

DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
HUMÁNGENETIKAI TANSZÉK

GENETIKA ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIA



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
HUMÁNGENETIKAI TANSZÉK

GENETIKA ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIA

Jegyzet a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Kar
I. éves hallgatói számára



Debreceni Egyetemi Kiadó
Debrecen University Press
2015

Felelős kiadó:
Dr. Biró Sándor
egyetemi tanár, a DE ÁOK
Humánogenetikai Tanszék igazgatója

Felelős szerkesztő:
Schlamadinger József
ny. egyetemi docens

Lektorálta:
dr. Vitális Sándor
ny. egyetemi docens

Az egyes fejezetek szövegét írták és ábraanyagát összeállították
a DE ÁOK Humánogenetikai Tanszék munkatársai:

Beyer Dániel
Buglyó Gergely
Keserű Judit
Paholcsek Melinda
Szilágyi-Bónizs Melinda
Szirák Krisztina

ISBN 978 963 318 408 0

© Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press,
beleértve az egyetemi hálózaton belüli elektronikus terjesztés jogát is

Kiadta a Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press
www.dupress.hu

Felelős kiadó: Karácsony Gyöngyi
Készült a Debreceni Egyetem sokszorosító üzemében, 2015-ben

Tartalom

Előszó	4
1. A sejtmag és kromatin. A humán genom szerveződése. Sejtciklus, sejtosztódás	7
2. Citogenetika	25
3. Az emberi jellegek öröklődése. Mendeli és nem mendeli öröklődés	43
4. A vércsoportok genetikája. Genetikai polimorfizmusok	69
5. Molekuláris genetika. A DNS szerkezete, replikációja. A gének expressziója	79
6. Bakteriális genetika	93
7. Magasabbrendű szervezetek génregulációja	105
8. Mutációk	117
9. Populációgenetika	127
10. Farmakogenetika, ökogenetika	135
11. Rosszindulatú daganatok genetikai háttere	141
12. Molekuláris genetikai módszerek és alkalmazásuk	151

Előszó

Tisztelt Olvasó!

Ön a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Humán genetikai Tanszéke oktatói által a Népegészségügyi Kar hallgatói számára összeállított Genetika és Molekuláris Biológia jegyzetet tartja a kezében.

A jegyzet címe annyiban túlzó, hogy a klasszikus genetika (mendeli genetika, citogenetika, bakteriális genetika, populációgenetika) alapjain túl a molekuláris biológiának, amely a maga teljességében az élőlények és sejtek működésének molekuláris szintű leírásával foglalkozik, csak a molekuláris genetikai aspektusait (a gén és a genom szerkezete, szerveződése, és a génműködés szabályozása) tárgyalja. Nem célja a molekuláris biológia azon vonatkozásainak áttekintése, amelyek a biokémia és sejtbiológia tárgykörébe tartoznak.

A genetika, különösen más természet- és bölcséleti tudományokkal összehasonlítva nagyon fiatal tudomány. Kezdetét Gregor Mendel híres dolgozatának közzétételéhez (1865) kötjük, bár Mendel tudományos eredményeinek elismerése és elfogadása csak a XX. század elején történt meg. Ugyancsak erre az időpontra tehető az első öröklődő emberi betegségek (alkaptonúria és más veleszületett anyagcserebetegségek) leírása, és annak felismerése, hogy Mendel eredményei (amelyeket ekkortól neveznek Mendel-szabályoknak), magyarázzák ezeknek a betegségeknek a családi halmozódását. Viszonylag rövid „története” ellenére azonban, különösen az utóbbi néhány évtized rendkívül gyors fejlődésének köszönhetően, mára a genetika az orvostudomány egyik elismert alappillére a betegségek diagnosztikájának felállításában és egyre inkább a gyógykezelésében is. Különösen igaz ez a Humán Genom Projekt befejezése (2003.) óta, amely lehetővé tette az összes emberi gén azonosítását, az egyes gének populációkon belüli és a különböző populációk között mutatott változatosságának, s a gének kifejeződésének vizsgálatát, s mindezek alapján a géneknek az egyes emberi tulajdonságok vagy betegségek kialakításában feltételezett szerepének tanulmányozását. A genom-szekvenálásokkal párhuzamosan kialakuló genomika tudományának módszertana pedig lehetővé teszi, hogy az emberi genomot, mint egységes egészet tanulmányozzuk, azaz nem csak egyedi gének eseti működését, hanem a teljes génállomány kifejeződését egyidejűleg vizsgáljuk. Ez pedig a gének egymással és a környezettel való kölcsönhatásába, kifejeződésük szabályozásába, s ezzel a génműködés jobb megértésébe enged betekintést.

Jegyzetünk célja semmiképpen nem lehet az, hogy ezt a rendkívül nagy volumenű, szerteágazó ismeretanyagot részleteiben lefedjük. Ugyanakkor fontosnak tartjuk, hogy a Népegészségügyi Kar hallgatói a legalapvetőbb klasszikus és modern molekuláris genetikai ismeretekkel rendelkezzenek, hiszen ezek nagyon gyorsan eredményeznek az egészségügyben rutinszerűen alkalmazott diagnosztikai módszereket, mind a „monogénesen” öröklődő betegségek, mind pedig a több gén és a környezet által együttesen befolyásolt úgynevezett „komplex” betegségek esetében. Ezen véleményünket támasztja alá a közelmúltban megjelent Népegészségügyi genomika (szerkesztette Ádány Róza, Sándor Judit és Angela Brand, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2013.) könyv is, amely a modern molekuláris genetikai alapok mellett a terület etikai és jogi aspektusaival is foglalkozik.

Ha jegyzetünk a fenti elvárásainknak legalább részben megfelel, erőfeszítésünk nem volt hiábavaló.

A fentebb is említett gyors fejlődés eredményeinek közvetítésére, valamint a hallgatóság észrevételeire, kritikájára, javaslataira is számítva, és azt is figyelembe véve, a jövőben a jegyzet további bővítését és módosítását tervezzük.

A szerzőtársak nevében is

Dr. Biró Sándor

tanszékvezető egyetemi tanár

Debrecen, 2013. december.

DUPress

1. fejezet

A sejtmag és a kromatin. A humán genom szerveződése. Sejtciklus, sejtosztódás.

A sejtmag

Minden sejt génikus információ-készletét **DNS** (dezoxiribonukleinsav) tárolja. A DNS a fehérjékhez hasonlóan **sorrendspecifikus biopolimer**, amelynek szerkezetét részletesen az 5. fejezetben tárgyaljuk, ahol kiderül az is, hogy hogyan határozza meg a DNS szekvenciája a fehérjék elsődleges szerkezetét. **Génnek** nevezik a DNS azon szakaszát, amely egy funkcióképes makromolekulát (fehérjét, RNS-t) kódol. A gén magába foglal kódoló és nem kódoló, valamint a kifejeződéséhez szükséges szabályozó szakaszokat is. Adott gén két vagy többféle, egy-mástól egy vagy több bázispárban különböző szekvenciájú gént változatát **allélnak** nevezzük.

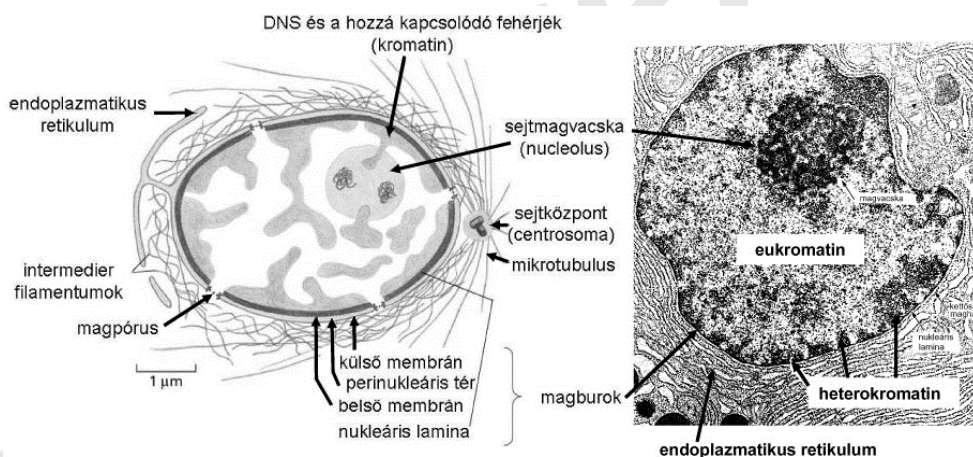
A prokarióta sejtek (baktériumok) DNS-ét nem határolja membrán (l. 6. fejezet). Az eukarióta sejtekben az örökítőanyagot kettős membránrétegből álló maghártya veszi körül és mechanikailag védi, azaz az eukariótáknak valódi **sejtmagiuk** (**nucleus**) van (1-1. ábra). Az összes eukarióta sejtmag karioplazmájában a DNS számos fehérjével kapcsolódik össze és a **kromatinnak** nevezett szupramolekuláris struktúrát alkotja. A sejtmag lehet gömbölyű, szabálytalan vagy lebenyezett alakú és általában egy van belőle egy sejtben (de pl. a májban előfordulnak több-magvú sejtek is). A **magboríték** a **külső és belső magmembránból** és a belső membránhoz csatlakozó, szövetes fehérje bevonatból, a **nukleáris laminából** áll. A két membrán nem független, a **magpórusok**nak nevezett nyílásoknál találkoznak, áthajlanak egymásba (1-1. ábra). A pórusok bonyolult szerkezetű fehérjekomplexén keresztül kis és nagy molekulák, riboszóma alegységek átjutása zajlik. A külső magmembrán közvetlen kapcsolatban van az endoplazmatikus retikulummal. A nukleusz belső membránja belső felszínéhez a nukleáris lamina csatlakozik, amelynek 3féle lamin fehérjéből álló, többrétegű, szövött anyagra emlékeztető szerkezetéhez kihorgonyozódik a kromatin. A riboszóma alegységeket összeszerelő **sejtmagvacská (nucleolus)**, bár nincs határoló rétege, mégis jól elkülönül a kromatin további részétől, mivel erőteljes rRNS termelés zajlik benne és ezzel egyidejűleg a citoplazmából nagy mennyiségű riboszómális fehérje áramlik ide.

Genom, kromatin, kromoszómák

Az **eukarióta genom** fajokként különböző információ-tartalmú, a sejtmagban és a mitokondriumokban/kloroplasztokban található együttes genetikai anyag. A DNS elsődleges szerkezete (nukleotid sorrendje, szekvenciája) hordozza a fejlődés,

a növekedés, az anyagcsere és a szaporodás pontos meghatározásához szükséges génikus információkat – azaz lényegében minden információt, amitől kialakulhat a működőképes szervezet. Az egyed fejlődését az öröklött információk mellett a környezetből jövő hatások is jelentős mértékben befolyásolhatják. A gamétákká differenciálódó sejtek (ivari sejtvonál) kivételével minden, a szervezetet felépítő sejt szomatikus (*soma* [gör] = test) azaz testi sejt. A magasabbrendű eukarióták általában **diploid** szervezetek, azaz minden, sejttaggal bíró testi sejtjük rendelkezik két saját genom kópiával, de előfordulnak olyan élőlények is (pl. mohák, gombák), melyek életciklusában fellelhető hosszabb-rövidebb **haploid** szakasz, ahol a sejtekben csak egyszeres genom van jelen. A fejlettebb soksejtű eukariótákban az ilyen haploid életszakasz az ivarsejtekre korlátozódik.

Az **interfázisban**, azaz a sejtosztódások közötti időszakban a kromatin diffúzan szétoszlik a sejtmagban, emiatt viszonylag homogénnek tekinthető a fénymikroszkópos képe (1-2. ábra). Elektronmikroszkóppal sokkal jobban megfigyelhető, hogy a kromatinban vannak lazább szerkezetű és ezért halványabban festődő területek, amelyeket **eukromatin**nak neveznek, ezek génikusan aktívak. Az erősebben festődő, tömörebb szerkezetű, génikusan inaktív szakaszok a **heterokromatin**hoz tartoznak (1-1. ábra).

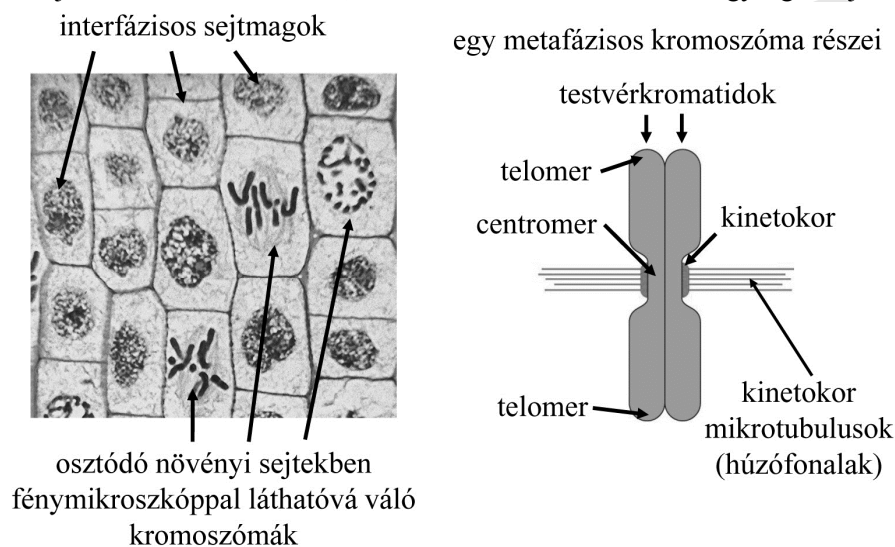


1-1. ábra

Interfázisos sejtmag sematikus rajza és elektronmikroszkópos képe

A – sematikus rajzon fehér – lazább szerveződésű, génikusan aktív eukromatinus régiók világosabban festődnek, a rajzon szürkés, tömörebb szerkezetű, génikusan inaktív heterokromatin pedig sötétebben, és jellemzően a magborítékhoz kapcsolódik.

A DNS molekulák a sejtmagban **kromoszómák**¹ felépítésében vesznek részt. Egy DNS egy kromoszómát alkot, vagy – megfordítva a fogalmazást – egy kromoszómában egy (lineáris) DNS helyezkedik el. A kromoszóma szó kettős jelentést takar. Egyfelől a sejtosztódás idején fénymikroszkóppal látható diszkrét, egymástól jól elkülönülő, pálcikaszerű struktúrákat nevezik így (1-2. ábra), de másfelől ezek a kromoszómák az egész sejtciklus folyamán, így a két sejtosztódás között, az **interfázisban** is megőrzik integritásukat, azaz ugyanaz a DNS alkotja a kromoszómát, csak lazábbá válik a szerkezete, tehát a kromoszóma szó ezt a sejtben állandóan jelen levő, hol tömörebb, hol kondenzáltabb szerkezetű egységet is jelenti.



1-2. ábra

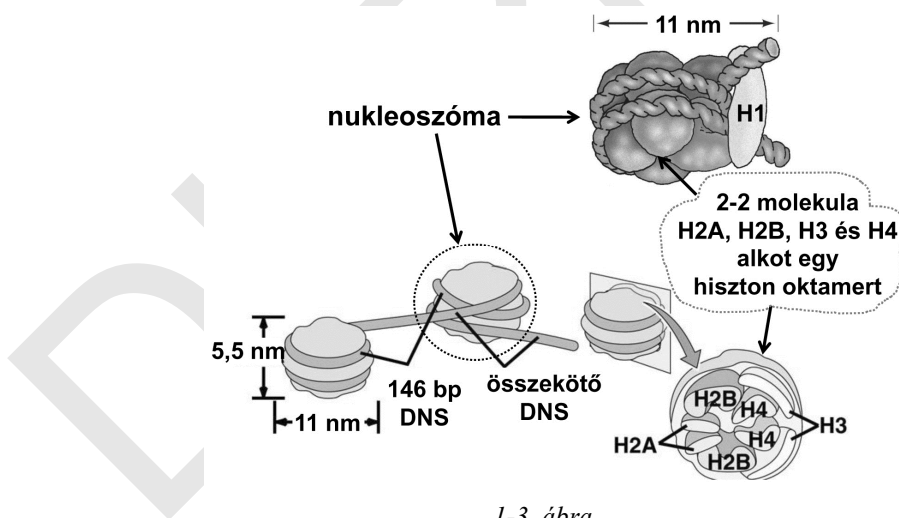
Balra osztódó növényi sejtekben megjelenő kromoszómák, jobbra egy metafázisos kromoszóma sematikus ábrázolása

Ha a kromoszómák pusztán DNS-ből épülnének fel, nehezen lenne elképzelhető a megkettőződésük és az utódsejtekbe való továbbadásuk a hosszú láncmolekulák összegabalyodása és szétszakadása nélkül. A kromoszómák DNS molekulája elsősorban a bázikus **hiszton** fehérjékkel kapcsolódik (1-3. ábra) és ezek mellett interfázisban a sokfajta fehérjét egy csoportba foglaló **nem-hiszton magfehérjék**

¹ A kromoszóma kifejezés a *chroma* [gör] = színes és a *soma* [gör] = test szavakból származik, és az osztódó eukarióta sejtekben fénymikroszkóppal megfigyelhető megfestett kromoszómákra utal. A prokarióta sejtek örökítőanyagának része több kisebb, kör alakú DNS molekulán kívül egy nagyobb, általában körré záródott DNS molekula is, amelyet **bakteriális kromoszómának** neveznek. Ez kapcsolódik ugyan fehérjékkel, de nem jön létre olyan kromatin szerkezet, mint az eukariótákban, ezért nem tekinthetjük a valódi eukarióta kromoszómákkal egyenértékű képletnek.

alkotta **nukleáris mátrix**hoz (1-4. ábra), sejtsztódás során pedig a jórészt azonos fehérjék alkotta, de nem teljesen azonos összetételű kromoszómavázhoz, a **scaffold**hoz rögzülve képes tömörebb szerkezetbe csomagolódnia, kondenzálódni. A nukleáris fehérjékhez tartoznak még például a DNS és az RNS szintézisében résztvevő, vagy a gének kifejeződés szabályozáshoz szükséges fehérjék.

A kromatin szerkezetének lényeges alapeleme a **nukleoszóma** (1-3. ábra). Egy nukleoszómában két-két molekula **H2A, H2B, H3 és H4 hiszton** alkotta fehérjegombóc, a **hiszton oktamer** (*okta* [gör] = 8, *meros* [gör] = rész) körül a DNS – mint fonal az orsó köré – kb. kétszer körültekeredik. A **H1 hiszton** – mint cipőfűző bekötésnél az ujjunk – rögzíti a DNS-t, nehogy letekeredjen. A negatív töltéseket hordozó DNS erősen kötődik a nukleoszóma fehérjemagját alkotó, pozitív töltéseket hordozó hisztonokhoz. A nukleoszómákban lévő H3 és H2A molekulákat számos speciális hiszton-féleség helyettesítheti, amelyek egyedi sajátosságokat kölcsönöznek az adott helyen a genomi DNS-nek. A nukleoszómából – mint kis „far-kincák” – kinyúlhatnak a hisztonok N-terminális végei és ezek kémiai modifikációja (ún. posztranszlációs módosítás [l. 5. fejezet]) – különösen a H3 és a H4 esetén – növeli vagy csökkenti a hisztonokon a pozitív töltések számát, ezáltal befolyásolja, hogy milyen erősen kötődik a DNS a hisztonokhoz vagy mennyire könnyen letekerhető, szabaddá tehető más fehérjék számára. A kromatin szerkezete tehát a hisztonok módosításával változtatható és ezzel is szabályozható, hogy éppen mely gének fejeződhetnek ki (l. 7. fejezet). A fő és a specializált hiszton típusok mintázatát és azok módosításait együttesen gyakran nevezik **hiszton kódnak**.

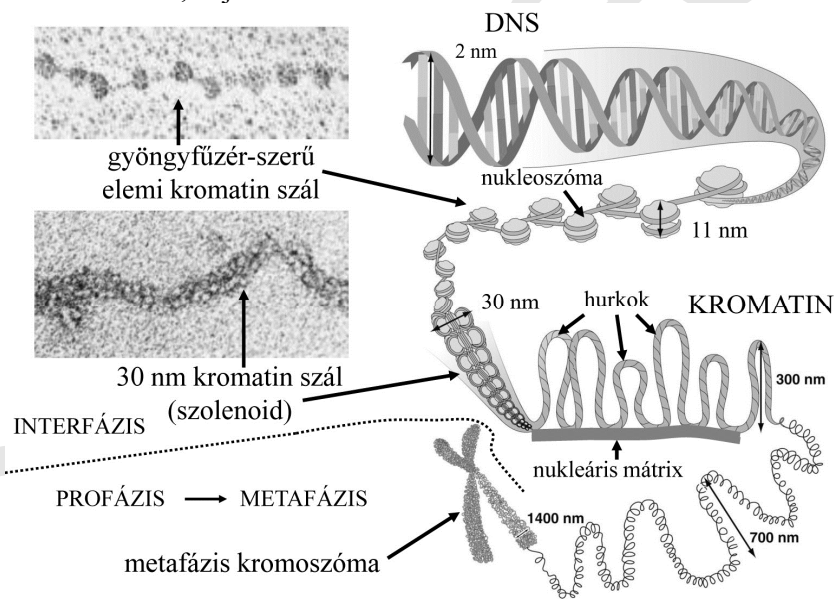


1-3. ábra

A kromatin szerkezeti alapegysége, a **nukleoszóma** szerveződése

A hiszton oktamer köré 147 bp DNS tekeredik kb. kétszer körbe. A H1 hiszton a két irányból érkező, egymással találkozó szálat rögzíti. (bp = bázispár.)

A hosszú **gyöngyfűzér-szerű** lánc (1-4. ábra) – más néven a **11 nm-es elemi kromatinszál** – a natív, fehérje-mentes DNS hosszához képest már jelentős rövidülést eredményez. Ez a laza szerkezet az eukromatinra jellemző. A **H1** hiszton nemcsak megakadályozza a DNS letekeredését egy-egy nukleoszóma esetén, hanem újabb rövidülést, kondenzálódást eredményez azzal, hogy a nukleoszóákat egymáshoz kapcsolja, ezáltal kialakul egy magasabbrendű szerkezet, mely egyszerűsített formában egy cső alakú tekercshez hasonlítható. Ez a **30 nm-es kromatinszál**, amely elektronmikroszkóppal vastag fonalnak látszik (körülbelül háromszor olyan vastag, mint a gyöngyfűzér szerkezetű fonal) és **szolenoid** szerkezetként (*solenoides* [gör] = cső alakú) is emlegetik (1-4. ábra). A 30 nm kromatinszál **hurkokat** képezve rögzül a nukleáris mátrixhoz. További feltekeredésekkel egyre tömörebb szerkezet alakulhat ki, amely már a heterokromatinra jellemző. Az interfázisos sejtben levő lazább, hurkos kromatinszerkezet a sejtosztódás profázisában a kromoszóma minden pontján kezd tömörebb szerkezetbe kondenzálódni, amely a fénymikroszkóppal jól megfigyelhető metafázis kromoszómák kialakulását eredményezi (1-4. ábra). A maximálisan tömörödött kromoszóma hossza kb. 1/10000-ed része a benne levő, teljesen kitekeredett DNS hosszának.



1-4. ábra

A DNS szerveződése a „csupas” kettős hélixről a metafázis kromoszómáig. A bal felső elektronmikroszkópos képen a nukleoszóma „gyöngyfűzér” szerkezete látható az elemi (11 nm) kromatinszálban, az alsó képen pedig a nukleoszóma szolenoid struktúrába szerveződése (30 nm-es kromatinfonal). A pontozott vonal az interfázis végét, a sejtosztódás kezdetét jelöli, amikor is a lazább kromatinszerkezet erősen kondenzálttá válik.

Az összes eukarióta egynél több kromoszómával rendelkezik az egyszeres genomon belül, bár a kromoszómák száma, a genom mérete vagy a gének száma és az adott faj „fejlettsége” között csak laza összefüggés állapítható meg (pl. egyes kétéltűek vagy virágos növény fajok genommérete akár 10^{10} – 10^{11} bázispár (bp) is lehet, szemben az ember $3,2 \times 10^9$ bp méretű genomjával). (A genetikában gyakran előforduló egységek: $1000 \text{ bp} = 1 \text{ kilobázispár} = 1 \text{ kbp}$; $10^6 \text{ bp} = 1 \text{ megabázispár} = 1 \text{ Mbp}$; $10^9 \text{ bp} = 1 \text{ gigabázispár} = 1 \text{ Gbp}$.)

A humán genom és a kromoszómák

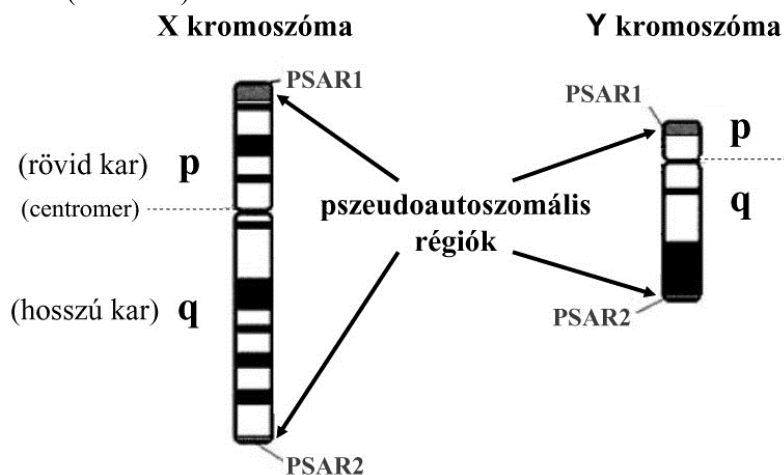
Az ember testi sejtjeinek sejtmagja 46 darab = 23 pár kromoszómát, azaz két genomnyi ($2n$) mennyiséget tartalmaz. A DNS megkettőződés előtt a **G1 fázisban** (l. még a sejtciklusnál) **levő sejtekben minden egyes emberi kromoszóma egy darab lineáris, kettős hélix szerkezetű DNS molekulát tartalmaz**, azaz a nem osztódó testi sejtekben a sejtmagi genomot összesen 46 DNS molekula alkotja.

A 23 párból 22 pár egyforma a nőkben és a férfiakban, ezek az **autoszómák**, amelyeket a legnagyobbtól kezdődően a legkisebb felé haladva számoztak meg 1-től 22-ig (2-2. ábra). A fennmaradó kromoszómapárt a **szex-kromoszómák** alkotják: két **X** nőkben, **X** és **Y** a férfiakban (1-5. ábra). A legtöbb kromoszómát nem csak a hossza, hanem a centromer helyzete alapján is meg lehet különböztetni. A centromer **elsődleges befűződésként** jelenik meg. Ez a jól felismerhető citogenetikai tájékozódási pont két **karra** osztja a kromoszómákat. A rövid kart **p**-vel, a hosszút **q**-val jelölik (1-5. ábra). Mind a 24 féle kromoszóma (22 autoszóma, X és Y) egyedileg azonosítható különféle citogenetikai és molekuláris technikák közös használatával (l. 2. fejezet).

A 24 féle kromoszóma mindegyike más-más géneket tartalmazó lineáris génsozort hordoz. A **lokusz** a gén helye a kromoszómán. A kromoszómapárok tagjai (a **homológ kromoszómák** vagy **homológok**) egymásnak megfelelő génikus információval rendelkeznek, azaz azonos lokuszokat azonos sorrendben tartalmaznak. A homológ kromoszómapár tagjain bármely lokuszt tekintve lehetnek egymással teljesen azonos, identikus szekvenciájú gének, de előfordulhat az is, hogy két különböző, egymástól csak egy kicsit eltérő szekvenciájú formát találunk. Ezeket nevezzük **alléleknek**, azaz **génváltozatoknak**. A **genotípus** egy adott egyed génjeinek összességéből (genomjából) kiválasztott egy, két vagy több (elvileg akár az összes) gén alléljeinek megadása.

Minden kromoszómapár egyik tagját az apától, másikat az anyától öröklí az utód. Normális esetben, hagyományos festési technikával az autoszóma párok tagjai egymástól fénymikroszkóppal nem különböztethetők meg. Nőkben a **két X kromoszóma** szintén nagyon hasonló fénymikroszkópos képet mutat. Férfiakban különbözőek az ivari kromoszómák. A nagyobb a nők X kromoszómájával azonos, az anyjától öröklí a fiú, a kisebb, kevés gént hordozó (a génjeinek száma 1/4-e az X-en levő gének számának) az **Y kromoszóma**, amely apáról fiúra öröklődik. Az X és Y kromoszóma egymással nem homológ, azaz nem azonos lokuszokat hordoznak, de a kromoszómavégek, a telomerek irányában mindkét kromoszómán **psze-**

udoautoszomális régiók² található, amelyeken azonos lokuszok vannak az X-en és az Y-on is (1-5. ábra).



1-5. ábra

Pszeudoautoszomális régiók (PSAR1 és PSAR2) szubtelomerikus elhelyezkedése az egymással nem homológ nemi kromoszómákon

Minden emberi kromoszómát a centromerje két karra oszt, a rövid kar egyezményes jele p, a hosszú karé a q. Rendezett kariogramként való ábrázolásban az előbbi mutat felfele. (A sötét és világos sávok eltérő festődésű régiók, l. a sávtechnikáknál a 2. fejezetben.) A telomerek a karok legvégén helyezkednek el (l. 1-2. ábra).

A humán genom a 22 autoszóma és egy nemi kromoszóma továbbá a mitokondriális DNS (16 569 bp) együttese. Mivel az utódok csak az anya petesejtjében levő mitokondriumkat öröklik, a spermiumban levők kívül rekednek a megtermékenyítéskor, ezért a mitokondriális gének kizárólag anyai (maternális) öröklődést mutatnak (l. bővebben a 3. fejezetben).

Az eukarióta sejt kromoszómái a különböző típusú géneknek és más DNS szekvenciáknak nem véletlenszerű gyűjteményei, hanem a hasonló módon szerve-

² *Pseudo* [gör] = álságos, hamis, nem igazi és autoszomális = azaz az autoszómákra jellemző. Az elnevezés arra utal, hogy jöllehet ezeken a (kromoszómavégekhez közeli) régiókon az X és Y kromoszómán is megtalálható gének vannak, de ettől még a két szexkromoszóma nem homológ egymással, csak a rövid homológ szakaszok miatt tűnik – hamisan – autoszómákhoz hasonlóknak. De ezek a rövid szakaszok is elegendőek ahhoz, hogy a meiózisban a két szex-kromoszóma párt alkotva normális módon szétválogatódhasson az utódsejtekbe. Az osztódás hibájának számít az, ha a profázis I-ben az X és Y – az autoszómákhoz hasonlóan – *crossing over*ek révén egymással szakaszokat cserél ki a pszeudoautoszomális régiókon belül, és ezáltal a férfias nemi jelleg kialakulásában nagyon fontos *SRY* gén Y-ról X-re való kerülését, és ezzel a nemi fejlődés zavarait eredményezi (l. a 2. fejezetben).

zódó, replikálódó és expresszáldó DNS szakaszok régióit csoportokba rendeződve találhatjuk meg bennük. Egyes kromoszóma régiók vagy akár egy egész kromoszóma is lehet gazdagabb génekben, más régiók pedig lehetnek génszegények. A génekben gazdag kromoszómák vagy kromoszomális régiók rendellenességei általában sokkal súlyosabb klinikai következményekkel járnak, mint a hasonló nagyságú, de génszegény genomi régiót érintő rendellenességek.

A Human Genom Project segítségével szerzett tudás alapján úgy tűnik, hogy a DNS szerveződése az emberi genomban sokkal változatosabb annál, mint ahogy azt egykor gondoltuk. A genomi DNS ~3 milliárd bázispárjának valójában kevesebb, mint 1,5%-a kódol fehérjét, és csak kb. 5%-áról gondoljuk, hogy az egyedfejlődés folyamán a különböző szövetekben kialakuló génexpressziós mintázat meghatározásában jelentős szabályozó elemeket tartalmaz. Megközelítőleg a teljes genom felét teszik ki a **nem-ismétlődő szekvenciák**, amelyek csak egyszer (vagy legfeljebb kis számban) vannak jelen az egész genomban. Az ilyen egyedi szekvenciák nagy többségének még nem ismert a funkciója, kisebbik hányadukat pedig a kb. 25 000 génünk túlnyomó többsége teszi ki. A genom másik felét az **ismétlődő szekvenciák** különféle osztályai adják. Ezek azonos formában vagy némi eltéréssel több százszor vagy akár milliószor is megtalálhatók egy genomban. Az ún. nagy gyakorisággal ismétlődő szekvenciák két típusát az alapján különítjük el, hogy egy csoportban vagy szétszórtan helyezkednek el. Becslések alapján a genom kb. 10-15%-át a csoportba tömörülő, ún. **tandem ismétlődő szekvenciák** teszik ki, amelyek azonos orientációban, közvetlenül egymás után helyezkednek el (hosszuk alapján mikroszatellitáknak és miniszatellitáknak nevezik őket). Ezek többek között a kromoszómák szerkezetének kialakításához és fenntartásához járulnak hozzá, így megtalálhatók pl. a centromer régióban (ezáltal fontos szerepet játszanak a sejtosztódás során a kromoszómák ill. testvérkromatidok szétválásában) és a telomerben, továbbá ezek alkotják az Y kromoszóma több mint felét is. Az ismétlődő DNS-szekvenciák másik fő típusa a genomban szabálytalanul **szétszórt ismétlődő szekvenciák** osztálya. Noha sokféle csoportjuk ismert, csak kettőt emelünk ki, az **Alu³ szekvenciákat** és az **L1⁴ szekvenciákat**, mivel ezek együtt jelentős hányadát adják a genomnak és genetikai rendellenességekkel is kapcsolatban állnak. Az Alu szekvenciák a rövid szétszórt szekvenciák családjának legjobban tanulmányozott és legjelentősebb képviselői. Összesen több mint egymillió darab Alu szekvencia van a genomban, ezek adják a humán genom ~10%-át. Eloszlásuk egyenetlen, a genom néhány területén (pl. a telomerikus régiókban)

³ Nevét a felderítésére használt *AluI* nevű, DNS-t hasító enzimről (restrikciós endonukleázzról) kapta.

⁴ A genomban szétszórtan található ismétlődő szekvenciák között vannak hosszabbak, ezeket angol elnevezésük alapján (*Long INterspred Elements*) LINE szekvenciáknak nevezik. Az emberi genom valószínűleg egyetlen LINE családot tartalmaz, amelyet L1-el jelölnek.

gyakoribbak. A második legjellegzetesebb szétszórt ismétlődő DNS szekvenciák az L1 szekvenciák, amelyek hozzávetőleg a genom 20%-át teszik ki. Bőségesen megtalálhatók pl. a centromer közelében, míg máshol viszonylag gyéribben fordulnak elő. Az Alu és L1 szekvenciákról készülő RNS-eket az L1 által kódolt **reverz transzkriptáz** enzim DNS-re írja át ismét. Az így létrejövő cDNS (*c = complemter*) másolatok új helyre ékelődnek be a genomba, mivel az L1 szekvenciák az áthelyeződést végző enzimet is kódolják. Az Alu szekvenciák ugyan nem kódolnak semmit, de a róluk készült másolatokat a sejtben egyébként is jelen levő enzimek ugyanúgy áthelyezik, mint az L1-et, azaz mindkét szekvencia-típus további szóródásához megvannak a szükséges feltételek. Mivel mind az Alu mind az L1 szekvenciák véletlenszerűen ékelődnek be valahová, ezért alkalmanként orvosilag fontos géneket szakíthatnak meg, elrontva a gén működését (ez az **inszerciós inaktiváció** jelensége), ami alkalomadtán daganatos elfajuláshoz is vezethet.

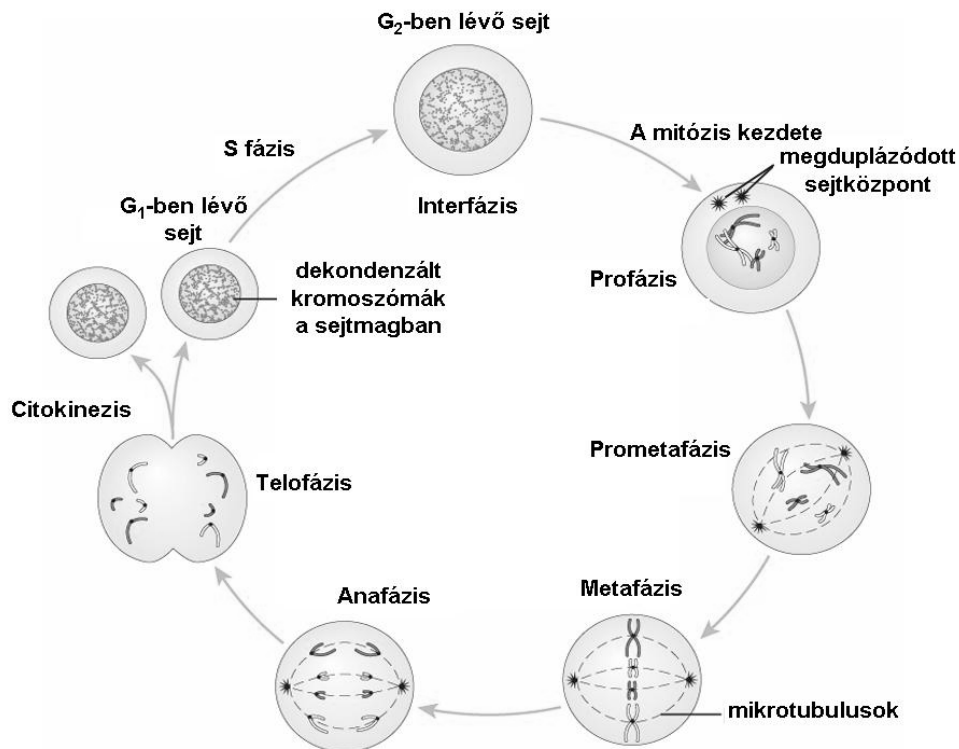
A mikroszatellitákat az igazságügyi (pl. apasági keresetek elbírálása), bűnügyi vizsgálatokban is felhasználják. Egy bizonyos mikroszatellita szekvencia meghatározása személyazonosításhoz nem elegendő, de ha több, elég sok különböző helyre lokalizálódó szekvenciát is bevonnak a vizsgálatba, akkor már olyan egyedi mintázatot (DNS ujjlenyomat) kapnak, ami személyazonosításra is felhasználható.

A sejtciklus és a sejtosztódás

Eukarióta élőlényekben kétféle sejtosztódás létezik: a mitózis és a meiózis. A **mitózis** (1-6. ábra) a testi sejtekre jellemző, amelynek az a célja, hogy a szülősejttel megegyező sejteket hozzon létre, mivel azokra szükség van a test növekedéséhez, a differenciálódáshoz és a szöveti regenerálódáshoz is. A mitotikus sejtosztódás két utódsejtet eredményez, amelyek azonos kromoszómákat és géneket tartalmaznak. Egy testi sejt vonalban több tucat vagy akár több száz egymást követő mitózis történhet. Ezzel ellentétben a **meiózis** csak a reprodukív ivarsejtek, más néven **gaméták** kialakulásáért felelős. Az ember gamétái mind csak 23 kromoszómát tartalmaznak – minden autoszóma pár egyik tagját, emellett a petesejtekben egy X-et, a hímivarsejtekben pedig vagy egy X-et vagy egy Y-t. A testi sejtek **diploidok** (*diploos* [gör] = dupla) azaz **2n a kromoszómakészletük** (ember esetén 46), a gaméták **haploidok** (*haploos* [gör] = egyszeres) azaz **n kromoszómaszámúak**.

