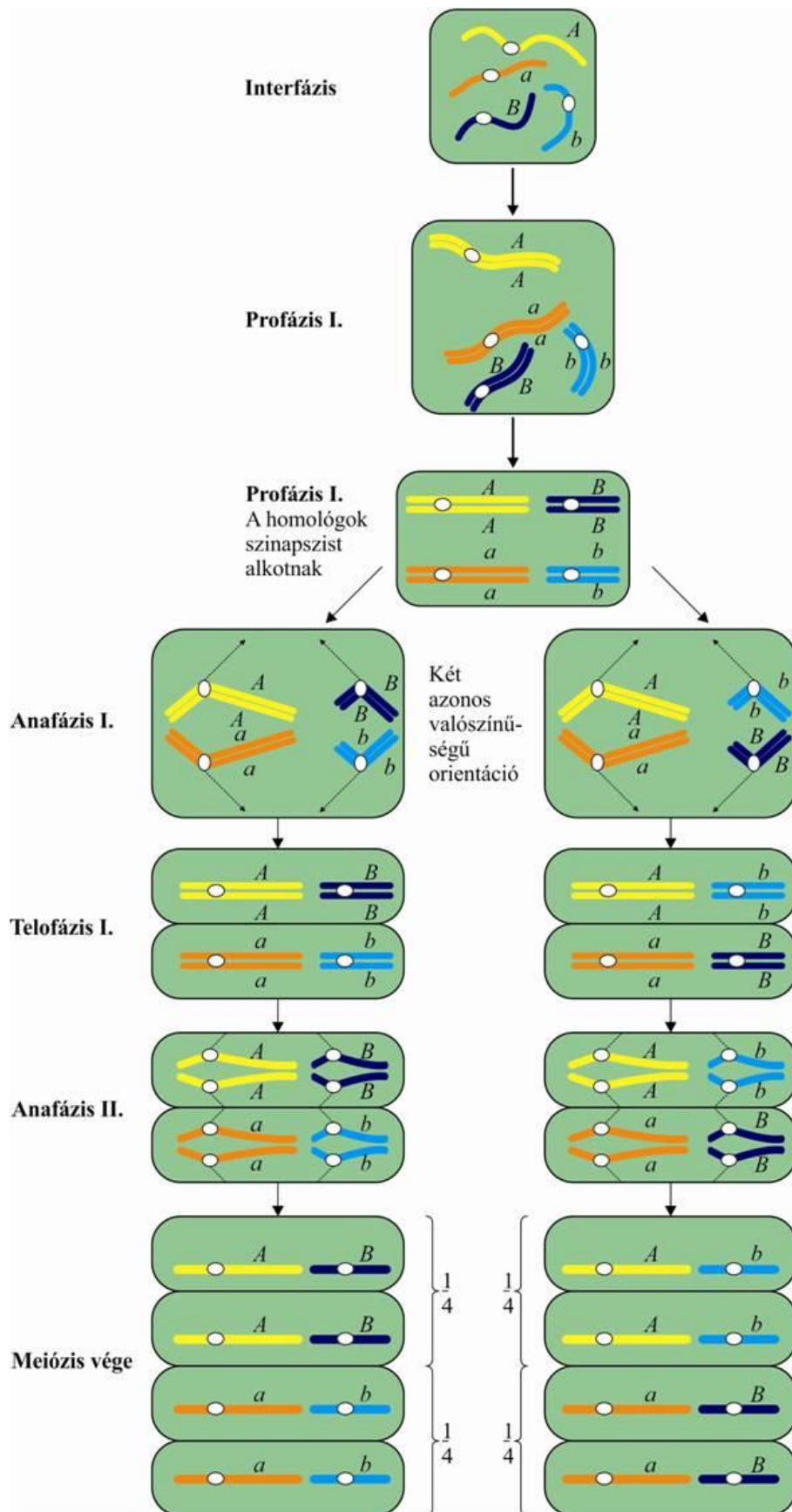
3.3. A független öröklődés kromoszómális háttere

Akárcsak Mendel első törvénye (az allélpárok egyenlő szegregációja), a különböző kromoszómákon lévő gének független hasadása is (Mendel második törvénye) a kromoszómák meióziszbeli viselkedésével magyarázható. Jelöljük a több kromoszómát tartalmazó diploid sejt kromoszómáit 1 (melynek egyik homológ tagja 1', másik homológ tagja 1''), 2 (2' és 2'' homológ pár) stb. számokkal! Miután a meiózis során a homológok párba állnak, és az egyenlítői síkba rendeződnek, a homológ párok egyik tagja (1') mehet a sejt egyik pólusa felé (mondjuk úgy, hogy „északra”), a másik tagja (1'') pedig a sejt másik pólusa felé („délre”), vagy fordítva. Ugyanez érvényes minden homológ kromoszómapárra. Az 1' taggal kerülhet ugyanabba az utódsejtbe a 2' vagy a 2'' tag is, és így tovább, ez a független vándorlás a többi kromoszómapárra is igaz.

Mikroszkóposan a kromoszómák egymástól független szétválása, szétosztása csak kivételes esetben detektálható, mivel a homológ párok nem különböztethetők meg egymástól ezen a vizsgálati szinten. Az első citológiai bizonyítékot Elinor **Carothers** szolgáltatta 1913-ban. Ő egy bizonyos szöcskefaj hímjeinek hereszövetében tanulmányozta a meiózist. Carothers ezekben az egyedekben különleges kromoszómákra figyelt fel: egy pár nélküli, illetve egy heteromorf (más kinézetű) homológ párra. Nagyszámú meiózist végignézve Carothers azt tapasztalta, hogy a pár nélküli kromoszóma ugyanolyan gyakorisággal került egy utódsejtbe a heteromorf pár egyik tagjával, mint a másikkal.

Általánosságban elmondható, hogy ha az első kromoszómapár helyzetét (vándorlási irányát) rögzítettnek tekintjük, akkor a második kromoszóma tagjai 50–50% eséllyel kerülnek az első kromoszóma adott tagjával ugyanabba az utódsejtbe, azaz a nem homológ kromoszómák egymástól függetlenül „szortírozódnak”, az egyes homológ párok szétválása nem befolyásolja más homológ párok szétválását.

A 3.8. ábra szemlélteti, hogy két kromoszómapár egymástól független meióziszbeli viselkedése miként vezet egy dihibrid sejt ($A/a; B/b$) meiózisa során 1:1:1:1 genotípus arányú meiótikus termék keletkezéséhez. Az egyik homológ kromoszómapár tagjain feltüntettük a $A-a$ (az „ A ” lókuszon), a másik homológ pár tagjain pedig a $B-b$ (a „ B ” lókuszon) allélokat. A példában szereplő sejt tehát $2n=4$ kromoszómát, azaz két homológ párt tartalmaz. A meiózis során a négyféle allélkombinációjú ($A;B$, $a;b$, $A;b$ és $a;B$) haploid termék egyenlő arányban keletkezik. Ezt írtuk fel a mendeli dihibrid keresztezések szemléltetésekor a Punnett táblában egyik, illetve másik szülő esetén is, és e négyféle allélkombinációjú gaméta random fúziójából kaptuk a 9:3:3:1 fenotípusos számarányt.



3.8. ábra: Két gén független öröklődésének magyarázata a kromoszómák szintjén

3.4. Autoszómális és nemi kromoszómához kötött gének független hasadása

A független hasadás a nemi kromoszómákra is érvényes: az autoszómák és a szexkromoszómák egymástól függetlenül viselkednek a meiózis során. A nemi kromoszómák is párba állnak (például X és Y), majd külön utódsejtbe kerülnek. Nézzük, milyen dihibrid arányt kapunk, ha egy X-hez kötött és egy autoszómális gén öröklődését követjük nyomon egyszerre! A példában csökevényes szárnyú (autoszómális recesszív allél okozza, az allél jele: *vg*, *vestigial* = csökevényes) /és vad szemszínű/ *Drosophila* nőtényt keresztezünk fehér szemű (X-hez kötött recesszív allél, jele: *w*, *white* = fehér) /és vad szárnyú/ hímmel. A keresztezés genetikai szimbólumokkal felírva:

$$vg/vg ; +/+ \quad \text{♀} \quad \times \quad +/+ ; w/Y \quad \text{♂}$$

Tanulmányozzuk és értelmezzük a genetikai jelöléseket a fenti keresztezésben!

- A keresztezést szimmetrikusan írjuk fel: minden szóban forgó gén allélpárjait felírunk mindkét szülőnél, azonos sorrendben.
- A vad allélokat „+” jel jelzi. Az egyszerűség kedvéért a nőtény szülőnél a w^+/w^+ allélpárt $+/+$ -ként, a hím szülőnél pedig a vg^+/vg^+ allélpárt $+/+$ -ként írtuk fel, de mivel a gének felírásának sorrendje a két szülőnél szabály szerint megegyező, pontosan tudjuk, hogy az egyes + jelek mely gén vad alléljának felelnek meg.
- Mivel a hímekben az X-hez kötött géneknek csak egy példánya van jelen, a *w* allél mellé az X kromoszóma párját, vagyis az Y-t írtuk fel.

A fenti keresztezést részletesebben az alábbi módon is felírhatjuk:

$$vg/vg ; X^{w+}/X^{w+} \quad \text{♀} \quad \times \quad vg^+/vg^+ ; X^w/Y \quad \text{♂}$$

Itt kiírtunk minden allélt, valamint az X és Y ivari kromoszómákat is, felső indexben az általuk hordozott allélokkal.

Nézzük tovább, milyen geno- és fenotípusú utódokat kapunk az F1 és F2 generációkban! A két Mendel törvény ismeretében az utódok genotípusának felírása roppant egyszerű:

F1 ♀	$vg/vg^+ ; X^{w+}/X^w$	minden nőtény vad szárnyú, vad szemű
♂	$vg/vg^+ ; X^{w+}/Y$	minden hím vad szárnyú, vad szemű

Az F1 *inter se* keresztezés (egyszerűsített jelölésekkel):

$$vg/+ ; +/w \quad \text{♀} \quad \times \quad vg/+ ; +/Y \quad \text{♂}$$

Az F2 generációban:

- Az autoszómális *vestigial* génre nézve ez egy monohibrid keresztezés. Nemtől függetlenül:

$\frac{3}{4}$	$+/-$	($vg^+/-$ valami, bármi”: a kötőjel azt jelenti, hogy vg^+ vagy vg is lehet a helyén), szárny fenotípus: vad
$\frac{1}{4}$	vg/vg	szárny fenotípus: csökevényes

- Az X-hez kötött *white* gén esetén:

♀ $\frac{1}{2}$ $+/+$ és $\frac{1}{2}$ $+/w$ szemszín fenotípus: mind vad
Magyarázat: a nőtény utódok két X kromoszómát kapnak, egyik X-et az apjuktól, mely ebben az F1 *inter se* keresztezésben w^+ allélt tartalmaz; az anyától pedig 50-50 %-ban öröklök a w^+ illetve a w allélt hordozó X kromoszómát).

♂ $\frac{1}{2}$ $+/Y$ (vad szemszín) és $\frac{1}{2}$ w/Y (fehér szemszín)
Magyarázat: a hímek csak az anyjuktól kapnak X kromoszómát, vagy a w^+ vagy a w allélt tartalmazót.

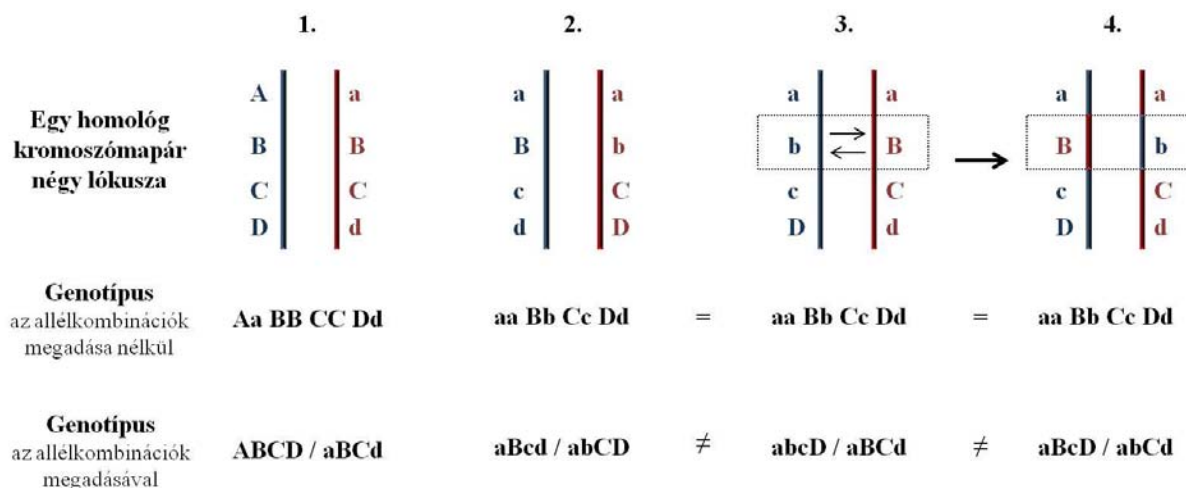
A két gént kombinálva és a szorzási szabályt alkalmazva az F2 generációban a nemeknek megfelelő fenotípusos megoszlás:

F2 nőtények: $\frac{3}{4}$ vad típus (mindkét jellegre)
 $\frac{1}{4}$ csökevényes szárnyú (és vad szemű)

F2 hímek: $\frac{3}{8}$ vad típus ($\frac{3}{4} \times \frac{1}{2}$)
 $\frac{3}{8}$ fehér szemű (és vad szárnyú) ($\frac{3}{4} \times \frac{1}{2}$)
 $\frac{1}{8}$ csökevényes szárnyú (és vad szemű) ($\frac{1}{4} \times \frac{1}{2}$)
 $\frac{1}{8}$ csökevényes szárnyú és fehér szemű ($\frac{1}{4} \times \frac{1}{2}$)

4. Kapcsoltság. Homológ rekombináció. Kapcsoltsági térképek

Az 1900-as évek elején eukarióta szervezetek széles spektrumán tesztelték és találták általánosan érvényesnek Mendel két – az egyenlő szegregáció és a független hasadás – törvényét. A független öröklődés azonban sok génpár tekintetében nem érvényesül. Erre a felismerésre jutott több kutató is az 1900-as évek elején a legkülönbébb rendszerekben (élőlényekben). A nem függetlenül öröklődő génpárokra azt mondjuk, hogy kapcsoltnak öröklődnek. A kapcsoltság fizikai oka az, hogy ezen gének lókuszai azonos kromoszómán, egymáshoz közel helyezkednek el, ezért a kromoszómák szegregálása során a két gén együtt mozog. A független kombinálódás a kapcsolt gének alléljaira tehát nem érvényesül: egy dihibrid gamétáiban nem 1:1:1:1 arányban jelennek meg az allélkombinációk. Adódik a kérdés, hogy hogyan módosul ez az arány? A fentiek alapján talán azt gondolhatjuk, hogy ha két gén egy-egy allélja egy kromoszómán, kapcsoltnak helyezkedik el, akkor azok mindig is így maradnak, sok-sok sejtosztódás során, generációról generációra együtt mozognak. Ez azonban nem így van. A homológ kromoszómák ugyanis a meiotikus osztódás során darabokat cserélhetnek ki egymással. Ennek következménye az, hogy az egyes kromoszómák allélösszetétele változik. Emlékezzünk vissza, hogy a homológ kromoszómák megegyező morfológiájúak, ugyanazokat a lókuszokat (géneket) tartalmazzák, ugyanolyan elrendeződésben. Különbség köztük az egyes lókuszokon lévő allélekben lehet: a homológ pár egyik tagján egy gén egyik változata (allélja), másikon másik allélja helyezkedhet el. Ha egy kiterjedtebb kromoszómaszakaszt nézünk több lókusszal, akkor a homológ párok az egyes lókuszokon bármilyen kombinációban tartalmazhatják az alléleket (4.1. ábra). Figyeljük meg, hogy a 4.1. ábrán szemléltetett 2., 3., 4., esetben a diploid genotípusa a négy génre nézve megegyezik ($aa Bb Cc Dd$), ha azonban a homológ kromoszómák allélkombinációit nézzük, az mindhárom esetben eltérő (Korábban már megismertedtünk a perjel szerepével, melyet a homológ kromoszómák tagjainak elválasztására használunk, egyik oldalán az egyik, másik oldalán a másik homológ tag alléljait soroljuk fel.) Az ábra 3. és 4. része szemlélteti a homológ párok közötti adott szakasz (itt a B lókuszt tartalmazó régió) kicserélődésének következményét az allélösszetétel megváltozására.



4.1. ábra: Négy példa allélpárok elrendeződésére egy homológ kromoszómapáron (kék az egyik, piros a másik homológ; A, B, C és D négy lókuszt)

4.1. Kapcsoltság és intrakromoszómális rekombináció kimutatása genetikai eszközökkel

A kapcsolt öröklődésre vonatkozó első megfigyeléseket William **Bateson** és Reginald Crundall **Punnett** tette (1911) szagos bükköny növényben. A virág színét és a pollen alakját befolyásoló gének öröklődésében nem a várt 9:3:3:1 arányt tapasztalták.

P	$PP LL$ lila virág, hosszúkás pollen	×	$pp ll$ piros virág, kerek pollen
F1	$Pp Ll$ lila virág, hosszúkás pollen		
F2	$P- L-$ lila virág, hosszúkás pollen $pp L-$ piros virág, hosszúkás pollen $P- ll$ lila virág, kerek pollen $pp ll$ piros virág, kerek pollen	várt (9:3:3:1) 215 < 284 71 > 21 71 > 21 24 < 55	tapasztalt (381 utód) 284 21 21 55

Két kategória a vártnál nagyobb, kettő pedig a vártnál kisebb arányban jelent meg. Azt feltételezték, hogy a domináns génváltozat „kötődik” (*coupling*) a dominánshoz, a recesszív pedig a recesszívhez.

Hogy ez nem egészen így van (nem mindig van így), és hogy miért nem, arra a híres *Drosophila*-iskola (*Columbia University, fly room* – légszoba) kutatói világítottak rá (a Kromoszómaelmélet igazolása témakörnél már találkoztunk Morgan és Bridges nevével). A kapcsolt öröklődés alapjainak feltárása és ennek kihasználása genetikai térképek készítésére Thomas Hunt **Morgan** és Alfred H. **Sturtevant** nevéhez kapcsolódik (4.2. ábra).



4.2. ábra: Thomas Hunt Morgan és Alfred H. Sturtevant a „légyszobá”-ban

Nézzünk meg két, Morgan által elvégzett, *Drosophila* keresztezést:
(a génekről: *pr* – purple – lila szem, *vg* – vestigial – csökevényes szárny, „+” jelenti a vad allélt)

Első keresztezés:

P	<i>prpr vgv</i> ♀ lila szem, csökkent szárny	×	<i>pr⁺pr⁺ vg⁺vg⁺</i> ♂ vad szem, vad szárny
F1	<i>prpr⁺ vgv⁺</i> ♀ (dihibrid) vad szem, vad szárny	×	<i>prpr vgv</i> ♂ (test cross) lila szem, csökkent szárny

Mivel Morgan a dihibrid nőtényt tesztelő keresztezésbe vitte, az F2 utódok fenotípusa tükrözi a dihibrid szülő által létrehozott gaméták allélösszetételét. A tesztelő keresztezés kulcsfontosságú volt.

F2 fenotípusok:	vad szem, vad szárny	<i>pr⁺ vg⁺</i>	1339 vártnál több
(1:1:1:1-t várnánk)	vad szem, csökkent szárny	<i>pr⁺ vg</i>	151 vártnál kevesebb
	lila szem, vad szárny	<i>pr vg⁺</i>	154 vártnál kevesebb
	lila szem, csökkent szárny	<i>pr vg</i>	1195 vártnál több
	összesen:		2839 utód

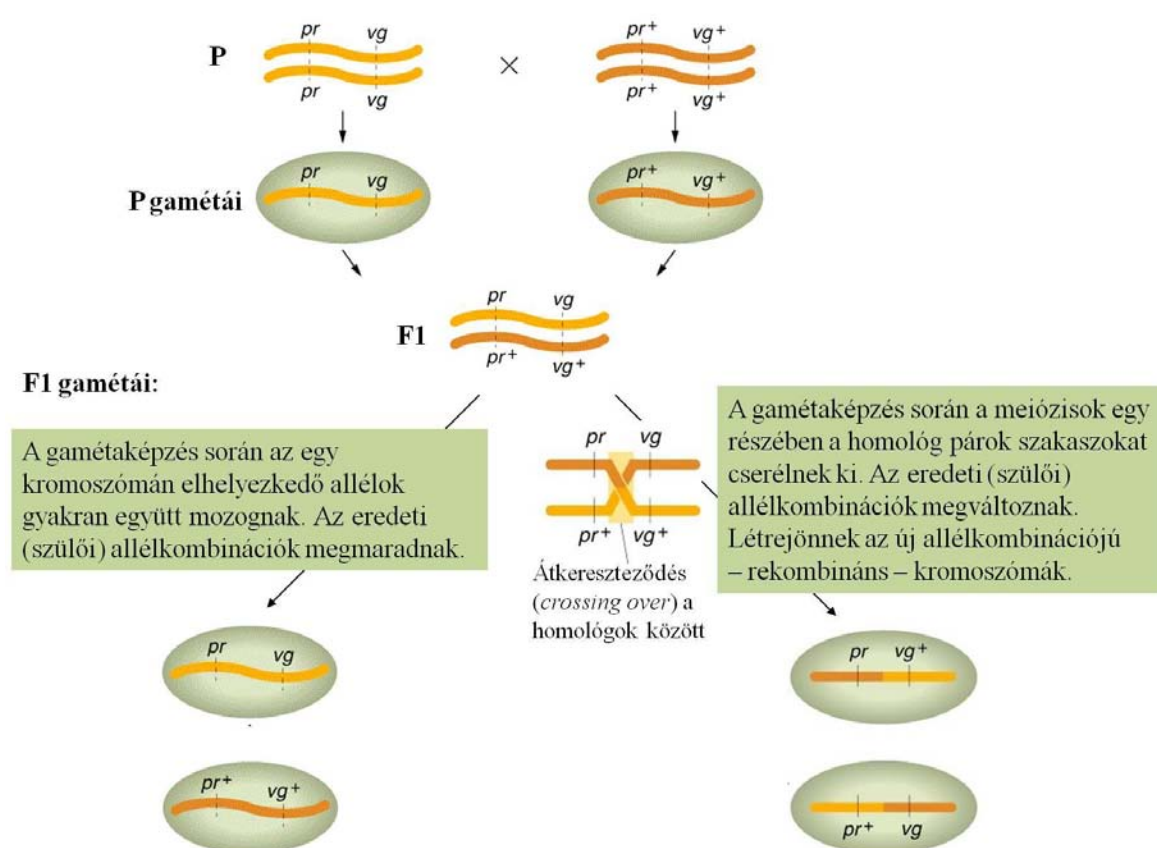
Második keresztezés (felcserélt P szülői allélkombinációk):

P	<i>pr⁺pr⁺ vgv</i> ♀ vad szem, csökkent szárny	×	<i>prpr vg⁺vg⁺</i> ♂ lila szem, vad szárny
F1	<i>prpr⁺ vgv⁺</i> ♀ (dihibrid) vad szem, vad szárny	×	<i>prpr vgv</i> ♂ (test cross) lila szem, csökkent szárny

F2 fenotípusok:	vad szem, vad szárny	<i>pr⁺ vg⁺</i>	157 vártnál kevesebb
(1:1:1:1-t várnánk)	vad szem, csökkent szárny	<i>pr⁺ vg</i>	965 vártnál több
	lila szem, vad szárny	<i>pr vg⁺</i>	1067 vártnál több
	lila szem, csökkent szárny	<i>pr vg</i>	146 vártnál kevesebb
	összesen:		2335 utód

A fenti keresztezések tanulsága szerint nem a domináns vonzza a dominánsat, és a recesszív a recesszívet, hanem mindig **az eredeti (szülői P) tulajdonságok kombinációja (azaz allélkombinációk) jelennek meg a vártnál nagyobb arányban az F2 generációban.**

Morgan felismerte, hogy a két tulajdonság génje azonos kromoszómán helyezkedhet el, ezért a kettős heterozigóta ivarsejtképzése során azok nem válnak el egymástól, és egy ivarsejtbe kerülnek. Ennek következményeként az eredeti allélkombináció a vártnál nagyobb gyakorisággal lesz jelen az ivarsejtekben (4.3. ábra). Látjuk azonban, hogy nem kizárólag a szülői allélkombinációk jutnak tovább a következő generációba. Hogyan jönnek létre az új kombinációk, vagyis a rekombinánsok? A meiózisosok egy részében a homológok szakaszokat cserélnek ki, melynek következményeként új allélkombinációjú kromoszómák keletkeznek. Ilyen rekombináns kromoszómákat tartalmaz a képződő ivarsejtek egy része (4.3. ábra).



4.3. ábra: A kapcsolt gének alléljai nagy gyakorisággal együtt öröklődnek. Új allélkombinációk a homológok közötti szakaszok kicserélődésével jöhetnek létre.

A rekombináció újra kombinálódást jelent: olyan kromoszómák, ivarsejtek kialakulását, melyek a meiotikus diploidot létrehozó haploid sejtektől eltérő allélkombinációt hordoznak. Rekombináció kétféle módon történhet:

- **Interkromoszómális** (kromoszómák közötti) rekombináció: a különböző kromoszómákon elhelyezkedő gének a kromoszómák független kombinálódásából adódóan rekombinálnak (lásd a Gének független öröklődése című 3. fejezetet).
- **Intrakromoszómális** (kromoszómán belüli) rekombináció: a homológ kromoszómák tagjain belüli allélkicserélődés vezet új allélkombinációk kialakulásához

(ebben a fejezetben ezzel foglalkozunk). Mivel a homológ kromoszómák régióinak újra kombinálódásáról van szó, a rekombinációnak ezt a formáját **homológ rekombinációnak** is nevezzük.

Két gén független öröklődése esetén a szülői és a rekombináns ivarsejtek 50–50%-ban keletkeznek (lásd a Gének független öröklődése című 3. fejezetet). Kapcsolt öröklődésnél a szülői allélkombinációt hordozó ivarsejtek aránya 50%-nál több, a rekombináns ivarsejtek aránya pedig 50%-nál kevesebb. A pontos arányt több tényező befolyásolja, melyek közül az egyik legfontosabb a lókuszok közötti távolság. Mint később látni fogjuk, egy adott élőlény két adott lókuszának viszonylatában statisztikai szempontból megfelelően nagyszámú ivarsejt (tesztelő keresztezésben F2 utód) átvizsgálásával a rekombináns:szülői típusok aránya közel állandó, reprodukálható. Ezt ismerte fel Sturtevant, és használta fel gének viszonylagos távolságának meghatározására (lásd később a Kapcsoltsági térképezés című 4.4. szakaszban).

4.2. Az intrakromoszómális rekombináció citológiai kimutatása

A homológ kromoszómák közötti szakaszok kicserélődésének első fizikai bizonyítékát Barbara **McClintock** és Harriet **Creighton** (1931) szolgáltatta kukorica növényben. Fenotípusos markerekkel genetikailag, az érintett kromoszóma citológiai vizsgálatával (mikroszkópos kromoszóma vizsgálat) pedig fizikailag mutatták ki a rekombináció tényét.

A két markergén:

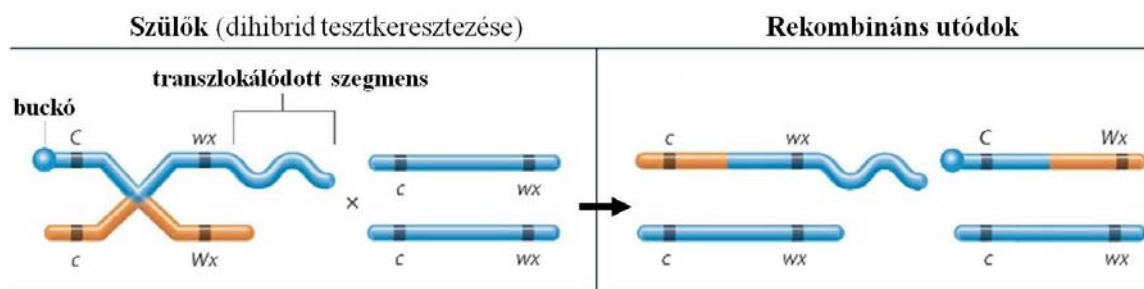
C– (*colour* gén) → sötét aleuron, sötét szem

cc → színtelen aleuron, sárga szem

Wx– (*waxy* gén) → normál keményítő a magban

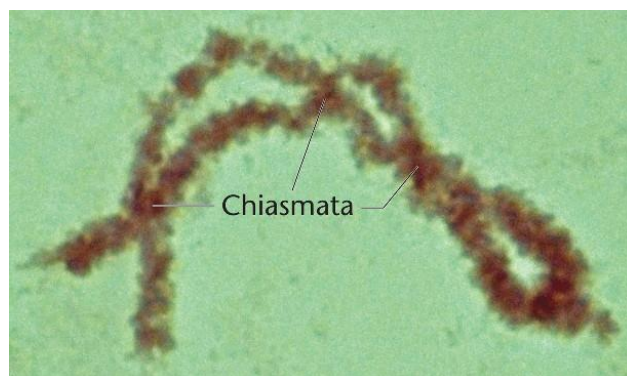
wx wx → abnormális keményítőszerkezet, viaszos megjelenésű mag

A két gén kapcsoltan öröklődik, lókuszaik egy kromoszómán helyezkednek el. Ennek a kromoszómának találtak egy olyan különleges formáját, mely citológiai kimutatható jegyeket hordozott: egyik végén egy buckószerű képletet (jelöljük: •), a másik végén pedig egy extra szakaszt (transzlokálódott szegmens, jelöljük: ~) tartalmazott. Előállítottak egy olyan vonalat, mely adott kromoszómájának egyike a különleges morfológiájú, másika pedig normál szerkezetű volt. A fenti két génre nézve a vonal dihibrid, méghozzá • *C wx* ~ / *c Wx* allélrendeződésben (4.4. ábra). Ezt a dihibrid vonalat tesztelő keresztezésbe vitték, majd az utódok között a rekombináns fenotípusúak kromoszóma citológiai is megvizsgálták. Kimutatták, hogy a rekombináció együtt jár a kromoszómaszakaszok fizikai kicserélődésével, ami minden bizonnyal töréssel és újraegyesüléssel valósul meg (4.4. ábra).



4.4. ábra: A homológok közötti szakaszcsere citológiai igazolása kukorica kromoszómán

A homológok közötti átkelesztződés mechanizmusára használjuk a crossing over kifejezést, az átkelesztződési helyet pedig kiazmának (chiasma, többes számban chiasmata, eredete: chi = x forma) nevezzük. Az átkelesztződés a meiózis I profázisában történik (lásd a Meiózistról szóló [2.3.2.](#) fejezetet). Emlékezzünk vissza, hogy ekkor minden kromoszóma kétkromatidás formában van jelen, tehát a két kétkromatidás homológ négy kromatidája simul össze. Citológiaiilag akkor láthatók legszebben a kiazmák, amikor a homológok már kezdenek szétválni (4.5. ábra). Ekkortájt történik a keresztszerkezetek feloldása is (lásd a továbbiakban). Átkelesztződés nemcsak a nemtestvér, hanem a testvér kromatidák között is létrejöhet, de ez utóbbi genetikailag nem érhető tetten, hiszen a testvérkromatidák egymás replikái, így ha történik is közöttük szakaszcsere, az az eredeti állapothoz képest nem okoz eltérést.



4.5. ábra: Kiazmák a homológok között

4.3. A homológ rekombináció mechanizmusa

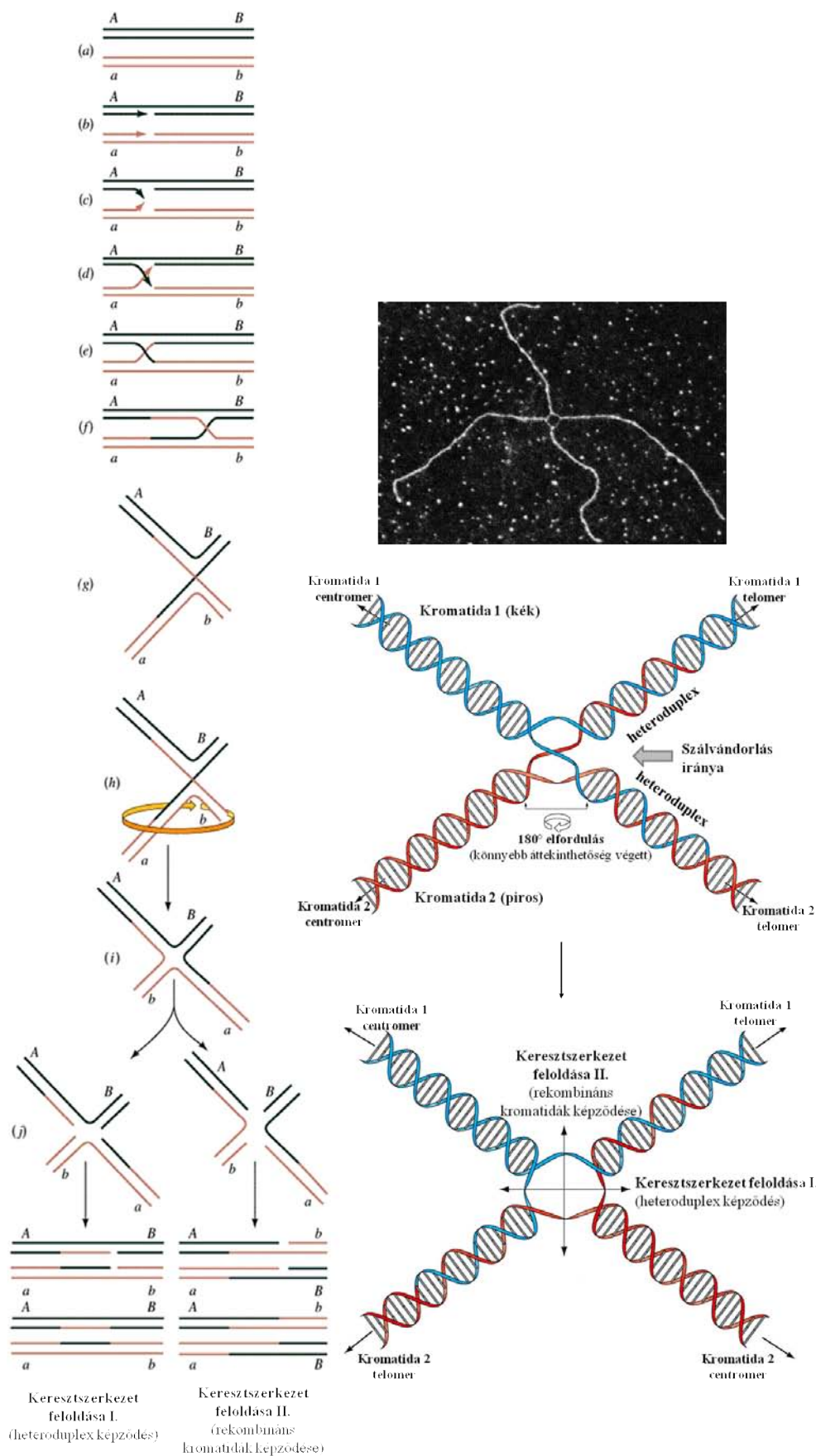
Ezidáig a homológ rekombinációt úgy emlegettük, mint a meiotikus osztódás fontos mechanizmusát, amely hozzájárul a homológ kromoszómák szakaszainak keveredéséhez. Ez a mechanizmus az ivaros szaporodó fajok genetikai változatosságának egyik forrása. Tudnunk kell azonban, hogy a homológ rekombináció mint mechanizmus nem csak ebben a vonatkozásban zajlik. Bármely olyan esetben, amikor homológ DNS-szakaszok között csere történik, homológ rekombinációról van szó. Ez egy konzervált (élővilágszerte hasonlóképpen zajló) molekuláris mechanizmus, mely homológ szakaszokat tartalmazó vírus, baktérium és eukarióta genomrészek között is lejátszódhat. Fontos szerepe van a prokarióta genomok „keveredésében”. A DNS-hibajavításban pro- és eukarióta sejtekben is nagy jelentőségű a homológ rekombináció.

Sok szervezetben sokan tanulmányozták a DNS-molekulák átkereszteződésével, majd a keresztszerkezet feloldásával járó folyamat molekuláris hátterét. Ma több modell is ismerünk, aminek oka az ismeretek folyamatos bővülése, a mechanizmus egyre több aspektusának megismerése. A legismertebb modellek megalkotói: Robin **Holliday** (1964), M. S. **Meselson** és C. M. **Radding** (1975), Jack W. **Szostak** (1983).

A homológ rekombináció a DNS-molekulaszakaszok igen precíz (bázis pontosságú) reciprok cseréje (4.6. ábra). A csere első lépése a két homológ DNS-molekula átkereszteződése, ami a szálak törésével és újraegyesülésével jár. Az átkereszteződést speciális rövid szekvenciárészek (ún. chi-szakaszok), illetve egyes vagy kettős szálú DNS-törések inicializálják. Az átkereszteződésben egy ponton két DNS kettős hélix vesz részt, tehát négy DNS-szál. (Meiotikus crossing overnél ez két kromatidának felel meg, de a négy kromatida közül páronként bármelyek átkereszteződhetnek különböző helyeken.) Az átkereszteződést gyakran a kereszteződési pont elcsúszása követi (ún. szálvándorlás), amiből az következik, hogy a kereszt alak megoldódásának helye a DNS-molekulák mentén nem feltétlenül esik egybe az átkereszteződési ponttal. A kereszt alak feloldása történhet úgy, hogy visszaáll az eredeti molekulaszervezet (leegyszerűsítve mondhatjuk így, mert valójában a kereszt vándorlás miatt egy rövid szakaszon megtörténik a szálcseré, és ún. heteroduplex szakasz keletkezik; a heteroduplex az eredeti átkereszteződési ponttól a kereszt alak feloldódási helyéig tart), vagy úgy, hogy a két DNS-molekula szakaszai kicserélődnek (ebben az esetben beszélhetünk klasszikus értelemben vett rekombinálódásról) (4.6. ábra). A folyamatban számos fehérje vesz részt, melyek nagy része közös a DNS-replikációban és a DNS-hibajavításban működő fehérjékkel (helikáz, DNS-polimeráz, SSB-fehérjék, ligáz, nukleázok stb.).

Rekombináció nem csak nagyobb kiterjedésű homológ DNS-szakaszok között jöhet létre. A fággenomok baktérium kromoszómába integrálódása például rövid, nem teljesen homológ szakaszok által valósul meg, ezt **helyspecifikus rekombináció**nak nevezik.

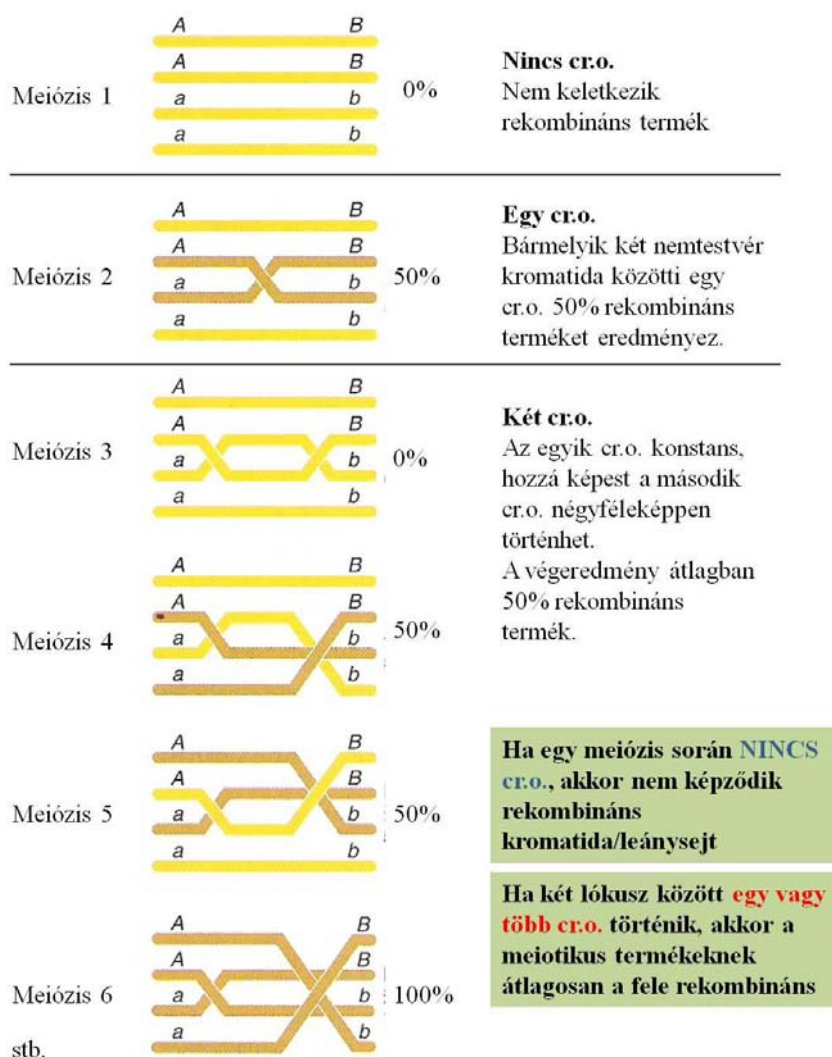
A homológ szakaszokat nem tartalmazó DNS-molekulák közötti kombinálódást **illegitim rekombináció**nak nevezik (így épülnek be például mozgó genetikai elemek és plazmidok a kromoszómák valamely részébe).



4.6. ábra: A homológ rekombináció Holliday-modellje

4.4. Kapcsoltsági térképezés (Linkage mapping)

Láttuk, hogy ha két gén kapcsoltan öröklődik, a meiózis során nem függetlenül kombinálódnak, hanem leggyakrabban együtt mozognak az őket hordozó kromoszómával. Új allélkombinációjú (rekombináns) kromoszómákat tartalmazó meiotikus termékek akkor jöhetnek létre, ha a meiózis során a két lókuszt között átkereszteződés és szakaszcsere történt. Ha egy meiózist tekintünk, melyben két lókuszt között rekombináció történt, akkor a meiózis termékeinek átlagosan a fele rekombináns. Ezt a 4.7. ábra szemlélteti.



4.7. ábra: Két lókuszt közötti crossing over átlagosan 50% rekombináns terméket eredményez

A fentiek tanúsága szerint két lókuszt között nemcsak egy, hanem kettő vagy több átkereszteződés is történhet, és ha ez egy meiózis során bekövetkezik, akkor a termékek fele rekombináns. Az átkereszteződésben bármelyik kromatida részt vehet, egy ponton páronként.

A lókusztok közötti távolságtól függ, hogy két lókuszt között a meiózisok hány százalékában történik rekombináció. Rekombináció a kromoszóma mentén bárhol létrejöhet, kis távolságon belül kisebb, nagyobb távolságon belül nagyobb valószínűséggel. Ha

két lókuszt olyan távol helyezkedik el egymáshoz képest a kromoszómán belül, hogy közöttük minden meiózisban történik legalább egy (de akár több) ponton rekombináció, akkor a rekombináns termékek 50%-ban keletkeznek, vagyis pontosan olyan arányban, mintha a két lókuszt külön kromoszómán helyezkedne el. Egy kromoszómán belüli távoli lókusztok között tehát kapcsoltág nem mutatható ki genetikai eszközökkel.

Kis géntávolságok esetén, melyeknél a kapcsoltág kimutatható (50%-nál kevesebb rekombináns termék), a keletkezett rekombináns termékek aránya a gének közötti viszonylagos távolság jó mérőszáma. Ezt ismerte fel Sturtevant, és használta ki elsőként muslicában gének egymáshoz viszonyított helyzetének meghatározására, azaz géntérképezésre. A módszer általánosan használható. Az 1900-as évek közepétől rengeteg laboratórium dolgozott és dolgozik a mai napig különféle szervezetek kapcsoltági térképén. A modern molekuláris biológiai eszközök lehetővé teszik, hogy ma már nemcsak **fenotípusos markereket** (olyan gének, melyek változatai fenotípusos eltéréshez vezetnek, ilyenekkel foglalkozunk folyamatosan ebben a fejezetben), hanem **molekuláris markereket** is térképezhetünk. Ezek olyan DNS-menti változatok, melyek nem feltétlenül érintenek génfunkciókat, ezért fenotípus alapján nem detektálhatók, de molekuláris biológiai eszközökkel igen, és a kromoszómatérképek mérföldköveiként használhatók.

Egy géntérképegység (map unit, rövidítve m.u.) az a génpárok közötti távolság, amikor 100 meiotikus termékből 1 rekombináns. Másképpen: 0,01 (vagy 1%) rekombinációs gyakoriság (recombinant frequency, RF) egyenlő 1 térképegységgel, melyet T. H. Morgan tiszteletére centimorgannak (cM) is neveznek. Az 1% rekombináns gyakoriságot úgy értelmezhetjük, hogy 50 meiózisból egyben történt egy rekombináció a két lókuszt között, 50 meiózisonak $4 \times 50 = 200$ terméke van, melyek közül 2 rekombináns (egy crossing over reciprok termékei). Meg kell jegyezni, hogy a m.u. nem egy precíz fizikai mértékegység, nem feleltethető meg egyértelműen egy meghatározott bázispárban kifejezett távolsággal. Az egyes biológiai rendszerekben a m.u.-ban és a bázispárban kifejezett távolságok különböznek, akár egy genomon belül is.

4.4.1. Kétpontos térképezés

A legegyszerűbb térképezés során egyszerre két lókuszt távolságát határozzuk meg, ezt az eljárást kétpontos térképezésnek nevezzük. A kétpontos térképezés sémája:

1. Tiszta vonalak keresztezése:

P $pr^+pr^+ vgvg$ ♀ $\times$ $prpr vg^+vg^+$ ♂
vad szem, csökött szárny lila szem, vad szárny

2. F1 tesztkeresztése (test cross):

F1 $prpr^+ vgvg^+$ ♀ (dihibrid) $\times$ $prpr vgvg$ ♂ (test cross)
vad szem, vad szárny lila szem, csökött szárny

3. F2 utódok számolása

F2 fenotípusok:	vad szem, vad szárny	$pr^+ vg^+$	157	vártnál kevesebb
(1:1:1:1-t várnánk)	vad szem, csökött szárny	$pr^+ vg$	965	vártnál több
	lila szem, vad szárny	$pr vg^+$	1067	vártnál több
	lila szem, csökött szárny	$pr vg$	146	vártnál kevesebb
	összesen:		2335 utód	

4. RF számolás: RF = rekombináns utód / összes utód

ebben a példában a rekombinánsok száma: $157 + 146 = 303$

$RF = 303 / 2335 = 0,129$ $0,129 \times 100 = 12,9 \% = 12,9 \text{ cM (vagy m.u.)}$

Ugyanez rajzban szemléltetve (4.8. ábra):

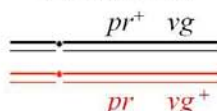
Tiszta vonalú szülők keresztezése:



Tiszta vonalú szülők gamétái:



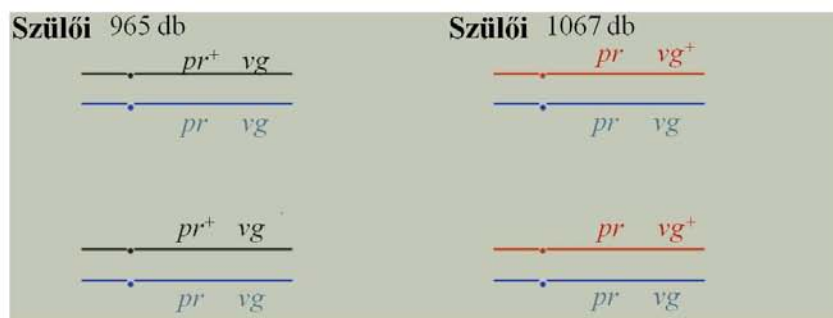
F1 dihibrid:



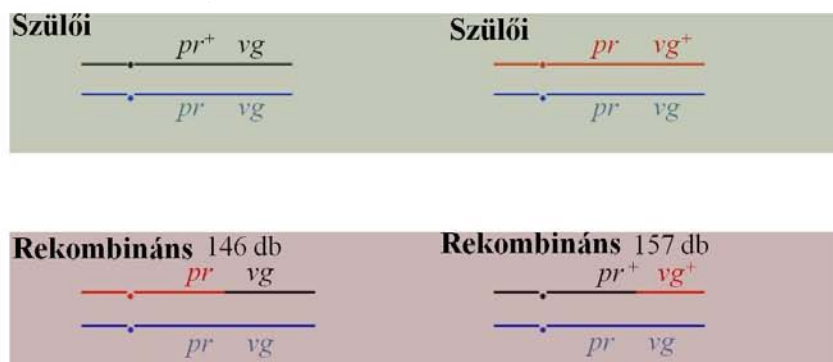
F1 dihibrid tesztkeresztése:



F2 utódok rekombináció nélkül – a szülői allélkombinációkat tartalmazzák:



F2 utódok, ha a dihibrid meiózisa során rekombináció történt a lókuszok között – fele szülői, fele rekombináns:



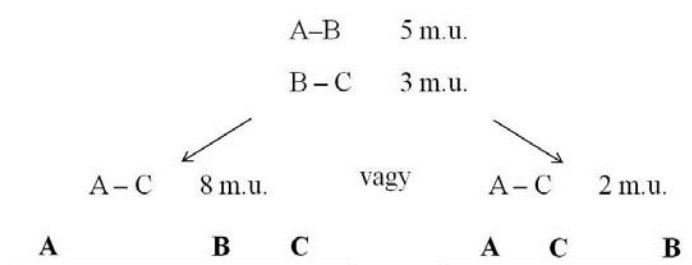
4.8. ábra: Kétpontos térképezés kísérleti sémája

Minél nagyobb utódszámmal dolgozunk (minél több meiózis végkimenetelét nézzük egyszerre), annál pontosabb távolságértéket kapunk. Egy kísérlet természetesen nem egy-egy, hanem több azonos genotípusú egyed populációjának keresztezésével történik.

A térképtávolsággal ténylegesen a lókuszok közötti crossing overek átlagos száma arányos. A gyakorlatban ezt nem közvetlenül mérjük, hanem a végkimenetel, a rekombináns utódok arányának megállapítása által. Távol lévő lókuszok esetén genetikai eszközökkel nem feltétlenül tudjuk detektálni az összes közöttük lezajlott crossing over-t. Például, ha ugyanazon két nem-testvér kromatida között két (vagy bármely páros számú) átkereszteződés történik, akkor a széli markerek (a két térképezett gén alléljai) a szülői kombinációban jelennek meg. Ez a szülői kategória arányát növeli meg a számításainkban, tévesen. Közeleli lókuszok esetén a többszörös crossing over keletkezésének esélye elhanyagolható, ezért kis távolságoknál a rekombináns F₂ utódok aránya hűen tükrözi a meiózisokban lezajlott crossing overek arányát. Nagy géntávolságoknál a kísérletesen meghatározott rekombináns frekvencia – a többszörös crossing overek torzító hatása miatt – a valós távolság alulbecsüléséhez vezet. A kísérletesen meghatározható géntávolság felső határa 50 m.u. (50%-os rekombináns frekvencia már a nem kapcsolt génekre jellemző). Minél közelebbi adatot kapunk a felső határhoz, annál nagyobb a pontatlanság. Léteznek matematikai számítások a mért térképtávolságok pontosítására. A kísérleti kivitelezés szempontjából két dolgot tehetünk annak érdekében, hogy minél precízebb géntérképet készíthessünk: 1) minél több markerrel, minél kisebb távolságokon térképezünk, 2) hárompontos térképezést végzünk.

4.4.2. Hárompontos térképezés

Egyszerre három markerrel végzett térképezési eljárás a hárompontos térképezés. A térképtávolságok additívak, ezért hárompontos térképezéskor a térképezett három lókusz egymáshoz viszonyított sorrendje is kiderül (a relatív távolságok mellett) (4.9. ábra).



4.9. ábra: Hárompontos térképezéssel egyszerre három gén egymáshoz viszonyított távolságát és sorrendjét lehet meghatározni

Az eljárás további előnye a kétpontos térképezéssel szemben, hogy több crossing overt „tehetünk láthatóvá” az utódokban. A két szélső lókusz közötti kettős crossing overre a közbülső marker rávilágíthat. Ez a két szélső lókusz távolságának pontosabb meghatározását teszi lehetővé. Hárompontos térképezésnél az a gén van középen, amelyik a legritkább rekombinációs osztályban a szülői genotípushoz képest eltérést mutat.

Nézzünk egy sémát a hárompontos térképezési kísérlet kivitelezésére!

Kukoricában térképezünk három gént: *L*, *G*, *S*

A gének nevének és jelölésének eredete:

ll (*lazy*) – lassú növekedés

gg (*glossy leaves*) – fényes levél

ss (*sugary endosperm*) – cukros endospermium

A hárompontos térképezés kivitelezése a kétpontos térképezéshez hasonlóan történik, a kiértékelésben van eltérés. A kísérlet kivitelezése:

1. Tiszta vonalak keresztezése:

P	<i>L G S / L G S</i> ♀	×	<i>l g s / l g s</i> ♂
	vad növény		lassú, fényes, cukros

2. F1 tesztkeresztése (test cross):

F1	<i>L G S / l g s</i> ♀ (trihibrid)	×	<i>l g s / l g s</i> ♂ (test cross)
	vad növény		lassú, fényes, cukros

3. F2 utódok számolása:

F2 fenotípusok	F2 genotípusok	Darabszám
vad	<i>L G S / l g s</i>	286 (szülői)
lassú	<i>l G S / l g s</i>	33
fényes	<i>L g S / l g s</i>	59
cukros	<i>L G s / l g s</i>	4
lassú, fényes	<i>l g S / l g s</i>	2
lassú, cukros	<i>l G s / l g s</i>	44
fényes, cukros	<i>L g s / l g s</i>	40
lassú, fényes, cukros	<i>l g s / l g s</i>	272 (szülői)
Összesen: 740		

4. Kiértékelés:

- A két leggyakoribb osztály a szülői: *LGS* és *lgs*. Az összes többi rekombináns kategória.
- A két legritkább osztály kettős crossing overre utal. Ezek a *LGs* és a *lgS*. Említettük már, hogy a ritka kettős rekombináns osztályban a szülőitől eltérő allél arra utal, hogy annak lókusza van középen, tehát a génsorrend gyaníthatóan: *L – S – G*. A két legritkább genotípus az *L–S* és az *S–G* között is lejátszódó kettős crossing overrel keletkezhetett. Ennek következménye, hogy a két szélső marker kombinációja a szülőivel egyezik, de a középső attól eltér: *L–s–G*, valamint a reciprok termék *l–S–g*. Ezt a génsorrendre vonatkozó feltételezést a kiszámított távolságoknak alá kell támasztaniuk.

Az RF értékeket génpáronként számoljuk.

L–S esetén (rekombinánsok a *Ls* és *lS* kategóriák):

$$RF = (33 + 4 + 2 + 40) / 740 \rightarrow 10,7 \text{ m.u.}$$

S–G esetén (rekombinánsok a *Sg* és *gS* kategóriák):

$$RF = (59 + 4 + 2 + 44) / 740 \rightarrow 14,8 \text{ m.u.}$$

L–G esetén (rekombinánsok a *Lg* és *lG* kategóriák):

$$RF = (33 + 59 + 44 + 40) / 740 \rightarrow 23,8 \text{ m.u.}$$

A géntávolságok alapján valószínűsíthető génsorrend (megegyezik azzal, amit a ritka rekombináns osztályok sugalltak:

$$\begin{array}{ccccc} 10,7 \text{ m.u.} & & 14,8 \text{ m.u.} & & \\ L & & S & & G \\ \hline & & 23,8 \text{ m.u. (?) & & \end{array}$$

A két szélső lókusztávolságát a fenti számításban alulbecsültük. Ennek oka, hogy nem vettük figyelembe a ritka rekombináns osztályokat, mivel ha csak az $L-G$ viszonyát nézzük, akkor az ebben a két ritka osztályban szülőinek mutatkozik. Valójában azonban történt crossing over az L és a G lókuszek között, mégpedig kettő is, amit a közbűlső marker (s) jelez. Így tehát akkor járunk el helyesen, ha $L-G$ esetén a ritka rekombináns osztályokat kétszeres szorzóval vesszük számításba. Ekkor

$L-G$ esetén

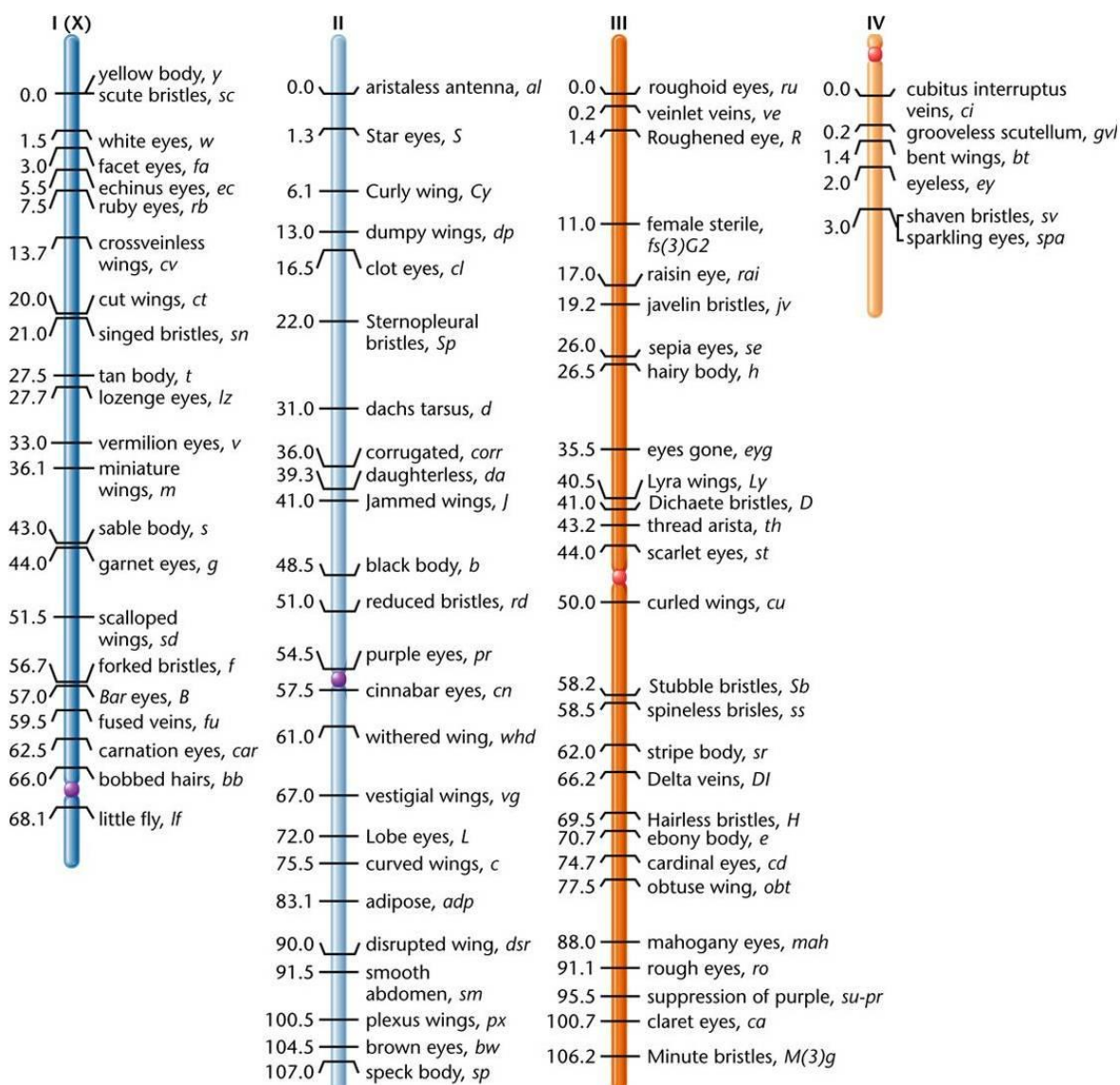
(rekombinánsok a Lg és lG kategóriák + a két ritka rekombináns osztály $2\times$):

$$RF = (33 + 59 + 44 + 40 + 2 \times 4 + 2 \times 2) / 740 \rightarrow 25 \text{ m.u.}$$

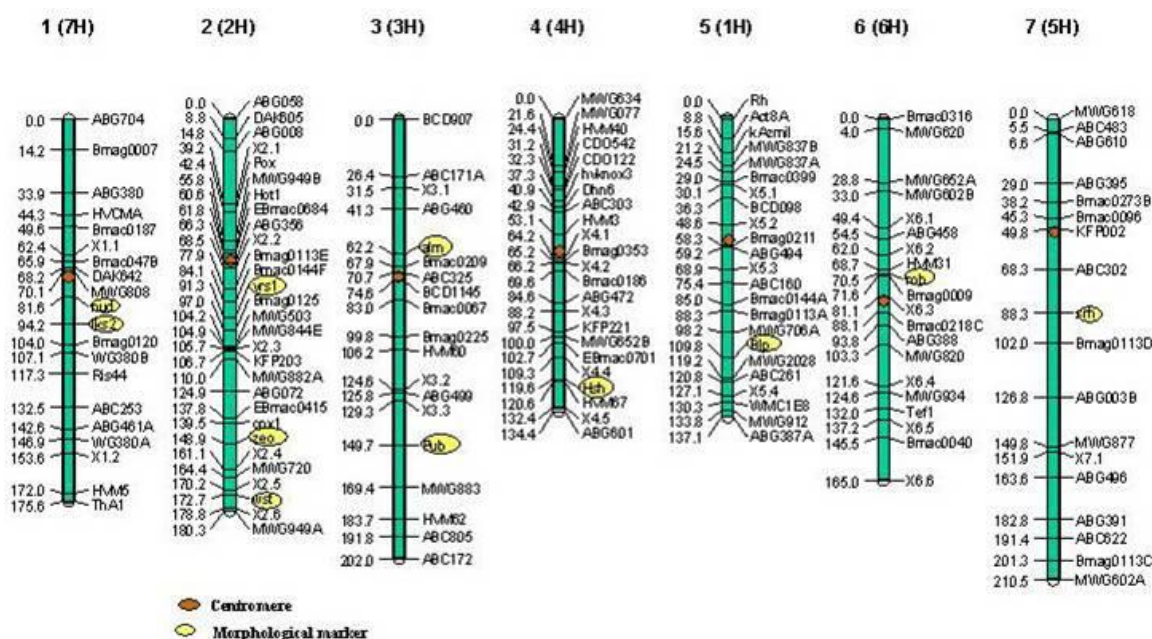
A 25 m.u. érték közel megegyezik a $10,7 + 14,8 = 25,5$ m.u. additív távolsággal.

4.4.3. A kapcsoltsági és a fizikai térképek összeegyeztetése

A kapcsoltsági térképek a kromoszómákat ábrázolják a térképezett lókuszekkel. A lókuszek közötti távolságokat m.u. (cM) egységekben adják meg. Egy kromoszóma rendszerint hosszabb 50 cM-nál. Bár a kísérletesen meghatározható térképtávolság maximum 50 cM lehet, a közeli lókuszek távolságának összeadásából kaphatunk nagyobb térképtávolságokat. A 4.10. ábra a muslica korai kapcsoltsági térképét mutatja be. Egy kromoszómát egy vonal reprezentál, I (X) jelöli az X ivari kromoszómát. Egy kromoszómát egy kapcsoltsági csoportnak is szoktak nevezni. (Megkereshetjük a térképen a már megismert, és később a későbbi fejezetek példáiban előforduló lókuszeket: *white*, *vestigial*, *purple*, *Bar*, *brown*, *cinnabar*.)

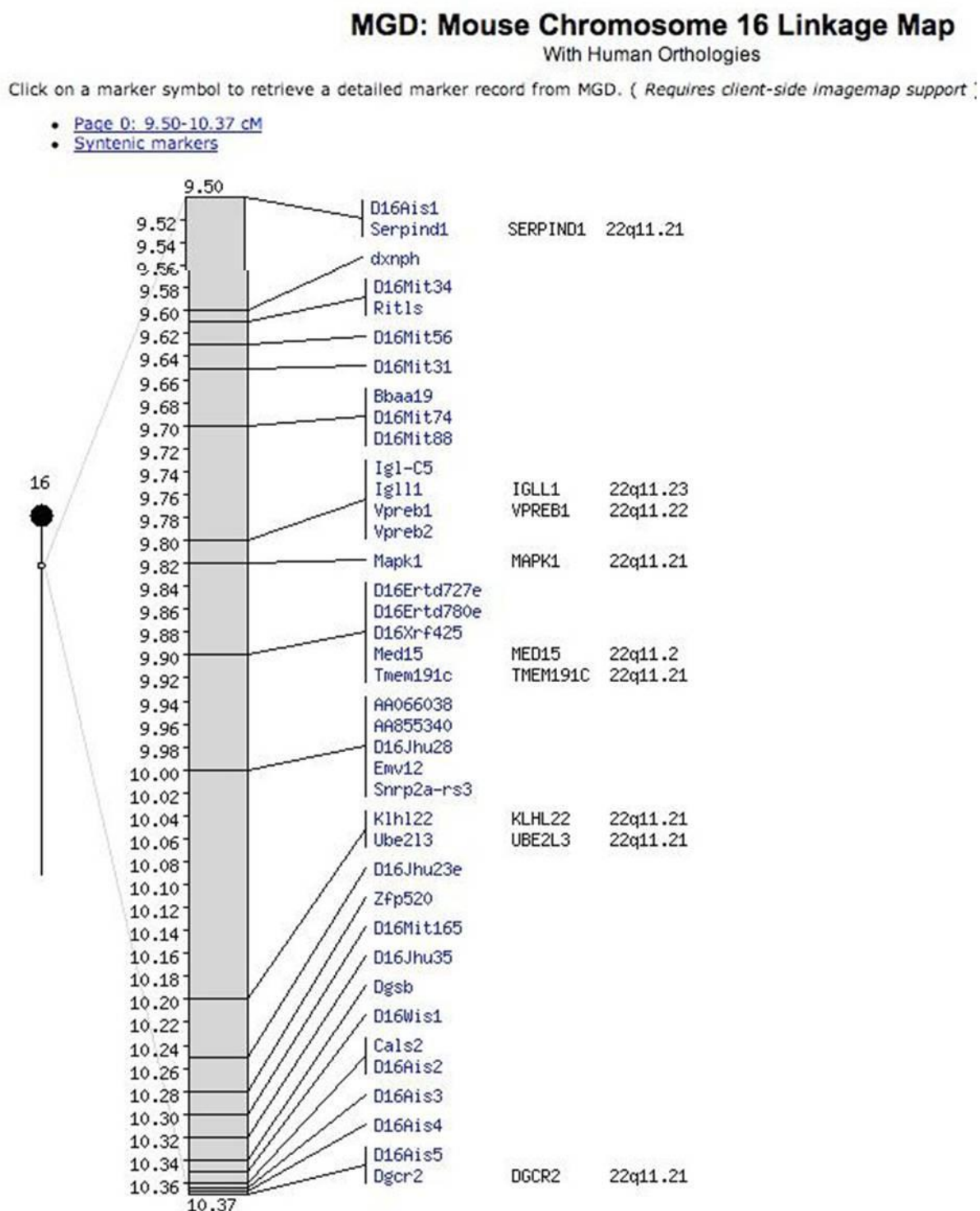
4.10. ábra: A *Drosophila melanogaster* kapcsoltsági géntérképe

Ha ma látunk egy kapcsoltsági térképet, az kevés (vagy semennyi) morfológiai markert és nagyságrendekkel több molekuláris markert tartalmaz. A sűrűn elhelyezkedő molekuláris markerek segítik a génazonosítást. Ha egy érdekes fenotípust okozó gént keresünk (például növényben egy patogén rezisztencia gént), akkor minél szorosabban kapcsolt molekuláris markert találunk hozzá, annál közelebb juthatunk „fizikailag” magához a génhez. A 4.11. ábrán árpa növény kapcsoltsági térképe látható néhány morfológiai, és számos molekuláris markerrel.



4.11. ábra: Árpa kapcsoltsági térképe (hét kromoszóma, bal oldalon a térképtávolság cM egységekben megadva, sárgával kiemelve a morfológiai markerek, a többi molekuláris marker)

A 4.12. ábra az egér 16-os kromoszómájának egy kevesebb, mint 1 cM-nyi szakaszát (9,5–10,37 cM) mutatja. Adódik a kérdés, hogy mi az összefüggés a klasszikus térkép-egység és a valós fizikai (bázispárokból kifejezett) távolság között. A klasszikus kapcsoltsági adatok és a DNS-szekvencia ismeretének tükrében egérben ebben a régióban 1 cM $\approx$ 3000 kbp-nak felel meg. A gének mérete átlagosan 10–20 kbp közé esik (intronokkal együtt), a maradék távolságokat az intergénikus (gének közötti) régiók teszik ki.



4.12. ábra: Az egér 16-os kromoszómájának egy kevesebb, mint 1 cM-nyi szakasza. A régióban számos gén és molekuláris marker található (kék színnel jelölve). Az eredeti tárhelyen az egyes gének részletes adatait is megtaláljuk (<http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=16>). Jobb oldalon fekete betűkkel a humán ortológok és azok kromoszómális lokalizációja van feltüntetve.

5. A mendeli genetika kiterjesztése

A korábbi fejezetekben már találkoztunk olyan öröklődési mintázatokkal (lásd a [2.4.](#) Nemhez kötött öröklődés és a [4.](#) Kapcsoltság témákat), melyek a klasszikus mendeli szabályszerűségekhez képest valamilyen eltérést mutattak. Ebben a fejezetben továbbá, a mendeli genetikát kiegészítő öröklődési formákkal ismerkedünk meg.

A mendeli számarányok fenotípus szintjén való megnyilvánulása szigorú feltételekhez kötött. Mendel a róla elnevezett számarányok és törvények felfedezését a következő „véletlen” tényezőknek köszönhette:

- minden mendeli allélpár egyszerű domináns–recesszív viszonyt mutatott
- az összes genotípus életképessége azonos volt
- minden vizsgált fenotípus jól azonosítható volt (nem függött a környezeti hatásoktól és a genetikai háttértől)
- minden vizsgált gén csak egyetlen fenotípust befolyásolt (két allélpár esetén mind-egyik allélpár csak az egyik fenotípust befolyásolta, a másikat nem)
- minden mendeli fenotípus génye különböző kromoszómán helyezkedett el

Mendel a kísérleteiben egy fenotípus követésével valójában egy kromoszóma átöröklését modellezte. A mendeli törvények tökéletesen leírják a kromoszómák meióziszbeli viselkedését, ami az élővilág nagy részére általánosan érvényes.

Számos olyan mechanizmust ismerünk, melyek hatására nem a mendeli számarányok jelennek meg a fenotípus szintjén. A mendeli számarányokat módosító mechanizmusok nem érvénytelenítik, hanem kiegészítik a klasszikus mendeli genetikát. Ezek a mechanizmusok az alábbiak:

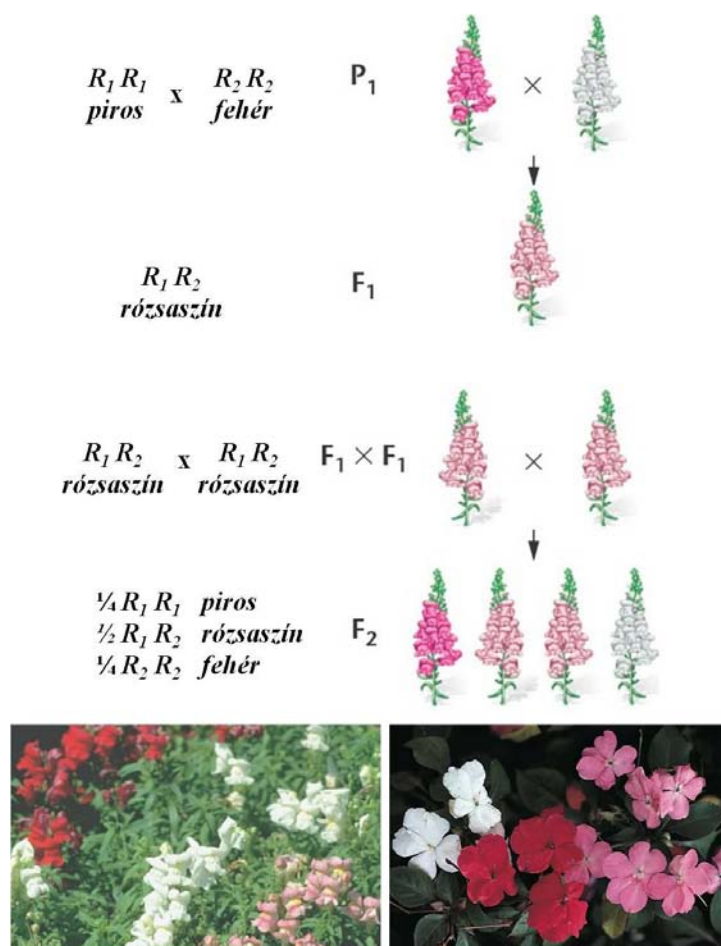
- különböző dominanciaviszonyok
- többszörös allélizmus
- letális allélok
- pleiotrópia (egy gén egyszerre több tulajdonságot befolyásol)
- a környezet fenotípusra gyakorolt hatása
- penetrancia (egy tulajdonság megjelenésének gyakorisága)
- expresszivitás (egy tulajdonság kifejeződésének változó mértéke)
- több gén hatása ugyanarra a jellegre
- egy útvonalban ható gének, episztázis
- extranukleáris öröklődés
- kapcsolat
- nemhez kötött öröklődés
- imprinting

Meg kell jegyezni, hogy a fenti felsorolás nem klasszikus tudományos felosztás, inkább csak ízelítő és felvezetés a további témákhoz. Ebben a fejezetben megismerkedünk ezen mechanizmusok egy részével, más részüket külön fejezetekben tárgyaljuk. Látni fogjuk ezen mechanizmusok összefüggését, a gének működésének összetett formáit.

5.1. A dominanciaviszonyok különböző változatai

5.1.1. Inkomplett dominancia

Az inkomplett (nem teljes) dominancia jelenségének leírása Carl **Correns** (a Mendel-törvények egyik újralfelfedezője) nevéhez köthető. Az 1900-as évek legelején csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*) növények keresztezésekor figyelt fel arra, hogy ha piros virágú növényeket keresztez fehér virágú növényekkel, akkor az utódok mindegyike köztes fenotípust (rózsaszín virág) mutat. Az F₁ rózsaszín virágú növények önmegtermékenyítéséből származó F₂ generáció tagjai 1:2:1 arányban piros:rózsaszín:fehér virágúak (5.1. ábra). Az F₂ nemzedék 1:2:1 aránya azt igazolja, hogy a három fenotípust egy allélpár határozza meg (ez az egygénes öröklődés genotípusaránya). A példában az *R*₁ és az *R*₂ jelölés tehát egy gén, az *R* (red, piros) két alléljára vonatkozik. A jelenség oka a szülők fenotípusának nem tiszta domináns–recesszív viszonya. A háttérben a „jó” géntermék dupla, szimpla vagy nulla dózisa áll, ennek megfelelően alakul ki a piros, rózsaszín, vagy fehér virág szín. A nem teljes dominancia eme formája sok növényenél felfedezhető (oroszlánszáj, nebáncsvirág, szegfű stb.)



5.1. ábra: Inkomplett dominancia

5.1.2. Kodominancia

Kodominancia esetén a heterozigóta egyed a gén mindkét alléljának fenotípusát mutatja. A fenotípus tehát pontosan tükrözi a genotípust. Tipikus példa kodominanciára az M–N vércsoportrendszer öröklődése az emberben. A háromféle vércsoportot a vörösvértestek felszíni antigénjének minősége okozza (5.1. táblázat).

5.1. táblázat: Kodominancia az M–N vércsoportrendszer kialakításában

Genotípus	Fenotípus	Antigén
$L^M L^M$	M vércsoport	M
$L^M L^N$	MN vércsoport	M és N
$L^N L^N$	N vércsoport	N

Ki kell emelni, hogy a fenotípus vizsgálati szintjétől függően (molekula, sejt, szövet, egyed) kaphatunk különböző dominanciaviszonyokat. Példaként nézzük a sarlósejtes vérszegénység betegséget, melynek hátterében a vad típustól eltérő hemoglobin mutáció áll. A normális változatot a Hb^A allél, a mutáns változatot a Hb^S allél határozza meg. A következő három szinten vizsgáljuk a fenotípust:

1. VÉRSZEGÉNYség (csökkent vörösvértest szám)
2. VÖRÖSVÉRTESTEK SARLÓS ALAKJA
3. HEMOGLOBIN FEHÉRJE (elektroforetikus mobilitás)

A lehetséges háromféle genotípushoz – a vizsgálati szinttől függően – az alábbi fenotípusok, illetve heterozigótában az alábbi dominanciaviszonyok rendelkezhetők:

Hb^A/Hb^A normál

- Hb^A/Hb^S
1. nem vérszegény > Hb^A domináns
 2. normál/enyhén sarlós/sarlós > inkomplett dominancia
 3. kétféle hemoglobin fehérje > kodominancia

- Hb^S/Hb^S
1. vérszegény, mert a sarlósejtes vörösvértestek könnyebben degradálódnak
 2. a kizárólagos abnormális hemoglobin miatt a vörösvértestek sarló alakúak
 3. egyféle (kóros) hemoglobin fehérje

5.1.3. A dominanciaviszonyok magyarázata

Egy gén két alléljának dominanciaviszonyait az allélokra nézve heterozigóta egyed fenotípusa mutatja meg. Ha a heterozigóta fenotípusa megegyezik az egyik allélra homozigóta egyed fenotípusával, akkor az az allél teljes dominanciát mutat a másik felett. Leggyakrabban a vad allél domináns a funkcióvesztéses allélek felett. Ez esetben **haploelégségről (haploszufficiencia)** beszélhetünk, azaz a „jó” géntermék egy dózisa (lényegében haploid felállítás) elég a dupla géndózisnak megfelelő fenotípus kialakításához. A funkcióvesztéses allél ez esetben recesszívként viselkedik. Ha a „jó” gén egyszeres dózisa a vad fenotípus kialakításához szükséges küszöbérték alatt van, akkor **haploid elégtelenség (haploinsufficiencia)** esete áll fenn. Ekkor a funkcióvesztéses allél dominánsként viselkedik, mert a heterozigóta fenotípusa a funkcióvesztéses homozigóta fenotípusával egyezik meg. Hasonló helyzet áll elő az ún. **domináns negatív** mutációt hordozó allélek hatására. Ilyenkor heterozigótában a „rossz” géntermék gátolja a „jó” géntermék működését. Nem teljes dominanciánál az allélek dupla, szimpla és nulla dózisa más-más fenotípust okoz. Kodominanciánál az allélok egymással egyenértékűek, hatásuk a másik allél jelenlététől függetlenül megnyilvánul.

5.2. Többszörös allélizmus

Egy populációban a génváltozatok, vagyis az allélféleségek száma több is lehet (természetesen egy diploid egyedben minden génnek két allélja van csak jelen). Egy gén alléljainak összességét **allélsornak** nevezzük. Egy allélsor tagjai változatos dominanciaviszonyokat mutathatnak. Nézzük példaként az AB0 vércsoportrendszert az embernél! Egy gén három allélja alakítja ki a lehetséges négyféle vércsoportot a humán populációkban, az alábbiak szerint (5.2. táblázat):

5.2. táblázat: Többszörös allélizmus (i , I^A , I^B) az AB0 vércsoportrendszernél

Genotípus	Fenotípus	Antigén
ii	0 vércsoport	nincs
$I^A I^A$ vagy $I^A i$	A vércsoport	csak A
$I^B I^B$ vagy $I^B i$	B vércsoport	csak B
$I^A I^B$	AB vércsoport	A és B

Akárcsak az M–N vércsoportrendszernél, itt is vörösvértest-felszíni antigének térnek el az egyes vércsoportok esetén.

A dominanciaviszonyok alakulása:

- i allél recesszív, vele szemben az I^A és I^B allélek dominánsak
- I^A és I^B allélek kodominánsak

További szemléletes példa többszörös allélizmusra az emlősök bundaszínét befolyásoló C (colour) gén. Leggyakoribb alléljai: C sötét egyszínű, c^{ch} csincsilla, c^h himalája, c albínó (5.2. ábra). Az allélok egymáshoz képest dominánsak C , c^{ch} , c^h , c sorban, ennek megfelelően a genotípus–fenotípus viszonyok az alábbiak szerint alakulnak:

szőrszín fenotípus	genotípus
sötét, egyszínű	CC vagy Cc^{ch} vagy Cc^h vagy Cc
csincsilla	$c^{ch} c^{ch}$ vagy $c^{ch} c^h$ vagy $c^{ch} c$
himalája	$c^h c^h$ vagy $c^h c$
albínó	cc



5.2. ábra: A C génnel összefüggő szőrszín fenotípusok

A himalája fenotípus kialakításáért felelős c^h allél, pontosabban a fehérjeterméke hőmérséklet érzékeny: a hidegebb testrészekben funkcióképes (a C allél termékével egyenértékű), a melegebb részekben funkcióképtelen (a c allél termékével egyenértékű). A hőmérséklet érzékeny mutációkat a képződő fehérje szerkezetének hőmérséklet érzékenysége magyarázza. A mutáció hatására a fehérje elsődleges szerkezetében bekövetkező változás (legtöbbször egyetlen aminosav cseréje) alacsony (megengedő – permisszív) hőmérsékleten nem okoz jelentős változást a fehérje szerkezetében és funkciójában, míg magasabb (korlátozó, restriktív) hőmérsékleten az aminosavcsere következtében a fehérje olyan szerkezetben stabilizálódik, amely a működését lehetetlenné teszi.

Fontos kiemelni, hogy a C génen kívül még számos gén terméke befolyásolja az emlősök szőrszínét, ezért a C allélsor fenti fenotípusai függenek más gének alléllösszetételétől is.

5.2.1. Az allélizmus megállapítása vagy elvetése. A komplementáció

Ugyanazon jelleg (például szőrszín) különböző változatait okozhatják egyetlen gén allélváltozatai vagy különböző gének változatai. Hogyan állapíthatjuk meg az allélizmust, vagyis azt, hogy egy jelleget érintő két fenotípust (például csincsilla és himalája szőrszín) ugyanazon gén változatai okozzák-e? Ha a kétféle fenotípust mutató tiszta vonalú egyedek keresztezésekor a mendeli egyfaktoros öröklődés szabályszerűségeivel találkozunk, akkor az allélizmus esete áll fenn. Az F1 generációban – teljes dominancia esetén – csak az egyik fenotípus jelenik meg, (hogy melyik, az elárulja az allélek közötti dominanciaviszonyt is), az F2 generációban pedig a 3:1 (vagy 1:2:1) arányokat kapjuk.

Például:

P	F1	F2
sötét × himalája	mind sötét	$\frac{3}{4}$ sötét, $\frac{1}{4}$ himalája
himalája × csincsilla	mind csincsilla	$\frac{3}{4}$ csincsilla, $\frac{1}{4}$ himalája
albínó × himalája	mind himalája	$\frac{3}{4}$ himalája, $\frac{1}{4}$ albínó

Vezessünk le egy esetet, például a sötét × himalája keresztezést genetikai szimbólumokkal:

P	CC sötét	×	$c^h c^h$ himalája
F1	Cc^h sötét		
F2	3 1	$C-$ (vagyis CC és Cc^h) sötét $c^h c^h$ himalája	

Nézzünk egy másik példát! A muslica téglavörös (vad), fehér és barack szemszínű tiszta vonalak egyedeinek keresztezésekor szintén igazolható egy gén többszörös allélizmusa, és a $w^+ > w > w^a$ dominanciasor.

P	F1	F2
téglavörös × fehér	mind téglavörös	$\frac{3}{4}$ téglavörös, $\frac{1}{4}$ fehér
téglavörös × barack	mind téglavörös	$\frac{3}{4}$ téglavörös, $\frac{1}{4}$ barack
fehér × barack	mind barack	$\frac{3}{4}$ barack, $\frac{1}{4}$ fehér

Nézzük ez utóbbit genetikai szimbólumokkal felírva:

P	ww	$\times$	w^aw^a
	fehér szem		barack szem
F1			ww^a
			barack szem
F2	3	w^a- (vagyis w^aw^a és ww^a)	barack szem
	1	ww	fehér szem

Mint látjuk, egy gén alléljait rendszerint felső indexek által különböztetjük meg. A vad allél jelölési módja fajoként változó lehet, leggyakrabban + jellel vagy nagy betűvel jelöljük. Polimorf alléloknál, ahol több allél is vad típusnak tekinthető, az egyenértékűsége utaló jelölést célszerű alkalmazni. Meg kell jegyezni, hogy a különféle élőlények genetikai szimbólumrendszerének egységesítésére – bár jó ideje vannak már törekvések erre – tudománytörténeti vagy más okokból nem mindig van lehetőség. Néhány szervezet jelölésrendszeréről az alábbi elérhetőségeken találunk részletes leírást:

<http://www.genenames.org/guidelines.html> (ember)

<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml> (egér)

<http://www.yeastgenome.org/help/community/nomenclature-conventions> (élesztő)

http://flybase.org/static_pages/docs/nomenclature/nomenclature3.html (muslica)

<http://www.wormbase.org/about/userguide/nomenclature#68b3d9f074ea21hc59ji--10> (laboratóriumi fonalféreg)

A *white* gén elnevezése abból adódik, hogy elsőként leírt változata fehér szemszín fenotípust okozott (ww). A w^a allél indexének elnevezése az apricot (barack) kifejezésből származik.

A fenti példában szereplő *white* gén ww genotípusán kívül más genotípus is vezethet fehér szemszínhez. Erről a bevezető fejezetben már volt szó: az *stst bwbw* kétszeres homozigóta egyedek nem képesek sem a skarlát, sem a barna pigment termelésére. Itt tehát két további, szemszínt befolyásoló génről van szó. Hogyan igazolhatjuk, hogy a fehér szemszínt a két vonalban nem egy gén alléljai okozzák? Beltenyésztve mindkét fehér szemszínű vonal fehér szemszínű utódokat hoz (tisztá vonalak). Egymással keresztezve azonban azt kapjuk, hogy az utódok mindegyike téglavörös szemű, azaz vad fenotípusú. A jelenséget, amikor azonos jelleget érintő azonos vagy hasonló fenotípusú tisztá vonalak keresztezésekor vad típusú utódokat kapunk, **komplementáció**nak nevezzük. A komplementáció kiegészítést jelent: a két genotípus egészíti ki egymást úgy, hogy a hibridben előáll a vad fenotípus. Ha ezt tapasztaljuk, akkor az allélizmust el kell vetnünk. A komplementáció jelenségének fennállása igazolja, hogy a két vonalban ugyanazt a fenotípust nem ugyanazon gének alléljai okozták. A fehér szemszínű muslica vonalak példáján szemléltetve:

P	$ww\ st^+st^+ bw^+bw^+$	$\times$	$w^+w^+ stst\ bwbw$
	fehér szem		fehér szem
F1	$ww^+ stst^+ bwbw^+$		komplementáció
	vad, téglavörös szem		

A két szülői vonalban aláhúztuk a fehér szemszín háttérében álló genetikai okot. Mint azt korábban bemutattuk, minden keresztezést szimmetrikusan írtunk fel, s az ismert mutáns allélokon kívül a többi gén alléljainak vad típusát is feltüntetjük. Az F1 generáció minden egyede trihibrid, mindhárom szóban forgó gén vad allélját tartalmazza, genotípusa „kiegészült”, fenotípusa vad.

Itt érdemes kitérni a skarlát és barna szemszín mutánsok genetikai analízisére is, melyről a bevezető fejezetben – az ennek megértéséhez szükséges tudnivalók ismertetése előtt – csak érintőlegesen szólhattunk. Hogyan lehet megállapítani, hogy a két (skarlát és barna) szemszín mutáció allélikus-e vagy sem? Egész egyszerűen, kereszteznünk kell a skarlát és barna tiszta vonal egyedeit, és megvizsgálni az utódokat:

- Ha az F1 minden tagja kizárólag skarlát vagy kizárólag barna szemszínű, és az F2-ben 3:1 fenotípusarányt kapunk, akkor ez egyenes mendeli örökletességnek felel meg, az allélizmus igazolt, tehát egy gén két allélja okozza a szülői vonalakban a skarlát, illetve barna fenotípust.
- Ha az F1 utódok mindegyike vad típusú, azaz a komplementáció jelenség fennáll, és az F2-ben a mendeli dihibrid fenotípusos számarányokat kapjuk (négyféle fenotípus, 9:3:3:1 arányban), akkor megállapíthatjuk, hogy két gén változatai okozzák a skarlát és barna szemszín fenotípusokat.

A valóságban ez utóbbi eset bizonyul igaznak. Levezetése genetikai szimbólumokkal:

P	$stst\ bw^+bw^+$	×	$st^+st^+\ bw bw$
	skarlát szem		barna szem
F1	$stst^+\ bw bw^+$		komplementáció
	vad, téglavörös szem		
F2	9	$st^+ - bw^+ -$	vad szem
	3	$stst\ bw^+ -$	skarlát szem (mert nem képződik a barna pigment)
	3	$st^+ - bw bw$	barna szem (mert nem képződik a skarlát pigment)
	1	$stst\ bw bw$	fehér szem (mert nem képződik egyik pigment sem)

5.3. Letális allélok

Letálisnak azokat az allélokat nevezzük, melyek a hordozójuk pusztulását okozzák (diploidokban a legtöbbször csak homozigóta formában okoznak letalitást). Minden olyan gén, melynek terméke az illető élőlény életfenntartásához vagy egyedfejlődéséhez nélkülözhetetlen, potenciális letális gén. Ezen génfunkciók kiesése ugyanis az életműködés megszűnését, vagy a fejlődés megszakadását eredményezik. Az, hogy mikor letális az allél az egyedfejlődés során, fontos információt nyújt arra vonatkozóan, hogy mikor, hol van szükség az adott gén termékére. Például embernél az achondropláziás törpeségért felelős allél homozigóta formában embrió letális, amiből az következik, hogy a gén terméke az embrionális fejlődés során fontos funkcióval bír. A letalitás sokszor függ a környezettől: ilyenek például a cisztás fibrózis vagy a sarlósejtes anémia monogén betegségei, melyek kezelés hiányában letalitáshoz vezetnek. A hőmérséklet-érzékeny letális allélok hatása szintén függ a környezettől.

A letális allélok egyik iskolapéldája a sárga bundaszínű egerek esete (5.3. ábra). Az emlősökben előforduló aguti (*agouti*) nevű gén rendelkezik egy letális alléllal, jelöljük ezt A^Y -nal, a vad allélt pedig A -val. A kutatók először arra figyeltek fel, hogy a sárga bundaszínű egerek nem tenyésznek tisztán. Beltenyésztve 2:1 arányban jönnek létre

sárga:vad színű utódok. Sárga és vad egerek keresztezésekor pedig 1:1 arányban keletkeznek sárga és vad utódok. Ez utóbbi arra utal, hogy a sárga egerek heterozigóták. Beltenyésztve azért kapunk 2:1 arányt, mert az egyik genotípus-kategória hordozói, az $A^Y A^Y$ homozigóták, embrionális korban elpusztulnak. Az A^Y allél ezek szerint kétszeres dózisban letalitást, egyszeres dózisban sárga szőrszínt okoz, és etekintetben domináns a vad allél felett ($A^Y A$ heterozigóta sárga).



5.3. ábra: Sárga ($A^Y A$) és vad típusú ($A A$) egerek

Ebben a példában láthatjuk a **pleiotrópia** érvényesülését. A pleiotrópia az a jelenség, amikor egy gén több jelleget is befolyásol, jelen esetben a letalitást és a bundaszín kialakulását, valamint további, eddig nem említett életműködést is: elhízást, inzulin rezisztenciát, tumorgenezisre való megemelkedett hajlamot. Ezek látszólag igen távoli jellegek, és talán nehéz elképzelni, milyen molekuláris szintű mechanizmus teremt kapcsolatot a jelenségek között. A gén termékének molekuláris-funkcionális elemzéséről szóló első publikáció 1994-ben jelent meg a *Nature* című rangos folyóiratban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935841>). Az aguti gén terméke egy parakrin szignalizációs peptid, a melanokortikoid receptorok endogén antagonistája. Kifejeződése normálisan csak meghatározott szövetekben tapasztalható. A melanocortin rendszer számos élettani funkcióban vesz részt, mint például a pigmentáció, szteroidszintézis, energia homeosztázis, gyulladás, hőszabályozás, szexuális funkciók. A gén ektopikus (nem normális helyeken történő) expressziója, valamint epigenetikai szabályozásának megváltozása (DNS-metiláció csökkenése a gén területén, lásd a gén-kifejeződés szabályozásáról szóló 10. fejezetet) a fenti funkciókat érintő változásokhoz vezet. A gén ortológja emberben is megtalálható. Az utóbbi években a humán aguti ortológ bizonyos alléljait összefüggésbe hozták az elhízásra, illetve bőrrákra való hajlammal.

További példa a Man szigetről származó manx macska, mely egy gén mutációja miatt farkatlan (5.4. ábra). A mutáns allél domináns a vad allél felett, a heterozigóták tehát farkatlanok, homozigóta formában a mutáns allél letalitást okoz:

$M^L M$ – a gerinc fejlődése nem megfelelő, következménye a farkatlanság

$M^L M^L$ – életképtelen genotípus.

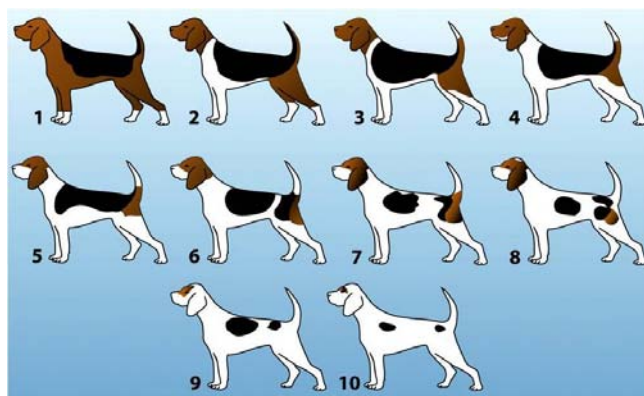


5.4. ábra: Farkatlan manx macska

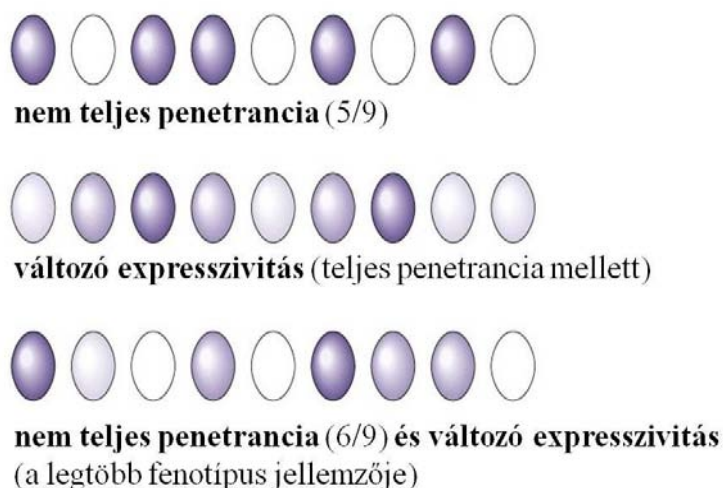
5.4. Penetrancia és expresszivitás

A penetrancia azt mutatja meg, hogy azonos genotípusú egyedek csoportjában az egyedek hány százaléka mutatja a genotípusra jellemző fenotípust. Ha a megegyező genotípusú egyedek mindegyikében megjelenik az adott fenotípus, akkor a gén teljes penetranciájú (penetrancia 100%), ha csak az egyedek egy részén látszik a fenotípus, akkor a gén penetranciája nem teljes.

Az expresszivitás a fenotípus kifejeződésének mértékét mutatja. Az expresszivitás egy fenotípusos skálán a magastól az alacsonyig bármekkora lehet. A fenotípust nem mutató egyed (0% expresszivitás) a penetrancia értéket csökkenti az azonos genotípusúak csoportjában (5.5 és 5.6 ábrák).



5.5. ábra: 100% penetrancia (minden egyed foltos) és változó expresszivitás (a foltosság mértéke egyenként változó) kutyákon



5.6. ábra: Nem teljes penetrancia és változó expresszivitás szemléltetése. Minden ovális egy egyedet képvisel, és minden egyed azonos genotípusú.

A nem teljes penetranciát és a változó expresszivitást két körülmény okozhatja:

- a genom többi génje (melyek egy része ugyanazon fenotípust befolyásolja) egyenként különbözik
- az egyes egyedeket eltérő környezeti hatások érik az egyedfejlődés során.

5.5. Több gén hatása ugyanarra a jellegre

A gének nem magukban, hanem más génekkel együttműködve, azokkal kölcsönhatásban alakítják ki a fenotípust. Úgy is fogalmazhatunk, hogy az egyes jellegeket a legtöbbször nem egy, hanem több gén terméke alakítja ki. Ebből az következik, hogy a korábban megismert mendeli örökletesség a fenotípus szintjén sokszor módosul. Most olyan eseteket veszünk sorra, melyekben ugyanazt a jelleget befolyásoló géneket vizsgálunk dihibrid keresztezésekben. A fenotípus szintjén megfigyelhető módosult számarányok a génpárok közötti kölcsönhatás viszonyára utalhatnak. A kölcsönhatás típusának megállapítása nagyon hasznos információt szolgáltat. Egy jelleget érintő sok gén viszonyának szisztematikus feltárása elvezethet komplett biokémiai vagy genetikai útvonalak feltérképezéséhez.

5.5.1. Két gén hatása ugyanarra a jellegre független útvonalon

Egy példával A komplementáció című 5.2.1. szakaszban már találkoztunk. Muslicában a szemszín egy jellegnek tekinthető. Több gént ismerünk, amely részt vesz e jelleg kialakításában, ilyenek a korábbiakban bemutatott *white* (*w*), *scarlet* (*st*) és *brown* (*bw*) gének. Ha a hivatkozott szakaszban ismertetett dihibrid keresztezést (P: *stst bw⁺bw⁺* × *st⁺st⁺ bwbw*) megvizsgáljuk, és párhuzamba állítjuk a mendeli dihibrid keresztezésekkel, akkor a megfeleltethetőség nyilvánvaló. Függetlenül hasadó génpárról van szó, mert F2-ben megkapjuk az erre jellemző 9:3:3:1 fenotípusarányt. Mi a különbség a mendeli borsó kísérlettől? Az, hogy itt a két függetlenül öröklődő gén ugyanazt a fenotípus-jelleget (szemszín) érinti (szemben a borsószem színére és alakjára vonatkozó sárga–zöld/ráncos–sima jellegpárral), ezért abban az egy jellegben, a szemszínben tükröződik vissza mindkét gén allélösszetételének hatása.

A következő iskolapélda az ugyanarra a jellegre független útvonalon ható két génre a csirke tarajforma öröklődése. Hosszú múltra tekint vissza ez a terület, Bateson és Punnett már 1902-ben publikált a tarajforma öröklődés kapcsán két gén interakciójáról. Rózsa és borsó tarajú csirkék keresztezésekor az utódok egy új fenotípust, dió tarajat növesztettek (5.7. ábra). Az F1 *inter se* keresztezés utódai között 9:3:3:1 arányban jelent meg a dió:rózsa:borsó:egyszerű tarajforma. Sematikusan:

P	<i>RR pp</i>	×	<i>rr PP</i>
	rózsa		borsó
F1	<i>Rr Pp</i>		
	dió		
F2	9	<i>R- P-</i>	dió
	3	<i>rr P-</i>	borsó
	3	<i>R- pp</i>	rózsa
	1	<i>rr pp</i>	egyszerű

A gének jelölésének eredete: *R* rose, rózsa; *P* pea, borsó.

A háttérben álló molekuláris mechanizmusról sokáig nem tudtak semmit. Egy néhány éve megjelent publikáció számol be arról, hogy a borsó tarajformát egy fejlődés-tanilag fontos gén (a *SOX5* transzkripció faktor gén) intronjában bekövetkező duplikáció okozza. Ez egy olyan domináns mutáció, mely a gén kifejeződésének szabá-

lyozását változtatja meg (ektópikus expressziót okoz). A *SOX5* gén megfelel a fenti példában szereplő *P* génnek, domináns mutáns allélja a *P*-nek, recesszív vad allélja a *p*-nek. A cikk megtalálható az alábbi webhelyen:

<http://www.plosgenetics.org/article/info:doi/10.1371/journal.pgen.1000512>.



5.7. ábra: Csirke tarajformák

A házi tyúk őse, az ázsiai esőerdőkben honos bankivatyúk (*Gallus gallus*) egyszerű tarajjal rendelkezik. A *SOX5* mutáció minden bizonnyal a házasítás kezdetén jöhetett létre, mert a borsó taraj elterjedtnek számít a tenyésztett fajtáknál világszerte. A kutatók ezt előnyös spontán mutációnak gondolják, mert a borsó tarajforma hidegebb éghajlatokon előnyösebb az egyszerű tarajjal szemben, a kisebb hűtési felület miatt. A rózsza tarajformát szintén egy, a vad típussal szemben domináns allél okozhatja. Emberben hús *SOX* gént ismerünk. Ezek számos fejlődésbiológiai folyamat (ivarmeghatározás, neuronális fejlődés, sejt differenciáció) irányításában vesznek részt. A kutatók úgy vélik, hogy néhány *SOX* gén alkalmas lehet a gyermekkori agytumor kialakulásának korai diagnosztizálására, ezért ez intenzív kutatási terület napjainkban. A modellszervezeteken végzett génazonosítás és funkcionális jellemzés jelentőségét ez a példa is bizonyítja.

5.5.2. Komplementer öröklésment

Két fehér virágú borsó törzs keresztezésének utódai lehetnek bíbor virágúak, ami komplementációra utal. F₂-ben 9:7 arányban kapunk bíbor:fehér virágú növényeket. Ez módosult dihibrid F₂ számarány: a 7 a 3:3:1 genotípusok egymással megegyező fenotípusából adódik. A virágszín csak akkor bíbor, ha a genotípusban mindkét szóban forgó génnek legalább egy domináns allélja jelen van. Egyszerű jelölésekkel levezetve:

P	AA bb	×	aa BB
	fehér		fehér
F1	Aa Bb komplementáció		
	bíbor (vad)		
F2	9	A- B-	bíbor komplementáció
	3	aa B-	fehér
	3	A- bb	fehér
	1	aa bb	fehér

A genotípusok szintjén tehát nem, csak a fenotípus szintjén érvényesül a módosult számarány.

A komplementer génhatás jelenség magyarázata az, hogy egy festék termeléséért két enzimre van szükség, és azok lineáris sorban egymás után fejtik ki hatásukat. Csak akkor keletkezik festék, ha mindkét enzim jelen van. Az **A** enzim hiánya is (*aa* funkcióvesztéses allélpár), akár a **B** enzim hiánya is (*bb* funkcióvesztéses allélpár), s mindkettő hiánya is (*aa bb* genotípus) megakadályozza a pigmentképződést, fehér virágszín okoz (5.8. ábra).



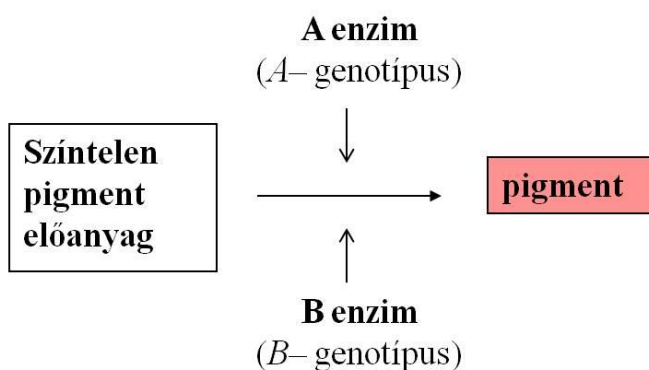
5.8. ábra: Komplementer génhatás egy reakciósor két tagjánál

5.5.3. Duplikált gének öröklésmenete

Nem ritka, hogy egy biokémiai lépést két vagy több gén terméke is képes végrehajtani. Az ilyen géneket **redundáns gének**nek nevezzük. Redundáns gének génduplikációval keletkeznek. A duplikált gének az evolúciós folyamatok kiváló nyersanyagai, mivel az egyik géntaggal „az evolúció szabadon bánhat”, ami új, az élőlény számára előnyös funkció kialakulásához is vezethet.

A megegyező funkciójú redundáns gének bármelyikének terméke elegendő a fenotípus kialakításához, például egy pigment termelődéséhez (5.9. ábra). Minden genotípus, amelyben *A* vagy *B* gén domináns allélja előfordul, színes fenotípusú, és csak a *aa bb* genotípusban nem termelődik aktív enzim, ezért nem keletkezik festékanyag. A fenotípus szintjén módosult F2 dihibrid számarány 15:1.

P	<i>AA bb</i>	×	<i>aa BB</i>
	színes		színes
F1	<i>Aa Bb</i>		
	színes		
F2	9	<i>A- B-</i>	színes
	3	<i>aa B-</i>	színes
	3	<i>A- bb</i>	színes
	1	<i>aa bb</i>	fehér



5.9. ábra: A redundáns gének termékei azonos funkcióval rendelkeznek

5.5.4. Recesszív episztázis

Az episztázis jelentése: felette álló. A genetikában gének egymás feletti hatására használt kifejezés. Az egymás felett állás természetesen nem fizikai értelemben, hanem gén-funkcióban értendő. Gyakorlatias megfogalmazásban: az A gén episztatikus B gén felett, ha a B gén allélösszetételétől függetlenül az A gén allélkombinációjának megfelelő fenotípus érvényesül. Úgy is mondhatjuk, hogy az episztatikus gén bizonyos allélösszetétele meggátolja egy másik gén fenotípusos kifejeződését. Az előző mondatban a „bizonyos allélösszetétel” arra utal, hogy megkülönböztetünk recesszív episztázist (ha az episztatikus gén recesszív allélja fejt ki episztatikus hatást) és domináns episztázist (ha az episztatikus gén domináns allélja fejt ki episztatikus hatást).

Nézzünk egy példát recesszív episztázisra!

Az emlősök szőrszínével korábban már foglalkoztunk. A *C* gén allélsora példát mutatott a többszörös allélizmusra, az *A* aguti gén *A^v* allélja pedig a letális allélra). Most egy harmadik gént is bemutatunk: ez a *brown* (*B*) gén, melynek domináns allélja fekete pigment, recesszív allélja pedig barna pigment termelődéséhez vezet.

B gén alléljai:

B– fekete
bb barna

C gén alléljai:

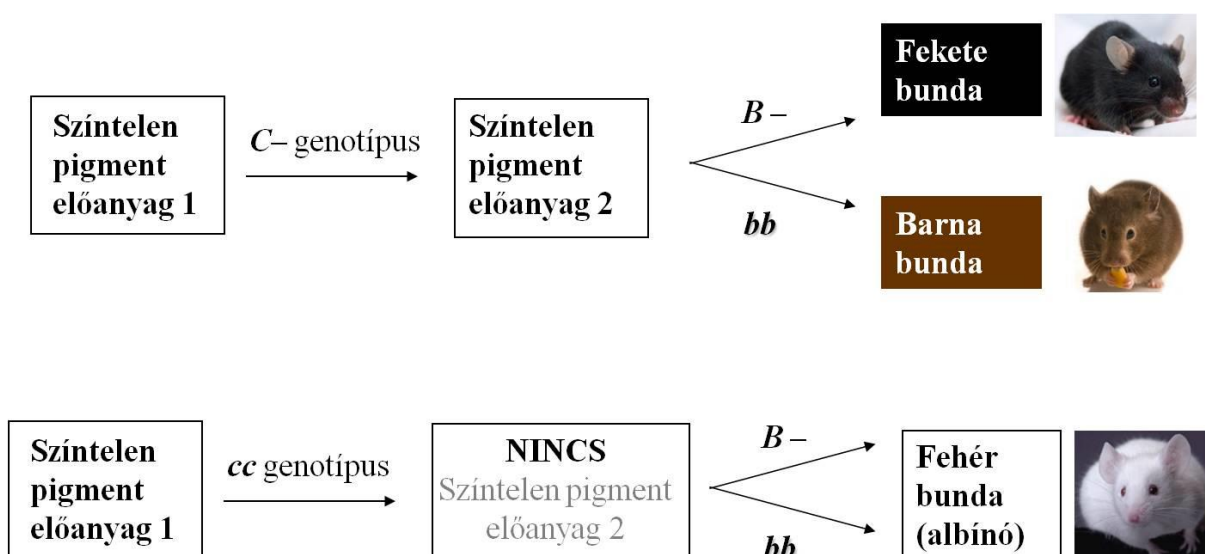
C intenzív szín
c^{ch} csincsilla
c^h himalája
cc albínó

A *C* és *B* bundaszín gének recesszív episztázisa:

P	<i>CC bb</i> barna	×	<i>cc BB</i> albínó
F1	<i>Cc Bb</i> (komplementáció, mert barna és albínó nem allélikusak) fekete		
F2	9	<i>C</i> – <i>B</i> –	fekete
	3	<i>cc</i> <i>B</i> –	albínó
	3	<i>C</i> – <i>bb</i>	barna
	1	<i>cc bb</i>	albínó

(A fenti eset a többi szőrszín gén meghatározott genotípusa mellett érvényesül).

A recesszív episztázisra a 9:3:4 módosult F2 fenotípusos számarány jellemző. Ez úgy jön létre, hogy az egyik „3” és az „1” genotípusok fenotípusa megegyezik, jelen esetben albínó. A „4” arányban megjelenő fenotípus oka az, hogy ha az egyik gén recesszív homozigóta formában van jelen (itt *cc*), akkor a fenotípus a másik gén alléljaitól függetlenül (*B*– vagy *bb*) ugyanaz (itt albínó). A biokémiai hátteret szemlélteti az 5.10. ábra:



5.10. ábra: Recesszív episztázis egy reakciósor tagjai között

C gén recesszív allélja episztatikus B gén felett, ezért recesszív episztázisról beszélünk. B géntermék hatása szubsztrát hiányában nem érvényesül.

5.5.5. Domináns episztázis

A domináns episztázisban két gén között olyan episztatikus viszony áll fenn, melyben az episztatikus gén domináns allélja akadályozza meg a másik gén alléljainak fenotípusos kifejeződését.

Példaként a gyűszűvirág (*Digitalis purpurea*) pártaszínének alakulását tekintjük át.

Az egyik gén a D gén, melynek domináns allélja sötét lila, recesszív allélja homozigóta formában (dd) világos lila virágszín eredményez.

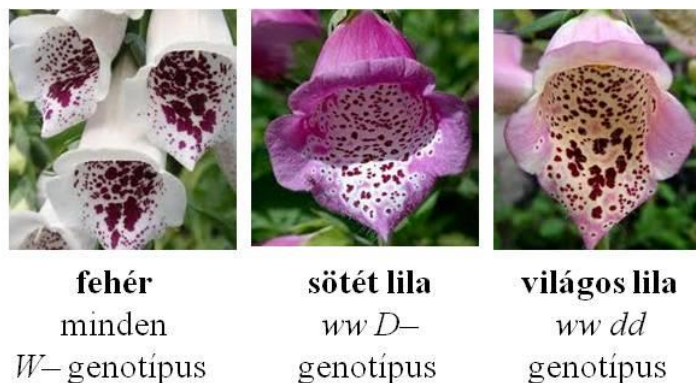
Egy másik gén, a W gén, befolyásolja a képződött pigment lerakódását:

- W domináns allélja megakadályozza a pigmentlerakódást, kivéve a virágtorokban, így a párta fehér
- w allél nem gátolja a pigment lerakódását (így a D gén genotípusának megfelelő színű a virág).

Ebben a példában a W gén domináns W allélja episztatikus D gén felett. A D gén alléljainak hatása csak ww genotípus mellett érvényesül (5.11. ábra). A két génre nézve dihibrid önmegtermékenyítések az utódokban a domináns episztázisra utaló 12:3:1 számarányt kapjuk:

$Ww Dd$ inter se

9	$\underline{W}-D-$	fehér
3	$ww \underline{D}-$	sötétlila
3	$\underline{W}-dd$	fehér
1	$ww \underline{dd}$	világoslila



5.11. ábra: W allél domináns episztázisa D gén felett

5.5.6. Egy biokémiai útvonal genetikai analízise

Egy tudománytörténeti szempontból is nagy jelentőségű kísérletsor bemutatásával szemléltetjük a genetikai és biokémiai analízis ötvözésének erejét. Biokémiai útvonalon olyan több lépésből álló reakciósorértünk, melynek egyes lépéseit különböző gének termékei (különböző enzimek) katalizálják.

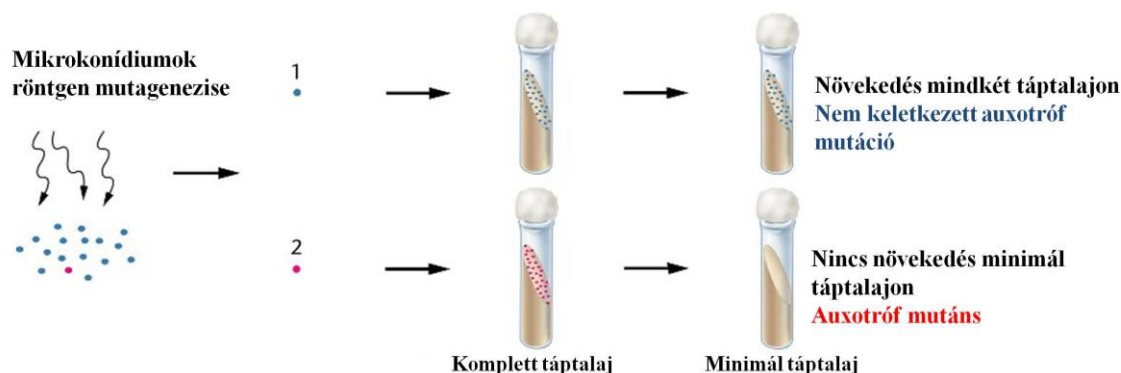
A példánkban szereplő kísérletsort George Wells **Beadle** és Edward Lawrie **Tatum** végezte még az 1940-es években. Ebben az időszakban még ismeretlen volt a gének mint a tulajdonságok átörökítéséért felelős faktorok molekuláris természete. A két kutató a gének és fehérjék közötti kapcsolat felderítését tűzte ki célul. Ha van direkt kapcsolat a gének és az enzimek között, akkor lehet olyan mutánsokat (öröklődő változásokat hordozó, tehát génjükben megváltozott) izolálni, amelyek specifikus enzimreakciókban hibásak. Eredményeik alapján ez a feltevésük be is igazolódott. Megalkották az ún. egy gén – egy enzim hipotézist. Munkájukért 1958-ban Nobel-díjat kaptak.

A kérdés tanulmányozására a *Neurospora crassa* mikroszkopikus gombát választották. Előnyös választás volt ez a modellszervezet, mert kis helyen, egyszerű eszközökkel nagy számban fenntartható, és aszexuális és szexuális szaporodási ciklusa is van. Aszexuálisan a haploid hifák által termelt spórákkal (vagy mikrokonídiumokkal) szaporodik. Szexuális ciklusában két párosodási típus hifái kétmagvú (dikarióta) hifává egyesülnek, s ezt magfúzió (kariogámia) követi. A sejtmagok fúziójából kialakulnak a diploid magok. Ezekből a sejtekből alakulnak ki az aszkuszok (tömlők). Az aszkusz olyan zsákszerű képződmény, melyben nyolc haploid aszkospóra jön létre. Az aszkospórák a kiindulási diploid sejt egy meiotikus osztódásával, majd azt követő egy mitotikus osztódásával keletkeznek. A faj jellemzője, hogy az aszkuszban a spórák nem keverednek, lineáris sorrendben helyezkednek el, mely elrendeződés tükrözi a megelőző osztódások és rekombinációs események térbeli viszonyait. Ennek Beadle és Tatum munkájában nincs jelentősége, de a térképezéssel és rekombinációval kapcsolatos vizsgálatoknál a szabályos elrendeződés meghatározó jelentőségű volt (erre itt nem térünk ki).

A kísérlet célja nagyszámú arginin auxotróf (arginin aminosavat előállítani nem képes) mutáns izolálása és jellemzése, ami elvezetett az arginin bioszintézis lépéseinek feltárásához. A mutánsok képződését röntgen mutagenézissel indukálták, ami megemelte a spontán mutációs rátát (lásd a Mutációk című 8. fejezetet). Körülbelül 80000 darab röntgensugárzásnak alávetett mikrokonídiumot teszteltek a továbbiakban. Azért volt szükség ilyen nagy számú egyed átvizsgálására, mert a mutációképződés esélye még indukált esetben is kicsi. Ha keletkezik is mutáció egy mikrokonídiumban,

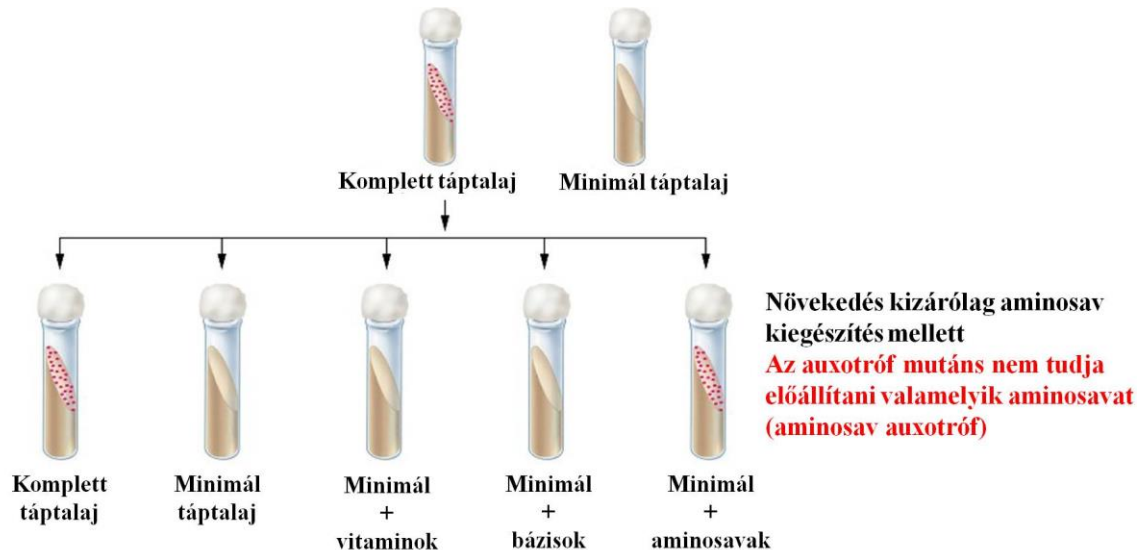
akkor az a genom bármelyik részét érintheti, s az csekély valószínűségű, hogy a mutáció éppen az arginin bioszintézisben részt vevő valamely génben következzen be.

Több lépésben keresték a besugárzott mikrokonídiumok között az arginin auxotróf mutánsokat. Első lépésben kiválogatták az auxotrófokat: ezek azok a mikrokonídiumok, melyek csak komplett (a növekedéshez szükséges minden szerves és szervetlen vegyületet tartalmazó) táptalajon nőnek, minimál (csak alapvető szervetlen forrásokat tartalmazó) táptalajon nem (5.12. ábra).



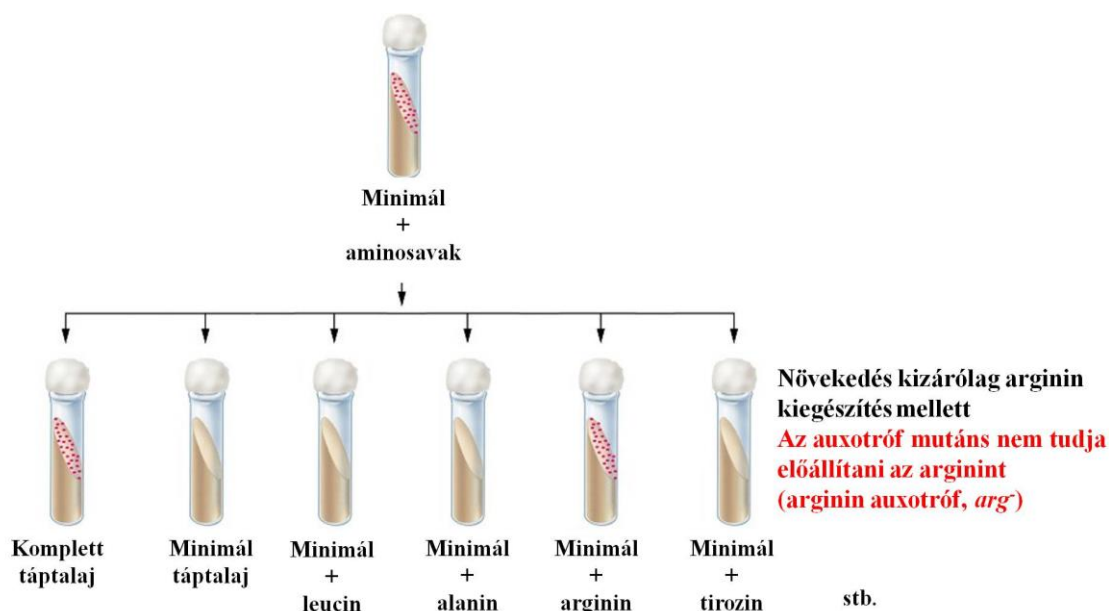
5.12. ábra: Auxotrófok kiválogatása

Az auxotrófokat tovább szűrték: arra a csoportra volt szükségük, melyek az összes aminosavval kiegészített minimál táptalajon növekedni tudtak, mert ezek mindegyike valamelyik aminosav előállításában hibás (5.13. ábra).



5.13. ábra: Aminosav auxotrófok kiválogatása

Végül már csak az aminosav auxotrófokat kellett egyenként tesztelni arra, hogy közülük melyik arginin auxotróf, vagyis melyik képes kizárólag argininnel kiegészített tápközegben növekedni (5.14. ábra).

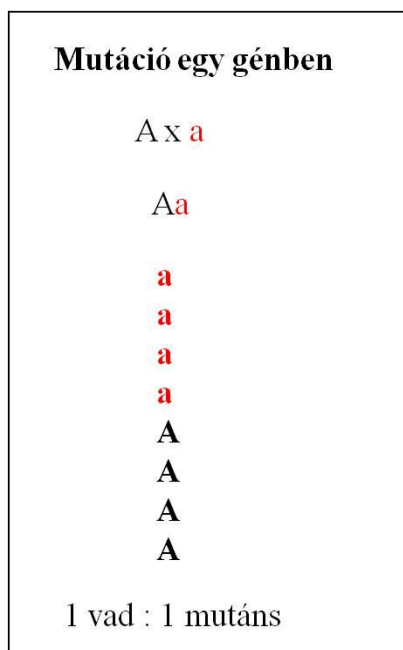


5.14. ábra: Arginin auxotrófok kiválogatása

Miután találtak néhány arginin auxotrófot, két alapvető genetikai teszt elvégzése következett, melyek semmilyen klasszikus genetikai analízisből nem hagyhatók ki. Ezek célja:

- igazolni, hogy az adott vonalban csak egy mutáció van jelen

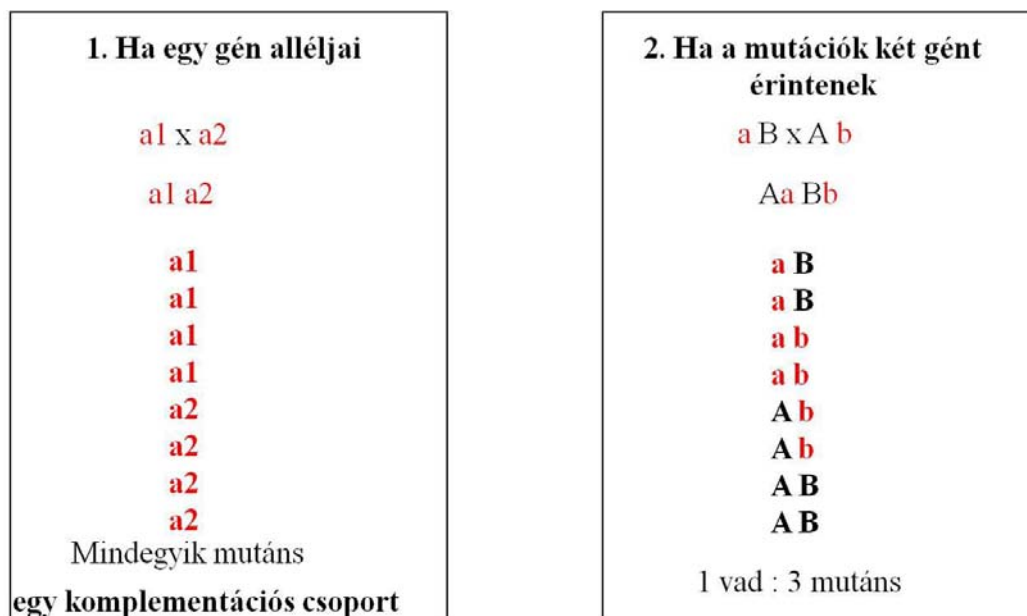
Csakis olyan mutánssal érdemes dolgozni, melyben az adott fenotípus egyetlen mutációnak a következménye. A „kikeresztezést” (outcrossing) általában alkalmazzák indukált mutagenézissel induló mutánsparc előállításakor. Ez azt jelenti, hogy ha kezünkben van az „érdekes” fenotípusú mutáns, akkor néhány generáción keresztül a vad típussal keresztezzük, minden generációban az „érdekes” fenotípusú egyedekkel megyünk tovább. Ezzel elérhető, hogy az „érdekes” fenotípust okozó mutáción kívül a genomból eltűnjenek az indukált mutagenézis során esetlegesen létrejött más mutációk. *Neurospora crassa* esetében a mutáns és a vad vonal párosításából származó utódok 1:1 arányú hasadása igazolja, hogy a mutánsban egy gént érint a mutáció (5.15. ábra).



5.15. ábra: Az 1:1 arányú hasadás igazolja, hogy egyetlen gén mutációja okozza az arginin auxotrófiát

- a mutánsokat (pontosabban az általuk hordozott mutációkat) komplementációs csoportokba sorolni

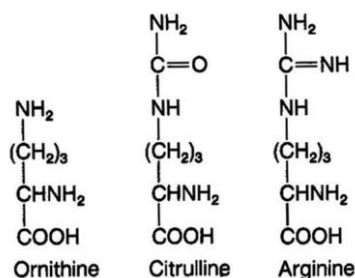
A komplementációs csoportba sorolás célja annak megállapítása, hogy az izolált, azonos fenotípusú (itt arginin auxotróf) mutánsok közül melyek azok, amelyek ugyanabban a génben hordoznak mutációt, azaz allélikusak, és melyek azok, melyek különböző gének mutációi hatására lettek arginin auxotrófok. A komplementációs analízissel végeredményben azt állapítjuk meg, hogy a kezünkben lévő mutánsok által hány darab, az adott fenotípust befolyásoló gént azonosítottunk. Leegyszerűsítve, az egymást komplementáló mutációk különböző géneket érintenek, más kifejezéssel: különböző komplementációs csoportba tartoznak. Ha két mutáció esetén a komplementáció elmarad, akkor azok ugyanazt a gént érintik, azaz egy komplementációs csoportba tartoznak. Egy genetikai analízis során minél több komplementációs csoport, azaz a folyamatot érintő minél több gén azonosítása kívánatos, mert így tárható fel minél részletesebben a folyamat genetikai-bio-kémiai háttere. Páronként keresztezve példánkban az arginin auxotrófokat, az alábbi séma szerint végezhető el a komplementációs analízis (5.16. ábra):



5.16. ábra: Az arginin auxotrófok komplementációs csoportokba sorolásának kísérleti vázlata

Beadle és Tatum három olyan mutánst találtak, melyek különböző komplementációs csoportba tartoztak. A három komplementációs csoport egy-egy tagja által tehát három arginin bioszintézisben részt vevő gént sikerült „fűlön csípni”. (Ezek az *arg-1*, *arg-2*, *arg-3* gének, a mutánsokat jelöljük *arg-1*, *arg-2*, *arg-3* jelöléssel, utalva arra, hogy három különböző génben hibásak.)

A mutánsok izolálása és jellemzése után következhetett a biokémiai munka. Az argininén kívül annak rokonvegyületeire nézve is tesztelték, hogy a három arginin auxotróf mutáns vajon menekíthető-e az argininén kívül más, hasonló szerkezetű vegyülettel is, például ornitinnal vagy citrullinnal (5.17. ábra).



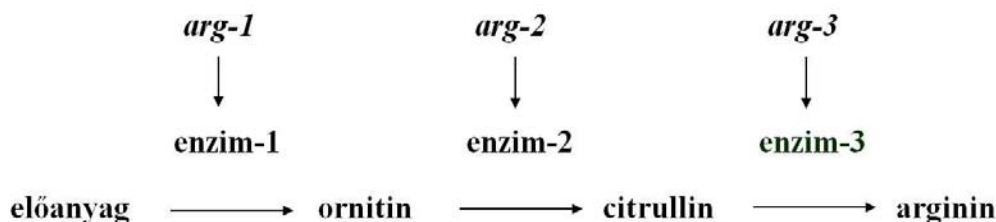
5.17. ábra: Az arginin és két rokonvegyület, az ornitin és citrullin szerkezeti képlete

A menekítési kísérlet eredményeit foglalja össze az 5.3. táblázat.

5.3. táblázat: A menekítési kísérlet eredményeinek összefoglalása
(+ van növekedés, - nincs növekedés)

	ornitin	citrullin	arginin
<i>arg-1</i>	+	+	+
<i>arg-2</i>	-	+	+
<i>arg-3</i>	-	-	+

Ez a menekítési mintázat egy bioszintézis útvonalra utal. Egy adott mutáns csak annak a vegyületnek a bioszintézisére képtelen, mely a prekursorok sorában először képes minimál táptalajon a mutánst menekíteni. A bioszintézis útvonal elemeit az 5.18. ábrán látjuk sorbarendezeve.



5.18. ábra: Az arginin bioszintézis útvonal elemeinek sorbarendezeve

A bioszintetikus út minden egyes lépését egy-egy specifikus enzim végzi. Minden enzimet külön-külön egy-egy gén határoz meg. A modell az egy gén – egy enzim hipotézis néven vonult be a tudományág szóhasználatába. Más kutatók más rendszerekkel hasonló eredményeket kaptak. Az arginin bioszintetikus út helyességét is részletekbe menően igazolták, s a működésképtelen enzimeket is kimutatták.

A bemutatott kísérleti séma általánosan alkalmazható bioszintetikus utak felderítésére.

5.5.7. Egy genetikai útvonal episztázis analízise

Genetikai útvonalaknak tekintjük azokat a sejten belüli és sejtek közötti jeltovábbító rendszereket, melyek gének működésének megváltoztatását eredményezik. A biokémiai szintézis útvonalakhoz hasonlóan a jelátviteli rendszerek több elemből állnak, és az elemek szekvenciálisan működnek. (A valóságban ennél komplexebb a működésük a különféle visszacsatolási hurkok és a különféle jelátviteli útvonalak közötti kereszt-hatások miatt.) A genetikai útvonal elemei olyan jeltovábbító fehérjék, melyek a következő elem aktivitását befolyásolják annak függvényében, hogy ők maguk aktív vagy inaktív állapotban vannak-e. Ezt pedig az előző elem aktivitása határozza meg, és így tovább. Az útvonal utolsó tagja meghatározott gén vagy gének kifejeződését befolyásoló szabályozó fehérje (transzkripció faktor, lásd a 7. génkifejeződésről szóló fejezeteket). A génszabályozás célirányos megváltoztatásával érhető el egy szignál által kiváltott sejtválasz (például ilyen szignál a sejtet érő növekedési faktor, melynek hatására a sejt osztódik).

Ahhoz, hogy megértsük, hogyan lehet azonosítani egy genetikai útvonal elemeit, és hogyan lehet felderíteni a klasszikus genetika eszköztárával az elemek közötti gátlási-aktiválási viszonyokat, a *Caenorhabditis elegans* modellszervezetet vesszük példának.

A *Caenorhabditis elegans* modellszervezet bemutatása

A *C. elegans* körülbelül egy milliméter hosszú, a talajban élő fonálféreg. Minden szárazföldön elterjedt. Laboratóriumi fenntartásuk agar lemezen történik, a lemezre oltott *E. coli* baktériumokkal táplálkoznak. Óriási előny, hogy $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is tárolhatók a törzsek. Hermafrodita alakjai (XX ivari kromoszómákkal) és hím (X0, vagyis egy X ivari kromoszómával rendelkező) alakjai vannak. A hímek csak 0,1–0,2 %-ban jelennek meg a természetes populációkban (ivari kromoszóma nondisjunkció következtében). A kromoszómák szétválását érintő bizonyos mutáns törzseiben körülbelül 30% a hímek aránya.

Ezek a törzsek szükségesek a genetikai munkában alkalmazott keresztmegtermékenyítéshez. A hermafroditák petéket raknak, ezekből lárva bújik ki. A lárva növekszik, többször vedlik, míg kifejlett állattá (adult) válik. A *C. elegans* esetében a szokásos laboratóriumi feltételek között egy életciklus mindössze körülbelül három napig tart, ami rövidnek számít, és igen előnyös a rajta végzett kísérletes munka szempontjából.

A kifejlett állat élettartama rövid, ezért viszonylag könnyű megővekedett, illetve csökkent élethosszú (ún. age) mutánsokat izolálni. Emiatt az öregedéskutatás területén kedvelt modell. A kifejlett egyedek morfológiája nagyon leegyszerűsített. A hermafroditák testüregének nagy részét a gonádok teszik ki. Az ivarnyílást (vulva) a két gonádkarral az uterusz kapcsolja össze. A gonádok teljes hosszuk felénél visszahajlanak, disztális (az uterusztól távoli) és proximális (az uteruszhoz közeli) karta alkotnak. A proximális karokon az uterusz fele haladva petevezetékét és spermatékát találunk. A gonádok petesejteket és spermiumot egyaránt termelnek. A petevezetékét az uterusz felé növekvő méretű petesejtek töltik ki. A spermatékában tárolt spermiumok által történik a hermafroditák önmegtermékenyítése. Ha hermafrodita egyedeket hímmel párosztatnak, akkor a hím spermiumai abszolút előnyt élveznek a hermafrodita saját spermiumaival szemben.

A felnőtt egyed testében csak nemosztódó sejtek vannak: hermafroditáknál 939 darab, hímeknél 1031 darab. A sejtek leszármazási sorsa invariáns, azaz szigorúan determinált, hogy melyik sejtől milyen szövetféleség lesz. Ezek a sejtvonalak teljes pontossággal reprodukálódhatnak. A sejtek leszármazása az alábbi technikákkal vizsgálható:

- az embriót kiveszik az uterusból, blasztomerjeit megjelölik (riportergénnel, fluoreszcens jelöléssel), osztódások során az utódsejtek is jelölődnek
- lézeres sejtltéziókat hoznak létre az embrióban, és vizsgálják, mi történik hatására, mi nem fejlődik ki
- Nomarski mikroszkópiával

Az egyedfejlődés során bizonyos sejtek (105 darab) egyértelmű sorsa, hogy programozott módon elhalnak. Emiatt a *C. elegans* a programozott sejthalál (apoptózis, jelentése lombhullás) kutatás kiváló modellje.

A *C. elegans* genomszekvenciája volt az első megismert szövetes eukarióta genomszekvencia (1998-ban határozták meg). A genom 97 Mbp méretű és 19000 gént tartalmaz. Egy génre átlagosan 5 kbp DNS esik. Az emberi gének körülbelül 70%-a rendelkezik *C. elegans* ortológgal. Genomjában a redundáns gének száma alacsony.

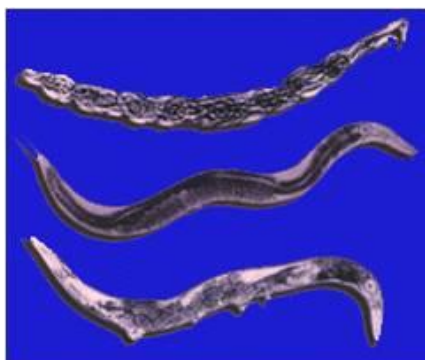
A közelmúltban három Nobel-díjat is kiérdemeltek az e modellszervezettel végzett kutatások:

- 2002 (orvosi)
Sydney Brenner – a féreggel végzett úttörő munkájáért
John Sulston – a sejtleszármazások feltérképezéséért
Robert Horvitz – a programozott sejthalál vizsgálatáért
- 2006 (orvosi)
Andrew Fire és Craig Mello – az RNS interferencia felfedezéséért (lásd az eukarióta génkifejeződés szabályozásáról szóló [10.](#) fejezetet)
- 2008 (kémiai)
Osamu Shimomura, Martin Chalfie és Roger Y. Tsien – a GFP (green fluorescent protein, zöld fluoreszcens protein) felfedezéséért és genetikai markerként való alkalmazásáért a féregben

A vulva (a hermafroditák ivarnyílása)

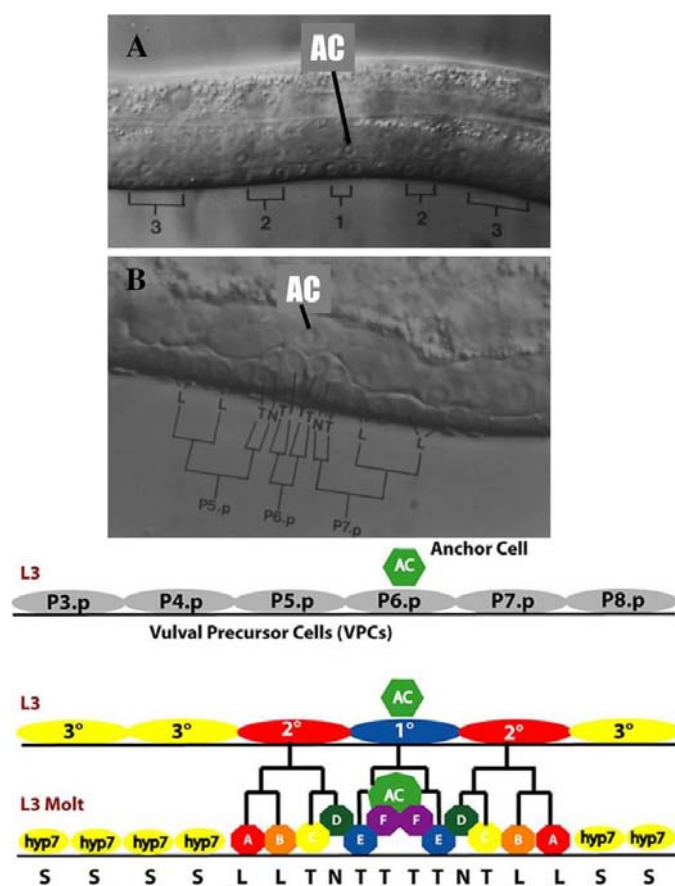
A genetikai útvonal, melynek analízisét bemutatjuk, a hermafrodita egyedek ivarnyílásának (vulvájának) fejlődését szabályozza. Normálisan egy vulva található a kifejlett féreg hasi oldalán, s kétféle, a vulvafejlődésben hibás mutántípus bizonyult izolálhatónak (5.19. ábra):

- vulvaless (Vul fenotípus) – vulva nélküli (az ivarnyílás hiánya miatt a hermafrodita nem tud lepetézni, a lárvák a testen belül fejlődnek ki, ami az anya pusztulásához vezet)
- multivulva (Muv fenotípus) – egynél több vulvaszerű képződmény fejlődik a hasi oldalon



5.19. ábra: *C. elegans* vulvaless, vad típusú és multivulva egyedei (fentről le)

A vulva néhány sejtből kialakított csőszerű képződmény, mely az uteruszt köti össze a külvilággal. Kialakulása az L3 lárvastádiumban zajlik. Bizonyos sejtek (ún. vulva prekursor sejtek) a környező sejtektől érkező molekuláris jelek hatására meghatározott sejtorsót vesznek fel (ezt 1°, 2°, 3° jelölik), ami azt jelenti, hogy a jelnek megfelelő módon differenciálódnak. Normál esetben meghatározott sejtek veszik fel ezeket a sejtorsókat. A szerv kialakulása, leegyszerűsítetten szólva, az adott sejtek meghatározott számú osztódásával történik (5.20. ábra).

5.20. ábra: A *C. elegans* vulvájának kialakulása

A vulva egyszerű szerv, de a kialakulásában több jelátviteli útvonal játszik közre. Ha a jelátviteli rendszerek valamely eleme(i) hibás(ak), akkor a sejtek nem a megfelelő módon differenciálódnak. E hibák következménye lehet, hogy egyáltalán nem fejlődik vulva, vagy az, hogy egynél több vulva fejlődik.

A továbbiakban bemutatjuk a genetikai analízis menetét lépésről lépésre.

Vulvafejlődésben érintett mutánsok izolálása, s azt követő komplementációs analízis

Tegyük fel, hogy izolálunk 10 vulva nélküli és 10 multivulva mutánst. Ezek a vonalak alkotják a kiindulási mutánsparcát. Mint azt már korábban többször láttuk, első lépésként a mutánsparc tagjait komplementációs csoportokba kell sorolni. Ehhez páronként keresztezzük az azonos fenotípust mutató vonalak egyedeit. Az egymást nem komplementáló vonalakban egyazon gén tartalmazza a fenotípust kialakító mutációt (azonos komplementációs csoportba tartoznak). Az egymást komplementáló vonalak tagjaiban különböző gének mutációja vezet ugyanazon fenotípus kialakulásához. Az alábbi példában konkrét kísérleti eredményeket mutatunk be. A komplementációs analízis eredményeként a vulvaless mutánsok két, a multivulva mutánsok pedig három komplementációs csoportba sorolhatók. Ez azt jelenti, hogy öt vulvafejlődésben részt vevő gén érintett a mutánsok által. Minden komplementációs csoportból kiválasztottak egy képviselőt a további analízishez, ezek:

- Vul (vulvaless) mutánsok: lin-45, let-23
- Muv (multivulva) mutánsok: lin-1, let-60, lin-15
(a fenti jelölések a törzseket jelentik, a megfelelő géneket hasonlóképpen, de dőlt betűvel írjuk, a vad allél +, a mutáns allél - jelzést kap)

A kettős mutánsok fenotípusának megállapítása

A fenti öt gén termékéről tehát tudjuk, hogy mutációjuk milyen fenotípushoz vezet. Az episztatikus viszonyok megállapításához ismerni kell a kettős mutánsok fenotípusát. Ennek megállapítása az alábbiak szerint történik a *lin-45* és a *lin-1* példáján (5.21. ábra):

P	<i>lin-45⁻/lin-45⁻ ; lin-1⁺/lin-1⁺</i>	x	<i>lin-45⁺/lin-45⁺ ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>
F1	mind	<i>lin-45⁺/lin-45⁻ ; lin-1⁺/lin-1⁻</i>	vad fenotípus (inter se)
F2	9	<i>lin-45⁺/– ; lin-1⁺/–</i>	vad fenotípus
	3	<i>lin-45⁺/– ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	Muv
	3	<i>lin-45⁻/lin-45⁻ ; lin-1⁺/–</i>	Vul
	1	<i>lin-45⁻/lin-45⁻ ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	kettős mutáns > fenotípus?

Az F2 9:3:4 aránya bizonytalan lehet, ezért:

Kiszedünk F2 Muv-kat, majd megnézzük, hogy önmegtermékenyítéssel milyen utódokat szegregál

<i>lin-45⁺/– ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	→ 3	<i>lin-45⁺/– ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	Muv
	→ 1	<i>lin-45⁻/lin-45⁻ ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	? Muv vagy Vul

- Ha minden utód Muv, akkor a kettős homozigóta is Muv
- Ha az utódok 3:1 arányban Muv:Vul, akkor a kettős homozigóta Vul

5.21. ábra: Kettős mutánsok fenotípusának megállapítása

A két csoport tagjaival minden páros kombinációban el kell végezni a fenti séma szerinti kettős mutáns fenotípus-analízist. Az eredményeket az 5.4 táblázat foglalja össze.

5.4. táblázat: A kettős mutánsok fenotípusának összefoglalása

	lin-1 Muv	let-60 Muv	lin-15 Muv
lin-45 Vul	Muv	Vul	Vul
let-23 Vul	Muv	Muv	Vul

Az episztatikus viszonyok megállapítása

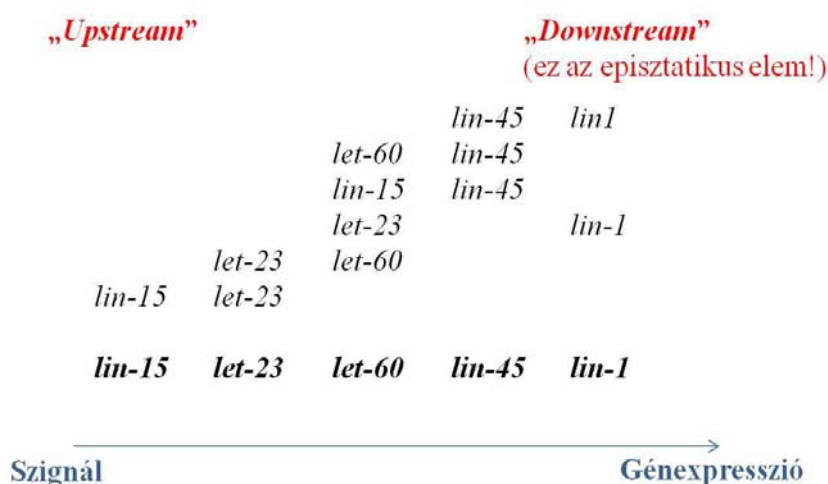
Az 5.4. táblázatba foglalt eredmények szerint a kettős mutáns fenotípusok valamely egyes mutáns fenotípusával egyeznek meg. Páronként vizsgálva a géneket, az a gén episztatikus a másik gén felett, amelynek mutáns fenotípusával megegyezik a kettős mutáns fenotípusa.

Például:

<i>lin-45⁻/lin-45⁻</i>	egyes mutáns Vul
<i>lin-1⁻/lin-1⁻</i>	egyes mutáns Muv
<i>lin-45⁻/lin-45⁻ ; lin-1⁻/lin-1⁻</i>	kettős mutáns Muv

A fentiekből az következik, hogy a *lin-1* gén episztatikus a *lin-45* gén felett, mert *lin-1⁻/lin-1⁻* genotípus (a *lin-45* gén allélösszetételétől függetlenül) ugyanazon (Muv) fenotípus kialakulásához vezet.

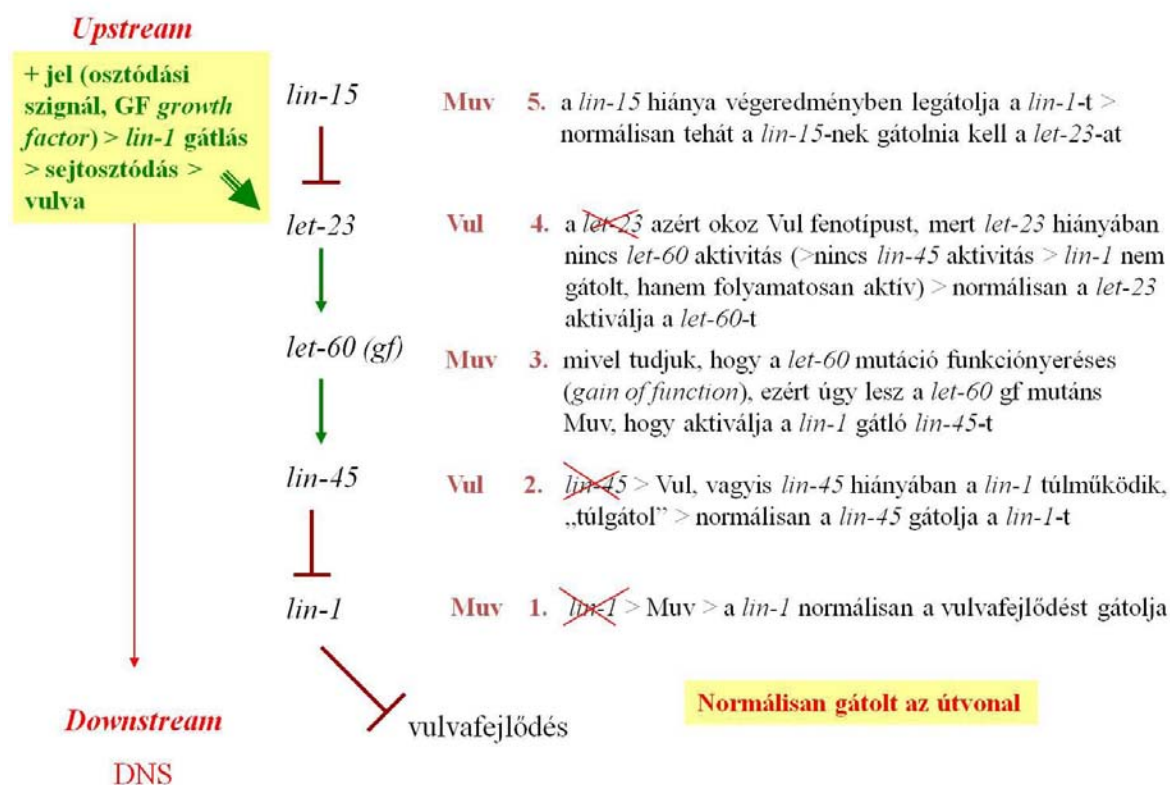
A genetikai útvonalaknál az episztatikus viszonyokat másképp értelmezzük, mint ahogyan egy biokémiai reakciósor esetén láttuk (lásd a fejezet előző szakaszában). Genetikai útvonalaknál a downstream elem episztatikus az upstream elemhez képest. A downstream irányon a folyamatsor végéhez mutató irányt értjük, a legutolsó (the most downstream) elem a génnek kifejeződését befolyásoló transzkripció faktor. Ha például a transzkripció faktor mutáns, akkor ahhoz kapcsolódik egy bizonyos fenotípus. Ha a transzkripció faktor mutációján kívül egy – a folyamatsorban előbb lévő, more upstream – elem is hibás (kettős mutáns), akkor is a transzkripció faktor mutációjának megfelelő fenotípus jelenik meg, vagyis a downstream elem episztatikus az upstream elem felett. Ez a logika a jelátviteli útvonal bármely két tagjára alkalmazható, és ennek alapján az elemek sorrendje meghatározható (5.22. ábra).



5.22. ábra: Egy jelátviteli útvonal elemeinek sorbarendezése a mutáns fenotípusok alapján

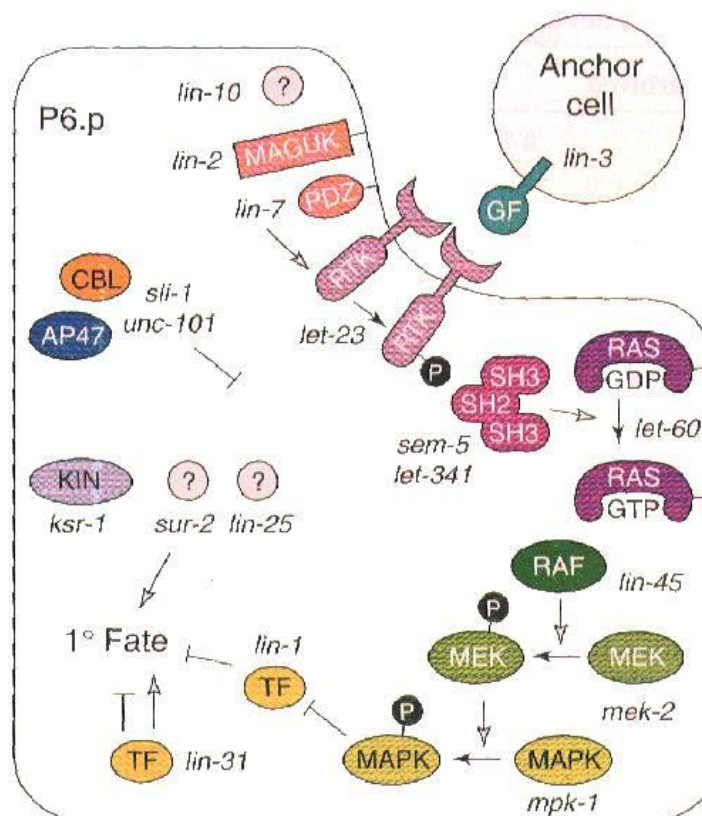
Az elemek közötti aktiválási és gátlási viszonyok megállapítása

Miután a szignáltól (upstream) a génkifejeződésig (downstream) sorba rendeltük a jelátviteli útvonal elemeit, az elemek közötti aktiválási, illetve gátlási viszonyokat is megállapíthatjuk. Ehhez célszerű a „the most downstream” elemtől „felé” haladni, és az elem mutáns fenotípusából következtetni annak normális funkciójára. Példánkhoz az 5.23. ábra nyújt magyarázatot.



5.23. ábra: A jelátviteli útvonal elemek közötti aktiválási és gátlási viszonyok megállapítása

Végül hangsúlyozzuk, hogy a vulvafejlődés példáján azonosított jelátviteli útvonal elemei konzervált, sejtosztódást szabályozó útvonal elemeinek (a Ras-Raf-MAPK) felelnek meg. A *lin-3* gén terméke az anchor sejt által kibocsátott epidermális növekedési faktor, ez az a jel, melyet a növekedési faktor receptor (példánkban a *let-23* gén terméke) érzékel, és továbbítja a sejtbe. A *let-60* kódolja a Ras, a *lin-45* pedig a Raf fehérjét, melyek a jelátvitel fontos citoplazmatikus komponensei. A „the most downstream” elem, a *lin-1* gén terméke, transzkripciós faktor, melynek aktivitása vagy inaktivitása meghatározza a sejtorsót, ebben az esetben azt, hogy a sejt osztódjon-e vagy sem (5.24. ábra). Rákos sejtekben gyakori a tárgyalt jelátviteli útvonal elemeinek abnormális működése.