Az emlősök, így az emberi lények is, megtermékenyített petesejtként, **zigótá**ként kezdik életüket. A zigóta diploid sejt, amelyből a leendő test összes sejtje származik több tucatnyi vagy több száz egymást követő mitózis révén. Két egymást követő mitózis közötti szakasz az **interfázis**, amelyben a sejtek életük legnagyobb részét töltik. Az interfázis és az azt követő osztódási szakasz együttesen jelenti a sejtciklust. Az osztódás után a sejt a **G₁ fázis**ba lép, amelyben nincs DNS szintézis (1-6. ábra). Vannak olyan sejtek, amelyek órák alatt átmennek ezen a stádiumon; más sejtek hosszú időt – napokat vagy éveket – töltenek a G₁-ben. Valójában néhány sejt típus nem osztódik (mint például a neuronok felnőttekben). Az ilyen teljesen differenciálódott sejtek sejtciklusa folyamatosan gátlás alatt van. Ezt az álla-

potot G_0 -nak nevezzük. Más sejtek – mint például a májsejtek – beléphetnek G_0 -ba, de ha a szerv károsodik, akkor visszatérnek a G_1 -be és folytatják a sejtciklust.



1-6. ábra

Mitózis és sejtciklus

Az ábra a valóságosnál sokkal rövidebbnek mutatja az interfázist, benne a G_1 , S és G_2 szakaszokkal. A jobb áttekinthetőség kedvéért a mitózis fázisait megnyújtottuk.

A **sejtciklus szabályozásának** bonyolult molekuláris hátterét még nem teljesen derítették fel. **Ellenőrzőpontok** szabályozzák az egész ciklust és benne a mitózis minden lépésének időzítését is. Ezek az „érzékelők” kontrollálják például a DNS épségét, a DNS-szintézis pontosságát és folyamatának lezárulását, a kromoszómák mozgását végző mikrotubulusok bonyolult rendszerének összeszerelődését és a kromoszómákhoz erősítését. A DNS szerkezetének megsérülése megzavarja a sejtciklus lezajlását. A szabályozásban résztvevő elemek mindaddig nem engedik a sejtet tovább lépni, amíg vagy javító mechanizmusok újra éppé nem teszik a DNS struktúráját és így a sejt folytathatja a sejtciklust, vagy amíg a DNS túlzott károsodása miatt be nem indul a génikusan előre programozott sejthalál (**apoptózis**) folyamata.

A G_1 fázisban minden kromoszóma egyetlen DNS molekulát tartalmaz. A G_1 -et követő **S** (szintézis) **fázisban** minden DNS molekula megkettőződik, replikálódik (l. az 5. fejezetben) és két **testvérkromatidot** tartalmazó kromoszómává válik. Minden kromoszóma (kétkromatidosnál a testvérkromatidok) végén a speciális ismétlődő szekvenciákból álló **telomer** (1-2. ábra, B) biztosítja a kromoszóma védelmét az egész sejtciklus alatt. Egy RNS-tartalmú enzimkomplex, a **telomeráz** – az RNS-ével templátot szolgáltatva a kromoszómák legeslegvégének replikációjához – biztosítja a telomerek hosszának megőrzését. Telomeráz hiányában a kromoszómák minden ciklussal egyre rövidebbekké válnak, ami végső soron a sejt halálához vezet. Jelentős szerepet tulajdonítanak a telomer–telomeráz rendszernek a sejtek öregedésében, ill. „halhatatlanná” válásában. (Hogy mi köze a telomeráznak a daganatok kialakulásához, erről a 11. fejezetben írunk bővebben.)

Az interfázis a sejtciklusnak mintegy 80-90%-át teszi ki, ami jellemzően nagyjából 16-24 órát jelent egy osztódó emberi sejt esetében. A mitózis csak 1-2 óráig tart. A sejtciklus hossza nagy változatosságot mutat.

A mitózis

Kromoszóma szegregációnak nevezzük a sejtciklus mitózis fázisában a kromoszómák testvérkromatidáinak szétválását és elkülönülését a két utódsejtbe (1-6. ábra). Ha ez a folyamat hibásan zajlik, akkor az utódsejtek genetikailag instabillá válnak, mint például tumorsejtek esetén.

A mitózis folyamata megszakítás nélküli és 5 szakaszra osztható: profázis, prometáfázis, metafázis, anafázis és telofázis.

Profázis (előszakasz): A sejtmagban lévő kromatinállomány fokozatosan fénymikroszkóppal látható kromoszómákká tömörül. A citoplazmában a megkettőződött sejtközpontra (centroszóma) a sejt két ellentétes pólusára vándorol, miközben formálódik az **oszlási orsó**.

Prometáfázis: Szétesik a magboríték, a kétkromatidás kromoszómák kinetokorjaihoz hozzá tudnak kapcsolódni a két sejtközpontról kiinduló húzófonalak (mikrotubulusok). A kapcsolódás csak akkor lesz végleges, ha az egyik testvérkromatid kinetokorjához az egyik pólus felől, a másikhoz a másik pólus felől növekvő húzófonalak kötődnek. Ez a mechanizmus akadályozza meg, hogy mindkét testvérkromatid ugyanabba az utódsejtbe jusson, miközben a másikba nem kerül az adott kromoszóma egyetlen példánya sem. A kromoszómák az oszlási orsó egyenlítői síkjára felé mozognak, közben tömörülésük folyamatosan zajlik.

Metafázis (középszakasz): **A kromoszómák elérik maximális tömörségüket és eközben az orsó egyenlítői síkjára rendeződnek** azáltal, hogy a húzófonalak egyenlő erővel hatnak rájuk mindkét oldalról. Ez az osztódási szakasz a leg-rövidebb, a felsorakozás megtörténtevel véget is ér. Az osztódó emlős sejtek kromoszómáit a mitózis prometáfázisában vagy a metafázisban lehet legkönnyebben tanulmányozni. (Technikailag a metafázis sejtek előállítását könnyebb.)

Anafázis (utószakasz): A centromerjüknél egymáshoz kapcsolt **testvérkromatidok hirtelen szétválnak**. Az egymástól függetlenné vált testvérkromati-

dokat **utód kromoszómáknak** nevezzük, ezeket a kinetokorjukhoz kapcsolt húzófonalak a sejt két ellentétes pólusára viszik (1-6. ábra).

Telofázis (végszakasz): A kromoszómák elkezdnek dekonzenzálni, körülöttük újra összeszerelődik a magboríték. Mindkét sejtmag szerkezete fokozatosan kialakítja az interfázisos képet.

A sejtosztódás folyamatának befejezése a **citokinezis** szakasza, amelyben – a metafázisos egyenlítői síknak megfelelő helyzetben – a sejtmembrán belső felszínéhez kapcsolódó, összehúzódnásra képes gyűrű a membránt magával vonva kettéfüzi a citoplazmát.

A mitotikus osztódás végeredménye az anyasejttel mindenben – az örökítő anyagban is – megegyező, egymással azonos két utódsejt. Egy fontos különbség van a mitózisba éppen belépő és a mitózist éppen befejező sejt között. A szülő sejtek kromoszómáinak G_2 -ben két kromatidja van, míg az utódsejtek kromoszómái csak az örökítő anyag egy kópiáját tartalmazzák. A kromoszómák egy kromatidásak maradnak mindaddig, amíg a következő sejtciklusban a sejt el nem éri újra az S fázist, amikor minden kromoszóma kétkromatidosává válik. A mitózis egész folyamata a megkettőződött genom szabályos szétválását biztosítja az egymást követő sejtosztódásokban. Az egész eukarióta élővilágra általánosan jellemző, hogy mitózissal haploidból haploid, diploidból diploid sejtek jönnek létre.

A meiózis számcsökkenő (redukciós) sejtosztódás

Az ivaros szaporodás lényege, hogy a gének keveredését és a diploid állapot megőrzését biztosítsa. A diploid állapot teszi lehetővé, hogy a különböző génekben mutáns genomok egymás hibáit kompenzálják. Gyakran a heterozigóta állapot (azaz a homológ kromoszómapár két tagján különböző géntípus, allél van jelen) a legkedvezőbb az egyed túlélése szempontjából. A meiózis ahhoz szükséges, hogy az ivaros szaporodáshoz a szülők diploid genomját két külön – de teljes, kihagyás- és ismétlődés-mentes – genomná lehessen szétválogatni. A két szülő haploid genomjának keveredése a zigótában azonban nem hozna létre új allélkombinációkat egy adott kromoszómán. Ezért van szükség az ivarsejtek kialakításához a meiózisa, amelyben a diploid sejtek nem csupán haploid utódsejteket képeznek, hanem eközben még a saját genetikai állományukat is újrakombinálják. Tehát annak oka, hogy miért különbözik annyira a meiózisban létrejövő utódsejtek génállománya egymástól és a szülő sejtől az, hogy **a gamétákba egyrészt véletlenszerűen kerül be minden homológ pár eltérő eredetű tagjai közül az egyik (neokombináció)**, másrészt a meiózis leelején, a **profázisban lejátszódó genetikai rekombináció miatt ezek már új allélszétválású kromoszómák lesznek.**

A meiózis két egymást követő osztódási szakaszból áll (meiózis I és meiózis II), amelyek közül **csak az első előzi meg a DNS replikációt.** A homológ kromoszómák a profázis I-ben egymás mellé rendeződnek és egyes szakaszaik kicserélődnek egymással (**crossing over**: átkereszteződés; **rekombináció**). A meiózis I anafázisában a homológ kromoszómapárok tagjai két sejtbe válogatódhatnak szét

(szegregálódnak). A meiózis II lépései a mitózisra emlékeztetnek, az anafázis II-ben a testvérkromatidok válnak szét és vándorolnak a két pólus felé (1-10. ábra).

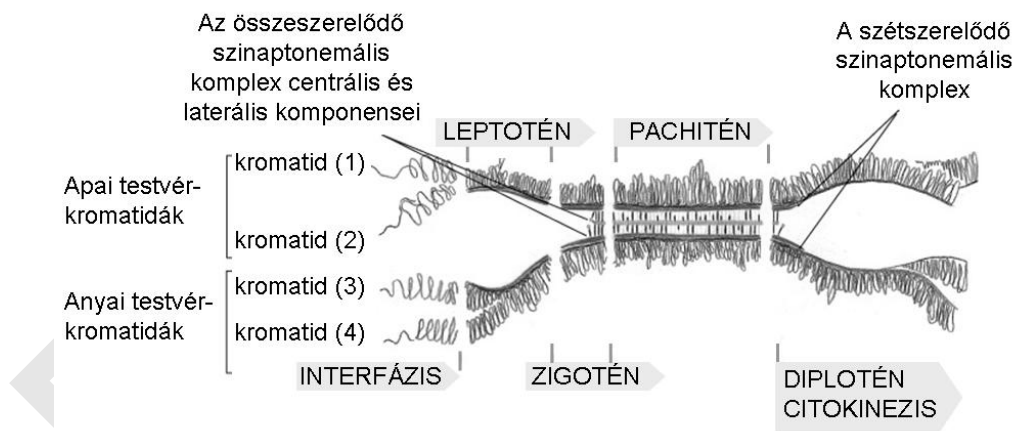
Az első meiotikus osztódást (Meiózis I) redukciós sejtosztódásnak is nevezzük, mert a kromoszómaszám felére csökken.

Profázis I: A mitózis profázisánál bonyolultabb, attól számos tekintetben eltérő, megnyúlt szakasz, amely öt részre tagolható (1-7. ábra). A kromoszómák mindvégig folyamatosan kondenzálódnak, egyre rövidebbekké és vastagabbakká válnak.

A meiózis I profázisában lejátszódó szinapszis-képzés menete:

Leptotén: Az S fázisban megduplázott kromoszómák két testvérkromatidja egyetlen vékony fonal formájában fénymikroszkóppal észlelhetővé válik.

Zigotén: A homológ párok végei egy speciális szalagszerű fehérjeszerkezet, a **szinaptonemális komplex** segítségével összekapcsolódnak. A szinaptonemális komplex (1-7. ábra) tovább épül és a homológ párok között lokuszról lokuszra haladva precíz összeköttetés jön létre, amelynek molekuláris alapja még nem teljesen tisztázott. Mindenesetre bázispárról bázispárra pontos az illeszkedés. Mintha egy cipzár záródna közöttük a magborítéktól a mag belseje felé haladva, teljes hosszukban egymáshoz igazodnak. Ez a **szinapszis-képzés** folyamata. Mivel összesen négy testvérkromatid áll össze egyetlen látható fonallá, **tetrádnak** nevezik ezt a formációt (*tetra* [gör] = 4). **Bivalensnek** is nevezik az így kialakult képleteket, mivel egymás mellett tartalmazzák a homológ pár anyai és apai eredetű tagját.

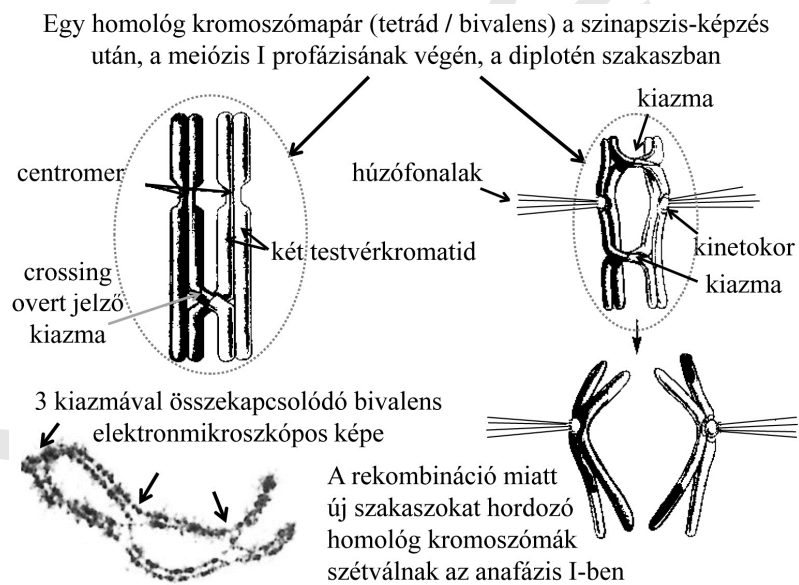


1-7. ábra

Homológ kromoszómák egymás mellé rendeződése a meiózis I profázisában, balról jobbra haladva

A szinaptonemális komplex kialakításában résztvevő fehérjék cipzárhoz hasonlóan pontról pontra szorosan egymás mellé illesztik a profázis első 3 alfázisában a két kromoszómát. A szoros illeszkedés lehetővé teszi (a pachiténben) egyes szakaszok kicserélődését a molekuláris rekombináció folyamatában.

Pachitén: A kromoszómák még szorosabban feltekerednek, vastag fonalak formájában láthatók, a szinapszis teljes. Ekkor lehetővé válik, hogy a szinaptomális komplexben lévő rekombinációs enzimek a homológ párok egymásnak megfelelő szakaszait kicseréljék egymással, ez a **crossing over** (átkereszteződés). A **rekombináció** csak akkor játszódhat le pontosan, ha a két homológ kromoszóma fizikai összefonódása tökéletes, azaz elegendően hosszú szakaszon azonos DNS szekvenciák kerültek egymás mellé (1-7. ábra). Ez a feltétele annak is, hogy a kromoszómák szétválása is pontosan menjen végbe. A helytelenül lezajló rekombináció a kromoszómák hibás szétválogatódását okozhatja a meiózis I-ben és ez gyakori oka a kromoszóma-rendellenességeknek (1. nondisjunkció, 2. fejezet). Az X és Y kromoszómák szigorúan véve nem alkotnak homológ párt, de a rövid és a hosszú kar végén lévő pseudoautoszomális régiók (1. 1-5. ábra) homológok egymással, és ezeken a szakaszokon részlegesen összekapcsolódhatnak a meiózis I-ben, ami nem kívánt átrendeződésekhez, génkicserélődésekhez vezethet a két kromoszóma szakaszai között (ennek egyik lehetséges végkimeneteléről a 2. fejezetben írunk, l. az *SRY* gén áthelyeződése az Y-ról az X kromoszómára). A spermio-genézisben az X és az Y elválnak egymástól.



1-8. ábra

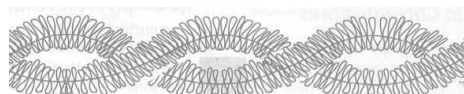
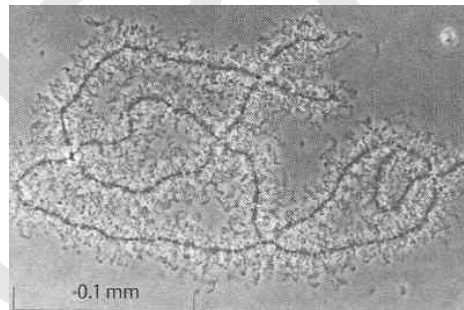
A crossing overeket jelző kiazmák megjelenése a meiózis I profázisában és az anyai és apai szakaszokat is hordozó kromoszómák szétválása az anafázis I-ben

A pachitén szakaszban lezajlott crossing overekre utalnak a diploténben is jól látható összekapcsolódások –kiazmák– a homológ kromoszómák között. A két kromoszóma egymástól való eltávolodásával a kiazmák a kromoszómavégék irányába vándorolnak.

Diplotén: A rekombinációt követően a szinaptonemális komplex elkezd lebomlani. A bivalens két komponense kissé távolodik egymástól, csak néhány ponton mutat – látszólagos – összeköttetést, ahol a kromatidák tagjai (egymáson fekvő) átkereszteződve maradtak. Ezeket a pontokat **kiazmáknak** nevezzük (1-8. ábra), a korábban lezajlott crossing overeket jelzik, de a tényleges helytől fokozatosan elvándorolnak a kromoszómavégék irányába, ahogy a kromatidák távolodnak egymástól.

A kromoszómák tovább tömörödésével láthatóvá válik a tetrádokban a négy kromatid. Az emberi petesejt ebben a stádiumban várakozik az embrionális kortól a petefészek-tüsző éréséig (akár 50 évig is), ezalatt a kromatin dekondenzálódik kissé, azaz kromatinhurkok lógnak ki a kromatidokból és rajtuk RNS-szintézis folyik. Emlősökben, így az emberben ezt nem lehet fénymikroszkóppal megfigyelni, de kétéltűek oocitáiban fáziskontraszt mikroszkóppal is láthatók a kilógó hurkok, így jellegzetes alakjukról **lámpakefe kromoszómáknak** nevezik az említett állatokban ezeket a kromoszómákat. A lámpakefe kromoszómák (1-9. ábra) a géntérképezésben, a genom szerveződésének megértésében és a hurkokban lévő gének kifejeződésének vizsgálatában is fontos szerepet játszanak.

Diakinézis: Ebben a stádiumban érik el a kromoszómák a maximális tömörséget, felvéve szokásos mikroszkópos alakjukat. A kromoszómavégék leválnak a nukleáris lamináról. Ellentétben a mitózissal, a kromoszómák centromerjein csak egy aktív kinetokor alakul ki, mivel a testvérkromatidok kinetokorjai összetapadnak, egy egységként működnek, azaz a testvérkromatidok a meiózis I-ben még nem válnak szét.



1-10. ábra

Lámpakefe kromoszóma

Fent: fáziskontraszt mikroszkóppal készült felvétel. Lent: vázlatos rajz.

Metafázis I: A sejtmaghártya szétdarabolódik és a sejtmagon kívüli sejtközpontokból a mikrotubulusok elérhetik a kromoszómák kinetochorjait, kialakul az

oszlási orsó és a párban lévő kromoszómák az oszlási orsó egyenlítői síkjába igazodnak.

Anafázis I: A homológ kromoszómák elválnak egymástól, a húzófonalak a két ellentétes pólusra húzzák őket (1-8. ábra). A meiózis I-ben tehát a kromoszómaszám feleződik, a *Homo sapiens* esetén 46-ról 23-ra, diploidról haploidra. Mivel az egyes bivalensek egymástól függetlenül válnak szét, ezért az apai és az anyai eredetű homológ kromoszómák véletlenszerűen kombinálódnak a két póluson (**neokombináció**). A 23 pár kromoszóma összes lehetséges variációjának száma így 2^{23} (több mint 8 millió). Mivel a homológ kromoszómapárok közötti átkeresztődésekkel (l. a profázis I-ben) szinte megszámlálhatatlanul sok variációban jelentkezhetnek anyai és apai szakaszokat egyaránt tartalmazó kromoszómák (1-8. ábra), ezért a szülőtől gyermekbe átadott genetikai anyag variációinak száma valószínűleg lényegesen nagyobb ennél.

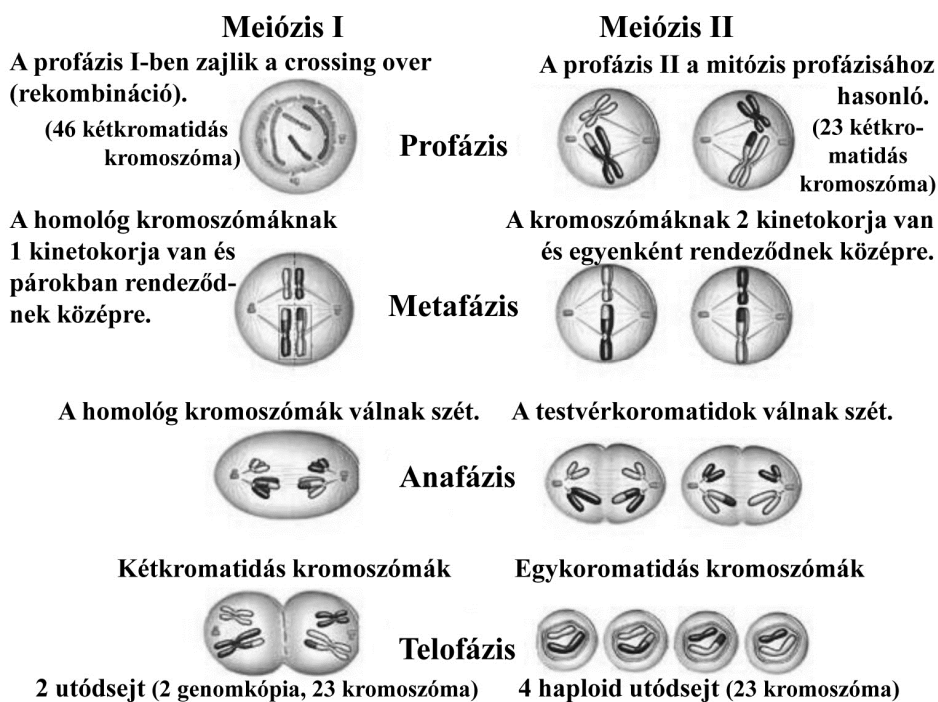
Sokféle hiba történhet a sejtosztódás során. Néhány leállítja a meiózist és a sejt elpusztul. Az anafázis I-ben bekövetkező más jellegű hibák a kromoszómák rendellenes szegregációjához vezetnek, például a homológ kromoszómapár mindkét tagja egy irányba vándorol ahelyett, hogy az ellenkező pólusra menne. Ezt a folyamatot, a szét nem válást **nondiszjunkciónak** nevezzük (l. 2. fejezet, 2-3. ábra). A nem megfelelően zajló meiózis következményei közül néhányat a 2. fejezetben foglalkozunk.

Telofázis I: A két haploid kromoszómakészlet a sejt ellenkező pólusán csoportosul, újra összeszerelődik a magboríték.

Citokinezis: A telofázis I után a sejt osztódik két haploid utódsejtre és egy közti fázisba jut. A hímivarsejtek képződésekor (**spermatogenezisben**) a citoplazma többé-kevésbé egyenlően oszlik meg a két utódsejt között. A petesejtképzéskor (**oogenezisben**) az egyik utódsejt, a másodlagos oocita kapja jóformán az összes citoplazmát, a másik az első sarkitestté válik.

A második meiotikus sejtosztódás

Eseményeit és azok sorrendjét tekintve érdemben egyezik a mitózissal azzal a különbséggel, hogy haploid sejtek osztódnak. A meiózis I-től hosszabb-rövidebb szünet választja el. Ez a szünet nem felel meg a mitotikus ciklus interfázisának, mivel nem történik benne DNS duplázódás és nincs G_1 , G_2 szakasz. A meiózis II-ben minden homológ párból egy-egy példány van jelen, azaz n számú, két testvérkromatidos kromoszóma. Az anafázisban a testvérkromatidok elkülönülnek, és egykromatidos kromoszómákként a haploid utódsejtek új sejtmagjába kerülnek. Végeredményként (a kiindulópontként szereplő egy diploid sejtől) általában 4 haploid utódsejt jön létre, az emberekben azonban ez kicsit módosul. Férfiakban négy egyenértékű haploid hímivarsejt keletkezik, amelyek mindegyike egy teljes sorozat, azaz 23 db egykromatidas kromoszómát tartalmaz, de vagy X, vagy Y van a sorozatban. Nőkben azonban csak 1 petesejt jön létre, és egy jóval kisebb méretű sarki test (polocita) is kialakul a meiózis első szakaszának végére, de jellemzően nem fejezi be a második osztódási szakaszt (1-10. ábra).



1-10. ábra
Meiózis

A meiózis genetikai következményeinek összefoglalása

– A kromoszómaszám diploidról haploidra csökken, ami nélkülözhetetlen lépés az ivarsejtek kialakításában.

– Az allélek szegregálódnak – vagy a meiózis I-ben vagy a meiózis II-ben – összhangban a gaméta tisztaság törvényével (amit Mendel első törvényének is neveznek, 1. 3. fejezet).

– A homológ kromoszómák párba rendeződését követően a véletlen szétválás eredményeképpen a genetikai anyag véletlenszerűen keveredik, összhangban a Mendel második törvényének tartott független öröklődés szabályával (1. 3. fejezet).

– A genetikai állomány még nagyobb fokú keveredéséhez a rekombináció járul hozzá, ami a genetikai variabilitást megnövelő és normális kromoszóma szétválást biztosító mechanizmusként fejlődött ki az evolúció során.

A mitózis és a meiózis orvosi vonatkozásai

A 2. fejezetben foglalkozunk részletesen a hibás sejtosztódások következményeivel. A meiotikus nondiszjunkció okoz leggyakrabban kromoszóma mutációt fajunkban. Különösen a petesejtképzés érintett. Ez a hibaforrás okolható sok magzat kromoszómális rendellenesség miatti, méhen belüli elhalásáért. A kihordott terhességek esetében a kromoszómák számbeli és szerkezetbeli eltérései fejlődési

rendelleneségekért, mentális retardációért lehetnek felelősek és az újszülött elégtelen gyarapodását is okozhatják.

A genetikai rendellenességek létrejöttében a mitotikus nondiszjunkció szintén fontos tényező lehet. A megtermékenyítést követő néhány sejtosztódás alatt, vagy a fejlődő embrióban, vagy az embrión kívüli szövetekben (pl. a placenta sejtjeiben) bekövetkező nondiszjunkció kromoszomális mozaicizmushoz vezet (1. 2 fejezet). Ez történik pl. egyes Down-szindrómás betegek esetében. A gyorsan osztódó szövetek sejtjeiben (mint pl. a vastagbél hámsejtjeiben) a rendellenes kromoszóma szegregáció gyakran egy (újabb) lépést jelent tumor kialakulásához vezető úton. Számos daganatos megbetegedés esetében diagnosztikus és prognosztikus fontosságú a kromoszómák vizsgálata és a genom instabilitásának megállapítása (11. fejezet).

DUPRESS

2. fejezet

Citogenetika

A citogenetikai vizsgálatokkal megállapíthatók a kromoszómák szám- és alakbeli rendellenességei és tetszőleges (gyakran rendellenes) kromoszóma részlet lokalizációja is. Az orvostudomány részeként a citogenetika a kromoszóma rendellenességekkel társuló fejlődési hibákkal és kórképekkel is foglalkozik.

Az alábbi esetekben érdemes tanulmányozni az adott egyén kromoszómakészletét:

- megfelelő mértékű növekedés, fejlődés hiánya a csecsemőnél, kisgyereknél, különböző deformációk, alacsony termet, bizonytalan külső nemi szervek és mentális retardáció esetén,
- halvaszületett magzat, illetve újszülött korban bekövetkező elhalálozás esetén,
- nőknél, akiknél hiányzik a menstruáció, illetve azoknál a pároknál, akik termékenységi nehézségekkel küzdenek vagy sorozatos vetélés problémája áll fenn,
- a családban előfordul kromoszóma rendellenesség,
- nem normális, rendezetlen sejtosztódás, tumor esetén,
- ha a fogamzás idején az anya 35 évnél idősebb.

A citogenetika alapjai: kromoszóma-preparátum készítése, a humán kariotípus, idiogram és kariogram

A kromatin a mitózisban tömörödik fénymikroszkóppal megfigyelhető kromoszómákká. A hagyományos technikákat alkalmazó citogenetikai vizsgálatok során a kromoszómákat általában prometafázisban vagy metafázisban lehet eredményesen vizsgálni. Ehhez osztódó sejtekre van szükség, amelyek *in vivo* („élőben”, azaz a testünkben) is léteznek, de általában fájdalmas beavatkozásra van szükség, hogy mintát vegyenek belőlük, ezért csak kivételes esetekben tarthatjuk indokoltnak és megengedhetőnek (pl. leukémiás megbetegedés esetén vörös csontvelőből vett biopszia). Mivel általában a szövetekben nem található elegendő éppen osztódó sejt a megfelelő számú metafázisban lévő sejt biztosításához, ezért előbb osztódásra kell bírni a vizsgált minta sejtjeit és *in vitro* („üvegben”, azaz a testen kívül, mesterséges közegben) kell tenyészteni. Például fehérvérsejtekből állandóan osztódó limfoblaszt sejtvonalak hozhatók létre (születést követően a kromoszóma-vizsgálathoz ez a leggyakrabban felhasznált sejtípus), míg bőrbopszia esetén fibroblasztok nőnek ki a tenyésztőedény aljára. Prenatális citogenetikai vizsgálatok céljára az amnionfolyadékban lévő magzati sejtek, ill. chorion-boholy sejtek is tenyészthetők *in vitro*.

A nem osztódó sejteket egy osztódást indukáló anyaggal (T-limfociták esetén a phytohaemagglutininnal) G_0 -ból G_1 fázisba léptetik. Három nap után elegendő osztódó sejt lesz a sejt kultúrában. Ekkor a tenyészethez **colchicint** (az **őszi kikerics** [*Colchicum autumnale*] alkaloidját) adva megállítják a sejtosztódást a metafázisban, mivel ez a vegyület megakadályozza az oszlási orsó összeszerelődését, így a testvérkromatidok nem tudnak elválni egymástól. Ezt követően a tenyészet sejtjeit hipotóniás közegbe helyezik, ahol azok megduzzadnak, sejthártyájuk felszakad és a kromoszómák elkülönülnek egymástól (ugyanakkor az egy sejthez tartozó kromoszómák együtt maradnak). A fixált sejtszuspenziót tárgylemezre cseppentik, beszárítják és a kromoszómákat megfestik a megfelelő technikával. Az eltérő kondenzálódásnak megfelelően a kromoszómákon számos sáv válik láthatóvá, melyek jellegzetes csíkozottságot, mintázatot adnak az egyes kromoszómáknak (l. alább a sávtechnikákat, sáv-idiogramot).

A preparátumokban egy sejt kromoszómái elszórtan láthatók a mikroszkóp alatt (2-1. ábra). Ha ezt a képet lefotózzák, akkor a sejt **rendezetlen kariogramját** kapják.



2-1. ábra

Egy interfázisos sejt magja és egy másik sejt rendezetlen kariogramja (G sávozás)

Metafázis készítmény, amelyben az egy sejtől származó kromoszómák kis területen, de teljesen rendezetlenül helyezkednek el. Közvetlen mikroszkópos vizsgálatuk így a legtapasztaltabb szakember számára sem igen járható út. Minden kromoszóma kétkromatidás, de nagyon ritkán látható külön-külön a két testvérkromatid, mivel nagyon szorosan egymás mellett vannak.

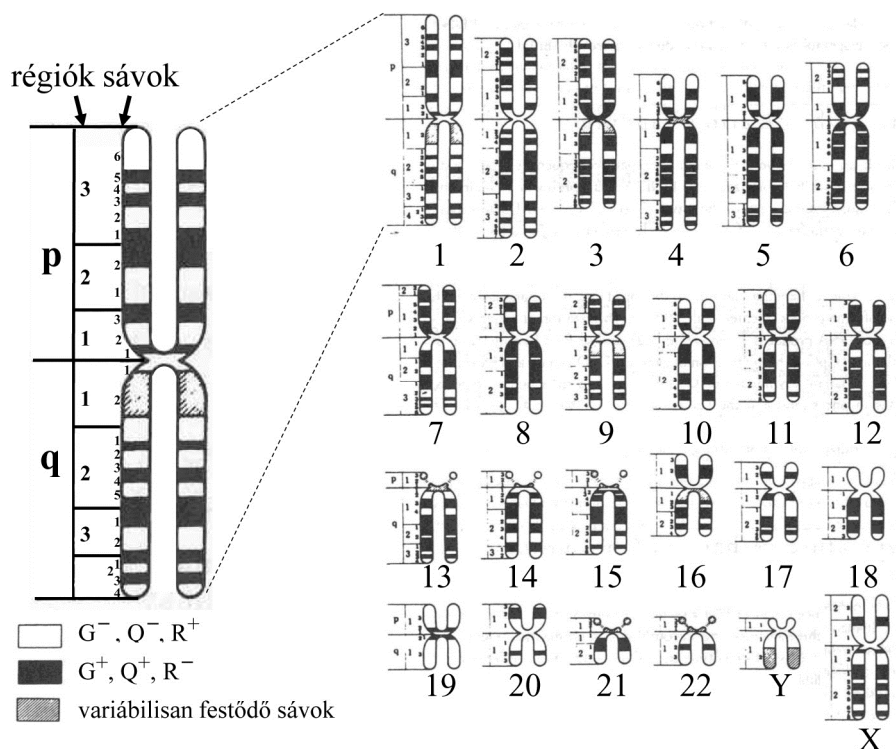
Minden faj egy saját, jellegzetes számú és morfológiájú kromoszóma-készlettel rendelkezik. A fajra jellemző kromoszómák csökkenő nagyság és alak szerinti szemantikusan ábrázolása az **idiogram** (2-2. ábra). Ez egy olyan idealizált, kromoszóma szerelvényt ábrázol, amelyhez viszonyítani lehet a vizsgált egyénben talált kromoszómákat, és megállapítható, hogy van-e számbeli vagy alakbeli eltérés az idiogramban foglaltakhoz képest. A rendezetlen kariogram digitálisan rögzített kromoszómáit egy számítógépes program segítségével sorba rendezik, párosával az idiogram alapján. Jelenleg a sávmintázatot is figyelembe vevő Párizsi Nomenklatúra van érvényben, ennek összefoglalása az ún. **sávidiogram** (2-2. ábra). Így hozzák tehát létre a **rendezett kariogramot** (2-3. ábra).

Megfelelő számú (10-15-20) sejttel megismételve az eljárást az egész egyénre jellemző kromoszómaösszetételt, a **kariotípust** tudják meghatározni. A kariotípus leírásának formája: kromoszómaszám, nemi kromoszómák, rendellenesség (ha van). **Kariotipizálásként** beszélünk arról a folyamatról, amelyben megállapítják az adott egyénre vagy a szóban forgó (pl. daganatos) sejtvonalra speciálisan jellemző kromoszómaszerelvény összetételét.

A **sávtechnika** alkalmazása során különböző anyagokkal festik meg a kromoszómákat, így a kialakuló csíkos mintázat alapján minden kromoszóma egyedileg megkülönböztethető a többitől, ami megkönnyíti a szerkezeti vagy számbeli rendellenességek meghatározását. A következő sávtechnikákat alkalmazzák. **G-sávozás**: (savas-sós Giemsa-festés) a legelterjedtebb módszer a klinikai citogenetikai laboratóriumokban (l. 2-2. és 2-3. ábra). Minden kromoszómapár a rá jellemző, jól festődő, sötét (G^+) és gyengén festődő, világos (G^-) sávok váltakozásából adódó mintázattal festődik. **Q-sávozás**: (quinacrin festés) UV fényel megvilágítva fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálható, élénken fluoreszkáló Q^+ sávokat hoz létre, amelyek gyakorlatilag egybeesnek a sötétén festődő G^+ -sávokkal. Ismert technikák még a reverz- vagy **R-sávozás**, a **C-sávozás** (amely főleg a centromert festi) és a **T-sávozás** (amely a telomerre specifikus). A sávok a kromoszómáknak a géneknél sokkal nagyobb egységeit tüntetik fel (kb. 50-100 gén lehet egy sávban).

A metafázis kromoszómában a kromatin három fő formában létezik: a centroméretet közrefogó **konstitutív** (állandó) **heterokromatin** (C-sávok), a **fakultatív** (változhat, hogy hetero- vagy eukromatin) **heterokromatin** (sötét G-sávok, ill. erősebben fluoreszkáló Q-sávok) és **eukromatin** (R-sávok). A konstitutív heterokromatin az interfázisban is heterokromatikus: ilyen a centromernél található ismétlődő szekvencia (α -szatellita DNS), amely sohasem íródik át, azaz génikusan inaktív, nincs kódoló funkciója. A fakultatív heterokromatin (pl. az inaktiválódott X kromoszómán a pszeudoautoszomális régióban [l. az 1 fejezetben] néhány gén) az interfázisban átírhatóvá válhat.

Itt kell megjegyeznünk, hogy az eddig ismertett vizsgálati eljárások a minor elváltozásokat nem feltétlenül mutatják ki. Az ilyenek detektálására az alábbiakban ismertetendő molekuláris szintű megközelítések alkalmasak. Különös figyelmet igényelnek ilyen szempontból a prenatális citogenetikai analízisek, hiszen akár a tévesen negatív, akár a hibásan pozitív eredmény emberi életet, egy család boldogságát vagy fájdalmát befolyásolhatja.



2-2. ábra

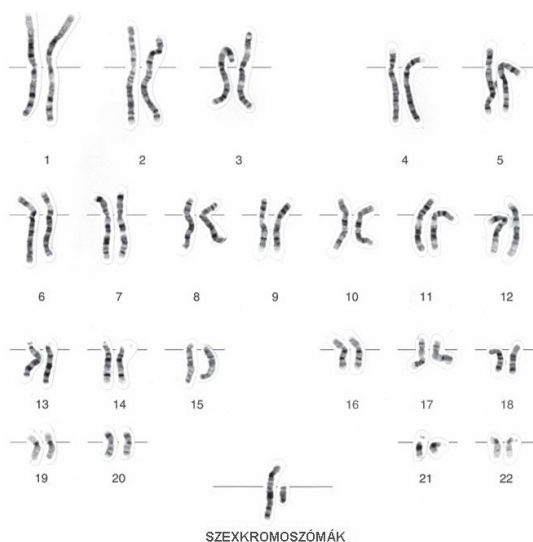
Balra az 1-es kromoszóma sávmintázata,
jobbra a *Homo sapiens* sávidiogramja

A kromoszómán lévő sávok számozása a centromertől távolodva növekszik, akár csak a sávokat nagyobb egységekbe rendező régiók számozása. Az emberi sávidiogram a kromoszómákat a legnagyobbtól kezdődően csökkenő méret és a centromer elhelyezkedése szerinti sorrendbe rendező grafikus ábrázolás, amely feltünteti a G-, Q- és R-sávtechnikával jól festődő (G^+ , Q^+ , R^+) és a variabilisan festődő sávok adta mintázatot is.

Molekuláris citogenetika

Az alábbi speciális technikákat részletesen nem ismertetjük, de klinikai jelentőségük miatt fontosnak tartjuk a megemlítésüket. A **fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)** technika a fent ismertetett módszerekkel szemben interfázisban levő sejtmag esetén is elvégezhető, ezért az **interfázisos citogenetika** tárgykörébe is tartozik. Mivel nem szükséges hozzá osztódó sejt (elegendő egy vér- [vagy biopsziából származó egyéb] sejtkenet, vagy egy szöveti metszet is), gyorsabban eredményt ad (akár 2-24 óra alatt). Nem csak kromoszóma többletről és -hiányról, hanem kisebb kromoszóma-átrendeződésekről, sőt a keresett gén meglétéről, ill. pontos helyzetéről is kaphatunk értékes információkat. Egyidejűleg többféle DNS szekvencia vizsgálata is lehetséges. Ismétlődő szekvenciákat is ki tudunk mutatni

ezzel a megközelítéssel, például a centromer, telomer, vagy más heterokromatikus régiókban. Habár költséges, de számos előnye miatt a FISH ma már egyre jobban előtérbe kerül a hagyományos eljárásokkal szemben: pl. tumorok, prenatális vizsgálatok stb.