5.24. ábra: A vulvafejlődést konzervált jelátviteli útvonal szabályozza

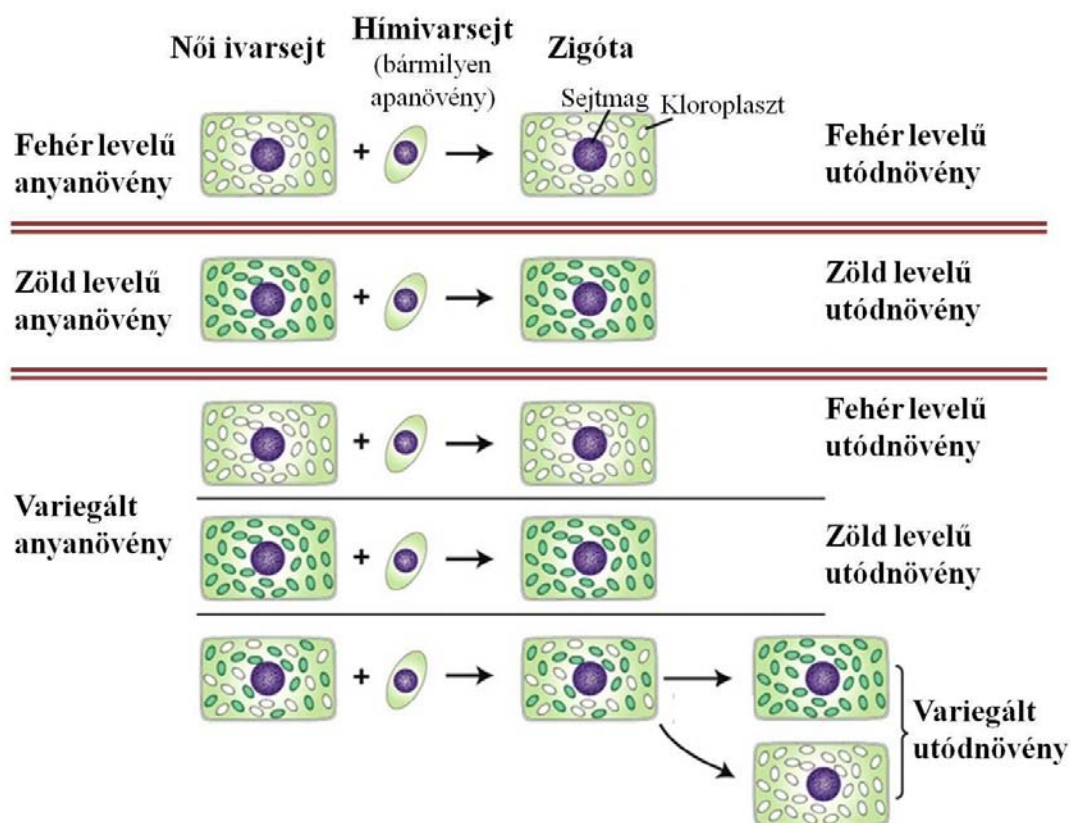
5.6. Extranukleáris öröklődés

Az extranukleáris (vagy citoplazmatikus) öröklődés a nem sejtmagi génekre jellemző. Eukarióta sejtekben a mitokondrium és a kloroplaszt organellumok rendelkeznek saját DNS-sel, melyeket mitokondriális (mtDNS) és kloroplaszt genomnak (cpDNS), együttesen pedig extranukleáris genomnak nevezünk. Az organellumok genomja cirkuláris, a nukleáris genomtól és a sejtciklustól függetlenül replikálódik (a sejtmagban kódolt, de organellum specifikus DNS-polimeráz által). A sejtekben ezek a sejtorganellumok több példányban vannak jelen, és organellumonként az mtDNS és a cpDNS kópiaszáma is több egynél (számuk változó). Fajok között széles mérettartománybeli eltéréseket találunk (akár néhány százszoros különbséget is). Az mtDNS állati szervezetekben kisebb, mint növényekben. A humán mtDNS mérete 17000 bp körüli; rRNS-géneket, tRNS-géneket és tizennégy, az oxidatív foszforilációban részt vevő, fehérjét kódoló gént tartalmaz. A mitokondriális fehérjék nagy része a sejtmagban kódolt, a citoplazmában szintetizálódik, majd importálódik a mitokondriumba (ez a kloroplaszt fehérjék zöme is igaz). A cpDNS többnyire egy-két nagyságrenddel nagyobb a mtDNS-nél. A dohány cpDNS-mérete például 156000 bp körüli; rRNS-, tRNS-géneket és számos, a fotoszintézisben részt vevő fehérjekódoló gént tartalmaz.

Az extranukleáris öröklődés felismeréséhez vezető első megfigyeléseket Carl **Correns** (a mendeli törvények egyik újrafelfedezője) tette 1909-ben. Csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*) növényénél figyelt fel arra, hogy a szár és levél színét – ami lehet teljesen zöld, teljesen fehér, vagy zöld-fehér variegált – kizárólag az anyai szülő határozza meg. El is nevezte ezt az öröklődési formát **anyai öröklődésnek**.

Hangsúlyozni kell, hogy az anyai öröklődés és az anyai hatás nem ugyanazt jelenti. Ez utóbbi kifejezést azon anyai hatású gének öröklődésével kapcsolatban használjuk, melyek a nukleáris genomban kódoltak, és melynek termékei a petesejtbe kerülve a korai embrionális fejlődést irányítják. Az anyai hatású génekre jellemző a mendeli öröklődés, azzal a kiegészítéssel, hogy a fenotípusos hasadás egy generációval megkérik: az anya genotípusa az utódok fenotípusában tükröződik ezekre a sajátságokra nézve.

Az anyai öröklődés a csodatölcsér esetén a kloroplaszt gének öröklődésével magyarázható: csak az anya kloroplasztiszai kerülnek a petesejten keresztül a zigótába, a pollenszemcsék nem tartalmaznak kloroplasztot. A levelek fenotípusa attól függ, hogy a zöld színtest keletkezik-e bennük (vad típusú cpDNS), vagy sem (mutáns cpDNS). A csak vad típusú DNS-sel rendelkező kloroplasztokat tartalmazó sejtek osztódásával zöld szövet keletkezik, a mutációt hordozó cpDNS-t tartalmazó sejtek pedig fehér szövetet hoznak létre. Ha egy sejtben mindkét féle cpDNS jelen van, akkor is zöld fenotípus alakul ki. Az egy sejtben belül különféle organelláris DNS jelenlétét (a kloroplaszt és a mitokondrium vonatkozásában is) **heteroplazmia** jelenségnek hívják. Milyen utódokat képez egy heteroplazmiás petesejt a fenti példában? Mitotikus sejtosztódás során a sejtorganellek random jutnak az utódsejtekbe (5.25. ábra). Ennek következménye, hogy az utód fejlődése során létrejöhetnek olyan sejtek, melyek kizárólag mutáns cpDNS-t hordoznak, ezen sejtek osztódásával kialakulnak mutáns cpDNS-t tartalmazó sejtklónok, azaz fehér színű szektorok a növényben. A csak vad vagy mindkétféle cpDNS-sel rendelkező sejtek alkotta szövetek zöld szektorként jelennek meg. A variegált fenotípusú növény tehát heteroplazmiás petesejtből alakulhat ki (5.25. és 5.26. ábra). A sejtek mitotikus osztódása során különváló fenotípusok kialakulását **citoplazmás szegregáció**nak is nevezik.



5.25. ábra: Kloroplaszt gének citoplazmatikus öröklődése



5.26. ábra: Variegált fenotípusú csodatölcsér növény

Nem növényi rendszerben hasonló megfigyelést először 1952-ben publikált Mary **Mitchell** és Herschel **Mitchell**. *Neurospora crassa* gombában írták le a poky mutáció anyai öröklődését. A poky (lassan növvő) fenotípust egy mtDNS-mutáció miatti oxidatív foszforiláció hiba okozta.

Meg kell jegyezni, hogy bár az mtDNS és a cpDNS a legtöbb esetben anyai uniparentális öröklődést mutat, a természetben ismerünk példákat uniparentális apai (csak az apai organelláris DNS kerül az utódba) és biparentális (mindkét szülőből átjut organelláris genom az utódba) citoplazmatikus öröklődésre is. Ezek a mechanizmusok fajonként változók lehetnek. A szakirodalomban a humán mtDNS apai öröklődésének ritka eseteivel is találkozhatunk. Egérben kimutatták, hogy az utódokba került apai: anyai mitokondriumok aránya 1–4:100000.

A humán mtDNS – néhány ritka esettől eltekintve – anyai öröklődésű. Számos mtDNS-mutáció vezet súlyos kórképek kialakulásához. A mutációk a respirációs lánc alulműködését, ezáltal ATP-depléciót okoznak, ami komplex, krónikus degeneratív megbetegedésekhez vezet. A tünetek tipikusan az agy, a szív, az izmok, a vesék, az endokrin szövetek működését érintik.

6. A DNS szerkezete és replikációja

Foglaljuk össze, milyen kulcsfunkciókkal kell rendelkeznie a genetikai anyagnak:

- A többsejtű szervezetek minden sejtjének ugyanazzal az öröklődő információval kell rendelkeznie, tehát a sejtek osztódása során a genetikai anyag **hű másolására** van szükség. Az élővilág nagy részében az ivarsejtek által kerül átadásra az élőlények genetikai anyaga generációról-generációra, és ezáltal a szülőkhöz hasonló élőlények jönnek létre, tehát a pontos másolás az ivarsejtek kialakulásához is elengedhetetlen.
- A genetikai anyag **információt hordoz**. Az információ alapján épülnek fel a sejteket kialakító és működtető molekulák, ami a sejtek által felépített szövet, szervezet felépítését és működését meghatározza.
- Az öröklődő változások, vagyis a mutációk szolgáltatják az evolúció (biológiai változás) nyersanyagát, tehát a genetikai anyagnak képesnek kell lennie a **változékonyságra**. (A mutációkkal részletesebben foglalkozunk egy későbbi fejezetben).

A tudományos társadalom nagy része sokáig kételkedve fogadta a DNS örökítőanyag mivoltára utaló eredményeket, hiszen a DNS viszonylag egyszerű felépítésű polimer, monotonnak tűnő szerkezettel. Meg kellett érteni, hogy ez az egyszerűnek tűnő molekula hogyan képes betölteni az örökítőanyag szerepét, hogyan lehet alkalmas arra, hogy a Földön élő szervezetek óriási diverzitásának alapját biztosítsa, és hogyan képes a tulajdonságok generációról-generációra történő átadására. A kérdések megválaszolásához a szerkezeti modell lefektetése hozta meg az áttörést.

A DNS helyes szerkezeti modelljét James **Watson** mikrobiális genetikus és Francis **Crick** fizikus állították fel 1953-ban. A 20. század első felében számos kísérleti eredmény mutatott abba az irányba, hogy az örökítőanyag a DNS, és nem egyéb biomolekula (szénhidrát, fehérje, lipid).

A Watson–Crick modell számos kutató megelőző eredményeire épült. Felhasználták a DNS kémiai összetételéről, a bázisok arányairól felhalmozódott ismeretanyagot, valamint a DNS-ről készült röntgendiffrakciós felvételek adatait.

Mielőtt a DNS szerkezetének tárgyalására térünk, tekintsük át, mit lehetett tudni a génekről és a DNS-ről akkor, amikor Watson és Crick megkezdte történelmi jelentőségű munkáját. A legfontosabb ismereteket az alábbi pontok foglalják össze:

- A gén – a Mendel által leírt öröklődési faktorok – specifikus tulajdonságokhoz köthetők, de fizikai természetük ismeretlen. A mutációk megváltoztatják a gének funkcióját, de a mutációk molekuláris természete tisztázatlan.
- Az egy-gén-egy-protein hipotézis szerint a gének határozzák meg a fehérjék szerkezetét (lásd a génkifejeződés [7.](#) fejezetet).
- A géneket a kromoszómák hordozzák (lásd a [2.4.](#) nemhez kötött öröklődés és a [2.4.5.](#) kromoszómaelmélet témaköröket).
- Az 1920–50-es években egy sor kísérlet utalt arra, hogy a DNS a genetikai anyag. Az alábbiakban két ide vonatkozó, nagy jelentőségű kísérletet mutatunk be.

6.1. A DNS mint genetikai anyag

6.1.1. A transzformáció felfedezése

1928-ban Frederick **Griffith** *Streptococcus pneumoniae* baktériumokon érdekes és tudományos szempontból igen fontos megfigyelést tett. A baktérium emberben tüdőgyulladást okoz, laboratóriumi egereket megfertőzve az állatok pusztulásához vezet. Léteznek kevésbé virulens törzsek is. Griffith egy virulens és egy avirulens törzzsel kísérletezett. Laboratóriumi körülmények között, agaros táptalajon tenyésztve a két törzs az általuk képzett telepek alapján egymástól megkülönböztethető volt:

- a virulens törzs sejtjei vastag poliszacharid tokot termeltek, mely „sima” megjelenést kölcsönzött a sejtek millióiból álló telepeknek (az angol *smooth* = sima kifejezésből azt a törzset Griffith *S* törzsnek nevezte).
- az avirulens törzs sejtjei nem termeltek tokot, a sejtek által képzett telepek kompaktabbak, „durva” megjelenésűek voltak (az angol *rough* = durva kifejezésből ez a törzs az *R* jelet kapta).

A forralással elpusztított *S*-sejtekkel beoltott egerek életben maradtak. Ha azonban a felforralt *S*-sejteket *R*-sejtekkel keverte össze, akkor az egerek elpusztultak, és a tetejükből Griffith *S*-sejteket tudott izolálni, melyek teljesen fertőzőképesnek bizonyultak. Az elölt *S*-sejtek maradványa tehát valamilyen módon átalakította (transzformálta) az avirulens *R*-sejteket. Úgy is mondhatjuk, hogy az *S*-sejtekből származó molekula átadódott az *R*-sejteknek, felruházva azokat egy új tulajdonsággal, a virulencia képességével, és ez a tulajdonság átörökíthető volt. Leegyszerűsítve: az *S*-törzs örökítőanyaga, de legalábbis a virulencia génje átjutott az *R*-törzsbe. Azt a jelenséget, amikor örökítőanyag jut át egyik szervezetből a másikba, általánosságban **genetikai transzformációnak** nevezzük.

Az elölt *S*-sejtek azon kémiai komponensét kellett megkeresni, amelyik az *R*-sejtek transzformációját okozta, mivel nyilvánvalónak tűnt, hogy a transzformáló anyag a baktérium örökítőanyaga. 1944-ben – Griffith kísérletének továbbvitelével – Oswald **Avery**, Colin **MacLeod** és Maclyn **McCarty** találta meg ezt a komponenst. Kísérleteikben külön-külön szelektíven degradálták a felforralt *S*-sejtek maradványában az egyes biomolekula típusokat: poliszacharidokat, lipideket, fehérjéket, RNS-t, DNS-t. Az egyes mintákkal aztán tesztelték, hogy megmaradt-e azok transzformáló képessége vagy sem. Csak a DNS-bontó enzimmel (DNázsal) kezelt mintáknak tűnt el a transzformáló sajátsága, és ez azt jelentette, hogy a genetikai információ molekuláris hordozója a DNS. Ma már tudjuk, hogy a virulenciát okozó transzformáló DNS-szakasz beépült az *R*-sejtek kromoszómájába úgy, hogy közben „helyet cserélt” a megfelelő, de virulenciát okozni nem képes DNS-szakasszal (a DNS-szakaszok kicserélődése rekombináció útján megy végbe).

6.1.2. A Hershey–Chase kísérlet

A bemutatott transzformációs kísérletek erős bizonyítékul szolgáltak a DNS örökítőanyag mivoltára vonatkozóan, de sok kutató továbbra is vonakodott az eredményeket elfogadni. Hogyan képes egy ilyen alacsony komplexitású molekula betölteni az örökítőanyag funkcióit? A fehérjék sokkal változatosabbak, és szintén részei a kromoszómáknak, így egyes tudósok továbbra is úgy gondolták, hogy ezek a molekulák felelősek az öröklődő sajátságok kialakításáért. 1952-ben Alfred **Hershey** és Martha **Chase** újabb bizonyítékot szolgáltatott. A legegyszerűbb biológiai rendszerek, a vírusok közül választottak alanyt a kísérleteikhez, s ez az *Escherichia coli* baktériumot fertőző T2 el-

nevezésű fág volt. Úgy gondolták, hogy ha meg tudják állapítani, hogy a fág mely molekulafélesége jut be a baktériumsejtekbe a fertőzéskor, akkor ezzel azonosítani tudják a fág genetikai anyagát, hiszen a baktériumba az a molekulatípus kerül be a fágból, amely képes újabb fágreszcsek kialakításának irányítására. A fágok csak kétféle molekulaféleséget tartalmaznak: a feji rész DNS-ből és az azt körülölelő fehérjeburokból áll, a farokstruktúra pedig kizárólag fehérjéből épül fel. DNS-molekulák nyomkövetésére olyan fágkultúrát hoztak létre, mely radioaktív foszfort tartalmazott. (^{32}P -t tartalmazó tápfolyadékban növesztett fágreszcsek a radioaktív foszfort beépítik a DNS-ükbe, de a fehérjébe nem, mert azok nem tartalmaznak foszfort.) Egy másik fágkultúrát pedig radioaktív kén (^{35}S) tartalmú tápfolyadékban hoztak létre, megjelölve ezáltal kizárólagosan a fehérjét, hiszen a DNS nem tartalmaz ként. A kétféleképpen jelölt fágkultúrával megfertőzték az *E. coli* sejteket: összekeverték a fágokat a baktériumokkal folyadékkultúrában, és néhány perc kitapadási időt követően erős rázásnak vetették alá az elegyet (konyhai turmixgéppel), ami által a baktériumok felszínéhez tapadt, de a sejtekbe be nem jutott fágreszcsek leváltak, és centrifugálás hatására a felülúszóba kerültek, míg a baktériumsejtek (a beinjektált fág genetikai anyaggal együtt) lecsúsztek az üledékbe. Ezután az egyes frakciókban vizsgálták a radioaktivitást: a ^{32}P -jelölt kultúra esetében a radioaktivitás az üledékben (a baktériumsejtekben), a ^{35}S -jelölt fágoknál pedig a radioaktivitás csak a felülúszóban (a baktériumsejteken kívül) volt kimutatható. A konklúzió egyértelmű: a fág örökítőanyaga a DNS; a fehérjék csak csomagoló, szállítóanyagként funkcionálnak, és fertőzéskor nem jutnak be a baktériumokba.

6.2. A DNS szerkezete

6.2.1. Mit tudtak a DNS-ről a Watson–Crick modell előtt?

A DNS építőkövei

A Watson–Crick modell megszületése előtt már ismeretes volt, hogy a DNS (dezoxiribonukleinsav) háromféle alkotóelemből áll: foszfátcsoportból, cukor (dezoxiribóz) részből és négyféle nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületből vagy bázisból (ezek az adenin, guanin, citozin és timin). A bázisok és a cukor rész C-atomjait arab számokkal jelölik (bázisoknál 1, 2, 3 stb., a cukornál 1', 2', 3' stb.). A dezoxiribóz 2' C-atomjához – a ribózzal ellentétben – nem kapcsolódik –OH csoport. Az adenin és a guanin kettős gyűrűt alkotó purinvázis bázisok, a citozin és a timin pedig egyetlen gyűrűt képező pirimidinvázis vegyületek. Egy foszfátcsoport, egy dezoxiribóz és a négyféle bázis egyike alkot egy **nukleotid**nak nevezett egységet (6.2. ábra). A nukleotidok kémiai elnevezése: dezoxiadenozin 5'-monofoszfát (dAMP), dezoxiguanozin 5'-monofoszfát (dGMP), dezoxicitidin 5'-monofoszfát (dCMP), dezoxitimidin 5'-monofoszfát (dTMP). A négyféle nukleotidot az egyes bázisok kezdőbetűivel jelöljük (A, G, C, T).

A DNS-t alkotó nukleotidok (bázisok) aránya

A DNS-t alkotó nukleotidok aránya meghatározott. Erre a felismerésre Erwin **Chargaff** jutott az 1940–50-es években, amikor különféle élőlényekből kivont DNS-mintákban meghatározta a négyféle bázis arányát.

- A purin nukleotidok mennyisége egyenlő a pirimidin nukleotidok mennyiségével: $A+G = C+T$
- Az A nukleotidok száma megegyezik a T nukleotidok számával, és a G nukleotidok száma megegyezik a C nukleotidok számával: $A=T$ és $G=C$

A különböző élőlényekben az A+T nem szükségszerűen egyenlő a G+C mennyiséggel, de arányuk egy fajon belül állandó. Ismerünk kifejezetten A+T-gazdag genomokat (például egy tengeri sünn faj, *Paracentrotus lividus* $(A+T) / (G+C) = 1,85$), illetve G+C-gazdag genomokat is (például *Mycobacterium tuberculosis* $(A+T) / (G+C) = 0,42$). Egy genomon belül is váltakozhat a G+C és az A+T tartalom. A G+C-gazdag DNS-szakaszok – az A+T-gazdag DNS-hez képest – stabilabbak. Ez megnyilvánul abban, hogy a kettős hélix hődenaturációja (ún. olvadása) megegyező bp-hosszúság esetén magasabb hőmérsékleten megy végbe G+C-gazdag fragmentumok esetén.

A DNS röntgendiffrakciós analízise

A DNS röntgendiffrakciós elemzésével Rosalind **Franklin** és Maurice **Wilkins** foglalkozott szintén az 1940–50-es években. Az adatok alapján úgy tűnt, hogy a DNS hosszú, vékony, egyenletes átmérőjű molekula, amely a teljes hosszán végigfutó két párhuzamos részből áll. A felvételek a molekula spirális szerkezetére is utaltak. A DNS-ről készült legjobb felvétel Franklin tudta nélkül került Watson és Crick kezébe, és ez kiemelkedő fontosságú volt a DNS háromdimenziós modelljének megalkotásához.

6.2.2. A DNS szerkezetének Watson–Crick modellje

Mint láttuk, a DNS összetételéről sok információ gyűlt össze az 1950-es évekre, de az még nem volt világos, hogy miként kapcsolódnak egymáshoz az egyes részek. Watson és Crick a DNS háromdimenziós szerkezetét leíró modelljét 1953-ban, egyoldalas cikk formájában publikálta a Nature című rangos tudományos szaklapban. A modellben mérészen összeillesztették a röntgendiffrakciós adatokat, a Chargaff-szabályokat és a DNS alkotórészeiről felhalmozódott kémiai ismereteket oly módon, hogy a modell eleget tegyen az örökítőanyaggal szemben támasztott követelményeknek (pontos másolás, információhordozás, változékonyság). Akkortájt több publikáció is megjelent a DNS szerkezetéről (lásd a Watson-Crick cikkben és a cikk hivatkozásai között), de kémiai és/vagy biológiai okokból egyik sem volt helytálló.



6.1. ábra: Watson és Crick a fizikai modell építése közben

Az alábbiakban áttekintjük a DNS szerkezetére vonatkozó mai ismereteket:

A DNS elsődleges szerkezete: foszfodiészter kötés

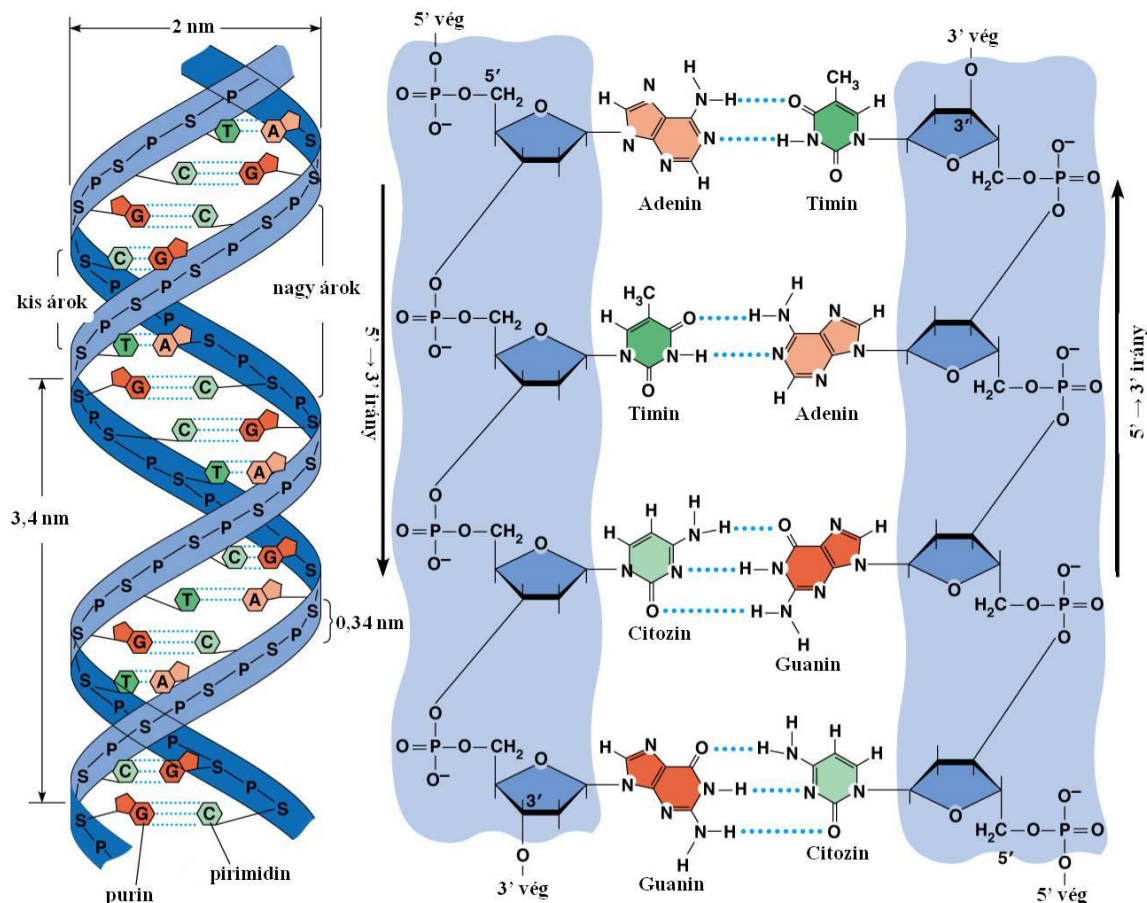
- A nukleotid egységek 3'-5'-foszfodiészter-kötéssel összekapcsolódva alkotják a polinukleotid láncokat
- Két polinukleotid lánc fut egymással párhuzamosan, de ellentétes (antiparallel) irányultságban. A szálak polaritását a cukor 5' és 3'C-atomjaihoz viszonyítjuk: a szálvégi nukleotidok egyike szabad foszfátcsoporthoz tartalmaz a cukor 5' C-atomjához kapcsoltan (ezt nevezzük a lánc 5' végének); a szál másik végén lévő nukleotid cukor egységén a 3' C-atomon szabad -OH-csoport van (ezt tekintjük a lánc 3' végének). Minden polinukleotid szál egyik végén tehát 5' foszfát-csoport, másik végén pedig 3' hidroxil-csoport található. Az antiparallelitást a két párhuzamos szál ellentétes 5' → 3' irányú lefutása adja (6.2. ábra).
- A két szál között a bázisok teremtenek kapcsolatot H-kötések révén. A hidrofíll cukor és a foszfát-csoportok a molekula külső felületén helyezkednek el.
- A szemközti bázisokat bázispároknak (rövidítése: bp; 1000 bp = 1 kbp, azaz kilo-bázispár) nevezzük. Minden bázispár egy purint és egy pirimidint tartalmaz, így biztosított a DNS-molekula egyenletes átmérője (2 nm). A bázisok közül az adenin timinnel, a citozin pedig guaninnal alkot párt (ez megfelel a Chargaff-szabálynak). A párokat kialakító bázisokat egymást kiegészítő vagy komplementer bázisoknak nevezzük. Az A-T párt 2, a G-C párt 3 hidrogénhid stabilizálja. Ezekről eltérő bázispárok csak igen ritkán alakulhatnak ki (lásd a 6.3. replikációról és a 8. mutációkról szóló fejezeteket).
- A DNS-szálak egyediségét az adott szakaszon egymást követő bázisok milyensége adja. Egy DNS-szakaszt tehát a bázisok sorrendje (szekvenciája) azonosít. A szálak szekvenciáját megegyezés szerint 5' → 3' irányban írjuk fel. A 6.2. ábra példáján az egyik szál szekvenciája (bázissorrendje) 5'- ATCG -3', a másik, komplementer szálé pedig 5'- CGAT-3'. A szakirodalomban (cikkekben, adatbázisokban stb.) egy DNS-szakasz szekvenciájának megadásakor elegendő csak az egyik (bármelyik) szál bázissorrendjét felírni, de ezt mindig következetesen balról 5' → jobbra 3' irányban tesszük (a legtöbbször a polaritást külön nem is jelöljük, mert a balról-jobbra olvasási irány ezt is megadja). Az egyik szál 5' → 3' irányú bázissorrendjének fordított irányú (reverz) komplementere adja a másik szál 5' → 3' irányú olvasatát.

A DNS másodlagos szerkezete: kettős spirál

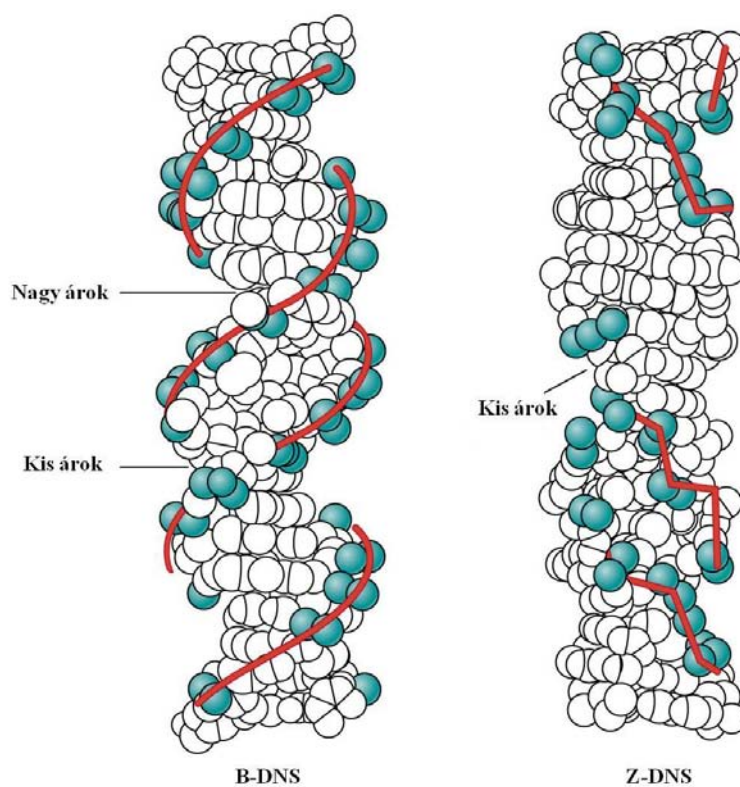
A két párhuzamosan futó DNS-szál egy közös tengely mentén spirálszerűen csavarodik, s ezt kettős spirál (double helix) szerkezetnek nevezzük. A kettős hélixet szalag, létra vagy térkitöltő formában szokták ábrázolni (6.2. és 6.3. ábrák).

A szalag és a létra ábrázolási formában a szalagok a két antiparallel lánc cukorfoszfát gerincét, a pálcák vagy sokszögek pedig a bázisokat képviselik. A bázispárok létrafokként helyezkednek el a szerkezet belsejében. A cukorgyűrű síkja majdnem merőleges a bázisok síkjára. A víztaszító bázisok szoros egymásra fekvése a víz kiszorítása által erősen stabilizálja a szerkezetet (két bázispár közötti távolság 0,34 nm). A hidrofíll cukor-foszfát gerinc kölcsönhatásban áll a sejt vízmolekuláival. A spirál 10 bázisonként fordul csaknem pontosan 360°-ot, egy csavarulat hossza 3,4 nm. A háromdimenziós szerkezet jól szemlélteti az ellentétes oldalakon futó kis és a nagy árkot. A DNS-kötő fehérjék ezeknél az árkoknál kapcsolódnak a bázisokhoz.

A DNS többféle másodlagos szerkezetet vehet fel (6.3. ábra). Az élőlényekben és vizes oldatban a „B” forma a leggyakoribb, melyre jobb menetes csavarulat jellemző, a bázisok síkja majdnem merőleges a cukor-foszfát gerincre. Dehidrált körülmények között egy tömörebb „A” forma jön létre, melyben a bázisok síkja megdől. Hosszú ismétlődések (például GCGCGC....) a „Z” formát vehetik fel, amely balmenetes, zezugos lefutású és megnyúlt.



6.2. ábra: A DNS elsődleges (jobbra) és másodlagos (balra) szerkezete



6.3. ábra: A DNS térkitöltő modellje

6.3. A DNS szintézise

A DNS szintézise (replikáció) rendkívül gyors és pontos folyamat. Egyetlen ember egyedfejlődése több millió sejtosztódást igényel, és minden sejtosztódást megelőzi a teljes genom megkettőződése (a sejtciklus S – szintézis – fázisában). A replikáció sebessége 1000 nukleotid/másodperc. A genom másolásánál csupán 1/100 000 000 (10^{-8}) replikációs hiba történik, melynek 99%-át a javító rendszerek (repair mechanizmusok) utólagosan kijavítják. Az átlagos mutációs ráta a replikáció végeztével 10^{-10} , vagyis a 10^9 bp genomméretű emberi sejt egy osztódása során 0–1 új mutáció keletkezik a replikáció hibája folytán.

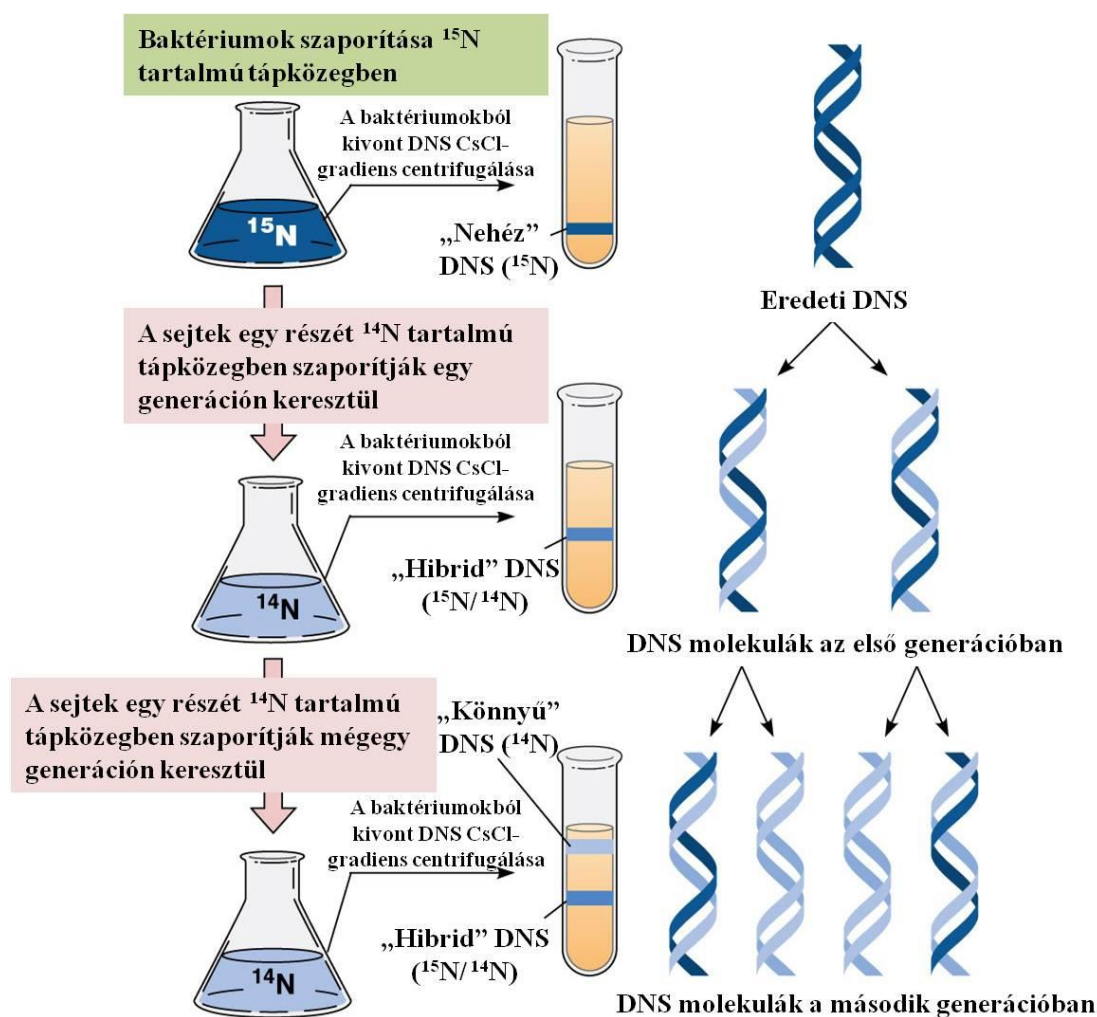
6.3.1. A DNS replikáció jóslata

A DNS kettős spirál szerkezetéből közvetlenül adódik a megkettőződés mikéntje, amire Watson és Crick már a modell publikálásakor utalt:

"It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material." (Nem kerülte el a figyelmünket az, hogy az általunk lefektetett specifikus bázispárosodásból közvetlenül adódik a genetikai anyag másolásának lehetséges mechanizmusa.) A bázispárosodás szigorú törvényéből az következik, hogy ha a kettős spirál két szála cipzárként kettéválik, mindkét szál mintaként (templátként) szolgálhat egy új szál szintéziséhez, aminek során az eredetivel és egymással megegyező molekulaszerkezetek jönnek létre. Ezzel magyarázatot nyer az örökítőanyag pontos átadódása a sejtosztódások során. A genetikai kódot a nukleotid sorrend adhatja.

6.3.2. A szemikonzervatív replikáció bizonyítása

A DNS másolása szemikonzervatív (félig konzervatív) módon történik. Ez azt jelenti, hogy a kettős szálú molekula másolásakor az egyik és a másik régi (szülői) szál mellé is szintetizálódik egy-egy új szál, így a létrejövő két kópia egyik szála régi, a másik pedig új lesz. Ezt Matthew **Meselson** és Franklin **Stahl** igazolta 1958-ban baktériumok örökítőanyagán. A céziumklorid (CsCl) sűrűséggradiens ultracentrifugálás során a DNS a fajsúlyának megfelelő sávban gyűlik össze. Ezt a jelenséget használták ki kísérleteikben. A több generáción keresztül ^{15}N táptalajon tartott baktériumokból származó DNS nehéz sávot, a normál (^{14}N) táptalajon nevelt baktériumok DNS-e pedig könnyű sávot ad céziumklorid-gradiens centrifugálással. Ha a ^{15}N -en tartott sejteket átteszik könnyű táptalajra, az első nemzedékben köztes, a másodikban könnyű és köztes sáv figyelhető meg a gradiensen (6.4. ábra). A Meselson–Stahl kísérletben kapott eredmények csak szemikonzervatív DNS-replikációval értelmezhetők (6.4. ábra).



6.4. ábra: A szemikonzervatív replikáció bizonyítása baktériumban

A DNS-replikáció magasabbrendűekben is szemikonzervatív

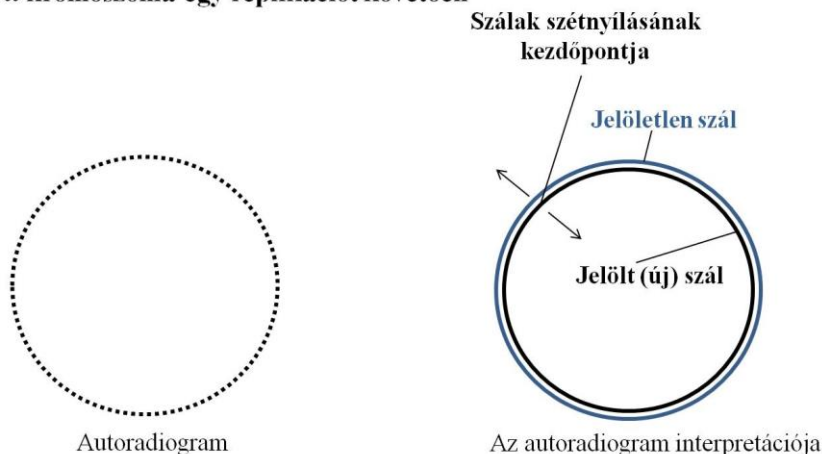
1958-ban Herbert **Taylor** bab gyökércsúcs sejteken bizonyította, hogy a DNS replikációja – a baktériumok DNS-éhez hasonlóan – szemikonzervatív módon zajlik. Egy sejtgeneráció hosszan triciált (^3H timidint tartalmazó) tápoldatban tartott sejtjei a radioaktív nukleotidot beépítik az új DNS-száiba, amit a kromoszómák autoradiogramja jelez. Emlékezzünk vissza, hogy minden kromatida egy DNS kettős hélixnek felel meg. Egy szintézisfázist követően minden kromatida jelölődik, mert minden DNS-molekula „hibrid” a radioaktivitás tekintetében. Ezután nem-radioaktív timidint tartalmazó tápoldatba áttéve a sejteket, egy újabb replikáció után az autoradiogramon csak az egyik testvér-kromatida jelölődik (a kiindulási DNS hibrid volt, a jelölt szülői szál és a nem jelölt szülői szál mellé is egy-egy jelöletlen szál szintetizálódik).

6.3.3. Replikációs villa

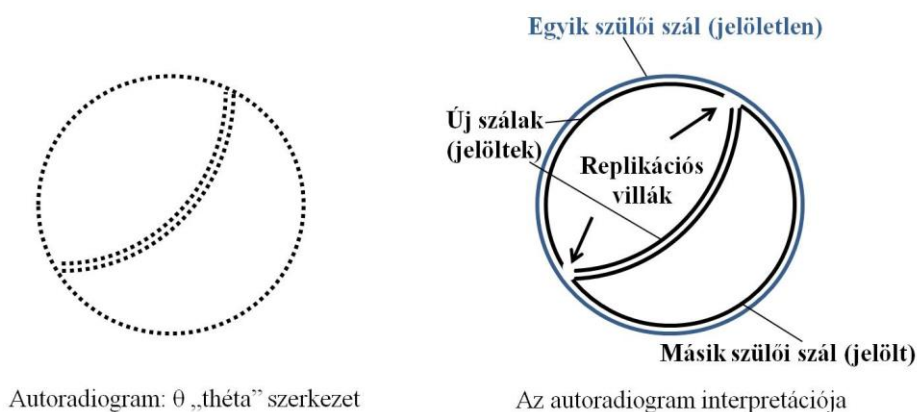
E.coli sejtek táptalajához ^3H timidint adva a DNS-be beépült radioaktivitás a hibrid szálak autoradiogramján kimutatható. A sejtekből szelíd feltárással John **Cairns** ki tudta nyerni a baktérium cirkuláris DNS-ét, mely radioaktív jelet adott (6.5.a ábra). A következő replikációs ciklus során a képződő egyik dupla hélix most szintetizálódó szála lesz

csak jelölt, míg a másik dupla hélix („a kör belsejében”) mindkét szála jelölt lesz. A jelölésbeli különbséget az autoradiogramon a jel intenzitása tükrözte (6.5.b ábra). A felvételen látott szerkezet a görög θ betűre emlékeztet, ezért a szaknyelvben a bakteriális cirkuláris DNS replikációja θ -replikáció kifejezéssel él a mai napig. A szülői kettős spirál szétnyílásával két – a szintézis során egymástól távolodó – replikációs villa jön létre (6.5.b ábra).

a) *E. coli* kromoszóma egy replikációt követően



b) *E. coli* kromoszóma a második replikációs ciklusban



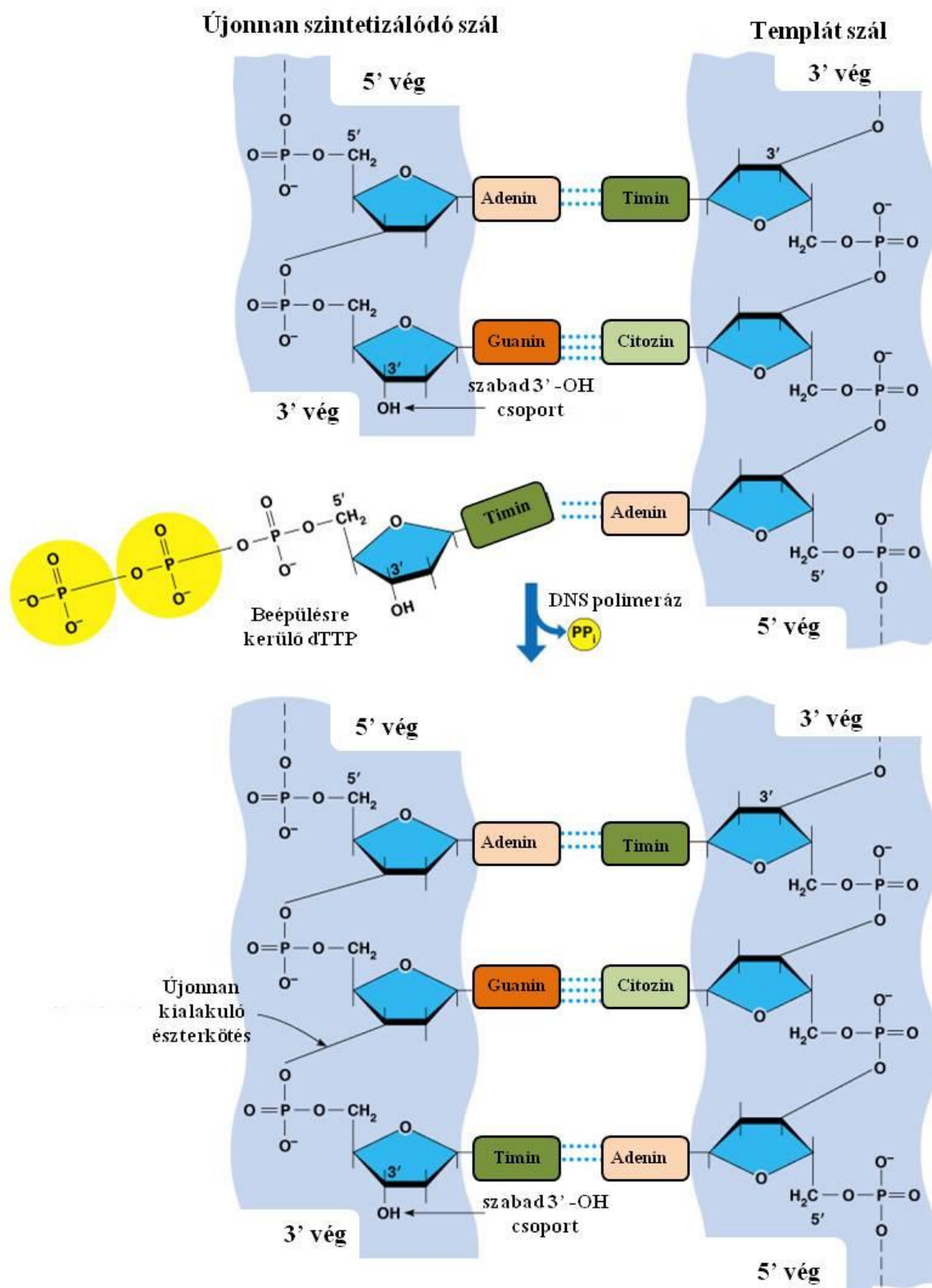
6.5. ábra: *E. coli* cirkuláris kromoszóma θ replikációja

6.3.4. A DNS-polimerázok

Az első DNS-polimeráz enzimet 1959-ben izolálta Arthur **Kornberg** *E. coli* baktériumból. Az enzim polimeráz aktivitását *in vitro* igazolta. Az enzim szubsztrátjai a dezoxiribonukleotidok trifoszfát formái (dNTP-k: dATP, dGTP, dCTP és dTTP). A DNS-polimeráz az egyes szálú DNS-templátra (minta) azt kiegészítő (komplementer) szálát szintetizál a rendelkezésre álló nukleotid trifoszfátokból. A Kornberg által izolált enzim volt az első, ezért ezt DNS-polimeráz I-nek (pol I, Kornberg-enzim) nevezzük. Az *E. coli* pol I – akárcsak a többi eddig ismert DNS polimeráz – polimeráz aktivitása 5' → 3' irányú szálnövekedést katalizál. Az új szál tehát mindig az 5' vég felől a 3' vég irányába növekszik: az újonnan beépülő nukleotid a szál előző nukleotid cukor egységének 3'-OH csoportjához kapcsolódik észterkötéssel, pirofoszfát felszabadulás közben (6.6. ábra).

Később (1969, John Cairns és Paula DeLucia) igazolták, hogy a *pol I* génben hibás baktériumok normálisan növekednek, tehát nem a pol I a baktérium DNS-szintézisének

fő katalizálója. Erre utaltak további adatok is: a pol I túl lassú (körülbelül 20 nt/perc), túl abundáns a sejtekben (400 molekula/sejt), túl gyakran disszociál a DNS-ről (20–50 nukleotid beépítése után leválik). Mai ismereteink szerint az *E. coli*-ban öt DNS-polimeráz működik, és a replikációs villákban a pol III a fő polimeráz.



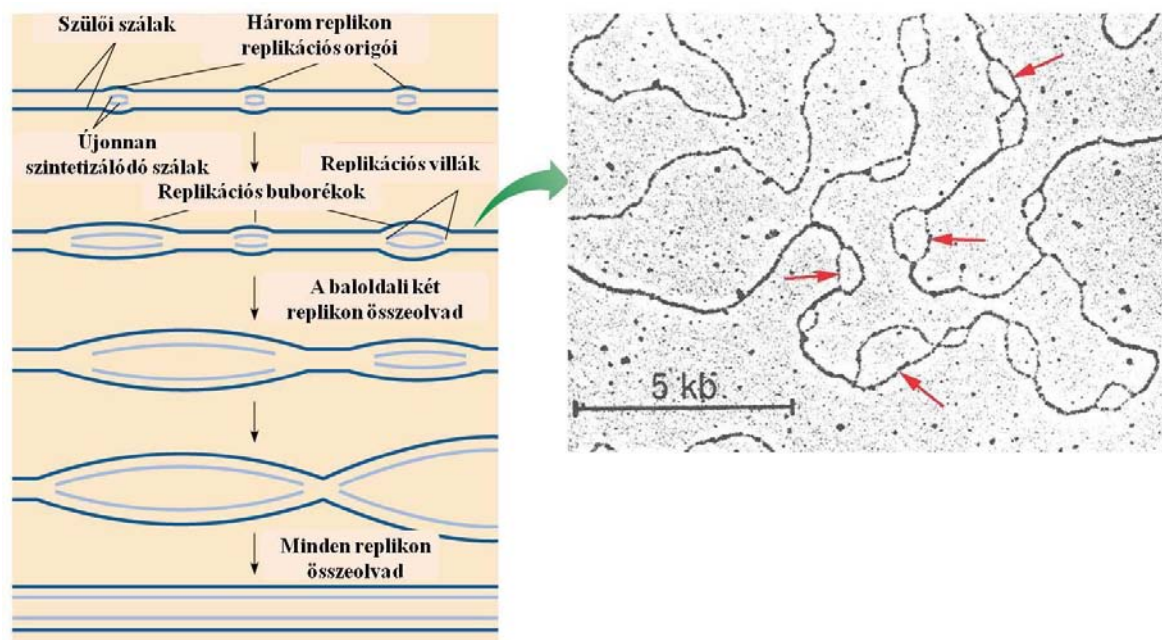
6.6. ábra: A DNS-szál szintézise 5' → 3' irányban történik

6.3.5. A replikációs kezdőpont (origó)

A replikációnak kitüntetett kezdőpontja (**origója**) van. Az *E. coli* cirkuláris kromoszómájának egyetlen replikációs origója, az *oriC* 245 nukleotidpár hosszú, meghatározott szekvencia részletekkel. Innen indul a cirkuláris kromoszóma replikációja két ellentétes irányba, amíg a villák össze nem érnek. Az *oriC* egyik szakaszán 13 bp hosszú speciális szekvenciárész többször ismétlődik (ún. DnaA box). Ehhez a részhez kötődnek a DnaA fehérjék, és ezzel elkezdődik a replikációs gépezet, az ún. **repliszóma** összeépülése. A DnaA-kötődés hatására az *oriC* másik, A+T-gazdag szakaszán a kettős hélix szálai szétválnak. A szétvált szálakhoz további DnaA fehérjék kötődnek, majd helikázaktivitással rendelkező DnaB fehérjék folytatják a szálak szétválasztását a kialakuló replikációs villákban. Fehérje-fehérje kölcsönhatással bekötődik a replikációhoz szükséges többi fehérje: a primáz (lásd később) és a pol III. A replikációs gépezetnek nem része a DnaA fehérje, funkciója a replikáció kezdőpontjának kijelölése és a repliszóma összeszerelődésének segítése. A baktériumok replikációs-osztódási ciklusa általában 60 percnél kevesebb (az *E. coli* esetén 20–40 perc).

Az eukarióta kromoszóma sok replikációs origót tartalmaz

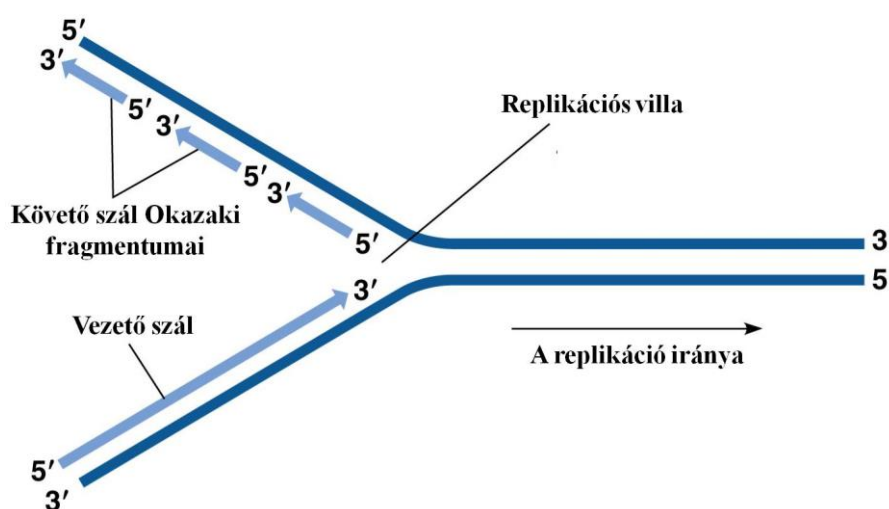
Az eukarióta sejtek sejtciklusa 1–2 órától (élesztő: 1,4 óra) több óráig tarthat (állati eredetű laboratóriumi sejttenyészeteknél 24 óra körüli). A szintézisfázisban nemcsak a DNS, hanem a kromatin teljes szerkezetének meg kell duplázódnia. Az eukarióta kromoszómák – a replikációs hatékonyság növelése végett – több replikációs origót tartalmaznak (néhány százat vagy néhány ezret), és ennek megfelelően több **replikon**ból állnak. Replikonnak az egy origóból kiinduló replikációs egységet nevezzük. A replikonok a replikáció végére összeolvadnak (6.7. ábra).



6.7. ábra: Az eukarióta kromoszómák replikációja több origóból indul
balra: sematikus ábrázolás, jobbra: elektronmikroszkópos felvétel

6.3.6. Szemidiszkontinuus replikáció

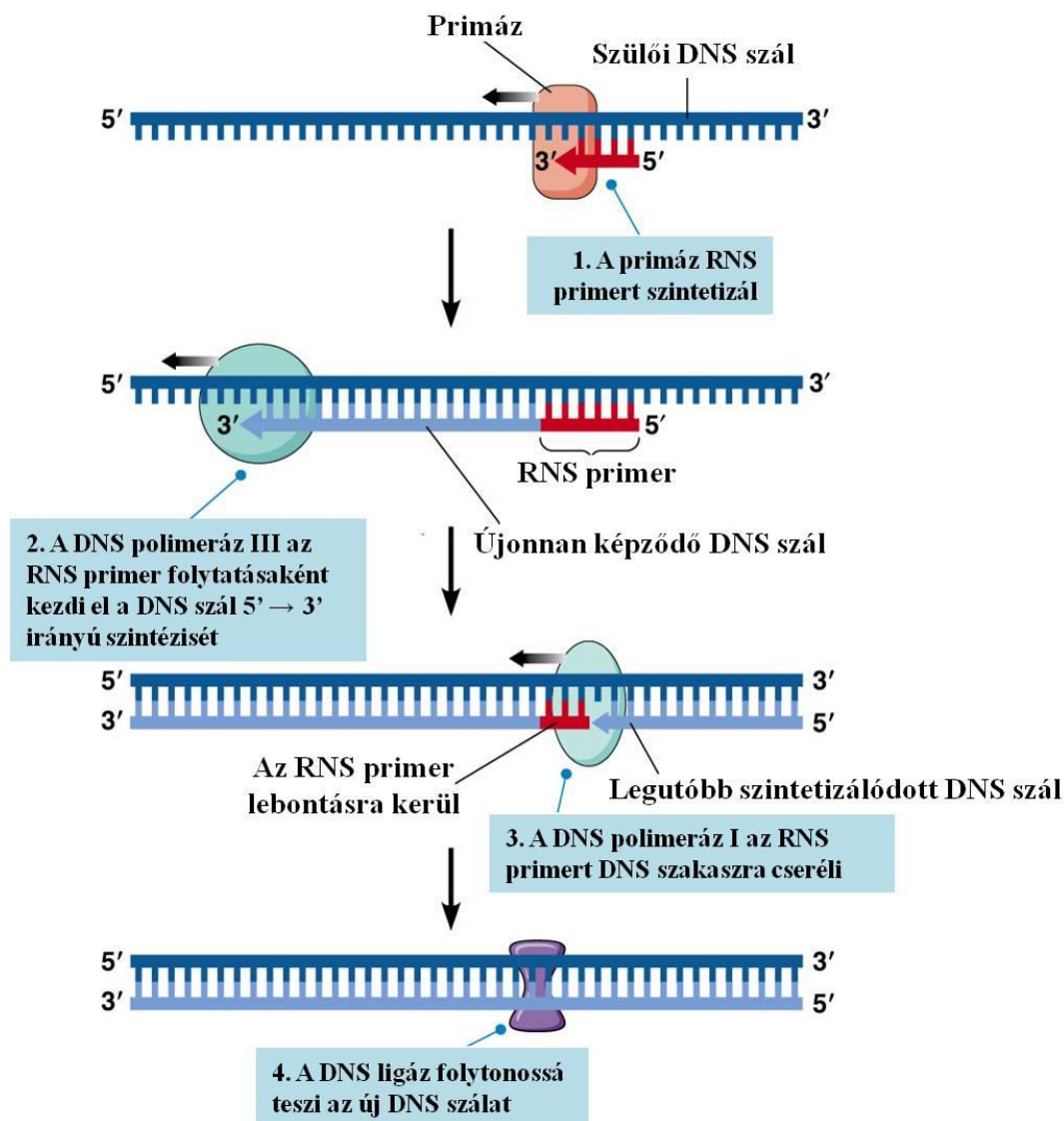
A replikáció az origótól mindkét irányban halad. Autoradiográfiás (^3H -timidin pulzusjelöléses) kísérletekkel kimutatták, hogy a legtöbb eukarióta és prokarióta DNS replikációja kétirányú. Az origótól két irányba haladó DNS-replikáció két replikációs villát és négy újonnan szintetizálódó szálát jelent. Mivel a szálak szintézise csak egyik irányba ($5' \rightarrow 3'$) haladhat (lásd fent), minden egyes replikációs villában az egyik új szál a replikációs villa irányában folyamatosan növekszik – ezt az új szál **vezető szálnak** (leading strand) nevezzük –, a másik új szál pedig csakis szakaszosan, a replikációs villával ellentétes irányban polimerizálódhat – ez az új szál a lemaradó, vagy **követő szál** (lagging strand) (6.8. ábra). A követő szál kezdetben különálló (később összekapcsolódó, lásd alább) darabjait leírójuk után Okazaki-fragmentumoknak nevezzük. Az Okazaki-fragmentumok hossza 1000–2000 nts (nukleotidok, nucleotids).



6.8. ábra: A replikációs villában az egyik szál szintézise folyamatos, a másik szálé szakaszos

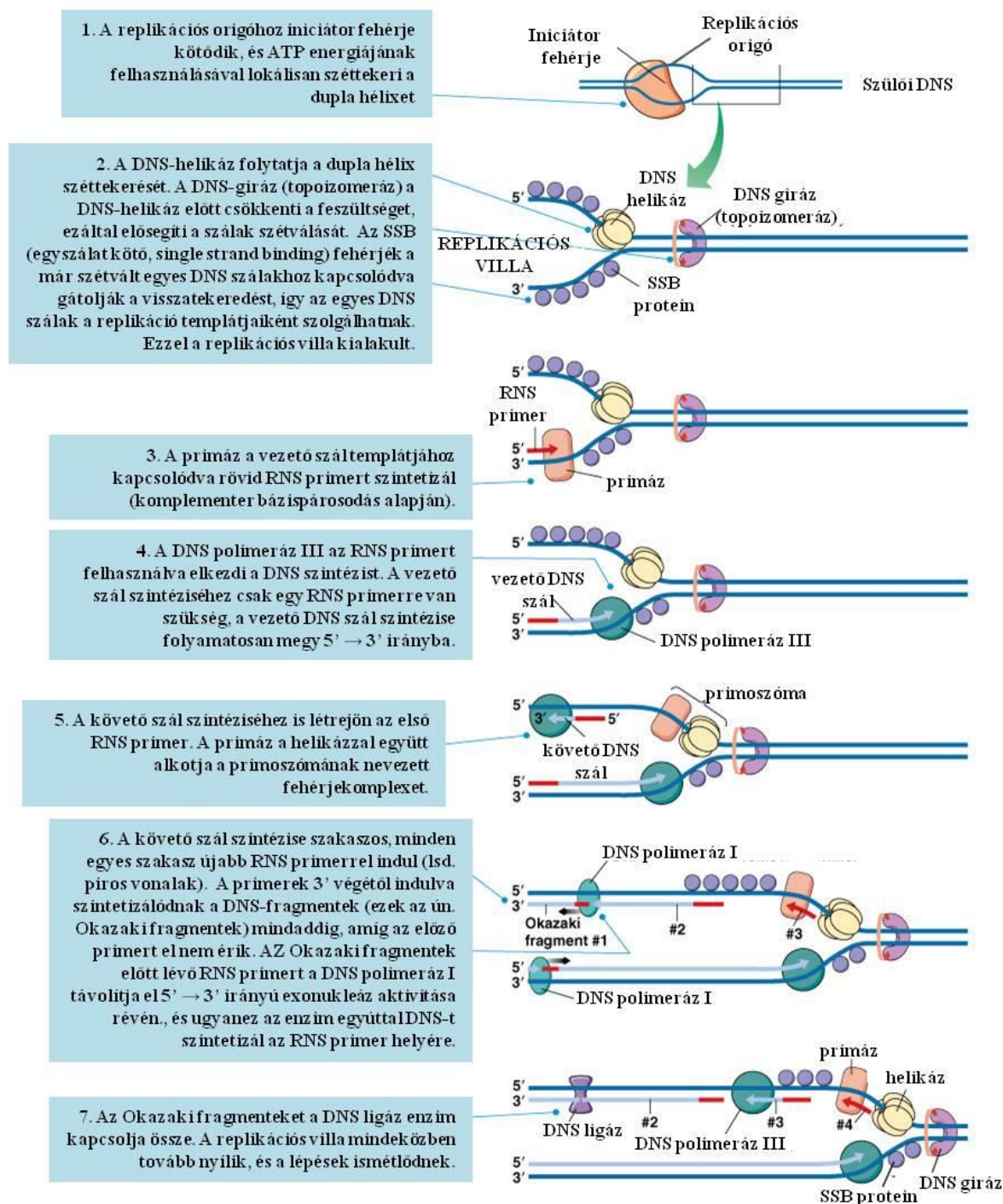
6.3.7. A replikáció további enzimei

A DNS-polimerázok a szálszintézist elkezdni nem tudják, csak folytatni. A kezdéshez egy rövid kezdő (**primer**) szakaszra van szükségük. A primer körülbelül 8–12 nts hosszú RNS-szakasz, melyet a **primáznak** nevezett RNS-polimeráz szintetizál (6.9. ábra). Minden DNS-szál tehát egy rövid RNS-szakasszal indul (az $5'$ vég felől). A vezető szál szintéziséhez egyetlen kezdő primerre van szükség, a követő szál esetén pedig minden Okazaki-fragmentum egy-egy RNS-primerrel kezdődik. A primáz enzim a repliszómával együtt egy nagyobb fehérjekomplex, a **primoszóma** részeként halad előre a replikációs villában (6.10. ábra). A DNS-polimeráz III az RNS-primer folytatásaként szintetizálja a DNS-t addig, amíg a templát rendelkezésre áll, illetve az Okazaki-fragmentumok esetén addig, amíg az előző primert el nem éri. Az Okazaki-fragmentumokat indító RNS-primereket a DNS-polimeráz I távolítja el $5' \rightarrow 3'$ exonukleáz-aktivitása révén, és helyére DNS-t szintetizál $5' \rightarrow 3'$ polimeráz-aktivitásának köszönhetően. A követő szál DNS-szakaszait végül a **ligáz** enzim kapcsolja össze: ATP felhasználásával hozza létre a hiányzó észterkötést az egyik fragmentum $5'$ foszfát és a másik fragmentum $3'$ -OH csoportjai között.



6.9. ábra: Primáz, primer, ligáz szerepe a replikációban

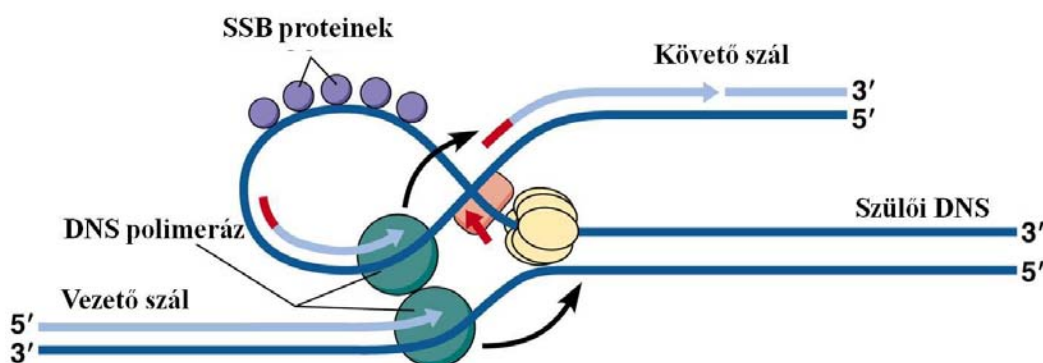
A kettős hélix széttekercsét a **helikázok** végzik a hidrogénhidak bontásával. Amint a replikációs villában szétválnak a szülői szálak, a villa túloldalán lévő DNS-szakasz pozitív irányban túltekercslik. A **topoizomeráz** oldja fel a feszültséget oly módon, hogy az egyik szálát elvágja, azt a másik szál körül „kipörgeti”, majd a szálát folytonossá teszi. A replikációnál működő DNS-topoizomeráz neve **gíráz**. A széttekert templát-szálak visszacsavarodását a hozzájuk kötődő ún. **SSB fehérjék** (egyes szálát kötő, single strand binding) akadályozzák meg (6.10. ábra).



6.10. ábra: A replikáció áttekintése

6.3.8. A két új szál szintézisét egyetlen pol III dimer végzi

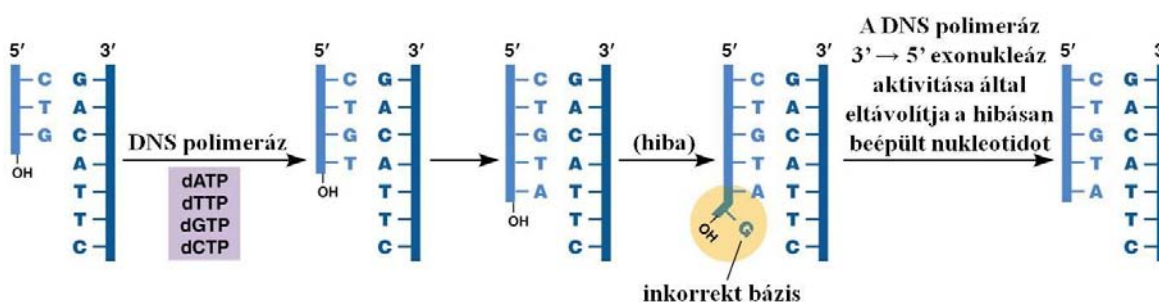
Az elmaradó szál templátjának kihurkolódása lehetővé teszi, hogy a replikációs villához kapcsolódó pol III mindkét utódszálat a villa irányában szintetizálhassa (6.11. ábra). A pol III így két „leolvasófejjel” rendelkező dimerként működik. A hurokban a templát szál időnként – ahogy a villában a szálak válnak szét – továbbcsúszik. Ez a mechanizmus gyorsítja a folyamatot, mivel a követő szál szintéziséhez sem szükséges a polimeráz leválása, majd újbóli bekapcsolódása (ez lényegesen lelassítaná a szintézist).



6.11. ábra: A két új szál szintézise egyetlen pol III dimer által, az elmaradó szál templátjának kihurkolódásával valósul meg

6.3.9. A replikáció pontossága. Proof-reading repair.

A szintézis során 10^4 – 10^6 nukleotidonként történik egy hibás beépülés. Ez igen magas mutációs rátát eredményezne. A pol III és a pol I enzim is rendelkezik saját hibajavító rendszerrel, és a hibás beépülések 99%-át azonnal kijavítják, így csak 10^8 nukleotidonként marad egy hiba. A pol III ϵ (epszilon) alegysége végzi annak ellenőrzését, hogy nem történt-e hiba a szintézis során. A hibásan beépített nukleotidokat az alegység azonnal kivágja, majd folytatja a szintézist (6.12. ábra). A kivágás visszalépést jelent, ezért annak iránya $3' \rightarrow 5'$, és nukleotid-eltávolítást, azaz **exonukleáz** aktivitást igényel. A DNS-polimerázok saját hibajavítását **proof-reading repair**-nek („visszaolvasó” javításnak) nevezzük. A primáz nem rendelkezik ezzel a hibajavító képességgel, és ezért az RNS-primerekben nagyobb eséllyel fordul elő hiba. A replikáció hűségét (fidelitás, fidelity) azonban ez nem befolyásolja, hiszen a primerek a replikáció végére lebomlanak. A replikáció utáni javítórendszerek a megmaradt hiba 99%-át kijavítják. Így adódik a végső pontosság, ami 10^{10} nukleotidonként egy hiba. Ez az emberi genom esetén átlagosan egyetlen hibát jelent egy replikáció során.



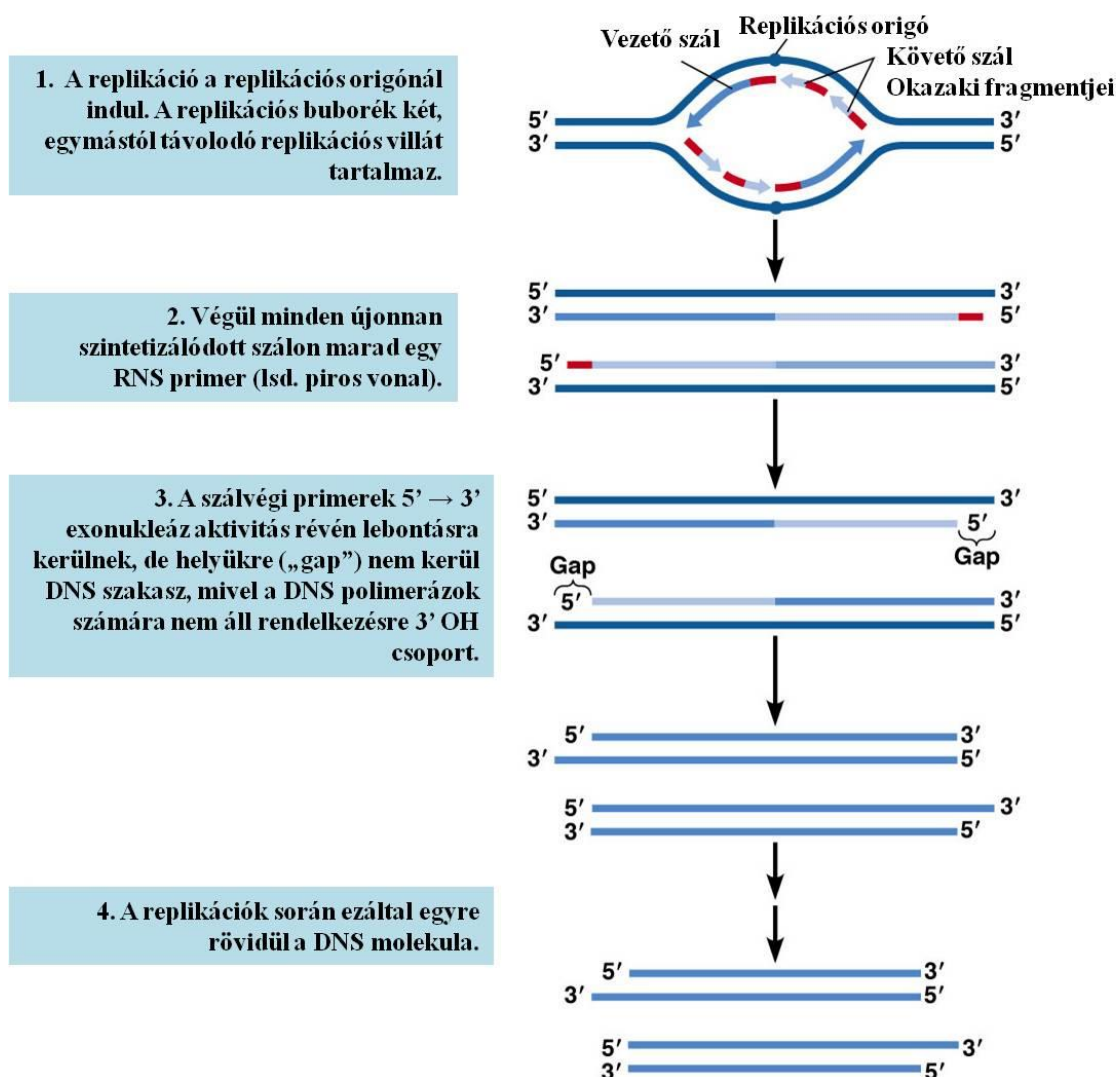
6.12. ábra: A replikáció alatt azonnali hibajavítás működik (proof-reading repair)

6.3.10. Vírus genomok gördülő gyűrű replikációja

Egy különleges replikációs mechanizmus a gördülő gyűrű (rolling circle) replikáció, ami főleg cirkularizált vírusgenomokra jellemző. A cirkuláris DNS egyik szála pontszerűen bevágódik (keletkezik egy rés, nick). A polimeráz az ép szálát templátként használva a törött szál 3' végéhez új nukleotidokat épít körbe-körbe, miközben leszorítja az előtte lévő régi szálát. A leszoruló egyes szál kettős szálá egészül ki. A lineáris kettős szálú molekula az eredeti cirkuláris DNS-nek megfelelő szakaszokat egymás után többszörösen tartalmazza. Ezt a hosszú, az eredeti DNS sok kópiáját tartalmazó molekulát **konkatemer**nek nevezzük. A konkatemer végül egységnyi méretűre darabolódik, és az egységek gyűrűkké zárulnak.

6.3.11. Telomerek. Telomeráz.

Cirkuláris DNS esetén nem, de a lineáris DNS-molekulák replikációjánál találkozhatunk az ún. **végreplikációs problémával**. Minden újonnan szintetizálódott szál 5' végén marad egy RNS-primer (6.13. ábra).



6.13. ábra: Lineáris DNS-molekulák végreplikációs problémája

Nem ismert, hogy kizárólag a primerek eltávolítása miatt történik-e így, de tény, hogy a legtöbb eukarióta sejtfeleségben minden DNS-replikáció során 50–100 bp szakasz elvész a DNS-molekulák végeiből (tehát minden kromatida két végéből), azaz fogy a DNS. Az orvosi Nobel-díjat 2009-ben három olyan kutatónak (Elizabeth H. **Blackburn**, Carol W. **Greider** és Jack W. **Szostak**) ítelték oda, aki e problémakörben jelentős felfedezéseket tett. A legfontosabb ide vonatkozó ismereteket az alábbiakban foglaljuk össze.

A kromoszómák végeit a **telomerek** védik. A telomerek fenntartását a **telomeráz** enzim végzi. A telomer kifejezés a görög *telosz* (vég) és *merosz* (rész) szavakból keletkezett. A telomerek feladata kettős: a szabad DNS-vég védelme a lebomlástól, valamint a replikációs rövidülés megakadályozása.

A telomerekkel kapcsolatos első eredmények a *Tetrahymena thermophila* egysejtű protozoa és élesztőgomba sejteken születtek. Azt találták, hogy a *Tetrahymena* kromoszómavégi DNS-szakasza (azaz telomere) megakadályozza a mesterséges kromoszómák lebomlását élesztő sejtekben.

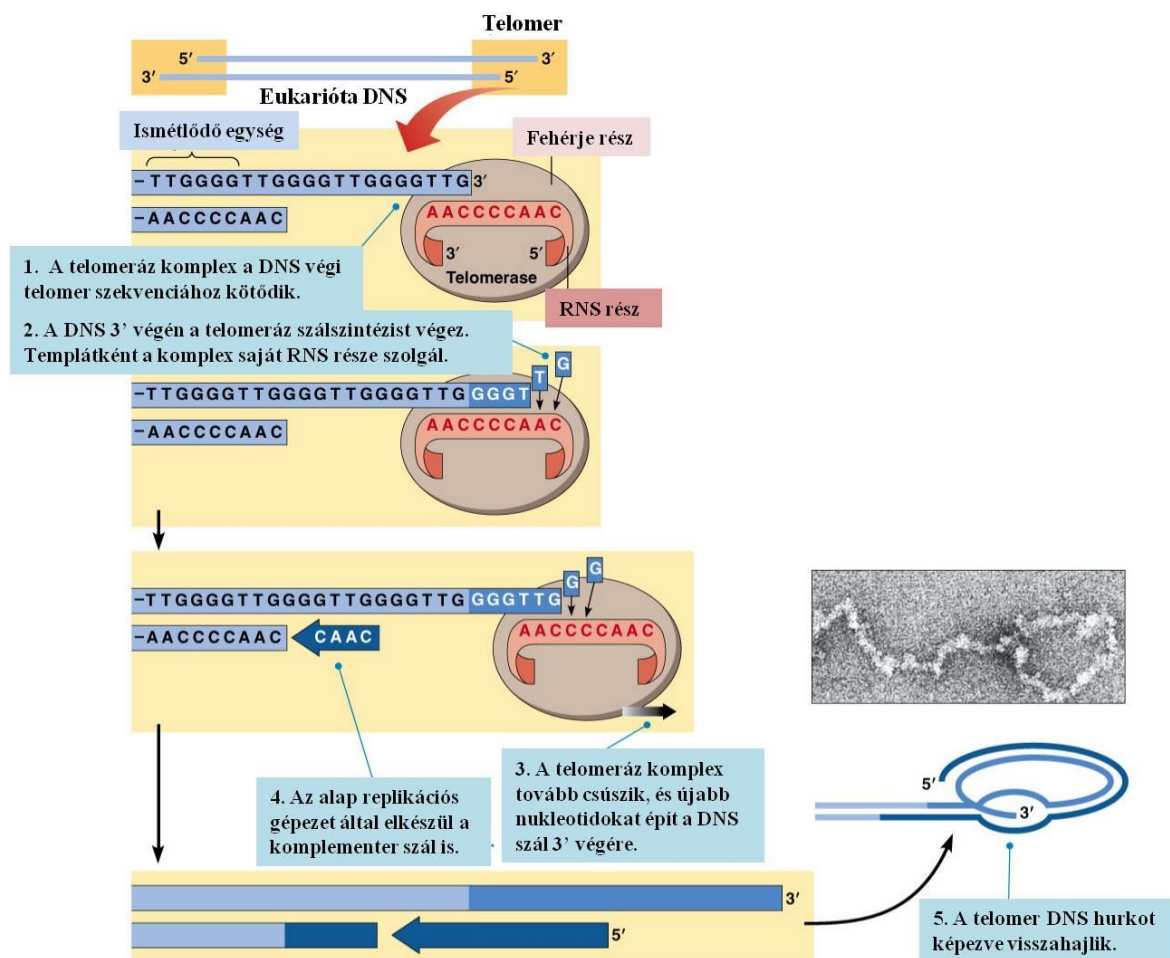
A telomer szakaszt több szervezetben szekvencia szinten ismerjük. Ezek olyan kromoszómavégi DNS-részek, melyekben egy rövid szekvencia ismétlődik sokszorosan. Emberben -TTAGGG- szekvencia ismétlődik körülbelül 2500-szor (az ismétlések száma sejt-, illetve szövetfüggő). A telomer szakaszon a DNS visszahurkolódik, a hurokszerkezetet telomer kötő fehérjék stabilizálják.

Egy átlagos testi sejtben a telomer minden sejtosztódás során rövidül. Kivételt képeznek az ivarsejtek, az őssejtek, és a rákos sejtek többsége. Ha a telomer szakasz túl rövid, akkor a telomerkötő fehérjék nem tudnak hozzákapcsolódni, a visszahajlás (loop) nem tud kialakulni, a kromoszómák végei „ragadóssá” válnak, és mindez kromoszóma-átrendeződésekhez vezet. Végül leáll a sejtosztódás, és beindul a programozott sejthalál mechanizmus, az apoptózis. Mindebből az következik, hogy a telomervesztésnek – ha az nem kerül pótlásra – köszönhetően a sejtek meghatározott számú (50–60) osztódás után elpusztulnak. Igazolt, hogy az ember testi sejtjeiben a telomer a kor előrehaladtával rövidül. Mai tudásunk szerint ezt a mechanizmust a biológiai órák egyik mozgatórugójának tekinthetjük. Azt is kimutatták, hogy oxidatív stressz hatására a telomervesztés ötszöröse lehet a normálisnak.

Mint említettük, bizonyos sejtípusok (ivarsejtek, őssejtek) képesek a telomer szakaszaik megújítására. Ennek szükségessége érthető is. A telomerek hosszúságát a **telomeráz** enzim tartja fenn. A telomeráz egy **ribonukleo-protein**.

A humán telomeráz felépülése (6.14. ábra):

- **Katalitikus alegység (hTERT, humán telomeráz reverz transzkriptáz):** ez a fehérje egység, mely az RNS részt saját templátként használva DNS-t szintetizál, vagyis reverz transzkripciót végez. A testi sejtekben a hTERT fehérje génje transzkripcionálisan represszált állapotban van (róla mRNS és fehérje nem keletkezik).
- **RNS-alegység (hTERC, humán telomeráz RNS komponens):** ez az RNS-molekula a telomer ismétlések szintézisének a templátja. Másodlagos szerkezetét fajok közti erős konzerváltság jellemzi.



6.14. ábra: A telomer szerkezete, és újjáépülése a telomeráz komplex által

A rákos sejtek korlátlan számú osztódásra képesek, „halhatatlanok”. A kutatásokban használt sejtvonalak jelentős része éppen ezért rákos szövetből származik. (Például a HeLa egy méhnyakrák sejtvonala, melyet 1951-ben izoláltak egy bizonyos Henrietta Lacks nevű páciensből, s azóta világszerte fenntartanak kutatási célokra.) A rákos sejtek zömére jellemző a telomeráz enzimaktivitás. Az orvoslásban felvetődött a telomeráz-gátlás daganatterápiás alkalmazásának lehetősége. Ez olyan szempontból szelektív, hogy a normális szövetekben telomerázaktivitás alig van, de az őssejtekre gyakorolt hatásuk elbizonytalanító. A kutatók feltételeznek egy ún. ALT-mechanizmust (a telomerek hosszabbításának alternatív útja), mivel a rákos sejtek egy része fenn tudja tartani a telomerei hosszúságát, miközben telomeráz enzimaktivitást nem mutatnak. „Áttérve” erre az útvonalra, a daganatsejtek rezisztensekké válhatnak a telomeráz gátlószerekkel szemben.

A telomereknek fontos szerepük van néhány örökletes betegség kialakulásában is. A Werner-szindróma egy korai öregedést mutató kórkép, mely autoszómális recesszív módon öröklődik. A betegek WRN génjének mindkét kópiája mutáns. Ez a gén egy helikázaktivitású fehérjét kódol, melynek szerepe lehet a telomerstruktúra létrehozásában. A betegek sejteire fokozott telomer veszteség jellemző.



6.15. ábra: Kromoszóma „a fodrásznál”

7. A génkifejeződés molekuláris alapjai

Azokat a lépéseket, melyeken keresztül a génekről a fenotípust befolyásoló molekulák (fehérjék és funkcionális RNS-ek) képződnek, génkifejeződésnek (génexpresszió) nevezzük. Az 1990-es évek közepétől kezdődően meghatározták egy sor élőlény teljes genomjának DNS-szekvenciáját. Ezek az eredmények óriási előrelépést jelentenek, hiszen a szekvenciaadatokból a korábban felhalmozódott ismeretek alapján rengeteg információ kiolvasható. Lehetővé válik a gének számának és milyenségének előrejelzése, sőt a gének kifejeződésének szabályozására utaló információk kiolvasása is. Az információk értelmezését a DNS-ben kódolt „jelrendszer” teszi lehetővé. Ezekről a „jelekről” a továbbiakban folyamatosan tárgyalunk. A teljes genomok szekvenciájának analízise informatikai eszközökkel lehetséges.

Az elsőként megismert teljes genomszekvenciák nem hoztak meglepetést a gének számának tekintetében: az *Escherichia coli* baktérium kb. 3200 génnel, a *Saccharomyces cerevisiae* egysejtű eukarióta élesztő kb. 6300 génnel, a többsejtű muslica (*Drosophila melanogaster*) kb. 13600 génnel rendelkezik. A növekvő komplexitás tehát a gének számának növekedésével jár. Ennek alapján a kutatók korábban úgy becsülték, hogy az ember kb. 100000 génnel rendelkezik. A humán genom felderítése előtti években az érdekelt kutatók fogadást kötöttek egymással a humán gének számára vonatkozóan. A tippek 26000-150000 között mozogtak. 2003 tavaszára jutott el a humán genom analízise abba a stádiumba, hogy a gének számát jó közelítéssel meg tudták állapítani. Igen meglepő eredmény született: a fehérjekódoló génjeink száma mindössze 20000 körüli. A fogadásban a legkisebb számra (25947) tippelő kutató nyert. Hogyan lehetséges, hogy a fejlett aggyal, kifinomult immunrendszerrel rendelkező *Homo sapiens* csak kétszer annyi génnel rendelkezik, mint egy fonalféreg, és nagyjából ugyanannyi génje van, mint a növényi modellszervezet *Arabidopsis thaliana*-nak? A válasz az alternatív splicing mechanizmus létében keresendő (erről később szólunk részleteken), melynek köszönhetően a 20000 gén 100000-nél több fajta proteint kódol.

7.1. RNS intermedier létére utaló korai kísérletek

1957-ben Elliot **Volkin** és Lawrence **Astrachan** kutatók igen jelentős megfigyelést tettek. Azt a meglepőnek tűnő jelenséget találták, hogy az *Escherichia coli* baktérium T2 fággal történő fertőzését követően jelentős mennyiségű RNS szintetizálódik a baktériumban. Ez a gyors „fág-indukálta” RNS-szintézis hamar, percekben belül lecseng. Az RNS-molekulák gyors megjelenése, majd eltűnése arra utalt, hogy a képződő RNS-eknek szerepük lehet a T2 fággenom kifejeződésében, szükségesek lehetnek ahhoz, hogy az új fágreszecskeket felépítő fehérjék szintetizálódjanak.

Eukarióta sejteknél a DNS a sejtmagban található, míg a fehérjeszintézis a citoplazmában történik. Az RNS közvetítő szerepét a DNS és fehérjék közötti információ átvitelben ún. pulse-chase (impulzus és üldözés) kísérlettel vizsgálták. A sejtekhez rövid

időre (impulzusszerűen) radioaktívan jelölt uracilt adtak (az uracil az RNS egyik alkotóeleme), majd a médiumot lecserélték nem jelölt uracil tartalmúra. A médiumcsere előtt a sejtek a sejtmagban tartalmazták a jelölt RNS-eket, a médiumcserét követően pedig a radioaktivitás a citoplazmában volt kimutatható. A kísérlet azt mutatta, hogy eukarióta sejtekben az RNS a sejtmagban szintetizálódik, majd kijut a citoplazmába, a fehérjeszintézis helyszínére. A kísérlet alapján az RNS-molekula alkalmas jelöltnek tűnt arra, hogy információt továbbítson a DNS és a fehérjék között.

7.2. Az RNS-molekulák sajátosságai

A DNS és az RNS is nukleinsavak, felépítésük, tulajdonságaik sok közös vonást mutat, azonban fontos különbségek is vannak közöttük:

- Az RNS általában egyszálú nukleotidlánc (nem kettős hélix szerkezetű, mint a DNS). Egy RNS-molekulán belüli bizonyos szakaszok bázispárosodással egymáshoz közel hozhatják a molekula adott szakaszait (**intramolekuláris bázispárosodás**), így az egyes RNS-molekulák igen változatos háromdimenziós szerkezeteket képeznek.
- Az RNS-t felépítő nukleotidok cukor része **ribóz** (nem dezoxiribóz, mint a DNS-ben). A cukormolekula 2' szénatomján hidroxilcsoport (-OH) található a ribóz esetében. Később látni fogjuk, hogy ez a hidroxilcsoport kitüntetett szerepet játszik több fontos folyamatban. Az RNS cukorfoszfát gerince – a DNS-hez hasonlóan – 5'→3' polaritást kölcsönöz a nukleotidláncnak.
- Az RNS-t felépítő nukleotidok (**ribonukleotidok**) adenin, guanin, citozin és **uracil** (timin nukleotid helyett) bázisokat tartalmaznak. Az uracil – a timinhez hasonlóan – adeninnel képez bázispárt.
- Ismerünk olyan RNS-molekulákat, melyek – a fehérjékhez hasonlóan, de a DNS-sel ellentétben – katalizálni képesek biokémiai reakciókat. A **ribozimek** katalitikus sajátossággal rendelkező RNS-ek. (Nevük az „RNS-enzim” összeolvadásából alakult ki.)

7.3. RNS-típusok

- **mRNS** (messenger, információs RNS): A gének többségéről képződő RNS-transzkriptum köztes, információszállító termék, amely szükséges a gén által kódolt fehérjetermék szintéziséhez.
- **Funkcionális RNS-ek:** Ezek az RNS-típusok nem szolgálnak alapul fehérjék szintéziséhez, hanem önmagukban végeznek egy bizonyos funkciót
 - **tRNS** (transzfer, szállító RNS): Aminosavat szállítanak a fehérjeszintézishez.
 - **rRNS** (riboszómális RNS): A riboszómák felépítésében és működésében vesznek részt. A riboszómák RNS-ből és fehérjéből felépülő makromolekuláris gépezetek, melyek az aminosavláncok szintézisét végzik.

A t-RNS-t és az rRNS-t kódoló gének száma egy adott genomban kevés (néhány tucat). A sejtben lévő RNS-ek között az rRNS-ek vannak fölényes mennyiségben jelen. Ez az r-RNS-ek nagy stabilitásának köszönhető, valamint annak, hogy folyamatosan sok kópiában íródna át a génjeikről.

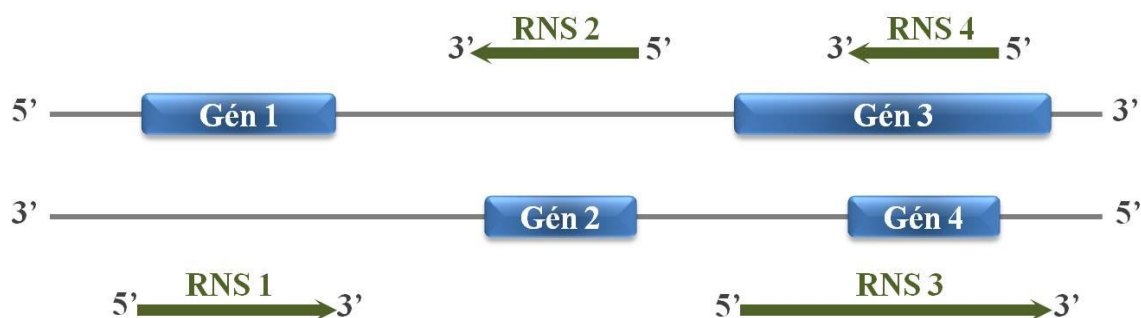
- **snRNS** (small nuclear, kis nukleáris RNS): Csak az eukariótákra jellemző csoport. Az elsődlegesen képződött RNS-transzkriptum érésében vesznek részt. Egy részük fehérjékkel komplexet alkotva alakítja ki a spliceoszómát (lásd a fejezet későbbi részében), mely az intronok eltávolítását végzi.

A következő két csoport szintén az eukarióta szervezetekre jellemző RNS-féleségeket tartalmaz. Az eukarióta genomok jelentős része íródik át olyan funkcionális RNS-sé, melyek a gének kifejeződésének szabályozásában vesznek részt különböző szinteken. Ezek közül a legismertebbek:

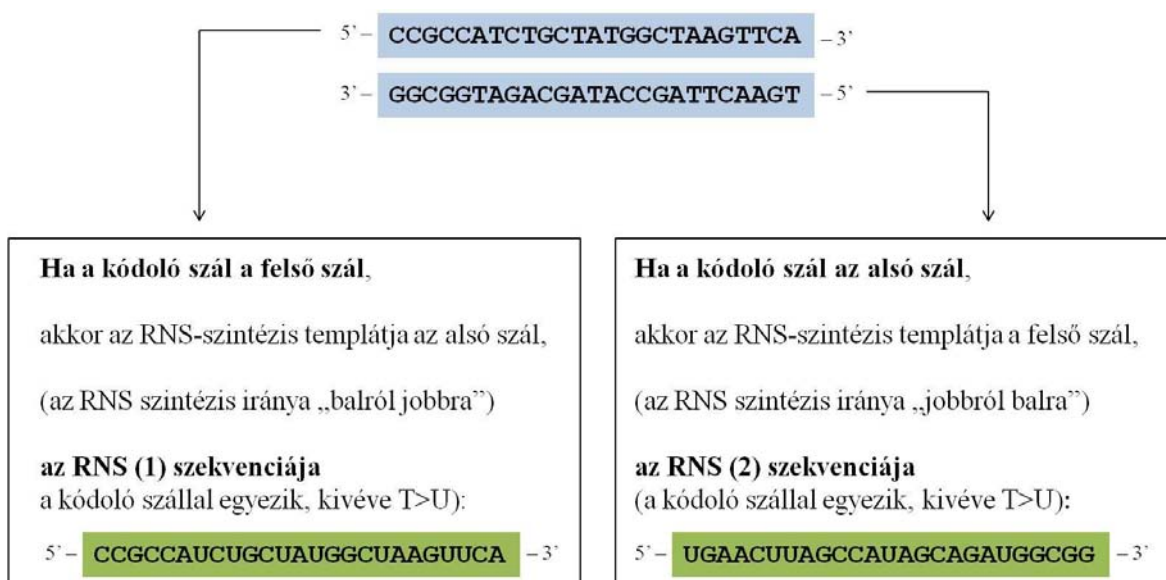
- **miRNS** (micro RNS): Nemrégiben fedezték fel ezt az RNS-típust, és egyre több gén esetén igazolják, hogy ezek nagyon sok gén expressziójának szabályozásában vesznek részt. A képződött fehérjetermék mennyiségét különféle szinteken befolyásolhatják.
- **siRNS** (small interfering, kis interferáló RNS): A növényi és állati genomok integritásának megőrzésében fontosak. Gátolják a vírusrészecskék képződését, megelőzik a mozgó genetikai elemek genomon belüli áthelyeződését.

7.4. RNS-szintézis

Az RNS-szintézis (transzkripció, átírás) báziskomplementaritás szerint DNS-mintáról (templát) történik. A szintézist **RNS-polimeráz** végzi. Az enzim a DNS kettős spirálhoz kapcsolódik az átírandó gén elején, és miközben halad előre, építi a ribonukleotid-láncot a DNS-templát alapján, rNTP-k (ribonukleotid-trifoszfátok) felhasználásával. Az RNS-szintézis – a DNS-szintézishez hasonlóan – 5'→3' irányban történik, azaz az újabb rNTP a készülő RNS-lánc előző nukleotidján a ribóz egység 3' –OH csoportjához kapcsolódik észterkötéssel. Egy RNS-molekula szintéziséhez mindig csak a DNS kettős hélix egyik lánc szolgál **templátként**. A másik szál az RNS-szintézis tekintetében a **nem-templát szál**, melynek nukleotidsorrendjével és polaritásával a képződő RNS nukleotid sorrendje és polaritása megegyezik, vagyis az RNS a nem-templát szál másolata (kivéve, hogy az RNS-ben timin helyett uracil található). Ez a nem-templát szál a **kódoló szál**, mivel a benne rejlő nukleotidsorrend adja a funkcionális RNS-ek és a fehérjék szerkezetére vonatkozó információt, a kódot. Ha egy nagyobb kromoszómaszakaszt tekintünk, több génnel (kódoló szekvenciával), akkor az egyes gének esetén a DNS kettős hélix egyik vagy másik szála lehet a kódoló szál, tehát bizonyos gének esetében az egyik, míg más gének esetében a másik DNS-szál szolgál genetikai kódként (7.1 ábra). Kompakt genomoknál, amelyekben a génsűrűség nagy, előfordulhat, hogy a DNS kettős spirál egy adott szakaszán mindkét szál kódoló. Ebben az esetben az egyik és a másik szálról is képződik RNS-másolat, tehát egy DNS-szakaszon két gén is elhelyezkedhet (gén a génben, Gén 3 és Gén 4 a 7.1. ábrán). Ez két teljesen különböző RNS-nukleotidsorrendet eredményez (7.2. ábra). A két kódoló szakasz átfedése sokszor csak részleges. Az RNS-szálat – akár csak a DNS-t – balról jobbra 5' → 3' irányban írjuk fel. Később látni fogjuk, hogy ennek a polaritásnak az RNS-érése és későbbi „élete” során is jelentősége van (például mRNS-eknél a fehérjeszintézis irányának meghatározásában).



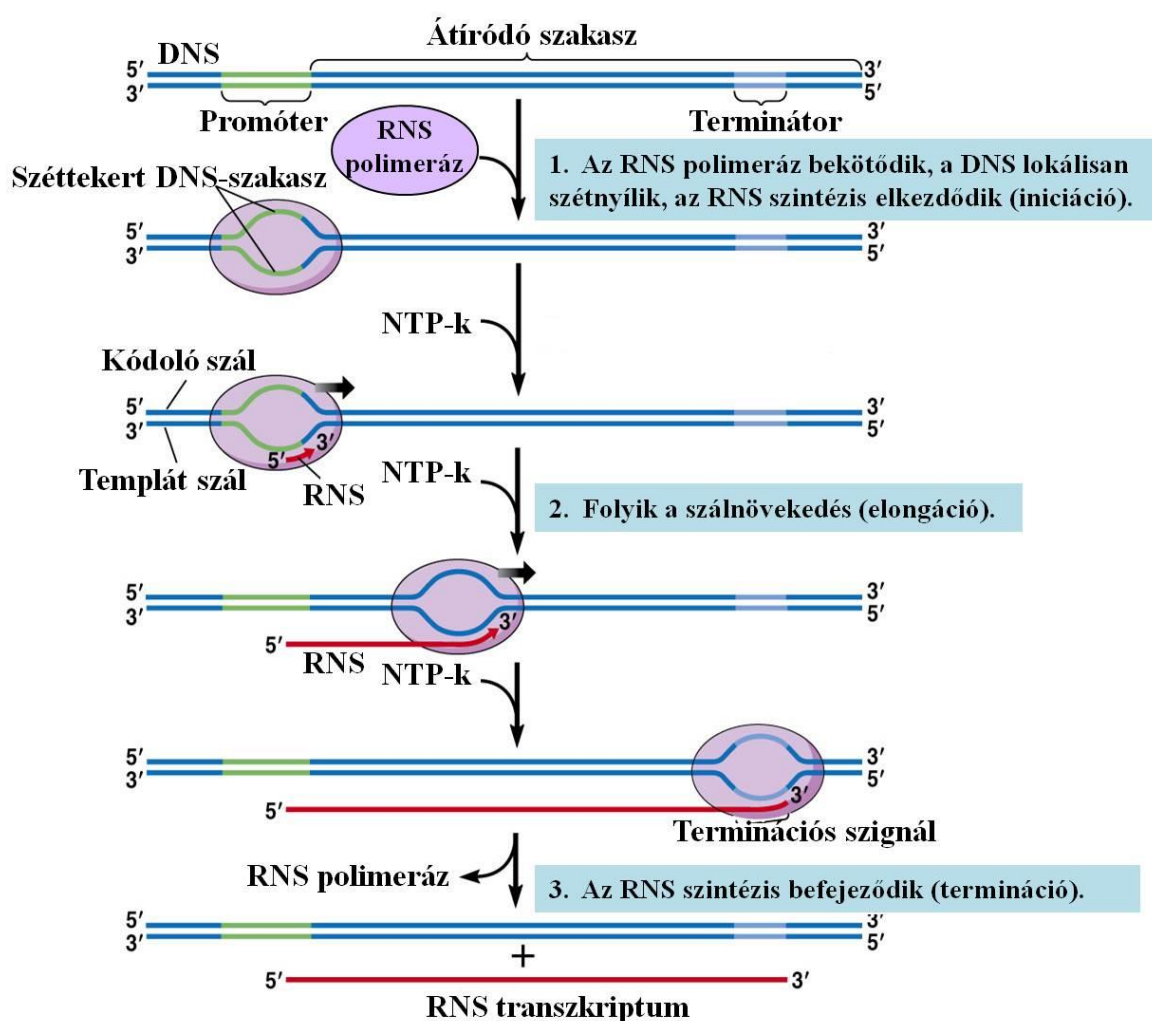
7.1. ábra: A DNS mindkét szála szolgálhat genetikai kódként



7.2. ábra: Egy szakaszon a DNS egyik és másik szála eltérő kódot jelent, eltérő RNS-szekvenciát határoz meg

7.4.1. A transzkripció lépései

Egy átírássra kerülő DNS-szakasz egy jóval nagyobb DNS-molekulának, a kromoszómának egy kis szegmense. Mivel a kromoszómát alkotó DNS kettős hélix egyetlen molekula, egyetlen folytonos egység, a transzkripciót végző molekuláris gépezetnek nukleotid pontossággal biztosítani kell, hogy a megfelelő szakaszok a megfelelő irányban és megfelelő hosszan íródjanak át. Ez három részfolyamatban történik: 1) a gén elejének megtalálása, a transzkripció pontos starthelyének és irányának kijelölése – **iniciáció**, kezdés, 2) az átírás végzése a gén hossza mentén – **elongáció**, lánchosszabítás, 3) az átírás leállítása a gén végén – **termináció**, befejezés (7.3. ábra). A teljes folyamatot a fenti három részfolyamat szerint tárgyaljuk. A transzkripció alapjaiban igen hasonlóan zajlik pro- és eukariótákban, de vannak lényeges eltérések is.

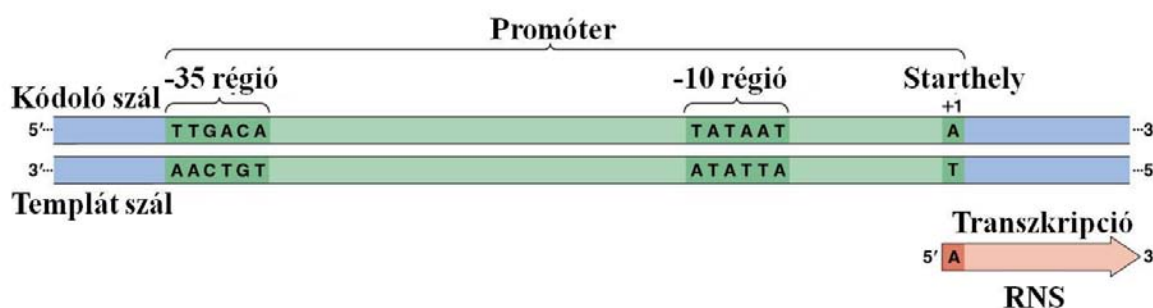


7.3. ábra: A transzkripció áttekintése

7.4.2. Transzkripció iniciáció prokariótákban

Hogyan találja meg az RNS-polimeráz a transzkripció korrekt starthelyét? Ehhez egy speciális DNS-szekvencia segíti hozzá, melyet **promóternek** (promoter, elősegítő) nevezünk. A promóter a transzkripció starthelyének közelében, attól 5' irányban (vagy upstream) helyezkedik el (7.3. ábra). Emlékezzünk vissza, hogy a gén kódoló szakaszát 5' → 3' irányban írjuk fel, és a transzkripció iránya megegyezik a kódoló szál 5' → 3' irányultságával. A kódoló szálon az első átíráshoz kerülő nukleotidot **+1 pozíciónak** nevezzük. Ez a fontos koordináta a transzkripció starthelye (7.4. ábra). Ettől 5' irányban (a kódoló szakasz előtt vagy upstream) lévő nukleotidokat -1, -2... stb. számozással, a +1 helytől 3' irányban (downstream) elhelyezkedőket pedig +2, +3... stb. számozással jelöljük. A promóter tehát a +1 helytől upstream elhelyezkedő DNS-szekvenciariész, mely a transzkripció starthelyének közelébe irányítja az RNS-polimerázt. Mitől speciális ez a DNS-szakasz? Egy DNS-szakasz egyediségét nem adhatja más, mint annak nukleotidsorrendje. A promótert is meghatározott nukleotidok meghatározott pozíciókban és sorrendben való elhelyezkedése teszi funkcionális szakasszá. Egy genomon belül az egyes promóterek szekvenciája hasonló. Ha összehasonlítjuk például *E. coli* gének +1 helytől upstream lévő DNS-szakaszait, akkor két olyan, egyenként néhány nukleotidból álló részt figyelhetünk meg, melyek az egyes gének promóter régióiban

igen hasonlóak. (A promóterszekvenciát általában csak az egyik szál, a kódoló szakasznak megfelelő DNS-szál szerinti szekvenciával adjuk meg.) Ezekből a hasonló – de nem mindig tökéletesen egyező – szekvenciájú régiókból leképezett leggyakoribb bázissorrendet **konszenzus** (megegyező) szekvenciáknak nevezzük. Az *E. coli* promóterek konszenzusszekvenciái a -10 és a -35 pozíciók környezetében vannak (7.4. ábra). Más prokarióta promóterekre is jellemző ez a szerkezet. Bár e két konzervált régió helye prokariótáknál általános, a konkrét bázissorrendben egy genomon belül is többféle variáció lehetséges. Ez befolyásolja az adott promóter erősségét, és lehetőséget biztosít meghatározott géncsoportok együttes transzkripcionális szabályozására (lásd később). A 7.4. ábrán az *E. coli* RNS-polimeráz σ^{70} alegysége által felismert konszenzusszekvencia látható. A konszenzusszekvenciától akár csak egy bázisban is eltérő promótereknél az RNS-polimeráz kötődése (és ezzel a transzkripció) gyengül vagy akadályozott. Más típusú promóterfelismerő RNS-polimeráz alegységekhez más konszenzusszekvenciák tartoznak.



7.4. ábra: Az *E. coli* RNS-polimeráz σ^{70} alegysége által felismert promóterek konszenzusszekvenciái

A promóter után pásztázva, az RNS-polimeráz holoenzim (több alegységből álló enzimkomplex) felismeri azt a speciális szekvenciája alapján, hozzáköt, megkezd a DNS kettős hélix lokális széttekerését (ezzel létrejön a **transzkripciós buborék**), és pontosan a +1 pozícióban lévő nukleotidnál elkezd az RNS-lánc felépítését. A promóterben a konzervált szekvenciaszakaszok megfelelő pozícióban való jelenléte elengedhetetlen ahhoz, hogy a transzkripció mindig pontosan meghatározott nukleotidnál indulhasson el.

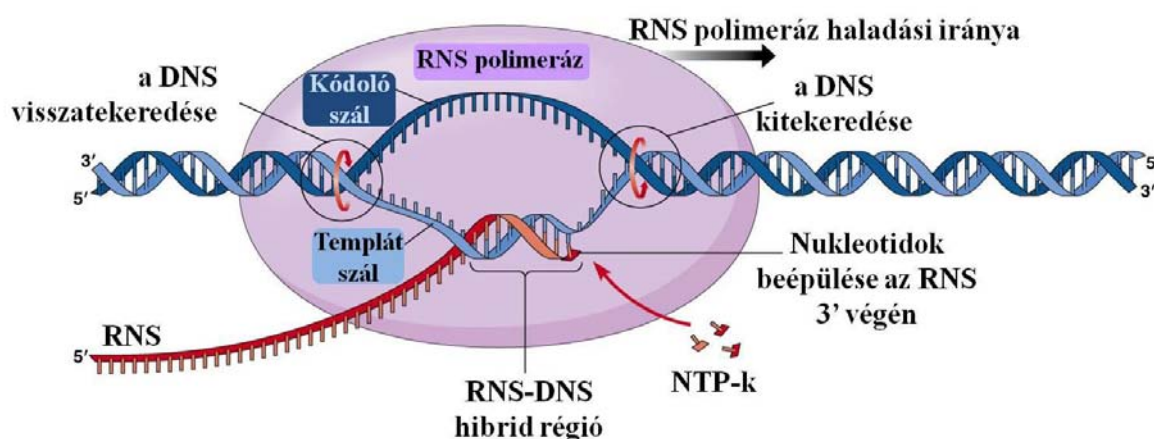
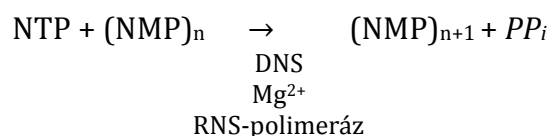
A bakteriális **RNS-polimeráz alegységei**: α , α , β , β' , ω . Ez az öt alegység alkotja az ún. core enzimet (core – mag). A promótert közvetlenül egy további alegység, a σ -faktor ismeri fel, ez irányítja a promóterhez a core enzimet. A σ -faktor elnevezése a specifitás (specificity) kifejezés kezdőbetűjével áll összhangban, ugyanis ez az alegység felel a DNS specifikus szakaszainak felismeréséért. A σ alegység a DNS-szálak szétválasztásában is részt vesz a -10 hely környezetében. A transzkripció elindulásával a σ alegység leválik a DNS-ről és a core enzimről.

Az *E. coli* – akárcsak más baktériumok – többféle σ -faktorról is rendelkezik. A gének zömének átírásában a σ^{70} nevű (70 kDa) fehérje vesz részt. Más σ -faktorkok másféle promóterszekvenciákat ismernek fel, vagyis a σ -faktorkok promóterspecifitásban különböznek egymástól. Ez lehetővé teszi, hogy ugyanaz az RNS-polimeráz holoenzim – a sejtben jelenlévő σ -faktorkok függvényében – többféle, különböző promóterszerkezetű gének csoportjait írhasssa át. Prokariótáknál a gének kifejeződésének a σ -faktorkok sejtben belüli hozzáférhetőségéből (jelenlétéből, hiányából, mennyiségéből) fakadó szabályozása elterjedt (lásd A génkifejeződés szabályozása prokariótákban című 9. fejezetet).

A transzkripció starthelye (+1) nem esik egybe a transzlációs starthellyel. (Itt mRNS-ekről beszélünk; más RNS-féleségek nem templátjai a transzlációnak.) A transzláció a START kodonnál (ez általában AUG az mRNS-en, tehát ATG a kódoló DNS-szálon) indul. A DNS-szekvenciában ez az ATG triplet (bázishármas) a +1 helytől távol, downstream helyezkedik el, és a transzkripciós apparátus számára semmilyen jelzésértékkel nem bír. Ez azt jelenti, hogy a képződő RNS-transzkriptumnak van egy olyan 5' végi szakasza (a transzkriptum eleje), mely nem kerül transzlációra. Ezt az RNS-szakaszt **5' UTR-nek** (untranslated region, nem transzlálódó régió) nevezzük. Az 5' UTR-nek a transzlációnál a riboszóma kötésében fontos szerepe van (lásd erről később).

7.4.3. Transzkripció elongáció prokariótákban

Az RNS-polimeráz haladása közben maga előtt kitekeri, maga mögött pedig visszatekeri a DNS kettős hélixet. A lokálisan széttekert DNS kettős hélix (transzkripciós buborék) lehetővé teszi, hogy a templát szál leolvashatóvá váljon az enzim számára. A transzkripciós buborék így az RNS-polimerázzal együtt halad (7.5. ábra). Az RNS-polimeráz kb. 30 nukleotid hosszan kötődik a DNS-hez (a DNS dupla hélix egy teljes csavarulata 10 nts), a kitekért szakasz hossza 18–20 nukleotidnyi. A nukleotidok beépülése a templát szállal komplementer bázispárosodás alapján történik. A beépüléshez szükséges energiát a szintézis monomereiben, a ribonukleozid-trifoszfátokban (NTP-k) lévő foszfoanhidrid-kötések felszakadása szolgáltatja, pirofoszfát felszabadulása közben. Az RNS-szintézist az alábbi egyszerű képlettel írhatjuk le:



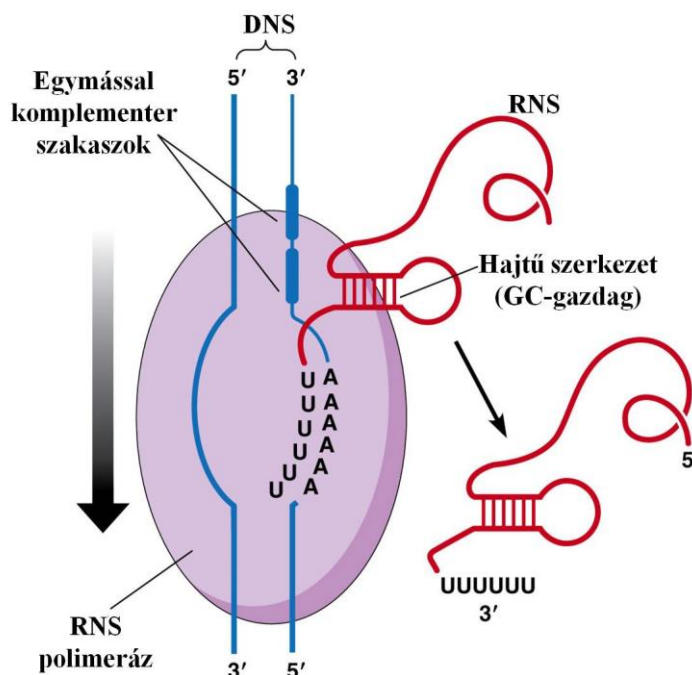
7.5. ábra: RNS-szintézisnél a DNS kettős hélix lokálisan felnyílik (transzkripciós buborék)

Az RNS-láncba utoljára beépült 8–9 nukleotid hidrogénhidakkal kapcsolódik össze a DNS-templátszállal (ez RNS-DNS hibrid régió, 7.5. ábra), az ezt megelőző RNS szakasz pedig leválik a templátról.

7.4.4. Transzkripció termináció prokariótákban

Az elongáció mindaddig tart, míg az RNS-polimeráz nem „érzeke” terminációra utaló jelet. *E. coli*-ban (és más baktériumokban) két fő mechanizmust ismerünk a transzkripció terminációjára: **intrinsic** (belső, vagy másik nevén ρ -független) termináció és **ρ -függő** termináció.

Az intrinsic terminációs mechanizmus direkt út, külső faktor nem szükséges hozzá. A terminációs szignál – ahogy a mechanizmus neve is utal rá – a DNS-ben kódolt. Ez egy kb. 40 nukleotid hosszú szekvencia, mely rendelkezik két egymással komplementer, GC-gazdag szakasszal, melyet minimum hat A nukleotid követ (7.6. ábra). Ez a DNS-templátra jellemző szekvencia a róla átíródó mRNS-ben, az ellentétes irányultságú komplementer szakaszoknak köszönhetően, ún. hajtú szerkezet kialakulását idézi elő (7.6. ábra). Ezt követi egy A-U hibrid szakasz, mely laza DNS-RNS párosodást okoz. A mechanizmus részletei nem világosak. Feltételezhető, hogy a transzkripció során az RNS-polimeráz érzékeli, ha túl laza a „mögötte hagyott” DNS-RNS hibrid szakasz, ekkor visszalép, és megpróbálja stabilizálni azt. A terminációs szakaszon kialakuló laza A-U kapcsolódás ezért leállásra és visszalépésre készítheti az RNS-polimerázt, a stabil, GC-párok által összetartott hajtú struktúra pedig útját állja, melynek hatására a polimeráz és az RNS leválik a DNS-ről. Az *E. coli* genomban ezernél több ilyen szekvencia található, ami azt jelenti, hogy a gének közel fele ilyen terminátorral rendelkezik.



7.6. ábra: Intrinsic (ρ -független) transzkripció termináció

A másik terminációs mechanizmusban egy fehérje, a **ρ -faktor** működik közre. Ez egy homohexamer fehérje. A ρ -függő terminációs szignált is egy speciális DNS-szakasz szolgáltatja, melyre jellemző, hogy 40–60 nukleotid hosszúságú, C-ben gazdag (de G-ben szegény), és tartalmaz egy ún. rut (rho ut ilization site, ρ által felismert hely) szekvenciárészt. Amint a rut hely átíródik és hozzáférhetővé válik, a ρ -fehérje hozzáköt, ezzel leállásra kényszeríti az RNS-polimerázt, és elősegíti az RNS leválását.

mRNS-ek esetén a transzkripció terminációs helyet mindig megelőzi a majdani transzláció terminációs hely (ez a STOP kodon, lásd később). Az mRNS 3' végén tehát – az 5' véghez hasonlóan – van egy nem transzlálódó szakasz (UTR, untranslated region, nem transzlálódó régió). A **3' UTR** tehát az mRNS-nek a STOP kodontól a 3' végig tartó szakasza, mely tartalmazza a transzkripció terminációs szignált.

7.4.5. Transzkripció eukariótákban – áttekintés

Az eukarióta transzkripció az alapmechanizmusok tekintetében a prokarióta mechanizmusokhoz hasonlít, de annál jóval komplikáltabb. Ennek legfőbb okait az alábbi három pontban foglaljuk össze:

- Eukariótákban a gének száma nagyobb (jellemzően tízezres nagyságrendű a prokarióta genomok néhány ezres génszámával szemben). Ehhez a nem kódoló DNS-szakaszok magas aránya társul, ami jelentősen csökkenti a gének „sűrűségét”. Néhány példa a génsűrűsége: *E. coli* 1 gén/1400 bp, *Drosophila* 1 gén/9000 bp, ember 1 gén/100000 bp. Egy gén megtalálása a transzkripciós apparátus számára olyan lehet, mintha tűt keresnénk a szénakazalban. Érthető, hogy eukarióta sejtekben komplexebb transzkripció iniciációs rendszer felelhet csak meg ennek az óriási kihívásnak. Az egyik kiemelendő eltérés a prokariótákkal szemben az, hogy eukariótákban nem egy, hanem három különböző RNS-polimeráz enzim működik. Az RNS-polimerázok más-más géncsoportok transzkripcióját végzik:
 - **RNS-polimeráz I** – rRNS-gének átírása (kivéve az 5S RNS-t)
 - **RNS-polimeráz II** – fehérjekódoló gének (melyek termékei a mRNS-ek), továbbá néhány snRNS gén átírása
 - **RNS-polimeráz III** – kis funkcionális RNS-ek (tRNS-gének, snRNS-gének és az 5S rRNS-gének)

A mitokondrium és a kloroplaszt saját RNS-polimerázzal rendelkezik.

Ebben a fejezetben elsősorban az RNS-polimeráz II-vel foglalkozunk.

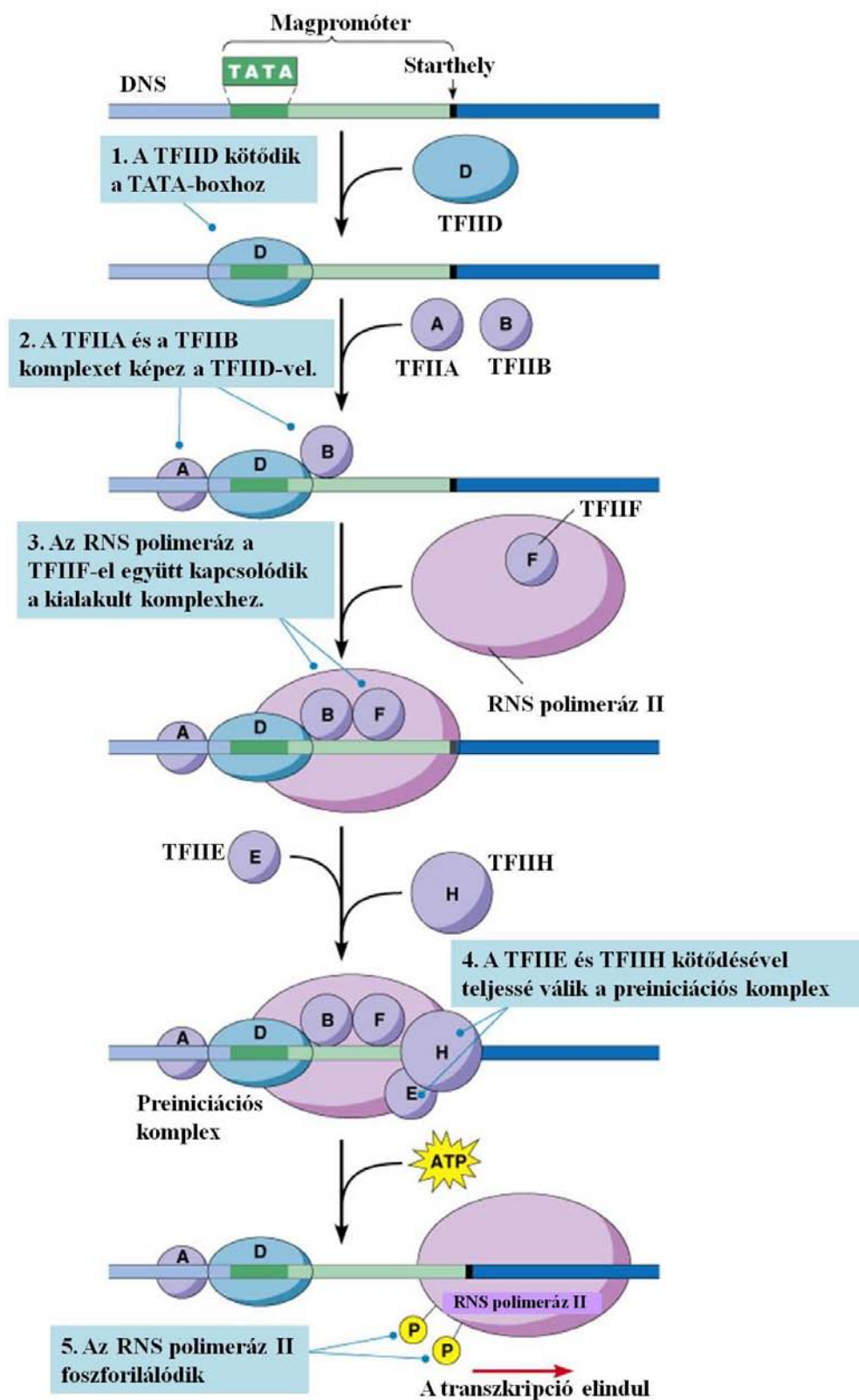
Az eukarióta génátírás másik fontos jellemzője, hogy az iniciációs lépésben az RNS-polimerázon kívül számos fehérje vesz részt. Ezeket a fehérjéket összefoglaló néven **általános transzkripciós faktoroknak** (GTFs, general transcription factors) nevezzük. Hiányukban az RNS-polimeráz nem képes elindítani az átírást.

- Eukariótákban a transzkripció és a transzláció térben és időben elkülönül egymástól: a transzkripció a sejtmagban, a transzláció a citoplazmában zajlik. Míg prokariótákban már a transzkripció elongáció során elkezdődik az 5' RNS vég transzlációja, eukarióta sejtekben az mRNS-nek előbb ki kell jutnia a sejtmagból. Ezt megelőzően számos módosuláson megy keresztül az **elsődleges transzkriptum** (vagy **pre-mRNS**), mely folyamatokat összefoglaló néven **RNS-érésnek** nevezünk (ennek részleteit lásd a továbbiakban).
- Eukariótákban a **kromatin** szerkezete befolyásolja a génátírást, ami jelentős szereppel bír a gének kifejeződésének szabályozásában.

7.4.6. Transzkripció iniciáció eukariótákban

Az **RNS-polimeráz II** nem képes arra, hogy a gének promóter régióit felismerje. Ehhez más fehérjék, az **általános vagy alap transzkripciós faktorok** (GTFs, general vagy BTFs, basal transcription factors) szükségesek. A TFIIA, TFIIB... stb. (transcription factor of RNA polymerase II) elnevezésű általános transzkripciós faktorok egyenként is több fehérjéből felépülő komplexek. Maga az RNS-polimeráz II szintén több (egy tucat körüli) alegységből áll. Az RNS polimeráz II több alegysége **konzervált** (hasonló szerkezetű) az élesztőtől a humánig. Ezt igazolja, hogy ha az élesztő RNS-polimeráz bizonyos alegységeit a humán megfelelőire kicserélik, akkor az az élesztősejtekben funkcionál **kiméra** (a kiméra szó jelentése: különböző eredetű részeket magába foglaló) RNS-polimerázt alkot.

A **promóter** régió eukarióta géneknél is a transzkripciós starthelytől 5' irányban helyezkedik el. Az eukarióta promóterek kiterjedtebb szekvenciaszakaszok, mint a prokarióta promóterek, és funkcionális szempontból két részre oszthatók: **magpromóter** és **szabályozó promóter**. E fejezetben a magpromóterrel foglalkozunk, a szabályozó promóterekről a génexpresszió szabályozás témakörnél lesz szó. Az RNS polimeráz-II által átírt gének promótereinek összehasonlításából kirajzolódik a -30 pozíció környezetében elhelyezkedő TA-gazdag, ún. **TATA-box** konszenzus szekvencia. Ennél a pozíciónál kezdődik el a **preiniciációs komplex** összeépülése, mely hat GTF-t és magát az RNS-polimeráz II enzimkomplexet tartalmazza (7.7. ábra). A TATA-boxot a **TFIID** komplex **TBP** (TATA-binding protein, TATA-kötő fehérje) alegysége ismeri fel. A TBP a promóter környezetébe vonzza a többi GTF-t (**TFIIA**, **TFIIB**, **TFIIE**, **TFIIF**, **TFIIH**) és az RNS-polimerázt (7.7. ábra). A preiniciációs komplex összeszerelődésével az RNS polimeráz II-komplex a megfelelő helyre irányítódik, és elkezdheti az átírást. Az elongációs szakasz kezdetéről azt tudjuk, hogy az RNS polimeráz II egyik alegységének a C-terminális doménje (**CTD**) **foszforilálódik**, feltehetőleg valamelyik GTF által. Ez a kémiai módosulás lazíthatja a polimeráz kötődését a preiniciációs komplex többi tagjához, és elősegítheti a leválását (7.7. ábra). Ezzel kezdetét veszi az RNS-lánc szintézis (elongációs) szakasz. A GTF-ek egy része a DNS-hez kötötten marad, és hozzájuk újabb RNS-polimeráz kapcsolódhat. Ily módon egy génről egymást követően több polimeráz folytathat átírást.



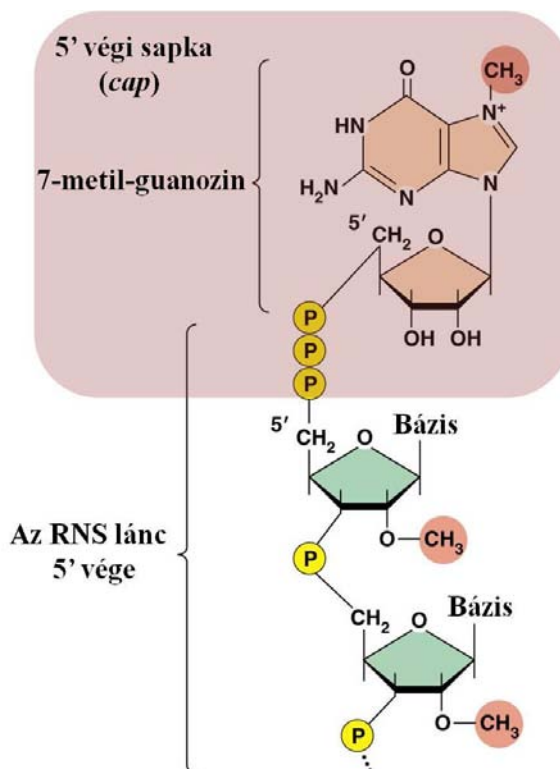
7.7. ábra: Transzkripció iniciáció eukariótákban

7.4.7. Transzkripció elongáció, termináció és pre-mRNS-érés eukariótákban

Az elongáció a transzkripció buborékban a prokarióta RNS-szintézishez hasonlóan zajlik. A lényegi különbség, hogy míg prokariótáknál a még polimerizálódó RNS-szál már elkészült 5' végéhez riboszóma kapcsolódik, és elindul a transzláció, addig az eukarióta pre-mRNS-ek nem transzlálódnak, hanem ebben a fázisban esnek át három fontos érési folyamaton: 1) az 5' vég egy „sapkát” (**cap**) kap, 2) meghatározott szakaszai, az intronok kivágásra kerülnek, ez a **splicing** nevű folyamat, 3) a 3' végre adenin tartalmú nukleotidokból álló szakasz (poliA) kapcsolódik a **poliadenilációnak** nevezett folyamat során. Korábban azt gondolták, hogy ez a három érési folyamat a transzkripció végeztével zajlik (azaz poszt-transzkripcionálisan), de a kísérleti eredmények azt igazolják, hogy már a transzkripció közben (ko-transzkripcionálisan) végbemegy a pre-mRNS-ek érése. Úgy tűnik, hogy az RNS-polimeráz már említett alegységének C-terminális doménje (CTD, amely az elongációs fázis elején foszforilálódik) fontos szerepet kap az érési folyamatok összehangolásában, irányításában is. A CTD jellegzetes aminosavsorrenddel rendelkezik (hét aminosavból álló szakasz többször ismétlődik), és térben a készülő RNS-lánc RNS-polimeráztól leváló részének közelében helyezkedik el. Az érés egyes fázisaiban a CTD aminosavai reverzibilis módosításokon mennek keresztül (leggyakoribb a foszforiláció–defoszforiláció), ami meghatározza, hogy az érésben részt vevő fehérjék közül melyek kapcsolódnak hozzá, és kerülnek ezáltal az RNS-lánchoz közel.

Az 5' és a 3' végek módosítása

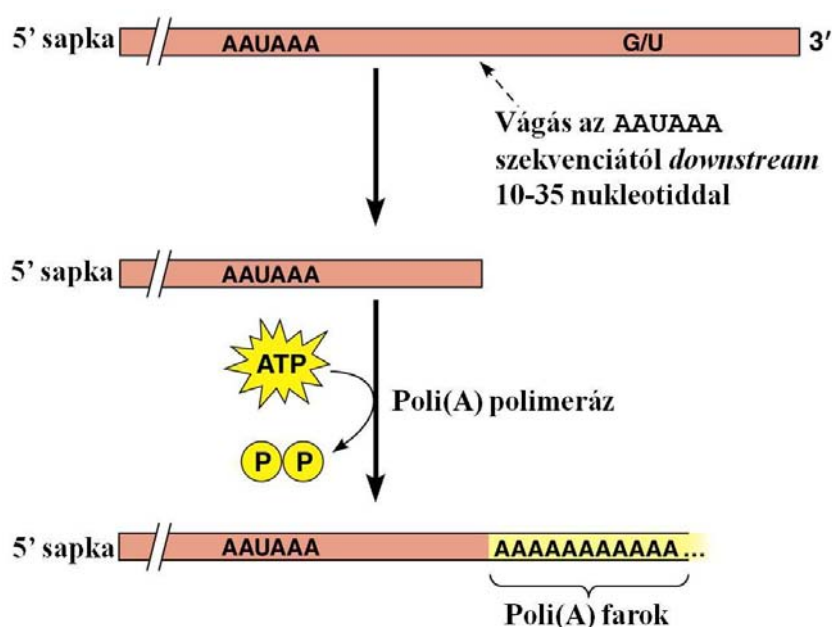
Amint az RNS-lánc 5' vége („eleje”) leválik a polimeráztól, egy speciális struktúrát, 7-metilguanozin „sapkát” (**cap**) kap, mely három foszfátcsoporton keresztül kapcsolódik a transzkriptumhoz (7.8. ábra).



7.8. ábra: Capping: az RNS 5' végi módosítása

A módosítást az ún. capping enzimkomplex végzi. A cap szerepe kettős: 1) védi az RNS-t a degradálódástól, ami azért fontos, mert hosszú utat kell megtennie, míg a transzlációra sor kerül, 2) jelenléte szükséges a transzlációhoz (erről lásd később).

Az elongáció addig folytatódik, míg egy AAUAAA vagy AUUAAA konzervált szekven-
cia keletkezik az RNS-szálon. Ezt egy enzim felismeri, és tőle 10–35 nukleotiddal
downstream elvágja a transzkriptumot. Az elvágott 3' véghez egy 150–200 adenint tar-
talmazó nukleotidfüzér (**poliA farok**) szintetizálódik (7.9. ábra). A konzervált
szekvenciaszakaszt ezért **poliadenilációs szignálnak** nevezzük. A 3' vég módosítását
végző enzim a **poli(A) polimeráz**. Ez az RNS-lánchosszabbítás nem igényel templátot,
a poliA farok nem a DNS-ben kódolt! Megjegyezzük, hogy más RNS-féleségekhez (nor-
málisan) nem kapcsolódik poliA farok, ami lehetőséget teremt arra, hogy a kutatók az
mRNS-eket szelektíven preparálhassák a sejtekből (például kromatográfiás oszloptöl-
tetten rögzített szintetikus oligoT szekvenciákhoz az mRNS-ek a poliA szekvenciájukkal
a komplementer bázispárosodás alapján kikötődnek).

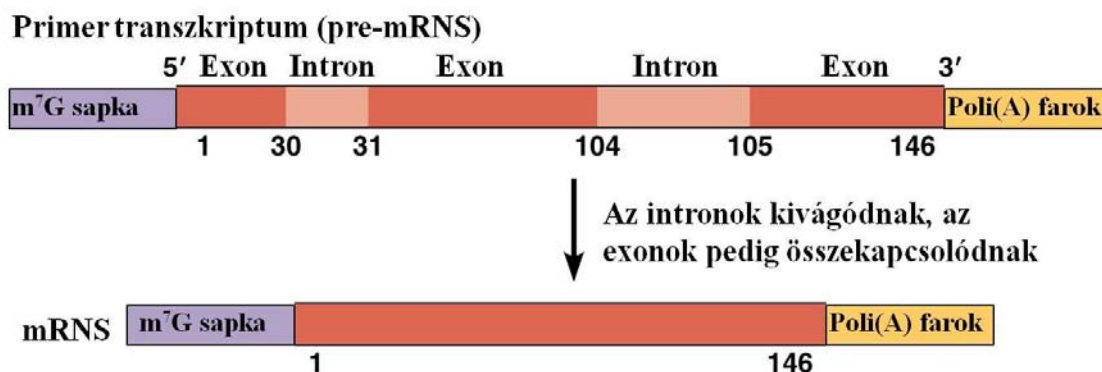


7.9. ábra: Poliadeniláció: az RNS 3' végi módosítása

Az intronok eltávolítása: RNS-splicing

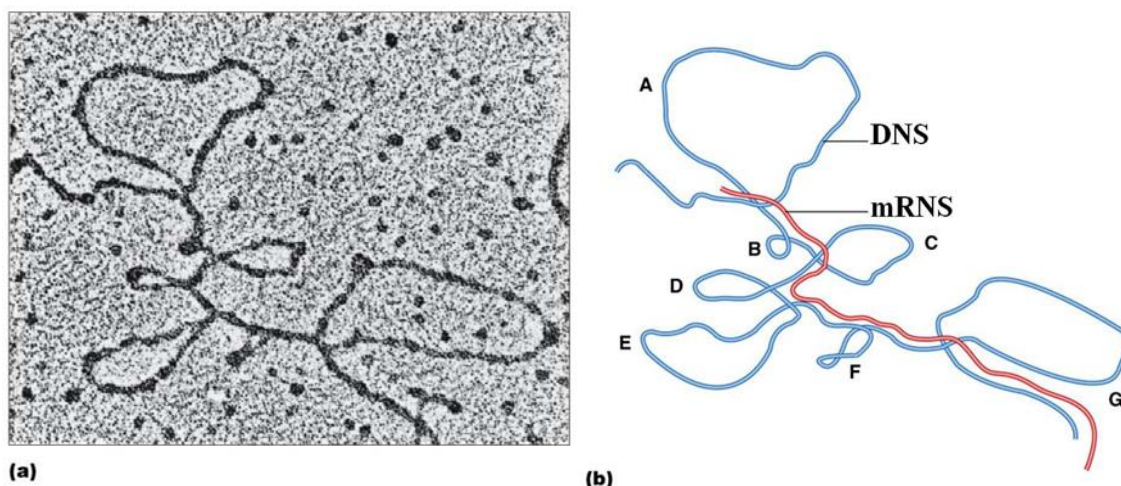
1977-ben a Cell című folyóiratban jelent meg egy tudományos publikáció a következő címmel: An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA, azaz Elképesztő szekvenciaelrendeződés az adenovírus 2 mRNS 5' végén. Az „elképesztő” kifejezés nem volt túlzó. Két kutatócsoport (Richard **Roberts** és Phillip **Sharp** laboratóriuma) egymástól függetlenül fedezte fel, hogy az eukarióta gének két-féle darabokból állnak, **exonokból** és **intronokból**. Az exon szakaszok (expressed region, kifejeződő régió) tartalmazzák mRNS-ekben a fehérjék aminosavsorrendjére vonatkozó kódsort, az intron részek (intervening region, közbeeső régió) pedig az exonok közé ékelődnek, genetikai kódként nem funkcionálnak, mivel a primer transzkriptum érése során kivágódnak (7.10. ábra). Az intronok funkciója máig nem világos. Intronok nemcsak a proteinkódoló génekben vannak, hanem néhány rRNS- és tRNS-génben is. Az intronok száma, mérete egy genomban génenként változik, illetve

fajok között is vannak felismerhető különbségek. Például az élesztő 6300 génjéből csak kb. 200-ban van intron, emberben pedig a legtöbb génben van néhány intron. Emberben az intronok átlagos mérete 2000 nukleotid, az exonoké pedig 200 nukleotid. Egy extrém példa: egy humán izombetegség, a Dushenne-féle izomdisztrófia génje 79 exont és 78 intront tartalmaz, együttesen 2,5 millió bp hosszúságú, s ebből az exonok mindössze 14000 bp-t tesznek ki.



7.10. ábra: Az exonok közé ékelődő intron szakaszok az érés során kivágódnak

Az intronok láthatóvá tehetők elektronmikroszkóppal, ha az érett mRNS-t a megfelelő genomiális DNS-szakasszal hibridizáltatják (párosítják). Ekkor az intronszakaszok – mivel az RNS-ben nincs homológ szekvenciájuk – kihurkolódnak (7.11. ábra). Kísérletesen bázispontossággal megállapíthatók az exon–intron határok úgy, hogy az ismert genomiális szekvenciát és az érett mRNS-ről készített cDNS (komplementer DNS, melyet *in vitro* rendszerben rutinszerűen szintetizálnak reverz transzkriptáz enzim segítségével) szekvenciáját összevetik egymással.

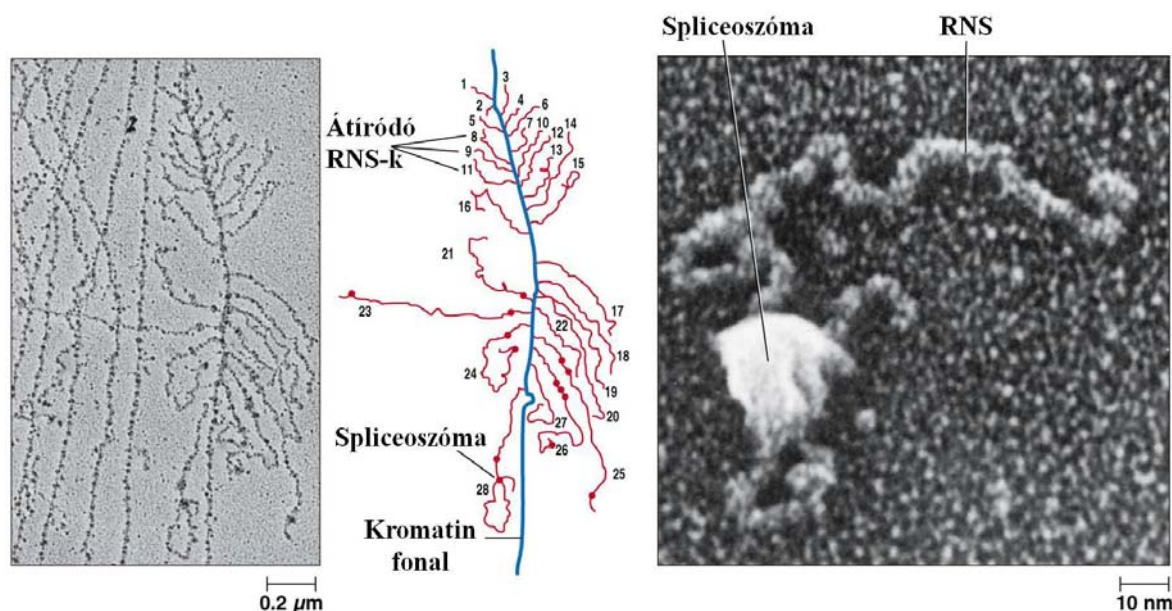


7.11. ábra: A gén és a róla képződött érett mRNS hibridizációjakor a DNS-molekula intron szakaszai kihurkolódnak, mert az érett mRNS-ben nincs homológ szakaszuk

A splicing mechanizmusa. A spliceoszóma és a kis nukleáris RNS-ek (snRNS-ek)

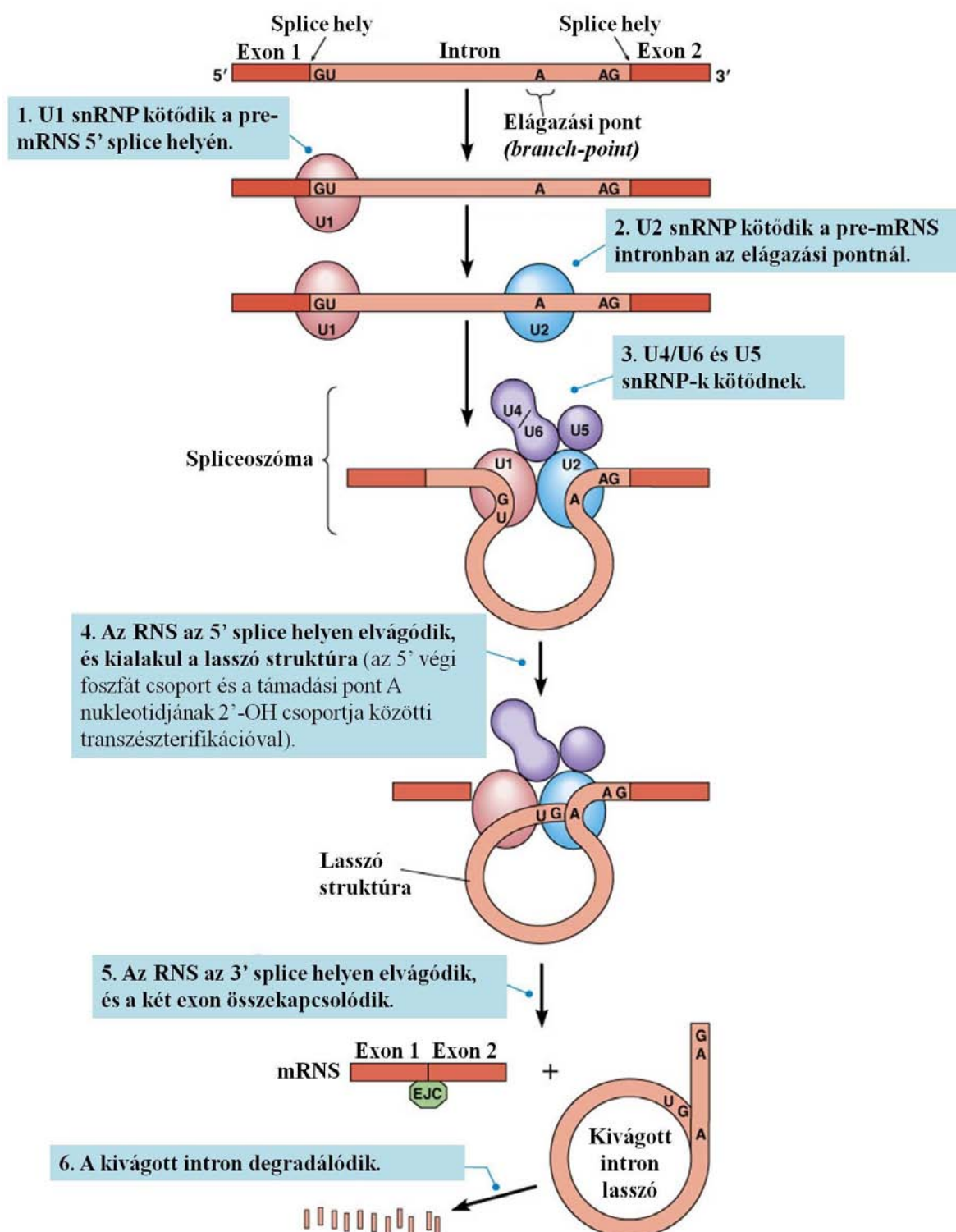
Miután az intronok léte nyilvánvalóvá vált, a következő kérdés az volt, hogy milyen mechanizmussal vágódnak ki nukleotidpontossággal az intronok. A kutatók első megközelítésképpen pre-mRNS szekvenciákat hasonlítottak össze (melyekben az exon–

intron határokat már ismerték). Az illesztésekből kirajzolódott a konzervált bázisok helye és milyensége: az intronok **5' végén GU**, a **3' végén AG**, és ez utóbbtól 15–45 nukleotiddal upstream konzervált **A** nukleotid mindig jelen van (7.13. és 7.14. ábra). E három hely környezetében lévő más nukleotidok konzerváltsága is megfigyelhető (de nem annyira erős). A konzervált bázisok jelenléte az exon–intron határokon arra utalt, hogy léteznie kell olyan celluláris „gépezetnek”, mely információként használja ezeket a jeleket, és az exonok **splicingját** (összekapcsolását) véghezviszi. Mint a tudományban sok más esetben is, a splicing elemek első megfigyelése is a véletlennek köszönhető. Joan **Steitz** autoimmun betegségben szenvedő páciensek vérének vizsgálata közben olyan antitestet talált, mely egy nagy molekuláris komplexhez kapcsolódott. Ez a nagyméretű molekuláris komplex kisméretű RNS-eket és fehérjéket tartalmazott. Mivel ezt a riboprotein komplexet sejtmagból izolálták, az RNS-komponenseket **kis nukleáris RNS-knek (snRNAs, small nuclear RNAs)** nevezték el. Később kiderült, hogy az snRNS-ek komplementer szakaszokat hordoznak az exon–intron határok környezetével, és így összefüggésbe hozták ezeket a splicinggal. Mai tudásunk szerint a transzkriptum konzervált szakaszait öt snRNP (**snRNS+proteins**) komplex ismeri fel, melyek fehérjéket és az öt snRNS (U1, U2, U4, U5, U6) egyikét tartalmazzák. Száznál több további fehérje vesz még részt a folyamatban. Ezek az elemek együttesen alkotják az intronok eltávolítását végző molekuláris gépezetet, a **spliceoszómát** (7.12. ábra). A spliceoszóma komponensei kölcsönhatásban állnak az RNS-polimeráz CTD-részevel, és így kerülnek közel a készülő RNS lánchoz már a transzkripció befejezése előtt (7.12. ábra). A splicing tehát ko-transzkripcionálisan megy végbe (ily módon a 7.10. ábra nem teljesen hűen tükrözi a valóságot, mert a poliA farok létrejötte előtt már kivágódhatnak az intronok). Ez mikroszkóposan is megfigyelhető (7.12. ábra).

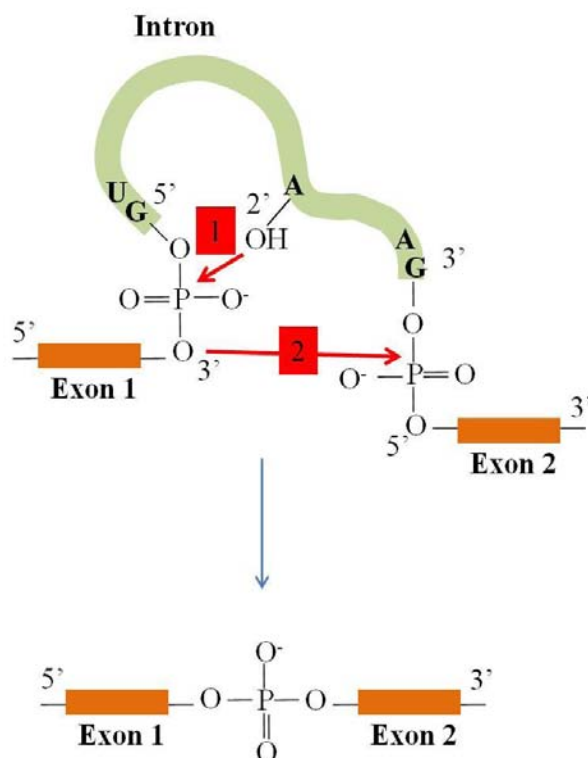


7.12. ábra: Egy génről egyszerre több RNS-transzkriptum képződik, ez mikroszkóposan fenyőfára emlékeztető struktúráként jelenik meg (a „fa teteje” a gén elejének, „alja” a gén végének felel meg, egyre hosszabb „ágakkal”, vagyis leváló transzkriptumokkal). A splicing ko-transzkripcionálisan zajlik, ez a bal oldali felvételen megfigyelhető.

A splicing kémiai két transzészterifikálási reakciót jelent. Az első reakcióhoz az **elágazási ponton** (branch point) lévő konzervált A nukleotid ribózegységének 2' -OH csoportja szükséges. Az első transzészterifikálás következtében az intron lasszóra emlékeztető szerkezetet alkot. Az intron lasszóstruktúra a második transzészterifikálást követően kivágódik, majd lebomlik (7.13. és 7.14. ábrák).



7.13. ábra: A splicing folyamatának áttekintése



7.14. ábra: A splicing két egymást követő transzészterifikálási reakcióval valósul meg

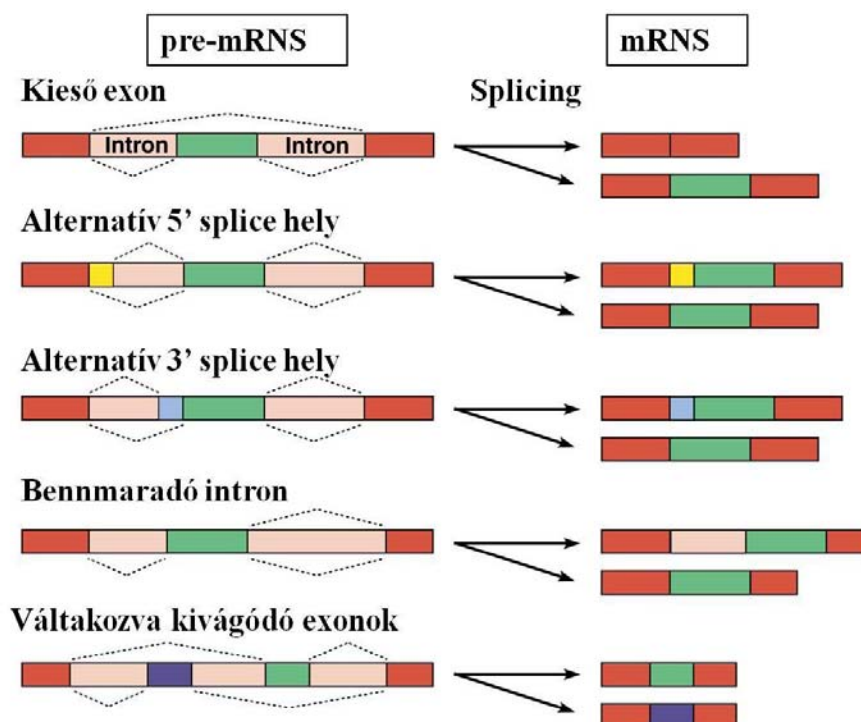
Self-splicing intronok és „RNS-világ”

Átütő felfedezés született 1981-ben Tom **Cech** és munkatársai jóvoltából. Leírták, hogy a *Tetrahymena* állati egysejtű (melyet a telomerkutatás kapcsán már említettünk) egyik rRNS-ének elsődleges transzkriptumából egy 413 nukleotid hosszúságú intron szakasz kémcsőben, fehérjék nélkül, önkatalizált módon képes kivágnodni. Ma már több, hasonló tulajdonsággal rendelkező, ún. self-splicing intront ismerünk. Ezek az ismeretek az snRNS-k splicingban betöltött szerepének felülvizsgálatára készítették a kutatókat. A legfrissebb kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a spliceoszómában az intronok eltávolítását nem a fehérjekomponensek katalizálják, hanem az snRNS-ek. Később látni fogjuk, hogy mai tudásunk szerint egy másik RNS-fehérje gépezet, a riboszóma működésében is igen fontos katalitikus szerepük van a riboszóma RNS komponenseinek a fehérjeszintézis során. A katalitikus funkcióval rendelkező RNS-eket **ribozimek**nek nevezzük. Létük hívta életre az „RNS-világ” teóriát, mely szerint a földi élet kialakulása során az első sejtek genetikai anyaga RNS lehetett, mivel ez a molekula képes genetikai információ tárolására és egyúttal biokémiai reakciók katalizálására is.

Alternatív splicing

A humán **genom** körülbelül 20000 fehérjekódoló gént tartalmaz (ami csak körülbelül kétszerese egy hengeresféreg génjei számának), a humán fehérjék összesége, a **proteom** viszont százazres nagyságrendben tartalmaz fehérjéket. Ez csak úgy lehetséges, ha egy génben kódolt információ egynél több fehérje szerkezetét is képes meghatározni. Ez többek között az alternatív splicing segítségével valósul meg, melynek során egy elsődleges transzkriptumból több különböző mRNS és ennek megfelelően több különböző fehérje képződik. Míg az alternatív splicing igen ritka a növények körében, ad-

dig a humán gének több mint 70%-áról képződik alternatív splice termék. Hangsúlyozni kell, hogy az alternatív splicing során képződő fehérjetermékek egymáshoz hasonlóak, hiszen ugyanazon elsődleges transzkriptum alapján készülnek. Ezek az alternatív szerkezetű fehérjék általában különböző sejttypusokban vagy eltérő fejlődési stádiumokban keletkeznek. A lehetséges alternatív splicing mechanizmusokat szemlélteti a 7.15. ábra.