2-3. ábra

Rendezett humán kariogram

Egy prometafázisban lévő sejt Giemsa-festéses technikával (G-sávozás) kezelt kromoszómái. Normális férfi kariogram. Kariotípus: 46,XY. (A női kariotípus 46,XX, azaz ebben két homológ X kromoszóma van.)

Az **összehasonlító genomikahibridizáció** (*Comparative Genomic Hybridization* = CGH) az átlaghoz képest megváltozott kópiaszámú DNS-ről ad információt. Különösen elterjedten használják

az eljárást tumorsejtek megváltozott DNS-állományának vizsgálatára. (Bővebben I. a 12. fejezetben.)

Kromoszóma-rendellenességek

Számbeli kromoszóma-rendellenességek

Triploidia, tetraploidia. Ha egy egyed minden sejtmagjában n darab kromoszóma (egyszeres, haploid kromoszóma készlet) egész számú többszöröse van jelen, akkor **euploidia**ról beszélünk. Euploidia ennek megfelelően az n (haploid), $2n$ (diploid), $3n$ (**triploid**), $4n$ (**tetraploid**) kromoszómaszám, és általában a **poliploidia** ($5n$, $6n$, $7n$ stb.) is. Ember esetén már a triploid állapot is összeegyeztethetetlen az étellel, spontán vetélésből származó abortumokban vagy – sokkal ritkábban – halva született magzatokban írták le. Legtöbb esetben akkor alakul ki, ha egy petesejtet két hímvarsejt termékenyít meg. De az is triploidiahoz vezet, ha a meiózis szenved zavart, aminek eredményeképpen diploid petesejt vagy hímvarsejt keletkezik. Magasabbrendű állatokban a poliploidia – az emberhez hasonlóan – letális, de egyes növényfajok jól tolerálják, sőt gyakran a termesztés szempontjából kedvezőbb tulajdonságúak az ilyen fajták.

Aneuploidiaról beszélünk, ha nem n egész számú többszöröse észlelhető az érintett egyén kariotípusában, hanem kromoszóma garnitúrája $2n+1$ -nek vagy $2n-1$ -nek felel meg. Az aneuploidiaikat feloszthatjuk tehát **hiper-** és **hipodiploidia**kra,

aszerint, hogy 46-nál több, vagy kevesebb kromoszóma található egy-egy sejtmagban. Egy bizonyos kromoszómából a szokásos homológ pár mellett megjelenő harmadik példány esetén az illető kromoszóma **triszómiájáról** beszélünk. Csak azoknak az autoszómnak a triszómiája fordulhat elő egy újszülöttnben, amelyekben a többihez képest a legkevesebb gén található, azaz a 21-es, 18-as és a 13-as kromoszómák triszómiája (ne felejtjük el, hogy ezek miatt sokkal több embrió elpusztul a méhen belül, mint ahány továbbfejlődhet és megszülethet végül, és az utóbbi két kromoszóma triszómiája esetén igen rövid ideig élhet a gyermek). **Monoszómia** esetén a homológ párnak csak az egyik tagja van meg, ami az X kromoszómát kivéve tiszta formában letális. Bizonyos daganatos kromoszóma-rendellenességek esetén szintén detektálható monoszómia.

Hogyan jöhetnek létre a kromoszómák számbeli eltérései? A legegyszerűbb lehetséges mechanizmus a **kromoszómakésés**. Ez azt jelenti, hogy egy kromoszóma mozgása akadályozott a sejtosztódás anafázisában, és a telofázisban lekési a sejtmag újrászerveződését, kívül marad a magborítékon és a citoplazmában lebomlik, aminek a következménye monoszómia.

A szét-nem-válás (**nondiszjunkció**) jelensége nem csak a kromoszóma-hiány, hanem a kromoszóma-többlet létrejöttét is megmagyarázhatja. A **mitotikus nondiszjunkció** esetén egy sejt és annak leszármazottai (egy sejtvonala) mutatják a rendellenességet (l. a mozaicizmust alább). Ez jellemzően testi sejtekre vonatkozik, ezért nem öröklődik, ám daganat képződést okozhat. A **meiotikus nondiszjunkció** a teljes szervezetet érinti akkor, ha az ivarsejtek hibás meiózisa során keletkező kromoszóma-hiányos (nulliszómiás) vagy többletes (diszómiás) spermium vagy petesejt vesz részt a zigóta kialakításában (2-4. ábra). Nagyon ritkán előfordulhat, hogy meiózis I- és meiózis II-ben is nondiszjunkció következik be, vagy pedig a petesejtben is és az azt megtermékenyítő hímvarsejtben is. Ilyen esetekben az adott kromoszóma 4-5 példányban lehet jelen a zigótában, ami csak a nemi kromoszómák esetén egyeztethető össze az étellel (l. alább).

Néhány humán példa az autoszómalis aneuploidiákra

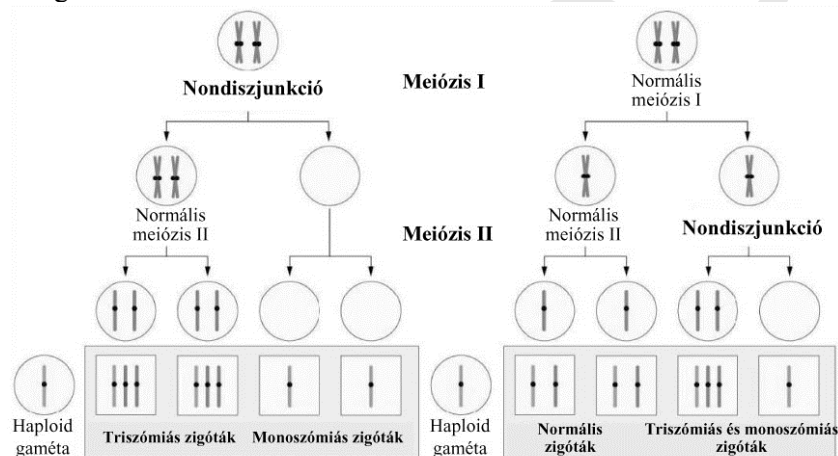
Ezek közül a **Down szindróma** a legismertebb. Kariotípusa: 47,XX,+21, ill. 47,XY,+21 (egy férfi kariogramját lásd a 2-4. ábrán). Csak néhány jellemző tünetet (az összes együtt nem fordul elő!) említünk: kerek, lapos arc, mongol redő (epicanthus) a felső szemhéjon, nagy nyelv, petyhüdt izmok, laza ízületek, testi és értelmi fejlődés visszamaradottsága, szívfejlődési rendellenesség, fogékonyság a fertőzésekre, hajlam a leukémiára. A Down kóros férfiak sterilek, a nők képesek gyermeket szülni.

A 13-as és 18-as triszómia (**Patau**, ill. **Edwards szindróma**) olyan súlyos fejlődési rendellenességekkel járnak, amelyek – ha egyáltalán élve születik meg a magzat – csak rövid idejű túlélést tesznek lehetővé.

Mozaicizmus

Genetikában mozaicizmusnak nevezzük azt a jelenséget, hogy egy egyedben – amely egyetlen petesejt egyetlen spermium általi megtermékenyítéséből származó

zigótából fejlődött – eltérő génösszetételű (nem daganatos!) sejtek találhatóak. Ha ez citogenetikai rendellenességként jelentkezik, **kromoszóma mozaikról** beszélünk. Elvileg ilyen esetekben három: egy euploid, egy hiperdiploid ($2n+1$) és egy hipodiploid ($2n-1$) sejtvonallal kellene számolnunk, a gyakorlatban azonban ez utóbbi általában életképtelennek bizonyul, és ezért $2n/2n+1$ képletű kariotípus észlelhető. A mozaik egyedek fenotípusa igen változatos lehet az alig észrevehetően rendellenestől a nagyon súlyos elváltozásokat mutatóig. Ennek az az oka, hogy a test nem minden esetben mozaik teljes egészében, hanem előfordulhat, hogy csak egészen kis területet érint a mozaicizmus, csak bizonyos szöveteket, vagy bizonyos szervet, attól függően, hogy az osztódási zavar az egyedfejlődés mely stádiumában és milyen elkötelezettségű sejtben következett be. A mozaicizmus diagnosztizálása emiatt nehéz feladat. Az is előfordul, hogy teljesen egészséges ember is mozaiknak tűnik, ha a belőle származó sejtek tenyésztése közben spontán nondiszjunkció történik. Ez a jelenség viszonylag gyakori korionbióhióból származó sejt kultúrák esetén, ami komolyan számbaveendő hibaforrást jelent a prenatális diagnózis felállításában.



2-4. ábra

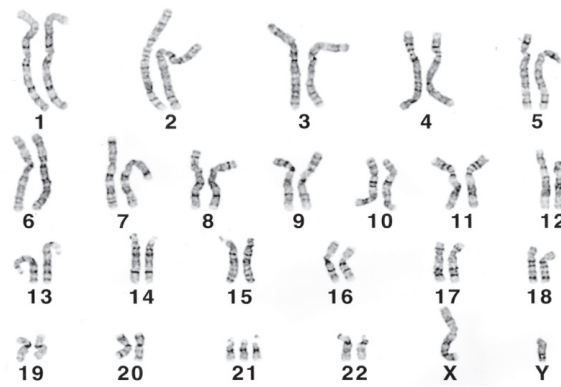
Meiotikus nondiszjunkció

Az üres körök a nulliszómiás, kromoszóma-hiányos ivarsejteket ábrázolják, a négyzetek pedig egy nondiszjunkciós sejtosztásból származó és egy normális kromoszómaszámú ivarsejt összeolvadásából keletkező zigótát.

Kimérizmus

Különböző geno- ill. kariotípusú sejtek lehetnek fel egyetlen egyedben, de ezek két különböző zigótából származnak és egyik sejt vonalnak sem kell aneuploidnak lennie. Kiméra kialakulásához vezethet pl. a kétpetéjű ikrek esete közös méhlepénnyel, mivel ilyenkor vérképzőrendszeri őssejtek kerülhetnek át az ikertestvére (egy- vagy kétirányúan) és ott megtelepedve saját sejt vonalat hoznak létre. Leányfiú pár esetén $46,XX/46,XY$ kiméra kariotípus is előfordulhat a csontvelői és onnan

származó sejtekben. Lehetséges két zigóta összeolvadása is. Ilyen esetekben két petesejtet termékenyít meg két különböző spermium, vagy – ami sokkal valószínűbb –, egy petesejtet és egy polocitát. Ez utóbbi elvileg nem életképes, de maradhat olyan szoros kapcsolatban a valódi zigótával és az abból származó sejtekkel, hogy az egyén tulajdonképpen a két megtermékenyített sejtből egyesült embriókezdeményből fejlődik ki. Ez génszintű különbséget minden esetben jelent, feltűnő következménye általában viszont csak a 46,XX/46,XY kiméra kialakulása esetén észlelhető: a nemi fejlődés zavaraiiban, különféle hermafroditákban írtak le ilyen kariotípust. Megjegyzendő, hogy a manapság egyre szélesebb körben alkalmazott szervátültetésnek, össejt beültetésnek jatrogén (orvosi beavatkozásból származó) kimérizmus a következménye.



2-5. ábra

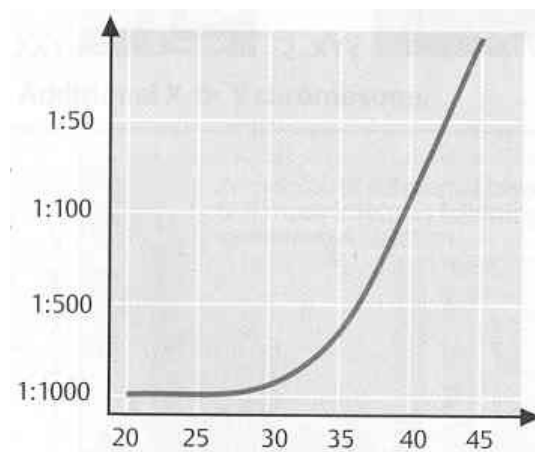
Down kóros férfi kariogramja

Kariotípus: 47,XY,+21.

2-6. ábra

A 35. életév fölött erőteljesen emelkedik a Down kóros utód világrahozatalának esélye

21-es triszómiás (Down kóros) születések gyakoriságának (függőleges tengely) függése a fogamzás-kori anyai életkortól (vízszintes tengely)



Szerkezeti kromoszóma-rendellenességek

Ezek lehetnek öröklöttek de megemlítendő, hogy viszonylag ritkán okoznak öröklődő betegségeket. Újjonnan is létrejöhetnek: igen ritkán spontán módon keletkeznek, gyakrabban azonban valamilyen „kromozómatörő” (ún. *clastogen*) ártalom (pl. ionizáló sugárzás, valamely vírusfertőzés vagy kemikália) idézi elő ezeket és idővel daganat jöhet létre miattuk. Lehetnek kiegyensúlyozatlanok, amikor a genomnak egy kis hányada hiányzik vagy van meg fölös mennyiségben, vagy kiegyensúlyozottak, amikor sem génhiány, sem géntöbblet nem mutatható ki, mivel a kromoszómaszakaszok átrendeződése vezet a különböző elváltozásokhoz.

Deléció. Egy vagy több kromozómarészlet elvesztése. Klinikai következménye függ a hiányzó kromozómadarab méretétől, az érintett gének számától és funkciójától. Ha a kromozóma végek vesznek el, terminális delécióról beszélünk (ide sorolandó pl. a **gyűrűkromoszóma** létrejötte is, amelyben a rövid és a hosszú kar vége egyaránt elvész és a tört végek összeforrnak). Ha a kromoszóma centromerjét is magába foglaló rész vész el, az így létrejövő instabil kromoszóma fragmentek legkésőbb a soron következő sejtosztódás során elvesznek.

A **Cri du chat szindróma** (macskanyávogás betegség) esetén az egyik 5-ös kromoszóma rövid karjából vész el egy darab. Kariotípus pl.: 46,XX,5p- (a mínusz jel a kar megjelölése után írva arra utal, hogy a rövid karból csak egy darab deletálódott, nem pedig az egész). A név onnan származik, hogy az e rendellenességgel született csecsemők gégeje nem fejlődik rendesen, ezért kezdetben olyan hangot hallatnak síráskor, mintha egy kismacska nyávogna valahol a szobában. A kórkép rendkívül súlyos mentális defektussal jár, ezek a betegek teljes körű ellátásra és ápolásra szorulnak.

Duplikáció. Egy kromozómarészlet megkettőződése. (Ha a homológ kromozómapár tagjai egymás mellett hossztengelyük mentén elcsúszva, nem a megfelelő pozícióban képeznek párt egymással a meiózis I-ben, akkor a crossing over egyenlőtlenül, nem a normális módon zajlik, ezért megkettőződhet egy kromoszómaszakasz úgy, hogy a másodpéldány az eredeti mellé kerül, miközben a másik homológ kromoszómán deléció történik).

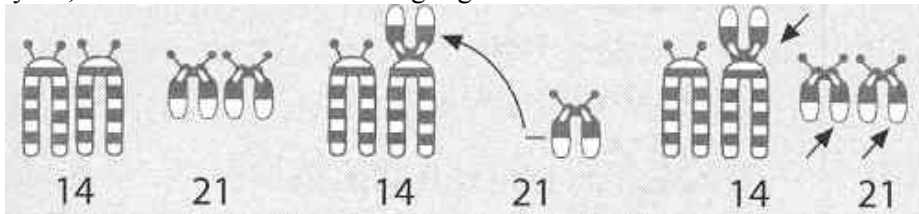
Izokromoszóma. Két hosszú vagy két rövid kart tartalmaz az adott kromoszómából. Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a metafázis→anafázis szétválás nem a kromoszóma hossztengelye mentén, hanem arra merőlegesen történik, azaz nem a testvérkromatidok válnak el egymástól. Legismertebb az X hosszú kar izokromoszóma: i(Xq), amit Turner szindrómás (l. bővebben alább) betegekben írtak le. Kariotípusa ebben az esetben a tipikus 45,X monoszómiától eltérően 46,X,i(Xq), ami Xp monoszómiát és Xq triszómiát jelent. Számos autoszóma esetén is találtak már izokromoszómát, ezek gyakran fordulnak elő daganatokban is.

Transzlokáció. Egy kromozómarészlet áthelyeződése. **Reciprok transzlokáció:** szakaszok kicserélődése nem homológ kromoszómák között. Mivel a kicserélődéskor a kromoszómaállományban számbeli változás nem történik, és a génállományban sincs mennyiségi változás, ezért a reciprok transzlokáció kiegyensúlyozott. Ez a rendellenesség lehet teljesen tünetmentes, de bekövetkezhet olyan átrendeződés is, ami génszekvenciát szakít meg, vagy egy adott gént a számára fizioló-

giás szabályozási környezetből olyanba helyez át, ahol vagy nem működik vagy túlműködik. Az intézeti ellátásra szoruló mentálisan retardált egyének körében gyakrabban fordul elő ez a rendellenesség, mint az átlagpopulációban. Kiegyensúlyozott és tünetmentes transzlokáció-hordozók is átadhatják azonban a rendellenességet kiegyensúlyozatlan transzlokáció formájában, ami súlyos fenotípusos elváltozásokkal járhat, mivel az utódban duplikáció, deléción vagy egyidejűleg mindkettő gondot okoz. Fennáll a veszélye annak is, hogy a transzlokáció miatt lehetetlenné válik a meiózis normális lefolyása, ami meddőségi panaszokat okoz.

Robertson-féle transzlokáció: centrikus fúzió, a reciprok transzlokáció sajátos esete. Ez két akrocentrikus kromoszóma centromer régiója között lejátszódó átrendeződés következménye úgy, hogy az egyik partner rövid karja helyére a másik hosszú karja lép, mivel a centromer (körüli) régiók egymáshoz tapadnak. A transzlokáció eredményeképpen a két résztvevő kromoszóma rövid karja elvesz. Ez azért nem okoz problémát a kiegyensúlyozott hordozóban, mivel 5 pár akrocentrikus kromoszómánk van, amelyek rövid karjain a **nukleolusz organizátor régió (NOR)** található, amely nagyszámú, rRNS-t kódoló gént hordoz. Ha a 10 akrocentrikus kromoszómából kettő elveszti ezeket a szakaszokat, akkor is elegendő számú rRNS génje marad a transzlokációt hordozó egyénnek. Bár mindenféle kombinációban megfigyelték már az akrocentrikus kromoszómák között a Robertson-féle transzlokációt, a leggyakoribb mégis a 14-es és 21-es kromoszómák hosszú karjának centromerikus fúziója. Ez az átrendeződés tehát nem jelenik meg a kiegyensúlyozott hordozó fenotípusában, de ő az utódjába kiegyensúlyozatlan formában is átörökítheti. Egy hordozó nő nagyobb eséllyel adja át kiegyensúlyozatlan formában a transzlokációs kromoszómát, mint egy hordozó férfi. A folyamat legismertebb, klinikai jelentőséggel bíró következménye a **transzlokációs Down szindróma** kialakulása. A tünetek tökéletesen azonosak a nondiszjunkciós 21-es triszómiáéval. A szülő kariotípusa ebben az esetben, pl. női hordozó esetén: 45,XX,-14,-21,t(14;21)(14q;21q). A beteg gyerek sejtjeiben viszont 46 kromoszóma van, de a génállomány lényegében a 21-es triszómiáéval azonos. A kariotípus leggyakrabban 46,XY,-14,t(14;21)(14q;21q) – férfi beteg esetén. Ritkán a transzlokációs Down szindróma kialakulhat valamely szülő ivarsejtjének képzése közben történt transzlokációs esemény miatt (*de novo* [lat] = újonnan), így az, akiben kialakult és annak utódai továbbörökíthetik a két fuzionált hosszú karból álló kromoszómát. Egy klinikailag egyértelműen Down szindrómás újszülöttről tehát kromoszóma vizsgálattal mindenképpen meg kell állapítani, hogy transzlokációs Down szindrómában szenved-e, mivel ez esetben valamelyik szülő – kiegyensúlyozott formában – hordozhatja a fuzionált kromoszómákat, és ha az elváltozás nem benne alakult ki *de novo*, akkor örökölte, azaz a közvetlen rokonai (testvére, unokatestvére) is hordozók lehetnek. Abban az esetben, ha a szülő kiegyensúlyozott hordozó, akkor a Robertson-féle transzlokációs Down szindróma ismétlődési kockázata nem függ az anya életkorától, mivel kiegyensúlyozatlan formában való továbbadás elméleti esélye fiatal és idősebb anyánál is egyöntetűen 1/3. Szerencsére a gyakorlatban a

hordozó nőknél nagyjából „csak” 10%, a hordozó férfiaknál 5% ez a kockázati tényező, ami azonban továbbra is magas genetikai rizikónak számít.



2-7. ábra

Robertson-féle transzlokáció = centrikus fúzió

Balra: normál diploid állapot: két 14-es és két 21-es kromoszóma. Középen: kiegyensúlyozott transzlokáció. Az egyik 21-es kromoszóma hosszú karja átkerült az egyik 14-es rövid karja helyére. Jobbra: ugyanaz a transzlokációs állapot, mint a megelőző formában, de két 21-es kromoszóma jelenlétében, azaz kiegyensúlyozatlan, Down-kórhoz vezető transzlokációs kromoszóma-képlet.

Inszerció: egy kromoszómárészlet áthelyeződése egy másik kromoszómára (ami tulajdonképpen egy egyirányú, nem reciprok transzlokáció). Inszercióról tehát akkor beszélünk, ha egy kromoszómán létrejött törésbe egy másiktól származó darab illeszkedik be azonos vagy fordított orientációban, és a törvégek összeforrnak. Mivel létrejöttéhez három kromoszómátörés együttes jelenléte szükséges, az inszerció meglehetősen ritka strukturális rendellenesség.

Inverzió. Egy kromoszómárészlet eredeti helyén való megfordulása törés és újraegyesülés mechanizmusával⁵. A legtöbb inverziónak nincs klinikai jelentősége, nem befolyásolja az egyén szaporodási képességét. Ha azonban a törés fontos kódoló vagy szabályozó szekvenciákban történt, ezek hiányának, ill. működésbeli zavarának tünete(i) léphet(nek) fel. Legnagyobb veszélye a meiózis megzavarásában van, aminek komoly fertilitási zavarok és/vagy az utódba kiegyensúlyozatlan géntípus átadása lehet a következménye.

Kromoszómátörés. Nem valódi törés, hanem a kifejezés itt a metafázis kromoszóma esetében a testvérkromatidokon azonos helyen látható elvékonyodásra utal, amely nem jelenti a kromatin megszakadását. Figyelmeztető jel lehet tekintetben, hogy valamilyen clastogen (kromoszómátörő) ártalom érte az egyént. Kémiai és fizikai mutagén hatások jelentősen fokozhatják a kromoszómátörések gyakoriságát, olyannyira, hogy ennek kimutatását szűrővizsgálati eljárásaként szokták alkalmazni olyan dolgozók terhelésének ellenőrzésére, akik ilyen veszélyeknek kitett munkahelyeken dolgoznak.

⁵ A **paracentrikus inverzió** valamely kromoszómakaron történik, nem érinti a centromert, míg a **pericentrikus inverzió** a centromert is magába foglaló kromoszómadarab megfordulását jelenti.

Nem tartozik szorosan ide, de meg kell említenünk a **testvérkromatid kicserélődést (SCE = sister chromatid exchange)**. Ez a meiotikus crossing overrel állítható párhuzamba, de mivel testvérkromatidok között történik a mitózis folyamán, így tökéletesen azonos DNS szakaszok kicserélését jelenti, tehát genetikai következményei nincsenek (kivéve, ha a két testvérkromatid egymáshoz képest elcsúszva vesz részt az eseményben). Megfelelő technikákkal az SCE jól kimutatható, és egy bizonyos gyakoriságig ez teljesen normálisnak mondható. Kóros viszont, ha egy egyénben megnő a száma. Ez egyfelől a kromoszómatoréshez hasonlóan lehet clastogen ártalom következménye, és ezért szűrővizsgálati célból szintén használható a kimutatása, másrészt olyan örökletes betegségekhez társul (mint pl. a *xeroderma pigmentosum*, l. a 8. fejezetben), amelyekben génikusan zavart a DNS javító mechanizmus.

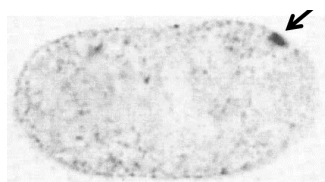
A nemi kromoszómák és a nem meghatározásának genetikája

A nemi kromoszómákat szembevetve méretbeli különbségük és a rajtuk lévő gének száma és minősége miatt nem tekintjük homológoknak, de szétválásuk a férfi meiózisban ugyanúgy történik, mint az autoszómáké, és a rajtuk lévő pszeudo-autoszómális régiók (PSAR, 1-5. ábra) között géncsere is létrejöhet. Fontos (de nem kizárólagos) szerepet töltenek be az ivari kétalakúság kialakításában. A spermiogenezisben a magasabb fejlettségű emlős fajokban alapvetően kétféle haploid gaméta keletkezik: a 22 autoszóma mellett vagy X-et, vagy Y-t hordozó. (A hímeket ennek alapján **heterogamétás nemként** említik.) Az X kromoszómán több mint négyszer annyi gén található, mint az igen génszegény Y kromoszómán. Emiatt gondot okozna, hogy a nőkben az X kromoszómán lévő génekből dupla mennyiség található, mint a férfiakban, és ugyanígy a géntermékekből is kétszer annyi lenne a sejtekben. A valóságban a nőkben és a férfiakban azonos mennyiségű géntermék van, ami a **géndózis-kompenzációnak** nevezett jelenségnek köszönhető. A két nem közötti eltérést a természet úgy küszöböli ki (kompenzálja), hogy a női nemben a két X kromoszóma közül az egyik inaktiválódik az embrionális fejlődés korai szakaszában, és heterokromatikus Barr-testként (felfedezőjéről, Murray Barr-ról elnevezve) tapad az interfázisban a magboríték belső felszínéhez (Mary Lyon nevéhez fűződik a Barr-test jelenlétének [2-8. ábra] értelmezése, amit Lyon-hipotézisként is szoktak emlegetni). (Az inaktiváció mechanizmusát l. a 7 fejezetben.)

A nem kialakításáért az Y felel, a normális nemi fejlődésben pedig mind az X, mind az Y szerepet játszik, de feladatot kap ebben számos autoszómális gén is. Alapvetően ugyanez igaz a többi emlős fajra is, kisebb-nagyobb eltérésekkel vagy variációs lehetőségekkel. (A madarak esetén a heterogamétás nem a nőstény, nemi kromoszóma-képlete ZW, a hímek a homogamétások: ZZ. Egyes hüllőfajokban a tojások kikelésének idején uralkodó környezeti hőmérséklet befolyásolja a nem kialakulását.)

Hogy az anyai és apai X kromoszómák közül melyik inaktiválódik, az – mai ismereteink szerint – teljesen a véletlen műve, de ha ez megtörténik, akkortól fogva

minden utódsejtben ugyanaz az X válik Barr-testté, azaz kb. a női test 50%-ában az apai, másik 50%-ában az anyai X lesz inaktív, teljesen véletlenszerű eloszlásban⁶. A folyamat nem fordítható vissza, nem lesz újra működőképes X kromoszóma a Barr testből (csak az ivarsejt-képzésben résztvevő sejtek jelentenek kivételt ez alól, ott újra aktiválódik az X). Ha az egyed egyik X kromoszómája rendellenes, akkor minden sejtben az inaktiválódik (pl. az X izokromoszóma). Ha kettőnél több X kromoszóma van, akkor is mindig csak egy X kromoszóma marad aktív, az összes többi inaktiválódik. A férfiakban és más, csak 1 X kromoszómát tartalmazó kariotípus esetén nincs Barr test, de pl. 47,XXY kariotípus (Klinefelter szindróma) esetén férfiakban is van.



2-8. ábra

Inaktiválódott X kromoszóma, azaz Barr-test
(nyíllal jelölve egy emberi fibroblaszt magjában)

Az emberi nemi fejlődésben különböző, egymásra épülő szinteket és ezek molekuláris folyamatait tartjuk nyilván. Elsődleges a **kromoszomális nem** meghatározása. Ez a fertilizáció, a zigóta kialakulásának pillanatában dől el. Ha X-et hozó spermium termékenyíti meg a petesejtet, nőnemű utód fogantat, ha Y, fiú lesz – várhatóan – az utód, a dolgok szokásos menete szerint.

Minden zigóta alapvetően női irányban fejlődik, pontosabban beavatkozás nélkül nővé válik, de az Y-on található **SRY** (*sex-determining region Y*) gén terméke, a **TDF**-ként emlegetett testis determináló faktor (és az általa befolyásolt egyéb gének működése) az embrionális életszakasz kb. 7. hetében hím irányba tereli a fejlődés útvonalát, azaz here kialakulását segíti elő az addig differenciálatlan ősgonádból. Ha az **SRY** hatása elmarad, mert nincs is ilyen gén a genotípusban (vagy mert 46,XX a kariotípus, vagy mert az Y-ról deléción miatt eltűnt), az ősgonád sejtjei az alapállapotnak vett női irányban fejlődnek tovább. Az **SRY** gén nem befolyásoló jelentőségét mutatja, hogy ha ez a gén áthelyeződik az X kromoszómára, és az apa ezt örökíti tovább, akkor a 46,XX kariotípusú zigótából fejlődő egyed férfias fejlődési utat fog bejárni, bár ez – a két X jelenlétében – nem lesz zavartalan (fenotípusa a Klinefelter szindrómásokéhoz hasonló lesz). Hogyan kerülhet az **SRY** a he-

⁶ Ez elvi (statisztikai) megoszlás, amitől egyedi esetekben jelentős eltérés is keletkezhet. Ennek X-hez kötött gén(ek)re heterozigóta (*carrier*) nők esetén lehet jelentősége (l .3. fejezet): a recesszív allél hatása megjelenhet a fenotípusukban.

lyéről egy X-re? Mind az Y, mind az X kromoszóma rövid karja végén található egy rövid pszeudoautoszomális (PSAR) régió (l. 1-5. ábra). Ezen a területen a két kromoszóma homológja egymásnak, ezért itt lehetséges crossing over közöttük. Az *SRY* közvetlenül a PSAR régió közelében helyezkedik el, ezért egy hibás rekombinációs esemény áthelyezheti az X kromoszómára.

A normális fejlődés következő szintje a **gonadalis nem** kialakulása. Ebben is a hím irányú differenciálódás domináló hatását figyelhetjük meg. A magzati here fejlődésének igen korai szakaszában már androgén hormont termel. Ha nincs ilyen hormontermelés, vagy van hormontermelés, de a sejtek nem tudják felfogni ezt a jelet a környezetükből (**testicularis feminisatio**, leírását l. a 3. fejezetben), akkor a szervezet automatikusan a női utat követi. A hormontermelés elmaradását az *SRY* gén megléte ellenére más, a magzati here kifejlődéséhez szükséges gének defektje okozhatja.

A **genitális nem** szerinti besorolás újszülött korban történik, a külső nemi szervek megtekintése nyomán. Ebből adják meg a csecsemő **jogi nemét**, azaz kap leány vagy fiú személynevet, amivel anyakönyvezik.

A pubertás ideje a **másodlagos nemi jelek kifejlődésének** szakasza. Ez párhuzamosan zajlik a **pszihoszomatikus nem** felépülésével, ill. ez utóbbi kissé előbb is kezdődik, mert a nemi azonosság tudata – főleg környezeti hatásokra – tulajdonképpen már óvodás korban megjelenik.

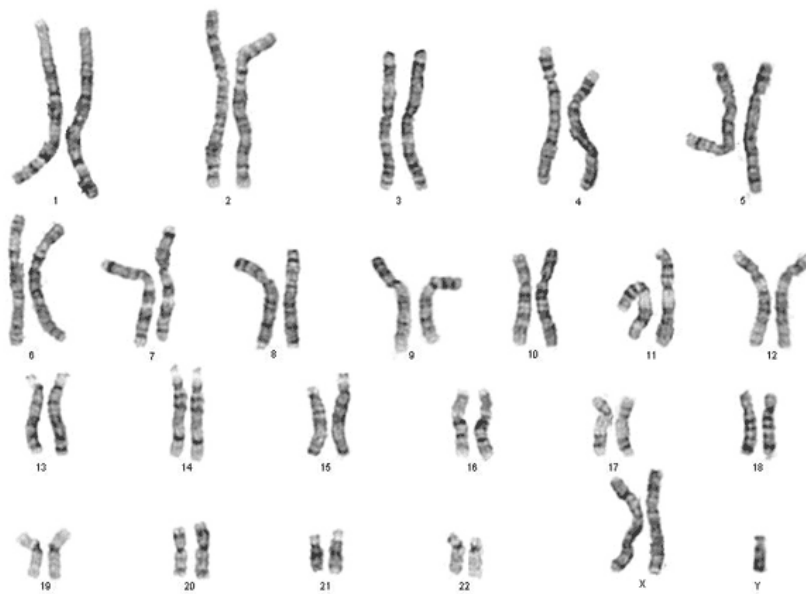
A nemi kromoszómák számbeli rendellenességei

Turner szindróma, 45,X. Ez az egyetlen monoszómia, amely az élettel tartósan összeegyeztethető. Barr test nincs. A fenotípusra jellemző a **szexuális fejletlenség (szexuális infantilizmus)**, az alacsony növés és a tarkóról a nyakra, vállra lehúzó bőrréda. A petefészkek helyén kötőszöveti sejtekből álló **csíkgonád** található, amelyben **sem petesejtérés, sem nemi hormontermelés nincs**, így ovulációs és menstruációs ciklus sem, a másodlagos nemi jelek (ide értve a testszőrzet megjelenését is) nem fejlődnek ki, az egyén steril. Mivel növekedési hormonnal és női hormonokkal kezelve átlagoshoz közeli magasság és a női másodlagos nemi jelek bizonyos mértékig kialakíthatók, ez megkönnyíti a betegek életét, javítja társadalmi beilleszkedésüket, de nem gyógyíthatja meg őket, és továbbra is gondot okoznak a pszichés problémák. Bár az élettel összeegyeztethetőnek neveztük a fentiekben a Turner szindrómát, meg kell jegyezzük, hogy nagyon nagy számban elpusztulnak az ilyen kariotípusú embriók a méhen belül.

A fentebb már említett **X hosszú kar izokromoszóma** jelenléte is okozhat Turner szindrómát 46,X,i(Xq) kariotípussal. Fenotípusosan a fent leírt képhez hasonló, de van egy Barr-test, ami mindig az izokromoszómából származik⁷.

⁷ Az említett bőrréda (pterygium colli) és az újszülöttön megfigyelhető lábháti ödéma feltétlenül indokolja az újszülött kariotípusának megállapítását – lehetőleg még a köldökzsinórból a szülőágyon vett vérből – az esetleges későbbi hormonális kezelés, ill. a megfelelő

Klinefelter szindróma. A **47,XXY** kariotípus (2-9. ábra) mellett, amely majdnem normális szellemi fejlődést tesz lehetővé, előfordulnak olyan kariotípus-verziók is, amikben legalább egy Y mellett több X kromoszóma szerepel. A **48,XXYY**, **48,XXXYY**, **49,XXXXYY**, **50,XXXXXY** esetén minél több X van jelen, annál súlyosabb mentális retardáció figyelhető meg, (a Barr testek száma pedig mindig eggyel kevesebb, mint az X kromoszómák száma). Enyhén nőies jellegű férfias fenotípus és általában magas növény jellemez minden Klinefelter szindrómás beteget, mivel emlőre hasonlító zsírfelhalmozódás és nőies testszőrzet, a szakáll-növény elmaradása teszi eunuhoid jellegűvé a beteget. A külső nemi szervek csökevényesek, a here nem vagy alig termel hormont és nincs spermium-képzés sem, ami sterilitást okoz.



2-9. ábra

Klinefelter szindróma rendezett kariogramja

Kariotípus: 47,XXY

Triplo-X állapot, X kromoszóma triszómia, 47,XXX. Nem jár olyan tünetekkel, amelyeket egy szindróma név alatt foglalhatnánk össze. A sejtmagokban két Barr-test figyelhető meg. Normál női fenotípus jellemzi. Két X kromoszómát hordozó petesejtjei lehetnek, amelyek miatt utódaiban előfordulhat triplo-X állapot vagy Klinefelter szindróma (47,XXY). Ha több X kromoszóma is jelen van (**48,XXXX**, **49,XXXXX**), az már az X-inaktiválódás ellenére is értelmi fogyatékoságot okoz.

pszichoszomatikus életvezetés szempontjából. Ezt a diagnózist semmiképpen sem szabad Barr-test vizsgálatra alapozni, mert i(Xq) is állhat a Turner szindróma hátterében.

Dupla Y állapot, 47,XYY. Normális férfias fenotípus jellemzi, esetleg az átlagosnál magasabbak. Az utódokban Klinefelter-szindrómát okozhat.

Különleges helyet foglal el az X kromoszóma strukturális rendellenességei között a **fragilis (törékeny) X szindróma** (l. még a 3. fejezetben). A valóságban nincs eltörve a kromoszóma⁸, csak jelentősen elvékonyodott, mivel az ezen a szakaszon (Xq28) található *FMRI* génben egy olyan mutáció történt, ami meghosszabbította az adott gén hosszát (egy bázishármas ismétlődési számának jelentős megnövekedése, triplet expanzió, l. a 9. fejezetben), ezért annak működése zavart szenved. (A gén jelölése a **familiáris mentális retardáció** kórképéből származik.)

Prenatalis genetikai diagnosztika

Hogyan és miért kerül ez a témakör a kromoszóma-rendellenességeket tárgyaló részbe? Történeti okokból kifolyólag. Amikor a technikai lehetőségek fejlődése már megengedte, hogy az anyaméhben növekvő magzataból sejtmintát vegyenek és azt citogenetikai vizsgálatnak vessék alá, a legégetőbb probléma a Down-kóros gyermekek születésének megelőzése volt a fogantatás idején 35 évesnél idősebb anyák esetén. Ez, ebben az esetben, bár vannak gyanújelként értékelhető szűrővizsgálati leletek, végső soron csakis a magzat (vagy embrió) kariotipizálásával bizonyítható. Mára már számos olyan eljárást is ismerünk, amelyek akár monogénes genetikai betegségek megelőzésében is haszonnal alkalmazhatók. A legmodernebb diagnosztikus megközelítések között megjelentek a nem invazívak is. Ezek közül több már szerves (és kötelező) része a terhesgondozásnak, szűrővizsgálat jelleggel. Alkalmazásukhoz anyai vérvételre és ultrahang vizsgálatra van szükség. Az anyai vérből meghatározható *α-foetoprotein* (AFP), mint neve is mutatja, magzati eredetű. A prenatalis genetikai diagnosztikában magasabb vérszintje a nyitott gerinc fennállásának indikátoraként szerepel, az átlagosnál alacsonyabb szintje a 21-es triszómia jelzője lehet. Mindkét irányú eltérés feltétlenül szükségessé teszi a magzati ultrahang vizsgálatot.

A várandósság idejét három trimeszterre szokás felosztani. Már az első végén (nagyjából a 12. terhességi héten) az **ultrahangos képalkotás** révén számos jellegzetesség utalhat a Down-kórra, pl. láthatóvá váló tarkótáji redő. A végső szót minden ilyen esetben a kromoszomális diagnózis mondhatja ki. Ha azonban sem az AFP, sem az ultrahangos vizsgálat nem szolgál ilyen irányú gyanújellel, megkímélhetik az anyát és magzatát egy invazív beavatkozás kockázataitól.