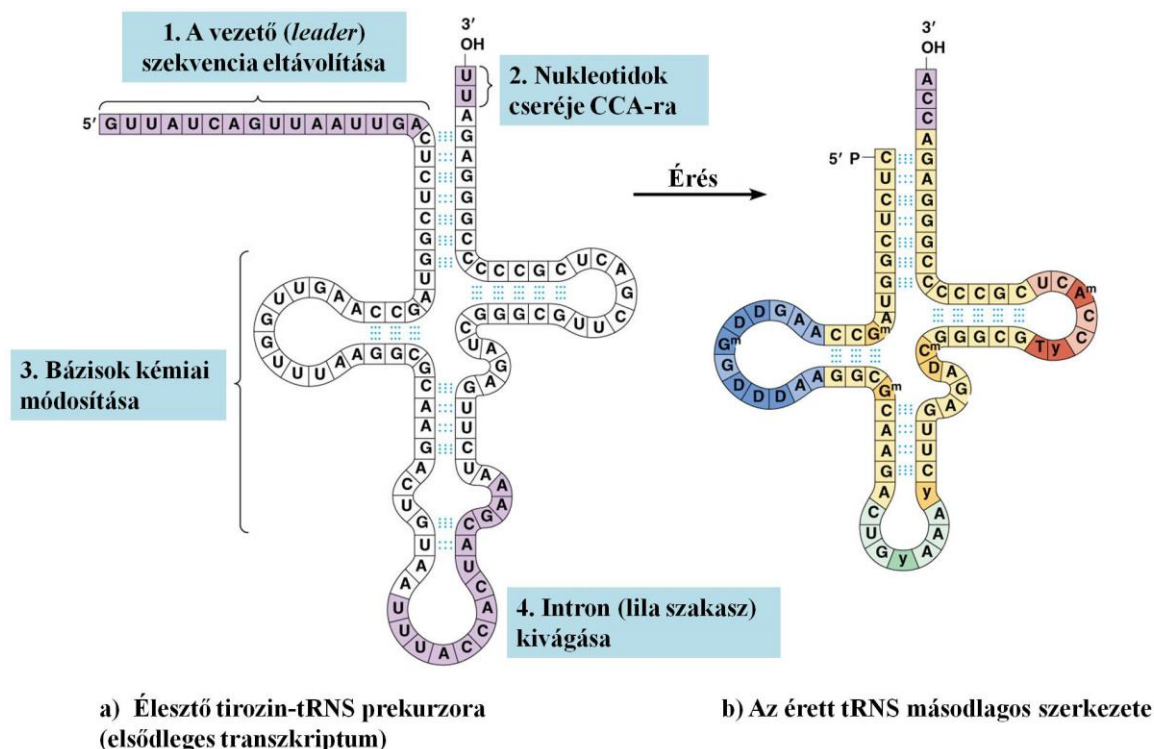
7.15. ábra: Alternatív splicing formák

7.4.8. Az eukarióta tRNS-ek érése

A tRNS-ek is átesnek érési folyamatokon (7.16. ábra). Ezek leggyakrabban az alábbiak:

- Az 5' végi szekvencia eltávolítása
- A 3' végi két nukleotid cseréje CCA szekvenciára (ez minden tRNS-molekulára jellemző, ehhez a részhez kapcsolódik a tRNS által a fehérjeszintézis helyére szállított aminosav).
- Meghatározott bázisok kémiai módosítása
- Intronok eltávolítása

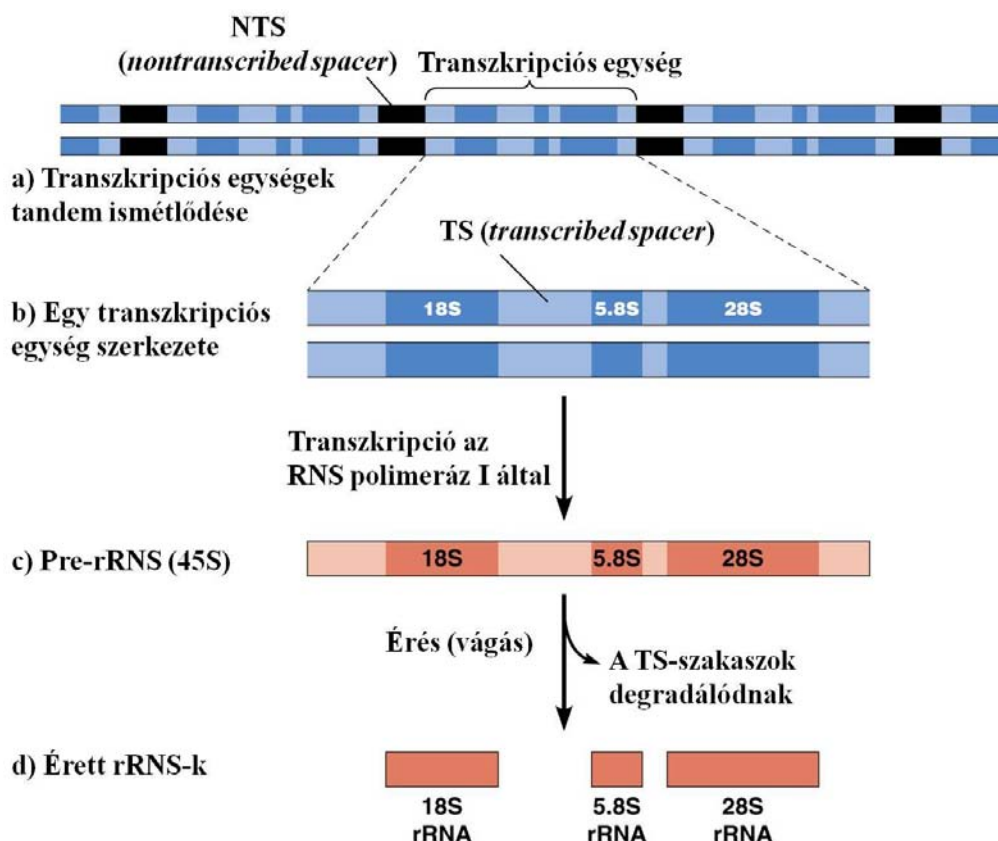
Az érett tRNS-t síkban ábrázolva lóhere levélre emlékeztető szerkezetet látunk (7.16. ábra). Ez a jellegzetes másodlagos szerkezet intramolekuláris bázispárosodások következtében alakul ki.



7.16. ábra: Egy tRNS-prekursor és érett formája

7.4.9. Az eukarióta rRNS-ek érése

A riboszómális RNS-gének egy része (18S, 5,8S és 28S) egy transzkripciós egységet alkot, és a genomban ezek az egységek egymás mellett többször ismétlődnek (ún. tandem ismétlődés, lásd a Sejtbiológiai tanulmányokban a nucleolust). Az rRNS-gének átírását az RNS-polimeráz I enzim végzi. Egy transzkripciós egységről egy olyan primer transzkriptum képződik (45S), mely a három rRNS-szekvenciát tartalmazza TS (transcribed spacer, átíródó elválasztó) szakaszokkal elválasztva egymástól. Az érés során a TS-szakaszok kivágódnak és előáll a háromféle rRNS-molekula (7.17. ábra).



7.17. ábra: Eukarióta rRNS-ek érése

7.5. A gének és a fehérjék kolinearitása

Az 1900-as évek első felében már ismert volt, hogy a gének kromoszómákon lokalizálódnak (lásd a kromoszómaelméletet, [2.4.5.](#) szakasz). A gének egymáshoz viszonyított helyzetét genetikai eszközökkel (lásd a rekombinációs térképezést, [4.4.](#) szakasz) meg tudták határozni még mielőtt bizonyítást nyert volna, hogy a gének anyaga a DNS, és mielőtt a DNS szerkezetét megismerték volna. Egy ideig külön fejlődött a genetika a maga eszköztárával, és tőle viszonylag független tudományág volt a hosszabb múltra visszatekintő biokémia. A két terület azonban a múlt század közepétől fokozatosan közelített egymáshoz.

A gének és a fehérjék kapcsolatára vonatkozó fontos feljegyzést tett Archibald **Garrod** az 1920-as években. Alkaptonúriás betegeket vizsgálva azt tapasztalta, hogy a betegek vizeletében a homogentizinsav felhalmozódik. (Egészséges embereknél ez a vegyület normálisan továbbalakul.) Garrod azt is tudta, hogy ez recesszíven öröklődő betegség, s feltételezte, hogy öröklődő metabolikus hiba, enzimhiba. Garrod felvetette annak lehetőségét, hogy a sejtekben lejátszódó kémiai reakciók gének irányítása alatt állhatnak.

Nagy jelentőségű kísérletsort végzett ezen a területen George Wells **Beadle** és **Edward Lawrie Tatum** 1940-ben. (Munkájukért 1958-ban Nobel-díjat kaptak.) Egy biokémiai útvonal genetikai analízisét végezték el *Neurospora crassa* gombán (lásd az Egy biokémiai útvonal genetikai analízise című [5.5.6.](#) fejezetben). Munkájuk hidat vert a genetika és a biokémia kutatási módszertana között. Eredményeik alapján megalkották

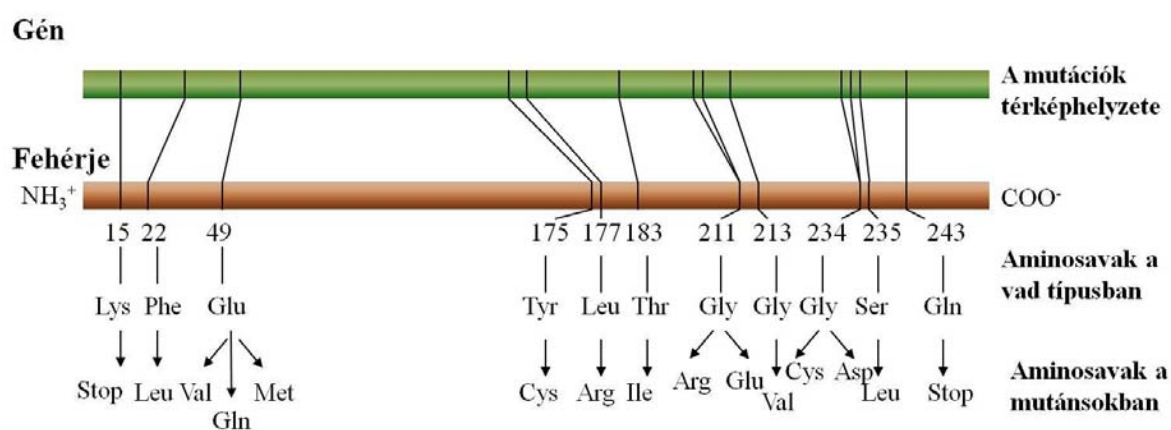
az **egy gén – egy enzim** hipotézist, mely szerint a gének felelősek az enzimek funkciójának kialakításáért. A szakmában a molekuláris biológia fogantatását kötik ehhez a munkához.

Ne feledjük, hogy a gének anyagi természete (lásd Griffith és Hershey-Chase munkái), és a gének anyagának szerkezete (lásd a DNS Watson–Crick-féle modelljét) csak ezt követően vált ismertté.

Nagy áttörést jelentett a fehérjék szekvenálási módszerének kidolgozása. Frederick **Sanger**nek hat évébe telt a szarvasmarha viszonylag kisméretű (51 aminosavból álló) inzulin aminosavsorrendjének meghatározása. Ez volt az első publikált fehérje szekvencia (1955-ben, jóval megelőzve a DNS-szekvenálást). A módszer kidolgozásáért Sanger 1958-ban megkapta a kémiai Nobel-díjat. (Második Nobel-díját 1980-ban kapta a DNS-szekvenálás módszerének kidolgozásáért, Paul Berggel és Walter Gilberttel megosztva.)

A Sanger-féle fehérjeszekvenálás módszerét felhasználva Vernon **Ingram** 1957-ben egészséges emberek és sarlósejtes vérszegénységben szenvedő betegek véréből származó (mutáns) hemoglobin β -alegység szekvenciáit hasonlította össze. A hemoglobin β -láncában egyetlenegy aminosav különbséget talált (a hatodik pozícióban glutaminsav helyett valin található a mutáns változatban). Munkájával a korábban genetikailag azonosított betegség új értelmezést nyert a fehérjeszerkezet szintjén. Később további öröklődő hemoglobinváltozatokban más-más aminosavcseréket találtak. Nyilvánvalóvá vált, hogy a génváltozatok fehérjeváltozatokat határoznak meg.

Minden ismeret arra utalt, hogy a DNS nukleotidsorrendje és a fehérjék aminosavsorrendje között lineáris megfeleltethetőség (kolinearitás) áll fenn. A kolinearitás kísérletes igazolására 1963-ban került sor. Charles **Yanofsky** egy könnyen kezelhető modellszervezetet, az *E. coli* baktériumot használta a kérdés tisztázására. 16 triptofán szintetáz mutánst izolált. A mutációk egymáshoz viszonyított helyét a *trpA* génben térképezte (rekombinációs térképezéssel). Az egyes mutánsokból izolált TrpA fehérje aminosavsorrendjét is meghatározta. Minden esetben egyetlen aminosavcserét talált. Bár a gén nukleotidsorrendjét akkor még nem tudta meghatározni, a mutációk sorrendjét és relatív távolságukat a klasszikus genetikai térképezéssel meglehetősen precízen meg tudta állapítani. Amikor a mutációk térképhelyzetével összevetette az egyes génváltozatok által kódolt fehérjeváltozatok adatait, akkor azt tapasztalta, hogy a *trpA* génben a mutációk sorrendje és relatív távolságuk megegyezik a fehérjék megfelelő aminosavváltozásainak sorrendjével és viszonylagos távolságával (7.18. ábra). Ezzel a gének és a fehérjék kolinearitása bizonyítást nyert.



7.18. ábra: A gén és a fehérje közötti kolinearitás igazolása Yanofsky kísérletében

7.6. A genetikai kód

A genetikai kód az a fordítási kulcs, amely meghatározza, hogy milyen nukleotidcsoportok felelnek meg az egyes aminosavaknak.

1968-ban a Nobel-bizottság a genetikai kód megfejtéséért és a fehérjeszintézisben játszott szerepének tisztázásáért három kutatónak – Robert William **Holley**, Har Gobind **Khorana** és Marshall Warren **Nirenberg** – ítélte oda a rangos kitüntetést.

Holley nevéhez fűződik a fehérjeszintézisben részt vevő tRNS-ek szétválasztására szolgáló módszerek kidolgozása. Ő határozta meg az első RNS, az alaninspecifikus tRNS nukleotidsorrendjét (1964). Khorana módszereket dolgozott ki meghatározott szekvenciájú, szintetikus polinukleotidok előállítására. A kémiai és enzimatiszter módszerek szellemes kombinációjával szintetizált poliribonukleotidokat, melyeket messengerként használt sejtmentes rendszerben folyó fehérjeszintézis programozására. Nirenberg 1961-ben munkatársaival együtt leírta egy *E. coli*-ból készített sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszer előállításának és működésének körülményeit. A fenti technikai előrelépések teremtették meg a genetikai kód megfejtésének lehetőségét.

Lássuk, mit tudtak a genetikai kódról a genetikai kódrendszer megfejtése előtt:

- **A kód három betűs**

Elvi megfontolás: A 20 aminosav kódolásához csak 4 különböző nukleotid áll rendelkezésre, ezért egy-egy aminosav meghatározásához több nukleotid kombinációja szükséges. Ha egy aminosavat két nukleotid kódol, akkor $4 \times 4 = 16$ féle (azaz kevés), ha három, akkor $4 \times 4 \times 4 = 64$ féle (több, mint elég) aminosavat képes kódolni.

Kísérletes igazolás: A kód három betűs (triplet) voltát kísérletesen Watson **Crick** és Seymour **Benzer** igazolta 1961-ben klasszikus genetikai eszközökkel az *E. coli* T4 fágjának rII lókusza segítségével (a részletekre itt nem térünk ki).

- **A kód nem átfedő**

Elvi megfontolás: Ha a kód átfedő lenne, akkor egy nukleotid változás egynél több (kettő vagy három) aminosavat érintene.

Kísérletes igazolás: A vizsgálatok egyértelműen azt mutatták, hogy egy nukleotid csere csak egyetlen aminosav cseréjét eredményezi. Tehát a kód nem átfedő.

A kódszótárt *in vitro* fehérjeszintetizáló rendszer segítségével fejtették meg. Templátként szintetikus RNS-eket használtak. Elsőként monoton polimerekkel sikerült megállapítani, hogy a poliU fenilalanin, a poliC prolin, a poliA lizin, a poliG pedig glicin beépüléséhez vezet. Két nukleotidot tartalmazó polimerekkel (például AGAGAGAGAGA) további kodonok váltak ismertté. Végül szintetikus RNS-tripletekkel sikerült az összes kód megfejtése, teljessé vált a **kódszótár** (7.19. ábra).

		Második pozíció				
		U	C	A	G	
Első pozíció	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met/start	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

7.19. ábra: A kódszótár

A genetikai kódrendszer további sajátosságai:

- A kódolás **redundáns**, egy aminosavat több kodon is meghatározhat. Vannak azonban aminosavak, melyekhez csak egy kodon rendelhető. A kód kialakulására vonatkozóan egyelőre nincs minden szempontból kielégítő tudományos magyarázat.
- START és STOP kodonok:
Három kodon nem határoz meg aminosavat (nincs vele komplementer antikodonnal rendelkező tRNS), ezek a STOP kodonok. A STOP kodon a transzláció terminációját okozza (lásd később). A STOP kodonok külön nevet is kaptak: UAG – amber (borostyánkő) kodon, UAA – ochre (okker) kodon, UGA – opal (opál) kodon.
A transzláció kezdőhelyét jelző START kodon leggyakrabban az AUG (vannak kivételek, főleg prokariótákban). Ennek megfelelően az első beépülésre kerülő (N-terminális végi első) aminosav minden peptidláncnál metionin. (Prokariótáknál formil-metionin – akkor is, ha más a START kodon –, mely utólagosan eltávolításra kerül.)
- A kód **univerzális**, élővilágszerte – kevés kivételtől eltekintve – ugyanaz.

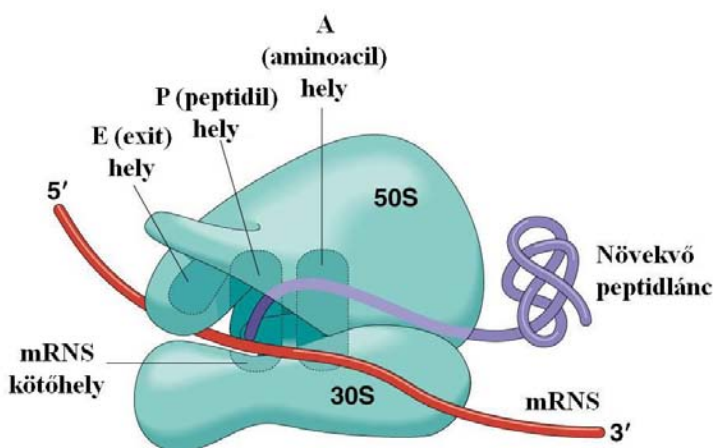
7.7. A genetikai információáramlás utolsó állomása: transzláció

A transzláció témakörével csak érintőlegesen foglalkozunk, mivel a genetikát hallgatók más tantárgyak keretein belül már részleteiben megismerkedtek a fehérjeszintézis mechanizmusával.

7.7.1. rRNS-ek és tRNS-ek a transzlációban

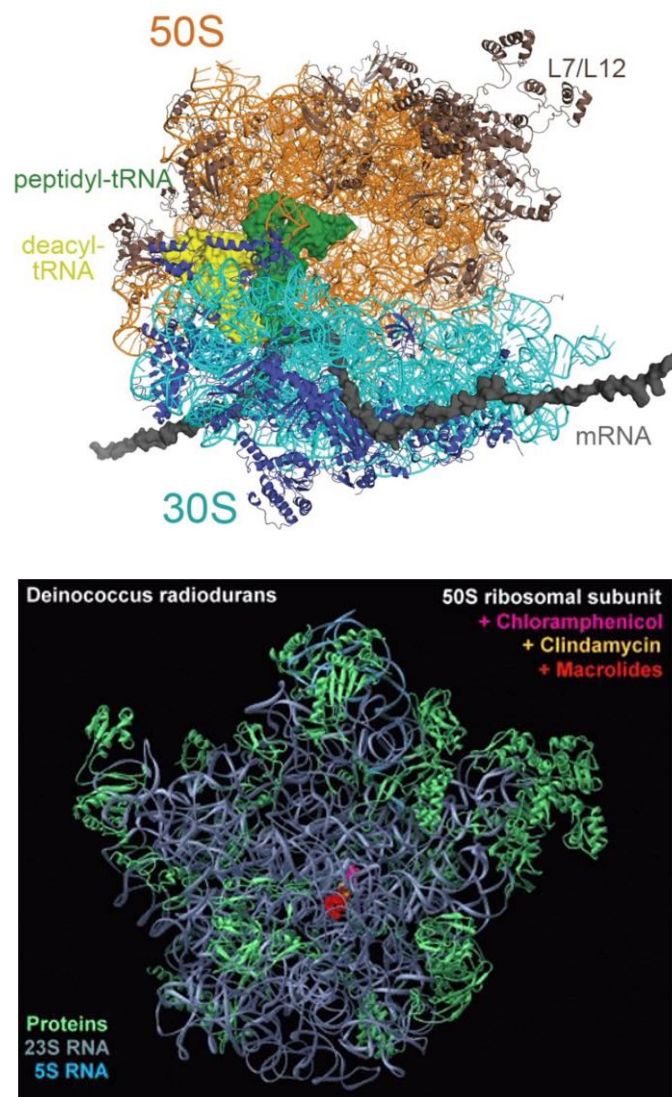
A fehérjék szintézisében két – együttesen a sejtek teljes RNS-tartalmának 80–95%-át kitevő – funkcionális RNS-csoport, a tRNS-ek és az rRNS-ek vesznek részt. Úgy becsülik, hogy e két RNS-féleség egy aktív eukarióta sejtben a teljes nukleáris transzkripció több mint felét lefedi. Abundanciájuk ezen kívül nagy stabilitásukból is ered.

A rRNS-ek a riboszómák alkotóelemei. A riboszómák felépítése pro- és eukarióta sejtekben hasonló, azzal a különbséggel, hogy az eukarióták riboszómái nagyobb méretűek. A prokarióta riboszóma tömegének 2/3-a RNS, 1/3-a fehérje. Egy nagy (50S) és egy kis (30S) alegységből épül fel (7.20. ábra). Háromféle rRNS (23S és 5S a nagy alegységben, 16S a kis alegységben) és mintegy ötvenféle fehérje alkotja. Az eukarióta riboszóma nagy alegysége 60S, a kis alegység 40S üledékesi állandójú. Négyféle rRNS-ből (28S, 5,8S és 5S a nagy alegységben, valamint 18S a kis alegységben) és több mint 80 fehérjéből áll. A mRNS-t tartalmazó riboszómán három tRNS-kötőhely található: a „töltött” tRNS (A – acilált vagy aminoacil), a peptid-tRNS (P – peptid vagy peptidil) és a deacilált „üres” tRNS (E – exit) helye (7.20. ábra). A riboszóma 5' → 3' irányban halad az mRNS mentén.



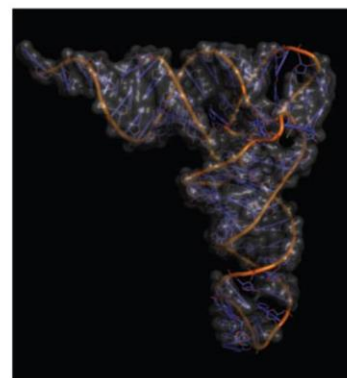
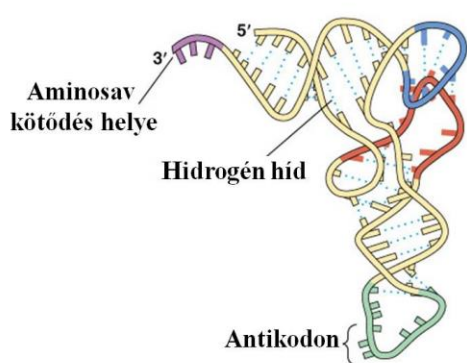
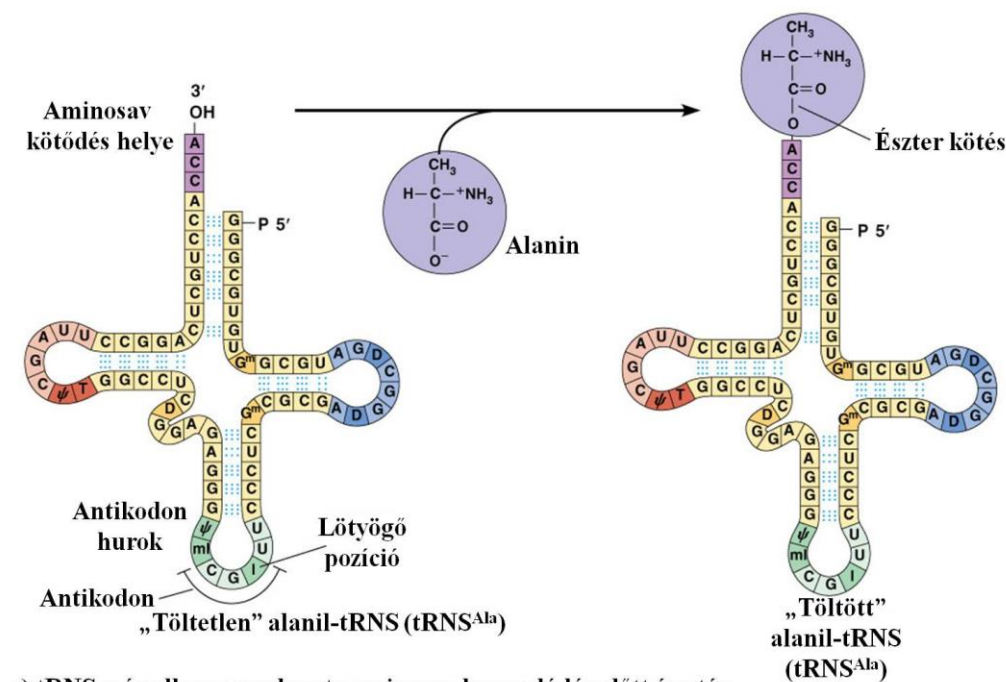
7.20. ábra: Prokarióta riboszóma sematikus ábrázolása a kötött mRNS-sel és a növekvő peptidlánccal

A riboszómák szerkezetéről egyre finomabb képünk van (7.21. ábra). Az első nagyfelbontású modelleket 2000–2001-ben publikálták. A riboszómák szerkezetének és működésének felderítéséért ítéltek oda a kémiai Nobel-díjat 2009-ben Ada E. **Yonath**, Thomas A. **Steitz** és Venkatraman **Ramakrishnan** kutatóknak. A részletes szerkezeti modellek nagyban hozzájárulnak a racionális, szerkezet alapú antibiotikum-tervezéshez (a ma forgalomban lévő antibiotikumok körülbelül felének targetje a bakteriális riboszóma).



7.21. ábra: Prokarióta riboszóma nagyfelbontású szerkezeti modellje (fent). Antibiotikumok, melyek a peptidlánc kivezető csatornánál blokkolnak (lent).

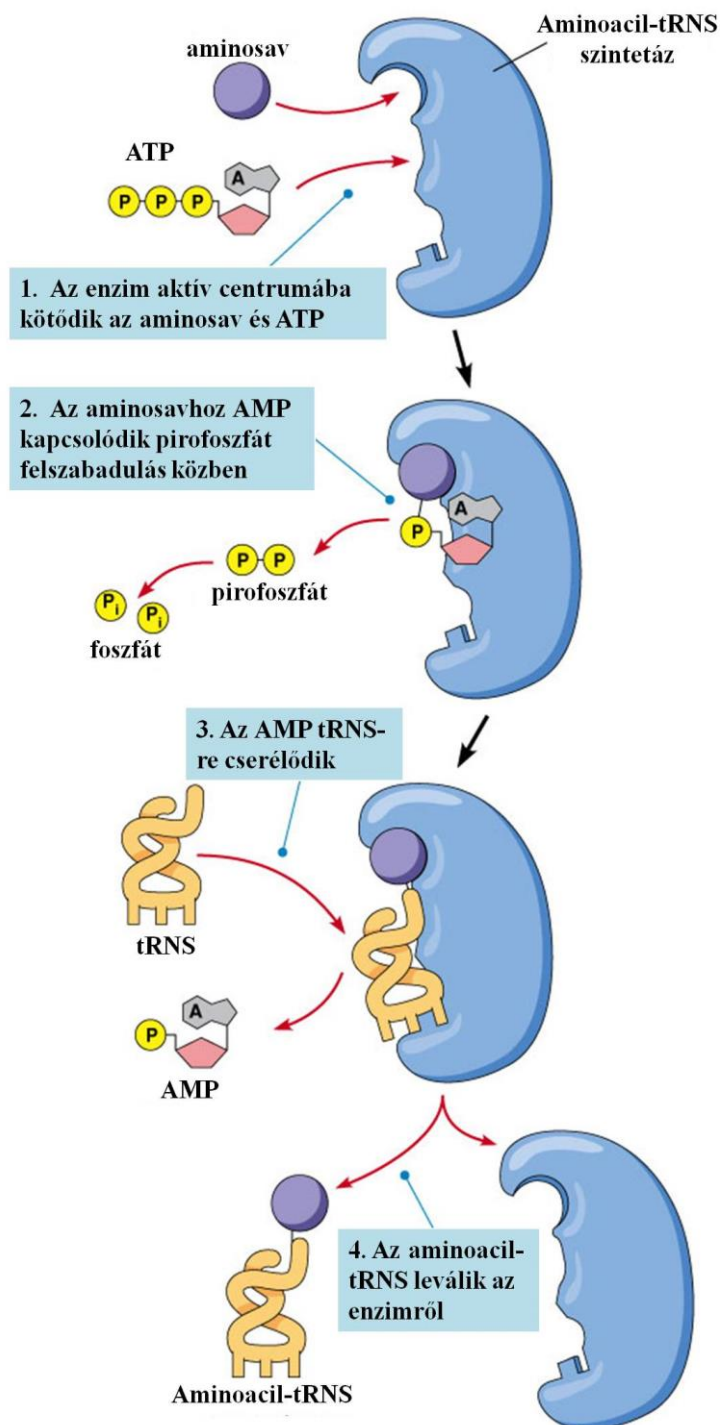
A tRNS-ek töltik be az adapter (feldolgozó) szerepet a transzláció során. Az mRNS kodonja összekapcsolódik a tRNS antikodonjával báziskomplementaritás alapján. A tRNS-ek a kódnak megfelelő aminosavakat szállítják a riboszómákhoz, így „értelmezik” az mRNS-ekben lévő kódokat. A tRNS-ek 74–95 nukleotid hosszú, jellegzetes lóhere alakú szerkezetet felvevő RNS-ek (7.22. ábra). Sejtenként 30–50 különböző tRNS található. Az antikodon hurok sorrendje szabja meg a tRNS kapcsolódását az mRNS-el.



b) tRNS harmadlagos szerkezete

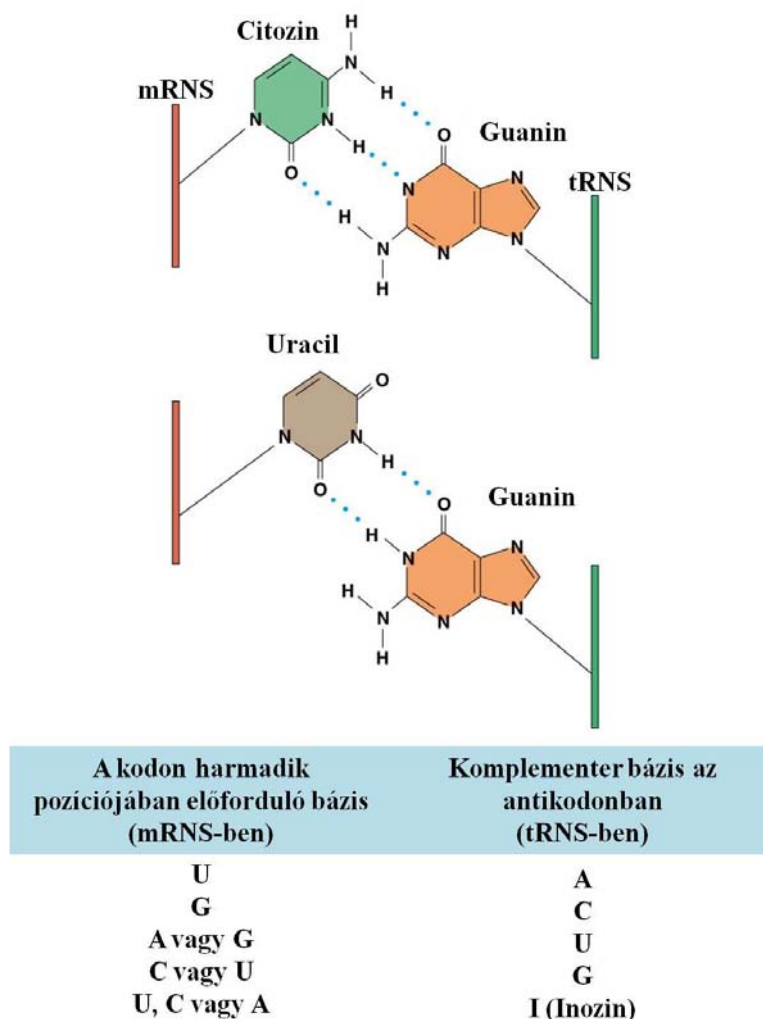
7.22. ábra: tRNS másodlagos és harmadlagos szerkezete

Az aminosav a tRNS 3' CCA sorrendjéhez kapcsolódik kovalensen **aminoacil-tRNS szintetáz** enzimek által. Ezek az enzimek specifikus kötőhelyet tartalmaznak az adott aminosav és a meghatározott antikodonnal rendelkező tRNS számára (7.23. ábra).



7.23. ábra: Aminoacil-tRNS szintézise

A kodon–antikodon párosodás nem csak Watson–Crick párosodással valósulhat meg. A kodon harmadik pozíciójában G-U párosodás is előfordulhat, amit **lőtyögésnek (wobble)** nevezünk (7.24. ábra). A tRNS antikodon részén inozin is előfordulhat, mely U, C és A bázisokkal is képes párosodni. Ha egy aminosavat több kodon is meghatároz, akkor ezek a kodonok gyakran a harmadik pozícióban lévő bázisban különböznek. A lőtyögés lehetővé teszi, hogy ugyanaz a tRNS több kodont is felismerhessen. Ezért nincs szükség minden (64 mínusz a 3 STOP kodon) kodonhoz külön tRNS-re.



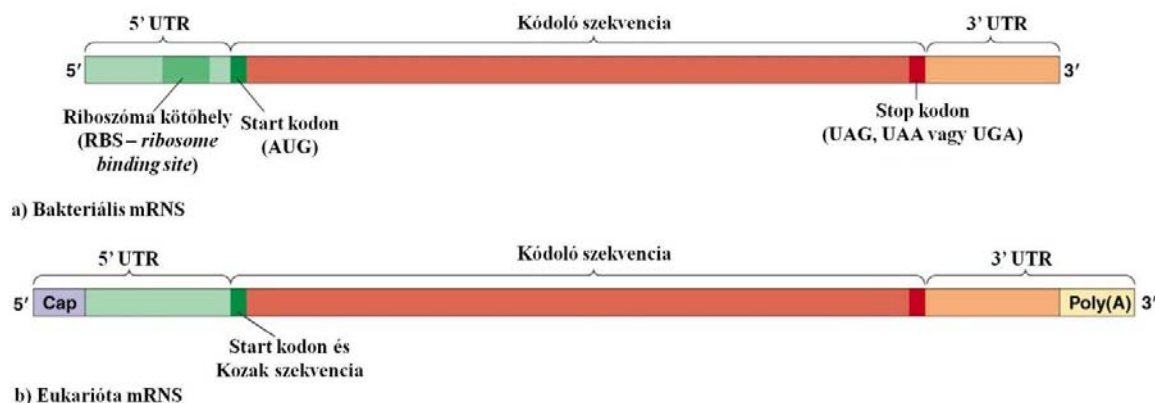
7.24. ábra: A kodon–antikodon kapcsolódásban „lötyögés” is előfordul

7.7.2. mRNS-ek a transzlációban

Az mRNS-ek szolgáltatják a génekből származó, a fehérjék aminosavsorrendjére vonatkozó kódsort. Egy sejt mRNS-ei méretüket tekintve igen heterogének, és a sejt összes RNS-ének csak néhány százalékát teszik ki. Gélelektroforézis során az mRNS-ek ezért halvány „maszatként” (smear) látszanak az abundáns rRNS-ek erős sávjaihoz képest.

A ténylegesen aminosavsorrenddé fordítódó szakasz a START kodon és a STOP kodon közötti rész (7.25. ábra). Mind a pro-, mind az eukarióta mRNS-ek rendelkeznek **5'UTR** és **3'UTR** (untranslated, nem transzlálódó) régiókkal. Ezek, ahogy a nevük is jelzi, nem kerülnek transzlációra. Az 5' UTR fontos szerepet tölt be a riboszóma mRNS-hez kötődésében. Prokariótáknál a riboszómakötőhely (**RBS, ribosome binding site**, vagy más néven **Shine–Dalgarno-szekvencia**) a START kodontól körülbelül 10 nukleotiddal 5' irányban elhelyezkedő 6–8 nukleotid hosszúságú GA-gazdag konszenzus szekvencia. Ide kötődik a riboszóma 30S kis alegysége a 16S rRNS 3' végével, komplementer bázispárosodással. Ezáltal az AUG START kodon a riboszóma P-helyére kerül. Prokariótáknál gyakori az ún. **policisztronos mRNS**, amely egymás után több polipeptidlánc kódoló szekvenciáját tartalmazza (lásd 9.4. operonok). Ebben az esetben minden egyes kódoló szakasz START kodonnal kezdődik és STOP kodonnal végződik, és minden START kodont megelőz egy riboszómakötő hely. Eukarióta mRNS-eknél

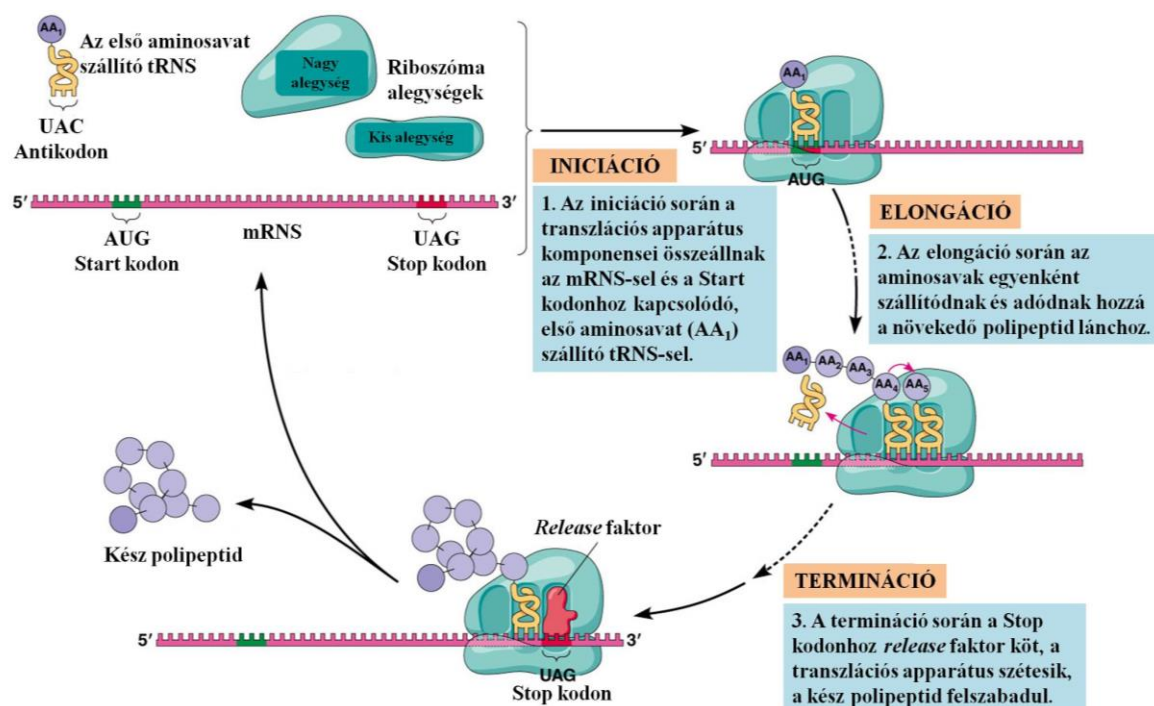
a transzláció kezdőpontját a START kodont is magába foglaló és az azt körülvevő konszenzus szekvencia (az ún. **Kozak-szekvencia**: ACCAUGG, az aláhúzott rész a START kodon) alapján ismeri fel a riboszóma. A transzláció iniciációjához, a riboszóma kötődéshez az eukarióta mRNS-ek 5' végi cap része és 3' végi poliA farka is szükséges.



7.25. ábra: Prokarióta (monocisztronos) és érett eukarióta mRNS-ek szerkezete

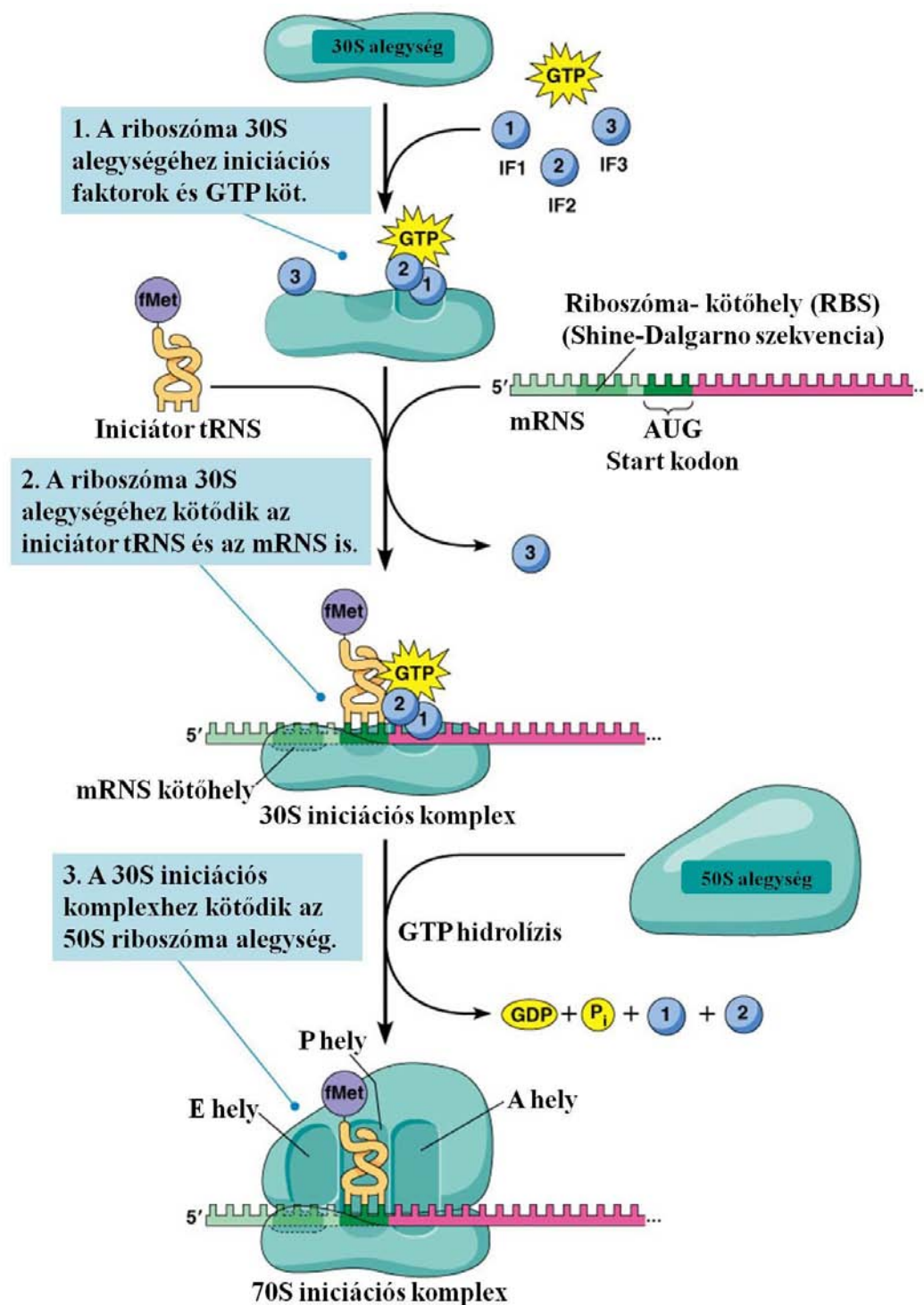
7.7.3. A transzláció mechanizmusa

A transzláció pro- és eukariótákban igen hasonlóan zajlik (7.26. ábra).

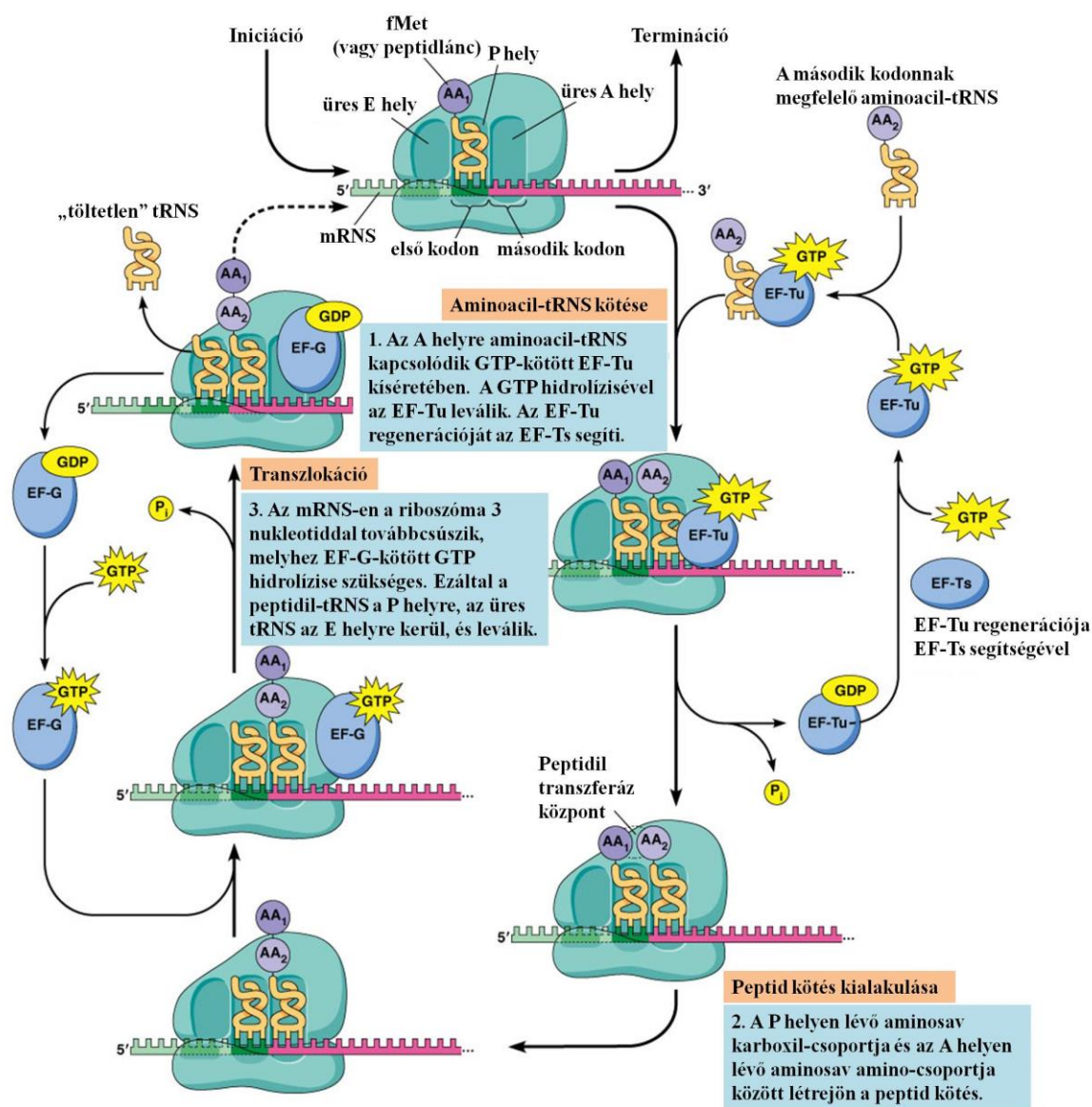


7.26. ábra: A transzláció lépéseinek áttekintése

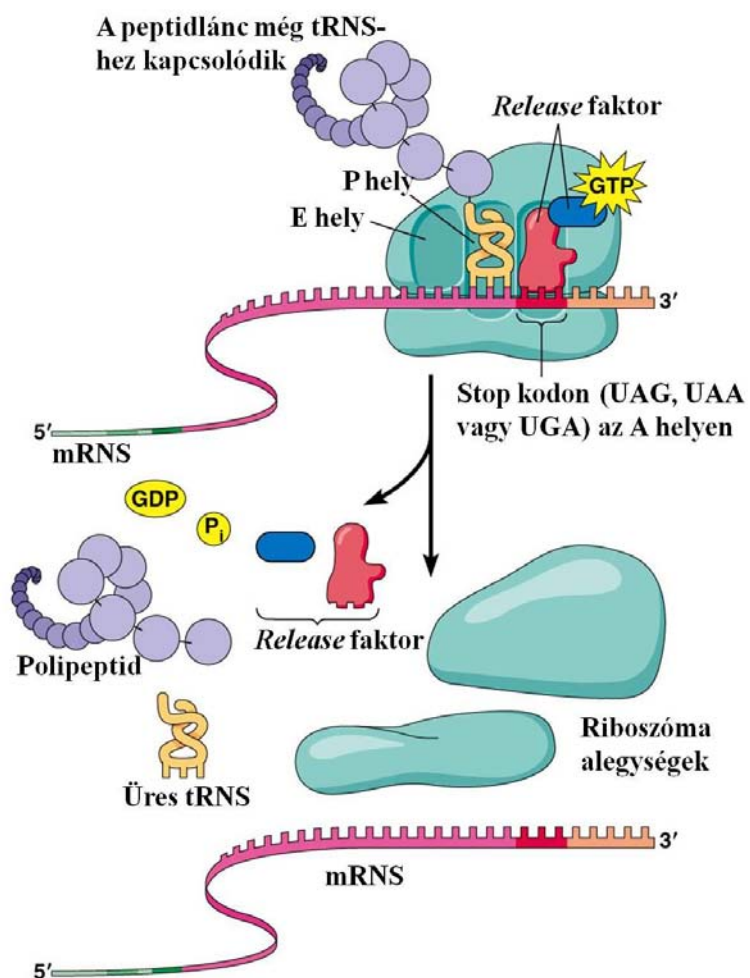
A transzlációban segítő fehérjék is részt vesznek: az iniciációhoz **iniciációs faktorkok (IF)**, az elongációhoz **elongációs faktorok (EF)**, a terminációhoz pedig **release faktorok (RF)** szükségesek (7.27, 7.28 és 7.29. ábra). A peptidkötés a 23S rRNS katalízise által jön létre.



7.27. ábra: Transzláció iniciáció (prokarióta)



7.28. ábra: Transzláció elongáció



7.29. ábra: Transzláció termináció

8. Mutációk

A genetikai változatosságot alapvetően két mechanizmus biztosítja: a mutációk képződése és a rekombináció. Mutációk szolgáltatják a nyersanyagot az evolúcióhoz. A rekombináció hatása magasabb szintű, lehetővé teszi, hogy a különböző gének alléljai új kombinációkban jelenjenek meg (lásd A homológ rekombináció mechanizmusa című 4.3. fejezetben). A mutációk, illetve az azokat hordozó mutáns sejtek vagy egyedek a genetikai analízis nyersanyagai: a genetikai boncolás mutánsok gyűjtésével vagy előállításával kezdődik. Ebben a fejezetben a mutációk típusaival, keletkezésével foglalkozunk.

A mutációk öröklődő változások. (Az öröklődést itt tágabb értelemben, a változás sejtről-sejtre történő átadásaként értelmezzük.) A változások a vad típushoz képest jelentenek változást. A vad típus olyan genetikai tulajdonságot takar, melyet közmegjegyzéssel alaptípusnak tekintünk. Egy gén vad típusú változatának vagy a természetben előforduló leggyakoribb allélt, vagy a laboratóriumban tenyésztett törzs allélját tekintjük. A mutáns kifejezést különböző szinteken használhatjuk: mutáns allél, mutáns fehérje, mutáns sejt, mutáns egyed. A mutációk létrejöhetnek spontán módon vagy kémiai (mutagén anyagok), illetve fizikai (sugárzás) hatások következtében.

8.1. A mutációk csoportosítása

A mutációkat különféle szempontok szerint csoportosíthatjuk: az érintett régió nagysága, a változás iránya, szövettípus, fenotípus és a génműködés megváltozása szerint.

8.1.1. Pont- és kromoszóma-mutációk

A mutáció által érintett régió nagysága szerint két mutációformát különböztünk meg:

- **Pontmutációknak** nevezzük azokat a mutációkat, amelyeket nem lehet kimutatni hagyományos citogenetikai eszközökkel. Ezek általában egy gént érintenek (ez esetben a **génmutáció** kifejezés is használatos).
- A **kromoszóma-mutációk** több gént, akár teljes kromoszómákat érintenek. Legtöbbször a kromoszómák szintjén kimutathatók.

8.1.2. Forward és reverz mutációk

A változás iránya szerint a mutáció kétféle lehet:

- **Előremutató (forward)** mutáció, ekkor az eredetitől (vad típustól) eltérő változat keletkezik.
- **Visszamutató (reverse vagy back)** mutáció, ez az eredeti (vad) genotípus vagy fenotípus visszaállását eredményezi. A visszaállítás többféle módon történhet:
 - pontos reverzióval, amikor az eredeti nukleotidsorrend helyreáll,
 - egyenértékű reverzióval, amikor az új nukleotid az eredetitől különbözik, de hatására az eredeti funkció helyreáll,

- génen belüli szupresszor mutációval, amikor ugyanabban a génben egy második mutáció kompenzálja az első mutáció hatását,
- génen kívüli szupresszor mutációval, amikor egy másik génben megjelenő új mutáció kompenzálja az első mutáció hatását.

8.1.3. Szomatikus és csíravonal mutációk

Szövetes szerveződésű élőlényekben a mutáció által érintett szövettípus szerint **szomatikus** mutációkat és csíravonal mutációkat különítünk el.

A **szomatikus** mutációk a testi sejtekben keletkező mutációk. A mutáns sejt osztódásával a mutáció az utódsejteknek is átadódik, mutáns szektort (sejtcsoportot) képezve az egyedben. Ezt mozaikosságnak is nevezik, mert az egyed eltérő genotípusú sejtcsoportokat tartalmaz. Ha a szomatikus mutáció az egyedfejlődés korai szakaszában keletkezik egy sejtben, akkor a mutáns szektor mérete nagyobb lesz, mert sok osztódással a mutáns sejtből nagy sejtpopuláció képződik. Az egyedfejlődés során később bekövetkező szomatikus mutáció kevesebb utódsejtbe adódik át, így a mutáns szektor mérete kisebb lesz. A szektorok száma megegyezik a mutáció kialakulásának esetszámával. Egy látványos példát mutat be erre a 8.1. ábra. A Golden retriever és a Labrador retriever kutyafajták között ritkán előfordulnak sárga-fekete mozaikos egyedek.



8.1. ábra: Sárga-fekete mozaikos Labrador retriever (lent) és szülei (fent)

A 8.1. ábrán látható foltos egyed fekete és sárga szülők keresztezéséből származik, testvérei vagy tiszta feketék, vagy tiszta sárgák. A sárga labradorokra jellemző *ee* allélpár *B*- genotípus mellett gátolja a fekete pigment termelődését. Genetikai jelölésekkel:

<i>Ee</i> (<i>BB</i>)	×	<i>ee</i> (<i>BB</i>)
fekete szülő		sárga szülő

utódok:

<i>Ee</i> (<i>BB</i>) feketék
<i>ee</i> (<i>BB</i>) sárgák

A foltos különc örökölt genotípusa ee (BB), a fekete szektorok szomatikus mutáció miatt ($e \rightarrow E$, ez back mutáció) alakultak ki a testen. A csíravonalat nem érinti mutáció, az ivarsejtek genotípusa e (B), ezért a foltos egyed az utódaira csak e allélt örökít át.

A természetben megfigyelhető változatosságot a **csíravonal** mutációk hozzák létre. A növények csírasejtjei az egyedfejlődés végén szomatikus sejtekből jönnek létre, ilyenformán a növények szomatikus mutációi ivaros szaporodás során átöröklődhetnek (a vegetatív szaporítással pedig egyébként is). Az állatok csíravonala korán elkülönül a szomatikus sejtektől az egyedfejlődés során. A csírasejtekben keletkező mutáció abban az esetben adódhat át a következő nemzedéknek, ha a mutáns csírasejt részt vesz a megtermékenyítésben.

8.1.4. A mutációk fenotípus szerinti csoportosítása

A mutáció által érintett fenotípus szerint a mutációk többfélék lehetnek:

- **Morfológiai (alaktani)** mutációk
Ide sorolunk minden olyan mutációt, amely az egyed morfológiáját (kinézetét) befolyásolja. A tananyag példáiban a leggyakrabban ilyen mutációtípusokkal találkozunk.
- **Letális (halálos)** mutációk
A letális allélokkal A mendeli genetika kiterjesztése című fejezetben már foglalkoztunk. Diploid élőlényekben ezek a mutációk a leggyakrabban homozigóta formában vezetnek letalitáshoz.
- **Anyagcsere**-mutációk
A mikrobák anyagcsere-mutációt hordozó törzseit auxotrófoknak nevezzük. Az auxotróf mutánsok laboratóriumi körülmények között táptalaj-kiegészítést igényelnek szaporodásukhoz. A prototrófok ásványi sókat és energia forrást tartalmazó minimál táptalajon nőnek. Az ember veleszületett anyagcsere rendellenességei is (például fenilketonúria, galaktozémia) anyagcserét érintő mutációk következményei.
- **Viselkedési** mutációk
Az állatok (és az ember) viselkedése jelentős részben genetikailag meghatározott, ezért azt mutációk megváltoztathatják. A muslica udvarlási viselkedése például megváltozhat akár a szárnyizmokat, akár azok beidegzését, akár az idegközpont szerkezetét befolyásoló mutációkkal.
- **Kondicionális (feltételes)** mutációk
A kondicionális mutáció csak bizonyos környezeti feltételek, **restriktív**, azaz korlátozó körülmények között eredményez mutáns fenotípust. Más, **permisszív**, megengedő körülmények között vad fenotípus jön létre. A kutatók leggyakrabban a tenyésztési hőmérsékletet használják mint restriktív, illetve permisszív körülményt, ilyenkor a mutánsokat hőérzékenyeknek nevezzük. A hőérzékeny mutánsok esetén az egyedfejlődés különböző szakaszaiban változtatva a hőmérsékletet meghatározható az „érzékeny” életszakasz. Az érzékeny szakasz azt jelzi, hogy az érintett gén működésére mikor van szükség.

8.1.5. Funkcióvesztéses és funkciónyeréses mutációk

A génműködés megváltozása szerint a mutációk lehetnek:

- **Funkcióvesztéses mutációk (loss of function, LoF)**

A DNS véletlenszerű változásának leggyakoribb következménye a génműködés sérülése. Ekkor a kódolt fehérje eredeti működése gátlódik vagy elvész. Ezek a funkcióvesztéses, vagy loss of function (LoF) mutációk. Amennyiben a génműködés teljesen kiesik, „nulla allél” jön létre. Ha a vad típusú funkcióból valamennyi megmarad, azt homozigóta formában leaky (magyarul sántának nevezett) fenotípus jelezheti. A funkcióvesztéses mutációk általában recesszívek. A gén egyetlen sértetlen példánya ugyanis legtöbbször a vad fenotípus kialakításához elegendő terméket termel. Azon ritka esetekben, amikor egyetlen ép génpéldány nem elegendő a vad fenotípus kialakításához, a funkcióvesztéses allél domináns fenotípust okoz (**haplo-elégtelenség**, haplo insufficiency). Léteznek ún. **domináns negatív mutációk** is. Ezek olyan funkcióvesztéses mutációk, amelyeknél a vad alléllal szemben mutatott dominancia oka az, hogy a funkcióvesztett géntermék gátolja az ép géntermék működését.

- **Funkciónyeréses mutációk (gain of function, GoF)**

A mutáció a sejtben megváltozott működésű génterméket is eredményezhet. Megemelkedhet például a fehérje eredeti aktivitása, vagy teljesen új reakciókban is részt vehet. A megváltozott működés a heterozigótákban is megjelenik, és általában domináns fenotípust okoz.

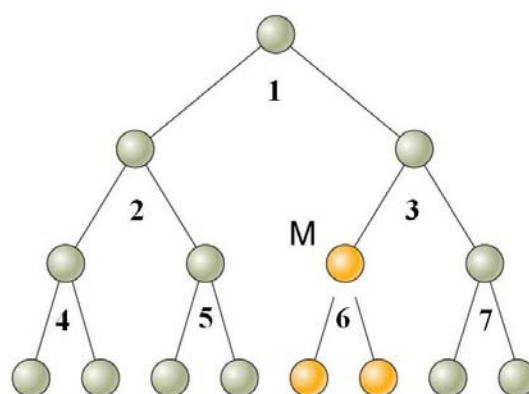
8.2. A mutációk kialakulása

A mutációk kialakulhatnak spontán módon vagy valamilyen környezeti hatás következtében. A **spontán** mutációk a sejtek természetes környezetében következnek be, míg az **indukált** mutációk kialakulásához valamilyen mutagén ágens szükséges, amely megnöveli a mutációk kialakulásának gyakoriságát.

8.2.1. Mutációs ráta és mutációs gyakoriság

Mutációs rátán az időegység alatt bekövetkező mutációk számát értjük. Biológiai időegységként általában egy élőlény generációs idejét használjuk, vagy sejtosztódásokra normalizáljuk az újonnan létrejött mutációk számát. A 8.2. ábra példáján a mutációs ráta 1/7 (egy mutáció keletkezett hét sejtosztódás alatt).

A **mutációs gyakoriság** az az arány, amivel egy bizonyos mutáció a sejtek vagy egyedek egy vizsgált populációjában előfordul. A 8.2. ábra példáján a mutációs gyakoriság az utolsó sejtgenerációban $2/8 = 0,25$.



8.2. ábra: Mutációs ráta ($1/7$) és mutációs gyakoriság ($1/4$) szemléltetése

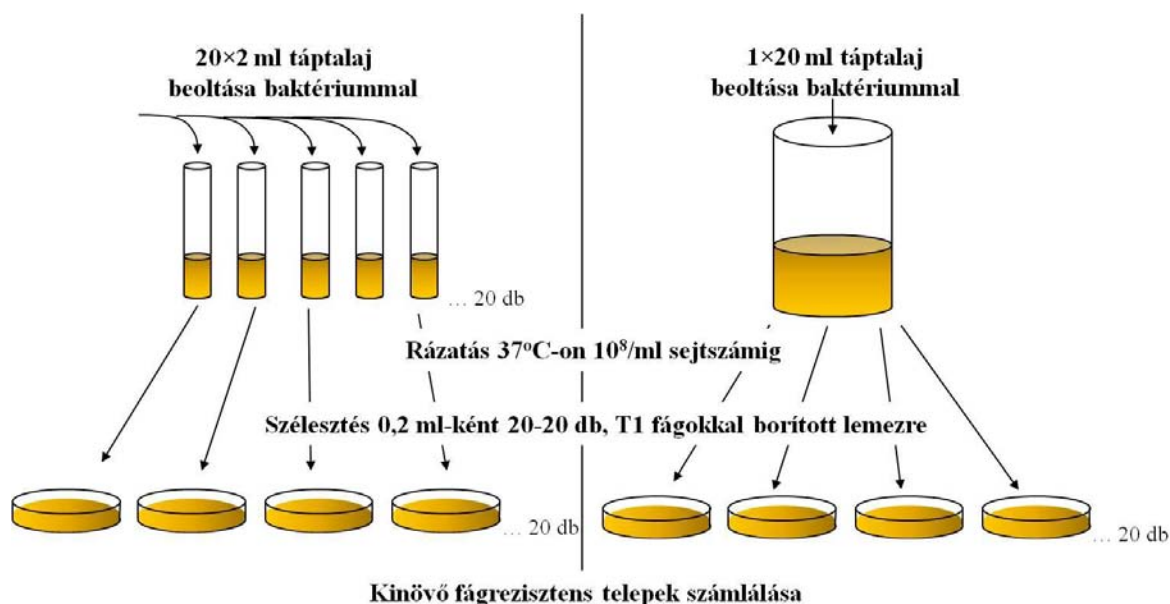
A nagyobb mutációs ráta nagyobb mutációs gyakoriságot eredményez.

A genom egyes régióinak „mutációs hajlama” nem egyforma. A spontán mutációs ráta ezért lókuszonként eltérő lehet, 10^{-5} – 10^{-10} nagyságrendben mozoghat.

8.2.2. A Luria–Delbrück-féle fluktuációs teszt

A mutációk kialakulásának mikéntje számos kutatót foglalkoztatott. Az alapvető kérdés az volt, hogy a mutációk spontán, véletlenszerűen keletkeznek-e, és a természetes populációkban kis gyakorisággal ugyan, de jelen vannak, vagy külső hatás befolyásolja a kialakulásukat. A kérdés megválaszolásához nagymértékben hozzájárult Salvador **Luria** és Max **Delbrück** 1943-as kísérlete.

Ha egy *E. coli* baktérium populációt T1 bakteriofágokkal fertőzünk meg, akkor a fágok a baktériumok többségét elpusztítják. Néhány baktérium azonban ellenáll a fágfertőzésnek, és túléli, tehát szaporodik, agar lemezen telepet képez. A fágrezisztencia sejtről sejtre átörököződik, tehát ez genetikai változás, azaz mutáció következménye. Luria és Delbrück azt a kérdést tette fel, hogy ezek a **fágrezisztens mutáns** baktériumok a fágfertőzést követően, annak hatására alakulnak-e ki, vagy a mutáns baktériumok még a fágfertőzés előtt kialakultak és jelen voltak a populációban, de csak a fágfertőzéses szelekció hatására váltak láthatóvá. E kérdés eldöntéséhez tervezték meg a fluktuációs tesztet. 20 baktériumtenyészetet képeztek kevés sejtből kiindulva: 10^8 sejt/ml sűrűségű baktérium tenyészeteket növesztettek fel. Emellett készítették egy 10^8 sejt/ml sűrűségű nagyobb kulturát is. A 20 egymástól függetlenül növesztett kultúrát és a nagy kultúrából származó mintát fágok jelenlétében agar lemezekre szélesztették, és megvizsgálták a rezisztens telepek számát az egyes lemezeken (8.3. ábra).



8.3. ábra: A fluktuációs teszt kivitelezése

Azt találták, hogy a független kultúrákban a rezisztens telepek (azaz baktériumsejtek, hiszen egy telep egy baktériumsejt klónja) száma lemezről lemezre nagy variációt mutat (0–107 telep/lemez), vagyis fluktuál (8.1. táblázat). Ugyanakkor az együtt növesztett baktérium kultúrából származó 20 mintában az ellenálló telepek száma kevésbé fluktuált (11–32 telep/lemez), és minden egyes lemezen találtak telepeket (8.1. táblázat).

8.1. táblázat: A fluktuációs teszt eredménye

Egyedi kultúrák				Nagy kultúra			
lemezek sorszáma és fágrezisztens telepek száma				lemezek sorszáma és fágrezisztens telepek száma			
1.	0	11.	0	1.	24	11.	16
2.	3	12.	0	2.	17	12.	23
3.	0	13.	1	3.	11	13.	26
4.	107	14.	0	4.	28	14.	18
5.	12	15.	0	5.	13	15.	22
6.	0	16.	64	6.	32	16.	15
7.	0	17.	0	7.	19	17.	17
8.	5	18.	35	8.	18	18.	16
9.	0	19.	0	9.	26	19.	25
10.	6	20.	0	10.	12	20.	14

A kísérlet eredménye alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a fágrezisztens mutációk létrejöttét nem a fágok jelenléte indukálta, hanem a baktérium tenyészetekben a növesztés folyamán véletlenszerűen keletkeztek. Ha ugyanis a rezisztenciát a fágok váltják ki, akkor minden baktérium csekély, de azonos valószínűséggel rezisztenssé válhat a fág hatására, és a rezisztens sejtek száma csakis a baktériumsejtek és a fágok számától függ. A kísérlet tanúsága szerint azonban azonos baktériumszám és fágszám mellett az egyes tenyészetekben eltérő számú rezisztens sejt keletkezett, vagyis a rezisztensek száma tenyészetenként változott, fluktuált.

A fluktuációt azzal magyarázták, hogy az egyes tenyészetekben a mutációk véletlenszerűen, nem egy időben keletkeznek. Azokban a tenyészetekben, ahol a mutációk korábban kialakulnak, több rezisztens sejt lesz a szélesztés időpontjában. Lesznek továbbá olyan populációk is, amelyekben a rezisztenciáért felelős génmutáció nem alakult ki a szélesztés időpontjáig (8.4. ábra).

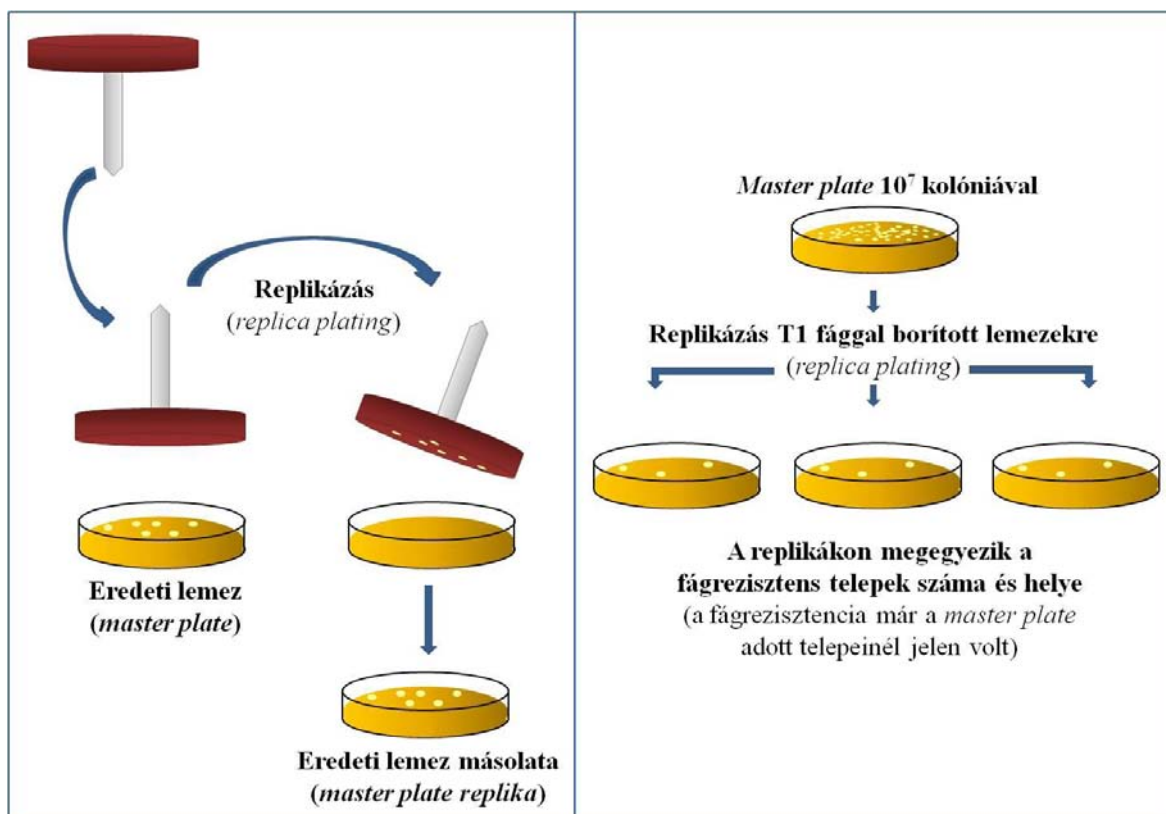
Luria és Delbrück ezért a felfedezésért, valamint a bakteriofágok kutatásában elért további eredményeiért 1969-ben megkapta a Nobel-díjat.

Külön-külön szaporított kultúrák: jelentős fluktuáció			
0 00 0000 00000000 000000000000000000 0 mutáns/lemez	0 •0 ••00 ••••0000 ••••••••00000000 8 mutáns/lemez	0 00 0000 000•0000 000000••00000000 2 mutáns/lemez	0 00 0000 00000000 0000000000000000 0 mutáns/lemez
Egy kultúrából származó szélesztések: nincs fluktuáció			
0 00 0000 0••00000 000•0000000••000 3 mutáns/lemez	0 00 0000 0••00000 •000•0000•00000• 4 mutáns/lemez	0 00 0000 0••00000 000000••000••00000 4 mutáns/lemez	0 00 0000 0••00000 0•00••000000•00•0 5 mutáns/lemez

8.4. ábra: A fluktuációs teszt eredményének magyarázata

A fluktuációs teszt által sugallt megállapításokat 1952-ben Joshua **Lederberg** és felesége, Esther Miriam Zimmer **Lederberg** kísérlete is alátámasztotta. Az általuk kidolgozott replika módszer (8.5. ábra) segítségével a fágfertőzést megelőzően sikerült kimutatniuk a mutáns baktériumok jelenlétét a tenyészetben. Ha a lemezen lévő telepekhez steril bárszondát érintünk, akkor ahhoz minden egyes telepéből néhány sejt hozzátapad. Ha ezt a bárszondát egy másik lemezhez érintjük, akkor a leszakadó sejtek létrehozzák az eredeti lemez (master plate) telepmintázatát, replikáját. Lederbergék a fluktuációs tesztet úgy módosították, hogy a baktériumtenyészeteket először fágmentes táplemezre szélesztették, majd a kinőtt telepeket a replika módszerrel számos, faggal fertőzött lemezre vitték át. Ha a mutációk a fágokkal való kölcsönhatás miatt alakulnak ki, akkor a replika lemezeken bármely baktérium véletlenszerűen mutálódhat, és ez az egyes replika lemezek telepmintázatában is megnyilvánul. Ezzel szemben azt tapasztalták, hogy minden egyes replika lemezen ugyanolyan mintázatban és számban jelentek meg rezisztens baktérium telepek (8.5. ábra).

Joshua Lederberg a mikrobiális genetika területén végzett munkásságáért – Edward L. Tatum és George Beadle kutatókkal megosztva – orvosi Nobel díjat kapott 1958-ban.



8.5. ábra: Replikázással igazolható, hogy a fágrezisztenciát okozó mutáció spontán, a fággal való találkozás előtt létrejön a baktériumokban

8.2.3. Spontán mutációk

A spontán mutációk a sejtek természetes környezetében következnek be. Gyakran nem állapítható meg, hogy a mutációt belső vagy külső tényező hozta-e létre. Ilyenkor általában spontán mutációnak tekintjük a mutációt. A spontán mutációk képződésének oka lehet a tautomerizáció és a bázisok egyéb szerkezeti változásai, valamint replikációs szálcsúszás.

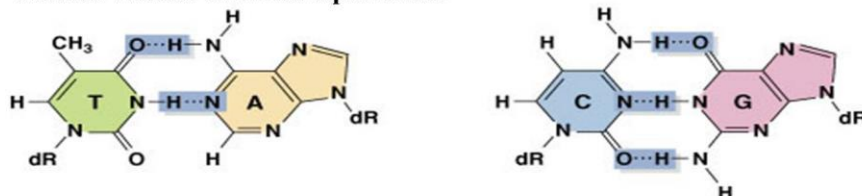
A **bázisok alternatív formái** (keto/enol, amino/imino tautomerek) megváltoztatják a bázisok párosodási sajátságait. A normál (Watson–Crick modell szerinti) bázispárosodásban a bázisok keto és amino formái vesznek részt (8.6. ábra). A tautomerek párosodásában pedig:

guanin enol forma	timinnel,
adenin imino forma	citozinnal,
citozin imino forma	adeninnel,
timin enol forma	guaninnal

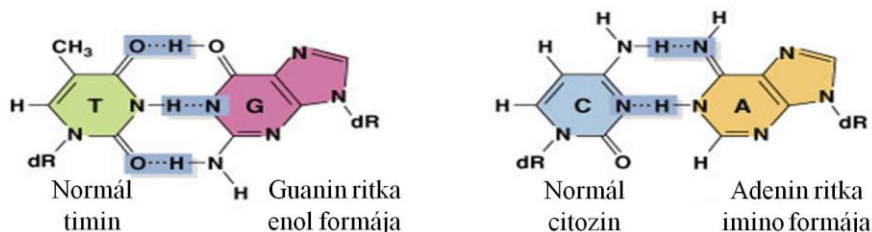
képez párt (8.6. ábra). A párosodási hiba a replikáció során jön létre az újonnan szintetizált szálban. Ha a hiba nem kerül kijavításra, akkor a következő replikáció során az inkorrekt módon beépült bázis szolgál alapul az egyik szál szintéziséhez, így a hiba állandósul:

például: eredeti bázispár G–C → G(enol)–T → egyik molekulában G–C, másikban A–T (a nyílak egy replikációs ciklust jelképeznek; az eredeti G–C pár a második replikációt követően A–T párra módosult).

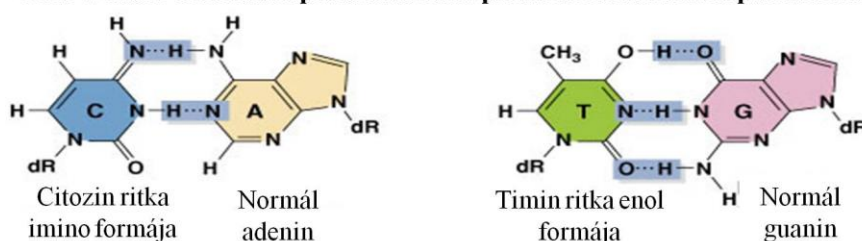
Normál Watson-Crick bázispárosodás



Nem Watson-Crick bázispárosodás normál pirimidinek és ritka purinformák között



Nem Watson-Crick bázispárosodás ritka pirimidinek és normál purinformák között

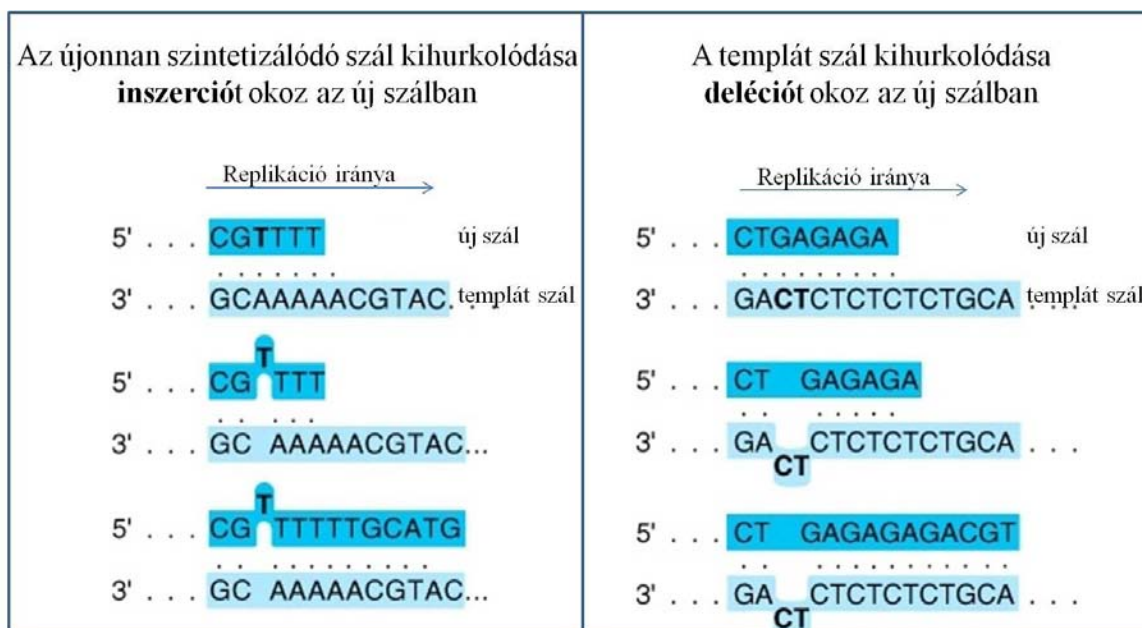


8.6. ábra: A bázisok normál és ritka tautomer formáinak párosodása

A DNS szerkezeti változásai szintén a bázisok párosodási tulajdonságait változtatják meg. **Deamináció**val a citozin uracillá alakul, s ez a replikációkor adeninnel párosodik, G-C → A-T tranzíciót okozva. Az uracil-DNS-glikoziláz repair enzim felismeri az uracilt és kivágja azt. (A bázismentes hely a fejezet későbbi részében leírt módon vezethet mutációhoz.) A metilált citozin (5-metilcitozin) a DNS-molekulában **mutációs forráspont**ként viselkedik (azaz gyakran vezet mutáció kialakulásához). Ennek oka, hogy az 5-metilcitozin deaminálása timint (5-metiluracilt) eredményez, melyet az uracil-DNS-glikoziláz nem ismer fel. Ez ${}^m\text{C-G} \rightarrow \text{T-A}$ tranzícióhoz vezet.

A **glikozidos kötés hasadása** bázismentes (apurin vagy apirimidin) hely kialakulásához vezet. A replikáció során a templáton lévő apurin illetve apirimidin helyen az új szálba random épül be egy bázis. Ez a véletlenszerű beépülés mutációt okozhat.

A replikáció során a **szálak elcsúszása** következtében kisméretű inszerciók és deléciók keletkezhetnek (8.7. ábra). A hiba kialakulásának esélye ismétlődő DNS-szekvenciáknál nagyobb. Az ismétlődéseket tartalmazó DNS-szakaszok ezért **mutációs forráspont**ként viselkednek, mert ezeken a részekén a mutáció képződés gyakorisága magas. A következő replikáció során az inszerció, illetve a deléció fixálódik.



8.7. ábra: Ismétlődéseket tartalmazó szekvenciák replikációjánál a szálak elcsúszása inszercióhoz vagy delécióhoz vezethet

Emberben több öröklődő betegség molekuláris hátterében **három nukleotid ismétlődés kiterjedése** áll. A különböző betegségekben az ismétlődés érinthet kódoló és nem kódoló szakaszokat egyaránt.

A törékeny (fragilis) X kromoszóma szindróma (a név abból ered, hogy *in vitro* citológiai képen az X kromoszóma az adott ponton gyakran törik) az egyik leggyakoribb öröklődő szellemi visszamaradottság (előfordulása férfiakban 1/1500, nőkben 1/2500). A betegség hátterében álló *FMR-1* (fragile X mental retardation 1) gén normálisan 60-nál kevesebb egymást követő CGG-ismétlődést tartalmaz az 5' UTR régióban. 50–200-szoros ismétlődés a legtöbbször nem okoz súlyos tüneteket (az esetek csak 20%-a súlyos), e feletti ismétlődésszámnál azonban kialakul a kórkép (súlyos esetekben az ismétlődések száma a betegben több ezer is lehet). Az *FMR-1* fehérje a szinaptikus plaszticitás kulcseleme, ezáltal elengedhetetlen a tanulás, memória folyamatokban. Az ismétlődések kiterjedésének mechanizmusa nem ismert. Valószínűsíthető, hogy 50 ismétlődés felett pontatlan az ember replikációs rendszere. Az ismétlődések génfunkcióra gyakorolt hatása sem ismert. Elképzelhető, hogy az ismétlődést tartalmazó szakaszon a kromatin magasabb metiláltsága transzkripciót gátló hatású, vagy a túl hosszú 5'UTR gátolja a transzlációt.

A Huntington-kórban számfeletti CAG ismétlődés jellemző a Huntingtin gén kódoló régiójában. Ez, a máig ismeretlen funkciójú Huntingtin fehérjében poliglutamin extra szakasz megjelenéséhez vezet.

8.2.4. Indukált mutációk

A spontán mutációs ráta mesterséges módon jelentősen megemelhető. Ez mutációt okozó vegyszerekkel (mutagén anyagokkal) vagy ionizáló sugárzással történhet. Az így keletkezett mutációkat nevezzük indukált mutációknak. A genetikai munkához szükséges nagyszámú mutáns vonal előállítása leggyakrabban indukált mutagenézissel, va-

lamilyen mutagén ágens alkalmazásával történik. Fontos hangsúlyozni, hogy a mutagén hatások a genom egészében növelik a mutációk képződésének gyakoriságát. A mutációképződés ez esetben is random, a mutagén ágens a folyamat irányára (mely génekben következzen be mutáció) nincs befolyással. A mutagenizált populációban a számunkra érdekes fenotípusú mutánsokat szűréssel (mutáns screen) kell kiválogatni.

Ionizáló sugárzás hatására a molekulák ionizált és gerjesztett állapotba kerülnek, és ilyen formában reagálhatnak a sejt komponenseivel, többek között a DNS-sel is. Az ionizáló sugárzás felbonthatja az N-glikozidos kötést, mely apurinált, illetve apirimidinált helyet eredményez, s kétszálú törések is létrejöhetnek. Mindkét jelenség mutációk kialakulását indukálja, az előbbi pontmutációkhoz, az utóbbi kromoszóma átrendeződésekhez vezethet.

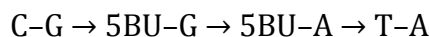
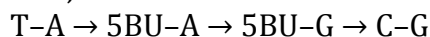
Vegyszerek számos módon okozhatnak mutációkat:

- a bázisanalógok a DNS-be beépülnek, de nem a megfelelő bázissal párosodnak,
- az alkiláló, deamináló szerek, oxidáló anyagok a DNS bázisainak szerkezetét és párosodási tulajdonságait változtatják meg,
- az interkaláló szerek a bázisok közé ékelődnek, és nukleotid inszerciót vagy deléciót okoznak.

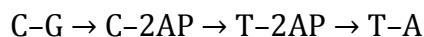
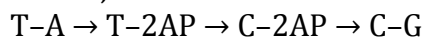
A **bázisanalógok** a természetes bázisokhoz hasonló szerkezetűek, a DNS-polimeráz a bázisanalógokat a kettős spirálba beépíti.

Például:

- Az 5-brómuracil (5BU) timin analóg, mely adeninnel és guaninnal is képes párosodni, s az alábbi utakon okozhat tranzíciót:



- A 2-aminopurin (2AP) adenin analóg, mely a timinen kívül citozinnal is képes párosodni, s az alábbi utakon okozhat tranzíciót:



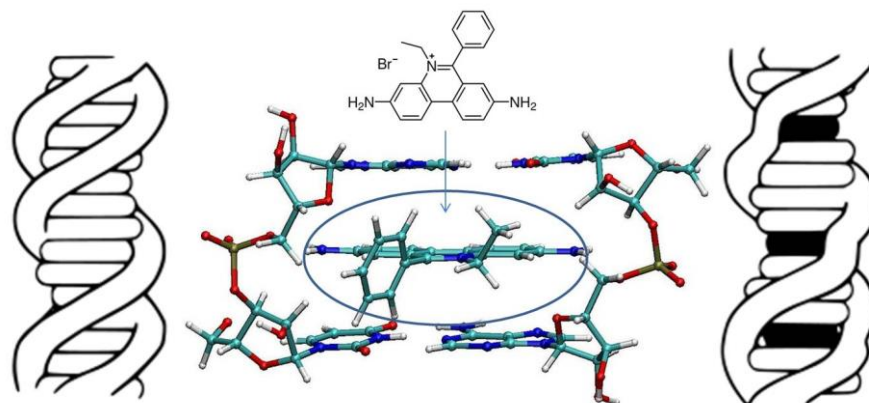
Az **alkilálószer**ek alkil ($-CH_3$, $-CH_2-CH_3$) csoportokat építenek a nukleinsavak bázisaira, így módosítják azok kémiai tulajdonságait.

Például az etil-metánszulfonát (EMS) főként a guanint, kisebb mértékben a timint módosítja. A 6-etilguanin (G^e) timinnel párosodik, ami $C-G^e \rightarrow T-A$ tranzíciót eredményez. A 4-etil-timin (T^e) guaninnal párosodik, melynek következményeként $T^e-A \rightarrow C-G$ tranzíció jön létre.

A **deamináló szerek** (például salétromossav) hatására a citozin uracillá, az adenin hipoxantinná (A^0) alakul. Az uracil (ha nem kerül kijavításra) a következő replikáció során adeninnel párosodik, majd az azt követő replikációban timin épül be az adeninnel szemben, ezáltal $C-G \rightarrow U-G \rightarrow T-A$ tranzícióhoz vezet. A hipoxantin nem timinnel (az adenin eredeti párja), hanem citozinnal párosodva $T-A \rightarrow C-A^0 \rightarrow C-G$ tranzíciót eredményez.

A **hidroxilálószer**ek (például hidroxilamin, NH_2OH) hidroxilálják a citozin C4 pozícióban levő amino-nitrogénjét, mely így adeninnel fog párosodni. Ezzel $C-G \rightarrow C^{NOH}-G \rightarrow T-A$ tranzíciót indukál.

Az **interkaláló szerek** olyan gyűrűs vegyületek, melyek térkitöltése a bázispárokhoz hasonlít. A DNS kettős spirálban egymás mellett lévő bázispár közé képesek beépülni (8.8. ábra). A beépülés a kettős spirál alakját torzítja, ami a replikáció során egy nukleotid kiesését vagy beépülését okozza. Az interkaláló vegyületek ezért **frameshift** mutációt (lásd később) okoznak. Előfordul, hogy keresztkötik a DNS két szálát, ezáltal megakadályozzák a replikációt. Interkaláló tulajdonságú molekulák például a proflavin, akridin sárga, etídiüm-bromid, aktinomicin-D, dioxin-származékok.



8.8. ábra: Két szomszédos bázispár közé ékelődő etídiüm-bromid torzítja a kettős spirál szerkezetét

8.3. Pontmutációk

8.3.1. A pontmutációk típusai

A pontmutációk mindössze egy vagy néhány nukleotidot érintenek. Pontmutációk három úton jöhetnek létre: szubsztitúció, inszerció vagy deléció révén.

Szubsztitúció esetén egy bázis egy másik bázisra cserélődik ki. A szubsztitúcióknak két altípusa van:

- **Tranzíció**ról beszélünk, ha egy bázis hozzá hasonló kémiai tulajdonságú bázisra cserélődik. Ez esetben egy purinvázis bázis purinvázis bázisra ($A \rightarrow G$ vagy $G \rightarrow A$), vagy egy pirimidin vázas bázis pirimidin vázas bázisra cserélődik ki ($T \rightarrow C$ vagy $C \rightarrow T$).
- **Transzverzió** esetén egy purin bázis változik pirimidinre ($A \rightarrow C$, $A \rightarrow T$, $G \rightarrow C$, $G \rightarrow T$), vagy egy pirimidin purinra ($C \rightarrow A$, $C \rightarrow G$, $T \rightarrow A$, $T \rightarrow G$).

Inszerció esetén egy vagy több bázis ékelődik be az eredeti DNS-szekvenciába.

A **deléció** egy vagy több bázis kiesését jelenti az eredeti DNS-szekvenciából.

8.3.2. A pontmutációk hatása a géntermékre

A kódoló régiót érintő pontmutációk

A mutációk érinthetik a DNS kódoló, illetve nem kódoló szakaszát. A kódoló szakaszban létrejött mutációk következménye általában könnyen megjósolható, legtöbbször az adott fehérje aminosavsorrendjének és térszerkezetének megváltozását eredményezi. Ezzel szemben a nem kódoló régiókban bekövetkező mutációk gyakran nem, vagy kevésbé előrelátható módon változtatják meg a génműködést. Befolyásolhatják a kódolt

fehérje aminosavszekvenciáját (lásd alább az mRNS érését befolyásoló mutációkat), hatással lehetnek a gén kifejeződésének helyére, illetve mértékére is.

- **Szinoním vagy csendes mutációk**

A kódoló szakaszt érintő pontmutációk legtöbbször a kód és így a kódolt aminosav megváltozásához vezetnek, azonban bekövetkezhetnek olyan mutációk is, amelyek nem okoznak változást a kódolt polipeptid aminosavsorrendjében. Ezek az úgynevezett szinoním (synonymous) vagy más néven csendes (silent) mutációk. A genetikai kód degenerált, vagyis a legtöbb aminosavat több kodon is kódolja. Ezért, ha az adott pontmutáció következtében az eredeti kodon egy szinoním (ugyanazt az aminosavat kódoló) kodonra változik, akkor ez a mutáció csendes, mivel nem okoz változást a kód alapján képződő polipeptid aminosavsorrendjében (8.9. ábra).

- **Misszensz (missense, megváltozott értelmű) mutációk**

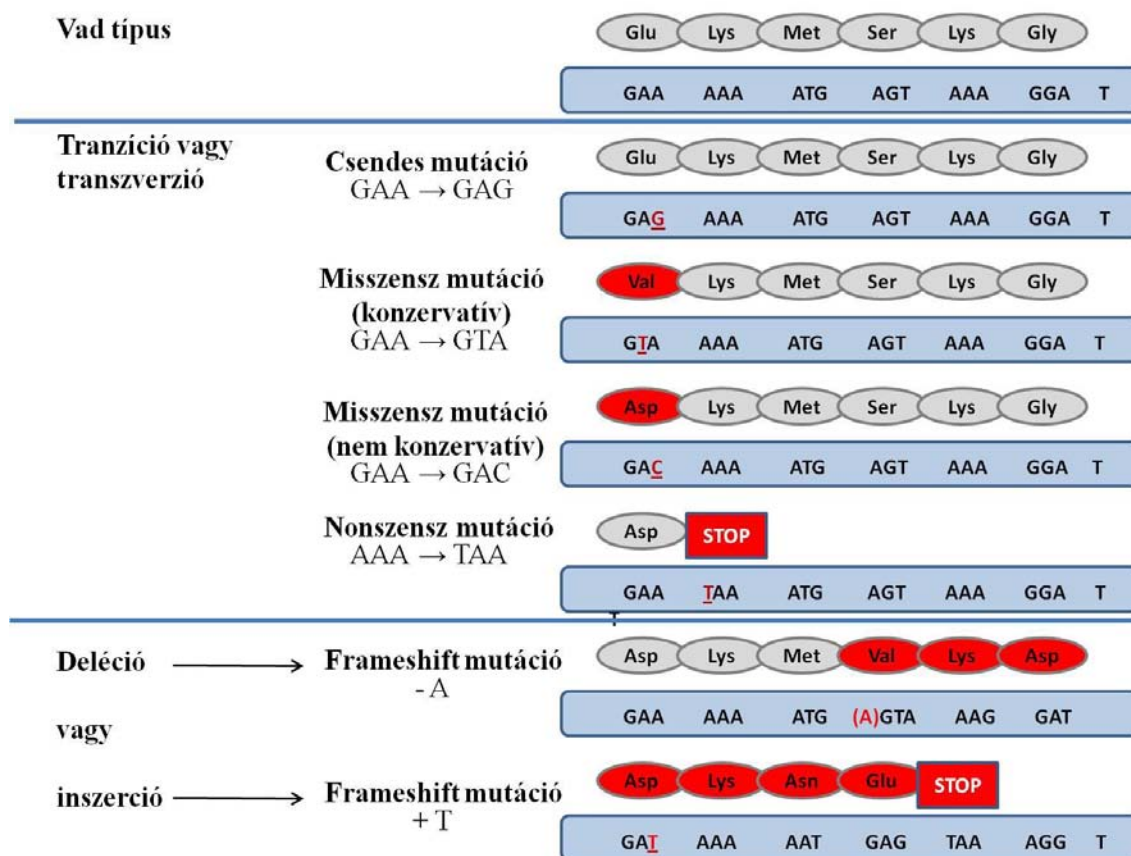
Ha egy pontmutáció eredményeképpen a kódolt aminosav minősége megváltozik, akkor misszensz mutációról beszélünk. Az aminosavcserét eredményező mutáció **konzervatív**, ha az eredeti aminosav hasonló kémiai struktúrájú aminosavra cserélődik. Két hasonló szerkezetű aminosav kicserélődése általában kevésbé befolyásolja az adott fehérje térszerkezetét, illetve funkcióját. Ha a misszensz mutáció következtében az eredetitől eltérő kémiai szerkezetű aminosav épül be a fehérjébe, akkor az aminosavcsere **nem konzervatív**. Az ilyen mutációk gyakran járnak az adott fehérje szerkezetének és működésének megváltozásával (8.9. ábra).

- **Nonszensz (nonsense, értelmetlen) mutációk**

Előfordul, hogy egy aminosavat kódoló kodon a transzlációt termináló, úgynevezett STOP kodonra változik, ezáltal a fehérje transzlációja idő előtt befejeződik. Az ilyen mutációkat nevezzük nonszensz (nonsense, értelmetlen) mutációknak. A nonszensz mutációk súlyosan befolyásolják a fehérjék funkcióját, mivel hatásukra az eredeti fehérjénél akár jelentősen rövidebb, működésképtelen fehérjék keletkezhetnek (8.9. ábra). A nonszensz mutációkat – a három STOP kodon hagyományos neve alapján – szokták **amber** (UAG), **ochre** (UAA), illetve **opal** (UGA) mutációknak is nevezni.

- **Frameshift (kereteltolódási) mutációk**

Egy vagy néhány bázispár kiesése (deléció) vagy beékelődése (inszerció) az örökítőanyag kódoló régiójába drámai változásokat okozhat a kódolt fehérje szerkezetében. Amennyiben az inszercióban, illetve a delécióban résztvevő bázisok száma **hárommal nem osztható**, a DNS-ről átíródó mRNS **leolvasási kerete elcsúszzik**, ezáltal a mutációt követő kodonok az eredetitől eltérő aminosavakat fognak kódolni. A leolvasási keret elcsúszása következtében sokszor nonszensz mutáció is kialakul. Abban az esetben is jelentős mértékben megváltozhat a fehérje szerkezete, ha az inszerció, illetve a deléció nem jár a leolvasási keret megváltozásával. (Három és többszöröse számú bázis beépülése vagy kiesése extra aminosavak beépüléséhez vagy kieséséhez vezet.) (8.9. ábra).



8.9. ábra: Fehérjekódoló gének kódoló régióját érintő pontmutációk típusai

Nem kódoló régiókat érintő pontmutációk

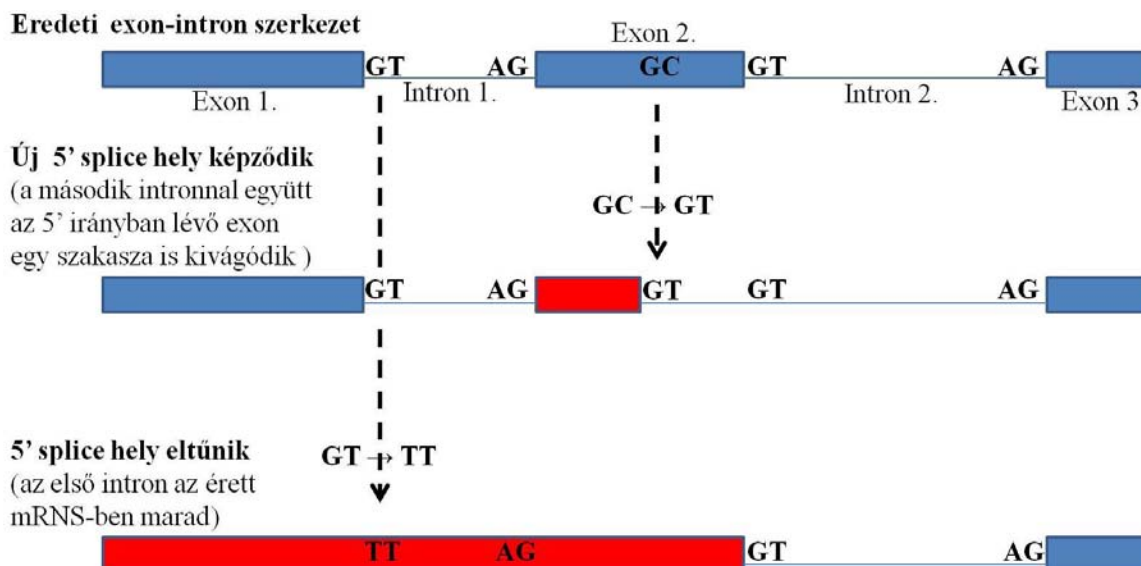
A DNS azon részében, amely közvetlenül nem vesz részt a fehérjék kódolásában, számos olyan régió található, amely elengedhetetlen a normális génműködéshez. Ilyen régiók például a DNS transzkripcióját, az mRNS érését, valamint transzlációját szabályozó fehérjék kötőhelyei. Az itt bekövetkező mutációk hatása nehezebben jósolható meg, mint a kódoló régiót érintőké. A nem kódoló régiókban bekövetkező mutációk egyes esetekben nincsenek kimutatható hatással a gén kifejeződésére, máskor azonban akár a gén teljes funkcióvesztéséhez is vezethetnek.

- **Az mRNS érését befolyásoló mutációk**

Az mRNS érése során a nem kódoló intronok kivágódnak. Az intron határait jellegzetes szekvenciák, az 5' és a 3' splice helyek jelzik. Ha egy génmutáció a splice helyeket érinti, akkor az éretlen mRNS-ből az intronok hibásan vágódnak ki. A splice helyek mutáció hatására eltűnhetnek, illetve megjelenhetnek. Előbbi esetben intronok maradhatnak az érett mRNS-ben (intron retenció), utóbbi esetben exon régiók vágódhatnak ki belőle. Mindkét esetben jelentős változást okoz a mutáció a polipeptid-szekvenciában (8.10. ábra).

- **A promótert és az 5' szabályozó régiót érintő mutációk**

A gén kifejeződése nagyban függ a transzkripciós faktorok kötődésétől. A kötődésben részt vevő szabályozó elemek mutációi elronthatnak vagy létrehozhatnak transzkripciós faktor kötőhelyeket, ezáltal drasztikusan változhat a gén transzkripciójának mértéke. Mutációk érinthetik azokat a nem kódoló szakaszokat, melyek átíródnak, és az RNS-ben a transzlációhoz szükségesek (például riboszóma kötőhely). Ezek a mutációk ugyancsak befolyásolják a gén kifejeződésének mértékét.



8.10. ábra: A pontmutációk megváltoztathatják a gén exon–intron szerkezetét

8.4. A DNS hibáit javító (repair) mechanizmusok

A DNS hibái többféle mechanizmussal javítódnak. Néhány általános szabály érvényesül. A javítás a DNS kettős spirál szerkezetén alapszik. A javítási mechanizmusok redundánsak, azaz egy hibát több mechanizmus is képes kijavítani, ami többszörös biztonságot jelent. Ha egy hibát az egyik mechanizmus nem javítja ki, jó esély van rá, hogy egy másik mechanizmus felismeri és kijavítja.

A DNS-polimeráz **proof-reading** javító tulajdonságáról a replikáció tárgyalásakor már volt szó.

A **mismatch (hibás bázispárosodát javító) repair** pro- és eukariótákban is előforduló konzervált mechanizmus. A MutL-MutS fehérjék felismerik a téves párosodást. A MutH exonukleáz a legközelebbi GATC helynél elvágja az új szálát. A javítandó új szálát úgy ismeri fel, hogy annak GATC helyein lévő adenin még nem metilált az adeninmetiláz (Dam metiláz) lassúsága miatt. A helikáz szétválasztja a szálakat, exonukleázok visszabontják, egyesszálú DNS-kötő (SSB) fehérjék stabilizálják az egysszálú templátot, melyen a polimeráz újra szintetizálja a kivágott darabot.

Baktériumokban és néhány alacsonyabb rendű eukariótában fordul elő a **fotoreaktivációs repair**. Az UV fény által létrehozott timidin fotodimert a kék–zöld tartományban működő fotoreaktiváló enzim (fotoliáz) széthasítja az eredeti bázisokra (fényt igénylő repair). Ez direkt hibajavítási mechanizmus.

Direkt hibajavítást végezhetnek **alkiltranszferázok**, melyek az O-6-os pozícióban metilezett guaninról a metilcsoportot egy ciszteinjükre viszik át, miközben az enzim inaktiválódik. Így ez a repair rendszer kimeríthető.

A bázis kivágáson alapuló (**bázis excíziós repair, BER**) esetében **DNS-glikozilázok** hasítják a sérült nukleotid bázis-cukor kötését, AP (apurin vagy apirimidin) helyet eredményezve. Az AP-helyen a foszfodiészter kötést az **AP-endonukleáz** elhasítja, a dezoxiribofoszfodiészteráz enzim eltávolítja a cukorfoszfát lánc egy szakaszát. A DNS-polimeráz ezután kipótolja a hiányt, amit a ligáz azután beforraszt, és ezzel helyreáll az eredeti sorrend. Sokféle glikoziláz ismert. Például az uracil-DNS-glikoziláz eltávolítja az uracilt a DNS-ből, mely a citozin spontán deaminálásakor keletkezik (vagy eleve uracil épülhet be). A rendszer felismeri a hipoxantint, xantint, 3-metiladenint, a 7-metilguanint és más módosított bázisokat. A sejtek életben maradásához nélkülözhetetlen javító mechanizmus, mert az AP-helyek keletkezése nagyon gyakori. Humán sejtben napi 20–40 000 AP-hely keletkezik.

A **nukleotid excíziós repair (NER)** nagyméretű DNS-hibákat (fotodimereket, nagyméretű bázismódosításokat) javító repair mechanizmus. A javító rendszer a sérülés környékén szétválasztja a szálakat, azokat SSB fehérjék stabilizálják. Két bemetszéssel eltávolításra kerül a sérülést hordozó szál egy nagyobb, több nukleotidnyi szakasza. A maradék egyszálú szakasz alapján a polimeráz a komplementer szálát feltölti, és a ligáz folytonossá teszi a szálát. Prokariótákban 12–13 nukleotidnyi a kivágás, és három fehérje (UvrA, B és C) vesz részt a javításban. Eukariótáknál 27–29 nukleotid vágódik ki, és legalább 17 fehérje működik közre a javításban.

Hibajavítás **rekombináció útján** is történhet. Ha a replikációs komplex működése fennakad egy hibán, a komplex esetenként „átugorja” azt, és egy egyszálú rést hagy maga után. A rést a *recA* gén terméke a másik templát szálról pótolja, majd az ott keletkezett rést – a másik új szálát használva fel templátként – kitölti.

A fentiekén kívül még sokféle mechanizmus ismert, melyekre itt nem térünk ki. Ha a hibajavító fehérjéket kódoló génekben mutáció következik be, a DNS-hibák javítása szenved kárt, így több hiba halmozódik fel a DNS-ben. Ennek következménye egysejtűekben nagyságrendekkel magasabb mutációs ráta, többsejtűekben rákbetegség kialakulása. Ezért ezeket a géneket **mutátor géneknek** is nevezik.

8.5. Mutagén hatást (genotoxicitást) mérő rendszerek

Felmérések szerint a halálozások oka a civilizált világban 40%-ban rákos daganat. A rákos megbetegedések közel 90%-át a környezetünket szennyező mutagének okozzák. A mutagén vegyületek egyben rákkeltők (karcinogének) is, hiszen a rákos sejtek mutációk sorozatával alakulnak ki. Évente néhány ezer olyan vegyületet állítanak elő, amelyek korábban nem léteztek a Földön (gyógyszer-alapanyagok, növény- és faanyagvédő szerek, élelmiszer-adalékok, kozmetikumok komponensei, háztartási vegyszerek stb.). A mutagének és a karcinogének közötti szoros kapcsolat szükségessé teszi a környezetünkben lévő mutagén vegyületek kimutatását.

A mutációt okozó anyagok kimutatására olyan tesztrendszer szükséges, amely hatékonyan láthatóvá tesz sok különböző lókuszban bekövetkező új funkcióvesztéses recesszív mutációt is. Soksejtű eukariótákban ez nehezebb, az első ilyen rendszert mégis

muslicában dolgozta ki Herman J. Müller 1928-ban (*Drosophila* CLB-teszt). Ma többféle, nemzetközileg elfogadott tesztrendszer használatos a genotoxicitás mérésére:

- bakteriális tesztek (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*)
- mikroszkopikus gombák (például *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*)
- rovarok (ecetmuslica *Drosophila melanogaster*)
- növények (lóbab, árpa, vöröshagyma)
- gerincessejt-vonalak (humán és egyéb emlős sejt vonalak)
- *in vivo* emlős (egér, hörcsög, patkány)

Az egyik legegyszerűbben kivitelezhető teszt a **bakteriális reverz mutagenitási teszt**. Kidolgozója, Bruce **Ames** után Ames-tesztnak is hívják. Validált teszt (OECD Guideline 471), világszerte alkalmazzák új anyagok mutagén tulajdonságának vizsgálatára első szűrőként. A teszt pontmutációk észlelésére alkalmas, s nagy populációban bekövetkező ritka mutációs esemény detektálását teszi lehetővé. A teszt *Salmonella typhimurium* apatogén, mutáns törzseinek használatán alapul. A tesztet több tesztörzsen is el kell végezni. A tesztörzsek mindegyike hisztidin auxotróf. A hisztidin bioszintézisben részt vevő több gén közül bármelyiket érintheti a mutáció (*hisG*, *hisC*, *hisD*) az egyes törzsekben. A teszt a potenciálisan mutagén vegyület hatására bekövetkező *his⁻ → his⁺* reverzió gyakoriságát méri a spontán reverziós gyakorisághoz képest (8.11. ábra).



8.11. ábra: Az Ames-féle mutagenitási teszt alapja

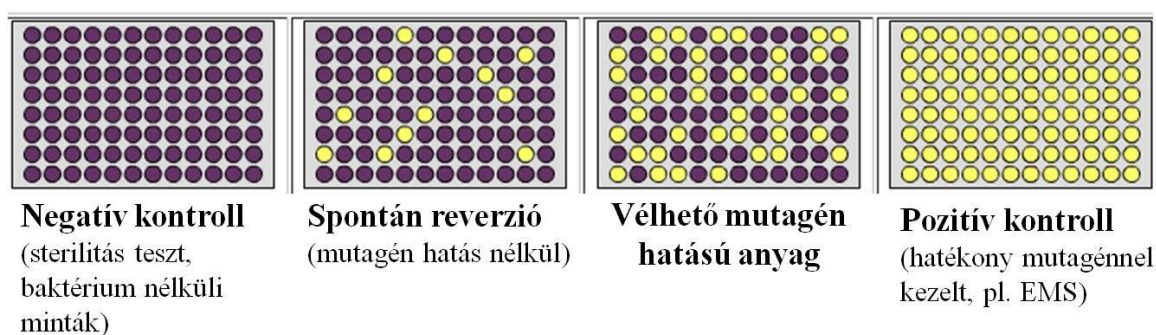
A tesztelő törzsek a fentiekén túl hibásak az LPS kialakításában (*rfa*, sejt felszíni lipopoliszacharid bioszintézisben), ezáltal a vizsgálandó anyag könnyebben jut be a sejtbe a sejt falon át. Továbbá, hibásak a tesztörzsek az excíziós repairben (*uvr*), ami érzékenyebb kimutatást tesz lehetővé.

A törzsek különböző típusú *his* mutációkat tartalmaznak (báziscserét vagy frameshift mutációt), ezért a mutáció reverziója történhet bázispár szubsztitúcióval vagy frameshift mutáció segítségével. Ez azért előnyös, mert különböző hatásmechanizmusú mutagén vegyületek mutathatók ki, azaz a teszt információt nyújt a genotoxikus anyagok által előidézett mutációk típusáról is.

A tesztelendő vegyülethez patkány májából készült mikroszóma frakciót (ún. S9 frakciót, mely tartalmazza az endoplazmás retikulumot a drogmetabolizmusban részt vevő enzimszerekkel) is adagolnak. Ennek célja, hogy modellezzék az emlősökben lejároló enzimikus reakciókat, így a bakteriális genotoxikológiai tesztből precízebben következtethetünk a vizsgált anyag magasabb rendű szervezetekre gyakorolt hatására.

Egy vegyületre akkor mondjuk, hogy Ames-tesztben **nem mutagén**, ha legalább négy törzsön – *TA98*, *TA100*, *TA1535*, *TA97* és/vagy *TA1537* – bizonyította önmagában vagy S9-es aktiválás után a hatástalanságát. Egyetlen törzsön mért pozitív teszt esetén is **mutagén** a minősítés.

Az Ames-teszt továbbfejlesztett változatában nem Petri-csészéken képzett telepek számát mérik, hanem 96 zsebes mikrotitráló lemezen, zsebenként 6 törzsszel (TAMix) egyszerre végzik a kimutatást. A lemez zsebeiben hisztidinmentes tápközegben szaporodó (revertált) baktériumok savasítják a tápközeget, amit a tápközegbe helyezett pH-indikátor festék (brómkrezol lila sárgulása) jelez (8.12. ábra).



8.12. ábra: Az Ames-teszt továbbfejlesztett változata

9. A génkifejeződés szabályozása prokariótákban

A gének kifejeződése (génexpresszió) az a teljes folyamatsor, melynek során a génekről funkcionális termék (fehérje vagy funkcionális RNS) képződik. Vannak gének, melyek termékeire állandóan szüksége van az élőlénynek, ezért expressziójuk állandó (**konsztitutív**). Ezeket **háztartási (housekeeping)** géneknek nevezzük. A **regulált**, nem mindig expresszáldó gének kifejeződése a teljes folyamatsor több pontján szabályozható. Az első szabályozási pont a transzkripcionális szabályozás, mely lehetőséget ad arra, hogy a sejtek génjeiknek csak egy részéről készítsenek RNS-másolatot, méghozzá azokról, amelyek termékeire az adott pillanatban szükségük van. Ez igen hatékony, energetikailag gazdaságos megoldás. Baktériumokban a génkifejeződés szabályozása elsősorban transzkripciós szinten valósul meg. Ez azt jelenti, hogy egy időpillanatban a sejtben a géneknek csak egy részéről történik átírás. Ahhoz, hogy sejtek a környezeti feltételekhez igazodva képesek legyenek génjeik ki-be kapcsolására, rendelkezniük kell a környezeti változásokat érzékelő rendszerrel, valamint a gének ki-be kapcsolását lehetővé tevő mechanizmusokkal. Azon gének, melyek termékeire az adott körülmények között nincs szüksége a sejtnek, nem (vagy csak gyengén) íródnak át. Általánosságban mondhatjuk, hogy a lebontó folyamatokért felelős gének alapállapotban nem íródnak át, csak akkor kapcsolnak be, ha a lebontandó molekula rendelkezésre áll (például speciális cukrok hasznosításában részt vevő operonok: *lac*, *ara* stb.). Ellenben, a felépítő folyamatokat irányító gének alapállapotban mindaddig működnek, amíg a termék szintézisére a sejtnek szüksége van (például aminosavak bioszintézisében részt vevő operonok: *trp*, *his* stb.).

A transzkripcionális szabályozás leggyakrabban a transzkripció iniciációjának befolyásolásával valósul meg, de ismerünk transzkripció terminációval kapcsolatos regulációs mechanizmusokat is.

9.1. A transzkripció iniciációjának szabályozása regulátor fehérjék által

A transzkripció iniciáció szabályozásának gyakori esete, amikor az RNS-polimeráz promóterhez kapcsolódása áll kontroll alatt. A szabályozásban a promóter környezetében elhelyezkedő **specifikus DNS-szakaszok** és a hozzájuk kapcsolódó **regulátor fehérjék** vesznek részt. A regulátor fehérjék lehetnek **aktivátorok**, melyek kötődése fokozza a transzkripciót (ez pozitív szabályozás), vagy lehetnek **represszorok**, melyek a promóter környezetébe kapcsolódva gátolják az átírást (ez negatív szabályozás). A represszorok kötőhelyeit baktériumokban **operátor régió**nak nevezik. A regulációban részt vevő fehérjék és kötőhelyeik a gének ki-be kapcsolásáért felelős **genetikai kapcsolók**. Mind az aktivátor, mind a represszor fehérjéknek képesnek kell lenniük arra,

hogy a sejt fiziológiás állapotának, illetve a környezeti feltételeknek megfelelően két-féle állapotba kerülhessenek: az egyik állapotukban kötődjenek, a másokban leváljanak a target DNS-szekvenciáikról. Ez leggyakrabban **allosztérikus konformációváltással** valósul meg. Az allosztérikus domén a regulátor fehérje szenzor funkciót betöltő része, melyhez kismolekulájú molekula (ún. **allosztérikus effektor**) kapcsolódhat. Az effektor kötődése befolyásolja a fehérje DNS-kötő doménjének konformációját, és így módon befolyásolja a génátírási kifejtett aktivitását. A transzkripció bekapcsolása, fokozása történhet aktiválással, vagy gátlás megszüntetésével. A transzkripció kikapcsolása, mérséklése pedig az aktiválás felfüggesztésével vagy gátlással valósulhat meg.

9.2. A transzkripció iniciációjának szabályozása speciális szigma (σ) faktorok által

E. coli-ban az **RpoD** (σ^{70}) az alap szigma faktor, amely jellegzetes konszenzus promóter szekvenciát ismer fel (9.1. táblázat). Vannak más szigma faktorok, amelyek különböző környezeti tényezők hatására vagy regulációs kaszkádok aktiválódásakor jelennek meg, és speciális, eltérő promóterszerkezettel rendelkező gének átíródását biztosítják a core RNS-polimerázhoz kapcsolódva. Az alternatív szigma faktorok tehát maguk is génexpressziós szabályozás alatt állnak. Nézzünk néhány példát az *E. coli* alternatív szigma faktoraira!

Az **RpoH** (σ^{32}) hőstressz fehérje gének átíródását irányítja. A hőmérséklet emelkedése jelennek meg a sejtben hőstressz (heat shock) fehérjék, amelyek között számos ún. dajkafehérje (chaperone) található. Ezek segítenek a fehérjék szerkezetének stabilizálásában, a helyes térszerkezet kialakításában. *E. coli*-ban 17 olyan hőstressz fehérje található, amelynek expressziója az RpoH irányítása alatt áll. A denaturált fehérjék felszaporodása a jel az RpoH megjelenésére. Ahogy nő az RpoH aránya a sejtben, úgy szorítja ki az alap szigma faktort az RNS-polimeráz komplexből, és segíti elő a hőstressz gének átíródását. Mivel az RpoH gyorsan degradálódik, a stressz elmúltával a hőstressz-gének átíródása is gyorsan leáll.

Az **RpoE** (σ^E) szintén hőstressz hatására jelenik meg. A periplazmikus térben és a külső membránban felszaporodó denaturált fehérjék hatására aktiválódik egy jelátviteli út, és jelenik meg az RpoE fehérje.

Az **RpoS** (σ^S) a logaritmusos növekedés leállása (a stacionárius fázis kialakulása) közben kezd megjelenni a sejtekben. Az alacsony hőmérséklet vagy a magas ozmolaritás stressz szintén aktiválja.

Az **RpoN** (σ^{54}) nitrogénéhezés esetében jelenik meg, amikor az ammónia szintje csökken. Ekkor olyan gének kapcsolódnak be, amelyek más nitrogénforrás felhasználását segítik elő.

A **FlhA** (σ^F) a kemotaxis és a flagelláris apparátussal kapcsolatos gének átíródását segíti elő.

A különböző szigma faktorokat tartalmazó RNS-polimerázok más és más konzerválódott promóter szerkezetet ismernek fel. Ezek legtöbbje a -10 és -35 régiókban tartalmaz – az alap promóterétől eltérő – jellegzetes DNS-szekvenciákat (9.1. táblázat).

9.1. táblázat: Különféle szigma faktorok és az általuk felismert promóter szekvenciák jellemzői

Gén	Sigma faktor	-35 konszenzus szekvencia	közbülső távolság (bp)	-10 konszenzus szekvencia
<i>rpoD</i>	RpoD (σ^{70})	TTGACA	16–18	TATAAT
<i>rpoH</i>	RpoH (σ^{32})	CCCTTGAA	13–15	CCCGATNT
<i>rpoN</i>	RpoN (σ^{54})	CTGGNA	6	TTGCA
<i>fliA</i>	FliA (σ^F)	CTAAA	15	GCCGATAA
<i>sigH</i>	SigH (σ^H)	AGGANPuPu	11–12	GCTGAATCA

A szigma faktorok alkothatnak regulációs kaszkádot. Jellegzetes példa erre a *Bacillus subtilis* sporulációjának szabályozása, ahol az egyes differenciálódási (spóra kialakulásához vezető) lépéseket irányító gének bekapcsolásának sorrendjét különböző szigma faktorok megjelenése határozza meg (ezt most nem tárgyaljuk). Ehhez hasonló a *Bacillus subtilis* SPO1 bakteriofág fertőzésénél működő kaszkád. A fág korai génjeinek promóterét még a baktérium alap szigma faktora ismeri fel. A korai gének között van egy speciális szigma faktort meghatározó gén is (*gp28*). A korai fázisban nagy mennyiségű gp28 fehérje készül, amely lecseréli az alap szigma faktort a baktériumban. A gp28-tartalmú polimeráz már nem írja át a bakteriális géneket, de intenzíven expresszálódnak a fág középső fázis génjei. Ezek között szintén van két gén, amelyek egy dimérből álló speciális szigma faktort kódolnak (*gp33* és *gp34*). Ezek felszaporodása teszi lehetővé a fág késői fázis génjeinek átíródását. Tehát minden egyes cserénél az RNS-polimeráz más és más promóterrel rendelkező gének átírását végzi, és abbamarad az ezektől eltérő promóterszerkezettel rendelkező gének átírása.

9.3. A transzkripció terminációjának szabályozása

Ismerünk transzkripció terminációval kapcsolatos szabályozást is. Ilyen mechanizmusok az attenuáció (lásd később, *trp*, *phe*, *his* operonok) és az antitermináció. Ez utóbbinál a terminációs szignál ellenére is tovább folyik a transzkripció akkor, ha egy antiterminátornak nevezett fehérje kötődik a transzkripció terminációs szignálhoz. Az antiterminációval megvalósuló transzkripcionális szabályozásra jó példát szolgáltat az *E. coli* lambda fág lizogén-lítikus fejlődésének szabályozása (erre itt nem térünk ki).

9.4. Operonok és regulonok

Baktériumokban az egy folyamatsorban részt vevő fehérjék génjei általában csoportokba rendeződnek a kromoszómán, ún. operonokat alkotnak. Ez a szerveződés gazdaságos, közös transzkripcionális szabályozásnak a lehetőségét teremti meg. Az operon tehát olyan gének csoportja, melyek fizikailag egymáshoz közel helyezkednek el a kromoszómán, és egy promóter irányítása alatt állnak. A gének egy transzkripciós egységet alkotnak, vagyis róluk egy közös RNS-transzkriptum keletkezik, melyet **policisztromos RNS**-nek („több génes”, a cisztron ritkán használt kifejezés, mai értelmezésben a génnek felel meg) nevezünk. A policisztromos RNS-ről több peptidlánc képződik. Az operon részének tekintjük annak szabályozó elemeit is: a promóter környéki szabályozó szekvenciákat (szabályozó fehérjék kötőhelyeit) és a struktúrgének közelében

elhelyezkedő – de saját promóterrel rendelkező, önálló transzkripciósi egységként viselkedő – szabályozó fehérjék génjeit. Az operonok prokariótáknál elterjedtek, eukarióta szervezetekben ritkák, de akad rá példa. A továbbiakban néhány operon szabályozási mechanizmusát tekintjük át.

A regulon több, együtt szabályozott géncsoportot jelent, lényegében együtt szabályozott operonok összessége, mely operonok a genomban elszórtan helyezkedhetnek el. Példa erre a CAP-regulon, mely az összes, cAMP-CAP által szabályozott operont magába foglalja (*lac*, *ara*, *gal*, *mal* és egyéb cukorhasznosításban részt vevő operonok, lásd a fejezet későbbi részében).

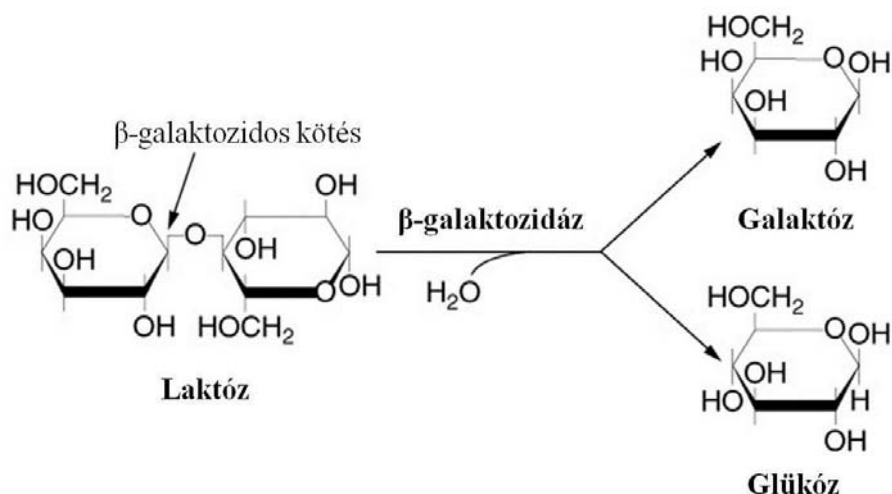
9.5. A *lac* operon szabályozása

Az elsőként felderített génszabályozási rendszer az *E. coli* laktóz-metabolizmusban részt vevő operon (röviden *lac* operon) szabályozása volt. Az operon működésének alapjait Francois **Jacob**, Jacques **Monod** és André **Lwoff** tárta fel az 1950-es években. Őket az operonmodell megalkotóiként tartjuk számon. Jacob és Monod 1965-ben Nobel-díjat kapott. Munkájukat nagyrészt genetikai kísérletes eszköztár segítségével végezték, s ezek a kísérletek a klasszikus baktériumgenetikai kísérletek iskolapéldái. A továbbiakban először áttekintjük az operon szabályozásának kulcselemeit, majd – az olvasó genetikai szemléletének csiszolása céljából – érintőlegesen foglalkozunk a modell megalapozásához vezető kísérletekkel.

9.5.1. Negatív szabályozás és indukció a *lac* operonban

A *lac* operon termékei a laktóz hasznosításban vesznek részt. Három struktúrgénje és a megfelelő fehérjetermékek, valamint azok funkciói az alábbiak:

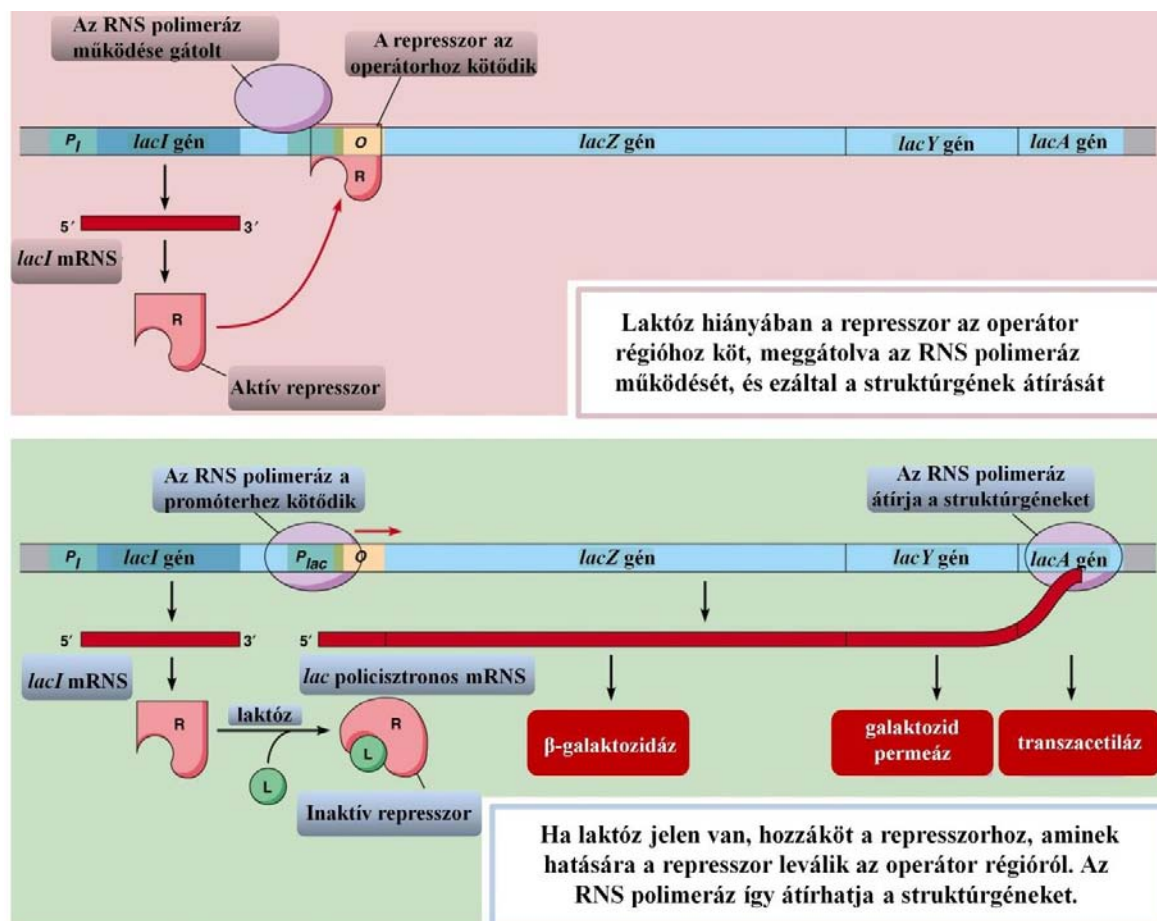
- *lacZ* gén – β -galaktozidáz – laktóz hidrolízisét katalizáló enzim (9.1. ábra)
- *lacY* gén – galaktozid permeáz – a sejtmembránban elhelyezkedő transzport fehérje
- *lacA* gén – transzacetiláz – funkciója a laktóz-metabolizmusban nem ismert



9.1. ábra: A β -galaktozidáz enzim a laktózt galaktózra és glükózra hidrolizálja

A három struktúrgénről, egy szabályozható promóter irányítása alatt egy policisztronos RNS keletkezik, így a három fehérjetermék mindig egyenlő mennyiségben képződik.

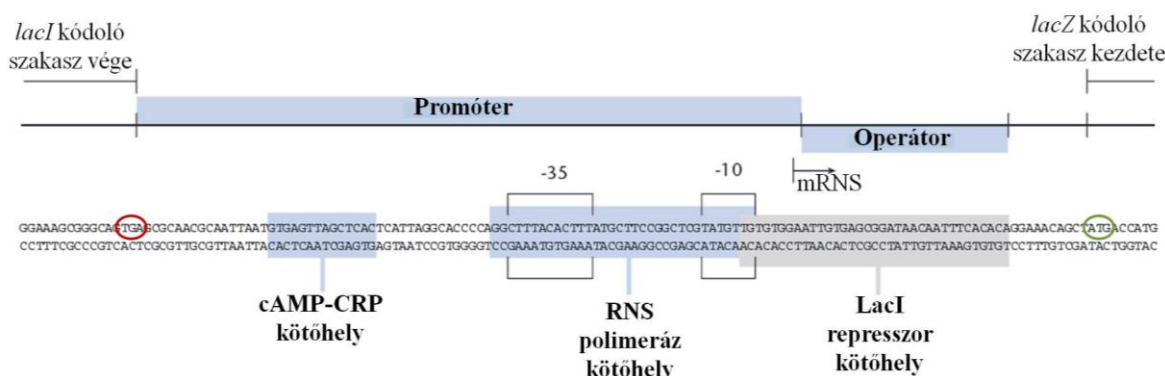
Az operonhoz tartozik a promótertől upstream elhelyezkedő szabályozó – represszor – fehérje génje, a *lacI*. A *lacI* gén saját promóterrel rendelkezik, expressziója konstitutív. Az operon része továbbá a LacI represszor fehérje kötőhelye, az operátor szakasz, mely a struktúrgének szabályozható promóterével és a transzkripció start-hellyel fed át (9.2. ábra).



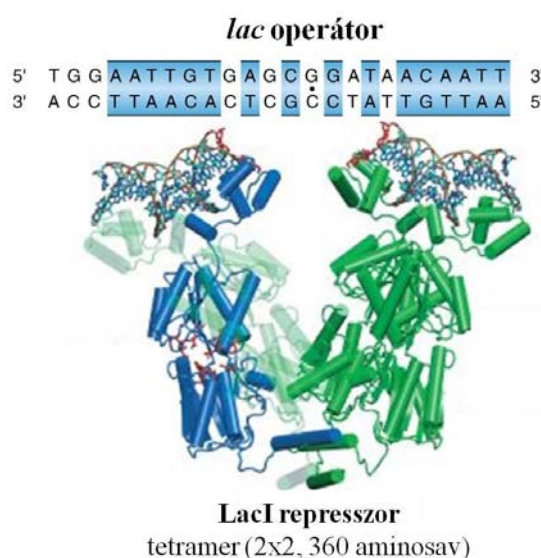
9.2. ábra: A *lac* operon felépítése és negatív szabályozása

Az operonon alapállapotban (ha nincs felvehető laktóz a tápközegben) negatív szabályozás érvényesül: a sejtben mindig jelen lévő LacI represszor fehérje az operátor szakaszhoz köt, és ezzel megakadályozza az RNS-polimeráz promóter felismerését. Az operon bekapcsolása a gátlás feloldásával valósul meg: a laktóz (illetve egyéb galaktozid-származékok) allosztérikus effektorként módosítják a LacI szerkezetét úgy, hogy az leválik az operátor szakasról (9.2. ábra). Ezt a folyamatot – mivel a génátírás fokozásáról van szó – **génindukciónak** is nevezzük. Felmerülhet a kérdés, hogy ha az operon represszált, akkor nincs jelen a sejtekben a laktózt importáló permeáz, tehát nem juthat be laktóz a sejtekbe, és nem végezhet effektor funkciót. Valójában a represszió, mint ahogyan a prokarióta génszabályozásban általában igaz, nem száz százalékos, az operon „ereszt”, gyengén, de átíródnak a struktúrgének. Az indukcióval ez a gyenge átírás többszázszoros mértékben megemelkedik.

Az operon szabályozható promóter környezetének szerkezetét DNS-szekvencia szinten mutatja be a 9.3. ábra. Az operátor régió egy tükrörszimmetrikus szekvenciarsz (akárcsak a később tárgyalandó cAMP–CRP kötőhely). Az operátorhoz a LacI represszor tetramerként kötődik (9.4. ábra).



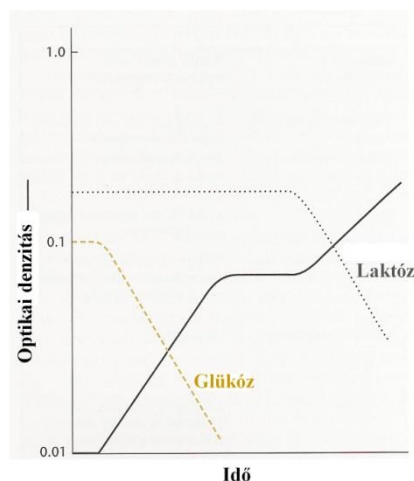
9.3. ábra: A szabályozható *lac* promóter és környezetének szerkezete szekvencia szinten



9.4. ábra: A LacI represszor tetramerként kötődik a tükörszimmetrikus szekvenciájú operátor régióhoz

9.5.2. Pozitív szabályozás a *lac* operonban

A *lac* operonon érvényesül egy pozitív szabályozás is. A szabályozó a CAP (vagy CRP) fehérje, melynek allosztérikus effektora a cAMP (ciklikus AMP). Ez a pozitív szabályozás nemcsak a *lac*, hanem más cukorhasznosításban részt vevő operonon is érvényesül (CAP-regulon). Ez a szabályozási rendszer lehetővé teszi, hogy több cukorforrás együttes jelenléte esetén a baktérium előnyben részesítse a számára legkedvezőbbet, a legkönnyebben hasznosítható glükózt (9.5. ábra). Amíg glükóz hozzáférhető a sejt számára, a *lac*, *ara*, *ma*, *gal* operonokról – a laktóz, arabinóz, maltóz, galaktóz indukció ellenére is – csak gyengén folyik az átírás.



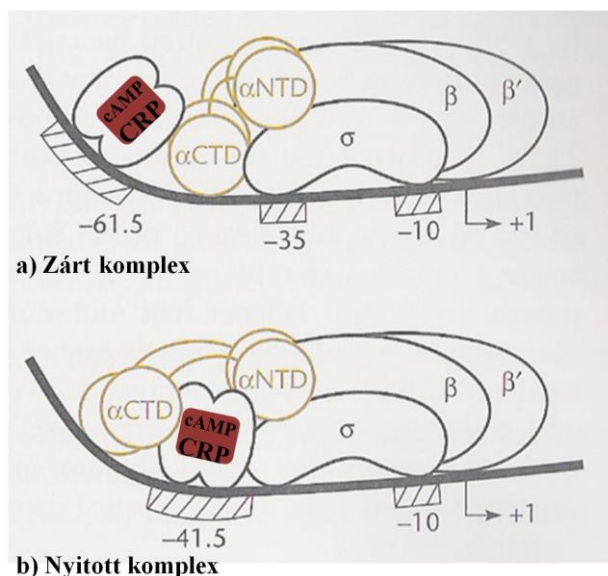
9.5. ábra: A sejtek két cukorforrás közül előbb a glükózt fogyasztják

Kezdetben azt feltételezték, hogy a glükóz valamelyik bomlásterméke, katabolizálja a többi cukoroperon működését, ezért a jelenséget elnevezték katabolit represszióknak, a szabályozó fehérjét pedig CAP, azaz katabolit aktivátor proteinnek. Ma már tudjuk, hogy egészen más mechanizmusról van szó, ennek ellenére a fenti kifejezés megmaradt a szaknyelvben. Néhol már találkozhatunk a CAP helyett a CRP (cAMP receptor protein) elnevezéssel, mely a valóságot jobban tükröző név. A továbbiakban mi is ezt használjuk.

Mi az összefüggés a CRP-t aktiváló cAMP szint és a glükóz között? A cAMP ATP-ből keletkezik adenilát-cikláz (AC) hatására. Alapvetően a szintézis sebessége határozza meg az intracelluláris cAMP-koncentrációt. Az adenilát-cikláz membránköthött enzim, amelynek aktivitását egy másik membránköthött enzim, a IIAGlc befolyásolja. A IIAGlc fehérje a foszfortranszferáz transzport rendszer egyik eleme, ami a glükóz transzportjában játszik szerepet. A IIAGlc működése közben reverzibilisen foszforileződik, és glükóz jelenléte esetén foszfátját nagy sebességgel a glükóznak adja, az pedig glükóz-6-foszfáttá alakul. Az adenilát-cikláz aktivitásához foszforileződésére van szükség, ami szintén a IIAGlc felől történik. Glükóz jelenlétében ez a folyamat lassú, mert a glükóz foszforilálódik elsődlegesen a IIAGlc által, ezért az AC inaktív, és alacsony a cAMP szint. Az alacsony cAMP szint miatt a CRP nem aktív, pozitív regulátorként nem tud hatni a CAP-regulon tagjain. Glükóz hiány esetén azonban a IIAGlc foszforilezett formájának koncentrációja megnő, gyorsan foszforilezi és aktiválja az AC-t, aminek következményeként megnő a cAMP szintje.

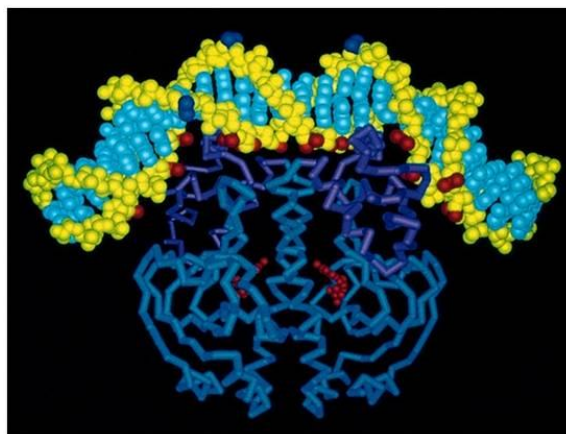
A cAMP–CRP komplex erősíti a promótert. A komplex kétféleképpen segítheti az iniciációt, annak függvényében, hogy milyen a promóter és a cAMP–CRP kötőhely viszonya (9.6. ábra):

- zárt komplex szerkezet: cAMP–CRP kötőhely a -60 pozícióban az RNS-polimeráz kötődését segíti (például *lac* operon)
- nyitott komplex szerkezet: cAMP–CRP kötőhely a -40 pozícióban stimulálja a DNS-szálak szétválását, azaz a transzkripció buborék kialakulását (például *gal* operon)



9.6. ábra: A cAMP–CRP komplex a kötőhelyének és a promóter távolságának függvényében kétféleképpen segítheti a transzkripció iniciációt

A cAMP–CRP kötőhely a *lac* operonban egy rövid, tükörszimmetrikus DNS-szekven-
cia (9.7. ábra). A komplex kötődése megváltoztatja a DNS görbületét.



9.7. ábra: A cAMP–CRP komplex tükörszimmetrikus szekvenciához kötődik

Összefoglalva: a *lac* operonon kettős – egy negatív és egy pozitív – szabályozás érvényesül. A struktúrgének átírása:

- laktóz hiányában és glükóz jelenlétében „csak szivárgó” (negatív szabályozás megléte, és pozitív szabályozás hiánya)
- laktóz és glükóz együttes jelenlétében gyenge (negatív szabályozás feloldása, de a pozitív szabályozás hiánya)
- laktóz jelenlétében és glükóz hiányában erős (negatív szabályozás feloldása, és a pozitív szabályozás megléte)

Ha egy gépjárműhöz hasonlítjuk a rendszert, akkor a negatív szabályozás analóg a fékkel, illetve annak kioldásával, a pozitív szabályozás pedig a gázadással. Ahhoz, hogy az autó maximálisan működjön, nem elég a féket kioldani (a repressziót megszüntetni), gázt is kell adni (pozitív szabályozás is szükséges).

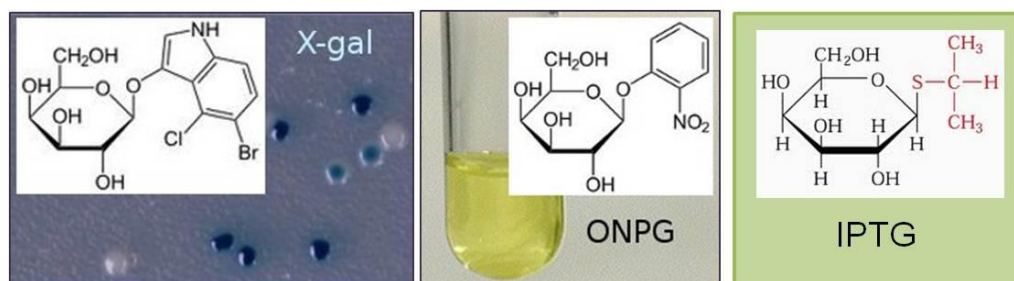
9.5.3. A *lac* operon működésének felderítése

Jacob, Monod és Lwoff az „enzimadaptáció” jelenségével kezdett foglalkozni az 1950-es években. Felfigyeltek arra, hogy az *E. coli* baktérium laktóz-metabolizmusban részt vevő enzime, a β -galaktozidáz nem mindig van jelen a sejtekben, csak akkor termelődik, ha laktóz kerül a táptalajba. Ezt nevezték el adaptáció jelenségnek, melyben az enzim megjelenését a szubsztrát váltja ki. Izotóppal jelzett aminosavak segítségével bizonyították, hogy az enzim a laktóz adást követően újonnan szintetizálódik. A kérdés, melynek megválaszolása elvezetett egy génszabályozási modell megalkotásához, és a Nobel-díj elnyeréséhez, szinte magától adódott: vajon miből érzékeli a sejt, hogy mikor kell termelni a megfelelő enzimeket?

A β -galaktozidáz aktivitás kimutatására, és az indukció kiváltására mesterséges galaktozid származékokat is kipróbáltak.

A β -galaktozidáz enzimaktivitás vizsgálatára két kromogén származékot (ONPG és X-gal) is találtak (9.8. ábra). E kromogén szubsztrátok esetén színes termék is keletkezik a bomlási reakció során, így az enzimaktivitás nyomonkövetése egyszerű. Az ONPG (O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) pontos enzimaktivitás méréseknél használatos, a reakció sárga terméket eredményez. Az X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-tiogalaktopiranozid) festéket a szilárd táptalajba téve a β -galaktozidáz aktivitással rendelkező baktériumkolóniák megkékekülnek. Ez a módszer az enzim jelenlétének vagy hiányának gyors kimutatását teszi lehetővé. A két kromogén szubsztrátot a mai napig elterjedten használják a *lac* operon alapú kutatási technikákban.

Egyes vegyületek az alapszinthez viszonyítva akár ezerszer több enzim megjelenését indukálták. Az inducer eltávolítása leállította az enzim szintézisét. A legjobb indukálószernek az IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) bizonyult (9.8. ábra), mely nem szubsztrátja az enzimnek. Az indukáló tulajdonság és az enzimhez való kötődés tehát elkülönül, úgy is mondhatjuk, hogy más az érzékelő és más a végrehajtó rendszer. Az IPTG alkalmazásának előnye, hogy nem fogy az indukció előrehaladásával, mint az eredeti indukálószer, a laktóz. Ezért máig ezt a vegyületet alkalmazzák a *lac* promóterrel működő biotechnológiai rendszerekben.



9.8. ábra: A β -galaktozidáz enzim két kromogén szubsztrátja (X-gal, ONPG) és a *lac* promóter kiváló indukálószer (IPTG)

Az operon struktúrgénjeinek azonosítása

A β -galaktozidáz enzim mennyiségi meghatározását eleinte specifikus ellenanyaggal végezték. A kromogén szubsztátok alkalmazása megkönnyítette a genetikai analízist. β -galaktozidáz aktivitást nem mutató, illetve az enzimet túltermelő baktériumtörzsek könnyen azonosíthatók voltak a színreakciókkal. Izoláltak olyan mutánsokat, melyek indukált állapotban is fehér telepeket képeztek (nem indukálható mutánsok, Lac⁻ fenotípus). A mutációkat két komplementációs csoportba tudták besorolni. A mutációk által izolált két gént (melyek neve *lacZ* és *lacY*) térképezték, és megállapították, hogy ezek egymáshoz igen közel helyezkednek el a kromoszómán. Funkciójukat tekintve megállapítható, hogy mivel ezen gének elrontása megakadályozza a laktózbontó enzimaktivitás megjelenését, a gének termékei nélkülözhetetlenek az aktivitáshoz (beleértve az enzimet kódoló gént is).

Szabályozásban hibás mutánsok

Az alapvető gének (*lacZY*) megismerése, térképezése után lehetőség nyílt különleges fenotípusú mutációk felismerésére, izolálására is. Néhány mutáció konstitutív (folyamatos) expressziót eredményezett, azaz a mutáns baktériumokban a β -galaktozidáz állandóan termelődött. Ez a mutáns tehát nem Lac⁻, felismerni például úgy lehet, hogy X-gal tartalmú táptalajon inducer hiányában kék telepet ad. Azon gének, melyek elrontása az enzim konstitutív termelését eredményezi, ép állapotban gátolják az enzim termelését. Az új mutációk a *lacZY* génekhez közel térképeződtek, és a későbbi kísérletekben további két csoportra voltak bonthatók: *lacO* operátorgén (későbbi pontos elnevezése operátor régió) mutációk és *lacI* indukálhatóságot befolyásoló mutációk. A két kategória között komplementációs kísérletekkel lehetett különbséget tenni.

A *lacI* volt az első gén, melyről feltételezhető volt, hogy nem enzimet kódol, hanem valamilyen regulátor funkciót tölt be. A vad (*lacI*⁺) baktériumokban β -galaktozidáz teljes termelődés csak inducer jelenlétében történik. A *lacI* - mutánsokban a β -galaktozidáz szint az indukált állapotra jellemző az inducer hiányában is. Tehát a *lacI* mutációja megakadályozza a gátlást, azaz a LacI represszor fehérje, mely gátolja a *lacZY* gének működését.

A szabályozás elemeinek felderítését és a működés megértését tovább segítette egy technikai előrelépés: létre tudtak hozni a *lac* operonra nézve részlegesen diploid (ún. parciális diploid) törzseket. Ehhez elsőként olyan plazmid származékokat izoláltak, melyek tartalmazták a baktériumkromoszóma bizonyos részeit (az alap plazmid az *E. coli* természetesen előforduló F plazmidja, melynek F' jelölt származékait rekombináció segítségével izolálták). A *lac* régió egyes részeit, különféle mutációk kombinációjával, hordozó F' plazmidokat különféle *lac* genotípussal rendelkező sejtekbe juttaták be. A parciális diploid állapotok létrehozása megteremtette a lehetőséget az allélek dominanciaviszonyainak megállapítására, valamint további fontos részlet tisztázására (9.2. táblázat).

9.2. táblázat: A lac operon működésének genetikai analízise I.

Genotípus	β -galaktozidáz enzimaktivitás indukálás nélkül	β -galaktozidáz enzimaktivitás indukálással	Fenotípus, következtetés
I^+Z^+ (vad)	–	+	ha I^+ , indukálható
I^-Z^+	+	+	ha I^- , konstitutív
I^+Z^-	–	–	ha Z^- , nem indukálható
$I^+Z^- / F' I^-Z^+$	–	+	indukálható, I^+ domináns I^- felett, I^+ transz módon hat

A táblázatban foglalt eredmények alapján, a $lacI^+$ (az indukálhatóság megléte) domináns a null mutációt (indukálhatóság hiánya, konstitutív expresszió) okozó $lacI^-$ allélok felett, függetlenül attól, hogy az allél a többi génhez képest *cisz* (ugyanazon a DNS-molekulán) vagy *transz* (másik DNS-molekulán – a kromoszóma, illetve F' jelenti a két DNS-molekulát) helyzetben van-e. A $lacI$ gén terméke ezért egy diffúzibilis represszor fehérje.

Hogyan működik a represszor? Komplexet kell alkotnia egy DNS-szakasszal, amely a szabályozott génnek előtt helyezkedik el. Ez a kitüntetett hely az operátor nevet kapta. Ha ez létezik, kell találni olyan mutációt, amely aktív represszor jelenlétében is (*cisz*) dominánsan megengedi az expressziót (a termék nem diffúzibilis). Sikert ilyen mutációt izolálni, s ezt O^c (operátor konstitutív) mutációnak nevezték el. A mutáció az I és Z gének közé térképeződött, és csak azon gének megnyilvánulására volt hatása, amelyek vele fizikai kapcsolatban (tehát ugyanazon a DNS-molekulán, *cisz* helyzetben) voltak (9.3. táblázat).

9.3. táblázat: A lac operon működésének genetikai analízise II.

Genotípus	β -galaktozidáz enzimaktivitás indukálás nélkül	β -galaktozidáz enzimaktivitás indukálással	Fenotípus, következtetés
O^+Z^+ (vad)	–	+	ha O^+ , indukálható
O^cZ^+	+	+	ha O^c , konstitutív
O^+Z^- és O^cZ^-	–	–	ha Z^- , nem indukálható
$O^+Z^- / F' O^cZ^+$	+	+	konstitutív, O^c <i>cisz</i> domináns módon hat

Az O^+ (az indukálhatóság megléte) és az O^c (indukálhatóság hiánya, konstitutív expresszió) alléleknek csak a velük *cisz* helyzetben lévő gének expressziójára van hatása. A feltételezett $lacO$ gén terméke tehát nem diffúzibilis (nem *transz* módon ható), hanem egy **cisz szabályozó elem**, azaz egy DNS-szakasz, mai nevén az operátor régió.

Így állt össze a kép: a szabályozás elemei a **regulátor gén**, az **operátor** régió és a **struktúrgének**, amelyek az operátor után rendeződve egy szabályozható egységként alkotják az **operont**.

(Megjegyzés: a modell kidolgozásának lépéseit nem teljes körűen mutattuk be.)

9.5.4. A *lac* operonon szerzett tudás hasznosítása napjainkban. A *lacZ* mint riporter gén

A **riporter gén**, valamint terméke, a **riporter fehérje** könnyen detektálható módon tudósít, közöl információt egy biológiai rendszer állapotáról, működéséről. A *lacZ* volt az elsőként alkalmazott, és máig igen népszerű riporter gén. Az ismertetett kromogén szubsztrátoknak (X-gal, ONPG) köszönhetően a β -galaktozidáz enzimaktivitás könnyen nyomomonkövethető nemcsak *in vitro* (sejtmentes rendszerben), hanem *in situ* (eredeti környezetben) is. Modellszervezetek széles spektrumán (baktérium, *C. elegans*, *Drosophila*, egér) alkalmazható. Az egyik legelterjedtebb alkalmazása az alapkutatásban a génexpressziós vizsgálatokban van. A géntechnika eszköztárának segítségével a *lacZ* kódoló szekvenciáját beépítik az adott modellszervezet valamelyik saját, vizsgálandó promótere mögé. Ezt a konstrukciót a kérdéses modellszervezetben működtetik, és különböző körülmények, eltérő fejlődési állapotok, különböző szövetek stb. esetén mérik a β -galaktozidáz enzimaktivitást, mely az őt irányító promóter mindenkori állapotáról nyújt információt.

Magát a szabályozható (ki-be kapcsolható) *lac* promótert (és származékait) is elterjedten alkalmazzák a biotechnológiában. Heterológ fehérjék (idegen fehérjék *E. coli*-ban történő) termeltetésére alkalmazott rendszerekben az egyik leggyakrabban használt promóter. Segítségével az irányítása alatt álló idegen fehérjét kódoló génről csakis indukció esetén (általában IPTG-vel) történik átírás és fehérjetermelés. Ez azért fontos, mert ezáltal kivitelezhető, hogy a „terméket gyártó” sejtpopulációt a legmegfelelőbb állapotában készítsük termelésre.

A *lac* rendszer a génklónozás eszköztárának is alapeleme évtizedek óta. A kék–fehér tesztet más kurzusok keretein belül (Mikrobiális genetika, Molekuláris biológiai technikák) részletesen tárgyaljuk, ahogyan a fenti pontban érintőlegesen bemutatott alkalmazásokat is.