Az AFP meghatározáshoz mára már több egyéb, az anyai vérből elvégezhető biokémiai vizsgálat is csatlakozott, amelyek segítik a kockázat megítélését. Ne feledjük viszont, hogy az érzékenység növelése itt is, mint annyi más laboratóriumi vizsgálat esetén, emelheti az álpozitív leletek gyakoriságát.

⁸ A jelenség csak bizonyos sejtenyészési körülmények között jelenik meg.

A legmodernebb technikával az anyai vérből magzati sejteket, vagy magzati DNS-t nyernek ki és annak tanulmányozásából állítanak fel diagnózist. Ezt a megközelítést a triszómiák kimutatására már használják a gyakorlatban is, de még nem szorította ki a hagyományos eljárásokat.

Jelenleg az invazívnak vehető prenatális kromoszómavizsgálatra három helyről tudnak meglehetősen nagy biztonsággal embrionális, ill. magzati sejteket nyerni: (i) chorionbolyhokból (CVS = *chorionic villus sampling*), (ii) amniocentesisből, és (iii) magzati vérből. Mindhárom módszernek megvannak az előnyei és hátrányai.

CVS. A chorion extraembrionális függelék, ami ugyanabból a zigótából származik, de sejtjei nem vesznek részt a leendő élőlény kialakításában, hanem csak a méhlepényében, annak is a magzati részében (*placenta foetalis*). A chorionbolyhokból (*chorion frondosum*) optimálisan a 9-11. terhességi héten történhet mintavétel, alkalmas eszközzel a hasfalon vagy a hüvelyen-méhszájon keresztüli behatolással, miközben nagy feloldású ultrahangos képalkotó eszközzel követik a magzat és a mintavételi eszköz helyzetét. A nyert sejtek *in vitro* tenyésztésre alkalmasak, ill. belőlük interfázisos citogenetikai vizsgálat végezhető, valamint DNS izolálható.

Előnye: korai diagnózis lehetősége és hogy ismételhető. Bizonytalanság esetén még mindig rendelkezésre áll a későbbi amniocentesis. Ha az első trimeszterben kapott eredmény kromoszóma-rendellenességet mutat ki, és az anya ennek nyomán meg kívánja szakíttatni terhességét, az egy olyan időpontban végezhető el, amikor művi vetélés – ahol egyáltalán legális – még általában engedélyezett.

Hátránya: előfordulhat mozaikosság (l. fentebb), amely nem érinti az embriót, ezért álpozitivitást, hibás diagnózist és ebből téves indikációjú beavatkozást okozhat. Hátrány továbbá, hogy az ultrahangos vizsgálat legkorábban a 12. héten lehet esedékes és eredményes, azaz nem igen használható párhuzamosan a két módszer.

Amniocentesis. A hasfalon keresztül történő behatolásból (gondos ultrahangos ellenőrzés mellett) vesznek mintát igen vékony tűvel az amnionüregben levő magzatvízből. Az ebben található sejtek garantáltan magzati eredetűek (általában külső [és belső szervi] levált hámsejtek).

Előnye: Nem jelentkezik a megelőzőekben említett mozaikosság. Ha ilyen mutatkozna, az magában a magzatban meglévő rendellenességre utalna. Az amnionüregből származó sejtek *in vitro* tenyészthetők, interfázisos citogenetikai vizsgálatra is alkalmasak, belőlük DNS nyerhető ki, az izolált sejtekből és magából az amnionfolyadékból pedig sokféle biokémiai vizsgálat is kivitelezhető. Ismételhető.

Hátránya: késői elvégezhetősége. Leginkább csak a 16. héten jut a terhesség abba a stádiumba, hogy annyi folyadék gyűljön fel, ami elegendő a biztonságot mintavételhez a magzat megsértése nélkül. A „klasszikus” sejtenyésztes módszer ebben az esetben lassú, néha csak háromheti várakozás után szolgálat elegendő sejtet a kariotipizáláshoz, amikor a terhesség már a 19., a diagnózis felállításakor esetleg már a 20. hetében jár. Ha valamely technikai hiba miatt ismételni kell, és a kariotípus vizsgálati lelete terhességmegszakítást indokolna, az tulajdonképpen már koraszülés beindítása lenne, nem pedig abortusz. Egy esetleges súlyos kromoszóma-rendellenesség kimutatása ennyire megkésetten nem lehet kíván-

atos. Az utóbbi években az interfázisos citogenetikai vizsgálattal a mintavétel másnapján születhet diagnózis. DNS szekvencia- vagy genomikai vizsgálatok nemcsak kromoszomális, hanem mono- vagy poligénes ártalmakat is jelezhetnek.

Magzati vérvétel. Ez a köldökzsinór vénából történhet ultrahangos képalkotással vezérelve, a második trimeszterben. Értelemszerűen ez is invazív, a magzatnak nagy kockázatot jelentő vizsgálat, de számos monogénes rendellenesség esetén az egyedül szóba jövő eljárás (l. pl. az Rh-inkompatibilitást.)

Preimplantációs genetikai diagnosztika

Az *in vitro* fertilizáció (IVF) esetén a leendő anya testéből eltávolított petesejteket laboratóriumi eszközök felhasználásával termékenyítik meg az apai spermiumokkal, majd az így létrehozott 6-8 előembrióból kettőt-hármat beültetnek az anyaméhbe. Ha a családban már előfordult valamilyen súlyos genetikai rendellenesség, akkor az egy (két) sejtből végzett DNS szekvencia meghatározás segítségével kiválasztják az egészséges utódokat ígérő előembriókat. A családban meglévő genetikai probléma pontos ismerete azért fontos, mivel a diagnosztizáláshoz használt technikával az 1 (2) sejtből kinyerhető, azaz igen kis mennyiségű DNS miatt csak korlátozott számú hibalehetőséget lehet ellenőrizni. Ezért igen precíz génmeghatározás szükséges, hogy azt és csak azt a hibát keressék, amit ha örökölt, defektes lesz a gyermek.

3. fejezet

Az emberi jellegek öröklődés.

Mendeli és nem mendeli öröklődés

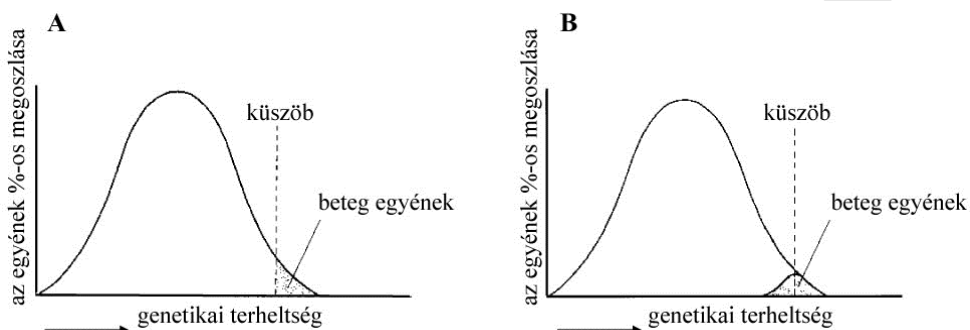
Az emberi jellegek típusai

A jellegek vagy fenotípusos bélyegek megfigyelhető, azonosítható, leírható tulajdonságok. Közülük sok jól látható (deformált illetve egészséges köröm; nyúlszáj illetve fejlődési rendellenesség nélküli ajkak stb.) vagy egyéb módokon detektálható (egy enzim aktivitása illetve az aktivitás hiánya, vércsoport, hibás vagy ép színlátás stb.): ezek a **minőségi (kvalitatív) jellegek**, melyek **diszkontinuusak** (megjelenésük vagylagos, nincsenek fokozati soraik) és mértékegységgel nem jellemezhetők. A mérhető, megszámlálható, skálán ábrázolható tulajdonságok a **menyiségi (kvantitatív) jellegek** (testmagasság, intelligencia, bőrszín, vérnyomás értéke stb.). Folytonosan változó mértékű sorozatot alkotnak (**kontinuusak**), mértékegységgel általában jellemezhetők. Van egy harmadik csoport is, ezek többnyire csak a DNS szintjén mutathatók ki, általában nem tudunk hozzájuk körülírható tulajdonságot kapcsolni. Lényegük, hogy a DNS szekvenciában mely variánsukat találjuk meg a lokuszon (génhelyen, l. 1. fejezet), ily módon egyebek közt egyének azonosítására vagy leszármazási kapcsolatok felderítésére szolgálhatnak: ezek az ún. **molekuláris jellegek** (SNP-k [*single nucleotide polymorphism*] – egy nukleotidás polimorfizmusok, TRP-k (*tandem repeat polymorphism*) – tandem ismétlődő szekvenciák polimorfizmusai, l. 4. fejezetben is).

A jellegek megjelenési formája a **fenotípus**, ez az, amit egy egyed esetében konkrétan meg tudunk figyelni: sötétbarna szem, aktív fenilalanin-hidroxiláz enzim, 175 cm-es testmagasság, nyúlszáj, cukorbetegség. Az örökletes bélyegek kialakításáért a gének felelősek, és a gének alternatív változatai (allélok) hozzák létre a konkrét fenotípust. A minőségi bélyegek kialakulásában általában egy vagy néhány gén játszik szerepet: ezek nagy hatású, ún. **major gének**. Ha főként⁹ egy major gén vesz részt a jelleg kialakításában, akkor **monogénes, egygénés⁵ vagy monolokuszos jelleg**ről beszélünk. Ha több gén is szerepet kap, akkor ezek a gének egymás kifejeződését, fenotípusbeli érvényre jutását (**expresszióját**) befolyásolják, ezt a jelenséget nevezzük **génkölcsönhatásnak** (l. alább). Vannak azonban olyan

⁹ Főként, mivel a legújabb nézet szerint nincs olyan fenotípusos jegy, melyet kizárólagosan csak egy gén alakítana ki, mentesen mindenfajta egyéb (genotípusos, környezeti) hatástól. Ha szigorúan vesszük, olyan, hogy *egygénés jelleg* nem is létezik. Miért használjuk mégis ezt a kifejezést? Hagyománytiszteletből, megszokásból.

minőségi bélyegek is, melyek kialakításában sok gén játszik szerepet, vagyis **poligénes** meghatározottságúak. Az ilyen jellegek esetében vagy a normál fenotípust, vagy valamilyen betegség, rendellenesség megjelenését figyelhetjük meg (3-1. táblázat). Az ezeket kialakító kis hatású ún. **minor géneknek (rizikó géneknek)**, illetve ezek **hajlamosító alléljainak** összeadódik a hatása. Ha a gének a rendellenesség kialakulása szempontjából rizikót jelentő alléljainak száma meghalad egy **küszöbértéket**, akkor jelenik meg a betegség, rendellenesség a fenotípusban; ha a rizikó allélok száma a küszöb alatt marad, akkor az egyén egészséges. Az ilyen jellegek öröklődésének leírására szolgál a **küszöb modell** (3-1. ábra).



3-1. ábra

A küszöb-modell vázlatja egyszerű poligénes (A), illetve a valósághoz közelebb álló multifaktoriális (B) öröklésment esetén

A: Ha a rizikó gének hajlamosító alléljainak száma (genetikai terheltség) meghalad egy értéket (elvi manifesztációs küszöb), akkor megjelenik a betegség. **B:** Az elvi manifesztációs küszöb körüli genotípusos rizikót hordozó egyének a környezeti hatások függvényében lesznek – vagy nem lesznek – ténylegesen jelleghordozók. A kevéssel a küszöb elvi határa alatt maradóknak is létrehozhatják a betegséget a megfelelő külső hajlamosító tényezők.

A mennyiségi jellegek öröklődése jellemzően poligénes: sok minor gén hatása adódik össze a kialakításuk során. Ezeknek a minor géneknek a lokuszait **QTL-nek (Quantitative Trait Locus)** nevezzük, ugyanis más, minőségi bélyegek kialakításában is részt vesznek, ekkor többnyire major géneként funkcionálva. (Ez egyébként rizikó gének sajátja is lehet, pl. a H komplement faktor egyik allélja megnöveli az időskori sárgafolt degeneráció kialakulásának valószínűségét). A fogalom bevezetésére azért volt szükség, mert a genom korántsem tartalmaz annyi gént, amennyire szükség lenne, ha egy gén csak egy tulajdonság kialakításában venne részt. Az örökletes faktoroknak ezt a sajátosságát, tudniillik hogy egyes gének illetve termékeik több élettani folyamatra is hatással lehetnek, így számos fenotípusos jegy kialakulását befolyásolják (pl. juvenilis – 1-es típusú – cukorbetegség esetén nemcsak a vércukorszint magas, hanem a vérnyomás is, megnő a trombózisveszély, károsodhatnak a vesék, a szemek), **pleiotróp** (szerteágazó) **génhatásnak** nevezzük.

3-1. táblázat

Néhány példa olyan multifaktoriális eredetű rendellenességekre, amelyek kialakulása a küszöb modell szerint magyarázható

Az „izolált előfordulás” azt jelenti, hogy nem egy szindróma részétünetéről van szó.

Gyakori izolált fejlődési rendellenességek	Gyakori (elsősorban felnőttkori) krónikus betegségek (izolált előfordulás esetén)
<i>Cheiloschisis</i> (nyúlajak, ajakhasadék)	Tüdő asztma
<i>Palatoschisis</i> (szájpadhasadék, farkas-torok)	Epekő
<i>Pylorus stenosis</i> (gyomorkapu szűkület)	Demencia
<i>Talipes</i> (dongaláb)	Depresszió
<i>Hernia diaphragmatica</i> (rekeszsérv)	2-es típusú <i>diabetes mellitus</i> (felnőttkori cukorbetegség)
Hirschsprung-betegség	Epilepszia
Veleszületett csípődiszplázia	Pajzsmirigy túlműködés
Veleszületett szívbetegségek	Zárt zugú glaukóma (zöld hályog)
Velőcsőzáródási rendellenességek	Magas vérnyomás betegség
<i>Anenkephalia ± spina bifida</i>	Ischemiás szívbetegség
<i>Spina bifida ± hydrokephalus</i>	Reumás sokizületi gyulladás
<i>Enkephalokele</i>	Skizofrénia

Mind a minőségi, mind a mennyiségi jellegekre igaz, hogy a gének hatását befolyásolhatják környezeti tényezők is. Ez sokgénese jellegeknél elég gyakori, ilyen esetekben nem is poligénese, hanem **multifaktoriális (komplex) meghatározottságról** beszélünk inkább. Az egy gén által kialakított jellegeknél is befolyással bírhat a környezet¹⁰ illetve környezetként szerepelve maga az általános genetikai háttér (pl. **módosító gének** formájában) is arra, hogy az adott gén, genotípus hatása milyen mértékben mutatkozik meg a fenotípusban: ez okozza a **variábilis (változó) expresszivitást**. Variábilis expresszivitás esetén az adott genotípus kialakítja a rá jellemző fenotípust, de az azonos genotípussal rendelkező egyedek mégsem egyformák: például neurofibromatózis esetén ugyanaz a genotípus megnyilvánulhat mindössze kozmetikai problémát okozó, tejeskávé színű foltok megjelenésével a bőrön, de akár hatalmas, karfiolszerű daganatok is kialakulhatnak, és nemcsak a bőrben, hanem egyéb szervekben is. Szélsőséges esetben egy adott genotípus nem is tudja kifejteni a hatását, az expresszivitása nulla lehet, ekkor beszélünk **inkomplett penetranciáról** (nem teljes áthatolóképesség). Ha például egy genotípus penetranciája 90%, ez azt jelenti, hogy 100, az adott genotípussal rendelkező személy

¹⁰ Például a fenilketonúriás (PKU-s) betegek tünetmentességének biztosítása fenilalanin-szegény diétával, l. alább.

közül várhatóan tízük fenotípusában *egyáltalán* nem jelenik meg a genotípus hatása.

A környezeti hatások közé soroljuk a szervezet belső állapotát is, ezért például egy adott allél, allélkombináció illetve genotípus expresszivitását befolyásolhatja a *nem* is, az eltérő hormonális háttér miatt. „Egyénes” jellegeknél ilyenkor **nem általi befolyásolt** öröklődésről beszélünk, amilyen pl. a kopaszság is. A férfiakban elég, ha az egyik allél kopaszságot kialakító változat, a fenotípus meg fog jelenni, mivel a magasabb tesztoszteronszint érzékenyebbé teszi a hajhagymákat, de a nők még akkor sem lesznek általában kopaszok, csak vékony hajúak, ha mind a két alléljuk ilyen. Multifaktoriális öröklődés esetén a nem általi befolyásoltság miatt a küszöbérték máshol lesz a két nemből: például gyomorkapu-szűkület esetén a küszöb a fiúkban, csípődiszplázia esetén a lányokban alacsonyabb, vagyis kevesebb hajlamosító allél szükséges a rendellenesség megjelenéséhez, ezért a betegség gyakoribb az adott nemből. Ez azt is maga után vonja, hogyha egy alacsonyabb kockázatú (magasabb küszöbű) nembe tartozó, a rendellenességet mutató szülőnek ellenkező nemű gyermeke születik, akkor ennek a gyermeknek nagyobb az esélye, hogy szintén rendellenes fenotípusú lesz, mint ha a másik szülője lett volna jelleg-hordozó (csípődiszplázias apa lányának nagyobb az esélye, hogy ő is érintett lesz).

A fentiekből is látható, hogy az egyes jellegek öröklődését nagyon nehéz egyszerűbb szabályszerűségekhez kapcsolni. Különösen így van ez a poligénes-multifaktoriális öröklődésnél: a legtöbb esetben még a jelleget befolyásoló gének sem mind azonosítottak. Az egyénes jellegeknél ismertek ilyen szabályok, de látni fogjuk, hogy ezek sem mindig alkalmazhatók.

Az „egyénes” jellegek öröklődésének szabályszerűségei

Ezeket elsősorban egy-egy lokusz alléljai határozzák meg. Ha valakinek két egyforma alléja van egy sejtmagi lokuszon, akkor ő (a genotípusa, lokusza) **homozigóta**, ha két különböző, akkor **heterozigóta** vagy **hordozó** (*carrier*). A carrier kifejezést leginkább az egyik X kromoszómájukon hibás allélt hordozó nőkre használják. A **compound heterozigóta** genotípus (személy) esetén két különböző allélt találunk a lokuszon, de mindkettő mutáns¹¹. Ez persze azt is jelenti, hogy az adott lokuszon több génvariáns, allél is létezik a populációban (kettőnél több), ezt nevezzük **multiplex alléliának**. Az X-hez kötött öröklődő jellegek esetén a férfiak csak egy alléllal rendelkeznek az adott génre (ha a génből csak egy kópia van a kromoszómán), őket és genotípusukat ekkor **hemizigótának** nevezzük. A mito-

¹¹ Ez a hagyományos formálgenetikai terminológiában mint **homozigóta recesszivitás** jelenik meg. Pontosabban: homozigóta recesszív fenotípusú egyének DNS-szintű molekuláris genotipizálása alapján született a megfogalmazás. Így ebben az esetben a *compound* (angol) kifejezés megtartása nem minősíthető a magyar nyelvhasználat elleni hibának, mert hiszen pl. a heterozigótaság megjelölés önmagában is kétféle allél egyidejű jelenlétét fejezi ki a genotípusban. Ugyanakkor az „összetett”, „komplex” használata megtévesztő volna.

kondriális DNS szintén kivételt képez, mivel mitokondriumból (és így a mitokondriális genomból is) több tíz vagy akár több ezer kópia is lehet egy sejtben, így az előbb ismertetett kifejezések nem alkalmazhatók ezen organellek genotípusának leírására, hanem a homoplazmia és a heteroplazmia kifejezés használatos (l. alább).

Mendeli öröklődés. Az egygénés jellegek öröklődéséről az első megállapításokat Mendel tette, aki borsónövények hét tulajdonságpárjának öröklődését követte figyelemmel. Következtéseit nagyszámú (több ezer) növény keresztezéséből nyert adatokat átlagolva vonta le, vagyis statisztikai¹² módszereket használt a kiértékeléshez. Az általa vizsgált tulajdonságok **egymást kölcsönösen kizáró**¹³, **allelomorf** jellegek voltak (ezeket a gének különböző alléljai alakítják ki). Kísérleteinek kiindulópontja különböző fenotípusú, **tiszta származéksorú** növények (önbeporzáskor az összes utód mind ugyanolyan fenotípusú volt mint a szülő, modern terminológiával a tiszta származéksorú növény homozigóta) keresztezése volt, ezt a generációt nevezzük **P (parentális = szülői)** nemzedéknek. Utódaik alkotják az **F1 (első filiális)** generációt, és az F1 egyedeit egymás között (**inter se**) keresztezve vagy önmegtermékenyítésükkel kapjuk az **F2 (második filiális)** nemzedéket. Kísérletei során Mendel rájött, hogy a különböző fenotípusú egyedek keresztezéséből származó utódok nem köztes tulajdonságúak lesznek¹⁴, hanem az egyik szülőhöz hasonlítanak (**uniformitás szabálya**). Az F2 generációban viszont újra megjelenik a másik szülői tulajdonság is. Ebből azt a következtetést vonta le, hogy egy tulajdonság öröklődése valamiféle öröklődési faktorok segítségével történik. Kikövetkeztette, hogy minden egyed két ilyen faktorral (ma allélnak mondjuk) rendelkezik, az egyik képes elnyomni a másik hatását, ha együtt fordulnak elő (vagyis **domináns** a másik, **recesszív** felett), és az ivarsejtek képzése során elválnak egymástól (sejttani alapja a homológ kromoszómák elválása a meiózis I. anafázisában, l. 1. fejezet), vagyis lokuszra vonatkozóan egy ivarsejtbe csak egy öröklődési faktor, azaz allél kerül. Ma ezt **Mendel első törvényének** vagy az **allél szegregáció szabályának** (esetleg a **gaméta tisztaság törvényének**) nevezzük. Az F1 generáció fenotípusából következtethetünk arra, hogy az adott fenotípusos bélyeg esetén melyik a domináns jelleg, ugyanis az összes F1 egyed egyformán heterozigóta genotípusú és domináns fenotípusú. A különböző tulajdonságok együttes előfordulását vizsgálva Mendel arra is rájött, hogy az egyes tulajdonság-párok öröklődése nem befolyásolja egymást, vagyis az ivarsejtek képzése során a különböző tulajdonságpárok kialakításáért felelős öröklődési faktorok egymástól függetlenül szegregálnak (válnak szét) és jutnak be az ivarsejtbe (sejttani alapja a

¹² Gregor Mendel – Ágoston rendi brünni (ma: Brno) szerzetes – egyetemi hallgatóként tanári tanulmányokat folytatott, kiváló matematikus volt.

¹³ Egy növényen csak egy jellegváltozat alakulhat ki: a borsószem vagy sárga vagy zöld, gömbölyű vagy szögletes stb.

¹⁴ A kor általános felfogása szerint pedig ilyeneknek kellett volna lenniük.

kromoszómák független szegregációja, kombinálódása a meiózis I. anafázisában). Ezt a szabályszerűséget ma **Mendel második törvényének**, vagy a **különböző gének alléljai független kombinálódásának** nevezzük. Ma már azt is tudjuk, hogy ez csak az olyan génekre teljesül, melyek vagy különböző kromoszómán helyezkednek el, vagy pedig ugyan **szintenikusak** (egy kromoszómára lokalizálódnak), de egymástól akkora távolságban, hogy a rekombináció bekövetkeztét a köztük lévő távolság már nem befolyásolja, vagyis **nem kapcsoltnak öröklődnek**.

A keresztporozást annak az eldöntésére is lehet használni, hogy a szülők neme befolyásolja-e az adott jelleg öröklődését. Ilyenkor az egyik kísérlet során a recesszív fenotípusú növény adja a pollent és a domináns fenotípusú a petesejtet, a másik keresztezés során pedig fordítva (**reciprok keresztezés**). Ha mindkét kísérlet ugyanarra az eredményre vezet (az F1 és az F2 is ugyanolyan fenotípusos és genotípusos megoszlást mutat), akkor a szülők neme nincs befolyással a jelleg öröklődésére. (Emberre vonatkoztatva: a gén autoszomális kromoszómán található.)

Ha el szeretnénk dönteni, hogy egy domináns fenotípusú egyed homozigóta domináns vagy heterozigóta genotípusú, akkor erre a legegyszerűbb módszer a keresztezése egy homozigóta recesszív genotípusúval. Ezt **tesztelő** vagy egyszerűen **tesztkeresztezésnek** nevezzük. Homozigóta domináns egyedet tesztkeresztezve minden utód domináns fenotípusú lesz, de ha egy utód is recesszív fenotípusú (akár százból), akkor a domináns fenotípusú szülő heterozigóta volt. Elvégezhető az utódok keresztezése valamelyik szülői genotípussal is, ezt **visszakeresztezésnek** nevezzük, tiszta származéksor előállításakor van jelentősége. Ha homozigóta recesszív szülővel végezzük el a mendeli keresztezés F1 egyedeinek visszakeresztezését, akkor ez nem tekinthető tesztkeresztezésnek, hiszen az ilyen szülő domináns fenotípusú utóda egészen biztosan heterozigóta.

A keresztezéseket egyezményes jelekkel írjuk le, táblázatos formában, ez a **Punnett-tábla**. A domináns allélt nagybetűvel, a recesszív allélt kisbetűvel jelöljük, egy gén alléljainak jelölésére mindig azonos betűt, ill. betűkombinációt használunk. A gének sokszor a mutáns fenotípusról kapják a nevüket és betűjelüket. A vad típusú allélt (ez a leggyakoribb, a normálnak tekintett allél) ilyen esetekben a mutáns allélt jelölő betű nagy változatával vagy egy + szimbólummal jelöljük (esetleg a mutáns allél betűjelét kiegészítjük egy felső indexbe rakott + jellel). Nemi kromoszómákon található gének esetében szerencsés jelölni az elhelyezkedést, pl: X_A, X^A . A gének jelét, szimbólumát, legyen az egy vagy több betű, nyomtatásban elkülönítendő az azonos szimbólummal szereplő fehérjétől, dőlten írjuk.

Az egyik szülő gamétáit, ivarsejtjeit (ált. a petesejtet) az első sorba egy-egy oszlop fölé (vízszintesen), a másik szülőét (ált. a hímivarsejtet) az első oszlopba írjuk egy-egy sor elé (függőlegesen), és a megfelelő kockákba vezetjük be az egyes gaméta-kombinációkból kialakuló egyedek genotípusát.

Ha a szülők csak egy tulajdonságban különböznek, akkor a keresztezést **monohibrid keresztezésnek** nevezzük. Egy **klasszikus mendeli monohibrid keresztezést** a következőképpen írunk fel:

P: $AA \times aa$

	<i>A</i>
<i>a</i>	<i>Aa</i>

F1:
minden egyed heterozigóta,
minden egyed domináns fenotípusú

F1 × F1: $Aa \times Aa$

	<i>A</i>	<i>a</i>
<i>A</i>	<i>AA</i>	<i>Aa</i>
<i>a</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>

F2:
1/4 homozigóta domináns, 1/2 heterozigóta, 1/4 homozigóta recesszív,
3/4 domináns fenotípusú, 1/4 recesszív fenotípusú

Természetesen lehetséges két független tulajdonság öröklődésének együttes vizsgálata is. Mivel a szülők két tulajdonságban különböznek, ezért ilyen esetekben **dihibrid keresztezésről** beszélünk. Egy klasszikus mendeli dihibrid keresztezés így írható fel (mivel mendeli keresztezésről van szó, ezért a szülők homozigóta domináns, ill homozigóta recesszív genotípusúak, de ugyanilyen utódarányokhoz vezetne az $AAbb \times aaBB$ keresztezés is, hiszen az általuk képzett Ab illetve aB gaméták ugyanúgy kettős heterozigóta F1 utódokat eredményeznek):

P: $AABB \times aabb$

	<i>AB</i>
<i>ab</i>	<i>AaBb</i>

F1:
minden egyed kettős heterozigóta
minden egyed domináns fenotípusú mindkét tulajdonságra

F1 × F1: $AaBb \times AaBb$

	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>
<i>AB</i>	<i>AABB</i>	<i>AABb</i>	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>
<i>Ab</i>	<i>AABb</i>	<i>AAbb</i>	<i>AaBb</i>	<i>Aabb</i>
<i>aB</i>	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>	<i>aaBB</i>	<i>aaBb</i>
<i>ab</i>	<i>AaBb</i>	<i>Aabb</i>	<i>aaBb</i>	<i>aabb</i>

F2 fenotípus arányok:

- I. 9/16 domináns mindkét tulajdonságra
- II. 3/16 domináns az **a** és recesszív a **b** tulajdonságra
- III. 3/16 recesszív az **a** és domináns a **b** tulajdonságra
- IV. 1/16 recesszív mindkét tulajdonságra

F2 genotípus arányok fenotípus-osztályokra lebontva, az általános genotípus feltüntetésével:

- I. 1/16 homozigóta domináns mindkét génre; 2/16 homozigóta domináns az *A* és heterozigóta a *B* génre; 2/16 heterozigóta az *A* és homozigóta domináns a *B* génre; 4/16 kettős heterozigóta (***A-B-***)
- II. 1/16 homozigóta domináns az *A* és homozigóta recesszív a *B* génre; 2/16 heterozigóta az *A* és homozigóta recesszív a *B* génre (***A-bb***)

III. 1/16 homozigóta recesszív az *A* és homozigóta domináns a *B* génre; 2/16 homozigóta recesszív az *A* és heterozigóta a *B* génre (*aaB-*)

IV. 1/16 homozigóta recesszív mindkét génre (*aabb*)

(A vízszintes vonás az általános genotípusban azt jelenti, hogy ott a szóba jövő allélok – domináns vagy recesszív – bármelyike előfordulhat.)

A mendeli öröklődés során várható fenotípus és genotípus arányokat módosító hatások

A mendeli törvények szabályos ivaros szaporodású diploid szervezet esetén teljesülhetnek csak (hiszen láthattuk, hogy a meiózis I anafázisának eseményein keresztül értelmezhetők). A géneknek autoszomákon kell elhelyezkedniük, mivel a nemi kromoszómákon található génekből nem egyformán részesül a két nem. A nyomon követett fenotípusos jegyek monolokuszos öröklődésűek kell legyenek (nem lehetnek poligénes/multifaktoriális meghatározottságúak, vagy nem jöhetnek létre génkölsönhatás következtében, l. alább). Az allélok között szabályos dominancia–recesszivitás kell fennálljon, hiszen **inkomplett dominancia** esetén az F1 generáció heterozigóta egyedei egyik tiszta származéksorú szülőre sem hasonlítanak, hanem egy köztes tulajdonság alakul ki bennük (természetesen a genotípus arányokon ez nem változat). Az **intermediér öröklődés** az inkomplett dominancia egy speciális esete, ahol a heterozigóták fenotípusa pontosan a két szélső fenotípus érték között középen helyezkedik el, pl. rózsaszín virágú csodatólcsér, mely egy vörös és egy fehér virágú egyed keresztezésekor keletkezik, és két rózsaszín virágú növényt keresztezve 1/4-1/4 arányban megjelennek a szülői fenotípusok az 1/2 heterozigóta rózsaszín növények mellett. **Kodomináns** allélok esetén pedig mind a kettő hatása teljes mértékben megnyilvánul a fenotípusban (pl. AB vércsoport, l. 4. fejezet).

Az is megnehezítheti az öröklődés vizsgálatát, hogy több gén hibája is eredményezhet hasonló fenotípust, például a vérzékenységnek vagy a süketségnek számos gén mutációja lehet az oka: ezt a jelenséget **genetikai heterogenitásnak** nevezzük.

Több gén öröklődésének együttes vizsgálatakor a géneknek egymástól függetlenül kell öröklődniük, vagyis különböző kromoszómán kell elhelyezkedniük, vagy azonos kromoszómán, de olyan nagy távolságra egymástól, hogy az azonos ivarsejtbe való jutásuk valószínűsége megegyezzen a különböző ivarsejtbe jutásuk valószínűségével. Ugyanakkor a kapott genotípusos vagy fenotípusos arányokat az is torzíthatja, ha nem kellően nagyszámú utódot vizsgálunk (statisztikai mintavételi hiba), vagy ha egy bizonyos allélkombináció letális hatású.

Ha valamilyen környezeti hatás, fertőzés, xenobiotikum (bármely anyag, amely idegen az élő szervezet számára) egy ismert öröklött jelleghez hasonló fenotípust alakít ki, akkor **fenokópiáról** beszélünk. Ilyen fenokópiák megjelenése is vezethet a fenotípus arányok módosulásához.

Génkölsönhatások. Egy fenotípusos jegyet több gén is kialakíthat együtt, ilyenkor természetesen ezek a gének befolyásolhatják egymás hatását. A legegyszerűbb esetben egy tulajdonságot két gén kölcsönhatása határoz meg, de sokszor

kettőnél több gén bizonyos (pl. vad típusú) alléljai lehetnek szükségesek egy adott (pl. normál) fenotípus kialakításához. Ha egy tulajdonságért két lokusz felelős, akkor keresztezések során tapasztalt gyakoriságokhoz képest, a két gén kölcsönhatása egyedül a fenotípus arányokat befolyásolja.

A legkönnyebben átlátható az **egyszerű génkölcsönhatás**. A két gén domináns alléljai önállóan (ha a másik lokuszon csak recesszív allélok vannak jelen) különböző fenotípust alakítanak ki. Szintén eltérő fenotípus jelenik meg, ha a két lokusz bármelyikén, vagy ha egyikén sem található domináns allél. Ez azt jelenti, hogy mendeli dihibrid keresztezés F₂ generációjában ugyanúgy négy fenotípus kategóriát kapunk és ugyanolyan arányban, mintha nem állna fenn génkölcsönhatás, csak éppen ezek nem két fenotípus kombinációiként állnak elő (tehát pl. nem a lehetséges borsószem szín és alak kombinációról van szó). Példa az ilyen génkölcsönhatásra a tyúk tarajalakjának öröklődése: **R** gén domináns allélja **rózsa** tarajt határoz meg, ha nincs jelen domináns allél a **B** lokuszon (**R-bb**); **B** domináns allélja **borsó** tarajt alakít ki, ha nincs domináns allél az **R** génre (**rrB-**); ha **R** és **B** allél is jelen van, akkor **dió** taraj alakul ki (**R-B-**); ha nincs se **R** se **B** allél, akkor **egyszerű** taraj fejlődik (**rrbb**). Kettős heterozigóták (**RrBb**) keresztezésekor a fenotípus megoszlás ugyanúgy 9:3:3:1 (dió:rózsa:borsó:egyszerű) arányt mutat, mint a dihibrid keresztezés fent levezetett esetében (3-2. táblázat).

A következő génkölcsönhatás típus az **episztázis**. Ilyen esetekben az egyik gént (lokuszát) **episztatikus** génnek (lokusznak) nevezzük, ez az, melyen egy bizonyos allélkombináció jelenléte, úgymint **recesszív episztázis** esetén két recesszív allél, illetve **domináns episztázis** esetén legalább egy domináns allél, teljesen elnyomja a másik (**hiposztatikus**) lokuszon lévő bármely allélkombináció hatását. Tehát ha az **A** lokusz az episztatikus és a **B** a hiposztatikus, akkor recesszív episztázis esetén az **aaBB**, **aaBb**, **aabb** (vagyis **aa--**) genotípusok, domináns episztázis esetén pedig az **AABB**, **AABb**, **AAbb**, **AaBB**, **AaBb**, **Aabb** (vagyis **A---**) genotípusok egyforma fenotípust alakítanak ki. Ez azt jelenti, hogy kettős heterozigóták keresztezésekor az utódnemzedékben bizonyos kategóriák összeolvadása miatt módosulnak a fenotípus arányok, recesszív episztázis esetén 9 (**A-B-**) : 3 (**A-bb**) : 4 (3 **aaB-** + 1 **aabb**), domináns episztázis esetén 12 (9 **A-B-** + 3 **A-bb**) : 3 (**aaB-**) : 1 (**aabb**) a tapasztalt fenotípus arány (3-2. táblázat).

Recesszív episztázis alakítja ki az emberi Bombay vércsoportot (**hh--**). Ilyenben az AB₀ vércsoportot meghatározó allélok közül bármelyik jelen lehet, a fenotípus ugyanolyan lesz, mivel az **I^A** illetve **I^B** allélok által kódolt enzimek nem tudják hozzátoldani a megfelelő monoszacharid egységet az alap H-antigénhez, ugyanis az nincs jelen a vörösvértestek felszínén egy másik lokuszon (**H**) fennálló mutáció (homozigóta recesszív genotípus) miatt (az **i** allél nem kódol működőképes enzimet, 0 vércsoport esetén a H-antigén nem egészül ki, l. 4. fejezet).

Domináns episztázis alakítja ki a tökök fehér termés színét. A **W** gén domináns alléljának jelenlétében a termés mindig fehér lesz, mivel gátolja a fehér pigment továbbalakulását zölddé. Ha nincs **W** allél (**ww**), akkor az **Y** lokusz határozza meg a

színt, wwY - genotípus esetén a létrejövő zöld pigment továbbalakul sárgává, míg $wwyy$ genotípus esetén marad zöld.

Az utolsó génkölsönhatás típus, amit részletesen elemzünk (természetesen további génkölsönhatások is lehetségesek), a **komplementer génkölsönhatás**. Ebben az esetben a két gén kifejeződése kölcsönösen függ egymástól. Ezek az egymást kiegészítő vagy **komplementer gének (pszeudoallélok**: a mutáns fenotípus a gének bármelyikének mutációja miatt kialakulhat, a különböző gének alléljai úgy viselkednek, mintha csak egy lokuszhoz tartoznának). Legtöbbször ezek a gének olyan fehérjét kódolnak, melyek egy metabolikus, differenciálódási vagy más jellegű útvonalon működnek. Gyakori, hogy az egyik enzim által létrehozott termék egy másik enzim szubsztrátja, és ilyenkor természetesen sem akkor nem képződik végtermék, ha ez a köztitermék nem jön létre, sem akkor, ha létrejön, de nem alakul tovább. Vagyis a komplementer génkölsönhatás esetén két fenotípus kategóriát találunk: vagy van végtermék, mivel minden enzimet kódoló gén rendelkezik legalább egy normál, domináns alléllal ($A-B$ -), vagy nincs végtermék, mert valamelyik vagy az összes lokuszon nem található normál allél ($A-bb$, aaB -, $aabb$). Pl. két gén (A ill. B) két különböző enzimet kódol, melyek egy virágszint meghatározó pigment létrehozásáért felelősek. A recesszív allélok (a , ill. b) termékei (ha vannak egyáltalán) funkciótelenek. Ha a növény homozigóta akár a -ra, akár b -re, nem képződik pigment, a virág fehér marad. Ennek megfelelően két kettős heterozigóta színes virág (mendeli dihibrid keresztezéskor ez az F1 nemzedék *inter se* keresztezésének felel meg) keresztezésekor 9:7 arányban kapunk színes és fehér virágokat. Emberben is találunk hasonlóan öröklődő tulajdonságokat. Ezekre jellemző a genetikai heterogenitás (l. fentebb), és a normál fenotípus csak akkor jelenik meg, ha minden gén rendelkezik legalább egy normál alléllal. Ezért fordulhat elő, hogy két öröklötten süket ember házasságából ép hallású gyermekek születnek, ha a szülők különböző génekre voltak homozigóta recesszív genotípusúak (a gyerekek mindkét lokuszra heterozigóták). Szintén így öröklődik a *xeroderma pigmentosum*, mely a NER (nukleotid excíziós repair, l. 8. fejezet) valamely enzimének defektusa, hiánya miatt alakul ki¹⁵. A betegekben daganatok jelennek meg, bőrük fényérzékeny, mivel a NER hibája miatt az UV sugárzás generálta timin-dimerek nem javítódnak ki (l. 8. fejezet).

¹⁵ Mindazonáltal meg kell említenünk, hogy a génkölsönhatási kategóriák közötti határ nem éles, tehát sokszor nézőpont kérdése, hogy melyik kategóriába soroljuk az adott génkölsönhatást. Pl. a NER enzimeinek működésekor komplementer génkölsönhatás áll fenn, de akár recesszív episztázisról is beszélhetnénk, ha megengednénk, hogy minden lokusz episztatikus és hiposztatikus is lehessen egyszerre.

3-2. táblázat

Mendeli dihibrid keresztezés F2 generációjában tapasztalható, génkölsönhatások miatt módosult fenotípus arányok áttekintése

A táblázat első sora tartalmazza a lehetséges genotípusokat, a második e genotípusok képződési arányát. A többi sorban az adott génkölsönhatás típusra jellemző fenotípusarányok láthatók, egyforma színárnyalattal jelölve az azonos fenotípusokat, és az azokat kialakító genotípusokat.

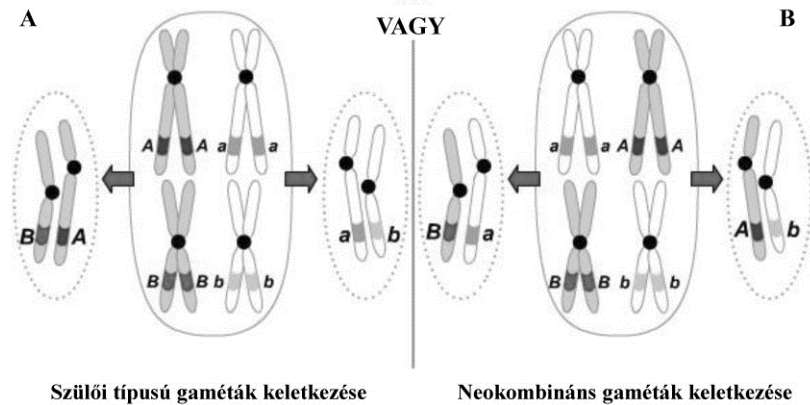
<i>AABB</i>	<i>AABb</i>	<i>AaBB</i>	<i>AaBb</i>	<i>AAbb</i>	<i>Aabb</i>	<i>aaBB</i>	<i>aaBb</i>	<i>aabb</i>	F2 fenotípus arány	Génkölsönhatás típusa
1	2	2	4	1	2	1	2	1		
9				3		3		1	9:3:3:1	egyszerű génkölsönhatás
9 (van két különböző domináns allél)				3 (<i>A</i> van)		3 (episztatikus <i>aa</i> van)		1	9:3:4	recesszív episztázis
9 (episztatikus <i>A</i> van)				3 (episztatikus <i>A</i> van)		3 (<i>A</i> nincs, <i>B</i> van)		1	12:3:1	domináns episztázis
9 (van két különböző domináns allél)				3 (nincs <i>B</i>)		3 (nincs <i>A</i>)		1	9:7	komplementer gének

Kapcsolt gének: Két gén együttes öröklődésének vizsgálatakor mendeli dihibrid keresztezés esetén azt tapasztaljuk, hogy az F1 kettős heterozigóta a két génre nézve négyféle gamétát képez. Az ivarsejtek párokban képződnek két különböző meiózis eredményeként. Az egyik pár ugyanolyan kombinációban tartalmazza a két gén alléljait, mint amilyen gamétákból az F1 egyed létrejött (mendeli keresztezés esetén *AB* és *ab*), ezek a **szülői típusú gaméták**. A másik pár új kombinációban tartalmazza az allélokat (itt *Ab* és *aB*), ezek a gének független öröklődése esetén a **neokombináns gaméták** (3-2. ábra).

Ha a két gén kapcsolt, vagyis ugyanazon a kromoszómán, bizonyos távolságon belül helyezkednek el egymáshoz viszonyítva, akkor a nem szülői típusú gaméták csak rekombináció eredményeként képződhetnek, és **rekombináns gamétáknak** nevezzük őket. Ilyenkor, ha egy gamétában egy kromoszómán 2 mutáns, avagy 2 vad típusú allél van, vagyis **cisz** elrendezésében találhatók a gének, akkor ezeket **coupling** – kapcsolt, párban álló – fázisú gamétáknak nevezzük. Ha egy mutáns és egy vad allél található egy gamétában egy kromoszómán, vagyis **transz** elrendezésben találhatók a gének alléljai, akkor ezek a **repulziós** gaméták. Egy genotípust úgy is felírhatunk, ha feltüntetjük / jellel elválasztva, hogy mely allélok találhatók egy kromoszómán (mely allélokat örökölte az egyed az egyik illetve a másik szülőtől), ezt nevezzük **haplotípusnak**: pl. *AB/ab* haplotípus esetén **coupling**, *Ab/aB* haplotípus esetén repulziós gamétákat adtak a szülők. Az egy kromoszóma egy lokuszán (haploid genotípus) vagy lokuszcsoportján (lokuszok genetikailag kapcsolt, együtt öröklődő kombinációja) található allélok alkotják a **haplotípust**.

Független öröklődéskor a gaméták egyforma eséllyel keletkezhetnek, de kapcsolt gének esetén a rekombináns gaméták képződési valószínűsége csökkent, megegyezik a gének közötti rekombináció valószínűségével (3-3. ábra). A rekombináció valószínűsége a két gén távolságától függ: minél közelebb van egymáshoz

két lokusz, annál kisebb eséllyel következik be közöttük crossing over. Ha nem képződnek rekombináns gaméták, akkor **teljes kapcsoltságról** beszélünk.



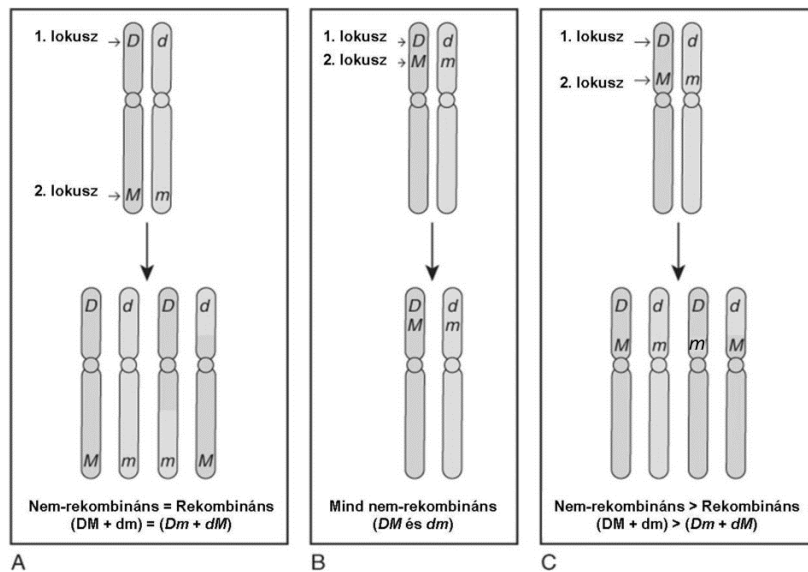
3-2. ábra

Kromoszómák (és a rajtuk található gének alléljainak) **független kombinálódása (független hasadás)** meiózis során

Az egyforma színű (fehér, a és b alléllal ill. szürke, A és B alléllal) kromoszómák származnak eredetileg egy szülőtől, vagyis az **A** meiózis során szülői típusú gaméták keletkeztek (AB és ab), míg a **B** meiózis során új kromoszóma-kombinációk alakultak ki, neokombináns gaméták keletkeztek (aB és Ab), egyenlő arányban.

Két gén távolságát **centiMorganban**¹⁶ (cM) adjuk meg, ami nem abszolút távolságot jelent, hanem a két gén közötti rekombináció valószínűségétől függ: 1 cM = 1% rekombinációs gyakoriság. Belátható, hogyha két gén távolsága eléri az 50 cM-t, akkor a rekombináns gaméták képződési valószínűsége megegyezik a szülői gametáékkal (50-50%), és ekkor már független öröklődésről szólunk. Ez azt is jelenti, hogyha két **szintenikus** (egyazon kromoszómán lévő), de függetlenül öröklődő gén távolságát ki akarjuk számolni, keresni kell olyan géneket, amelyek közöttük helyezkednek el egymástól kevesebb, mint 50 cM távolságra, és az egyenként megállapított rekombinációs értékeket össze kell adni.

¹⁶ A rekombinációs térképtávolság egységét Thomas Hunt Morgan tiszteletére nevezzük centiMorgan-nek. Morgan 1933-ban a kromoszómák öröklődésben játszott szerepének vizsgálatáért Nobel-díjat kapott. Ecetmuslicákkal (*Drosophila melanogaster*) végzett úttörő jelentőségű keresztezési kísérleteket. A kapcsoltan öröklődő jellegek vizsgálatára alapozva megállapította, hogy a gének kromoszómákon helyezkednek el, és a kapcsoltan öröklődő gének egyazon kromoszómán foglalnak helyet.



3-3. ábra

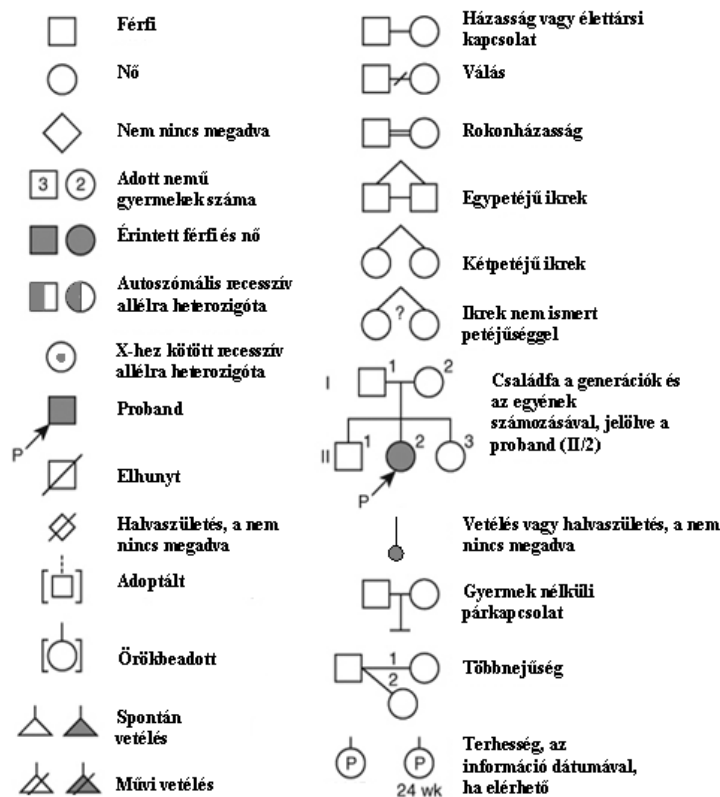
Szinténikus gének alléljainak kombinálódása

A: Ha a gének távolsága > 50 cM, akkor a gének függetlenül öröklődnek a köztük lejátszódó több crossing over miatt, az összes kombináció egyenlő eséllyel keletkezik. **B:** Ha a gének távolsága nagyon kicsi, fizikailag lehetetlen közöttük a crossing over, nem történhet rekombináció (**teljes kapcsoltág**). **C:** Ha a gének távolsága < 50 cM, és lejátszódhat közöttük crossing over, **rekombináns kromoszómák** (és gaméták) keletkeznek a crossing over valószínűségének arányában, ami a gének távolságától függ.

Mivel a rekombináns gaméták kisebb arányban termelődnek, mint a szülői típusúak, így a belőlük származó utódok is kevesebben lesznek, vagyis kapcsoltág esetén a genotípus arányok is megváltoznak. Ez heterozigóták egymás közötti keresztezésekor kevésbé nyomon követhető, így a kapcsoltág tesztelésére kettős heterozigóták tesztkeresztelését alkalmazzuk. Ilyenkor a tesztelő (ab/ab) szülő csak recesszív allélokot ad át az utódoknak, vagyis az utódok fenotípusát a kettős heterozigóta szülőtől örökölt allélok határozzák meg, így téve könnyen eldönthetővé, hogy mely utódok milyen gamétát kaptak tőle.

Emberi monolokuszos jellegek öröklődése

Mivel kontrollált keresztezési kísérletek eredményei nem állhatnak rendelkezésre, ezért „monolokuszos” – általában kóros, mert ezek érdekesek orvosi szempontból – emberi bélyegek öröklődéséről úgy nyerhetünk információt, ha családon belül követjük az adott jelleg nemzedékről nemzedékre való átadását.



3-4. ábra

A családfákon általánosan használt jelölések

Először információt kell gyűjteni a beteg családjáról, és a részleteket egy **családfán** összegezni, mely a családtagok leszármazási viszonyának grafikus ábrázolása egyezményes jelekkel (3-4. ábra), az egyének fenotípusának illetve hordozó voltának (ha biztos információkkal rendelkezünk ez ügyben) jelölésével. Azt a személyt, aki miatt a család genetikai vizsgálata kezdetét vette (akár több ilyen is található a családfán) **proband**nak vagy **probandus**znak nevezzük. A férfi probanduszt **propozitus**znak, a nőt **propozitán**ak is szokás még említeni. Ha egy párnak egy vagy több közös öse van, akkor a házasságot **rokonházasságnak** mondjuk. A családfán a generációkat római számokkal jelöljük (általában a legidősebb ábrázolt generáció a I) a generációkon belül pedig arab számozással látjuk el az egyéneket, balról jobbra haladva (lehetőleg a születési sorrendet követve), így mindenki egyértelműen jelölhető és hivatkozható.

A monokuszos jellegek öröklődési mintázata két tényezőtől függ elsősorban:

1. a mutáns fenotípus **domináns** (akkor jelenik meg, ha a kromoszómapár egyik vagy mindkét tagján a mutáns allél található) vagy **recesszív** (a kromoszómapár mindkét tagján a mutáns allél található), és

2. a gén **autoszomális (autoszómák: 1-22 kromoszóma)** vagy **nemi kromoszómán** (X vagy Y) helyezkedik-e el, esetleg a mitokondriális genom része.

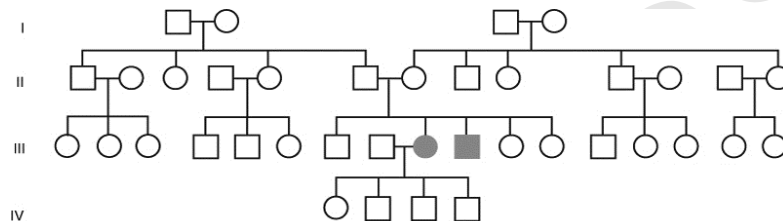
Autoszomális recesszív (AR) öröklődés: Az autoszomális recesszív jellegek, rendellenességek csak **homozigótákban** vagy **compound heterozigótákban**¹⁷ nyilvánulnak meg, vagyis olyan egyéneknél, akik csak recesszív (rendellenesség esetén mutáns) allélokkal rendelkeznek. **Az így öröklődő emberi kórképek gyakran enzimdefektusok**, hiszen enzimek esetén egy vad típusú allél terméke általában már elég a domináns, normális fenotípus létrehozásához, vagyis egy normál allél kompenzálni tudja a mutáns allél hiányzó hatását, és nem alakul ki a recesszív fenotípus. Mivel egy egyén egy lokusz esetén a két allél közül mindig csak az egyiket örökli az egyik szülőtől, a homozigóta recesszív genotípusúak mindkét szülőtől örökölték egy-egy mutáns allélt. Mindezeknek megfelelően az AR jellegek és betegségek általában igen korai életszakaszban már felismerhetővé válnak.

Homozigóta recesszív beteg akkor születik, ha vagy mindkét szülő beteg vagy csak az egyik, és a másik szülő heterozigóta hordozó; a leggyakoribb eset mégis az, amelyben mindkét szülő egészséges heterozigóta. Az első esetben (két beteg szülő) minden utód beteg lesz; egy érintett homozigóta és egy nem beteg heterozigóta hordozó szülő esetén $1/2$ az esély beteg gyermek születésére (1 a valószínűsége, hogy recesszív allélt örököl a beteg szülőtől, $1/2$, hogy recesszív allélt örököl a heterozigóta szülőtől, hogy mindkettőtől a recesszív allélt örökli, az $1 \times 1/2$, míg a harmadik esetben, két heterozigóta házasságakor $1/4$ ($1/2$ a valószínűsége, hogy recesszív allélt örököl egy-egy heterozigóta szülőtől, hogy mindkettőtől, annak az esélye $1/2 \times 1/2$). (Az események – egy bizonyos allél öröklése az egyik és egy bizonyos allél öröklése a másik szülőtől – függetlenek. Mivel ÉS kötőszóval kapcsolhatók, együttes előfordulásuk valószínűségét a két esemény valószínűségének a szorzásával kapjuk meg: ez a **szorzási szabály**. Ha VAGY kötőszó illeszthető a két esemény leírása közé – pl. a beteg gyermek fiú vagy lány –, akkor egymást kizáró eseményekről beszélünk, és együttes valószínűségüket az **összeadási szabály** alapján számoljuk: összeadjuk – itt $1/2 + 1/2=1$.) Ritka allélok esetén gyakran egyetlen érintett személy található a családban, ha mégis lenne másik, akkor az általában a testvérei között található (3-5. ábra). A beteg személy egészséges testvérei ilyenkor $2/3$ eséllyel heterozigóták, hiszen két heterozigóta egészséges szülő utódai között $1:2$ arányban találunk homozigóta dominánsokat és heterozigótákat (l. fentebb, mendeli monohibrid keresztezés F2 generáció genotípus arányai).

Autoszomális recesszíven öröklődik számos emberi betegség (kb. 1700), több mint 15%-a ezeknek enzim-hiba (**enzimopathia**). Így öröklődik többek közt a **fenilketonúria (PKU)**. A betegség klasszikus formáját a fenilalanin-hidroxiláz (PAH) génjének mutációja okozza (a nem klasszikus formákban az enzim kofaktora, a tetrahidrobiopterin nem reciklizálódik, vagy nem szintetizálódik). Az enzim

¹⁷ L. a lábjegyzetet a 46. oldalon.

átalakítja a fenilalanint tirozinná, ez PKU-ban nem történik meg, hanem a fenilalanin alternatív útvonalon fenilpiroszólósavvá, illetve egyéb fenilketonokká alakul, melyek károsítják (főként) a fejlődő agyat, mentális retardációt okozva. Újszülött korban (első héten, már az anyatejes táplálás megkezdése után) szűrik a fenilalanin plazmaszintet¹⁸. Ha PKU áll fenn (magas a fenilalanin plazmaszintje), akkor fenilalanin szegény diétát kell fenntartani élethosszig (nőknek mindenképpen, mivel a fenilpiroszólósav a placentán is átjut, és a PKU-s anya nem PKU-s magzatát is károsítja). A nem klasszikus formák nem reagálnak a diétára. A tirozin a pigmentek szintézisének kiindulópontja, ha az útvonal valamely enzime nem működik, **albinizmus** alakul ki, ami szintén autoszomális recesszíven öröklődik. A PKU-s betegek nem albínók (legfeljebb szőkék, kék szeműek), mivel a táplálékkal vesznek magukhoz tirozint.



3-5. ábra

Autoszomális recesszív öröklésmenet tipikus megjelenése családfán

Jellemző a generációugrás, valamelyik (több) generációban nincs érintett személy. A betegség (vagy más jelleg) általában két egészséges szülő utódai között jelenik meg, akik egyforma valószínűséggel lehetnek fiúk vagy lányok. Itt II/6 és II/7 egyaránt heterozigóta kell legyen, mivel két gyermekük (egy leány és egy fiú) is homozigóta recesszív genotípusú.

AR öröklődést mutat a **cisztikus fibrózis** (cisztás fibrózis, *fibrosis cystica*, CF) is (bár a heterozigóták nem teljesen tünetmentesek). A betegség oka egy mutáns klorid csatorna (cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor – *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – CFTR), mely egyéb transzport útvonalak szabályozásában is részt vesz. A tünetek az exokrin mirigyek (külső-elválasztású mirigyek: terméküket nem a vérbe ürítik, hanem a bőrre, bélbe, légutakba stb.) csökkent klorid- és nátriumion visszaszívására vezethetők vissza. A mirigyek kivezető csöveit sűrű váladék tömíti el, amire az emésztőrendszer zavarai vezethetők vissza, illetve sűrű váladék halmozódik fel az alsó légutakban, ami a

¹⁸ A szűrés Guthrie-teszttel történhet: fenilalanin-igényes (Phe auxotróf, l. 6. fejezet) baktériumok csak akkor nőnek a tesztpapír körül a minimál táptalajon, ha az újszülött sarkából vett vérben magas volt a fenilalanin szint; ill. újabban GC-MS-sel (gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria), MS/MS-sel (tandem tömegspektrometria), HPLC-vel (magas nyomású folyadékkromatográfia) amikor is több anyagcsere problémára is tudnak szűrni egyszerre.

légzőrendszer súlyos működési zavarait okozza (krónikus köhögés, elégtelen légzés, fogékonyosság fertőzésekre)¹⁹. A legtöbb férfibeteg steril az ondóvezeték veleszületett kétoldali hiánya miatt, és az érintett nők termékenysége is csökkent, egy részük meddő a sűrű méhnyaki nyák miatt. A veríték és a nyál extrém sótartalmú. A kaukázusi²⁰ nagyraszban rengeteg különféle mutáns allélt találunk elég nagy gyakorisággal (multiplex allélia, a betegek általában *compound* heterozigóták), valószínűleg a heterozigóták kevésbé fogékonyak kolerára, ami gyakori betegség volt régen Európában (heterozigóta előny; a *Vibrio cholerae* baktérium toxinja fokozott vízvesztést okoz a CFTR áttételes aktiválásával, ami fokozott klorid- és nátriumion szekrécióval jár, ez a mutáns CFTR esetén nem lehetséges).

Szintén autoszomális recesszíven öröklődik a **sarlósejtes anémia** (vérszegénység, l. 4. fejezet). A β -globin génjének 6. kodonjában jön létre egy mutáció (*HbS* allél), ami miatt a 6. aminosav glutaminsav helyett valin lesz. A β -globin a hemoglobin egyik alkotója (ez 2 α - és 2 β -globin polipeptidláncból áll, valamint négy hemből – vas tartalmú prosztetikus csoportból), mely a vörösvértestekben a gázok (O_2 , CO_2 , NO) egy részének szállításáért felelős, vagyis itt sem enzim gtnjének mutációja okozza a betegséget. Ez a β -globin rendellenes szerkezetét eredményezi, ami egyebek mellett a vvt-k megrövidült életidejéhez, és ezek miatt – valamint a rugalmatlan sarlósejtek kapillárisokat elzáró hatása miatt – a szövetek elégtelen oxigén ellátottságához vezet. Homozigóta formában gyakorlatilag letális; a heterozigóták egészségesek, de vvt-ik sarló alakúvá válhatnak extrém alacsony oxigén koncentráció esetén, emiatt kodominánsnak is tekinthető a *HbS* és a normál allél. Szintén emiatt a heterozigóták kevésbé fogékonyak a maláriára, mert a parazita (*Plasmodium falciparum* vagy *Plasmodium vivax*) nem képes túlélni az így átalakuló és hamar széteső vvt-kben (heterozigóta előny).

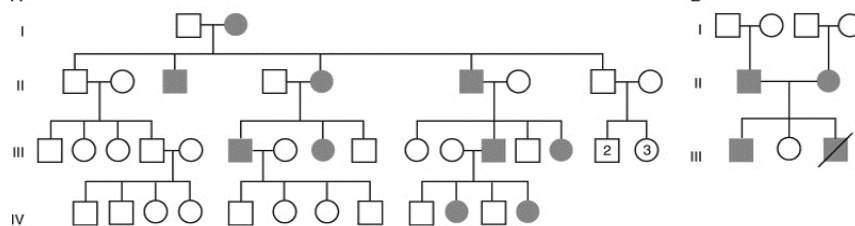
AR módon öröklődnek a **lizoszómális tárolási betegségek** is (kivéve a Hunter kórt és a Fabry betegséget, melyek X kromoszómához kötött recesszívek): egy lizoszómális enzim defektusa miatt a le nem bontott anyag(ok) felhalmozód/ik/nak ezekben a sejtorganelumokban és a nem működő képletek a citoplazma egyre nagyobb hányadát foglalják el. A kóros következmények ott válnak észlelhetővé, amelyik szervben vagy szövetben fontos lenne az adott enzim működése. A **Tay-Sachs betegség**ben a hexózáminidáz A (génje: *HEXA*) hiánya miatt a központi idegrendszer sejteinek membránjában nagy mennyiségben található G_{M2} gangliozid nem bomlik le, ez okozza a már csecsemőkorban megnyilvánuló és hamar halálhoz vezető tüneteket: súlyos értelmi visszamaradást, vakságot, süketséget.

Autoszomális domináns (AD) öröklődés: A fentiekben áttekintett recesszív rendellenességek vad típusú, normál, egészséges megfelelői – értelemszerűen – dominánsak. Ha autoszomális domináns jellegekről, rendellenességekről beszél-

¹⁹ A tünetek súlyossága acetilcisztein adagolásával enyhíthető.

²⁰ A kaukázoid (europid) nagyrasz elnevezése a korábban feltételezett származási helyre, a Kaukázus vidékére utal. Jellemző a világos bőrszín, ami a kevés napfény mellett szükséges a D-vitamin előállításához, az erős arcszörzet, magas homlok, vékony orr. Indiától Közép-Ázsián át Európáig találjuk meg az ide tartozó (al)raszokat.

lünk, azok párjai, normál megfelelői recesszív bélyegek. A leggyakoribb az az eset, amelyben az egyik szülő egészséges, homozigóta recesszív (dd) genotípusú, a másik pedig heterozigóta, ilyenkor a gyerekek fele egészséges, fele heterozigóta érintett. Az orvosi gyakorlatban nagyon ritkán találkozni homozigóta domináns genotípusú egyénnel, mert a házasságok, melyek esetén ilyen gyerekek születnének, meglehetősen ritkák. Ehhez mindkét szülőnek jelleghordozónak kell lennie (ha D a domináns és d a recesszív allél, akkor a következő házasságokból születhet homozigóta domináns utód: $Dd \times Dd$, $1/4$ valószínűséggel; $DD \times Dd$, $1/2$ eséllyel; $DD \times DD$, 100% bizonyossággal)²¹. Ha csak az egyik szülő érintett, a másik, egészséges szülő gamétájában új mutációnak kell keletkeznie, ami rendkívül kis valószínűségű. Sokszor a homozigóta domináns genotípusú egyedek olyan súlyos tünetektől szenvednek, hogy utóduk nem is lehet, vagyis igazi jelentősége csak két heterozigóta házasságának van. Ilyenkor a gyerekek $1/4$ -e DD , $1/2$ -e Dd , $1/4$ -e dd genotípusú, vagyis $3/4$ -ük mutat a szülőkhöz hasonló (esetleg a beteg gyerekek $1/3$ -át képviselő homozigóta domináns utódok súlyosabb) tüneteket¹³. Ha egy családban felbukkan egy ilyen rendellenesség, az általában nem egy egyént, hanem a család egész ágát érintheti, nemzedékkihagyás nélkül, akár generációkon át (3-6. ábra).



3-6. ábra

Autoszomális domináns öröklésű rendellenességek megjelenése családfákon

A. Egy teljes penetranciájú jelleg (Huntington kór) öröklődése. Minden allélhordozóban megjelenik a rendellenesség. Beteg gyermeke csak olyan szülőknél van, akik közül legalább az egyik szintén beteg. Férfiak és nők egyenlő eséllyel lehetnek érintettek. **B.** Akondroplastikus törpeség, egy inkomplett dominanciájú (szemidomináns – mivel homozigóta formában letális, vagyis súlyosabb tüneteket okoz, mint heterozigótákban) jelleg öröklődése. *FGFR3* gén (*fibroblast growth factor receptor 3*) mutációja okozza, a csöves csontok növekedése szenved zavart. Az I. generációban a házaspárok tagjai tünetmentesek, mindkét esetben új mutáció következtében jelenhetett meg a rendellenesség (mivel az akondroplázia teljes penetranciájú). A II/1, II/2 és III/1 heterozigóta akondroplázias törpe. A III/3 korán elhalálozott, minden bizonnyal a homozigóta domináns genotípusa által okozott súlyos rendellenességek miatt.

²¹ Tegyük hozzá megfontolásainkhoz, hogy egy bizonyos örökletes betegségben szenvedők nem szívesen választanak sorstársaik közül párt maguknak, alkalmasint éppen a leendő gyermekeik veszélyeztetettsége miatt.

Kb. 2200 autoszómális dominánsan öröklődő kóros jelleg ismert. Gyakran az idegrendszer (Huntington kór) vagy a csontváz érintett (akondroplasztikus törpe-ség, l. 3-6. ábra). Általában a mutáns allélok gyakorisága alacsony, ezért a betegek nagy valószínűséggel heterozigóták. A **Huntington kór** vagy Huntington chorea (*chorea*: vitustánc) a huntingtin fehérje mutációja miatt alakul ki, mely génátírás regulációjában játszhat szerepet. Az abnormális szerkezetű fehérje felhalmozódik a sejtekben, az idegsejtekben lerakódva idős(ebb) korban (35-50 év) kialakuló neurodegenerációt okoz, mely személyiségváltozásokkal, akaratlan izommozgással, rángatózással jár, és 10-15 évvel a tünetek megjelente után halálhoz vezet. A késői manifesztációs életkor miatt a betegek továbbörökíthetik a mutáns allélt.

Szintén AD öröklődésű a **familiáris hiperkoleszterinémia**. A vízben (tehát a vérplazmában sem) oldódó lipidek szállítását a vérben lipoprotein részecskék végzik, melyek fehérjerészeit (apolipoprotein) ismerik fel és kötik meg a különböző sejtek felszínén található receptorok. Az LDL (*low density* – alacsony denzitású lipoprotein) részecske a májban szintetizálódik, és a sejtekhez lipideket (koleszterint) szállít. Az LDL receptorok kötik meg, azután receptor-mediált (-közvetített) endocitózissal kerül be a sejtekbe. Ha a receptor nem elégséges mennyiségben szintetizálódik, vagy nem képes kötni az LDL-t, esetleg nem képes internalizálódni (bekerülni a sejtbe) vagy éppen beépülni illetve visszakerülni a sejtmembránba, akkor az LDL-t a sejtek nem veszik fel elégséges mennyiségben, és a szállított koleszterin lerakódik az érfalakban (bőrben, inakban, érhártyában, szaruhártyában, egyéb helyeken), súlyos érlemezésedést, majd érelzáródást és így (szív-, agyi- vagy egyéb) infarktust okoz. Homozigóta formában hamarabb megjelennek a tünetek, akár már gyermekkorban is.

Így öröklődik még a **neurofibromatózis** (l. a megelőzőekben), a **brachydactylia** (rövidujjúság, melyet részleges vagy teljes ujjperchiány okoz), mindkettő változó expresszivitást mutató kórkép, illetve az **Alzheimer kór**nak is van AD módon öröklődő változata.

X-hez kötött recesszív (XR) öröklődés: Egy X-hez kötött recesszív mutáció fenotípusosan minden, az allélt öröklő hemizigóta férfiban kifejeződik, de nők esetében általában²² csak azokban, akik homozigóták a mutáns alléllra. Éppen ezért, az X-hez kötött recesszív rendellenességek általában férfiakban jelennek meg, és ritkábban nőkben. Mivel a férfiak egy, a nők pedig két X-kromoszómával rendelkeznek, ezért a férfiakban két, a nőkben három lehetséges genotípus alakulhat ki egy X-kromoszómális lokuszon elhelyezkedő mutáns allél tekintetében. Egy férfi, aki egy mutáns alléllal rendelkezik egy bizonyos X-en lokalizált lokuszon, **hemizigóta** erre az alléllra, míg a nők lehetnek homozigóták mind a mutáns, mind a vad típu-

²² A heterozigóta nők többnyire egészségesek, de a véletlenszerű X inaktiváció miatt előfordulhat, hogy a betegség szempontjából fontos sejtek nagyobb részében a normál allélt hordozó X heterokromatizálódik. A tünetek súlyossága attól függ, hogy az adott sejtek hány %-ában marad aktív a mutáns allélt hordozó kromoszóma.

súra, és lehetnek heterozigóták is. A **hemofília A** klasszikus X-hez kötött recesszív betegség. Az ebben szenvedők vére nem alvad meg vagy csak nagy késlekedéssel a VIII-as véralvadási faktor hibája (hiánya) miatt, mely fontos eleme a véralvadási kaszkádnak. Vagyis, ha a VIII-as véralvadási faktor vad típusú allélját X^H -val jelöljük, a hemofília A kialakulásáért felelős mutáns allélt pedig X^h -val, akkor a férfiak genotípusai és a genotípusokhoz tartozó fenotípusai a következők lehetnek: hemizigóta X^H , egészséges; hemizigóta X^h , hemofília A-ban szenvedő. A nők genotípusai és a kialakuló fenotípusok a következők lehetnek: homozigóta $X^H X^H$: egészséges; heterozigóta $X^H X^h$: egészséges²³; homozigóta $X^h X^h$: hemofília A-ban szenved.

Ha egy hemofiliás férfi párja nem hemofiliás, és nem is hordozó, akkor minden gyermekük egészséges lesz, mivel a fiúk az apától az Y kromoszómát kapják, anyjuktól pedig egy vad típusú allélt hordozó X kromoszómát. A lányok mind hordozók lesznek, hiszen mindkét szülőjüktől X-et kapnak, és az apa X kromoszómáján rajta van a hibás allél. Ha egy ilyen hordozó nő férje egészséges, akkor lányaik mind egészségesek lesznek (az apai vad típusú domináns allél miatt), de várhatóan 50%-uk hordozó. A fiúk 50%-a egészséges lesz, a másik 50%-a pedig vérzékeny, vagyis a hemofiliás nagyapa betegsége nem jelenik meg a gyerekeiben, de minden fiúunokája, aki valamelyik lánya gyermeke, 50% eséllyel lesz hemofiliás. A fiaitól származó unokái mind egészségesek lesznek. Az is látható, hogy egy hordozó nő lányának 50% esélye van arra, hogy ő is hordozó legyen. Előfordulhat, hogy egy X-hez kötött recesszív allél generációkon keresztül megbújva adódik tovább hordozó nők során át, míg megjelenik egy beteg férfi utódban (l. 3-7. ábra).

Hemofiliás férfi \times normál nő: $X^h Y \times X^H X^H$:

	X^H	X^H	
X^h	$X^H X^h$	$X^H X^h$	Lányok: mind hordozó.
Y	$X^H Y$	$X^H Y$	Fiúk: mind egészséges.

Egészséges férfi \times hordozó nő: $X^H Y \times X^H X^h$:

	X^H	X^h	
X^H	$X^H X^H$	$X^H X^h$	Lányok: 1/2 homozigóta normál, 1/2 hordozó.
Y	$X^H Y$	$X^h Y$	Fiúk: 1/2 egészséges, 1/2 hemofiliás.

Előfordulhat az is hogy egy beteg férfinak és egy ugyanazon lokuszon mutáns allélt hordozó heterozigóta nőnek homozigóta recesszív beteg lánya születik:

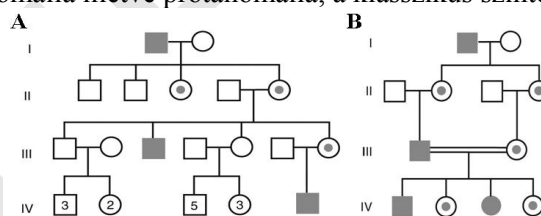
²³ Illetve esetükben jelentkezhet megnyúlt véralvadási idő (pl. hosszabb menstruáció), ha a májsejtek (a véralvadási faktorok szintézisének helye) nagyobb részében a mutáns allélt hordozó kromoszóma marad aktív.

Érintett férfi × hordozó nő: $X^hY \times X^H X^h$:

	X^H	X^h	
X^h	$X^H X^h$	$X^h X^h$	Lányok: 1/2 hordozó, 1/2 érintett.
Y	$X^H Y$	$X^h Y$	

A legtöbb X-hez kötött recesszív allél túl ritka ahhoz, hogy bekövetkezzék egy ilyen eset, hacsak a szülők nem rokonok (3-7. ábra, B panel), de az elméleti esély fennáll.

A 3-7. ábra B paneljén hivatkozott vörös-zöld szintévesztést szokás így, összevontan emlegetni, de ez valójában több rendellenesség neve is lehet. (A színvakság megnevezés alkalmazása pedig helytelen, mivel a valódi színvakság [= tritanopia] rendkívül ritka, kivételes, és nem X-hez kötött rendellenesség.) A színlátáshoz szükséges három látópigment (a főként zöld [deutan] és a főként vörös [protan, valójában sárga tartományban van az elnyelési maximuma] fény hullámhosszára érzékenyek) génjei közül kettő az X kromoszómán található, egymás közelében. Ha valamelyik pigment hiányzik, akkor deuteranopiáról („zöld vakság”) illetve protanopiáról („vörös vakság”) beszélünk (dikromázia, „két szint látás”), az érintett személyek habár kissé eltérő árnyalatok formájában, de lényegében kék, sárga és barna színeket érzékelnek csak. Ha a pigmentek termelődnek, de az általuk érzékelt spektrum eltolódott a deutan esetében a vörös, illetve a protan esetében a zöld tartomány felé, akkor csökken a zöld és a vörös szín közötti különbségtétel lehetősége, bár érzékelésük képessége megmarad, ilyenkor anomáliás trikromáziáról beszélünk (deuteranomália illetve protanomália, a klasszikus szintévesztés típusok).



3-7. ábra

X-hez kötött recesszív jellegek öröklődése

A. Hemofília A. B. Vörös-zöld szintévesztés, rokonok házasságából születő homizigóta recesszív lánnyal (IV/3). Az öröklődésre jellemző a generációugrás, amikor is egy generációban nincs fenotípusosan érintett személy. A betegség általában két egészséges szülő utódai között jelenik meg, ilyenkor az anya heterozigóta, lányai mind egészségesek (50%-uk hordozó lehet), fiai fele érintett, fele egészséges. Az apa sosem örökítheti a jelleget a fiára, de nagypapa – lánya révén – a fiúunokájára igen.

A **hemofília B** (Christmas-betegség) szintén XR módon öröklődik, de itt a IX-es véralvadási faktor mutációja okozza a tüneteket, vagyis az általánosságban vett

hemofiliát több gén mutációja is okozhatja – genetikai heterogenitás jellemzi. (Az egyéb örökletes vérszavarok autoszomális meghatározottságúak.)

A **Duchenne-féle** és a **Becker-féle izomdisztrófia** (DMD és BMD) is X-hez kötött recesszíven öröklődik. Mindkét rendellenességnél a disztrófin fehérje génje mutáns, de a Becker-féle izomdisztrófia tünetei sokkal enyhébbek, az életkilátásokat és utódlást nem befolyásolja lényegesen. A főként a vázizmokban kifejeződő (de az idegsejtekben is fontos) disztrófin az izomsejtek membránjának belső oldalán helyezkedik el, és számos más fehérjéhez kapcsolódik. A DMD betegek esetén a disztrófin hiánya miatt a sejtmembrán stabilitása számottevően csökken. Az izomszövet fokozatosan gyengül, sorvad, helyét kötő- és zsírszövet veszi át. A járás kacsázó, a testtartás görnyedt, a betegek 9-10 éves korukra járásképtelenné válnak, szív működési zavarok lépnek fel, valamint a rekeszizom érintettsége miatt légzési elégtelenség. A betegség természete miatt a fiúk nem örökítik tovább a mutáns allélt²⁴.