9.6. Az *ara* operon szabályozása

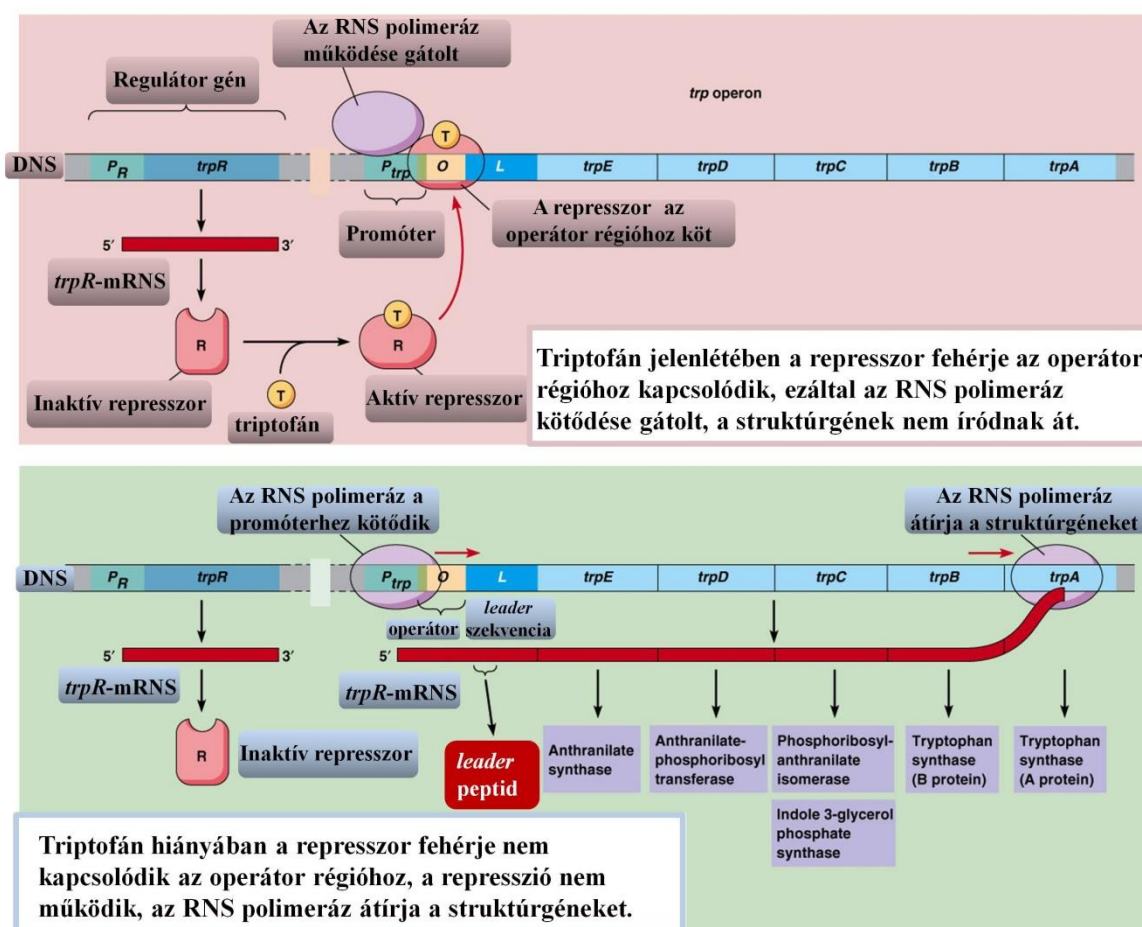
Az operon az arabinóz cukor lebontásához szükséges enzimek génjeit és szabályozó elemeiket tartalmazza. Struktúrgénjei: *araB*, *araA*, *araD*, melyekről policisztronos RNS keletkezik. A struktúrgéneket irányító promótert *pBAD*-nak nevezik (*p* – promóter, valamint a gének nevei sorrendben). Az operonon kettős pozitív és negatív szabályozás érvényesül. A szabályozó fehérje az AraC, mely – a LacI-hez hasonlóan – konstitutív módon termelődik. Az AraC a promóter környezetében lévő két DNS-régióhoz (I és O) egyszerre kötődve a DNS hurokképződése által gátolja az RNS-polimeráz működését, tehát represszorként működik, és felelős a negatív szabályozásért. Az indukálószer itt is a szubsztrát, az arabinóz. Az arabinóz–AraC komplex azonban nem válik le mindkét kötőhelyről: az O régiót kötésben tartja, és aktivátorként működik. Ez az egyik pozitív szabályozás. A másik pozitív szabályozás a *lac* operonnál már megismert cAMP–CRP által valósul meg itt is.

Az arabinózzal indukálható *pBAD* promóter-t szintén előszeretettel alkalmazzák heterológ fehérjetermeléskor. A *lac* promóterhez képest gyengébb promóterről van szó, ami mérsékelt termelésre ad lehetőséget. Sok esetben a lassabb termelés előnyös.

9.7. A *trp* operon szabályozása

Az *E. coli* triptofán (*trp*) operonjának géntermékei, a sejt szükségleteinek megfelelően, triptofán aminosavat állítanak elő. Érdekes módon az operonban a gének sorrendje megegyezik a géntermékek reakcióútban elfoglalt sorrendjével is (9.9. ábra).

A triptofán operonon negatív szabályozás érvényesül: alapállapotban a működő operont a végtermék magas szintje kikapcsolja, azaz ha a sejtben megnő a szabad triptofán szintje, akkor az transzkripció szinten negatívan visszahat a triptofán szintézisét végző enzimek expressziójára. A **negatív szabályozás** úgy valósul meg, hogy a triptofán az operon **represszor** fehérjéjéhez kapcsolódik mint **korepresszor**, elősegítve ezáltal annak operátor régióhoz kötődését, így gátolva az RNS-polimeráz működését (9.9. ábra).



9.9. ábra: A *trp* operon negatív szabályozása a represszor fehérje és a triptofán mint korepresszor által

Az operon genetikai analízise során felfigyeltek arra, hogy a represszor mutánsok továbbra is képesek szabályozni az enzimek képződését a triptofán szint függvényében. Ez a felismerés egy második, az előzőt kiegészítő negatív finomszabályozás felderítéséhez vezetett, melyet **attenuáció**nak (csillapítás) neveztek el. Ez a finomszabályozás a represszor génen kívül térképeződő deléciós mutáció által szűnt meg. A deletált (kiesett) szakasz a policisztronos mRNS elejét meghatározó gén régiót érintette. Az általa meghatározott mRNS-részt leader (vezető) szakasznak nevezték el. A leader

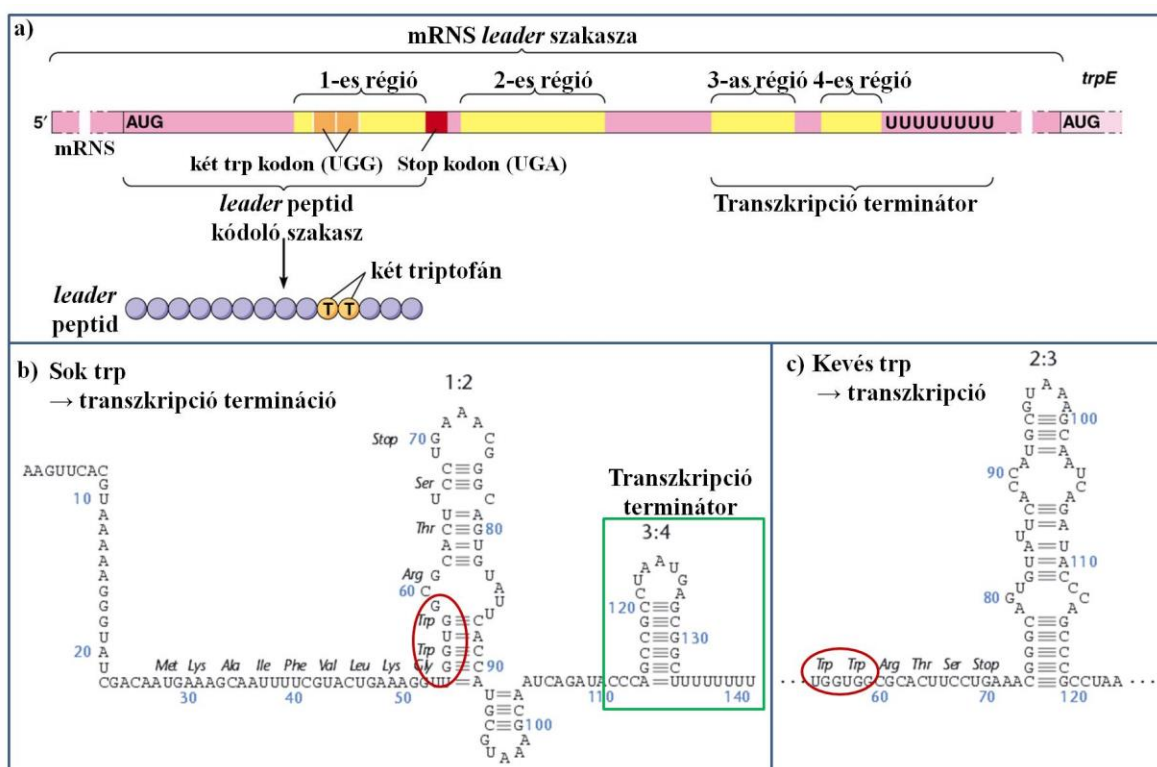
mRNS-szakasz szekvenciája speciális, kulcsfontosságú a finomszabályozás mechanizmusában. A leader mRNS-résznek négy kitüntetett szakasza van (1, 2, 3, 4, lásd 9.10. ábra), melyek által a molekuláris kétféle másodlagos szerkezetet vehet fel:

- az 1+2 és a 3+4 szakaszok kapcsolódnak komplementer bázisok által
- a 2+3 szakaszok kapcsolódnak komplementer bázisok által.

A leader szakaszcsoport egy rövid, 14 aminosavból álló peptid képződik. A peptid szintézisének végeit kijelölő START és a STOP kodon közé esik a leader mRNS 1-es szakasza. Ez az 1-es szakasz két egymást követő triptofán kodont tartalmaz. Emlékezzünk arra, hogy prokarióta szervezetről lévén szó, a transzkripció és a transzláció szorosan kapcsolódik: az RNS-polimeráz által hátrahagyott mRNS elejéhez azonnal riboszóma kapcsolódik, és az RNS-polimerázt követve elkezdődik a még szintetizálódó mRNS-ről a transzlációt. Amikor a riboszóma az 1-es szakaszhoz ér, felbomlanak az mRNS 1-es és 2-es szakaszai közötti másodlagos kötések. A transzláció sebességét az 1-es szakaszon lévő két trp kodonnál a triptofánt szállító trp-tRNS (mely arányos a sejtben lévő triptofán szinttel) hozzáférhetősége befolyásolja. Az 1-es szakasz területén a riboszóma gyorsan áthalad, vagy stagnál az alábbiaknak megfelelően:

- **Ha sok a triptofán** (van elég trp-tRNS), a riboszóma fennakadás nélkül beépíti a két egymást követő triptofánt a leader peptidbe, tehát gyorsan végighalad az mRNS 1-es szakaszán, és eléri a 2-es szakaszt. Emiatt a szintetizálódó mRNS 2-es szakasza fizikailag nem képes a 3-as szakasszal komplementer párosodást kialakítani. A 3-as szakasz így a legutóbb képződő 4-es szakasszal alakít ki bázipárosodással egy hurok (hajtű, hairpin) szerkezetet, amelyet U-fűző követ. Ezzel kialakul egy transzkripció terminációs szignál (ρ -független termináció). Ennek hatására az RNS-polimeráz leválik, nem viszi végbe a mRNS további szintézisét, tehát az enzimek kódoló szakaszait már nem írja át. Leáll a triptofán bioszintézis enzimeinek termelése.
- **Ha kevés a triptofán** (nincs elég trp-tRNS), a riboszóma a mRNS 1-es szakaszánál stagnál, vár az érkező trp-tRNS-re. Ekkor a 2-es és 3-as szakaszok párosodnak, és nem alakul ki a 3+4-es szakaszok általi transzkripció terminációs jel. Az RNS-polimeráz tovább halad, átírja a struktúrgéneket egy policisztronos mRNS-be, melyről a triptofán bioszintézis enzimeik képződnek.

Az attenuáció tehát egy transzkripció termináció általi szabályozási forma. A triptofán operonon kívül több más, aminosavszintézisben részt vevő operonon is érvényesül hasonló regulációs mechanizmus.



9.10. ábra: A trp operon szabályozása attenuációval

a) a leader mRNS szerkezete

b) és c) a leader mRNS szekvenciája és a transzkripció terminációs szabályozás szemléltetése

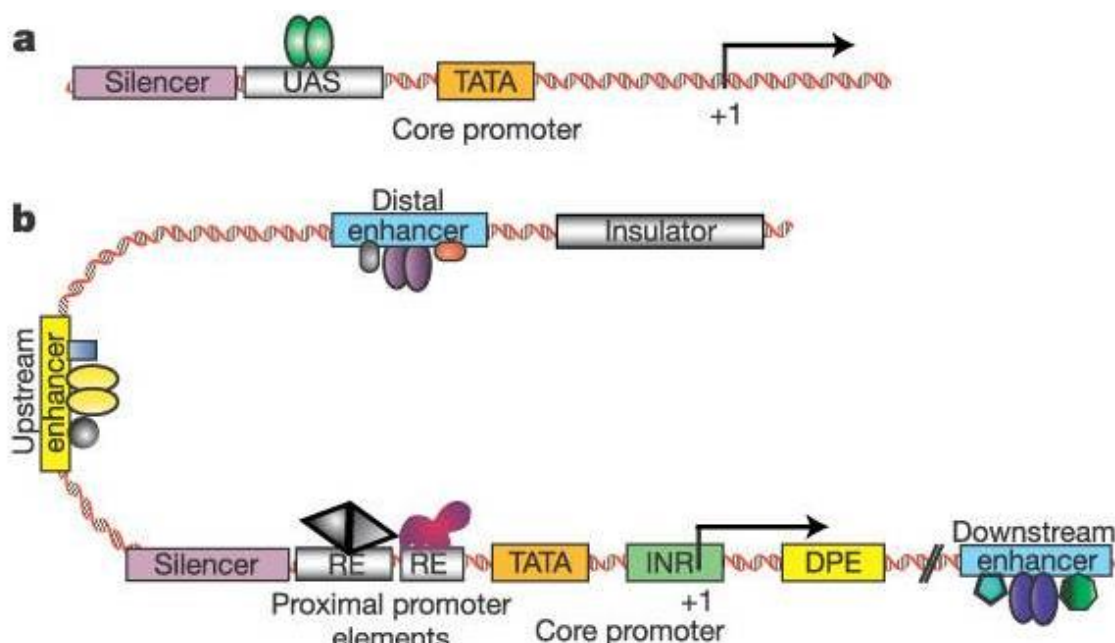
10. A génkifejeződés szabályozása eukariótákban

1996-ban az első klónozott emlős, Dolly birka híre végigfutott a világon. Dollyt szomatikus sejt (emlőszövet sejt) magjának enukleált (magjától megfosztott) petesejtbe ültetésével hozták létre. A korai stádiumú embriót álvemhes (hormonálisan felkészített) nőstény uterusába ültették. Azóta hallhattunk hasonló technikával klónozott szarvasmarháról, galambról, egérről és más állatokról. A tudományos társadalom is nagy megdöbbenéssel fogadta Dolly hírért, hiszen a tudomány akkori álláspontja szerint nehezen volt elképzelhető, hogy differenciált szomatikus sejt diploid magja alkalmas lehet egy új egyed kialakításához szükséges genetikai információ biztosítására. Dolly klónozásának sikeressége arra mutatott rá, hogy a többsejtű szervezetek differenciált sejtjeinek genetikai anyaga nem szenved olyan irreverzibilis változást, mely megakadályozná egy új egyed fejlődésére vonatkozó program végbemenetelét. Néhány kivételtől eltekintve, általánosnak mondható, hogy egy többsejtű élőlény sejtjei ugyanazt a genomot hordozzák, azaz jellemző rájuk a **genomi ekvivalencia** (genomi megegyezőség), mégis különböző fehérjéket tartalmaznak, ebből fakadóan eltérő a felépítésük és a működésük. Az egyedfejlődés és a sejtek, szövetek differenciált állapotának fenntartása a genom génjeinek **differenciális expresszióján** (eltérő kifejeződésén) alapul.



10.1. ábra: Dolly, az első klónozott emlős az „egyik anyjával”

Egy taxonómiai csoport komplexitásának mértékét a szervezet sejtfeleségeinek száma sokkal inkább kifejezi, mint pusztán az élőlény összes génjeinek száma. Az igazán izgalmas kérdés az, hogyan képes egy élőlény a genomját „használni”, milyen szabályozási mechanizmusokkal valósítja meg egyes sejt típusainak génkifejeződési mintázatát, ezáltal egyediségét.



10.2. ábra: Az eukarióta gének transzkripcionális szabályozása az egyszerűbb mechanizmusoktól a komplex szabályozási rendszerekig valósulhat meg
 a) Egy eukarióta sejt egyszerű transzkripcionális génszabályozási rendszere
 b) Egy többsejtű eukarióta szervezet génszabályozási elemei
 (részletek később a szövegben)

A fehérjekódoló gének szerepe hosszú évtizedekig kiemelt figyelmet élvezett a tudományban. Ez érthető, hiszen fehérjék határozzák meg a biológiai tulajdonságokat (szerkezet, enzimaktivitások stb.). A genomika ágazat, valamint a molekuláris genetikai kísérletes eszköztár fejlődése gyökeresen változtatta és változtatja meg a genomok működésével kapcsolatos elképzeléseinket. A humán genom körülbelül 98%-a nem kódol fehérjét. Mi tehát a funkciója? Valószínűtlen, hogy „hulladékként” maradt volna fenn, és értelmetlenül adódna át a sejtosztódások során. A gének kifejeződésének szabályozásával kapcsolatos mechanizmusok egyre jobb megértése közelebb visz minket a fenti kérdés megválaszolásához.

A bioinformatikai eszközök fejlődése, a rendszerbiológiai szemlélet további érdekességekre világít rá. Például a sejtekben fellépő fehérje interakciók száma, minősége (az ún. interaktóm) alapvetően meghatározza a sejtek működését. Az interaktóm hálózatok feltérképezése napjaink egyik nagy kutatási kihívása.

10.1. A génkifejeződés szabályozásának szintjei

Eukarióta sejtekben a gének kifejeződésének szabályozása több szinten valósulhat meg. A génkifejeződés szabályozható a DNS – mRNS – fehérje útvonal bármely lépésénél:

- **Transzkripcionális szabályozás:** milyen gének, mikor és hol íródjanak át RNS-sé.
- **Szelektív RNS-érés és alternatív splicing:** mely elsődleges transzkriptumok válnak mRNS-é, valamint milyen mRNS-ek alakulnak ki az elsődleges transzkriptumból.
- **RNS-transzport szabályozás:** mely érett mRNS-ek jutnak ki a sejtmagból a citoplazmába.

- **Transzlációs szabályozás:** mely mRNS-ek fordítódnak le a citoplazmában fehérjévé.
- **mRNS degradációs szabályozás:** bizonyos mRNS-molekulák szelektív módon lebontásra kerülhetnek.
- **Fehérjeaktivitás szabályozása:** fehérjemolekulák poszttranszlációs szabályozása (aktiváció, inaktiváció, kompartmentalizáció, degradáció).

10.2. Transzkripcionális szabályozás

Az eukarióta génszabályozás sokban hasonlít a bakteriális mechanizmusokhoz. Mindkét sejtfeleségben kiemelt fontosságú a transzkripcionális szabályozás, melynek alapja, hogy a DNS-molekula specifikus szekvenciáihoz regulátor fehérjék kötődnek. A szabályozó elemeket szokás az alábbiak szerint felosztani:

- *cisz* módon ható szabályozó elemek: ide tartoznak a szabályozásban részt vevő DNS-szakaszok, melyek csak a velük megegyező DNS-molekula génjeit képesek szabályozni
- *transz* módon ható szabályozó elemek: ide soroljuk a transzkripciót szabályozó fehérjéket, melyek diffúzibilis molekulák, minden jelen lévő DNS-molekulán képesek hatni.

Az eukarióta sejtekben sokkal nagyobb a gének száma, mint a prokariótákban (néhány ezer helyett akár néhányszor tízezer), ráadásul az eukarióták génjei nagyobbak és bonyolultabbak. Bizonyos szabályozó szekvenciák a transzkripció starthelyétől akár több tízezer bázispárnnyira is lehetnek, és reguláló faktorok egész sorára lehet szükség a gének megfelelő szabályozásához.

Eukariótákban a gének kifejeződésének transzkripcionális szabályozása két tényező összjátékával valósul meg:

- strukturális sajátságok: a DNS „csomagoltságának” mértéke
- transzkripcionális faktorok (transzkripciót szabályozó fehérjék) hatása

Foglaljuk össze újra az eukarióta transzkripció jellemzőit:

- a transzkripció és a transzláció külön térben, egymástól jól elválasztva zajlik
- háromféle RNS-polimeráz: pol-I, pol-II, pol-III van jelen
- a transzkripció szabályozása jelentős részben aktiváló jellegű: a promóter és az RNS-polimeráz önmagában nem elég a transzkripció elindításához
- a kromatinszerkezet gátolja a transzkripciót
- transzkripciós egységenként egy fehérjekódoló szakasz jellemző (monocisztronos mRNS), az operonok igen ritkák
- az mRNS érési folyamatokon megy keresztül, mielőtt kijutna a sejtmagból

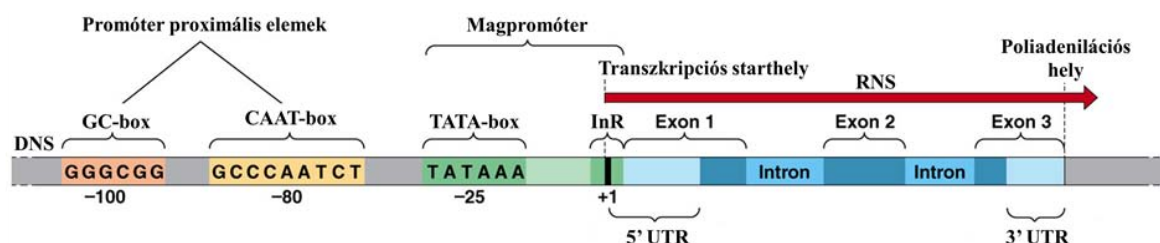
10.2.1. Cisz regulátor elemek: a promóter

Az eukarióta gének promóterei összetettek, több konzervált DNS-szekvenciát tartalmaznak. A **core (alap, minimál, mag) promóterről** és az alap transzkripciós faktorokról a transzkripció témakörnél már esett szó. Kiemeljük újra, hogy az RNS-polimeráz önmagában nem tud kötődni a DNS-hez. Az iniciáció számos fehérje-fehérje kölcsönhatás által valósul meg.

A magpromóter több konszenzus szekvenciát tartalmaz. A TATA-boksen kívül jellemző a transzkripciós starthely (+1 hely) körüli ún. InR (iniciátor régió), valamint a

strathelytől 20–30 nukleotiddal 3' irányban elhelyezkedő DPE (downstream promóter elem) konzervált régiók is. Az InR minden promóternél jelen van, a másik két elem (TATA-boksz, illetve DPE) közül elegendő csak az egyik jelenléte egy alap promóter működéséhez.

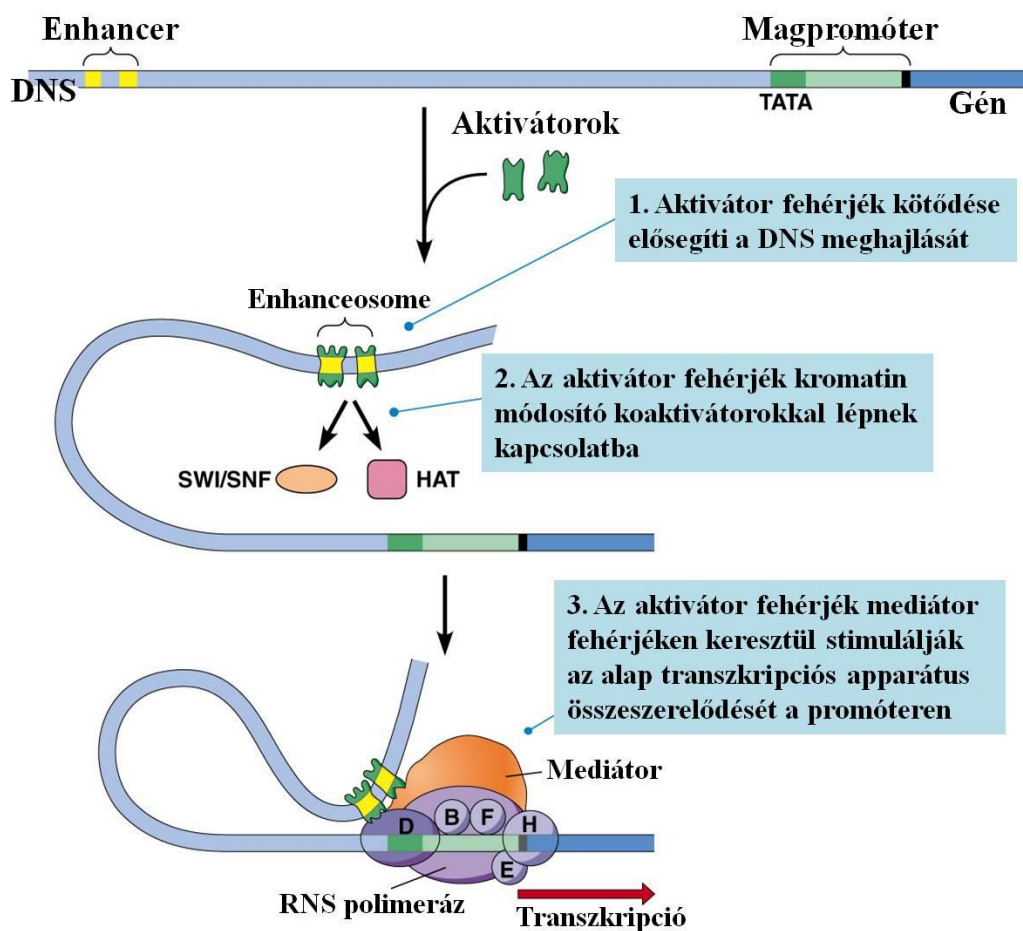
A minimál eukarióta promóter önmagában nagyon gyenge. További *cisz* aktivátor elemek (DNS-szekvenciák) szükségesek a jobb működéshez, melyeket szokás **szabályozó promóternek** vagy **aktivátor szekvenciáknak** vagy **promóter proximális elemeknek** is nevezni. Ezek a konzervált szakaszok különböző aktivátor fehérjék kötődését segítik elő. Az aktivátor szekvenciák a magpromótertől upstream (5' irányban) körülbelül 500 bp-on belül találhatóak. A CAAT-boksz az első megismert aktivátor szekvencia, mely a promóter határfokát növeli. A másik gyakori elem a GC-boksz (GGGCGG szekvencia, sokszor több kópiában). További szabályozó promóter elemek is ismertek. A különböző gének szabályozó promóterei e konzervált szekvenciák egyedi kombinációit tartalmazzák.



10.3. ábra: Egy eukarióta gén szerkezete a magpromóterrel és promóter proximális elemekkel

10.2.2. Távolból ható *cisz* regulátor elemek: enhancerek, silencerek

Az **enhancerek** olyan DNS-szakaszok (tipikusan néhány száz bp hosszúságúak), melyek távolról képesek a transzkripció mértékét fokozni, s a gén maximális aktivitásához járulnak hozzá. A távoli hatás akár több kilobázispárt is jelenthet, például a T-sejt receptor alfa alegységét kódoló gén enhancere 9 kbp távolságra helyezkedik el a promótertől. A legelfogadottabb modell szerint az enhancer hatása úgy valósul meg, hogy a hozzá kötődő aktivátor fehérjék a DNS kihurkolódása révén kerülnek kapcsolatba az alap transzkripciós apparátussal, vagy a szabályzó promóterhez kötődő fehérjékkel. Az enhancerhez kötődő aktivátor fehérjék magukhoz vonzhatnak kromatin szerkezetet befolyásoló (átépítő, fellazító) koaktivátor fehérjéket is (10.4. ábra). Élesztőben az enhancer sajátos szekvenciákat **UAS** (upstream activator sequences) elemeknek nevezik, melyek a promótertől csak 5' irányban elhelyezkedve működnek. Magasabbrendű eukariótákban az enhancer elemek változatos pozíciókat foglalhatnak el: a géntől (promótertől) 5' irányban, a génen belül, vagy akár a gén után 3' irányban. További jellegzetesség, hogy bár az enhancerek meghatározott szekvenciájú szakaszok, hatásuk orientációtól független. Egy gén transzkripcióját több enhancer is szabályozhatja. Az enhancerek a környezetük minden promóterére képesek hatni, hatásukat azonban **inzulátor** szakaszok (határoló DNS-elemek) korlátozzák. Az enhancer és a promóter közé helyezett inzulátor megakadályozza, hogy az enhancer hasson a promóterre. Bizonyos inzulátorok a kromatin konformáció változás továbbterjedését akadályozzák meg. Ismerünk transzkripciót gátló távoli *cisz* elemeket is, ezeket **silencereknek** nevezzük. A silenceren keresztül ható szabályozó fehérjék gátolják a transzkripciót.



10.4. ábra: Az enhancerhez kötődő aktivátor fehérjék távolba hatása a DNS meghajlása révén valósul meg

Egy stimulus egyszerre több gén működését is képes szabályozni, például hőstressz, nehézfémstressz, hormonhatás következtében összehangolt génexpresszió változás tapasztalható. A közösen szabályozott gének közös *cisz* szabályozó elemekkel rendelkeznek. Ezeket a jól definiált *cisz* szabályozó szekvenciákat **válasz elemeknek (response elements, RE)** nevezik, és a szabályozó promóter vagy az enhancer régiókban helyezkednek el. Néhány példa: hő sokk válasz elem – HRE, ösztrogén válasz elem – ERE, glükokortikoid válasz elem – GRE, fém válasz elem – MRE. A konzervált kötőhelyek ismerete és a bioinformatikai eszközök alkalmazása kellő alapot szolgáltat a új szabályozási utak felderítéséhez.

10.2.3. Transz regulátor elemek: a transzkripció faktorok

Eukariótákban transzkripció faktoroknak (TF) nevezzük azokat a transzkripcióban részt vevő szabályozó fehérjéket, melyek a bemutatott *cisz* szabályozó elemekhez kapcsolódva befolyásolják a génátírást. A TF-ek a transzkripciót pozitívan vagy negatívan befolyásolhatják. A TF-ek száma élesztőben körülbelül 300, emberben körülbelül 1800. Ez azt jelenti, hogy élesztőben kb. 20, emberben kb. 10 génre jut egy TF. Egy gén szabályozásában a TF-ek különféle kombinációi vesznek részt, ami a genetikai válaszreakciók számát óriásira növeli már a transzkripcionális szabályozás szintjén. A transzkripció hatásfokát a génen ható összes TF együttes hatása szabja meg.

Mivel a TF-ek kulcsfontosságúak egy szervezet fejlődése során, egy TF-gén deléciója gyakran súlyos fejlődési rendellenességekhez vezet. Például a *Drosophila* egyik mutánsánál (ún. Antennapedia) egy transzkripciós faktor hibája folytán az antenna imaginális korongból láb fejlődik csáp helyett (10.5. ábra).



10.5. ábra: A *Drosophila Antennapedia* mutánsa

A TF-ek által felismert DNS-szekvencia motívumok rövid, 6–10 bp hosszúságú szakaszok. A DNS egy szakaszának 3D szerkezete a TF-ek számára hasznosítható információt rejt: a bázisok szélei a DNS nagy árkában felismerhetők. A TF-ek kapcsolatba lépnek egymással és az RNS-polimerázzal. Gyakoriak a homo- vagy heterodimerként funkcionáló TF-ek.

A TF-ek moduláris szerkezetű fehérjék, s az alábbi domének kombinációit hordozhatják:

- DNS-kötő domén, mely által a DNS specifikus szakaszaihoz kötődnek
- fehérjekötő domén, mely által kapcsolatot teremtenek más TF-ekkel, vagy az RNS-polimerázzal
- a kromatinszerkezetet befolyásoló domén
- a különféle fiziológiai hatásokat érzékelő domén (például hormonkötő domén a nukleáris hormonreceptoroknál, melyek valamely hormon kötésével aktív transzkripciós faktorként működnek)

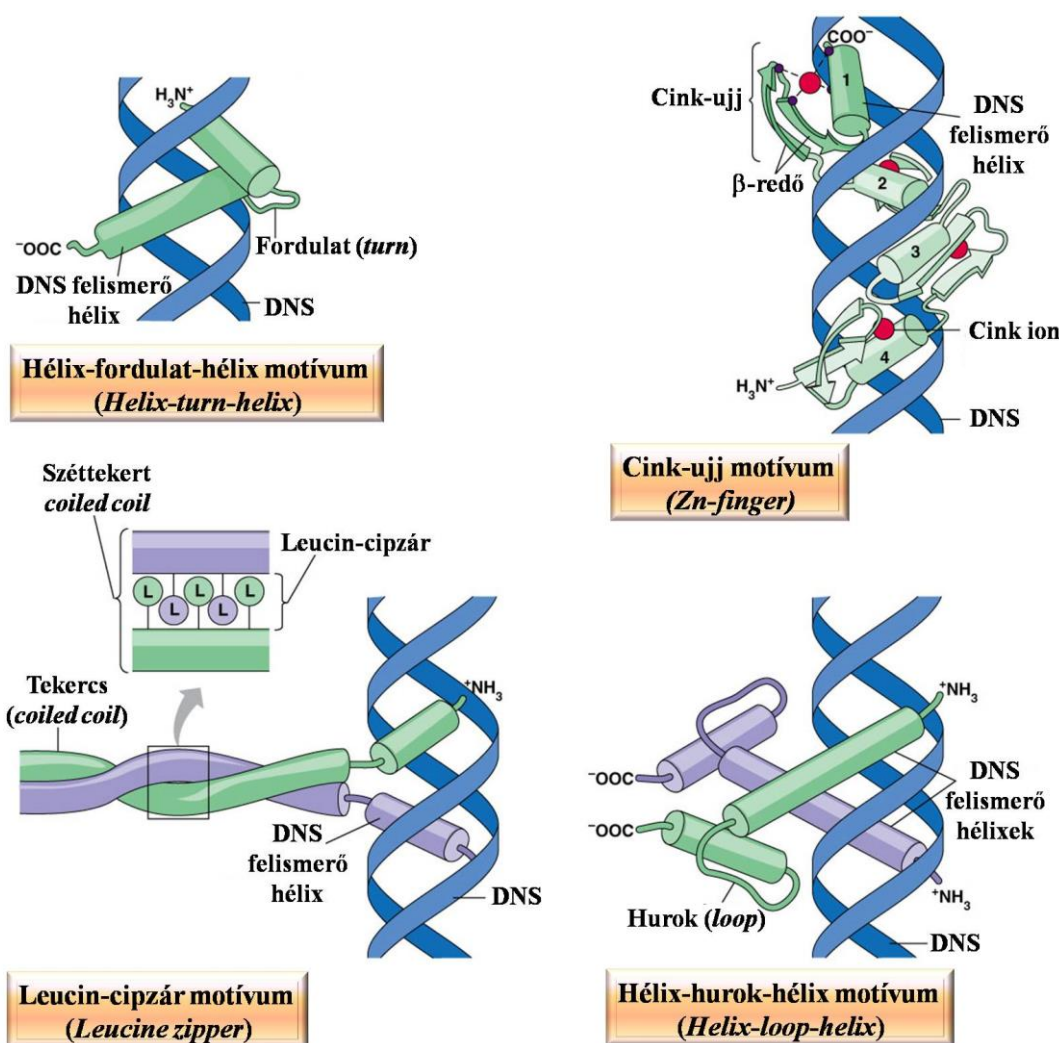
A transzkripciós faktorokat a DNS-kötő domén szerkezete alapján négy fő csoportba, funkcionális szempontok szerint pedig számos családba sorolják.

A DNS-hez kötődő motívumok szerkezetileg az alábbiak lehetnek (10.6. ábra):

- hélix-fordulat-hélix (helix-turn-helix)
- cink-ujj (zinc-finger)
- leucin cipzár (leucine zipper)
- hélix-hurok-hélix (helix-loop-helix)

Ez a sajátság teremti meg az alapját a TF-ek egyféle csoportosításának. Csoporton belül a fehérjék DNS-kötő régiójának szerkezete hasonló ugyan, de a régiók aminosavsorrendje közötti kisebb-nagyobb különbségek miatt, illetve más faktorokkal való kölcsönhatásuk eredményeképpen más-más DNS-szekvenciákhoz kötődnek. Megjegyezzük, hogy a fenti négy csoportba nem sorolható be minden TF, a finomabb csoportosítás érdekében további típusokkal is találkozhatunk a szakirodalomban.

Nem minden TF rendelkezik DNS-kötő doménnel, például a koaktivátorok fehérje-fehérje kölcsönhatással kapcsolódnak a transzkripciót szabályozó komplexhez.



10.6. ábra: Transzkripció faktorok DNS-kötő doménjeinek szerkezete

Funkcionális szempontok, doménszerkezet, szekvencia hasonlóság alapján a TF-eket számos családba sorolják. Internetes adatbázisok is rendelkezésre állnak, melyekben összegyűjtik az ismert, illetve a genomsekvenciák adataiból feltételezhető TF-ek adatait. Az adatbázisokban különféle szempontok szerint (például faj, TF-család) lehet keresni. Ezen adatbázisok előnye, hogy hivatkozásokat tartalmaznak számos más adatbázishoz, így némi keresgélés során rengeteg információhoz juthatunk. A jegyzet írásakor elérhető két legnagyobb TF-adatbázis: (Ezekon kívül egy-egy modellszervezetre specifikus TF-adatbázisok is léteznek.)

- AnimalTFDB, *Animal Transcription Factor Database* – állati szervezetek TF-adatbázisa

<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB>

Az adatbázis jelenlegi tartalma: 72 család, körülbelül 66000 tag (10.7. ábra)

- PlnTFDB, *Plant Transcription Factor Database* – növényi szervezetek TF-adatbázisa

<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>

Az adatbázis jelenlegi tartalma: 84 család, körülbelül 26000 tag (10.8. ábra)

AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database

**Table 1.**

Numbers of TFs, transcription cofactors and chromatin remodeling factors of 50 species in current AnimalTFDB

Group names	Species	Common names	TFs	CoFs	CRFs	Total
Primates	<i>Homo sapiens</i>	Human	1544	302	150	1996
	<i>Macaca mulatta</i>	Macaque	1440	266	119	1825
	<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzee	1429	272	135	1836
	<i>Gorilla gorilla</i>	Gorilla	1429	264	130	1823
	<i>Callithrix jacchus</i>	Marmoset	1397	277	132	1806
	<i>Pongo pygmaeus</i>	Orangutan	1331	263	118	1712
	<i>Microcebus murinus</i>	Mouse Lemur	1037	180	77	1294
	<i>Otolemur garnettii</i>	Bushbaby	894	129	72	1095
	<i>Tarsius syrichta</i>	Tarsier	842	151	64	1057
	<i>Mus musculus</i>	Mouse	1457	279	130	1866
Rodents	<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	1371	257	119	1747
	<i>Cavia porcellus</i>	Guinea Pig	1054	253	117	1424
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Rabbit	1047	252	117	1416
	<i>Ochotona princeps</i>	Pika	903	173	75	1151
	<i>Dipodomys ordii</i>	Kangaroo rat	862	170	78	1110
	<i>Tupaia belangeri</i>	Tree Shrew	815	138	64	1017
	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	Squirrel	810	128	52	990
	<i>Bos taurus</i>	Cow	1313	257	123	1693
	<i>Equus caballus</i>	Horse	1240	258	123	1621
	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Giant Panda	1199	258	127	1584
Laurasiatheria	<i>Tursiops truncatus</i>	Dolphin	1167	234	110	1511
	<i>Pteropus vampyrus</i>	Megabat	1119	236	111	1466
	<i>Canis familiaris</i>	Dog	1062	257	129	1448
	<i>Sus scrofa</i>	Pig	1038	195	90	1323
	<i>Myotis lucifugus</i>	Microbat	970	156	69	1195
	<i>Felis catus</i>	Cat	887	139	62	1088
	<i>Erinaceus europaeus</i>	Hedgehog	744	118	63	925
	<i>Sorex araneus</i>	Shrew	630	126	61	817
	<i>Vicugna pacos</i>	Alpaca	646	118	58	822
	<i>Loxodonta africana</i>	Elephant	1096	261	119	1476
Afrotheria	<i>Procavia capensis</i>	Hyrax	983	177	74	1234
	<i>Echinops telfairi</i>	Lesser hedgehog tenrec	985	155	59	1199
Xenarthra	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo	868	132	61	1061
	<i>Choloepus hoffmanni</i>	Sloth	725	107	48	880
Other mammals	<i>Monodelphis domestica</i>	Opossum	1454	241	97	1792
	<i>Macropus eugeni</i>	Wallaby	897	150	53	1100
Birds and reptiles	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Platypus	814	149	60	1023
	<i>Taeniopygia guttata</i>	Zebra Finch	1185	181	82	1448
	<i>Gallus gallus</i>	Chicken	775	192	83	1050
Amphibia	<i>Anolis carolinensis</i>	Lizard	1211	197	82	1490
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Frog	1038	168	67	1273
Fishes	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	1916	160	77	2153
	<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu	1274	162	73	1509
	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodon	1292	151	63	1506
	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Stickleback	1227	153	69	1449
	<i>Oryzias latipes</i>	Medaka	1187	138	63	1388
Other chordates	<i>Ciona savignyi</i>	Sea squirt	409	32	19	460
	<i>Ciona intestinalis</i>	Sea squirt	428	40	16	484
Other Eukaryotes	<i>Drosophila melanogaster</i>	Fruitfly	627	38	20	685
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Worm	657	21	9	687
Total			52 725	9111	4169	66 005

CoFs, transcription cofactors; CRFs, chromatin remodeling factors.

10.7. ábra: Állati szervezetek transzkripció faktor adatbázisában jelenleg fellelhető transzkripció faktorok (TFs), kofaktorok (CoFs) és kromatin remodeling faktorok (CRFs) száma taxonómiai egységenként

TRANSCRIPTION FACTOR FAMILIES

ABI3VP1	CAMTA	LFY	SBP
Alfin-like	CCAAT	LIM	Sigma70-like
AP2-EREBP	CPP	LOB	SRS
ARF	CSD	MADS	TAZ
ARR-B	DBP	mTERF	TCP
BBR/BPC	E2F-DP	MYB	Tify
BES1	EIL	MYB-related	TIG
bHLH	FAR1	IIAC	Trihelix
BSD	FHA	HOZZLE	TUB
bZIP	G2-like	OFP	ULT
C2C2-CO-like	GeBP	Orphans	VARL
C2C2-Dof	GRAS	PBF-2-like	VOZ
C2C2-GATA	GRF	PLATZ	WRKY
C2C2-YABBY	HB	RWP-RK	zf-HD
C2H2	HRT	S1Fa-like	Zn-clus
C3H	HSF	SAP	

OTHER TRANSCRIPTIONAL REGULATORS

ARID	IWS1	PHD	SOH1
AUX/IAA	Jumonji	Pseudo ARR-B	SWI/SIF-BAF60b
Coactivator p15	LUG	RB	SWI/SIF-SWI3
DDT	MBF1	Rcd1-like	TRAF
GHAT	MED6	SET	
HMG	MED7	SIF2	

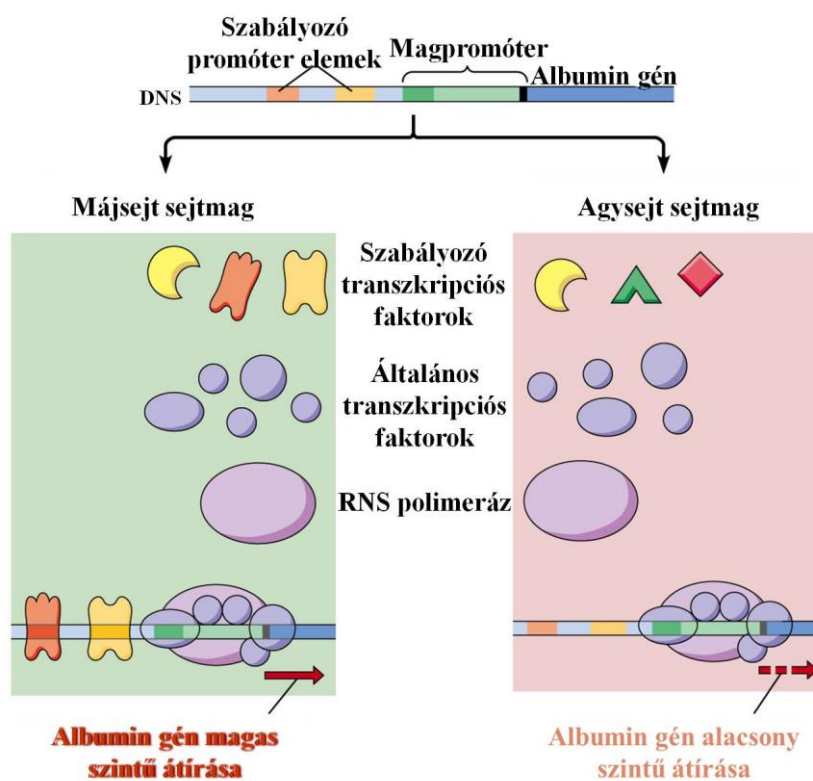
10.8. ábra: Növényi szervezetek transzkripciós faktor adatbázisában jelenleg fellelhető transzkripciós faktor és más transzkripcionális regulátor (kofaktorok, kromatin remodeling faktorok) családok

A TF-ek a transzkripciót pozitívan vagy negatívan befolyásolhatják. Az enhancerekhez kötődő **aktivátor** hatású transzkripciós faktorok közvetlenül vagy **koaktivátor**, illetve **mediátor** fehérjéken keresztül kapcsolódnak az alap transzkripciós komplexhez (10.4. ábra). A kapcsolat elősegíti a komplex összeszerelődését, és/vagy stabilizálja, aktiválja azt. A koaktivátor fehérjék egy részének a kromatinszerkezetet módosító aktivitása van (lásd később). Ezeket a TF-típusokat a csoportosítás során szokás elkülöníteni, és **kromatin módosító faktoroknak** nevezni. Eukariótákban – a prokariótáknál megismert típusú – kifejezett **represszorok** nincsenek, ezért gyakran nem is represszoroknak, hanem **silencer (csillapító) fehérjéknek** nevezik őket. Ezek a fehérjék gátolják az aktivátor fehérjék hatását, miközben maguk is specifikusan kötnek a DNS-hez, de sohasem az RNS-polimeráz működését akadályozzák közvetlenül, mint prokariótákban. A silencer fehérjék hatása megvalósulhat úgy, hogy versenyeznek az aktivátor fehérjékkel a kötődésben, de maguk nem aktiválódnak, vagy úgy, hogy destabilizálják az alap transzkripciós komplexet.

A szabályozó promóter elemekhez, valamint az enhancerekhez és silencerekhez kötődő transzkripció faktorok sejten belüli jelenléte meghatározó a gén transzkripcionális szabályozásában. Egy gén a *cisz* szabályozó szekvenciáival együtt (többsejtű szervezetben) minden sejtfeleségben jelen van, de a szabályozó *transz* elemek nélkül a génről nem történik, vagy csak igen alacsony szintű (ún. bazális) átírás történik. A génspecifikus transzkripció faktorok több tíz- vagy százszorosra fokozzák a gén átírásának mértékét.

Ahogy már említettük, vannak olyan gének, melyek termékére minden sejtfeleségben szükség van, ezeket **háztartási (housekeeping) gének**nek nevezzük. A háztartási gének azonos promóter proximális elemekkel rendelkeznek, amelyekre specifikus aktivátor fehérjék minden sejt típusban jelen vannak. Ez biztosítja, hogy ezek a gének minden sejtben folyamatosan átíródnak.

Más gének termékére viszont csak bizonyos sejtfeleségekben, vagy a sejt életének meghatározott szakaszában, vagy a sejtet érő különféle hatások esetében van szükség. Ez utóbbiak lehetnek a sejt szempontjából külső, illetve belső fiziológiai hatások. (Külső hatások például: sejt felszíni receptor felől szignáltranszdukciós útvonal által közvetített hatás, stresszhatások; belső hatás például: hibák felhalmozódása a DNS-ben.) Ezek a nem állandóan expresszálandó gének egyedi szabályozó *cisz* elemekkel rendelkeznek. A specifikus szabályozó transzkripció faktorok egyedfejlődési szakasztól, sejttől, szövettől, időtől és más tényezőktől függő jelenléte, illetve aktivitása teszi lehetővé, hogy csak a meghatározott helyen és időben íródjon át magas szinten az adott gén. A 10.9. ábra a szérum albumin példáján szemlélteti a gén májszövet-specifikus expressziójának szabályozó transzkripció faktoroktól való függését.



10.9. ábra: Egy gén szövetspecifikus transzkripciója a szabályozó transzkripció faktorok jelenlététől és aktivitásától függ

Mi befolyásolja az adott sejt aktív transzkripció faktor populációját? Sok transzkripció faktor kizárólag specifikus szövetekben képződik. Transzkripcionális szabályozásukért – ahogyan más géneknél is – specifikus *cis* regulátor szekvenciák és az ezekhez kötődő transzkripció faktorok felelősek. A transzkripció faktorok tehát nemcsak szabályozzák más gének kifejeződését, hanem azok kifejeződése is szabályozódik. Ennek megfelelően **génszabályozási hierarchiák** alakulnak ki, amelyeknek csúcán a **mestergén** áll. Ha a mestergén szabályozó szakaszában van olyan elem, melyen keresztül a saját átíródását serkenti, kialakulhat egy egyszerű sejtmemória mechanizmus. A sejtmemória alapja már az egyedfejlődés igen korai szakaszában tetten érhető a zigótát létrehozó petesejt citoplazmájában lévő ún. **morfogének** (ezek „a formát kialakító” molekulák, zömében transzkripció faktorok vagy azok mRNS-ei) gradienyszerű megoszlása által. A morfogének koncentrációja már a korai, néhány sejttes embrionális fejlődési szakaszban különböző lesz az egyes sejtekben (ennek oka az eleve gradienyszerű megoszlásuk a zigótában), tehát a sejtek egyedi, egymástól eltérő transzkripció faktor populációval fognak rendelkezni. Ezek a génszabályozási kaszkád csúcán álló TF-ek megteremtik a differenciálódás alapját.

A transzkripció faktorok kifejeződése nemcsak transzkripcionális szinten, hanem az azt követő génexpressziós lépések valamelyike (lásd fent) által is szabályozható. Gyakori a foszforiláció–defoszforiláció általi poszttranszlációs aktivitás szabályozás. A tiol-diszulfid redox átalakulás számos stresszválaszban fontos transzkripció faktor aktivitását befolyásoló poszttranszlációs módosítás. Az alternatív splicing is vezethet aktív vagy inaktív TF formákhoz (lásd a *Drosophila* ivarmeghatározási rendszere). A hormon-receptor komplex kialakulása egy további aktiválási lehetőség (például az intracelluláris szteroid receptoroknál).

10.3. Epigenetikai szabályozás

Az epigenetika a genetika dinamikusan fejlődő, napjainkban igen népszerű kutatási ágazata. Az epigenetika tárgykörébe tartoznak azok a genomot érintő jelenségek, melyek a DNS-szekvencia „felett, kívül” állnak. A genom olyan sajátosságai tartoznak ide, melyek nem a DNS nukleotidsorrendjét érintik, de mitotikusan, vagy akár meiotikusan is átörökökíthetőek. Epigenetikai szabályozáson az epigenetikai tulajdonságok megváltozásával járó génexpressziós szabályozást értjük. A mai tudásunk szerinti epigenetikai jelenségek a kromatin szerkezetét meghatározó hisztonmódosulások és a DNS-metilációs mintázatok. Mindkét jelenség alapvetően kihat a gének transzkripcionális szintű kifejeződésére. Ma már életünk szinte minden területét összefüggésbe hozzák – többé vagy kevésbé megalapozott módon – epigenetikai jelenségekkel. Habár mindent nem magyarázhatunk általa, tény, hogy a terület fejlődése jelentősen hozzájárul a genom működésének egyre jobb megértéséhez.

A genetika–epigenetika nevezéktan mintájára a „genom – genetikai kód – genetikai térkép” kifejezésekkel párhuzamosan használjuk az „epigenom – epigenetikai kód – epigenetikai térkép” kifejezéseket a teljes genomra vagy egy genomszakaszra jellemző hisztonmódosulások és DNS-metilációs mintázatok leírására.

10.3.1. A dinamikus kromatin

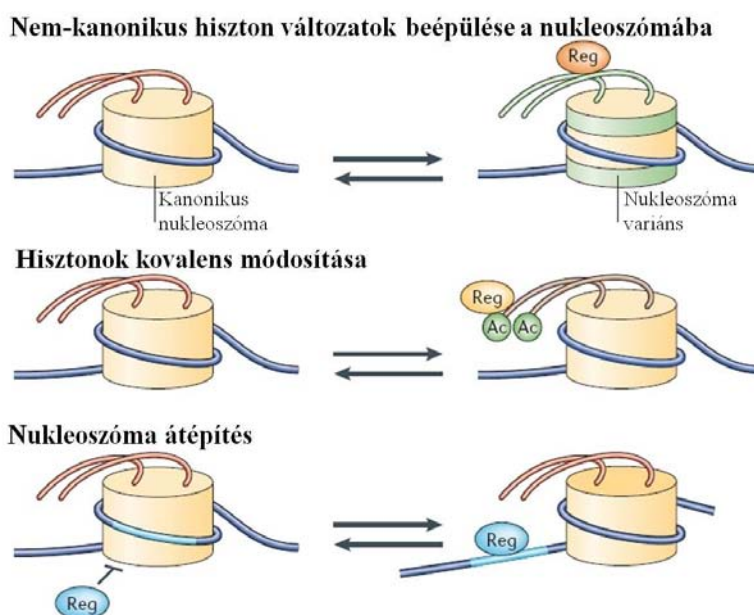
Elevenítsük fel a kromatin szerkezetére vonatkozó ismereteinket:

- a DNS bázikus oldalláncokkal rendelkező hiszton és nem-hiszton fehérjékkel összekapcsolódva tömörül, ez a fehérje–DNS szerkezet a kromatin

- a kromatinszerveződés több szinten valósul meg
- a kromatintömörülés mértéke a sejtciklus során és DNS-régióként változik (interfázisban laza, mitózis és meiózis során tömör; a heterokromatin régiók, az eukromatinnal szemben, az interfázisban is erősen kondenzált részek).

Ebben a fejezetben látni fogjuk, hogy a kromatin szerepe nemcsak a DNS kondenzációjának biztosítása, hanem a DNS működésének szabályozása is. Leegyszerűsítve azt mondhatjuk, hogy az eukarióták DNS-ének kromatinszerkezetbe szerveződése a gének működésére (a transzkripcióra) negatív hatással van. Az eukarióta gének „alapértelmezett” állapota ezért a kikapcsolt állapot. Annak érdekében, hogy a gének átírást kijelölő szabályozó szakaszok a transzkripciós apparátus számára hozzáférhetővé váljanak, szükség van a kromatin szerkezet meghatározott területeken történő fellazítására. A kromatinszerkezetet befolyásoló számos fehérjekomplexet és mechanizmust azonosítottak a közelmúltban. A legismertebb epigenetikai módosulások: 1) hisztonváltozatok beépülése a nukleoszómákba, 2) a hisztonok kovalens módosítása acetiláció, metiláció, foszforiláció által, 3) a nukleoszómák átépítése (10.10. ábra) és 4) a DNS metilációja.

A kromatinmódosulások lehetnek stabilak egy élőlény teljes élete során, így járulva hozzá egy állandó génkifejeződési mintázat kialakulásához. A jelenség azonban nem irreverzibilis. Rákos sejtekben például gyakoriak a kromatinszerkezeti változások. Az ivarsejtek kialakulása során az epigenom szintén jelentős változásokon esik át.



10.10. ábra: A kromatin szerkezetét befolyásoló epigenetikai jelenségek

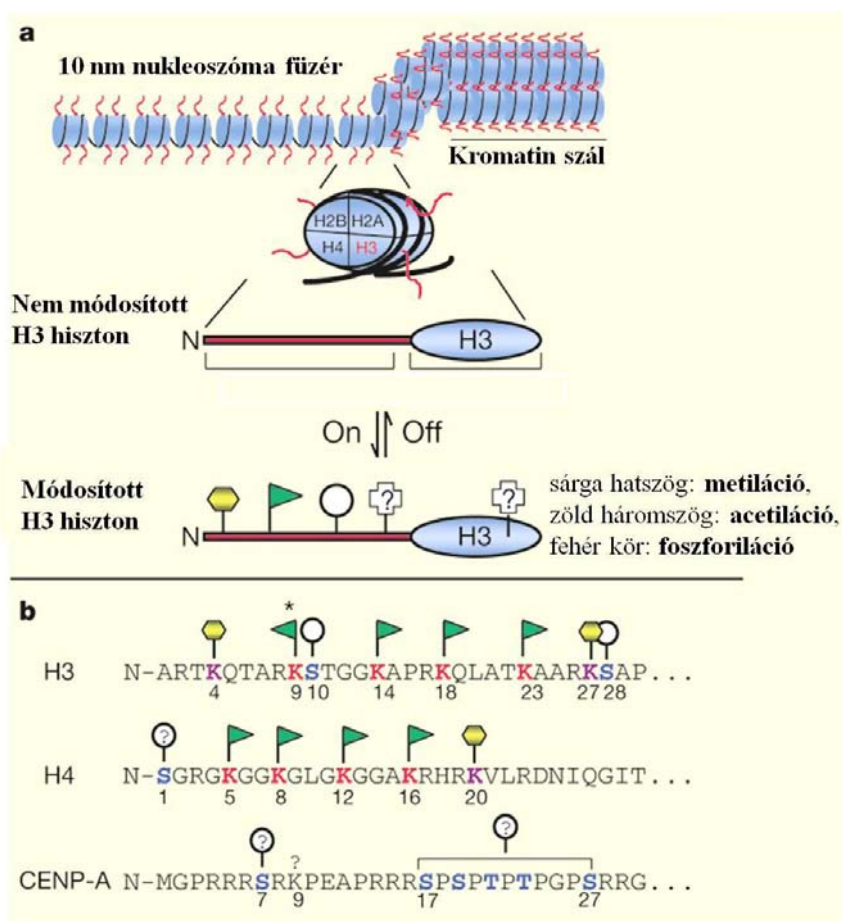
Hisztonvariánsok

A nukleoszómák magját kialakító hisztonfehérjékből álló oktamer kanonikus tagjai: 2-2 darab H2A, H2B, H3, H4. A nukleoszómák szerkezete a DNS-replikáció során alakul ki, ez a szerkezet azonban változhat. Az alap hiszton fehérjék kicserélődhetnek hiszton változatokra, valamint kovalens módosulásokon eshetnek át. Ezek a mechanizmusok hatással vannak a lokális kromatinszerkezetre, így jelentős szerepük van a génátírás szabályozásában.

A **H2A.Z** fehérje a H2A hiszton egyik változata, mely inaktív gének promóter régiójában fordul elő. Érdekes módon a H2A.Z hisztonváltozat nem a replikációkor épül be, hanem később egy kromatin remodeling komplex (SWR1) ATP-függő módon katalizálja a H2A hiszton kicserélését H2A.Z-re. Egy másik hisztonvariáns a CENP-A (10.11. ábra), melyet immunfluoreszcens festés alapján a centromer környékéhez kapcsolódó fehérjeként azonosítottak. A **CENP-A** egy H3 hisztonváltozat. A hiszton változatok egyedi, nukleoszómából kinyúló „farkai” lehetővé teszik egyedi regulátor fehérjék kötését (10.10. ábra).

Hisztonok kovalens módosítása

A kanonikus hisztonfehérjék poszttranszlációs kovalens módosítása befolyásolja a DNS-kötést. A módosulások reverzibilisek, s meghatározott aminosav oldalláncokon történnek, melyek közül leggyakoribbak: **acetiláció** és **metiláció** – lizin amino-csoportján, **foszforiláció** – szerin hidroxil-csoportján (10.11. ábra). Egy genomi régió működéséhez a hisztonmódosulások mintázata rengeteg információt rejt, ezért ezekre a mintázatokra használjuk a **hiszton-kód** elnevezést. A hisztonacetiláció elősegíti a transzkripciót, legalább kétféle mechanizmus által: 1) lazítja a hiszton–DNS kapcsolatot, mert csökkenti a hisztonfarok pozitív töltését, 2) befolyásolja a szabályozó fehérjék kötődését. Az acetilációért felelős hiszton-acetiltranszferáz (HAT) aktivitású fehérjék fokozzák, a hiszton-deacetilázok (HDAT) pedig mérséklék a transzkripciót.



10.11. ábra: A hisztonok kovalens módosítása (metiláció, acetiláció, foszforiláció) és hiszton változatok (például CENP-A) beépülése a nukleoszómába befolyásolja a kromatin szerkezeti és funkcionális sajátosságait

A legújabb kísérleti eredmények szerint (*Drosophila*-ban) DNS-replikációkor a szülői módosított hisztonok nem jutnak át a leány DNS-be. Ehelyett a DNS replikáció után új nukleoszómák szerelődnek össze a frissen szintetizált, módosítatlan hisztonokból. Úgy tűnik, hogy a hiszton módosító fehérjék képesek ellenállni a DNS-replikációs szerkezeten való áthaladásnak. Ott maradnak a kötőhelyükön megülve, és minden valószínűséggel később újra elvégzik a hisztonok módosítását, így véglegesítve a kromatin struktúrát, amely később a gének aktivációját vagy represszióját határozza meg.

Nukleoszóma-átépítés (remodeling)

Ismerünk olyan multiprotein komplexeket, melyek ATP hidrolíziséből származó energia felhasználásával képesek a nukleoszómák mobilizálására, átstrukturálására. Az átépítés pontos mechanizmusa nem ismert, feltételezhető, hogy a DNS és a hisztonok közötti kapcsolat felbontásával képesek a DNS irányított elcsúsztatására a hiszton-oktamer körül, vagy adott nukleoszóma hisztonjainak eltávolítására. Mindkét modell szerint a nukleoszómába csomagolt target DNS-szakasz hozzáférhetősége nő. Ma öt családba sorolják a remodeling fehérjéket. Legismertebb az SWI/SNF komplex, melynek első képviselőjét élesztőben írták le, majd sok más szervezetben is. A komplex tagjai interakcióba lépnek transzkripció faktorokkal, nukleáris mátrix fehérjékkel, centromer komponensekkel; fontos szerepük van a sejtciklus szabályozásában (a sejt-ciklus szabályozásában részt vevő gének transzkripcionális szabályozásában) és a kromoszóma-szerveződésben. A komplex humán ortológjai tumor-szupresszor gének, hibájuk a sejtosztódás kontrolljának felborulásához vezet.

10.3.2. DNS-metiláció

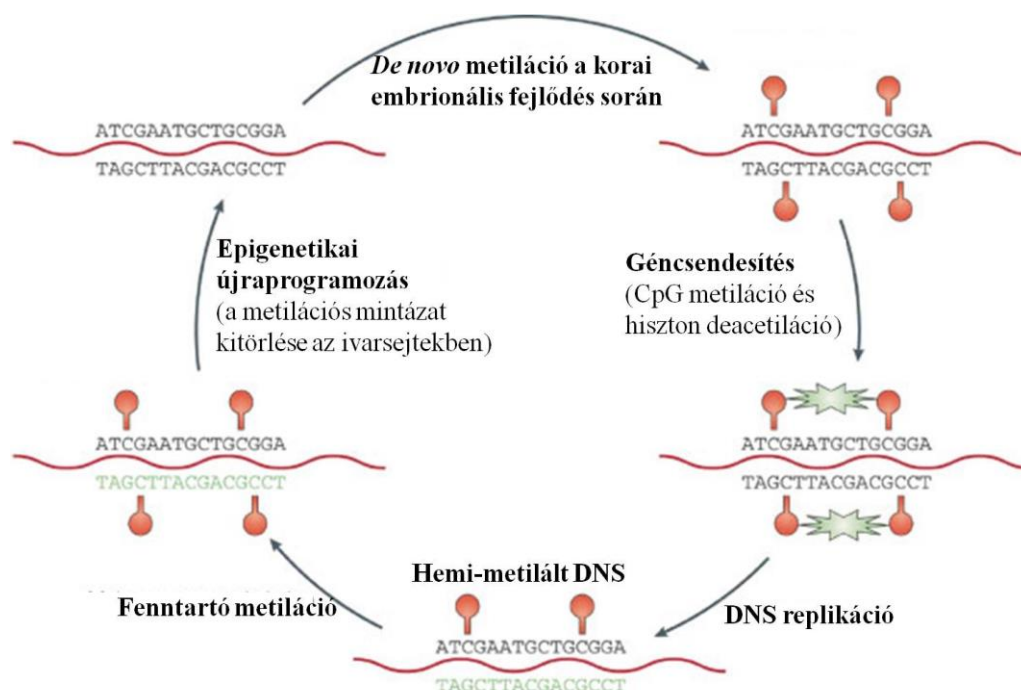
A DNS metilációs mintázata szintén epigenetikai jelenség (nem tévesztendő össze a hisztonok metilációjával). A metiláció a citozinbázisokon történik, 5-metil-citozin kialakulását eredményezve. Ez az epigenetikai jelenség gerinces állatokban és növényekben fordul elő. A citozinmetiláció a transzkripcionálisan nem aktív gének szabályozó régióira jellemző. Ebből következik, hogy a DNS-metiláció valószínűsíthetően gátolja a transzkripciót.

A citozinmetiláció az egymás melletti CG nukleotidoknál történik (a komplementer szálon is CG található 5'→3' irányban olvasva). Ez megmagyarázza a metilációs mintázat átörökítését a sejtosztódások során: ha a szülői DNS-szál metilált egy CG helyen, akkor az újonnan szintetizált DNS-szál citozinja is metilálódik az adott nukleotid párnál, DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimek által (10.12. ábra).

Közismert, hogy az 5-metil-citozinok mutációs forráspontként viselkednek (lásd Mutációk 8. fejezet), hiszen spontán dezaminációjuk timin kialakulásához vezet. Feltételezhető, hogy emiatt a CG szekvenciarszekciók nagy része az evolúció során „kikopott” a genomokból. Megmaradtak viszont azokon a részekben, melyeken regulációs szereppel bírtak, és emiatt szelekciós nyomás alá estek. Ma ezzel magyarázzák a gének szabályozó régióiban fennmaradt **CpG-szigeteket** (több CG szekvencia rövid szakaszon, a p a cukorfoszfát gerincet jelzi, utalva a C és G nukleotidok egymás melletti, egy szálon való elhelyezkedésére).

A DNS metilációja és a hisztonok módosulása gyakran együtt jár, s ma úgy látszik, hogy ezek egymást kiegészítő szabályozási formák. A metilezett DNS-szakaszokhoz jellegzetes fehérjék kötődnek. Ezekhez hiszton deacetilázok is kapcsolódhatnak, melyek tovább stabilizálják a gén inaktív állapotát (10.12. ábra). A metilcsoportok eltávolítása során rendszerint acetiltranszferázok is megjelennek, és segítik a nyitott kromatinszerkezet kialakítását.

Az ivarsejtek kialakulásakor a genomon „végigfut” egy demetilációs hullám, és az embrionális fejlődés során kialakul a *de novo* (újonnan képződő) metilációs mintázat a sejtekben, ami aztán a sejtosztódások során ún. fenntartó metilációval többnyire stabilan fennmarad (10.12. ábra). Ezen a területen még igen sok a megválaszolatlan kérdés, főként az embrionális epigenetikai újraprogramozás háttéréről tudunk keveset.



10.12. ábra: A DNS-metiláció egy epigenetikai jelenség, mely befolyásolja a kromatin szerkezetét és a gének kifejeződésének mértékét

A DNS-metiláció szerepet játszik a szülői imprintingben, az emlősök X-kromoszóma inaktivációjában, a centromer körüli kromatinrégiók kondenzált szerkezetének kialakításában. Szabálytalan metilációs mintázat rákos sejtekben is gyakori, például alapvetően kifejeződő tumorsuppresszor gének promóterének *de novo* hipermetilációja a gén csendesítéséhez vezet, ami ekvivalens az adott gén funkcióvesztéses mutációjával. A centromer régió DNS-ének hipometilációját is leírták bizonyos rákos sejtekben; ekkor a centromer szerkezetének megbomlása a genom instabilitásához vezet. A mozgó genetikai elemek (helyüket változtatni képes DNS-szakaszok) mozgásának visszaszorításában is igazolták a DNS-metiláció szerepét, tehát ezáltal ez a mechanizmus hozzájárul a genomi átrendeződések megakadályozásához.

10.3.3. Szülői imprinting

Az epigenetikai öröklődés különleges példája a szülői imprinting, ekkor adott gén aktivitása függ annak leszármazásától. Bizonyos autoszomális gének az általánostól eltérő öröklődési mintázatot mutatnak. Az *Igf2* gén például csak akkor fejeződik ki egérben, ha azt az egyed apjától örökölte. Erre az esetre az anyai imprintinget szenvedett (maternally imprinted) kifejezés használatos, mivel az anyától származó génpéldány inaktív. Az egér *H19* génje ezzel szemben apai imprintinget szenvedett. A jelenség következménye az, hogy noha fizikailag jelen van két példánya a kérdéses génnek, az imprintinget szenvedő génekre nézve az egyed hemizigótaként viselkedik. Az

imprintingben érintett gének molekuláris szintű vizsgálata megmutatta, hogy bizonyos citozinbázisaikon metilcsoportok vannak, és egyébként a gén szekvenciája nem változott. Mivel az egyik szülőtől örökölt allél inaktív, a másik szülőtől származó allél mutációja dominánsnak tűnik, holott az egyed funkcionális értelemben hemizigóta a génre nézve. Mai ismereteink szerint az imprintinget szenvedő gének száma az emberi genomban száz körüli.

Néhány humán genetikai betegség hátterében is imprintinget szenvedő gének vannak.

Az Angelman-szindróma (leírója Harry Angelman után, 1965) világszerte előfordul körülbelül 1:2000000 gyakorisággal. A betegség leírója „boldog babáknak” nevezte az érintett gyerekeket (jellemző tünetek a nevetés, szaggatott járás). 1987-ben írták le a betegséggel kapcsolatban a 15. kromoszóma egy kb. 4 Mbp-os szakaszának delécióját. Mára ismert, hogy ezen a szakaszon lévő, az ubikvitin-útvonalban részt vevő, *UBE3A* gén érintett a betegségben. A gén apai imprintinget mutat. Az Angelman-szindróma kialakulása az anyai allél deléciójának (az esetek 70%-a) vagy más mutációjának (az esetek 30%-ban) következménye.

Egy másik betegség, a Prader-Willi-szindróma szintén a 15. kromoszómán elhelyezkedő egyik gén (*SNRPN*) funkcióvesztésének eredménye. A betegek alacsonyak, enyhén szellemi fogyatékosak, izomtónusuk gyenge és kényszeres evők. Az *SNRPN* gén terméke az mRNS-splicingban vesz részt, anyai imprinting jellemzi. A szindróma tehát az apai génpéldány hiányának vagy hibájának következménye.

10.3.4. Az emlősök X kromoszóma inaktivációja

Emlősöknél az X kromoszóma dóziskompensációja (lásd még Az X kromoszóma inaktiváció című 2.4.3. szakaszban) azt jelenti, hogy az X két példányán lévő gének kifejeződése kiegyenlítődik a hímek egyetlen X kromoszómáján lévő gének dóziséval. A dóziskompensáció emlősökben a nőstények egyik X kromoszómájának inaktivációjával valósul meg. Minden egyes sejtben a fejlődés egy korai szakaszán az egyik X kromoszóma inaktiválódik, és ezt az állapotot minden utódsejtbe továbbörökíti. Az X kromoszóma az ovogenezis alatt aztán reaktiválódik.

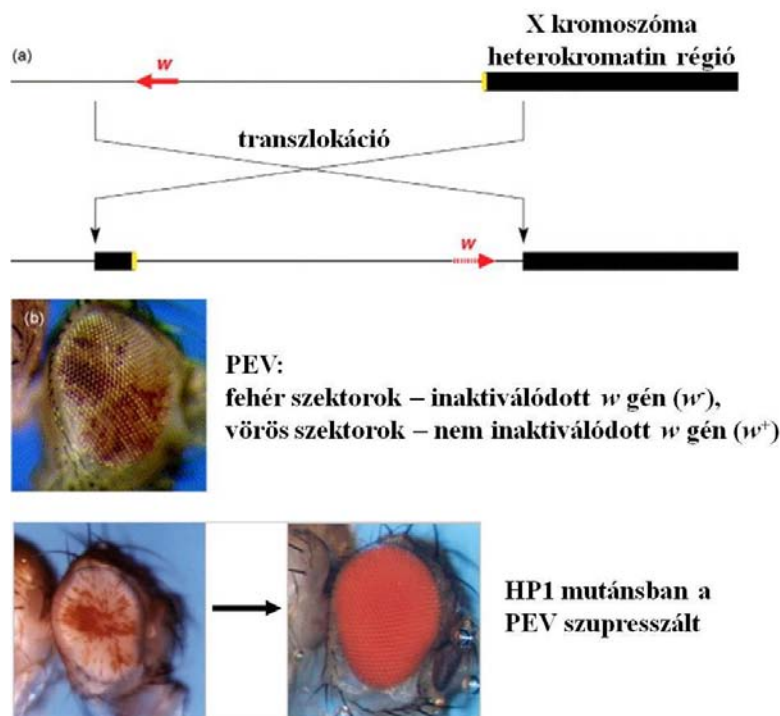
Az X-inaktiváció két tekintetben is hasonlít az imprintingre:

- Az X-inaktiváció nem mindig random. Az erszéyeseknél mindig az apai X inaktiválódik. Bizonyos sejt típusokban a méhlepényesekben sem véletlenszerű az inaktiváció: az amnion, a korion és a placenta, azaz az extraembrionális membránok sejtjeiben is az apai X inaktiválódik, és csak magában a kb. 64 sejtes, szűk értelemben vett embrióban random az inaktiváció.
- A korai sejtek minden utódja „emlékszik” a döntésre. A klonális természetű öröklődés miatt nagy, folyamatos szöveti szektorokban ugyanaz az X kromoszóma inaktív. A memória alapja lehet a metiláció: az inaktív kromoszóma jóval metiláltabb. Továbbá az inaktív X hisztonjai kevésbé acetiláltak. Egy speciális RNS, amit Xist-nek neveznek, nem kódol fehérjét, és az inaktív X-en szintetizálódik, egy inaktivációs centrumból kiindulva burkolja be az inaktív X-et. Hogy mennyiben járul hozzá a metiláció, hisztonacetiláció és a Xist-RNS-lokalizáció az X-inaktivációhoz, egyelőre kérdéses.

Megjegyezzük, hogy nem az egész X kromoszóma inaktiválódik, az ún. pszeudoautoszómális régió (az Y kromoszómával homológ szakasz) génjei mindkét X kromoszómán aktívak maradnak, és az inaktív blokkban is vannak aktív gének.

10.3.5. Pozíciófüggő variegáció

A jelenséget Hermann **Müller** írta le *Drosophilá*-ban még 1938-ban. (Müller volt az, aki elsőként végzett röntgen mutagenézis screen vizsgálatokat.) Felfigyelt olyan különleges mutánsokra, melyek összetett szemében fehér és piros szektorok váltakoztak. Kiderült, hogy a foltos szemű legyekben egy X kromoszóma szerkezeti változás van jelen: az X kromoszóma végi régió transzlokációval átkerült a centromer közelébe (10.13. ábra). Az átkerült szakasz tartalmazta a *white* gént (emlékezzünk vissza, hogy a gén mutációja fehér szemszínhez vezet). A fehér szektorok kialakulásának oka az, hogy bizonyos sejtekben a centromert alkotó heterokromatin szerkezet kiterjed a szomszédos régiókra, így a *white* gént tartalmazó transzlokálódott szakaszra, mely kromatinstruktúra a *white* gén inaktiválódásához vezet. A gén kifejeződése tehát nem mutáció hatására, hanem a kromoszómán elfoglalt pozíciójával változik meg (Erre utal a jelenség neve: pozíciófüggő variegáció, angol kifejezéssel position-effect variegation, rövidítve PEV). A heterokromatinizáció nem minden sejtcsoportban történik meg, ezért lesznek piros szektorok is a szemben (10.13. ábra). A felfedezés jelentőségét az adja, hogy PEV-fokozó és PEV-szupresszálo mutánsok segítségével egy sor olyan gént azonosítottak a *Drosophilá*-ban, melyek a heterokromatin kialakulását elősegítik vagy gátolják. Később kiderült, hogy a *Drosophilá*-ban azonosított fehérjék homológjai az eukarióta szervezetekben általánosan elterjedtek. A HP1 (heterokromatin protein 1) például egy H3 hiszton-specifikus metiltranszferáz, mely fontos a centromer és telomer régiók heterokromatin szerkezetének kialakításában. Mutációja *Drosophilá*-ban szupresszála a heterokromatin kiterjedését, azaz csökkentette a fehér szektorok mennyiségét a szemben (10.13. ábra).