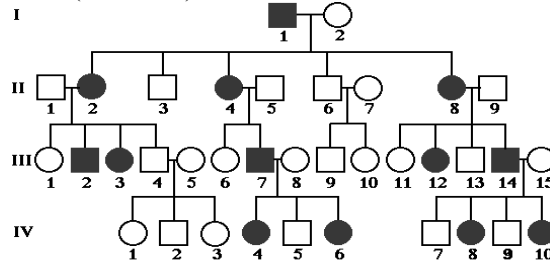
Szintén XR öröklésmentet mutat a **tesztikuláris feminizáció** (Morris-szindróma, teljes androgén inszenzitivitási szindróma, *complete androgen insensitivity syndrome* – CAIS), ami az X kromoszómán kódolt androgén receptor hibája miatt alakul ki. A kariotípus 46,XY, a fenotípus nő, de nincs méh, és a hüvely vakon végződik. A kariotípusnak megfelelően heréket találunk a hasüregben, és a tesztoszteron szint magas, csak a hormonreceptor, amelynek meg kellene kötnie és el kellett volna indítania a férfi nemi szervek kialakulását, erre nem képes (vagy nincs is). Az olyan kórképeket, amelyekben a kromoszomális és a gonádális nem megegyezik, egyedül a genitális nem különbözik, **pszeudohermafroditizmusnak** nevezük.

Ide sorolható még – sok egyéb betegség mellett – a favizmus (a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz – G6PDH hiánya, l. 10. fejezet), illetve a fragilis X szindróma, ami férfiakban a második leggyakoribb oka az öröklődő mentális retardációnak (a mutáció miatt a DNS szerkezet kissé torzul, ami metafázis kromoszóma-preparátumban az X kromoszóma törését utánozhatja, l. még a 2. és 8. fejezetben).

X-hez kötött domináns (XD) öröklődés: Egy X-hez kötött jelleget akkor tekintünk dominánssnak, ha heterozigótákban rendszeresen kifejeződik. Az X-hez kötött domináns öröklésmentet könnyen elkülöníthető az autoszomális dominánstól az **apáról fiúra való öröklődés teljes hiánya** révén, mivel az apák a fiaikra nem örökítenek X kromoszómát, csak Y-t. Egy teljes penetranciájú XD jelleg családfán való azonosításának legfontosabb elkülönítő jegye, hogy egy **érintett férfi minden lánya érintett**, míg **fiai közül egy sem**, ha egy lány is egészséges vagy egy fiú is érintett, akkor a jelleg egészen biztosan autoszomális és nem X-hez kötött. Ha a jelleg nőkön keresztül öröklődik, akkor a mintázata semmiben sem tér el az auto-

²⁴ Hogyan maradhat fenn nagyjából stabil gyakorisággal a férfi nemből letális, DMD-t okozó disztrófin mutáció? Úgy tartják, hogy a mutáns allélek kb. 1/3-a új mutáció eredménye. Ez azt is jelenti, hogy ez a fatális betegség családi előzmények nélkül is megjelenhet.

szomális domináns jellegektől, hiszen a nőknek ugyanúgy egy pár X kromoszómájuk van, mint ahogy autoszomális kromoszómáik is párokat alkotnak, és egy heterozigóta nő minden egyes gyermekének nemtől függetlenül 50% esélye van a mutáns allél öröklésére (3-8. ábra).



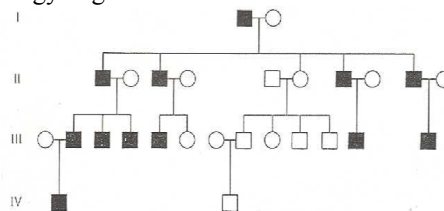
3-8. ábra

X-hez kötött domináns jelleg öröklődési mintázata családfán

Beteg apa összes lánya érintett, míg fiai közül senki. A jelleghordozó anyák utódai fele-fele arányban érintettek illetve egészségesek.

Csak pár X-hez kötött rendellenességet osztályoztak dominánsként. Ilyen a **hipofoszfátémia (D-vitamin-rezisztens angolkór)**, amelyben a vesetubulusok nem képesek megfelelően visszaszívni a filtrátumból a foszfátot. A hibás gén az endopeptidázok olyan családjába tartozik, melynek tagjai peptid hormonokat aktiválnak vagy degradálnak. Az még nem ismert, hogy ez a hibás allél hogyan vezethet a foszfát metabolizmus zavarához és angolkórhoz. Mindenesetre a rendellenesség teljesíti az X-hez kötött dominancia feltételeit, mivel a mutáns allél jelenléte esetén mindkét nem érintett, és a szérumban a foszfátszint a heterozigóta nőkben kevésbé csökkent és az angolkór kevésbé súlyos, mint az érintett hemizigóta férfiakban. Így öröklődik az *AMELX* mutációja miatt kialakuló **amelogenesis imperfecta** is (több auto-szomális gén mutációja szintén okozhatja – genetikai heterogenitás), mely a fogak zománcát érinti. A betegség fő tünetei: a vékony zománcréteg, mely elszíneződött, kis gödröcskékkel és barázdákkal a felszínén, érzékeny a fogszuvasodásra és a hőingadozásra. Érinti mind a tej-, mind a maradó fogakat.

Y-hoz kötött öröklődés: Mivel Y kromoszóma csak a férfiakban van, ezért az Y-on található gének által meghatározott jellegek férfiágon öröklődnek. Egy érintett férfi minden fia és minden fiúági fiúunokája, fiúdedunokája (és így tovább) szintén érintett lesz (3-9. ábra). Így öröklődik a szőrös fül, az ujjak közötti redő, valamint természetesen az Y-on található az *SRY* lokusz illetve egyéb gének.



3-9. ábra

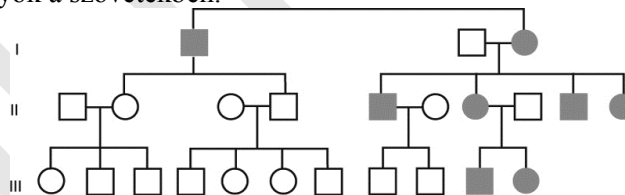
Az Y-hoz kötött öröklődés mintázata családfán

Csak férfiak érintettek, az első érintett személy minden fiúági utóda.

Mitokondriális öröklődés

A mitokondriumok (és növényekben a plasztiszok) rendelkeznek önálló genetikai információval. Ezek a sejtorganellek ősei valamikori prokarióta sejtek voltak, melyeket ősi eukarióták bekebeleztek, és szimbiózisa léptek egymással. A mitokondriumok (és plasztiszok) specializálódtak energiatermelésre (illetve fotoszintézisre, anyagtárolásra), a gazdasejt pedig védelmet és szükséges anyagokkal való ellátást biztosít számukra. Genomjuk jelentős részét elvesztették (mivel feleslegessé vált, illetve számos gén átkerült a sejtmagba), de önállóan replikálódnak, és önálló fehérjeszintézisre képesek. Egy sejten belül számos mitokondrium található (egy májsejtben például több ezer), melyek genetikai anyaga megegyezhet teljesen (**homoplazmia**), de előfordulhatnak mutáns mitokondriumok is közöttük (**heteroplazmia**).

A zigóta minden mitokondriuma a petesejtből (tehát az anyától) származik, a hímivarsejt mitokondriuma nem kerülnek be a megtermékenyítéskor, vagyis emberben a mitokondriális gének **anyai (maternális)** öröklődést mutatnak, nem mendeli módon öröklődnek (3-10. ábra). (Ez nem minden fajnál van így, ezért szokás **extrakromoszómális, extranukleáris öröklődésről** beszélni, melybe természetesen beletartozik a plasztiszok öröklődése is.) Ha egy nő homoplazmiás egy mitokondriális mutációra, akkor az összes gyermeke öröklíti ezt a mutációt, míg ha egy férfi homoplazmiás egy mtDNS mutációra, akkor egy gyermeke sem fogja azt örökölni. Heteroplazmia esetén a különböző sejttypusok (főként a nagy energiaigényű szervek: vázizom, szívizom, agy) mutáns mitokondriumainak részaránya határozza meg a tünetek súlyosságát. A **MERRF szindróma** (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers* = rojtos-vörös izomrostok – mioklonusos epilepszia; egy lizint hordozó tRNS mutációja okozza) normál mitokondrium hiányában letális, jelenlétében a tünetek: sükettség, fáradtság, epilepszia, akaratlan mozgások, agyvérzés, kristályzárványok a szövetekben.



3-10. ábra

Leber-féle optikus neuropátia öröklődése

Beteg anyának az összes gyermeke beteg, míg beteg apa gyermekei közül egy sem érintett.

Betegség gének azonosítása, emberi jellegek öröklöttségének meghatározása

A betegség gének azonosítására két módszert alkalmazhatunk. Az első, a **kapcsoltsági analízis család-vizsgálatokon** alapszik, és annak a kromoszómális régió-

nak a behatárolását célozza, amely a betegség örökítésében szerepel. A másik, az **asszociációs vizsgálat populáció-alapú**, és bizonyos variáns(ok) gyakoriságának eltéréseit vizsgálja a betegek és az egészséges kontrollok csoportjaiban, ily módon ez a megközelítés túllép a családi esetlegességeken. Ebben a jegyzetben nem foglalkozunk részletesebben ezekkel a módszerekkel.

Ahogy láttuk, az egygénes jellegek (többnyire) jól azonosíthatók családfák analízisével. Bonyolultabb a helyzet, ha többgénes, illetve multifaktoriális öröklődést feltételezünk, ilyenkor monozigóta (identikus, egypetűjű, MZ) és dizigóta (kétpetűjű, DZ) ikerpárok hasonlóságának (**konkordancia**) vagy különbözőségének (**diszkordancia, variancia**) összevetéséből következtetünk arra, hogy a jelleg milyen mértékben meghatározott genetikailag. A testvéreknél genetikai és környezeti variancia (eltérés) állhat fenn. Ez igaz a dizigóta ikrekre is, míg a monozigóta ikrek esetében csak a környezeti variancia okozhat különbséget a fenotípusban. Ez azt jelenti, hogy kivonva a környezeti eltérés okozta fenotípusos eltérést (monozigóta variancia) a dizigóták mindkét tényező által befolyásolt fenotípusos eltéréséből (dizigóta variancia), akkor legalábbis közelítőleg becsülni tudjuk a fenotípus kialakításában résztvevő genetikai komponens mértékét: **heritabilitás**, öröklöttség, jele h^2 . A következő képlet az egyik, mely a heritabilitás becslésére szolgálhat:

$$h^2 = \frac{\text{DZ ikerpárok varianciája} - \text{MZ ikerpárok varianciája}}{\text{DZ ikerpárok varianciája}}$$

Ha egy jelleg varianciáját főleg környezeti hatások határozzák meg, akkor a dizigóta ikrek varianciája megközelítőleg megegyezik a monozigóta ikrek varianciájával, ezért a számláló és ennek megfelelően maga a h^2 is 0. Ha a genotípus határozza meg a varianciát akkor a monozigóta ikrek varianciája 0 és a $h^2 = 1$.

Észak-európai populációban végzett ikervizsgálatokban a testmagasság h^2 értéke 0,6-nak bizonyult, ami arra utal, hogy az emberek testmagasságának variabilitását főleg génikus tényezők befolyásolják és kevésbé a környezet. Az ember testtömeg indexe (BMI, *body mass index*) esetében a h^2 értéke 0,7 és 0,8 között változik, erre a jellegre is erős hatással van a genotípus.

Az intelligencia szintén multifaktoriális jelleg, 0,5 és 0,8 között mért heritabilitással. Manapság mérésére leggyakrabban a Stanford-Binet tesztet használják. Ennek eredményét IQ (*intelligence quotient*, intelligencia hányados) pontokban adják meg:

$$\text{IQ} = \frac{\text{a teszt alapján megállapított szellemi kor}}{\text{valóságos kor}} \times 100$$

A képletből látható, hogy egy átlagos értelmi képességű személy IQ-ja 100, de az IQ érték a nevelés, oktatás minőségének megfelelően változhat az életkorral. Az IQ pontok eloszlása a multifaktoriális meghatározottságnak megfelelően a populációban folytonos, a normál eloszláshoz hasonló, de az alacsonyabb IQ pontok tarto-

mányában (IQ <60) a tényleges gyakoriság jóval meghaladja a várt értékeket. Csökkent értelmi képességet, sőt kifejezett gyengeelméjűséget okozhat a poligénes génrendszer terheltségétől vagy súlyosan negatív hatású környezeti ártalmaktól függetlenül számos ismert monolokuszos génikus defektus (PKU, galaktozémia, Tay-Sachs kór, Lesch-Nyhan szindróma, *Huntington chorea*, fragilis X szindróma stb.), kromoszóma rendellenesség (Down kór), beltenyészet eredetű IQ-csökkenés, de számos nem génikus betegség (agyvelőgyulladás, agyhártyagyulladás), magzati fertőzések (mindenekelőtt vírusok, mint pl. rubeola, de más fertőzések is, pl. *toxoplasmosis*), környezeti fiziko-kémiai ártalom, baleset.

4. fejezet

A vércsoportok öröklődése és a genetikai polimorfizmusok

A vércsoportrendszerek áttekintése

A vércsoportok ismerete az egészségügyi gyakorlatban elengedhetetlen a megfelelő vértranszfúziók (és szervátültetések) tervezéséhez, öröklődésük jellegzetességeinek megismerése pedig hozzásegítette a tudományt a genetikai polimorfizmus fogalmának megértéséhez. E fejezet részben a legismertebb vércsoportrendszerek (AB0, Rh) fontosabb genetikai jellemzőivel foglalkozunk, valamint említést teszünk néhány kevésbé közismert rendszerről is.

Az AB0 vércsoportrendszer

Azon molekulákat, amelyek a szervezetbe kerülve immunválaszt válthatnak ki, **antigénnek** nevezzük. **Antigén-determináns** vagy **epitóp** néven ismerjük e molekulák azon részét, ahová az ellenük termelt antitest kötődik. (L. még 7. fejezet.)

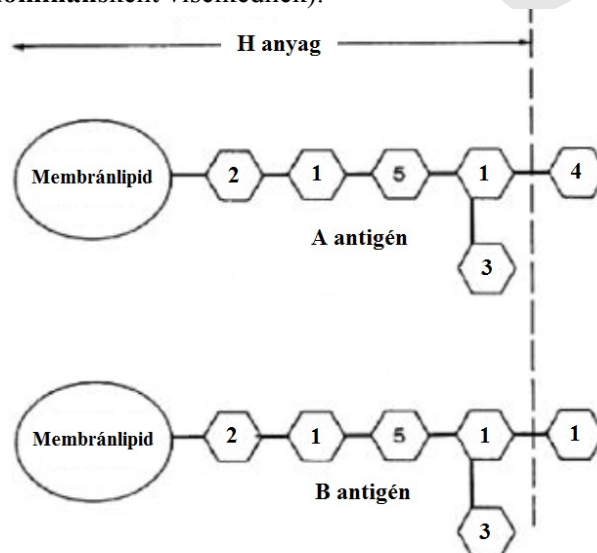
A vérátömlesztés kapcsán számos antigénnel kell számolnunk, amelyek a vörösvérsejtek felszínén találhatók. Ahogy fent utaltunk rá, ezek bármelyike klinikai jelentőséggel bírhat, ám a legismertebbek az **AB0 vércsoportrendszer** antigénjei: a sejtmembrán lipidjeihez kapcsolódó oligoszacharidok. 5 monoszacharid egység alkotja az ún. **H antigént**. A **0 vércsoportú**²⁵ egyénekben csak ezt találhatjuk meg. Ha ehhez a H antigénhez (más néven H anyaghoz) N-acetil-galaktózamin kapcsolódik 6. monoszacharidként, akkor **A antigénről**, ha pedig galaktóz, akkor **B antigénről** beszélünk (4-1. ábra). Az **A vércsoport** azt jelenti, hogy az egyén vörösvérsejtjeinek felszínén csak A antigének találhatók, a **B vércsoport** pedig értelemszerűen azt, hogy kizárólag B antigének. Az AB vércsoportú egyének esetében ugyanakkor mind az A, mind a B antigént megtaláljuk. Összesen tehát négyfajta fenotípust különböztetünk meg az AB0 vércsoportrendszer kapcsán.

A négyfajta vércsoportot egyazon lokusz 3 fő allélja határozza meg. (Ezért az AB0 vércsoportrendszer a genetikai **polimorfizmus** klasszikus humán példája – a fogalom értelmezését illetően a megfelelő alfejezetre utalunk az alábbiakban.) E

²⁵ A felfedező Landsteiner eredeti megjelölése szerint: sem A, sem B, tehát nulla.

három allél az I^A , I^B és az i (más jelölésben I^0). Ezek egy enzim különböző változatait kódolják, mégpedig azét a transzferázét, amely a H anyaghoz hozzákapcsolja a végálló monoszacharidot, így meghatározza a vércsoport-antigént. (Fontos tehát, hogy az AB0 lokusz nem a „vércsoportot kódolja”, hanem az azt meghatározó enzimet!)

Az I^A és I^B allélok működőképes enzimváltozatokat hoznak létre, amelyek csak a specificitásukban mutatnak eltérést: az I^A -nak megfelelő enzim N-acetil-galaktózamint, míg az I^B által kódolt változat galaktózt használ szubsztrátként. Az i allél viszont működésképtelen enzimet határoz meg, amely nem módosítja tovább a H anyagot. Minden diploid élőlény két kópiát hordoz egy-egy génre nézve, így az AB0 lokusz összesen háromféle allélja közül legfeljebb kettő lehet jelen a szervezetben. Ha a két kópia egyike működő enzimet kódol, az akkor is betölti feladatát, ha a másik kópiáról képződő enzim funkcióképtelen (vagy nem is jön létre). Ennek köszönhető, hogy az I^A és I^B allélok **dominánsak** az i allél felett (egymáshoz képest pedig **kodominánsként** viselkednek).



4-1. ábra

Az AB0 vércsoportrendszer antigénjei

A szaggatott vonaltól balra eső oligoszacharid szakaszt H antigénnek nevezük. A vonaltól jobbra eső monoszacharid kapcsolódása után alakul ki az A vagy B antigén. (Kulcs a monoszacharid egységekhez: 1: galaktóz; 2: glükóz; 3: fukóz; 4: N-acetil-galaktózamin; 5: N-acetil glükózamin.)

Ennek megfelelően a 0 vércsoportú egyének csak homozigóták lehetnek (ii), míg az AB-sek kizárólag heterozigóták ($I^A I^B$). Homo- és heterozigótákat is találunk azonban az A ($I^A I^A$ vagy $I^A i$) és a B ($I^B I^B$ vagy $I^B i$) vércsoportúak között.

Az 1950-es években, Bombayben leírtak egy speciális, igen ritka vércsoportot, amely hagyományos vércsoportvizsgálattal 0-ásnak mutatkozott, azonban kiderült, hogy ebben a csoportban nem csak a 6. monoszacharid, hanem maga a H anyag is hiányzik. E típust a felfedezés helye után Bombay vércsoportnak nevezték el.

A H antigén létrejöttéért nem az AB0 lokusz által kódolt transzferáz, hanem egy másik enzim felelős, de ahogy az A és B antigének esetében is láttuk, az enzim egyetlen kópiája már elégséges a fenotípus megjelenéséhez. (Ez a jellegzetesség általánosnak tekinthető a biológiában: ennek tudható be például, hogy az enzimhiány okozta betegségek többnyire recesszív öröklődést mutatnak. L. a 3. fejezetben.) Ennek megfelelően a H anyag megléte domináns a hiányával szemben, vagyis a *HH* és *Hh* genotípusú egyének rendelkeznek H anyaggal, míg a *hh* genotípusúak nem.

Mivel a Bombay vércsoportúakban hiányzik a H anyag, hiába van jelen esetleg működőképes transzferáz enzim, az nem tudja létrehozni a 4-1. ábrán látott A, ill. B antigént. Ez tehát a **recesszív episztázis** egy ismert humán példája (l. a 3. fejezetben): a *hh* genotípusú egyén mindenképpen Bombay vércsoportú lesz, függetlenül az AB0 lokuszon megfigyelhető genotípustól. (Mivel a klinikumban használtos vércsoporttesztek kizárásos alapon 0-ás vércsoportúnak nyilvánítanak minden olyan mintát, amelyből sem A, sem B antigén nem mutatható ki, a gyakorlatban nehézséget okozhat a 0 és a Bombay vércsoport elkülönítése – pedig ennek komoly jelentősége van a transzfúziók szempontjából.)

Tudnunk kell ugyanis, hogy a vérben immunizáció nélkül is jelen vannak **antitestek** minden olyan AB0 antigén ellen, amely nem található meg a saját vörösvérsejtek felszínén²⁶. Ezek az ellenanyagok elpusztítják az olyan vvtket, amelyek hordozzák az idegen antigént (a hagyományos vércsoportvizsgálat is ezen az ún. agglutináción, kicsapáson alapul). Ha tehát idegen antigént hordozó sejteket viszünk át a recipiens keringésébe, akkor az antitestek ezek hemolízisét váltják ki, és a transzfúzió akár végzetes is lehet.

Ennek köszönhető, hogy 0 vércsoportú személy csak 0-ás vért kaphat, hiszen mind anti-A, mind anti-B ellenanyaggal rendelkezik. A vércsoportúak kaphatnak A vagy 0, B vércsoportúak pedig B vagy 0 csoportba tartozó vért, míg az AB csoportúak esetében bármilyen vér adása biztonságosnak mondható, hiszen az ő vérükben az AB0-rendszerre jellemző antitestek egyike sem található meg. Fontos azonban, hogy mivel a Bombay vércsoportú személyek a H antigénnel sem rendelkeznek, ők a többi vércsoporttól eltérően anti-H antitesteket is termelnek (4-1. táblázat). Ez azt jelenti, hogy amennyiben transzfúzióra szorulnak, az komoly kihívás elé állítja az őket kezelő klinikát, hiszen kizárólag Bombay vércsoportú vér adható nekik.

A fent leírtakat elolvasva felvetődik a kérdés, hogy vajon a donor vérplazmájában keringő antitestek miért nem károsítják a recipiens vörösvérsejtjeit. Az esetek

²⁶ Ez nem öröklött tulajdonság, hanem nem pathogen baktériumokkal való latens fertőzés(ek) alakítják ki, már a korai csecsemőkorban, mely baktériumok sejt felszíni antigénmintázata igen erősen hasonlít az AB0 rendszer oligoszacharid antigénjeire.

többségében ezzel azért nem kell számolnunk, mert manapság csak egy vörösvérsejt-koncentrátumot transfundálnak, az antitesteket tartalmazó plazmát nem²⁷. Teljes vér transfúziót, amely a plazmával együtt történik, általában csak akkor végeznek, ha a sérült jelentős mennyiségű vért veszített egy balesetben. Ilyen esetekben az antitestek valóban veszélyt jelenthetnek a sérült egyébként is megcsappant létszámú vörösvérsejtjeire, ezért indokolt a csoportazonos vér adása. (Tervezett műtéti beavatkozás esetén ugyancsak csoportazonos vért adnak, szükség esetén figyelembe véve a ritka vércsoportokat is, amelyeket az alábbiakban fogunk röviden bemutatni.)

Fontos megjegyeznünk, hogy az AB0 rendszer antigénjei nem csat a vvt-k felszínén, hanem más, szöveti sejteken is kifejeződnek, így a sikeres donor-recipiens párosításban a szervátültetés szempontjából is alapvető jelentőségűek.

A 4-1. táblázatban az AB0 vércsoportrendszer legfontosabb jellemzőit foglaltuk össze.

4-1. táblázat

Az AB0 vércsoportrendszer genetikai és klinikai jellemzői

<u>Vércsoport</u>	<u>AB</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>0</u>	<u>Bombay</u>
Genotípus	$H-I^A I^B$	$H-I^A I^A$ vagy $H-I^A i$	$H-I^B I^B$ vagy $H-I^B i$	$H-ii$	$hh--$
Antigének	H, A, B	H, A	H, B	H	-
Antitestek	-	anti-B	anti-A	anti-A, anti-B	anti-H, anti-A, anti-B
A betegnek adható vércsoportok (vörösvérsejtek)	AB, A, B, 0	A, 0	B, 0	0	Bombay

²⁷ Abból különféle vérkészítményeket állítanak elő, amelyek adandó alkalommal úgyszintén életmentők. Pl. VIII-as véralvadási faktor hemofília A-ban szenvedők számára.

Az Rh vércsoportrendszer

1940-ben Landsteiner és Wiener elvégeztek egy kísérletet, amelyben a *Macacus rhesus* majom vörösvérsejtjeivel immunizált nyulak vérszérumát keverték el emberi vérmintákkal, és azt tapasztalták, hogy a vizsgált személyek 85%-ának esetében a humán sejteket is agglutinálta a szérum. Ez azt jelenti, hogy az emberi populáció nagy része rendelkezik egy olyan antigénnel, amely a majomban is megtalálható: ezt **rhesus (Rh) faktornak** nevezték el.

Azon egyéneket, akiknek vérében jelen van a rhesus faktor, **Rh-pozitívoknak** (Rh^+), a többieket pedig **Rh-negatívoknak** (Rh^-) nevezzük. E jegyzet keretei között csak a legerősebb immunogenitású Rh-antigénnel foglalkozunk, amelyet D-vel jelöl az irodalom. Ennek a legnagyobb a klinikai jelentősége. (A többi Rh-antigént, a C, c, E és e jelölésű fehérjéket egy másik lokusz kódolja.)

A D antigén megléte **domináns** öröklődésű tulajdonság, vagyis a *DD* és *Dd* genotípusú egyének Rh-pozitívok, míg a *dd* genotípusúak Rh-negatívok. Azzal ellentétben, amit az AB0 vércsoportnál láttunk, a D gén terméke nem enzim, hanem maga az antigenitásért felelős fehérje. A másik fontos különbség, hogy az anti-D ellenanyag az Rh^- vércsoportúak esetében nincs jelen a korai csecsemőkortól, hanem csak akkor kezd termelődni, ha Rh^+ vörösvérsejtek jutnak a keringésbe, így megtörténik az immunizáció. Ez azt jelenti, hogy az Rh^- férfiak és a menopauzán átesett nők egy alkalommal (legalábbis elméletben) kaphatnak Rh^+ transzfúziót, a második ilyen transzfúzió azonban már életveszélyes hemolízissel járna a keringésben jelen lévő antitestek miatt.

Magyarázatra szorul, hogy a fogamzóképes korú nők miért nem kaphatnak vért Rh^+ donortól egyetlen alkalommal sem. Ennek okát az **Rh-inkompatibilis terhességben** találjuk. Ilyen helyzet akkor áll elő, ha egy Rh^- nő Rh^+ magzatot hord (tehát a magzat D allélt örökölt az apától). A vér-placenta gát elvileg megakadályozza az anyai és a magzati vér keveredését, ám szülés (ill. vetélés vagy művi terhesség-megszakítás) kapcsán ez mégis megtörténik, és az anya immunrendszere felismeri az esetleges idegen antigént a magzati sejtek felszínén. Ez azt jelenti, hogy az első inkompatibilis terhesség alatt a magzat biztonságban van, hiszen az anya még nem immunizálódott az Rh-antigénnel, így nem termel anti-D antitesteket. Ám a szülés időpontjától, vagyis minden további terhesség során már kezdettől fogva jelen lesznek az anyai antitestek, amelyek átjutnak a vér-placenta gáton és súlyos, akár életveszélyes hemolízist váltanak ki a magzatban.

Ennek megelőzésére minden olyan terhesség esetében, amely vizsgálattal Rh-inkompatibilisnek bizonyul, a szülés (vagy terhességet befejező műtét) időpontja körül nagy mennyiségű anti-D antitestet juttatnak az anya szervezetébe. Ezek gyorsan kötődnek az anyai keringésbe bejutó magzati antigénekhez, és elfedik azokat, mielőtt az anya immunrendszere felismerné őket, ezáltal a következő terhesség is biztonságossá tehető.

Egyéb vércsoportrendszerek

A fent említett rendszereken kívül még számos ritkább vércsoportrendszert ismerünk. Ezek olyan sejtfelszíni antigéneket írnak le, amelyek ugyan kevésbé immunogének, ezáltal kisebb valószínűséggel okoznak problémát vérátömlesztés vagy terhesség kapcsán, de ha a beteg ritka vércsoporttal rendelkezik, amely nem kompatibilis a – többször is – kapott vérrel, akkor több transfúzió után már mutathatja a hemolízis jeleit. Még inkább igaz ez többszörös terhesség után, ahol is nagyobb a valószínűsége ismételten azonos, az apától örökölt magzati antigén jelenlétének.

E vércsoportok elnevezése legtöbbször azon beteg családnevéből származik, akinek esetével kapcsolatban először írták le az adott vércsoportot (pl. Kell, Duffy, Auberger stb.).

Klasszikus és molekuláris polimorfizmusok

Ahogy a fenti, megfelelő alfejezetben utaltunk rá, a megismert vércsoportrendszerek közül az AB0 a klasszikus **genetikai polimorfizmus** jól ismert humán példája. A genetikai polimorfizmust nem szabad összekevernünk a hagyományos polimorfizmussal, amely „sokalakúság”-ként fordítható le. A genetikában olyan lokuszokat nevezünk polimorfoknak, amelyek **2-nél több alléllal** rendelkeznek, és ezen allélok gyakorisága **meghaladja az 1%-ot** a populációban²⁸. (Amennyiben egy adott allél gyakorisága 1%-nál alacsonyabb, akkor nem polimorfizmusról, hanem mutáns allélról beszélünk. Lényegében tehát a polimorfizmus nem más, mint egy olyan mutáció, amely elterjedt egy adott populációban.)

A **klasszikus polimorfizmus** azt jelenti, hogy a 2-nél több allél a fenotípusban is megfigyelhető különbséget okoz (ahogy az AB0 vércsoportrendszer esetében láttuk), míg a **molekuláris polimorfizmus** egy bizonyos DNS szekvencia eltérésére utal. (Molekuláris polimorfizmusok esetében is az allél szót használja az irodalom annak ellenére, hogy az esetek többségében nem génről, hanem olyan DNS szakaszról van szó, amely nem kódol fehérjét vagy RNS-t.)

Egyre több enzimről derül ki – napjainkban is – a nagyfokú polimorfia. Kiemelt klinikai jelentősége van pl. a CYP enzimek sokalakúságának, l. 10. fejezet.

E bevezető után tekintsünk át néhány konkrét polimorfizmus-fajtát, természetesen csak azok legfontosabb jellemzőire szorítkozva.

A fő hisztokompatibilitási komplex (MHC)

Ahogy a neve is mutatja, a **fő hisztokompatibilitási komplex** (angol kifejezéssel *major histocompatibility complex* vagy **MHC**) arra az antigéncsoportra utal, amely meghatározza, hogy egy transzplantáció (leggyakrabban veseátültetés) eseté-

²⁸ Kissé eltér ettől a képtől az SNP-kre vonatkozó felfogás, amint azt a név is mutatja: *single nucleotide polymorphism*; itt már két változatot is polimorfnek említenek. (L. alább.)

ben a donorból származó szerv „kompatibilis”-e a recipiens szervezetével, más szóval nem lép-e fel immunválasz az ún. *graft*-tal (átültetett szervvel) szemben²⁹.

Az MHC-t az ember esetében leginkább **HLA**-nak (*human leukocyte antigen*) nevezzük, és a 6-os kromoszómán találjuk azon – szorosan kapcsolt – géneket, amelyek az antigénként viselkedő sejtfelszíni glikoproteineket kódolják. Két fő antigéncsoportot kell megemlítenünk: az MHC I. osztályt, amelybe a HLA-A, HLA-B és HLA-C lokuszok tartoznak (ezek valamennyi maggal rendelkező sejtünk felszínén kifejeződnek), valamint az MHC II. osztályt, amely a HLA-DP, HLA-DQ és HLA-DR lokuszokat foglalja magában (ezeket csak a makrofágok és a limfociták expresszálják).

A HLA antigének legfontosabb feladata az, hogy az immunrendszer számára elkülöníthetővé tegyék a saját és az idegen sejteket: ha a sejtfelszíni antigénminta eltér a sajáttól, akkor a citotoxikus T-sejtek működésbe lépnek, és elpusztítják azt a sejtet. E mechanizmus feltétele, hogy a rendszer egyidejűleg több antigént vizsgáljon, amelyek mindegyike nagyfokú változatosságot, **polimorfizmust** mutat (akár a 26-féle betűt és 10-féle számjegyet használó, több elemből álló azonosító az útlevelel). E polimorfizmus miatt a fent említett HLA lokuszok esetében a megszokottól eltérő módon az egyes allélokat nem betűvel, hanem számmal jelöljük: pl. HLA-A3, HLA-B7 stb. Minden fontosabb HLA lokusz több száz alléllal rendelkezik a *Homo sapiens* fajban. Ezek egy része fehérje szinten is elkülöníthető, mások csak DNSben detektálható variánsok.

Természetesen valamennyi diploid sejtünkben lokuszonként 2 allél található, ezek pedig külön-külön kialakítják a rájuk jellemző antigént, azaz egyik sem domináns vagy recesszív a másikkal szemben. Ez a **kodominancia** jelensége.

A rendszer harmadik fontos genetikai jellegzetessége, hogy a lokuszok rendkívül szoros **kapcsoltsága** miatt a *crossing over* gyakorlatilag sohasem választja szét őket, vagyis egy-egy allélsorozat: **haplotípus**³⁰ változatlanul jelenik meg a következő generációban. Ha pl. a szülő egyik haplotípusa HLA-A1, B8 (vagyis ezt a két allélt hordozza az egyik kromoszómáján), a másik pedig HLA-A2, B51, akkor ő maga fenotípusában az A1, A2, B8, B51 antigénekkal rendelkezik, ám a mendeli genetikában látott elvekkal szemben nem örökítheti ezek bármely kombinációját az utódjára, csak a két haplotípus egyikét, változatlan formában. Tehát, ha az utód az A1 allélt örökölte ettől a szülőtől, akkor biztosan örökölni fogja a B8 allélt is, míg a B51-et nem.

Jól ismert az orvosi szakirodalomban, hogy **bizonyos HLA antigének összefüggést mutatnak egyes betegségekkel**. A **HLA-B27** antigénnel rendelkezők koc-

²⁹ A fent említettek értelmében az AB0 rendszer oligoszaharidjai is transzplantációs antigének! De ezeket nem soroljuk az MHC-hez. Ha az átültetett szervvel szemben immunválasz lép fel, azt *host versus graft* reakcióként említik. (Ellentéte a *graft versus host* reakció.)

³⁰ A haplotípus kifejezést egyéb, nevezetesen molekuláris (DNS-szekvencia) értelemben is használjuk, pl. a HapMap meghatározás az SNP-vel kapcsolatosan. (L. 9. és 12. fejezet.)

kázata pl. 90-szer magasabb a csigolyák krónikus gyulladására, a Behtyerev-kórra (*spondylitis ankylopoetica*) nézve, mint az antigénnel nem rendelkezők, vagyis a **relatív kockázat** 90³¹.

SNP (egy pontos nukleotid-polimorfizmus)

A klasszikus genetikai polimorfizmusok után most vizsgáljunk meg néhány molekuláris polimorfizmust!

Az **SNP** (angol elnevezése *single nucleotide polymorphism*, a rövidítés angol ejtése: snip) egyetlen nukleotid cseréjét jelenti a DNS szekvenciájában; valójában tehát csak populációs gyakoriságában tér el a pontmutációtól (lásd fent). Az SNP-k többsége a nem kódoló szekvenciákban található, noha kódoló szakaszokban is ír-tak le ilyen polimorfizmust; itt azért maradnak meg ritkábban a polimorf allélok, mert az evolúció általában fixálja azt, amely jobban működő fehérjét eredményez, így segíti a faj adaptációját.

Jó példa erre a **sarlósejtes anémia**. Ezért a betegségért egy A→T tranzíció felelős a 6. aminosavat kódoló tripletben (vagyis lényegében egy SNP³²: az A allél a gyakoribb, és ez eredményezi az egészséges fenotípust, míg a T allél ritka: inkább mutánsnak mondjuk, ez okozza a sarlósejtes betegséget). Itt azért nem tűnt el a kórképeért felelős SNP, mert a sarlósejtes jelleg (vagyis a heterozigótáság) védelmet nyújt a malária kórokozója ellen, amely a vörösvérsejtekben élőszködik (l. még 3. fejezet). Olyan népegekben tehát, amelyek maláriával sújtott területen élnek, a T allél előnyt jelent az A-val szemben.

A szakirodalom beszámol róla, hogy az a genotípus, amit az emberi genomban található rengeteg SNP allél együttese alkot, számos betegség kialakulásának valószínűségét befolyásolja kisebb-nagyobb mértékben (ennek okai nagyrészt nem tisztázottak).

A rizikófaktornak tekinthető és a védő hatású allélok felderítése segíthet megbecsülni a különböző genotípussal rendelkező egyének kockázatát az adott megbetegedésre nézve. E vizsgálat elnevezése GWAS (*genome-wide association study*, azaz teljes genom asszociációs vizsgálat).

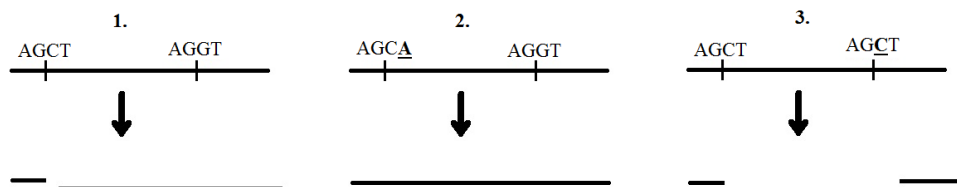
RFLP (restrikciós fragmens hossz polimorfizmus)

Az **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*), amint a neve is mutatja, a restrikciós endonukleázokkal nyert fragmentumok hosszának polimorfizmusát jelenti. A **restrikciós endonukleázok**, vagy egyszerűbben restrikciós enzimek álta-

³¹ Fontos! **Nem abszolút kockázatról van szó!** A **relatív kockázat** a rizikótényezővel rendelkezők csoportjának kockázata osztva a rizikótényezővel nem rendelkező csoport kockázatával. A jelenség okát nem ismerjük, az egyik elmélet szerint kapcsoltsági viszony állhat fenn az antigént kódoló HLA lokusz és a betegségért felelős gén között.

³² Nincs véglegesen lezárt terminológia tekintetben, hogy mi az SNP és mi a mutáció. Az egyik – többé-kevésbé általánosan elterjedt – felfogás szerint a pontmutáció (báziscsere, l. 8. fejezet) gyakorisága 1%-nál kisebb, az SNP-é 1%-nál nagyobb a népességben.

lában egy 4 vagy 6 nukleotidpárból álló palindrom³³ szakaszt ismernek fel és hasítanak a DNS-ben (bővebben lásd a 12. fejezetet).



4-2. ábra

Különböző SNP-k hatása a restrikciós fragmentumok méretére

Az *AluI* restrikciós endonukleáz az 5'-AGCT-3' szakaszt ismeri fel és hasítja. (Noha az ábrán csak a DNS kódoló szálát ábrázoltuk, értelemszerűen a 3'-5' szál is hasításra kerül, mivel az AGCT palindrom szekvencia.) A vizsgált szakaszon leggyakrabban egy AGCT felismerőhely található, valamint egy AGGT szekvencia, amelyet az enzim nem ismer fel – ám mindkét helyet SNP érintheti. Az 1. esetben a már említett, leggyakoribb allélokat látjuk, míg a 2. esetben a felismerőhelyet eltörölte egy ritkább SNP allél, a 3. esetben pedig az allél felismerőhellyé alakította az AGGT szakaszt.

Az eljárás során a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt ilyen enzimmal emésztik, majd a kapott fragmentumokat agaróz gélen futtatják, így méret szerint elválasztják. Akkor beszélünk RFLP-ről, ha nem mindig ugyanolyan méretű fragmentumokat kapunk, hanem megfigyelhető egy bizonyos variáció a különböző minták esetében. Ennek egyik oka az lehet, hogy a felismerőhelyen SNP található (4-2. ábra). Ám az RFLP nem pusztán az enzim felismerőhelyeinek polimorfizmusát jelentheti. Az is eltérést okozhat a restrikciós emésztés során kapott fragmentumok méretében, ha a két felismerőhely közötti szakasz hossza változik. Ennek oka lehet pl. **deleció**, **duplikáció**, **triplet-expanzió** vagy **szatellita DNS**. (Ez utóbbiról az alábbiakban számolunk be részletesebben, míg a többitől a 8. fejezetben.)

A szatellita DNS

A DNS **nem kódoló** területein található, **tandem ismétlődő** szekvenciákat nevezük **szatellitáknak**. (Egy ismétlődés akkor „tandem”, ha az ismétlődő szakaszok közvetlenül egymást követik, pl. az ATCATCATCATC szekvencia az ATC triplet 4-szeres tandem ismétlődése.)

A szatellita DNS-nek számos típusát különböztetjük meg aszerint, hogy hány nukleotid ismétlődéséről van szó, hol található a kromoszómán stb. A **mikrosza-**

³³ A kétszálú DNS palindrom szakaszának bármelyik szálán 5'-3' irányban haladva ugyanaz a szekvencia olvasható. A kifejezés eredete egy nyelvi játék: pl. a „Géza kék az ég” bármelyik irányban olvasva is ugyanazt jelenti.

tellita, más néven **STR** (*short tandem repeat*) elnevezés egy 2-9 nukleotid hosszúságú szakasz változó számú (akár 100-nál is több) ismétlődésére utal. (Ide tartozik tehát az ATC szekvencia ismétlődése is, amit fent példaként hoztunk.) Ha az ismétlődő szakasz hosszabb, 10-60 nukleotidból áll, akkor **miniszatellitáról**, vagy **VNTR**-ről (*variable number tandem repeat*) beszélünk.

Mivel mind az STR, mind a VNTR jellemzője az egyes szekvenciák rendkívül változó számú ismétlődése, e lokuszok nagyfokú polimorfizmust mutatnak, hiszen ha az ismétlődések száma akár csak 1-gyel is eltér, már egy másik allélról szólunk. (Megjegyzés: bár a szatelliták nem kódoló szakaszban találhatók, mégis alkalmazzuk rájuk a „lokusz” és „allél” elnevezéseket.) Az allélok kimutatása éppen azon alapszik, hogy a hosszuk eltéré: **PCR** segítségével felszaporítjuk a szatellitát tartalmazó szakaszt, majd agaróz gélen megfuttatva detektáljuk a különböző méretű PCR termékeket (a PCR módszertanát illetően a 12. fejezetre hivatkozunk). A legtöbb esetben két különböző sávot látunk a gélen egy adott személy mintájából, hiszen a polimorfizmus miatt nagy a valószínűsége, hogy az illető anyai és apai kromoszómája eltérő allélt hordoz az adott lokuszra nézve.

Az STR és VNTR lokuszok nagy száma és rendkívüli polimorfizmusa ideális eszközökké teszi őket az apasági és bűnügyi **személyazonosításban**. Ilyenkor egyidejűleg számos lokuszt vizsgálnak, hogy minimálisra csökkentsék a tévedés lehetőségét: a több lokuszon azonosított allélpárok sorozata az ún. **DNS-ujjlenyomat**.

A kópiaszám-polimorfizmus

A genetika egyik régi dogmája, hogy minden génünkből 2 kópia, vagyis allél található a szomatikus (diploid) sejteinkben: az egyik anyai, a másik apai eredetű. A legújabb tudományos eredmények tükrében azonban ez a dogma is megdőlt.

A teljes humán genom mintegy 10-12 százalékát érintheti olyan átrendeződés (pl. duplikáció, deléción), amely változást okoz a kópiaszámban. Ma már tudjuk, hogy ez alól a génjeink sem kivételek. Egyelőre nagyrészt tisztázatlan azonban, hogy a kópiaszám-polimorfizmus mely gének esetében lehet felelős betegségek létrejöttéért. Az sem kizárható, hogy bizonyos lokuszok esetében a nagyobb kópiaszám evolúciós előnyt jelenthet: a nyálamiláz génjéből pl. a legtöbb ember több mint 6 kópiával rendelkezik, sőt, a 15 kópia sem ritka.

Egy elmélet szerint ez annak köszönhető, hogy az ember tápláléka lényegesen több keményítőt tartalmaz, mint a többi főemlősé, így nagyobb mennyiségű amilázra van szükségünk. Kissé teleologikus megfogalmazás, de a lényegét illetően alighanem igaz.

5. fejezet

Molekuláris genetika

A DNS szerkezete, replikációja, a gének expressziója

A DNS, mint örökítő anyag

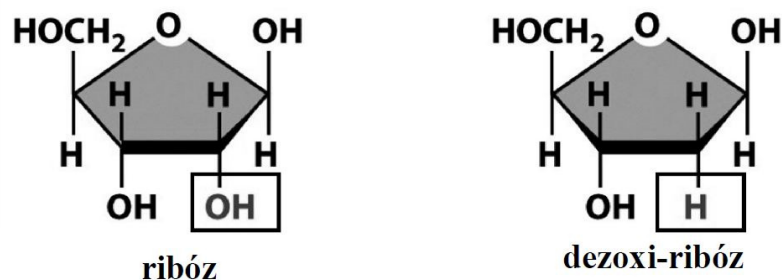
Bár a XX. század végére már a gének klónozása és a genomszekvenálás is lehetővé vált, a század elején még nem létezett egyértelmű bizonyíték az örökítő anyag mibenlétére. **Miescher** a XIX. században felfedezett egy enyhén savas anyagot a fehérvérsejtek magjában, a nukleint, amit később nukleinsavnak neveztek el, azonban voltak kétségek a genetikai anyag mivoltát illetően. A genetikában mérőföldkönek számít **Griffith** *Streptococcus pneumoniae* baktériummal 1928-ban végzett kísérlete. Ez tüdőgyulladást okozó baktérium. Sajátossága, hogy poliszaharid tokot képez maga körül, amely védelmet biztosít a szervezet immunrendszerével szemben, így a patogenitásában fontos szerepet tölt be. Vannak azonban olyan törzsei, amelyek tok képzésére képtelenek. A tokot képző baktérium telepeire a sima, fényes felület jellemző, amit **S-variáns**nak neveznek (*smooth* = sima). A tokot nem képző baktériumot durva felületű telepek kialakítása jellemzi, amit **R-variáns**ként jelöltek (*rough* = durva, érdes). Az S- és R-variánsra jellemző fenotípust ugyanazon gén vad és mutáns allélja határozza meg. Ha az S-variánssal fertőztek egereket, azok tüdőgyulladásban megbetegedtek és elpusztultak. Az R-variáns, illetve a hővel elölt S-variáns baktériumok azonban nem okoztak megbetegedést. Emellett Griffith azt tapasztalta, hogy az R-variáns és hővel elölt S-variáns baktériumok keverékével fertőzött egerek megbetegedtek és belőlük az S-variáns törzs kitegyészthető volt. Ebből arra következtetett, hogy valamilyen, az elölt S-variánsból származó anyag állíthatta helyre az R-variáns tokképzését és patogenitását. A jelenséget **genetikai transzformáció**nak nevezték el. Azt, hogy a DNS felelős a transzformációért **Avery** és munkatársai bizonyították 1944-ben. Az S-variánsból izolált DNS-t az R-variáns tenyészetéhez adták, melyek között így megjelentek S-variáns baktériumok. Azonban a DNS preparátumokban előfordulhat RNS, illetve fehérje szennyezésként, ezért azt bebizonyítandó, hogy valóban a DNS volt felelős az előbbi jelenségért, a DNS preparátumot különböző enzimes kezeléseknek vetették alá. A proteázokkal (fehérje bontó enzimek), illetve ribonukleázokkal (RNS-t bontók) történő kezelés nem érintette a transzformáló aktivitást, azonban a DNáz kezelés (DNS-t bontó enzim) teljesen megszüntette azt.

A DNS örökítőanyag voltára további bizonyítékul szolgáltak **Hershey és Chase** T2 bakteriofággal végzett kísérletei 1952-ben. A bakteriofágok a baktériumok vírusai, melyek örökítő anyagukat a fertőzés során a baktériumokba juttat-

ják (bővebben lásd a 6. fejezetben). Kísérleteik során kétféle, radioaktívan jelölt fágpreparátumot használtak. A ^{32}P a fág DNS-t (mivel a foszfor nukleinsavakban fordul elő), a ^{35}S pedig a fehérjéket jelölte meg (mivel a kén fehérjék építőeleme). A fertőzött baktériumokban a ^{32}P volt nagyjából kimutatható, ami az utódfágokban is jelen volt. Ebből következett, hogy a fágfertőzésben a DNS lehet a genetikai anyag.

A DNS szerkezete

A nukleinsavak – a fehérjékhez hasonlóan – sorrendspecifikus biopolimerek, makromolekulák. Építőköveik a **nukleotidok**, amelyek egy nitrogéntartalmú szerves bázisból, egy pentózból (5 szénatomos cukor) és egy foszfát csoportból épülnek fel. A bázisok és a pentóz által alkotott vegyületek a **nukleozidok**. A **bázisok** felépítésük szerint két csoportra oszthatók, pirimidinekre és purinokra. A **pirimidinek** 6 atomos, a **purinok** 9 atomos heterociklikus gyűrűt tartalmaznak. 5 bázist különböztethetünk meg: a purinok közé sorolható az **adenin (A)** és a **guanin (G)**, a pirimidinekhez tartoznak a **timin (T)**, a **citozin (C)** és az **uracil (U)**. A DNS (dezoxiribonukleinsav) és az RNS (ribonukleinsav) közötti különbséget egyrészt az adja, hogy az RNS-ben a pentóz molekula ribóz, a DNS-ben pedig dezoxiribóz (a 2. szénatomján $-\text{OH}$ csoport helyett $-\text{H}$ van). A DNS-ben lévő bázisok: adenin, guanin, citozin és timin, míg az RNS-ben timin helyett uracil található. A DNS kettős hélix, az RNS – általában – egyszeres lánc.



5-1. ábra

A nukleotidok felépítésében részt vevő cukorkomponensek szerkezete

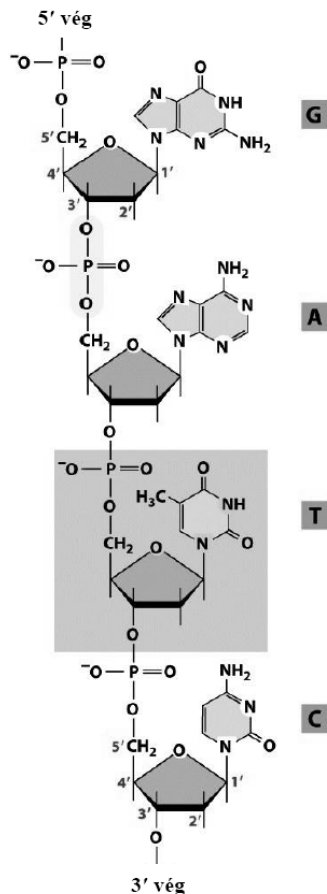
A 2. szénatomon az RNS molekulát felépítő ribózból $-\text{OH}$,
míg a DNS-ben található dezoxiribózból $-\text{H}$ található.

A nukleotidok összekapcsolódva **polinukleotid láncot** alakítanak ki, melynek gerincét az összekapcsolódó pentóz és foszfát csoportok képezik. A cukor-foszfát gerinc $5'-3'$ foszfodiészter kötésekkel épül fel, tehát minden nukleotid 5-ös szénatomján lévő foszfátcsoporthoz a láncban előtte elhelyezkedő nukleotid 3-as szénatomjához kapcsolódó hidroxil csoporthoz kötődik (5-2. ábra). A lánc egyik végén a terminális nukleotid 5' foszfát csoportja szabadon marad (5'-vég), míg a lánc másik

végét a 3' hidroxil csoport zárja (3'-vég). Hagyományosan a nukleinsavak szekvenenciáját 5'→3' irányban adjuk meg.

A biológiában mérföldkövet jelentett **Watson és Crick** munkássága, akik 1953-ban közölték a DNS kettős hélix modelljét. A modellalkotásnak a következő kiindulópontjai voltak. Röntgen-diffrakciós kísérletekből tudták, hogy a DNS szabályos helikális szerkezetű, illetve a DNS sűrűsége alapján valószínűsíthető volt, hogy a hélixnek két polinukleotid láncot kell tartalmaznia. Emellett ismerték a **Chargaff szabályt**, mely szerint a DNS-ben a G %-os aránya megegyezik a C %-os arányával, csakúgy mint az A% = T%.

A DNS **kettős hélix** szerkezetének felépítésében két ellentétes lefutású (**anti-parallel**) polinukleotid lánc vesz részt: az egyik lánc 5'→3', míg a másik 3'→5' lefutású. A kettős hélixet a polinukleotid láncok bázisai között kialakuló **H-kötések** kapcsolják össze, a G és a C között 3, az A és a T között 2 H hidrogénkötés alakul ki. A G-C és A-T párokat **komplementer** bázispároknak nevezzük. Emellett minden bázispár **hidrofób kölcsönhatásba** lép a felette és alatta elhelyezkedő bázispárral. A kettős hélixben a cukor-foszfát gerinc helyezkedik el kívül, melyben a foszfát csoportok negatív töltést hoznak létre.



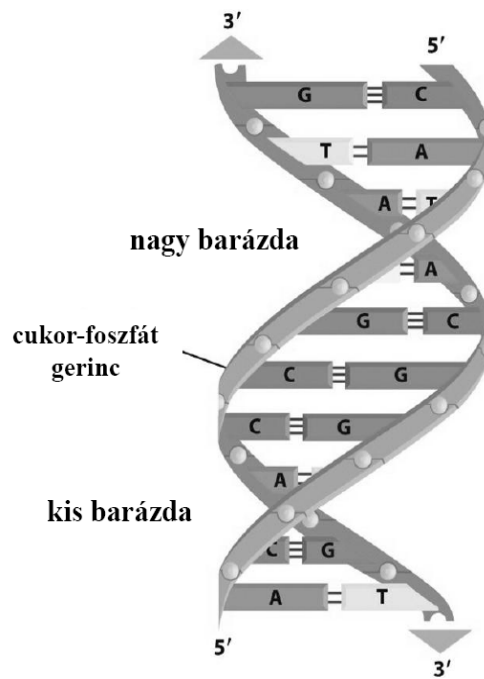
5-2. ábra

A polinukleotid lánc szerkezete

A nukleotidok 5' foszfát csoportja foszfodiészter kötéssel kapcsolódik a láncban előtte elhelyezkedő nukleotid 3'-hidroxil csoportjához. Az 5'-végen szabad foszfát, a 3'-végen pedig szabad hidroxil csoport foglal helyet.

A két DNS szál egymás körüli feltekeredése következtében a molekula felszíne felől nézve két különböző szélességű barázda alakul ki: a **nagy barázda** (2,2 nm átmérővel) és a **kis barázda** (1,2 nm átmérővel). A DNS-sel specifikus kölcsönhatásba lépő fehérjék általában a nagy barázdában kapcsolódnak. A kettős hélix jobbmenetes, azaz a csavarulatok az óra mutatóinak járásával megegyező irányban futnak le a molekula hossztengele körül. Az eddig ismertetett másod-

lagos szerkezet a **B-DNS**-re jellemző, fiziológiai körülmények között a DNS ebben a formában van jelen. Léteznek azonban alternatív másodlagos szerkezetek, ilyen pl. a **Z-DNS**, melynek különlegessége, hogy balmenetes, vagy az **A-DNS**, amely a duplahelikális RNS, illetve a DNS-RNS hibridek másodlagos szerkezetére jellemző. A DNS másodlagos szerkezetének fontos szerepe van a szabályozó fehérjékkel való kölcsönhatásban.



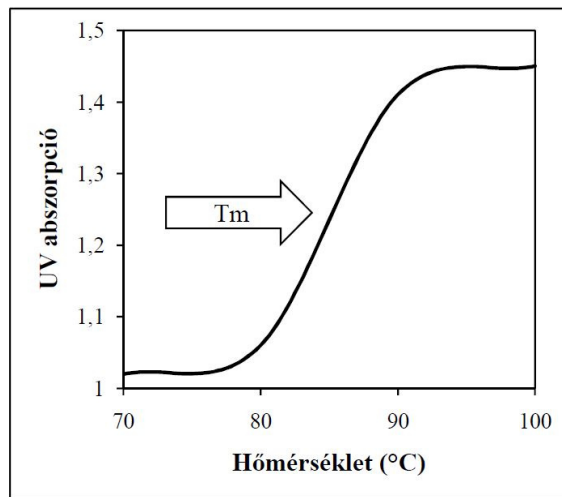
5-3. ábra

A DNS molekula kettős hélix szerkezete

A DNS felépítésében két, egymással komplementer, antiparallel lefutású lánc vesz részt, melyek között az összeköttetést a bázisok között kialakuló H-hidak biztosítják.

Ahhoz, hogy a DNS funkcióját elláthassa, időnként meg kell szünnie a két lánc közötti bázispárosodásnak, lokálisan szét kell válnia a két szálnak (pl. a replikáció, vagy a transzkripció során). A bázispárok közötti H-kötések felszakítása mesterséges körülmények között is elvégezhető. Ez a folyamat a **DNS denaturáció**, ami bekövetkezhet pl. akkor, ha a DNS oldatát alacsony sókoncentráció mellett melegítjük. A folyamat spektrofotometriával jól követhető. A DNS 260 nm-en mért extinkciója (UV-abszorpciója) egy szűk hőmérsékleti tartományon belül 30-50%-al megemelkedik. Ennek magyarázata, hogy a szálak szétválása következtében az UV elnyelő részecskék száma megnő. Azt a hőmérsékletet, melyen az extinkció növekedése fele a maximálisnak, a DNS **T_m pontjának** (*temperature of melting* = olvadáspont) nevezzük. A T_m pont értéke a G-C bázispárok arányától függ: minél

több G-C bázispár van a DNS-ben, annál magasabb a T_m pontja. Ez azzal magyarázható, hogy a G és C bázisok között a kapcsolatot 3 H-kötés tartja fent, ami sokkal erősebb, mint az A és T közötti 2 H-kötés. A denaturált DNS egyfonalas láncai megfelelő körülmények között képesek komplementer párjaikat megtalálni és azokkal újra kialakítani a kettős hélix szerkezetet. Ezt a folyamatot **renaturáció**-nak nevezzük. Ehhez a folyamathoz hasonló az ún. **DNS hibridizáció**. A különbség abban van, hogy a renaturáció során olyan komplementer szálakból alakul ki a kettős hélix, amelyek eredetileg is összetartoztak, míg a hibridizációval különböző eredetű polinukleotid láncok állnak össze. Ezt a tulajdonságot használjuk ki több molekuláris biológiai technikában (pl. a PCR során a primerek [1. 12. fejezet], vagy a *Southern blot* esetében a próba és a vizsgált DNS közötti hibridizáció nitrocellulóz membránon).



5-4. ábra

A DNS denaturációját az UV-abszorpció növekedése kíséri

Az X-tengely a hőmérsékletet mutatja °C-ban, az Y-tengely pedig a 260 nm-en mért extinkciót relatív egységekben (a DNS szobahőmérsékleten mért extinkcióját választottuk egységnek az egyszerűség kedvéért). A T_m az extinkciónövekedés 50%-ához tartozó hőmérsékleti érték (más megközelítésben a görbe inflexiós [áthajlási] pontja).

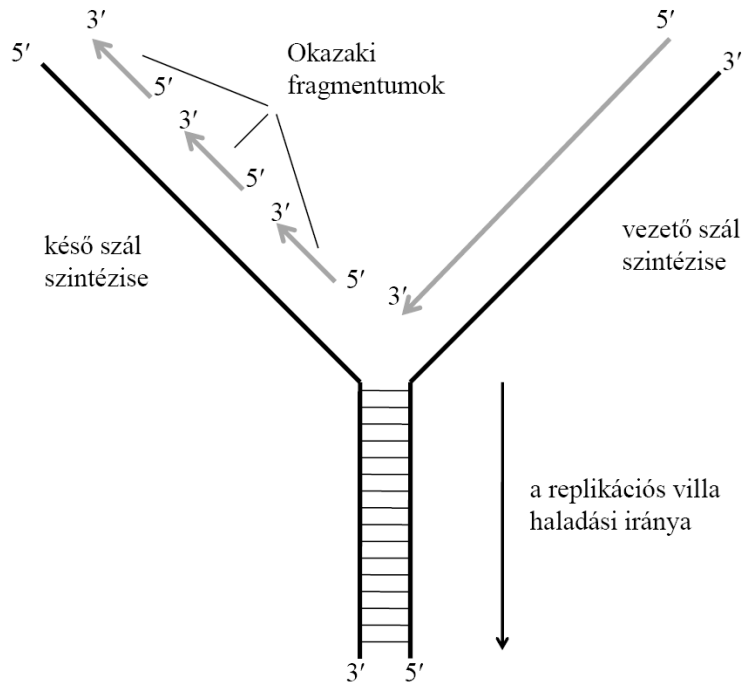
Fiziológias körülmények között a DNS molekulák sok esetben körré záródnak (pl. plazmidok, vírusok, baktériumok kromoszómája). Az eukarióta sejtek hatalmas lineáris DNS molekulái hurkokat képeznek, melyek kezdetét és végét fehérjék rögzítik (a nukleáris matrixhoz, l. 1. fejezet). Ha a kettős DNS hélixet megcsavarjuk, ún. **szuperhelikális szerkezet** alakul ki. A szuperhelikális szerkezet nélküli DNS molekula **relaxált** állapotban van. A szuperhelikális csavarulatok a molekulát feszülés alá helyezik (gondoljunk pl. arra, amikor a telefonzsinórt megcsavarjuk). Ha

a csavarodás ellentétes irányú a dupla hélix jobbmenetes csavarulatával, **negatív szuperhelikális szerkezetről**, ill. **negatív szuperhelikális feszülésről** beszélünk. A feszülés csökkenti az egységnyi DNS hossza eső csavarulatok számát, tehát megkönnyíti a szálak elválását, ami fontos lehet pl. a replikáció, vagy a transzkripció során. Ha a szuperhelikális csavarulat azonos irányú a dupla hélix jobbmenetes csavarulatával, **pozitív szuperhelikális szerkezetről** beszélünk, melyben a feszülés még jobban feltekeri egymásra a két láncot. A szuperhelikális struktúrát enzimek hozzák létre, ill. képesek megváltoztatni, ezeket az enzimeket **topoizomerázoknak** nevezzük.

Replikáció: DNS → DNS

Az eukarióta sejtciklus S szakaszában történik a DNS szintézise, a **replikáció**. Ekkor a DNS szálai szétválnak és mindkét szál templátként (mintaként) szolgál az új szál szintéziséhez, amely a nukleotidok beépülésével jön létre az eredeti, **templát** szállal szemben. A folyamat eredményeképpen két, az eredetivel teljesen megegyező DNS dupla hélixet kapunk. A replikáció **szemikonzervatív** módon történik, az utódmolekulák egyik szála a szülői molekulából származik, a másik pedig újonnan szintetizálódik. A DNS replikáció szemikonzervatív voltát **Meselson és Stahl** bizonyították a következő módon. *Escherichia coli* (közönséges bélbaktérium) sejteket tenyésztettek több generáción keresztül olyan táptalajon, amely a nitrogén nehéz izotópját (^{15}N) tartalmazta, így a baktériumok ezt építették be DNS-ükbe. Ezeket a baktériumokat később egy generáción keresztül olyan táptalajon növesztették, amely egy másik, közönséges izotópot (^{14}N) tartalmazott. Később a DNS sűrűségét megvizsgálva (mely CsCl gradiens centrifugálással történt) azt tapasztalták, hogy míg kezdetben a baktériumok DNS-ének mindkét szálára a nehéz izotóp jelenléte volt jellemző, az ^{14}N izotópot tartalmazó táptalajra oltás után a következő generációban a köztes sűrűségű DNS egyik szála az ^{15}N , a másik a ^{14}N izotópot tartalmazta. Tehát a DNS replikációja után képződő utód DNS egyik szála a szülői szál, a másik pedig az újonnan szintetizált.

Az alábbiakban az *E. coli* baktérium DNS-e replikációjának mechanizmusát mutatjuk be. A cirkuláris kromoszómán egy adott pontból indul meg a DNS replikációja. Ezt a szigorúan meghatározott pontot replikációs kezdőpontnak, vagy **replikációs origó**-nak nevezzük. A DNS megkettőzéséhez több fehérjére is szükség van. A replikációs origót egy speciális fehérje ismeri fel (DnaA), ahhoz kötődik, melynek hatására egy rövid, AT-gazdag régió felnyílik. Ahhoz, hogy a szintézis elkezdődhessen, a replikációs origónál a DNS két szálának lokálisan el kell válnia egymástól. Ebben a folyamatban a **helikáz** enzimé a főszerep, amely a kettős hélixet letekeri, így egy buborékszerű képződmény keletkezik (amit **replikációs buborék**nek szokás nevezni). Egy replikációs buborék egy replikációs egységnek, azaz **replikonnak** felel meg. A kettős hélix letekeredése során feszülés lép fel (gondoljunk pl. arra, amikor egy kötél rostjait megpróbáljuk elválasztani), amit egy topoizomeráz, az ún. **giráz** enzim szüntet meg.



5-5. ábra

A DNS replikációja

A replikációs origónál a szülői DNS szálak szétválnak és mindkét irányban megindul az új DNS szálak szintézise. Az így keletkezett replikációs buborék mindkét végén egy-egy replikációs villa van (itt csak az egyiket tüntettük fel). A **vezető** (templát, $3' \rightarrow 5'$) **szálon** az új DNS szintézise folyamatos, míg a **késő** ($5' \rightarrow 3'$) **szálon** ez csak szakaszosan valósulhat meg.

Ha a replikációs villa kialakult, kötődhet a DNS-hez a DNS szintézisét ténylegesen végző enzim, a **DNS polimeráz** (az *E. coliban*, 3 féle DNS polimeráz működik, a replikáció során a DNS szintézisét a DNS polimeráz III végzi). Ezen enzim felelős a DNS szintézis elongációjáért, azaz a megfelelő nukleotidok egymást követő beépítéséért. Azonban a DNS polimeráz III nem képes új láncot kezdeni, csak egy már meglévő lánc 3'-végéhez képes nukleotidokat hozzákapcsolni. Ezért az új szál szintézisét egy RNS polimeráz, a **primáz** kezdi, amely a templáttal komplementer rövid RNS szakaszt szintetizál. Ehhez az RNS primerhez kapcsol újabb nukleotidokat a DNS polimeráz III. Ezen RNS primert egy enzim később a szintetizálódó DNS molekula elejéről eltávolítja. Korábban tárgyaltuk, hogy a dupla hélix két szála ellentétes orientációjú, az egyik szál $5' \rightarrow 3'$, míg a másik $3' \rightarrow 5'$ irányultságú. A DNS polimeráz III kizárólag a készülő polinukleotid lánc 3'-végéhez képes nukleotidokat kapcsolni, ami a $3' \rightarrow 5'$ szálnál nem jelent problémát, hiszen a szintetizálódó DNS szál $5' \rightarrow 3'$ irányultságú lesz. Így ezen szál szintézise

folyamatosan történik, ezért **vezető szálnak** nevezzük. A másik, 5'→3' szálon azonban a DNS szintézis csak szakaszosan, a replikációs villa mozgási irányához képest visszafelé folyhat, ez a **késő szál**. Az így képződő rövid szakaszokat **Okazaki fragmentumoknak** nevezzük. Ezen a szálon a DNS polimeráz addig folytatja a DNS szintézisét, amíg el nem éri az előző Okazaki fragmentum elejét. Az Okazaki fragmentumokat később, az RNS primer eltávolítása után a **DNS ligáz** kapcsolja össze, így biztosítva a szakaszosan szintetizálódó DNS szál folytonosságát.

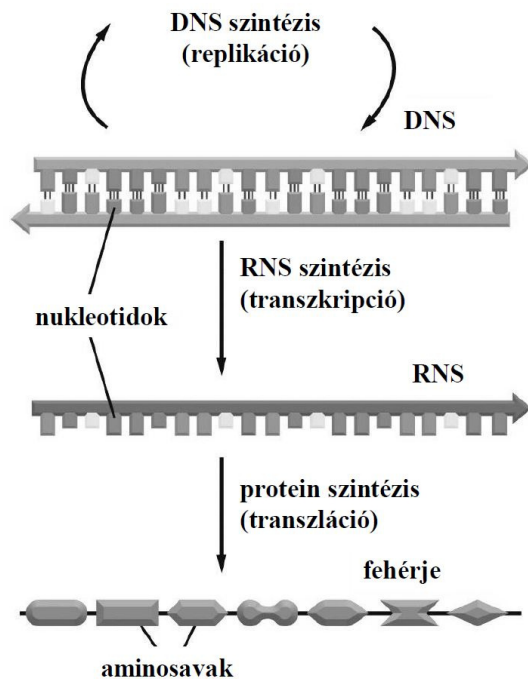
A pontos és hű replikáció előfeltétele annak, hogy a DNS, és általa az örökletes információ hibátlanul kerüljön át az utódsejtekbe. Ezt biztosítja a DNS polimerázok **korrekciós funkciója** (*proofreading*), ami azt jelenti, hogy a DNS polimeráz mielőtt a következő nukleotidot hozzákapcsolja a növekvő lánc 3'-végéhez, megvizsgálja, hogy az pontosan illeszkedik-e a komplementer párjával. Ha nem, 3'→5' exonukleáz aktivitása révén eltávolítja a hibásan beépített nukleotidot és a megfelelőt rakja a helyére. Így a hibák gyakoriságát 10^{-10} -re csökkenti.

Magasabbrendűekben a DNS replikációja hasonló módon megy végbe. Alapvető különbség, hogy az eukarióták kromoszómáján a replikáció nem egy, hanem több ponton kezdődik (több száz replikációs buborék is megfigyelhető a kromoszómákon). Az *E. coli*-ban ismertett, a DNS replikációjában fontos enzimeknek eukariótákban is megvannak a megfelelői, bár azoktól némileg különböznek.

A gének expressziója

A DNS-ben kódolt genetikai információ irányítja az élő szervezet fejlődését és életműködéseit, mely folyamatokban különböző fehérjék játszzák a főszerepet. A sejtekben azonban az adott időpillanatban nem minden gén aktív, rendkívül finom szabályozási mechanizmusok határozzák meg, hogy mely gének vannak „bekapcsolt” állapotban. Ahhoz, hogy egy gén kifejeződhessen, a DNS-ben tárolt információnak „fehérje nyelvre” kell fordítódnia, amely az mRNS molekula szintézisének közbeiktatásával valósul meg. Így a gének kifejeződésének, azaz expressziójának két alapvető lépése van. Először a DNS bázisszekvenciái az mRNS komplementer szekvenciáiba íródnak át, mely folyamatot **transzkripciónak** nevezzük. Ezt követi a második lépés, az mRNS bázissorrendjében tárolt információ aminosav szekvenciára való fordítása, a **transzláció**. A genetikai információátvitel iránya tehát: DNS → RNS → fehérje. Ez az ún. **centrális dogma**.

A DNS meghatározott szakaszait, amelyek egy funkcióképes makromolekulát kódolnak, **géneknek** nevezzük. Ez a funkcióképes molekula lehet fehérje, vagy RNS is. Az RNS molekuláknak több fajtáját különböztethetjük meg, ezek közül a génkifejeződés folyamatában az mRNS, tRNS és rRNS a központi jelentőségűek (lásd alább). Emellett a génexpresszió szabályozásában, a gének elcsendesítésében kiemelkedő fontosságúak az ún. mikro RNS-ek. Érdeemes megemlíteni, hogy vannak olyan RNS molekulák, amelyek a fehérjékhez hasonlóan katalitikus aktivitással rendelkeznek. Ezek az ún. **ribozimok**. Ilyenek pl. a viroidok (növényeket fertőző RNS molekulák), az önkivágódó intronok, vagy az RNS-ből és polipeptidből álló Ribonukleáz P komplex.



5-6. ábra
A DNS-től a fehérjéig: a genetikai információ megnyilvánulása
A transzkripció során a DNS-ben tárolt információ RNS-re íródik át. A fehérjeszintézishez az RNS szolgál mintaként.

Transzkripció: DNS → RNS

A transzkripció a komplementaritás elvén alapul hasonlóan a replikációhoz, azonban itt a felépülő új polinukleotid lánc RNS. Főbb lépéseit az *E. coli* modell-organizmusban tekintjük át. A transzkripció folyamata három részre osztható: 1. iniciáció, 2. elongáció, 3. termináció. A transzkripciót az **RNS polimeráz** enzim végzi, amely a DNS lánc mentén haladva azzal komplementer szekvenciájú RNS láncot szintetizál ribonukleotidok összekapcsolásával.

A transzkripció **iniciációja** során az RNS polimeráz kapcsolódik a gén előtt elhelyezkedő specifikus szekvenciához, a **promoter**hez. Az első bázispárt, ami ténylegesen transzkripcióra kerül, **transzkripciós startpont**nak nevezzük. Egy tipikus bakteriális promoter két szekvenciából áll: az egyik a -35 (a startpont előtt 35 bázispárral) elhelyezkedő hexanukleotid szekvencia), a másik a -10 régió (a startpont előtt 10 bázispárral) elhelyezkedő hexanukleotid szekvencia). Az RNS polimeráz először a -35 régióval lép kapcsolatba és a DNS-sel zárt komplexet alakít ki, ebben a kettős hélix szárai még nem váltak szét. Ezután kölcsönhatásba lép a -10 régióval, aminek következtében a -10 régió és a startpont közötti szakaszon a kettős hélix szárai szétválnak, így a zárt komplexből nyílt komplex lesz, ahol megkezdődhet a templát szállal komplementer RNS szintézise, azaz az **elongációs szakasz**. A szintézis itt is 5'→3' irányba folyik. Az a DNS szál, amely az RNS szintézishez mintaként szolgál a **templát szál**. Az ezzel komplementer DNS szál szek-

venciája megegyezik a készülő RNS szál szekvenciájával (kivéve persze a T bázisokat, amelyek helyett U szerepel az RNS-ben), amely szálakat kódoló, vagy **értelmes szálnak** nevezzük. Az RNS polimeráz enzim *E. coli*-ban két fő komponensből áll. Az egyik a **core enzim**, a másik a **szigma (σ)-faktor**. A core enzim képes az elongációra, de nem képes a transzkripció specifikus iniciációjára, arra csak a σ faktor és a core enzim komplexe, a **holoenzim** képes. Azt, hogy mely gén legyen „bekapcsolt” állapotban az teszi lehetővé, hogy egy bizonyos holoenzim, csak egyféle promotor feleség felismerésére képes. Tehát a körülmények változásának hatására új σ faktorok jelennek meg, amelyek a core enzimekkel való kapcsolódásuk után lehetővé teszik új gének transzkripcióját, azaz expresszióját.

A transzkripció **terminációja** baktériumokban kétféle módon történhet. Az egyik formához szükséges egy specifikus molekula, az ún. ró- (ρ)-faktor, ezt **ρ -dependens termináció**nak nevezzük. Ez a faktor az RNS-hez kötődik és 5'→3' irányban halad rajta. Amikor az RNS polimeráz elér egy terminációs szignált leáll, az RNS-en közeledő ρ faktor utoléri és szétválasztja az RNS-DNS hibridet. Ezt követően az RNS polimeráz és a ρ faktor is leválnak a DNS-ről. A másik terminációs típushoz nincs szükség a ρ faktorra, így ezt **ρ -independens termináció**nak nevezzük. Ez a termináció egy G-C gazdag szignálszekvencia segítségével játszódik le, amely egy önmagával bázispárosodó hajtúszerű struktúrát képez. Ezen terminációs hajtú hatására az RNS polimeráz leáll. Mivel a molekula végén kialakuló RNS-DNS hibrid gyenge A-U bázispárokat tartalmaz, a keletkezett RNS leválik a DNS-ről.

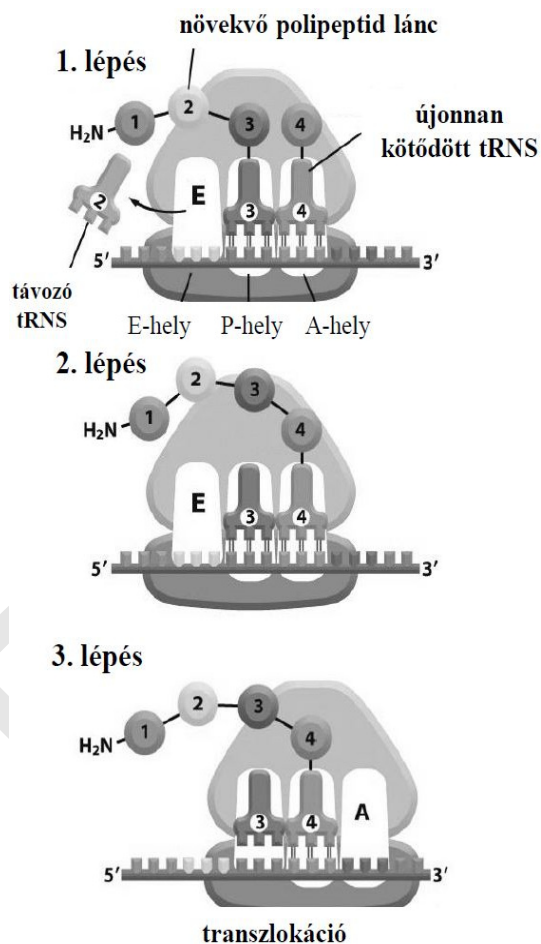
Az eukarióták transzkripciójának jellegzetességeivel a 7. fejezet foglalkozik.

Transzláció: RNS → fehérje

A gének expressziójában fontos szerepet betöltő **RNS** molekuláknak 3 fő típusát különböztethetjük: *messenger* (hírvivő) RNS (mRNS), transzfer RNS (tRNS) és riboszómális RNS (rRNS). A transzkripció során a DNS-ről mRNS íródik át, a tRNS és rRNS molekuláknak a transzláció során van meghatározó szerepük. A fehérjeszintézis folyamatához a DNS-ről átíródó **mRNS** szolgál mintaként. A készülő fehérje aminosav sorrendjét az mRNS bázishármasai határozzák meg, amelyeket **kodonok**nak nevezzük. Az mRNS minden kodonja egy aminosavat határoz meg, tehát egy mRNS-ben annyi kodon van, ahány aminosavat tartalmaz a róla íródó fehérje. Az mRNS molekula azonban nem kizárólag kodonokból áll, az 5'- és 3'-végén található **nem transzlálódó szekvenciák** is. Az 5'-végi nem kódoló régiót vezető, a 3'-végen elhelyezkedőt pedig uszály szekvenciának nevezzük.

A fehérjék szintézisében a **riboszómák** kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A riboszómák két, egy kis és egy nagy alegységből állnak, melyeket fehérjék és riboszómális RNS-ek (rRNS) építenek fel. Eukariótákban az **rRNS**-ek meghatározott kromoszómális régiókról, a nukleolusz organizátor régiókról íródnak át (az akrocentrikus kromoszómák rövid karjain kódolt szakaszok). A riboszóma a kódoló régió 5'-végének közelében kapcsolódik az mRNS-hez, s miközben a 3'-vég irányában halad, az mRNS kodonjait leolvassa minden tripletnél egy aminosavval

hosszabbítja a polipeptid láncot. Az aminosavak riboszómákhoz való szállítását a transzfer RNS-ek (tRNS) végzik. A **tRNS**-ek 3'-vége egy adott aminosavat köt, a molekula másik részén elhelyezkedő ún. **antikodon** pedig a bázispárosodás szabályai szerint felismeri az mRNA specifikus kodonját. Egy bizonyos aminosav megkötésére több tRNS molekula is képes, azonban egy tRNS molekula csak egyféle aminosavat köthet meg. A tRNS molekulák bonyolult háromdimenziós szerkezetet alakítanak ki, a polinukleotid láncon belüli komplementer szakaszok bázispárosodásával karok jönnek létre, amelyek végén hurkok helyezkednek el. A riboszóma egy időben 2, aminosavval töltött tRNS megkötésére képes, amelyek két egymást követő kodonhoz kapcsolódnak. Közülük az egyik a már elkészült polipeptid láncot hordozza (**P kötőhely**), a másikhoz pedig a következő beépítendő aminosavat tartalmazó tRNS kapcsolódik (**A kötőhely**).