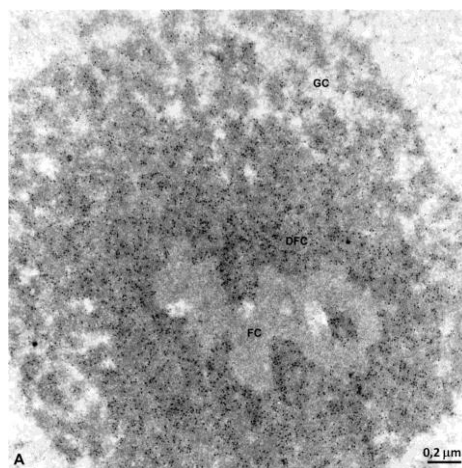
10.13. ábra: A pozíciófüggő variegáció (PEV) egy gén helyének megváltozásával járó génkifejeződés megváltozásából adódik

10.4. Általánosan és nagy mennyiségben előforduló RNS és fehérje molekulák termelődésének szabályozása

Sok molekulaosztály fehérjéi és RNS-ei nagy mennyiségben fordulnak elő minden eukarióta sejtben. Ide tartoznak például a hisztonok, a transzlációs apparátus molekulái, membrán komponensek. Ezen molekulák megfelelő számának fenntartására többféle stratégia ismeretes: folyamatos átíródás, gének ismétlődése (genetikai redundancia), gének extrakromoszómális amplifikációja.

A genetikai redundancia szép példái eukarióta sejtekben az rRNS-gének. Az emberi genom öt klaszterben (a 13, 14, 15, 21, 22 kromoszómákon) tartalmazza összesen 300–400 példányban azt a transzkripciós egységet, melyről a 18S, 28S és 5,8S rRNS keletkezik (lásd még Az eukarióta rRNS-ek érése [7.4.9.](#) szakaszban). Az 5S rRNS-gének nem a NO (nucleolus organizátor) régió részei, de szintén klaszterekben helyezkednek el a genomban. Az 5S rRNS gének száma emberben 2000 körüli. A hisztongének redundanciája ugyancsak megfigyelhető a legtöbb genomban.

A *Xenopus laevis* (Afrikai karmosbéka, fejlődésbiológiai modellszervezet) esetében és más kétéltűeknél a 40S rRNS transzkripciós egységéből az oocyta a testi sejteknél ezer-szer többet tartalmaz. Az oocyta magjában a kromoszómákból „elszabadult” extrakromoszómális sejtmagvacskák százai vannak, melyek a riboszómális gének gyűrszerű elrendeződéseiből állnak (10.14. ábra). Az amplifikáció részletei nem ismertek.



10.14. ábra: *Xenopus laevis* oocyta sejtmagjának elektronmikroszkópos felvétele. A fekete pöttyök az extrakromoszómális nukleóluszok (nukleolin antitest festés).

Bár nem tartozik szorosan a témához, itt említjük meg a **géncsaládok** létét. Számos példát ismerünk olyan géntöbbszöröződésre, amikor a másolat is működőképes marad, de mutációk következtében valamilyen mértékben megváltozik. Amennyiben a változások száma kicsi, és jellegük nem érinti alapvetően a fehérje szerkezetét, a gén eredeti funkciója egyáltalán nem vagy csak kis mértékben módosul. Több olyan enzim ismerünk (például laktát dehidrogenáz, aldoláz, kreatin kináz), amelynek génjei több változatban vannak jelen a genomban. Az egyes enzimváltozatok ugyanazt a reakciót katalizálják, de biokémiai tulajdonságaikban, szövetspecifitásukban lehet eltérés. Ezeket izoenzimeknek is nevezik. A véralvadásban szerepet játszó thrombin és a tripszin emésztő enzim génjének szekvenciája hasonló, és bizonyítható, hogy egyetlen

gén az idők folyamán módosult másolatairól van szó. Az azonos eredetű, szekvenciájukban nagyon hasonló gének összessége a géncsalád. A géncsalád tagjai többnyire egymás közelében helyezkednek el a kromoszómán.

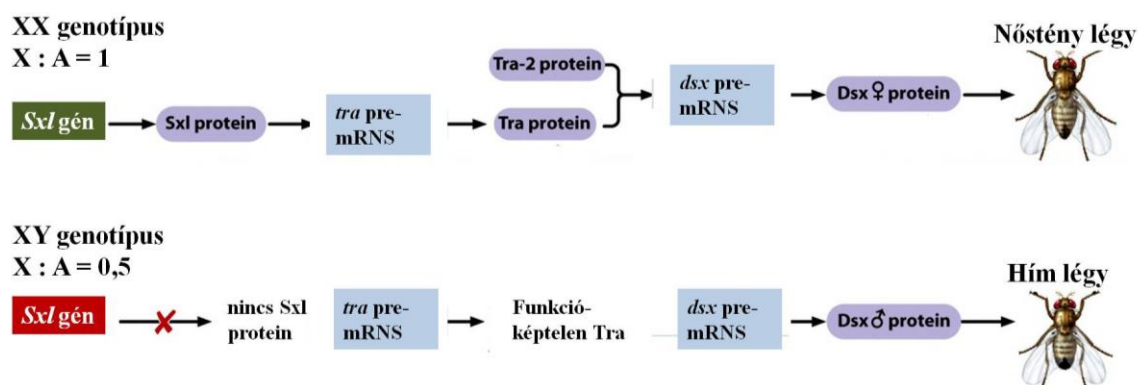
A génmásolatok az idők során olyan nagy mértékben is megváltozhatnak, hogy bár közös eredetük kimutatható, mégsem célszerű egyetlen család tagjaiként jelölni őket. Ha a homológ fehérjék aminosav szekvenciája 50%-nál nagyobb eltérést mutat, meg egyezés szerint szupercsaládról (gene superfamily) beszélünk. Az α -globulinok aminosavszekvenciája 50%-nál kisebb mértékben különbözik, ezért egyetlen géncsaládba tartoznak. A β -globulinok szintén azonos családba tartoznak. Az α -globulinok és a β -globulinok közötti különbség azonban már meghaladja az 50%-ot, így e két család (a mioglobinokkal) együtt egy szupercsaládot alkot.

10.5. Poszttranszkripcionális szabályozás

10.5.1. Differenciális mRNS-érés

Emlékezzünk vissza, hogy az eukarióta mRNS érik, azaz processzálódik: 5' végére cap, 3' végére poliA farok kerül, és a transzkriptum splicingon megy át. A differenciális (eltérő helyen történő) poliA farok hozzáadás különféle mRNS-eket eredményezhet ugyanabból a primér transzkriptumból. A splicing alternatív útjai szintén befolyásolják a géntermék funkcióját (lásd még A génkifejeződés molekuláris alapjai című 7.4.7. szakaszt).

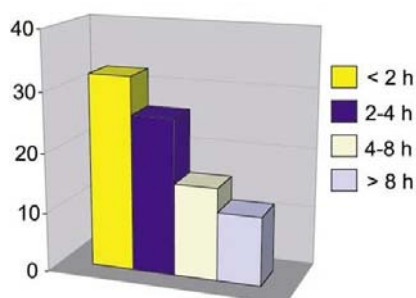
Az alternatív splicing szabályozás jól ismert példája a muslica ivarmeghatározása (10.15. ábra). Igazán érdekes „alternatív splicing kaszkád” határozza meg, hogy a zigóta X kromoszóma:autoszóma arányának függvényében miként fejlődik ki a hím vagy női egyed. A szabályozás első eleme egy olyan transzkripció faktor, mely dimert alkot az X kromoszómán kódolt és egy autoszómán kódolt alegységekből véletlenszerűen. A kombinációkat az egyszerűség kedvéért jelöljük a következőkkel: XX, AA és XA. Csak az XX dimer aktív transzkripció faktor (az XA és az AA inaktív), mely az *Sxl* (sex lethal) gén promóterét bekapcsolja. Ez akkor következik be, ha a muslicaembrió sejtjeiben az X:autoszóma arány 1 (két X kromoszóma van jelen). Az XX genotípusú embriókban a képződő *Sxl* fehérje egy másik gén, a *tra* (transformer) pre-mRNS-ének splice faktora. Az *Sxl* fehérje hatására a *tra* gén termékéről aktív, hiányában inaktív Tra fehérje képződik. A Tra fehérje maga is splice faktor, egy harmadik, a *dsx* (doublesex) gén termékének splicingját szabályozza. A Tra egy további gén (*tra-2*) termékével nőstényspecifikus Dsx fehérjét, Tra hiánya hím specifikus Dsx fehérje keletkezését eredményezi.



10.15. ábra: A *Drosophila* ivarmeghatározási rendszerében az alternatív splicing jelentős szerepet játszik

10.6. Az mRNS degradációjának szabályozása

Egy adott mRNS koncentrációja a citoplazmában nemcsak szintézisének rátájától, hanem stabilitásától is függ. A poliA farkak nélkül az mRNS-ek gyorsan degradálódnak. A poliA farkhoz kapcsolódó PABP (poliA binding protein) a cap-hez horgonyozza a poliA farkat, és ezzel védi az mRNS 5' végét. Az mRNS gyakori 5'→3' lebontását a poliA rövidítése, majd a cap eltávolítása előzi meg. Az mRNS-ek 3' UTR-ének szekvenciája befolyásolhatja annak féléletidejét. Egy rövid féléletidejű mRNS-osztály például az AUUUA szekvencia több példányát tartalmazza a 3' végén. A szekvencia átültetése stabilabb mRNS-ekbe azok féléletidejét lecsökkenti (10.16. ábra).



10.16. ábra: mRNS-ek féléletidejének függése a 3' UTR-ben jelen lévő AUUUA motívum számától

10.7. A gének kifejeződésének szabályozása kis RNS-ek által

Az utóbbi, körülbelül másfél évtized felismerése, hogy nem transzlálódó kis RNS-molekulák fontos génexpresszió-szabályozó szerepet töltenek be, szinte élővilágszerte. Legtöbb ismeretünk jelenleg az siRNS (small interfering, kis interferáló) és a miRNS (mikro) típusokról van. A kis RNS-ek köre az utóbbi évek felfedezései alapján tovább bővült (például piRNS – Piwi-interacting, rasiRNS – repeat-associated small interfering), és minden bizonnyal a sor nem szakad meg itt. Ez az izgalmas kutatási terület forradalmasította a génkifejeződés szabályozásáról szóló ismereteinket. Jelenlegi tudásunk szerint ezek a szabályozó kis RNS-ek a gének kifejeződését az alábbi pontokon befolyásolhatják:

- transzláció gátlása
- mRNS-ek degradációja
- transzkripció befolyásolása

A Science folyóirat 2002. decemberi számának címlapján ez áll: *New roles for RNAs. Breakthrough of the year*, vagyis RNS-ek új funkciója. Az év áttörése (10.17. ábra). Az RNS-féleségeket, melyekre a címlap utal, az 1990-es években fedezték fel két különböző kutatási területen, állati, illetve növényi rendszerben. Tekintsük át röviden ezeket a felfedezéseket!



10.17. ábra: 2002-ben a *Science* magazin a szabályozó RNS-eket tekintette az év tudományos áttörésének

Andrew **Fire** és Craig **Mello** 1998-ban publikálták azt az eredményüket, hogy találtak egy olyan mechanizmust *C. elegans* féregben, amellyel szelektíven ki lehet kapcsolni meghatározott géneket. A géncsendesítésnek (gene silencing) nevezett mechanizmust az embrióba injektált dupla szálú RNS-sel (dsRNS) érték el. A dupla szálú RNS-t *in vitro* szintetizálták, a vizsgált *unc-22* gén kódoló szálát (sense) és a komplementer (antisense) szálát is tartalmazta. A vad típusú féregembriókba injektált *unc-22* dsRNS az *unc-22* null mutánsokkal megegyező fenotípust (konkrétan izomdefektet) okozott. Vagyis egy gén szekvenciájának megfelelő dupla szálú RNS az adott gén kifejeződését meggátolja. A kérdés, hogy hogyan történik mindez, nyitva maradt. A két kutató 2006-ban felfedezésükért Nobel-díjat kapott.

David **Baulcombe** és csoportja leírta, hogy egy általuk létrehozott, vírus gént kifejező transzgenikus dohány növény rezisztens lett az adott vírussal szemben. Azt találták, hogy ezek a növények rövid, 25 nukleotid hosszúságú RNS-molekulákat termelnek, amelyek komplementerek a vírus genommal.

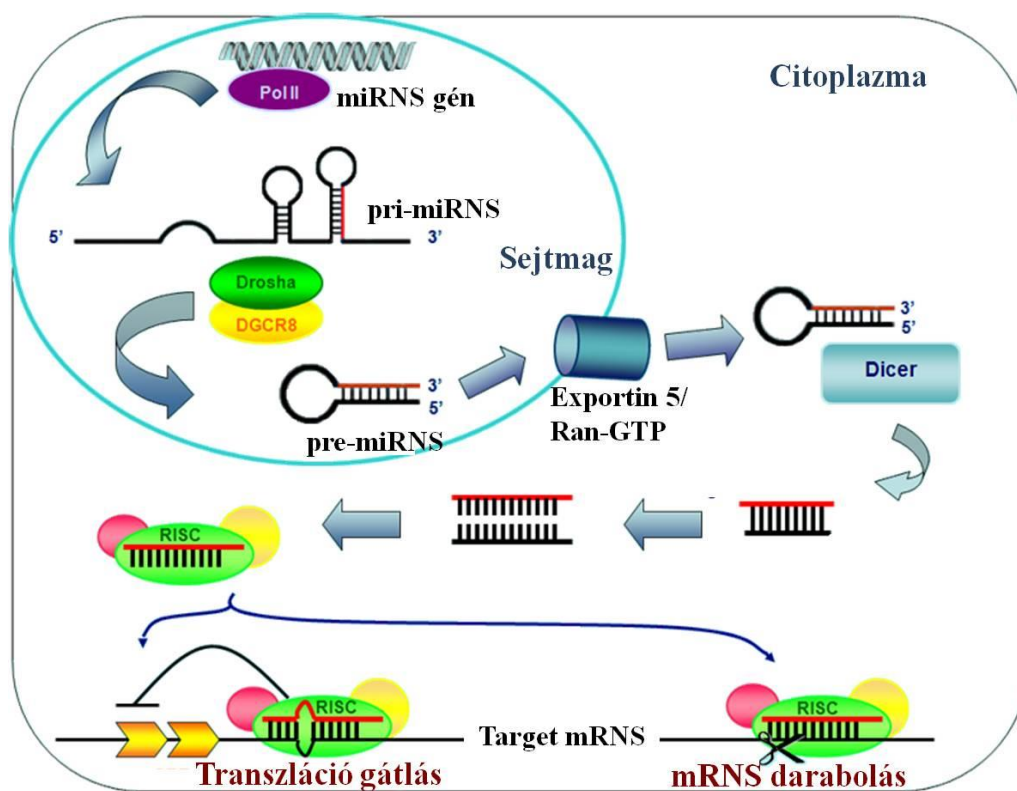
A rövid RNS-ek termelődését egy másik növényi kísérletben is kimutatták. Richard **Jorgenson** lila virágú petúnia növénybe vitte be egy saját gén extra kópiáját, a lila pigment termeléséért felelős enzim génjét. Meglepő módon, a transzgén (az extra kópia, melyet bejuttatott a növénybe) gátolta a lila pigment termelődését. Tehát a jelek arra utaltak, hogy a transzgén gátolta a saját és a vele megegyező endogén (a növényben eleve meglévő) gén kifejeződését.

Később kiderült, hogy a bemutatott növényi kísérletekben is dupla szálú RNS váltotta ki a géncsendesítést. A dsRNS úgy keletkezhetett, hogy a transzgén a növényi genomba random épültek be (ez a módszer sajátsága), és a beépülés környezetében lévő belső promóter(ek)-nek köszönhetően a transzgén mindkét szála átíródott. A keletkező két, egymással komplementer RNS-szál létrehozta a dsRNS-t.

A fenti eredmények közzlése után hamarosan kiderült, hogy egy közös, evolúciós értelemben ősi szabályozási mechanizmus áll a háttérben. Arra is fény derült, hogy ezt a mechanizmust nem csupán exogén (a sejtbe kívülről bejuttatott) nukleinsavak képesek aktiválni, ugyanis a sejtben képződő (endogén) kis RNS-ek is léteznek, melyek a génkifejeződés szabályozásának fontos szereplői. Ma úgy tartják, hogy a humán gének 60%-a áll miRNS-ek szabályozása alatt.

Az érett siRNS-ek és miRNS-ek keletkezési módjában és hatásmechanizmusában sok a közös elem, de eltérés is mutatkozik több ponton. Szerkezeti jellegzetességük, hogy érett formájuk körülbelül 21–26 nukleotidból áll. Prekurzor alakjaik kettős szálát alkotnak.

A miRNS-ek transzkripciójában az RNS-polimeráz II vesz részt. Először egy hajtűre emlékeztető, önmagában visszahajló prekursor, a primer-mikro-RNS (pri-miRNS) keletkezik. A kettős szálú RNS-re specifikus endoribonukleáz, a Drosha nevű enzimkomplex hasítja a pri-miRNS formát, létrehozva a körülbelül 70 nt hosszúságú pre-miRNS-t. Ez a forma jut ki a sejtmagból (az Exportin-5 által). A pre-miRNS végső átalakítását a Dicer ribonukleáz végzi: eltávolításra kerül a terminális hurok, és az egyik szál lebontásra kerül, így kialakul az egyszálú érett miRNS. A miRNS a citoplazmában beépül a RISC (RNS indukálta silencing komplex) nevű komplexbe, létrehozva a miRISC ribonukleoprotein komplexet. Kötődése a cél-mRNS-ekhez a RISC-kel kapcsolatosan történik meg. A kötődés leggyakrabban a cél-mRNS 3'UTR régiójánál történik. Általános szabálynak tűnik, hogy ha a miRNS teljesen komplementer a cél-mRNS egy szakaszával, akkor a cél-RNS a RISC által lebontásra kerül, ha pedig csak részben komplementer, akkor a cél-mRNS transzlációját gátolja (10.18. ábra). Állati sejtekben a transzláció-gátlás gyakoribb.



10.18. ábra: miRNS-ek keletkezése, érése és hatása

A siRNS-ek többnyire egyetlen mRNS-re specifikusak, és tökéletesen komplementerek a célszekvenciával. A siRNS-ek jellemzően a target mRNS enzimatisz degradációját (slicer aktivitás) idézik elő. Ez a klasszikus értelemben vett RNS-interferencia jelenség.

Az utóbbi évek felfedezése, hogy a kis RNS-ek a transzkripció csendesítésében is részt vesznek. Egyes eredmények szerint hozzájárulnak a kromatin metilációs mintázat módosításához, tehát az epigenetika kód megváltoztatásához. A *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőről írták le, hogy az RNS-interferencia útvonal elemeire szükség van a centromer régiók heterokromatinizációjának elindításához. Egy elkép-

zelés szerint a siRNS-t tartalmazó RITS (RNA-induced transcriptional silencing) komplex és az RNS-polimeráz II naszcens (éppen keletkező) transzkriptuma közötti kapcsolódás indítja el hisztonmódosító enzimek és/vagy DNS-metiltranszferázok megjelenését.

A miRBase adatbázisban (<http://www.mirbase.org>) számos taxonómiai csoport miRNS-eit gyűjtik össze. Az adatbázis jelenleg körülbelül 2000 humán miRNS-t tartalmaz. Bioinformatikai becslések szerint számuk a valóságban ennél sokkal nagyobb. Valószínűsítik, hogy a humán gének 30%-a miRNS-ek szabályozása alatt áll. A komplexitást növeli, hogy egy mRNS-t több miRNS is szabályozhat, egyes eredmények szerint kompetíció is felléphet a miRNS-ek között. Mai tudásunk arra utal, hogy a miRNS-ek általi szabályozás a génexpresszió finomhangolását jelenti. Ez az evolúciósan ősi mechanizmus (növényekben, valamint állatokban a gerincteleneken át az emlősökig jelen van) olyan alapvető sejtfunkciók szabályozásában vesz részt, mint például a sejtosztódás, sejthalál, sejt differenciálódás.

A miRNS-ek szerepe a daganatképződésben is nyilvánvalónak tűnik, amit napjaink kutatási eredményei alá is támasztanak. Számos dagantféleségben megváltozott miRNS-populációt írtak le. Célszerűnek tűnik a tumorképződéssel kapcsolatba hozható miRNS-eket az onkogének (a tumorgenezist elősegítő gének), illetve a tumorszuppresszor gének (a tumorgenezist gátló) egy-egy csoportjaként kezelni.

10.8. Transzlációs és poszttranszlációs szabályozás

Bizonyos gének kifejeződése a transzláció szintjén történik (ide sorolható a kis RNS-ek általi transzlációs szabályozás is, de most másféle mechanizmusra is fogunk látni példát).

Az emlősök vírusok elleni immunvédelméhez a T limfociták (T sejtek) nélkülözhetetlenek. A T sejtek a sejtciklus G0 állapotában keringenek. A vírus antigén megjelenése a T sejtek gyors osztódását, és nagy mennyiségű immunglobulin antitest termelését váltja ki. Az immunglobulin termelés beindulása nem igényli ezen fehérjék mRNS-szintézisének fokozódását. A folyamatot a transzláció-iniciációs faktorok hozzáférhetősége szabályozza.

Az inzulin okozta fehérjeszintézis-fokozódás során ugyancsak az inaktív formában lévő transzlációs iniciációs faktorok aktiválódnak. A folyamat foszforilációval válsul meg.

Az eIF2a iniciációs faktor számos stresszhatás (például oxidatív stressz, hipoxia, UPR – unfolded protein response, éhezés) folyamánaként foszforilálódik, ami a sejtben a transzláció globális leállításához vezet. A transzláció még számos ponton szabályozható, mely folyamatokra itt nem térünk ki. Az érdeklődők elmélyülését segíti a témában például az alábbi két írás:

<http://themedicalbiochemistrypage.org/protein-synthesis.php#geneticcode>

<http://www.cell.com/retrieve/pii/S0092867409000907>

A fehérjék poszttranszlációs módosításai tovább növelik a proteom (a sejtekben található fehérjék összessége) komplexitását. A fehérjék aktivitása transzlációjuk után többféle módon szabályozódhat. Enzimatisz modifikációjuk megváltoztathatja biológiai aktivitásukat. Klasszikus példái ennek az acetiláció és foszforiláció. A különféle polipeptidek közötti kölcsönhatások folytán létrejövő fehérjekomplexekben is változhat az egyes összetevők funkciója. A poszttranszlációs szabályozás részletesen tárgyalásra kerül a Biokémia II. tananyagban.

11. Felhasznált és ajánlott irodalom

Tankönyvek

Anthony J. F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, Sean B. Carroll: Introduction to genetic analysis, 9th edition. W. H. Freeman, 2007. ISBN-10: 0716768879, ISBN-13: 978-0716768876.

<http://bcs.whfreeman.com/iga9e/default.asp?s=&n=&i=&v=&o=&ns=0&uid=0&rau=0>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21766/> (7th edition, 2000. Szabadon hozzáférhető)

Robert F. Weaver, Philip W. Hedrick: Genetika. Szerk. Hajós né dr. habil Novák Márta. Panem Könyvkiadó, 2000. ISBN 9635452551.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter: Molecular Biology of the Cell, 5th edition. Garland Science, 2007. ISBN: 9780815341055.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/> (4th edition, 2002. Szabadon hozzáférhető)

William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino: Concepts of Genetics, 10th edition. Pearson Higher Education, 2011. ISBN-10: 0321732332, ISBN-13: 9780321732330

<http://www.pearsonhighered.com/product?ISBN=0321732332>

Nancy Trun, Janine E. Trempy: Fundamental Bacterial Genetics. Blackwell Publishing ISBN: 9780632044481

<http://www.blackwellpublishing.com/trun/> (Néhány fejezete, teljes ábraanyaga és animációi szabadon hozzáférhetők)

Szakkikkek

J. D. Watson and F. H. Crick: Molecular structure of nucleic acids, a structure for deoxyribose nucleic acid. 1953, Nature 171(4356):737-8.

<http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>

M. S. Meselson and C. M. Radding: A general model for genetic recombination. 1975, Proc Natl Acad Sci USA 72(1): 358–361.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC432304/>

Jack W. Szostak, Terry L. Orr-Weaver, Rodney J. Rothstein and Franklin W. Stahl: The double-strand-break repair model for recombination. 1983, Cell, [Volume 33, Issue 1](#), 25-35.

<http://www.cell.com/abstract/0092-8674%2883%2990331-8>

Dongsi Lu, Derril Willard, Indravadan R. Patel, Sue Kadwell, Laurie Overton, Tom Kost, Michael Luther, Wenbiao Chen, Richard P. Woychik, William O. Wilkison & Roger D. Cone: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. 1994, Nature 371, 799-802.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935841>

Dominic Wright, Henrik Boije, Jennifer R. S. Meadows, Bertrand Bed'hom, David Gourichon, Agathe Vieaud, Michèle Tixier-Boichard, Carl-Johan Rubin, Freyja Imsland, Finn Hallböök, Leif Andersson: Copy Number Variation in Intron 1 of SOX5 Causes the Pea-comb Phenotype in Chickens. 2009, PLoS Genet 5(6): e1000512. doi:10.1371/journal.pgen.1000512.

<http://www.plosgenetics.org/article/info:doi/10.1371/journal.pgen.1000512>

Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ.: An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. 1977, Cell 12(1):1-8.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/902310>

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. 1997, Nature 385(6619):810-3.

<http://life.nthu.edu.tw/~b851622/Biology/original%5B1%5D.htm>

Nahum Sonenberg and Alan G. Hinnebusch: Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. Cell, [Volume 136, Issue 4](#), 731-745, 2009.

<http://www.cell.com/retrieve/pii/S0092867409000907>

http://ac.els-cdn.com/S0092867409000907/1-s2.0-S0092867409000907-main.pdf?_tid=ea3703bc-56ce-11e3-9aae-00000aab0f6b&acdnat=1385493424_eb9aae4ca13c53857022c927c67626cf

Electronic scholarly publishing – Classical genetics. Klasszikus publikációk gyűjteménye (Mendel, Darwin, Galton, Weissmann, Bateson, Correns, Tschermak, Vries, Garrod, McClung, Sutton, Punnett, Morgan, Custle, Sturtevant, Bridges, Muller, McClintock, Creighton és mások)

<http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/browse/>

Elektronikus oktatási anyagok

Faye Murrin and Brian Staveley: Principles of Cell Biology (BIOL2060). Memorial University of Newfoundland, Department of Biology.

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

DNA from the beginning

<http://www.dnafb.org/>

[DNA Learning Center](#)

<http://www.dnalc.org/>

DNA Interactive

<http://www.dnai.org/>

GeneEd – Genetics, Education, Discovery

<http://geneed.nlm.nih.gov/index.php>

Scitable by Nature Education

<http://www.nature.com/scitable/ebooks#Genetics>

Learn Genetics – Genetic Science Learning Center

<http://learn.genetics.utah.edu/>

National Human Genome Research Institute – Education

<http://www.genome.gov/Education/>

Michael King: The Medical Biochemistry Page

<http://themedicalbiochemistrypage.org/index.php>

Kabai Péter: Genetika online

<http://www.behav.org/GENE/default.htm>

Adatbázisok, egyéb linkek

The miRNA database

<http://www.mirbase.org>

Plant Transcription Factor database

<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>

Animal Transcription Factor database

<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB>

The official web site of the Nobel Prize

<http://www.nobelprize.org/>

Mendel múzeum, Brno

<http://www.mendel-museum.com/>

Információk a humán genomról

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/StatsTable

12. Ábrák jegyzéke és forrása

1.1. ábra: Johann Gregor Mendel apáti öltözékben (posztumusz portré)

<http://www.mendel-museum.com/eng/1online/>

1.2. ábra: Genetikai modellszervezetek (felső sor balról jobbra: fágok, kukorica, laboratóriumi fonalféreg, zebradánió; alsó sor: baktériumok, egér, muslica, lúdfű).

<http://www.bacteriophagetherapy.info/ECF40946-8E2F-4890-9CA6-D390A26E39C1/9D10A630-EEB1-46C5-BEFD-04883AAD7C2A.html>

<http://www.pcsd.k12.ny.us/bwoods/AP%20Biology/Special%20Projects/Drosophila%20Pictures.shtml>

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aquaria_Danio_rerio-science_institute_02.jpg

<http://tuebingen.mpg.de/en/homepage/detail/how-plants-put-down-roots.html>

<http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Nematology/Research/Genetic-variation-in-C.-elegans.htm>

<http://www.sacredearth.com/ethnobotany/plantprofiles/corn.php>

<http://brainwindows.wordpress.com/2008/10/08/2008-nobel-prize-in-chemistry-to-gfp/>

1.3. ábra: A vad típusú és két szemméret mutáns muslica reakciónormája

<http://www.biologie.uni-halle.de/entwicklungsgenetik/lehre/studenten/drosophila/mutanten/?lang=en>

2.1. ábra: A sárga és zöld magszín öröklődésének szemléltetése

2.2. ábra: Egy tulajdonságpár öröklődése és magyarázata

2.3. ábra: Interfázisos kromoszómák által elfoglalt territóriumok csirke diploid sejtmagban (az egyes homológokat eltérő fluoreszcens festés jelöli)

http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n4/fig_tab/nrg0401_292a_F2.html

2.4. ábra: A kromatin szerveződése

2.5. ábra: A mitózis és meiózis szerepe állat, növény és gomba szervezetekben

2.6. ábra: A mitózis és meiózis áttekintése

2.7. ábra: Az X kromoszóma inaktiváció mozaikos fenotípust okoz

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

2.8. ábra: Cikk-cakk öröklésmenet a muslica X nemi kromoszómáján lévő white gén példáján

3.1. ábra: Két tulajdonságpár öröklődése Mendel kísérletében

3.2. ábra: Egy dihibrid öröklésmenet szemléltetése Punnett táblázattal

3.3. ábra: Mendel második törvénye szexuálisan szaporodó haploid eukariótákra is alkalmazható

3.4. ábra: A villás elágazás módszerének alkalmazása utódok geno- és fenotípusának becslésére

3.5. ábra: Beltenyésztés során a heterozigóták aránya generációról generációra csökken, a homozigóták aránya pedig nő

3.6. ábra: Egy négyszeresen homozigóta növényvonal nemesítési sémája

3.7. ábra: Hibrid kukorica (középen) a két beltenyésztett szülői vonallal (két szélén)

http://www.sciencenews.org/view/access/id/49813/description/HYBRID_VIGOR

<http://maizeandgenetics.tamu.edu/hybridvigort.htm>

3.8. ábra: Két gén független öröklődésének magyarázata a kromoszómák szintjén

4.1. ábra: Néhány példa (1., 2., 3., 4.) allélpárok elrendeződésére egy homológ kromoszómapáron (kék az egyik, piros a másik homológ; A, B, C és D négy lókuszt)

4.2. ábra: Thomas Hunt Morgan és Alfred H. Sturtevant a „fly room”-ban

<http://www.benchfly.com/blog/model-organism-week-drosophila-melanogaster-the-fruit-fly/>

<http://www.caltech.edu/content/first-genetic-linkage-map>

4.3. ábra: A kapcsolt gének alléljai nagy gyakorisággal együtt öröklődnek. Új allélkombinációk a homológok közötti szakaszok kicserélődésével jöhetnek létre.

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

4.4. ábra: A homológok közötti szakaszcsere citológiai igazolása kukorica kromoszómán

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

4.5. ábra: Kiazmák a homológok között

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

4.6. ábra: A homológ rekombináció Holliday modellje

4.7. ábra: Két lókuszt közötti crossing over (cr.o.) átlagosan 50% rekombináns terméket eredményez

4.8. ábra: Kétpontos térképezés kísérleti sémája

4.9. ábra: Hárompontos térképezéssel egyszerre három gén egymáshoz viszonyított távolságát és sorrendjét lehet meghatározni

4.10. ábra: A *Drosophila melanogaster* kapcsoltsági géntérképe

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

4.11. ábra: Árpa kapcsoltsági térképe (hét kromoszóma, bal oldalon a térképtávolság cM egységekben megadva, sárgával kiemelve a morfológiai markerek, a többi molekuláris marker)

<http://croptechology.unl.edu/pages/printinformationmodule.php?idinformationmodule=1087488148>

4.12. ábra: Az egér 16-os kromoszómájának egy kevesebb, mint 1 cM-nyi szakasza.

A régióban számos gén és molekuláris marker található (kék színnel jelölve). Az eredeti tárhelyen az egyes gének részletes adatait megtaláljuk

(<http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=16>).

Jobb oldalon fekete betűkkel a humán ortológok és azok kromoszómális lokalizációja van feltüntetve.

<http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=16>

<http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=16&midpoint=10.74&cmrange=1.0&dsegments=1&syntenics=0>

<http://www.informatics.jax.org/searches/linkmap.cgi?chromosome=16&midpoint=10.74&cmrange=1.0&dsegments=1&syntenics=0>

5.1. ábra: Inkomplett dominancia

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

5.2. ábra: Az emlősök bundaszínét a C gén számos allélja befolyásolja

5.3. ábra: Sárga (A^YA) és vad típusú (AA) egerek

<http://ponderingsofepigenetics.blogspot.hu/2011/11/fat-yellow-mice-and-identical-twins.html>

5.4. ábra: Farkatlan manx macska

<http://thecatpictures.onsugar.com/date/2011/7/8>

- 5.5. ábra:** 100% penetrancia (minden egyed foltos) és változó expresszivitás (foltosság mértéke egyedenként változó) szemléltetése kutyákon
<http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=5196>
- 5.6. ábra:** A „lila pigmentáltság erőssége” szemlélteti a penetranciát és az expresszivitást. Minden ovális egy egyedet képvisel, és minden egyed azonos genotípusú.
- 5.7. ábra:** Csirke tarajformák
- 5.8. ábra:** Komplementer génhatás egy reakciósor két tagjánál
- 5.9. ábra:** A redundáns gének termékei azonos funkcióval rendelkeznek
- 5.10. ábra:** Recesszív episztázis egy reakciósor tagjai között
- 5.11. ábra:** W allél domináns episztázisa D gén felett
- 5.12. ábra:** Auxotrófok kiválogatása
- 5.13. ábra:** Aminosav auxotrófok kiválogatása
- 5.14. ábra:** Arginin auxotrófok kiválogatása
- 5.15. ábra:** Az 1:1 arányú hasadás igazolja, hogy egyetlen gén mutációja okozza az arginin auxotrófiát
- 5.16. ábra:** Az arginin auxotrófok komplementációs csoportokba sorolásának kísérleti vázlata
- 5.17. ábra:** Az arginin és két rokonvegyület, az ornitin és citrullin szerkezeti képlete
- 5.18. ábra:** Az arginin bioszintézis útvonal elemeinek sorbarakása
- 5.19. ábra:** C. elegans vulvaless, vad típusú és multivulva egyedei (fentről le)
http://www.nematodes.org/teaching/retired_teaching/devbio3/NVD_lecture.html
- 5.20. ábra:** A C. elegans vulvájának kialakulása
http://www.wormbook.org/chapters/www_vulvaldev/vulvaldev.html
- 5.21. ábra:** Kettős mutánsok fenotípusának megállapítása
- 5.22. ábra:** Egy jelátviteli útvonal elemeinek sorbarendeze a mutáns fenotípusok alapján
- 5.23. ábra:** A jelátviteli útvonal elemek közötti aktiválási és gátlási viszonyok megállapítása
- 5.24. ábra:** A vulvafejlődést egy konzervált jelátviteli útvonal szabályozza
http://www.nematodes.org/teaching/retired_teaching/devbio3/NVD_lecture.html
- 5.25. ábra:** Kloroplaszt gének citoplazmatikus öröklődése
- 5.26. ábra:** Variegált fenotípusú csodatölcsér növény
<http://davesgarden.com/community/forums/fp.php?pid=8107415>
- 6.1. ábra:** Watson és Crick modellalkotás közben
<http://web.chem.ucsb.edu/~kalju/CSUPERB/public/tutorial/intro.html>
- 6.2. ábra:** A DNS elsődleges (jobbra) és másodlagos (balra) szerkezete
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 6.3. ábra:** A DNS térkitöltő modellje
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 6.4. ábra:** A szemikonzervatív replikáció bizonyítása baktériumban
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 6.5. ábra:** E. coli cirkuláris kromoszóma θ replikációja
- 6.6. ábra:** A DNS szál szintézise 5' $\rightarrow$ 3' irányban történik
- 6.7. ábra:** Az eukarióta kromoszómák replikációja több origóból indul
 balra: sematikus ábrázolás, jobbra: elektronmikroszkópos felvétel
<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>
- 6.8. ábra:** A replikációs villában egyik szál szintézise folyamatos, a másik szálé szakaszos
- 6.9. ábra:** Primáz, primer, ligáz szerepe a replikációban

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

6.10. ábra: A replikáció áttekintése

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

6.11. ábra: A két új szál szintézise egyetlen pol III dimer által, az elmaradó szál templátjának kihurkolódásával valósul meg

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

6.12. ábra: A replikáció alatt azonnali hibajavítás működik (proof-reading repair)

6.13. ábra: Lineáris DNS molekulák végreplikációs problémája

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

6.14. ábra: A telomer szerkezete, és újjáépülése a telomeráz komplex által

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

6.15. ábra: Kromoszóma „a fodrásznál”

http://www.scilogs.com/stripped_science/

7.1. ábra: A DNS mindkét szála szolgálhat genetikai kódként

7.2. ábra: Egy szakaszon a DNS egyik és másik szála eltérő kódot jelent, eltérő RNS szekvenciát határoz meg

7.3. ábra: A transzkripció áttekintése

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.4. ábra: Az E. coli RNS-polimeráz σ^{70} -faktor által felismert promóterek konszenzus szakaszai

7.5. ábra: RNS szintézisnél a DNS kettős hélix lokálisan felnyílik (transzkripciós buborék)

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.6. ábra: Intrinsic (ρ -független) transzkripció termináció

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.7. ábra: Transzkripció iniciáció eukariótákban

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.8. ábra: Capping – az RNS 5' végi módosítása

7.9. ábra: Poliadeniláció – az RNS 3' végi módosítása

7.10. ábra: Az exonok közé ékelődő intron szakaszok az érés során kivágódnak

7.11. ábra: A gén és a róla képződött érett mRNS hibridizációjakor a DNS molekula intron szakaszai kihurkolódnak, mert az érett mRNS-ben nincs homológ szakaszuk

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.12. ábra: Egy génről egyszerre több RNS transzkriptum képződik, ez mikroszkóposan fenyőfára emlékeztető struktúraként jelenik meg (a „fa teteje” a gén elejének, „alja” a gén végének felel meg, egyre hosszabb „ágakkal”, vagyis leváló transzkriptumokkal). A splicing ko-transzkripcionálisan zajlik, ez a bal oldali felvételen megfigyelhető.

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.13. ábra: A splicing folyamatának áttekintése

7.14. ábra: A splicing két egymást követő transzészterifikálási reakcióval valósul meg

7.15. ábra: Alternatív splicing formák

7.16. ábra: Egy tRNS prekursor és érett formája

7.17. ábra: Eukarióta rRNS-ek érése

7.18. ábra: A gén és fehérje közötti kolinearitás igazolása Yanofsky kísérletében

7.19. ábra: A kódszótár

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

7.20. ábra: Prokarióta riboszóma sematikus ábrázolása a kötött mRNS-sel és a növekvő peptidlánccal

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

- 7.21. ábra:** Prokarióta riboszóma nagyfelbontású szerkezeti modellje (fent). Antibiotikumok, melyek a peptidlánc kivezető csatornánál (exit tunel) blokkolnak (lent).
http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/home.html
- 7.22. ábra:** tRNS másodlagos és harmadlagos szerkezete
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 7.23. ábra:** Aminoacil-tRNS szintézise
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 7.24. ábra:** A kodon–antikodon kapcsolódásban „lötyögés” is előfordul
- 7.25. ábra:** Prokarióta (monocisztronos) és érett eukarióta mRNS-ek szerkezete
- 7.26. ábra:** A transzláció lépéseinek áttekintése
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 7.27. ábra:** Transzláció iniciáció (prokarióta)
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 7.28. ábra:** Transzláció elongáció
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 7.29. ábra:** Transzláció termináció
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 8.1. ábra:** Sárga-fekete mozaikos Labrador retriever (lent) és szülei (fent)
http://www.ashgi.org/color/Aussie_somatic_mutations.html
<http://greenstonelabradors.com/understanding-mismarks-in-the-purebred-labrador/>
<http://www.wallpaperswala.com/labrador-retriever/>
- 8.2. ábra:** Mutációs ráta (1/7) és mutációs gyakoriság (1/4) szemléltetése
- 8.3. ábra:** A fluktuációs teszt kivitelezése
- 8.4. ábra:** A fluktuációs teszt eredményének magyarázata
- 8.5. ábra:** Replikázással igazolható, hogy a fágrezisztenciát okozó mutáció spontán, a fággal való találkozás előtt létrejön a baktériumokban
- 8.6. ábra:** A bázisok normál és ritka tautomer formáinak párosodása
- 8.7. ábra:** Ismétlődéseket tartalmazó szekvenciák replikációjánál a szálak elcsúszása inszercióhoz vagy deléciohoz vezethet
- 8.8. ábra:** Az etídium-bromid interkalációja két szomszédos bázispár közé torzítja a kettős spirál szerkezetét, és ez zavart okoz a replikáció során
- 8.9. ábra:** Fehérjekódoló gének kódoló régióját érintő pontmutációk típusai
- 8.10. ábra:** A pontmutációk megváltoztathatják a gén exon-intron szerkezetét
- 8.11. ábra:** Az Ames-féle mutagenitási teszt alapja
- 8.12. ábra:** Ames teszt továbbfejlesztett változata
- 9.1. ábra:** A β -galaktozidáz enzim a laktózt galaktózra és glükózra hidrolizálja
- 9.2. ábra:** A lac operon felépítése és negatív szabályozása
<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>
- 9.3. ábra:** A szabályozható lac promóter és környezetének szerkezete szekvencia szinten
- 9.4. ábra:** A LacI represszor tetramerként kötődik a tükörszimmetrikus szekvenciájú operátor régióhoz
- 9.5. ábra:** A sejtek két cukorforrás közül előbb a glükózt fogyasztják
- 9.6. ábra:** A cAMP-CRP komplex a kötőhelyének és a promóter távolságának függvényében kétféleképpen segítheti a transzkripció iniciációt
- 9.7. ábra:** A cAMP-CRP komplex tükörszimmetrikus szekvenciához kötődik
- 9.8. ábra:** A β -galaktozidáz enzim két kromogén szubsztrátja (X-gal, ONPG) és a lac promóter kiváló indukálószer (IPTG)

9.9. ábra: A trp operon negatív szabályozása a represszor fehérje és a triptofán mint korepresszor által

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

9.10. ábra: A trp operon szabályozása attenuációval

a) a leader mRNS szerkezete

b) és c) a leader mRNS szekvenciája és a transzkripció terminációs szabályozás szemléltetése

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

10.1. ábra: Dolly, az első klónozott emlős „egyik mamájával”

<http://life.nthu.edu.tw/~b851622/Biology/original%5B1%5D.htm>

10.2. ábra: Az eukarióta gének transzkripcionális szabályozása az egyszerűbb mechanizmusoktól a komplex szabályozási rendszerekig valósulhat meg

a) Egy eukarióta sejt egyszerű transzkripcionális génszabályozási rendszere

b) Egy többsejtű eukarióta szervezet génszabályozási elemei (részletek később a szövegben)

<http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/>

10.3. ábra: Egy eukarióta gén szerkezete a magpromóterrel és promóter proximális elemekkel

10.4. ábra: Az enhancerhez kötődő aktivátor fehérjék távolba hatása a DNS meghajlása révén valósul meg

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

10.5. ábra: A Drosophila Antennapedia mutánsa egy transzkripciós faktor génben hibás

10.6. ábra: Transzkripciós faktorok DNS-kötő doménjeinek szerkezete

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>

10.7. ábra: Állati szervezetek transzkripciós faktor adatbázisában jelenleg fellelhető transzkripciós faktorok (TFs), kofaktorok (CoFs) és kromatin remodeling faktorok (CRFs) száma taxonómiai egységenként

<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB>

10.8. ábra: Növényi szervezetek transzkripciós faktor adatbázisában jelenleg fellelhető transzkripciós faktor és más transzkripcionális regulátor (kofaktorok, kromatin remodeling faktorok) családok

<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>

10.9. ábra: Egy gén szövetspecifikus transzkripciója a szabályozó transzkripciós faktorok jelenlététől és aktivitásától függ

10.10. ábra: A kromatin szerkezetét befolyásoló epigenetikai jelenségek

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromatin-remodeling-in-eukaryotes-1082>

10.11. ábra: A hisztonok kovalens módosítása (metiláció, acetiláció, foszforiláció) és hiszton változatok (például CENP-A) beépülése a nukleoszómába befolyásolja a kromatin szerkezeti és funkcionális sajátosságait

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromatin-remodeling-in-eukaryotes-1082>

10.12. ábra: A DNS metiláció egy epigenetikai jelenség, mely befolyásolja a kromatin szerkezetét és a gének kifejeződésének mértékét

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromatin-remodeling-in-eukaryotes-1082>

10.13. ábra: A pozíció-függő variegáció (PEV) egy gén helyének megváltozásával járó génkifejeződés megváltozásából adódik

<http://www.biology.wustl.edu/faculty/elgin/hp1&hp2.html>

10.14. ábra: *Xenopus laevis* oocyta sejtmagjának elektronmikroszkópos felvétele. A fekete pöttyök az extrakromoszómális nukleóluszok (nukleolin antitest festés).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171376>

10.15. ábra: A *Drosophila* ivarmeghatározási rendszerében az alternatív splicing jelentős szerepet játszik (részletek a szövegben)

10.16. ábra: mRNS-ek féléletidejének függése a 3' UTR-ben jelen lévő AUUUA motívum számától

10.17. ábra: 2002-ben a Science magazin a szabályozó RNS-eket tekintette az év tudományos áttörésének

10.18. ábra: miRNS-ek keletkezése, érése és hatása

érvényesek a kétszeresen heterozigóta F1 egyedek ivarsejtképzésekor. Mivel az egyik (*sd1*) illetve a másik (*se1*) lókuszt hordozó két homológ kromoszómapár egymástól függetlenül viselkedik a meiózis során, az általuk hordozott lókuszhoz tartozó allélpárok is egymástól függetlenül szegregálódnak az ivarsejtekbe.

Ebben a fejezetben láthatjuk, hogyan ismerhetjük fel a független öröklődést, illetve azt, hogy a független öröklődés szabályszerűségeinek ismerete miként hasznosítható törzsek létrehozásában, akár a mezőgazdasági nemesítésben, akár az alap kutatásban.

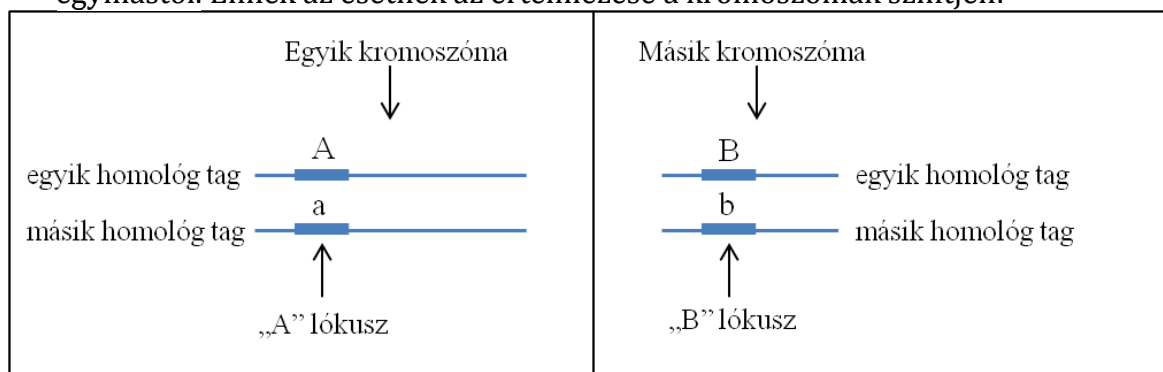
Mielőtt ismertetjük Mendel második, a független öröklődés törvényéhez vezető kísérleteket, ismerkedjünk meg néhány fontos genetikai jelöléssel!

Ha egy diploid szervezet genotípusának leírásakor két (vagy több) gént tüntetünk fel, akkor:

- Pontosvesszőt teszünk az allélpárok közé, ha a gének különböző kromoszómákon helyezkednek el, például:

$$A/a; B/b$$

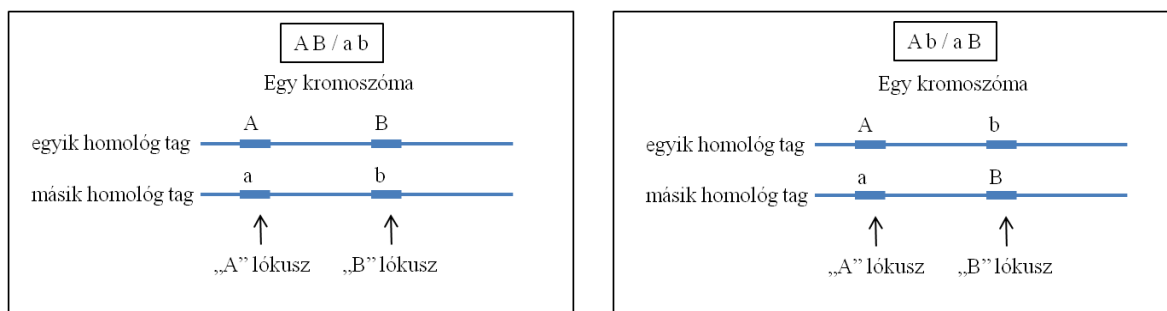
Egy allélpárt, mint azt korábban ismertettük, egymástól törtvonallal („perjellel”) választunk el. A perjel lényegében egy homológ kromoszómapár tagjait választja el egymástól. Ennek az esetnek az értelmezése a kromoszómák szintjén:



- Ha a szóban forgó két lókusztól tudjuk, hogy azonos kromoszómán helyezkednek el, akkor a gének egyik allélját a perjel egyik oldalára sorba írjuk, a gének másik allélját pedig a perjel másik oldalára, például:

$$A B / a b \quad \text{vagy} \quad A b / a B$$

Vegyük észre, hogy bár mindkét fenti genotípus *A* és *B* gén tekintetében heterozigóta, a két jelölés mégis megmutat egy lényeges különbséget a két genotípus között: azt, hogy a két gén alléljait milyen kombinációban hordozza az egyik, illetve a másik homológ kromoszóma tag. A fenti két esetet sematikusán, a kromoszómák szintjén az alábbiak szerint ábrázolhatjuk:



A továbbiakban fontos lesz, hogy ezt a jelölésmódot értelmezni és alkalmazni tudjuk.

- Ha a keresztezés felírásakor nem tudjuk, hogy két gén különböző vagy azonos kromoszómán helyezkedik-e el, akkor egy ponttal választjuk el a két allélpárt, például:
 $A/a \cdot B/b$

Ahogy egy génre nézve heterozigóta egyedet (A/a) **monohibrid**nek is nevezhetünk, úgy két génre nézve heterozigóta egyed pedig ($A/a \cdot B/b$) a **dihibrid**. A dihibrid keresztezés két tulajdonságpárra nézve heterozigóta egyedek keresztezését (vagy dihibrid egyed önmegtermékenyítését) jelenti.

3.1. Mendel II. törvénye: a független öröklődés törvénye

A legtöbb keresztezésben, melyet Mendel a veteményborsóval végzett, két tulajdonságpárban különböző tiszta vonalakból indult ki, vagyis két jelleget vizsgált egyszerre. Szerencsés módon, a Mendel által vizsgált jellegek háttérében álló gének egymástól függetlenül öröklődtek (különböző kromoszómán, vagy egy kromoszómán távol helyezkedtek el a lókusztok, lásd még a Kapcsoltságról szóló [4.](#) fejezetben). Ez tette lehetővé, hogy Mendel felismerje azt a genetikai törvényszerűséget, mely két függetlenül öröklődő génre érvényes.

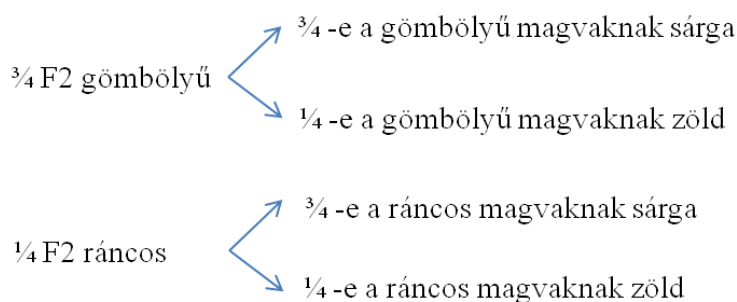
Az első, Mendel által együtt vizsgált két tulajdonságpár a borsószem színe (sárga vagy zöld) és a borsószem alakja (gömbölyű vagy ráncos) volt. Korábban már láttuk, hogy a sárga és a zöld szemszín esetén a sárga dominál a zöld felett (emlékeztetőül: Y/Y sárga $\times y/y$ zöld $\rightarrow F_1 Y/y$ mind sárga), a monohibrid keresztezés ($Y/y \times Y/y$) utódai között pedig 3:1 fenotípusarányban keletkeznek sárga és zöld magok (3 $Y/-$: 1 y/y).

A szem alakjának öröklődését önmagában vizsgálva Mendel hasonló eredményt kapott. A domináns fenotípus a gömbölyű, a recesszív pedig a ráncos, és az F_2 -ben 3:1 gömbölyű:ráncos arányt kapott.

Nézzük, mi történik a két jelleg együttes vizsgálatakor (3.1. ábra)!

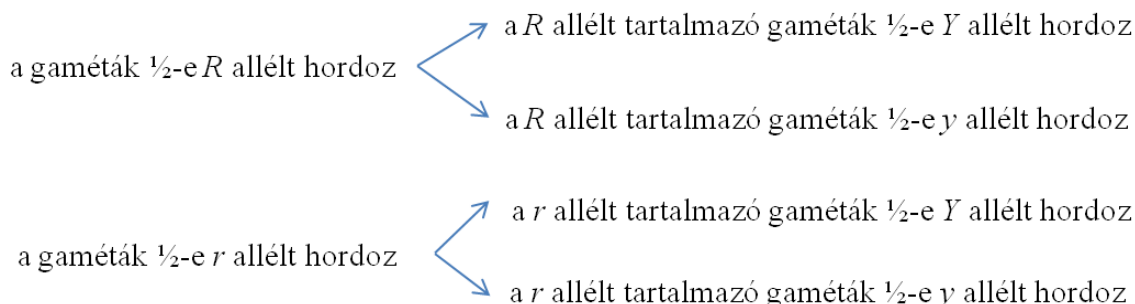
A keresztezésbe vitt szülői tiszta vonalak geno- és fenotípusa:

$$\begin{array}{ccc} R/R \cdot y/y & \times & r/r \cdot Y/Y \\ \text{gömbölyű, zöld} & & \text{ráncos, sárga} \end{array}$$



Ez megfelel egy alapvető statisztikai törvényszerűségnek: két független esemény együttes bekövetkezésének valószínűsége egyenlő a külön-külön vett bekövetkezési valószínűségük szorzatával. Így kapjuk meg a $9/16 : 3/16 : 3/16 : 1/16$ arányt. Más-képp fogalmazva: ha két esemény együttes bekövetkeztének valószínűsége megegyezik a külön-külön vett bekövetkezési valószínűségek szorzatával, akkor a két esemény egymástól független. Ez a gondolatmenet vezette Mendelt az öröklődés második alaptörvényének megfogalmazásához: **a különböző génpárok tagjai a gamétaképződés során egymástól függetlenül válnak szét (szegregálnak)**. Mai tudásunk szerint pontosítva a törvényt: **a különböző kromoszómapárokon** (vagy ugyanazon kromoszómán egymástól távol, lásd erről a [4.](#) kapcsoltság témakörében írtakat) **elhelyezkedő gének a meiózis során egymástól függetlenül szegregálnak**.

A $9:3:3:1$ arány a gaméták szintjén is levezethető. Ezt is szemléltethetjük ágdiagrammal:



A két génpár tekintetében tehát egy dihibrid egyedben négyféle gaméta keletkezik egyenlő arányban, ha a két gén szegregálása egymástól független:

$\frac{1}{4} R;Y$
 $\frac{1}{4} R;y$
 $\frac{1}{4} r;Y$
 $\frac{1}{4} r;y$

Vegyük észre, hogy itt egyszerre alkalmaztuk Mendel első és második törvényét (I. – egy génpár tagjai szegregálnak a meiózis során, a gaméták egyik fele a génpár egyik tagját, másik fele a génpár másik tagját kapja; II. – két génpár tagjai egymástól függetlenül szegregálnak az ivarsejtképződés során).

A négyféle genotípus a női és a hímivarú gamétákra egyaránt jellemző. A gaméták random párosodásából – elegendően nagyszámú F2 utód esetén – kirajzolódik a dihibrid keresztezésekre jellemző $9:3:3:1$ fenotípusos arány. Punnett táblázatban ábrázolva áttekinthető formában tüntethetők fel a négyféle genotípusú hím és női gaméták random fúziójából keletkező utód genotípusok, valamint az egyes genotípusoknak megfelelő fenotípusok (3.2. ábra).

A fenti elméletet Mendel tesztelte is. Azt kellett bizonyítani, hogy a dihibrid egyedek valóban 1:1:1:1 arányban hozzák létre a négyféle genotípusú gamétát. Ehhez Mendel **tesztelő keresztezést (test cross)** végzett, melyben a dihibrid egyedeket ún. tesztelő vonallal (kétszeresen homozigóta recesszív) keresztezte. Mivel a tesztelő szülő minden gamétája recesszív allélkombinációt (r/y) tartalmaz, ezzel nem fedi el a dihibrid által létrehozott gaméták allélkombinációit, tehát az utódok fenotípusa és azok aránya egyenesen tükrözi a dihibrid szülő által létrehozott gaméták allélkombinációit. A tesztelő keresztezés és eredménye genetikai szimbólumokkal (az átláthatóság kedvéért az egyes szülőktől származó allélokat színekkel jelzi):

P	$R/r ; Y/y$ dihibrid szülő	×	$r/r ; y/y$ tesztelő szülő
F1	<u>genotípus</u>		<u>fenotípus</u>
	$\frac{1}{4} R/r ; Y/y$		gömbölyű-sárga
	$\frac{1}{4} R/r ; y/y$		gömbölyű-zöld
	$\frac{1}{4} r/r ; Y/y$		ráncos-sárga
	$\frac{1}{4} r/r ; y/y$		ráncos zöld

A tesztelő keresztezésben Mendel megkapta a várt 1:1:1:1 fenotípus arányt, ami igazolta modellje helyességét.

Az 1900-as évek elején eukarióta szervezetek széles spektrumán tesztelték és találták általánosan érvényesnek Mendel két törvényét. A **3:1, 1:1, 9:3:3:1, 1:1:1:1** ún. mendeli számarányok, melyek két alapvető öröklődési törvényszerűséget, az egyenlő szegregáció és a független hasadás törvényét igazolják.

Ezek a törvények nemcsak diploid, hanem szexuálisan szaporodó eukarióta haploid szervezetekben is érvényesek, az alábbiak szerint (3.3. ábra):

Haploid szülők	$A ; B \quad \times \quad a ; b$
Két haploid sejt fúziójából keletkező átmeneti diploid sejt, meiocita	$A/a ; B/b$
Meiotikus termékek (szexspórák genotípusa; a szexspórák mitózissal hozzák létre a négyféle genotípusú haploid utódot)	$\frac{1}{4} A ; B$ $\frac{1}{4} A ; b$ $\frac{1}{4} a ; B$ $\frac{1}{4} a ; b$

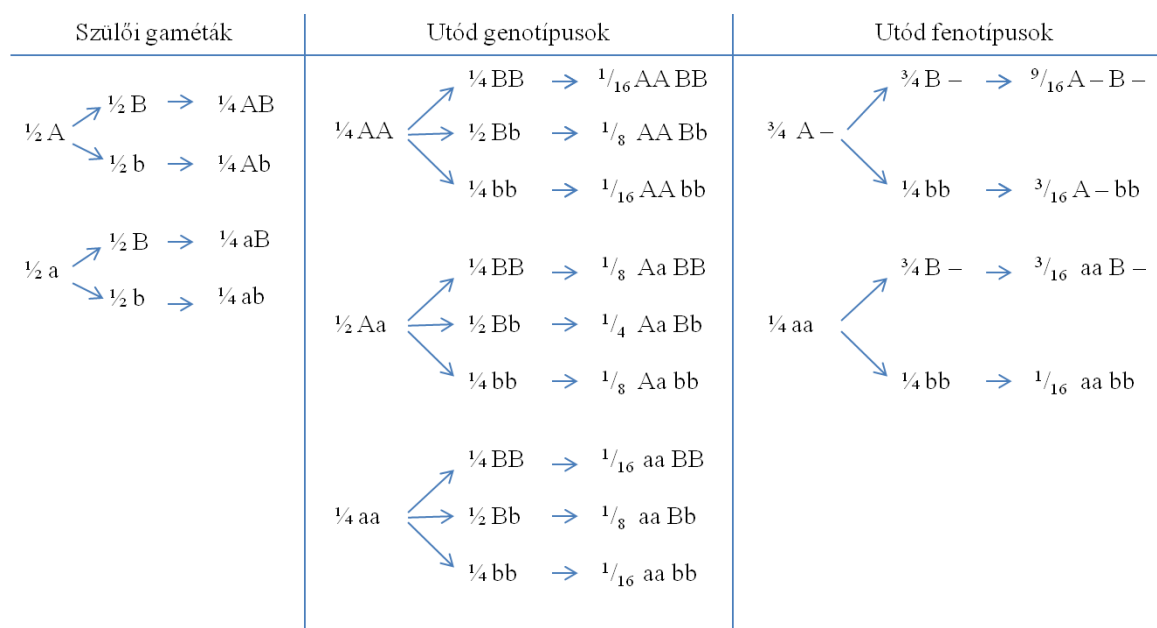
3.3. ábra: Mendel második törvénye szexuálisan szaporodó haploid eukariótákra alkalmazva

3.2. A független öröklődés törvényének alkalmazásai

3.2.1. A független öröklődés törvényének alkalmazásai: geno- és fenotípusok keletkezésének becslése keresztezésekben

A klasszikus genetikai analízis kétféle irányban is lehetséges: 1) egy utódnemzedék fenotípusos arányaiból következtetünk a szülők genotípusára (és az öröklődés módjára), 2) ismert genotípusú szülők keresztezéséből származó utódok geno- és fenotípus arányait előre meg tudjuk becsülni. Ez utóbbira nézve kétféle módszer alkalmazását már megismertük: a Punnett tábla és az ágdiagram (vagy villás elágazás) módszerét. Egy vagy két gén vizsgálata esetén a Punnett tábla jól alkalmazható, de a szerkesztése jóval időigényesebb a villás elágazás módszernél akkor, ha kettőnél több gén öröklődési mintázatát szeretnénk felírni. Gondoljunk bele, hogy dihibrid szülők keresztezésekor a gaméták típusainak száma 4 (azaz 2^2), tehát a Punnett tábla 16 (azaz 4×4) cellát tartalmaz. Trihibrid keresztezésnél a gaméta féleségek száma szülőnként 8 (azaz 2^3), a Punnett tábla celláinak száma pedig 64 (azaz 8×8). A villás elágazás módszerével egyszerűbben és gyorsabban írhatjuk fel, állapíthatjuk meg a gaméták, illetve az utódok várható geno- és fenotípus arányait. Egy dihibrid keresztezéssel szemlélítve (3.4. ábra):

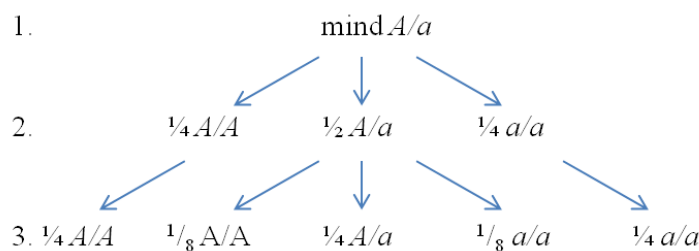
$$A/a ; B/b \times A/a ; B/b$$



3.4. ábra: A villás elágazás módszerének alkalmazása utódok geno- és fenotípusának becslésére

Minden gén esetében háromféle genotípus keletkezik, tehát a lehetséges genotípusok száma dihibrid keresztezésekben 3^2 , trihibrid keresztezésekben 3^3 és így tovább. A lehetséges fenotípusok száma pedig – mivel egy gén esetén kétféle lehet –, 2^2 dihibrid, 2^3 trihibrid stb. keresztezésekben.

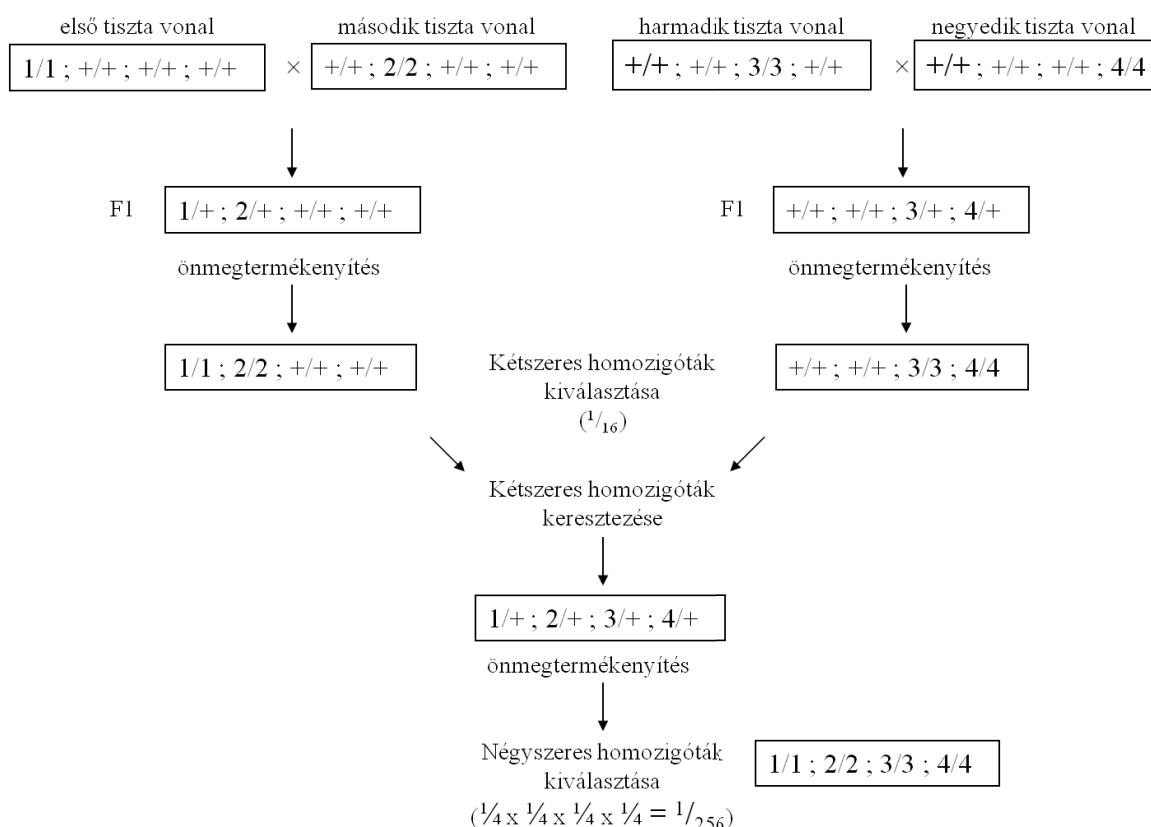
Ha egy keresztezésben több gént tekintünk egyszerre, és ezek egymástól függetlenül öröklődnek, akkor egy bizonyos genotípussal rendelkező utód keletkezési valószínűségét a teljes utódpopulációban egyszerű statisztikai számítással becsülhetjük. Ekkor a független eseményeket külön-külön tekintjük, és a szorzási szabályt alkalmazzuk.



3.5. ábra: Beltenyésztés során a heterozigóták aránya generációról generációra csökken, a homozigóták aránya pedig nő

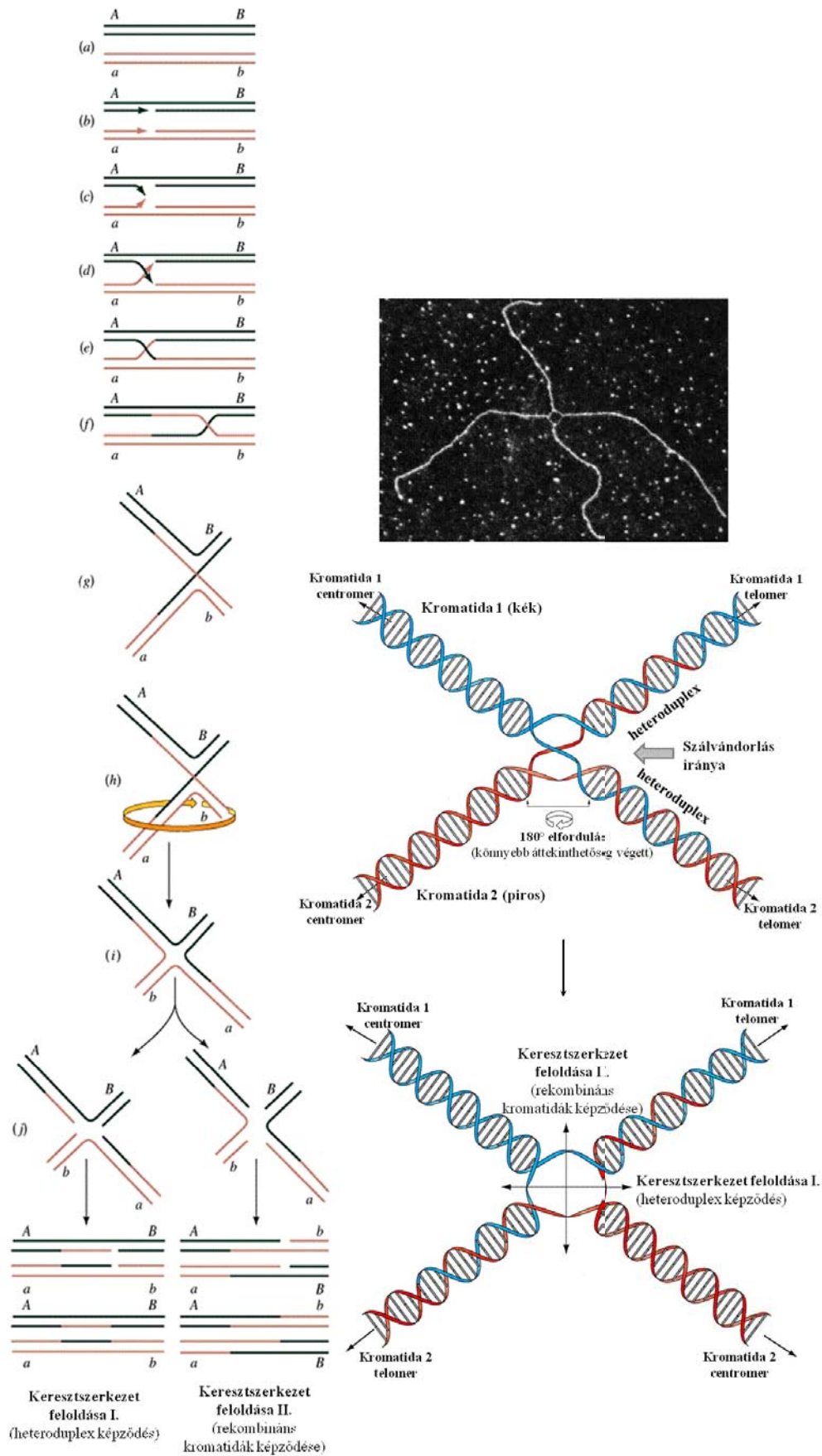
Ha 256 darab függetlenül öröklődő gén mindegyikére nézve heterozigóta egyedet önmegtermékenyítéssel nyolc generáción keresztül szaporítunk, akkor a nyolcadik generációban átlagosan mindössze egy gén marad heterozigóta formában ($1/256$) a 256 génből. A módszer tehát eredményesnek tekinthető tiszta vonalak létrehozásához.

Nézzünk egy olyan nemesítési sémát, melynek célja egy négyszeresen homozigóta növényvonal létrehozása. A négy gént mindenütt azonos sorrendben írjuk fel. + jel jelöli a vad allélt minden gén esetén, a mutáns allélokat pedig – melyeket homozigóta formában egyesíteni kívánunk – 1, 2, 3, 4 számokkal jelöljük. Itt négy olyan tiszta vonalból indulunk ki, melyek egy-egy gén különleges (előnyös) alléljait tartalmazzák, és a cél a négy előnyös tulajdonság egyesítése egy vonalban. Egy lehetséges nemesítési séma (3.6. ábra):



3.6. ábra: Egy négyszeresen homozigóta növényvonal nemesítési sémája

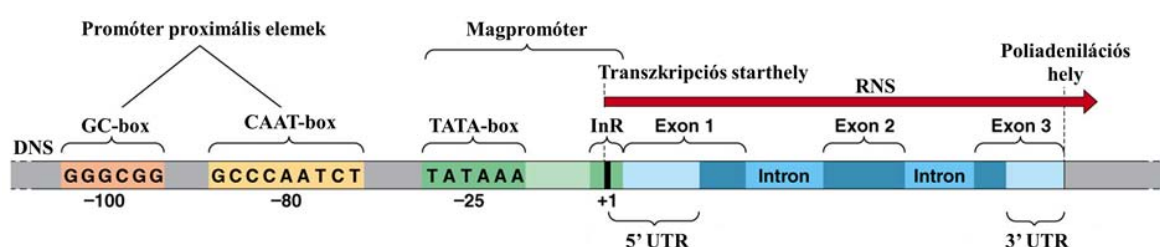
Az így létrehozott, több előnyös tulajdonságot hordozó tiszta vonalak (*superior pure lines*) kényelmesen fenntarthatók, szaporíthatók sok-sok generáción keresztül.



4.6. ábra: A homológ rekombináció Holliday-modellje

strathelytől 20–30 nukleotiddal 3' irányban elhelyezkedő DPE (downstream promóter elem) konzervált régiók is. Az InR minden promóternél jelen van, a másik két elem (TATA-boksz, illetve DPE) közül elegendő csak az egyik jelenléte egy alap promóter működéséhez.

A minimál eukarióta promóter önmagában nagyon gyenge. További *cisz* aktivátor elemek (DNS-szekvenciák) szükségesek a jobb működéshez, melyeket szokás **szabályozó promóternek** vagy **aktivátor szekvenciáknak** vagy **promóter proximális elemeknek** is nevezni. Ezek a konzervált szakaszok különböző aktivátor fehérjék kötődését segítik elő. Az aktivátor szekvenciák a magpromótertől upstream (5' irányban) körülbelül 500 bp-on belül találhatóak. A CAAT-boksz az első megismert aktivátor szekvencia, mely a promóter határfokát növeli. A másik gyakori elem a GC-boksz (GGGCGG szekvencia, sokszor több kópiában). További szabályozó promóter elemek is ismertek. A különböző gének szabályozó promóterei e konzervált szekvenciák egyedi kombinációit tartalmazzák.



10.3. ábra: Egy eukarióta gén szerkezete a magpromóterrel és promóter proximális elemekkel

10.2.2. Távolból ható *cisz* regulátor elemek: enhancerek, silencerek

Az **enhancerek** olyan DNS-szakaszok (tipikusan néhány száz bp hosszúságúak), melyek távolról képesek a transzkripció mértékét fokozni, s a gén maximális aktivitásához járulnak hozzá. A távoli hatás akár több kilobázispárt is jelenthet, például a T-sejt receptor alfa alegységét kódoló gén enhancere 9 kbp távolságra helyezkedik el a promótertől. A legelfogadottabb modell szerint az enhancer hatása úgy valósul meg, hogy a hozzá kötődő aktivátor fehérjék a DNS kihurkolódása révén kerülnek kapcsolatba az alap transzkripciós apparátussal, vagy a szabályzó promóterhez kötődő fehérjékkel. Az enhancerhez kötődő aktivátor fehérjék magukhoz vonzhatnak kromatin szerkezetet befolyásoló (átépítő, fellazító) koaktivátor fehérjéket is (10.4. ábra). Élesztőben az enhancer sajátos szekvenciákat **UAS** (upstream activator sequences) elemeknek nevezik, melyek a promótertől csak 5' irányban elhelyezkedve működnek. Magasabbrendű eukariótákban az enhancer elemek változatos pozíciókat foglalhatnak el: a géntől (promótertől) 5' irányban, a génen belül, vagy akár a gén után 3' irányban. További jellegzetesség, hogy bár az enhancerek meghatározott szekvenciájú szakaszok, hatásuk orientációtól független. Egy gén transzkripcióját több enhancer is szabályozhatja. Az enhancerek a környezetük minden promóterére képesek hatni, hatásukat azonban **inzulátor** szakaszok (határoló DNS-elemek) korlátozzák. Az enhancer és a promóter közé helyezett inzulátor megakadályozza, hogy az enhancer hasson a promóterre. Bizonyos inzulátorok a kromatin konformáció változás továbbterjedését akadályozzák meg. Ismerünk transzkripciót gátló távoli *cisz* elemeket is, ezeket **silencereknek** nevezzük. A silenceren keresztül ható szabályozó fehérjék gátolják a transzkripciót.