5-7. ábra

A fehérjeszintézis folyamata

A riboszóma 5'→3' irányban végighalad az mRNA-en és a következő kodon által kódolt aminosavat beépíti a polipeptid láncba.

1. lépés: a peptidil-tRNS elfoglalja a P-kötőhelyet, az A-kötőhelyre pedig a következő aminosavat hordozó aminosav-tRNS komplex kapcsolódik. A töltetlen tRNS az E-helyen távozik.

2. lépés: kialakul a peptidkötés az épülő polipeptid és az A-kötőhelyen helyet foglaló aminosav között, így a polipeptid átkerül az A-kötőhelyen helyet elfoglaló tRNS-re.

3. lépés: a transzlokáció során a riboszóma egy kodonnal továbblép, a peptidil-tRNS átkerül a P-kötőhelyre, az A-kötőhely újra készen áll a következő aminosav-tRNS fogadására. A töltetlen tRNS az E-helyre kerül.

A transzláció előfeltétele, hogy a fehérjeszintézishez szükséges aminosavak tRNS-hez kötve legyenek jelen a sejtben, amiről az **aminosav-**

szerűsége aminosavak tRNS-hez kötve legyenek jelen a sejtben, amiről az **aminosav-**

tRNS szintetáz enzimek gondoskodnak. Ezen enzimek nagyon specifikusak, minden aminosavat más-más enzim ismer fel, illetve korrekciós funkcióval is rendelkeznek, ha nem a megfelelő tRNS, vagy aminosav kötődik, az ledisszociál az enzimről. A translációnak 3 fő szakasza van: 1. iniciáció, 2. elongáció, 3. termináció. Először a **bakteriális transláció** folyamatát tekintjük át.

Az **iniciáció** során a riboszóma kis alegysége kapcsolódik az mRNS egy speciális, a kódoló régiót megelőző szakaszához, amelyet **Shine-Dalgarno szekvenciának** nevezünk. A transláció mindig az ezt követő első AUG kodonnál kezdődik, amit iniciációs kodonnak, vagy **start kodonnak** nevezünk. Az iniciáció során a kis alegység úgy kötődik az mRNS-hez, hogy az AUG iniciációs kodon a riboszóma P-kötőhelyére esik. Az iniciátor tRNS antikodonja felismeri az AUG kodont és belép a P-kötőhelyre – ekkor az A-kötőhely még szabadon marad. Ez az iniciátor tRNS egy olyan metionint hordoz, amelynek a metil csoportja formilálva van. (A formil-metionint tartalmazó tRNS-t kizárólag a transláció iniciációjára használja a sejt, ha az AUG kodon a lánc közben helyezkedik el, akkor metionin épül be.) Az iniciátor tRNS kapcsolódását követően a riboszóma nagy alegysége is kapcsolódik az mRNS-hez és megindulhat az elongációs szakasz.

Az **elongáció** során az aminosavak sorban kapcsolódnak a készülő polipeptid lánchoz. A folyamat lépései a következők. A szabad A-kötőhelyre belép az mRNS kodonja által meghatározott aminosav-tRNS, majd ezen aminosav amino csoportja és a P-kötőhelyen lévő épülő polipeptid lánc C-terminális karboxil csoportja között peptidkötés alakul ki a **peptidil-transzferáz** enzim aktivitása következtében. Ezt követően a peptidlánc átkerül az A-kötőhelyen lévő tRNS-re, így a P-kötőhelyen egy töltetlen tRNS marad, amely az E (*exit*)-helyen távozik. A riboszóma egy triplettel továbblép az mRNS-en, ezt a folyamatot **transzlokációnak** nevezzük. Így a polipeptid láncot hordozó tRNS a P-kötőhelyre lép és az A-kötőhely újra alkalmas a következő aminosav-tRNS befogadására. Az elongáció mindaddig folytatódik, amíg van olyan aminosav-tRNS, amely felismeri az A-kötőhelyen elhelyezkedő kodont. Az elongációhoz ún. elongációs faktorra is szükség van, az energiáját pedig GTP fedezi.

A **termináció** azokat a lépéseket jelenti, amelyek során az elkészült polipeptidlánc felszabadul és az mRNS leválik a riboszómáról. Ha az A-kötőhelyre egy terminációs kodon, más néven **stop kodon** kerül (UAG, UAA, UGA), nincs olyan aminosav-tRNS, amely ezt felismerné. Felismerik azonban az ún. **terminációs faktorok**, amelyek hatására a kész polipeptid lehasad a tRNS-ről, a tRNS és az mRNS pedig leválik a riboszómáról. A fehérjék szintézise tehát a start kodontól a stop kodonig tart. Azokat a szekvenciákat, amelyek iniciációs kodonnal kezdődnek, stop kodonnal végződnek és közben minden egyes triplet aminosavat kódol, nyitott leolvasási keretnek (*open reading frame*, **ORF**) nevezzük.

Prokariótákban a transzkripció és a transláció folyamatai térben és időben szorosan összefüggnek. (Nincs magboríték, mert sejtmag sincs, ami elválasztaná ezeket egymástól.) Amikor az mRNS molekula 3'-vége még szintetizálódik, az 5'-végen már folyik a transláció. Az mRNS egynél több fehérjét is kódolhat (l. az

operont a 6. fejezetben), ugyanis több kódoló régió is elhelyezkedhet egymás után. Az ilyen szerkezetű mRNS-t **policisztronális**³⁴ mRNS-nek nevezzük. Ugyanazt az mRNS-t olvasó riboszómák együttese a **poliriboszóma**, vagy poliszóma.

Az **eukarióta transzláció** főbb jellegzetességei a következők. A transzkripció és a transzláció folyamatai térben és időben elválnak egymástól. A transzkripció a sejtmagban játszódik le, ahol a képződött mRNS bonyolult érési folyamatokon megy keresztül (lásd 7. fejezetet), majd a maghártya pórusain át a citoplazmába jut és megindulhat a transzláció. Az eukarióta mRNS monocisztronális, azaz egyetlen gén átíratát tartalmazza, egyetlen fehérjemolekulát kódol. További különbségek figyelhetők meg az iniciációs lépésnél. Az iniciátor tRNS nem formil-metionint, hanem metionint hordoz. Emellett a kis riboszóma alegység először az iniciátor tRNS-hez kapcsolódik és csak utána az mRNS 5'-végi, ún. sapka struktúrájához. Az iniciációs kodon itt is az AUG, azonban megfelelő környezetben kell elhelyezkednie (a -3 helyen purin, a +1 helyen G kell legyen: PuXXAUGG). További különbségek figyelhetők meg az elongációs és terminációs faktorok számában és milyenségében, melyek részleteire itt nem térünk ki.

³⁴ A **gén** megjelölésére a **cisztron** megnevezés is használatos (bizonyos genetikai kísérletekből, nevezetesen a „cisz-transz teszt”-ből levezetve). A prokarióta DNS-en több gén is követheti egymást (lásd az operonális szabályozást a 6. fejezetben), amelyek egy transzkripciós egységet alkotnak. Az ezekről átírt mRNS ennek megfelelően tartalmazza több fehérjemolekula információját.

DUPress

6. fejezet

Bakteriális genetika

A baktériumoknak, és a baktériumok vírusainak, a bakteriofágoknak (vagy röviden fágoknak) a genetikai tanulmányozása az 1940-es években kezdődött. Ezen belül is a kutatások egyetlen mikroorganizmus, az *Escherichia coli* (közönséges bélbaktérium) és fágjainak a tanulmányozására koncentráltak. Az *E. coli*-t alapul véve áttekinthetjük a bakteriális genom alapvető jellegzetességeit. Ennek az organizmusnak a genomja viszonylag kicsi, mindössze kb 4 400 génnel rendelkezik, szemben az ember mintegy 25 000 génjével. A prokarióták genomja egyetlen, körre zárt DNS molekula, amit **baktérium kromoszómának** is szokás nevezni. Ezen felül előfordulnak további, kisebb DNS molekulák, a **plazmidok**, melyekre szintén a cirkuláris megjelenés jellemző. A baktériumokban előforduló genetikai elemek harmadik csoportját a **bakteriofágokból** származó DNS adja.

A baktériumokra jellemző a rendkívül gyors szaporodás képessége. Ez ivartalanul, **osztódással** zajlik, ami egyszerű megkettőződés, tehát tulajdonképpen egy baktérium tenyészet lehet nem más, mint egyetlen baktérium klónjainak összessége. Bár az ivartalan osztódás alkalmas a környezet rendkívül gyors benépesítésére (az *E. coli* ideális esetben 20 percenként osztódik, tehát egyetlen baktérium egy éjszaka alatt több milliós baktérium tenyészet kialakítására képes), azonban hiányzik az eukariótáknál megfigyelhető, hagyományos értelemben vett ivaros szaporodás képessége, így nincs meiózis, ivarsejtek és megtermékenyítés sem. Ez egyben azt is jelenti, hogy nincs meg az ivaros szaporodás során megvalósuló genetikai variabilitás lehetősége sem. Azonban a baktériumokban kialakultak olyan mechanizmusok, amelyek révén képesek idegen DNS-t felvenni a környezetből, illetve egymástól. Az így megszerzett DNS rekombinációval be tud épülni a saját genomjukba, ennek segítségével új tulajdonságokra tehetnek szert (pl. rezisztensek lesznek egy olyan antibiotikummal szemben, amire korábban érzékenynek bizonyultak). Ezen folyamatok a transzformáció, a konjugáció és a transzdukció. Mindhárom folyamatra jellemző a donor-recipient viszony, tehát a génátadás egyirányú.

A genom változásának lehetőségét képviselik továbbá az ún. mobilis genetikai elemek, a **transzpozonok** is. Ezek képesek a kromoszomális genom egyik pontjából a másikba „ugrani”, illetve a kromoszomális DNS-ből egy plazmidba helyeződni, vagy éppen fordítva, a plazmidból a kromoszomális DNS-be.

A transzformáció

Ennek során a baktériumok az idegen DNS-t a környezetükből veszik fel. Az ily módon sejtbe került DNS molekula rekombinációval be tud épülni a kromo-

szomális DNS-be. A baktériumok azonban nem képesek bármikor a DNS felvételre, ahhoz egy **kompetencia állapot** kialakulása szükséges. A Gram-pozitív baktériumok³⁵ közül a *Streptococcus pneumoniae* transzformációs rendszerét tanulmányozták részletesen. Itt a kompetencia állapot kialakulásáért egy fehérje-természetű **kompetencia faktor** felelős, mely hatására az idegen DNS a sejt felszínén megtapad, majd bejut a sejtbe. A Gram-negatív *Haemophilus influenzae* esetében a kompetencia a szaporodás számára kedvezőtlen körülmények között jön létre, nem kell hozzá kompetencia faktor és speciális vezikulumok, az ún. **transzformoszmák** közvetítésével zajlik.

A már fentebb emlegetett *E. coli* baktérium természetes körülmények között nem transzformálható. Ahhoz, hogy a molekuláris genetikában leggyakrabban alkalmazott mikroorganizmussá válhatott, hozzájárult egy olyan eljárás kidolgozása, mely során mesterségesen képessé tehető idegen DNS felvételére. Egy speciális kezeléssel ugyanis a sejthatár permeabilissé tehető az idegen DNS (általában plazmid) számára, így ebben az esetben **mesterségesen kialakított kompetenciáról** beszélhetünk.³⁶ Amennyiben a bevitt plazmid önálló replikációra képes, a baktérium kromoszómával együtt ez is replikálódik, és az utódsejtekbe szintén átkerülhet, tehát fennmaradásának nem feltétele a kromoszomális DNS-be való integrálódás.

Konjugáció: egyirányú génátvitel a baktériumok között és a plazmidok

A baktériumok egymás között is képesek DNS átadásra. Ahhoz, hogy a DNS egyik baktériumból egy másikba átjuthasson, speciális hidakra van szükség. Ezek az ún. **pilusok** (pl. F pilus), amelyek a bakteriális csillókhöz hasonló, de azoktól vastagabb és hosszabb képletek. Azonban nem minden baktérium képes ilyenek képzésére és genetikai információ átadására. E tulajdonság alapján megkülönböztethetünk szexipilus képzésre képes (F^+ : fertilitás pozitív), illetve képtelen (F^- : fertilitás negatív) baktériumokat. A konjugációt szokás szexuális folyamatnak is nevezni (ha az F^+ baktériumot „hím”-nek, az F^- baktériumot „nőstény”-nek tekintjük), azonban érdemes már az elején tisztázni, hogy a konjugáció nem szaporodás!

Az F^+ jellegért egy sajátos plazmid, az **F plazmid** a felelős, amely a konjugáció megvalósításához szükséges fehérjéket kódolja. Ezek egyike az F pilust építi fel, mások megakadályozzák a konjugációt két F^+ partner között, és vannak, amelyek a

³⁵ A Gram-festés a baktériumok osztályozására használt, sejtfelszínük különbözőségén alapuló eljárás. A Gram pozitív baktériumokból – a Gram negatívokkal ellentétben – a festés után a festék nehezen vonható ki, így lila színt mutatnak.

³⁶ Az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás során kétértékű ionok (Ca^{2+}) és hősek (42 °C-on történő inkubáció) hatására a sejt felszínén pórusok, csatornák jönnek létre, amelyek az idegen DNS bejuthat a sejtbe. A rendszer nagy előnye, hogy nem diszkriminál, tehát bármilyen idegen eredetű DNS felvételére képes, legyen az egy másik baktériumból származó, vagy – mondjuk – egy emberi eredetű gén.

DNS mobilizálásáért felelősek. A konjugáció során az F plazmid, az F^+ baktériumból az F -ba kerül át az F piluson keresztül. A DNS replikációja az ún. gördülő kerék mechanizmussal történik (6-1. ábra), melynek során az F plazmidot egy enzim egy meghatározott helyen bemetszi, majd a bemetszett szál 5'-végével kezdődően letekeredik és egyszálal formában áthalad az F piluson keresztül az F sejtbe. Az F^+ baktériumban a letekeredéssel párhuzamosan DNS szintézis zajlik, mely során a plazmid újra kétszálúvá egészül ki, tehát a sejt F^+ marad. Az F baktériumba átjutott egyszálú DNS szintén duplaszálúvá egészül ki az áthaladás után, így az is F^+ -vá alakul. Azaz a konjugáció eredményeképpen két F^+ baktériumot kapunk.

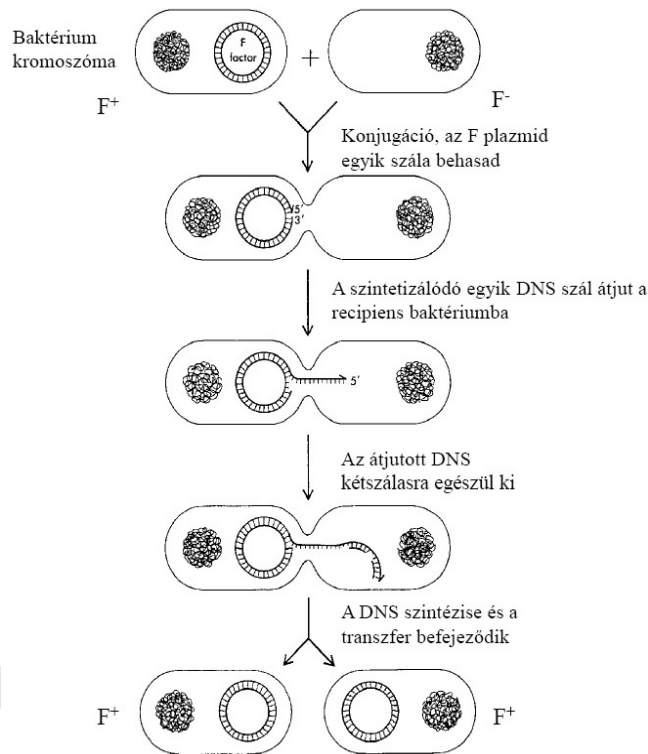
Láttuk tehát, hogy a konjugáció során egyik baktériumból a másikba hogyan kerülhet át az F plazmid. Azonban adódik a kérdés: hogyan kerülhet sor kromoszómális DNS átadására? Az F^+ baktériumok egyik csoportja csak az F^+ jelleget (tehát az F plazmidot) adja át, de kromoszómális DNS-t nem. Az F^+ baktériumok egy másik csoportja viszont csaknem kizárólag kromoszómális DNS-t ad át partnere számára és az F^+ jelleget csak nagyon ritkán. Ezen utóbbi törzseket **Hfr** (*high frequency of recombination* = nagy gyakoriságú rekombináció) törzseknek nevezzük, mivel ebben az esetben a két partner között a rekombináció gyakorisága nagyságrendekkel gyakoribb. A Hfr törzsekben az F plazmid nem önálló egység, hanem a baktérium kromoszómájába beépülve van jelen. Ezen törzsek is képesek a konjugációs folyamat elindítására, ami szintén a gördülő kerék mechanizmussal történik. Azonban az átvitel mechanizmusa miatt a kromoszómába integrálódott F plazmid DNS-ének átvitelére csak akkor kerülhet sor, ha már a teljes kromoszóma átjutott. A teljes kromoszómális DNS (amely tehát az F plazmidot is tartalmazza) átviteléhez hosszú idő, kb. 100 perc szükséges, de a folyamat általában hamarabb megszakad, így az F^+ jelleget csak ritkán adja át a Hfr törzs a recipiens baktériumnak. A konjugáció során bejutott kromoszómális DNS szakasz csak akkor változtatja meg a recipiens baktérium genotípusát, ha rekombinálódva annak kromoszómájával beépül az abban eredetileg jelen volt gének helyére.

Érdeemes még megemlíteni, hogy a kromoszómális DNS-be integrálódott F plazmid időnként kivágódhat és így ismét önálló egységként lehet jelen a baktériumban. Azonban előfordulhat, hogy ez a kivágódás nem szabályosan megy végbe, vagyis a plazmid egyik darabja benne marad a kromoszómában, helyette pedig a kromoszómából visz magával egy részletet, megteremtve ezzel a baktériumok közötti génátvitel lehetőségét. Ezeket a plazmidokat **F' plazmidoknak** nevezzük.

Kísérleti körülmények között a rendszer alkalmas ún. **merodiploidok** létrehozására. Ez részleges, néhány génre terjedő „diploid” állapot kialakítását jelenti. Lehetővé teszi, hogy a bakteriális gének domináns vagy recesszív jellegét tanulmányozzák.

A baktériumok plazmidjai közül említést érdemelnek az ún. **R plazmidok** (rezisztencia plazmidok). Ezek olyan cirkuláris DNS molekulák, amelyek a konjugációért és a DNS átvitelért felelős gének mellett tartalmaznak antibiotikum rezisztenciát kialakító géneket is. Jelentőségük igen nagy, mivel segítségükkel a baktériumok képesek átadni egymásnak az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia tulaj-

donságát. Ráadásul az átadás nem korlátozódik azonos fajú baktériumokra, pl. az ember vastagbelében elterjedt *E. coli* baktériumból átkerülhet a súlyos megbetegedést okozó *Salmonella typhibe*, így hatástalanná téve az ellene irányuló antibiotikus terápiát. Ismeretes a polirezisztencia jelensége is, ami főleg kórházi osztályokon alakulhat ki az ott előforduló baktériumokban, vagy otthon antibiotikumokkal nem célszerűen (célzottan) és megalapozottan kezelt, esetleg orvos által nem is látgott betegekben. Veszélyforrást jelent ilyen szempontból vírusos megbetegedések antibiotikumokkal való, abszolút felesleges kezelése.



6-1. ábra

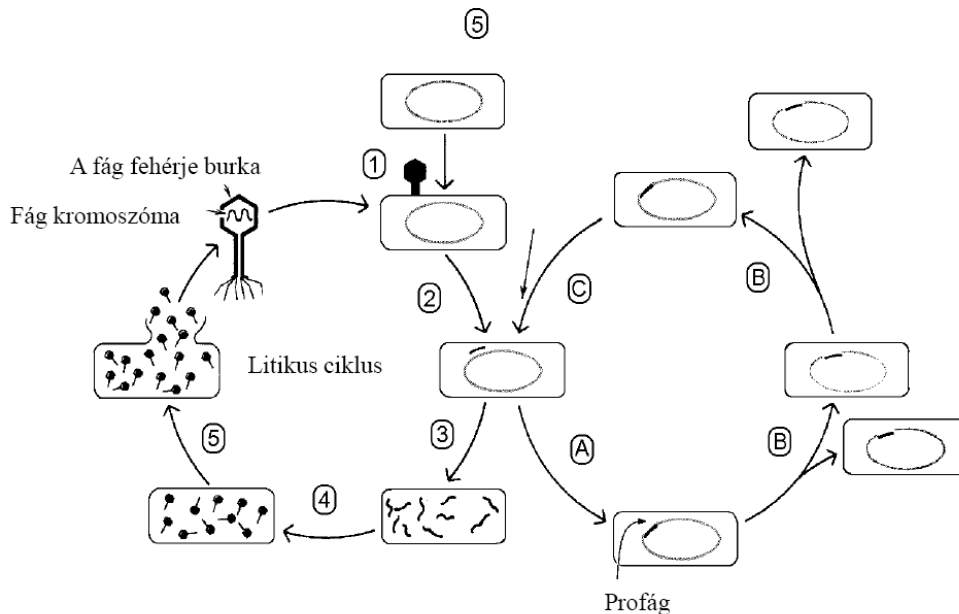
A DNS-transzfer mechanizmusa konjugációban

Az F-plazmid egy kitüntetett szakaszán a DNS-molekula egyik szálát egy enzim (specifikus endonukleáz) bemetszi. A gördülő kerék mechanizmussal történő replikáció során a bemetszett szál a szabad 5'-véggel indulva letekeredik a „kerék” forgása közben. A letekeredő szál a donorban egyszálas marad és az F-pilus csatornáján keresztül a letekeréssel párhuzamosan átmegy a recipiens sejtbe, ahol kétszálássá egészül ki a komplementer lánc szintézisével. A 3'-véghez a letekeredéssel párhuzamosan szintetizálódik a letekertet pótló, azzal teljesen azonos szál. Ha az egész F-plazmid átjutott a befogadó sejtbe és kétszálássá egészült ki, körré záródik.

A bakteriofágok életciklusa és a transzdukció

A **transzdukció** a baktériumok közötti génátvitel bakteriofágok közvetítette módját jelenti. Először érdemes tisztázni, hogy pontosan mik is azok a bakteriofágok és milyen életciklus jellemző rájuk. A bakteriofágok olyan vírusok, amelyek baktériumokat fertőznek. Felépítésük hasonló az eukarióták vírusaihoz, a külső fehérjeburkon belül nukleinsav helyezkedik el. A fertőzés során megtapadnak a baktérium felszínén, majd abba bejuttatják örökítő anyagukat. Kétféle életciklusuk létezik. A **litikus ciklusban** a bakteriofág nukleinsava, miután bekerült a baktériumba, leállítja az abban zajló DNS-, RNS- és fehérjeszintézist, majd arra kényszeríti a gazdasejtet, hogy a bakteriofág DNS és fágfehérjék szintézisét végezze. Az így képződő fág alkotókból több száz fertőzőképes fág szerelődik össze, majd a baktérium lízise következtében kiszabadulnak, miközben a gazdasejt elpusztul. Az így képződött bakteriofágok újabb baktériumokat fertőzhetnek meg és a ciklus kezdődhet előlről. Minden fágoknak van litikus ciklusa, azokat a fágokat, amelyeknek csak litikus életciklusa van, **virulens fágoknak** nevezzük. De hogyan képesek a bakteriofágok a baktériumok közötti géntranszferre? Ennek a génátvitelnek az egyik, litikus ciklushoz kötődő formája az ún. **generalizált transzdukció**. A litikus ciklusban ugyanis a fágok összeszerelődésével párhuzamosan zajlik a gazdasejt DNS-ének fragmentációja, így előfordulhat, hogy egy összeszerelődő fág burokból nem fág DNS, hanem azzal megegyező méretű bakteriális DNS fragmentum kerül be. Az ilyen fág a következő fertőzés alkalmával ezen, az előző gazdasejtből származó DNS-t juttatja be egy másik baktériumba.

A másik jellemző életciklus a **lizogén ciklus**. Ebben a baktériumba bejutott fág DNS nem indítja el a litikus ciklust, hanem helyspecifikus rekombinációval integrálódik a baktérium DNS-ébe. A fág DNS így rejtve marad, a baktérium generációkon keresztül örökíti azt a sejtosztódások alkalmával saját DNS-ével együtt. A kromoszómájába integrálódott fág DNS-t tartalmazó baktériumot **lizogénnek**, a baktériumot lizogénizáló fágot pedig **temperált fág**nak (vagy profág) nevezzük. Bizonyos tényezők hatására a fággenom kivágódhat a baktérium DNS-éből, és litikus ciklus kezdődik meg. Ilyenkor a kivágódás az esetek döntő többségében precízen történik. Azonban ritkán előfordul, hogy a fággenom nem pontosan vágódik ki a kromoszómális DNS-ből, hanem egy része benne marad a baktérium kromoszómában, helyette pedig a bakteriális DNS-ből tartalmaz egy darabot. Ilyenkor természetesen a beintegrálódott fág DNS melletti szekvenciákat tartalmazza az adott bakteriofág, amely a következő baktérium fertőzésekor az előző gazdasejtből származó DNS darabot is bejuttatja a fertőzés alkalmával. A transzdukció ezen formáját **specializált transzdukciónak** nevezzük.



6-2. ábra

Lizogén bakteriofág lehetséges életciklusai

A gazdasejtbe való bejutás után, vagy mint egy litikus vírus, azonnal elindítja a fág-specifikus DNS- és fehérjék szintézisét, vagy pedig integrálódik a gazdasejt genomjába, s azzal replikálódva átadódik minden egyes utódsejtbe. Ilyenkor generációkon keresztül rejtve marad. Bizonyos hatásokra, pl. a DNS sérülése, a profág indukálódik, s a genomból kivágódva litikus ciklusba megy át. 1. A fág megtapad a gazdasejten. 2. A fággenom bejutása a gazdasejtbe. 3. A fág-DNS replikációja. 4. A fággenom fágfejbe pakolódik. 5. A gazdasejt lízisekor a fág-részecskék kiszabadulnak. A) Profág képződése. B) A lizogén baktériumok rendszerint ugyanolyan gyorsan szaporodnak, mint a nem lizogének. C) A fág-kromoszóma kivágódása a baktérium-kromoszómából (általában ritka).

A génexpresszió szabályozása prokariótákban

Az *E. coli* baktériumnak, mint azt fentebb említettük, kb 4 400 géne van. Ezen géneknek azonban nem mindegyike van „bekapcsolt” állapotban minden körülmény között, azaz nem mindegyikről képződik RNS, illetve fehérje. A változó környezeti feltételekhez való alkalmazkodás céljából a gének kifejeződésének (génexpresszió) szabályozása egy szigorú folyamat eredménye. Vannak gének, amelyek olyan enzimeket kódolnak, amelyek alapvető életfunkciókban játszanak szerepet (pl. DNS, RNS, fehérjeszintézis), így ezekre a baktériumnak mindig szüksége van. Ezen enzimek folyamatosan termelődnek, őket **konstitutív enzi-**

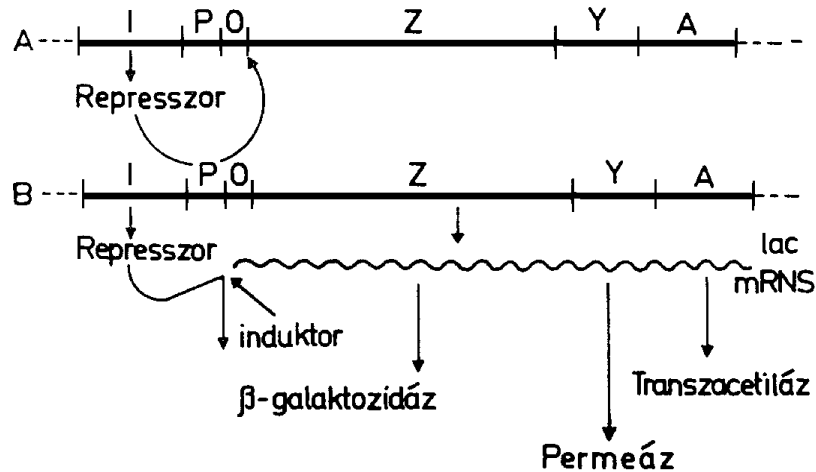
meknek nevezzük, képzésük pedig a **konstitutív enzimszintézis**: a fehérjék elhasználódása, tönkremenetele következtében fellépő igényt folyamatos szintézissel elégíti ki a sejt. Ezen enzimeket kódoló géneket **háztartási géneknek** nevezzük.

Más enzimekre azonban az adott környezeti feltételek függvényében van vagy nincs szükségük a baktériumoknak. Vegyük pl. a környezetben előforduló tápanyagok hasznosításához köthető enzimeket. Evolúciós előny, ha az adott enzimet csak akkor termeli a sejt, ha a tápanyag valóban rendelkezésre áll – hiszen folyamatos termelésük nagy energiavesztéssel járna. A **katabolikus** (lebontó folyamatokban részt vevő) **enzimeket** az ún. **induktív enzimek** közé soroljuk, amelyek képzése csak akkor indul meg, ha a környezetben olyan hasznosítható tápanyag jelentkezik, amire a sejt rá van utalva. Az **anabolikus enzimek**, amelyek a makromolekulák építőköveinek létrehozásáért felelősek (pl. aminosavak, purin-, pirimidin bázisok) a **represszálható enzimek** közé sorolhatók. Ezek szintézise mindaddig folyik, amíg termékük koncentrációja el nem ér egy bizonyos szintet.

Katabolikus operon: az *E. coli lac* operonja

Ahhoz, hogy a bakteriális génszabályozás operonális formáját megértsük, tisztáznunk kell az operon fogalmát. **Az egy szabályozási egységbe tartozó, a DNS-en közvetlenül egymás után elhelyezkedő struktúrgének és az ezek expresszióját befolyásoló szabályozó szekvenciák csoportját operonnak** nevezzük. Az operonon belül helyezkednek el tehát maguk a gének, amelyek egy fehérjét, vagy RNS-t kódolnak. Ezek a **struktúrgének**. A struktúrgének előtt az azok kifejeződését szabályozó szekvenciák foglalnak helyet, amelyek egyike az **operátor**. A transzkripció alkalmával az RNS polimeráz promoterhez kötődése után megkezd a struktúrgének átírását. Az adott struktúrgének kifejeződése azonban csak akkor mehet végbe, ha az operátor régió áthaladhat az RNS polimeráz enzim. Ha az operátorhoz nem kapcsolódik semmi, akkor az RNS polimeráz kialakíthatja az iniciációs komplexet és megkezdheti a transzkripciót. Azonban ha az operátorhoz hozzákötődik egy, az illető operonra specifikus fehérje, akkor az RNS polimeráz nem képes azon áthaladni (sőt, a promoterhez sem tud kapcsolódni). Ez a fehérje a **represszor**, az ezt kódoló gént pedig **regulátor génnek** nevezzük. Érdeemes megjegyezni, hogy míg **az operátor szekvenciának feltétlenül a szabályozott gének előtt kell elhelyezkednie** (azaz **cisz helyzetben**), addig a **regulátor gén** ahhoz, hogy működését kifejthesse, **bárhol elhelyezkedhet a genomban** (vagyis **transz helyzetben is**), mivel az arról szintetizálódó fehérje a sejten belüli diffúzió révén eljuthat célhelyére. Azonban ha a represszorhoz egy kis molekula, az ún. **effektor** (katabolikus operonok esetében **induktornak** nevezzük) kötődik, akkor a represszor nem képes tovább kapcsolódni az operátorhoz, arról leválik és így megindulhat a struktúrgének átírása. A bakteriális transzkripció jellegzetessége, hogy a közvetlenül egymás után elhelyezkedő struktúrgénekről az RNS polimeráz egy mRNS molekulát szintetizál, amit **policisztronális mRNS-nek** nevezünk. Így az operon struktúrgénjei koordináltan, egy időben kerülhetnek expresszióra. (Itt kell megemlítenünk a **regulon** fogalmát, ami olyan struktúrgének csoportját jelenti,

amelyek nem egymás után, hanem különböző helyeken helyezkednek el a baktérium kromoszómán, de mindenütt azonos operátorral együtt, tehát egy regulátor gén hatásának alávetve, egy szabályozási egységet alkotva.)



6-3. ábra

Az *E. coli lac* operonjának elvi vázlata

A: represszált állapot. Az *I* regulátor gén által meghatározott *lac*-represszor fehérje az *O* operátorhoz kapcsolódva gátolja a mögöttes struktúrgének (*Z*, *Y* és *A*) transzkripcióját.

B: derepresszált állapot. Induktor hatására ez a fehérje leválik az *O* régióról és a promoterhez (*P*) kapcsolódó RNS-polimeráz megkezdheti az operon transzkripcióját, aminek eredménye a policisztronális *lac* mRNS.

A katabolikus operonok működését egy konkrét példán, az *E. coli lac operonján* keresztül mutatjuk be. A baktériumokra általában, így az *E. coli*ra is jellemző, hogy ha több tápanyag is rendelkezésre áll a környezetében, mindig azt fogja először lebontani, aminek hasznosításához kevesebb energia befektetésre van szüksége. Energia befektetés/nyereség szempontjából a glükóz a legkedvezőbb szénforrás a számára, ezért mindaddig, amíg glükóz van jelen a környezetben azt fogja választani. Más tápanyagra csak akkor fog „rákényszerülni” ha a glükóz készletek kimerültek. Ha a glükóz elfogyott, de **laktóz** (glükózból és galaktózból felépülő diszaharid) rendelkezésre áll, akkor elkezd a laktózt hasznosítani. Ehhez szüksége van egy, a laktózt lebontó enzimre (β -galaktozidáz), egy fehérjére, ami a sejtbe bejuttatja a tejcukrot (galaktozid permeáz) és egy további, a laktóz hasznosításához szükséges enzimre (tiogalaktozid transzacetiláz). Ezen fehérjéket kódoló gének alkotják a struktúrgéneket a *lac* operonban. A rendszerben **induktorként** a laktóz izomerje, az **allolaktóz** szerepel. Tehát ha a környezetben laktóz van jelen,

és az bejut a sejtbe, a laktózból képződő allolaktóz hozzákötődik a represszorhoz, ami így nem képes tovább kötődni az operátor szekvenciához és megindulhat a laktóz hasznosításához nélkülözhetetlen enzimeket kódoló struktúrgének átírása.

Ha az indukált tenyészetbe glukózt adunk, megint rendelkezésre áll a kedvezőbb szénforrás, tehát nincs szükség továbbra a laktóz bontására, sem pedig az azt hasznosítani képes enzimeket kódoló gének aktivitására. Ekkor a *lac* operon represszálódik (**katabolit represszió**). Ez a represszió úgy jöhet létre, hogy a *lac* operon működéséhez a represszoron és induktoron túl egy további szabályozási pont van beépítve. Ahhoz ugyanis, hogy az RNS polimeráz a promoterhez kapcsolódni tudjon egy további fehérjére, a **CAP** (*catabolite activator protein*) fehérjére is szükség van. Azonban a CAP fehérje önmagában nem tud kötődni a promoterhez, ehhez cAMP-re (ciklikus-adenozin-monofoszfát) is szükség van. Glukóz jelenlétében a cAMP szint erősen lecsökken (egy itt nem részletezett mechanizmus következtében), így a CAP fehérje nem képes tovább kapcsolódni a promoterhez, aminek következtében a transzkripció iniciációja elmarad és a *lac* operon represszálódik.

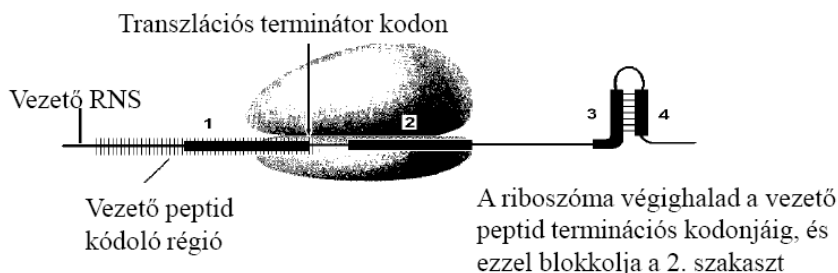
Ha egy fehérjének a DNS meghatározott szakaszához való kapcsolódása gátló hatású, ezt **negatív szabályozás**nak nevezzük. Ha a kötődés serkentő jellegű, akkor **pozitív szabályozás**ról szólunk. A represszor fehérje negatív, a CAP pozitív szabályozó elem.

Figyeljük meg! Az e rendszerekben szereplő fehérjék allosztérikusak: egy kis molekula kötődése változtatja meg aktivitásukat. Igaz ez a következő bekezdésben bemutatott rendszerre is.

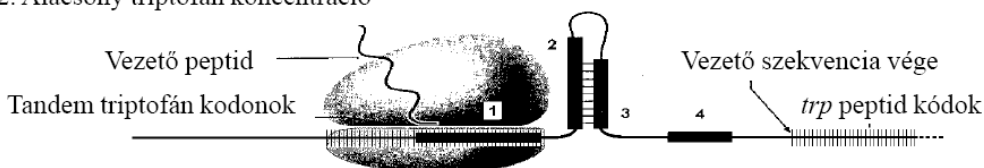
Anabolikus operon: az *E. coli trp* operonja

Az anabolikus operonok működése hasonló a katabolikus operonok működéséhez, azzal a különbséggel, hogy a represszor önmagában nem képes kapcsolódni az operátorhoz, ezért azt **aporepresszornak** nevezzük. Az operátorhoz kapcsolódásra csak akkor válik alkalmassá, ha kötődik hozzá az effektor molekula, amit **korepresszornak** nevezünk, azaz a hatásos represszor az apo- és korepresszor komplexe. Az anabolikus operonok működését az *E. coli trp* operonján szemlél-tetjük, amelyben 5, a **triptofán bioszintézis**ben részt vevő enzimet kódoló struktúr-gén kap helyet. A *trp* operon alapállapota a derepresszált állapot, azaz a triptofán bioszintézis mindaddig zajlik, amíg nincs elég rendelkezésre álló triptofán a sejtben. A *trp* operon esetében a korepresszor nem más, mint a bioszintézis vég-terméke, azaz a triptofán. Ha a baktériumban az intracelluláris triptofán szint magas, a triptofán hozzákötődik az aporepresszorhoz, így az aporepresszor-korep-resszor komplex képes a *trp* operátorhoz kapcsolódni és a triptofán bioszintézisben részt vevő enzimeket kódoló gének transzkripcióját megakadályozni. Ha a sejtben belüli triptofán szint csökken, az aporepresszorhoz nem kötődik triptofán, a *trp* operon derepressziója következik be és megindulhat a triptofán bioszintéziséért felelős enzimek génjeinek átírása.

1. Magas triptofán koncentráció



2. Alacsony triptofán koncentráció



3. Nincs fehérje szintézis



6-4. ábra

A *trp* operon transzkripció terminációjának szabályozása az **attenuátor régió**nál. A szabályozás végső soron a triptofán koncentráció függvénye

1. Elégséges triptofán koncentráció esetén az 1. és 2. szakasz nem tud hurkot képezni, mert a riboszóma gyorsan áthalad ezen a területen, a 3. és 4. szakaszoknak jut ideje arra, hogy létrehozzák a transzkripció terminátort.

2. A szükségesnél alacsonyabb triptofán koncentráció esetén a riboszóma a triptofán tripleteknél (1. szakasz) várakozik, s a 2. és 3. szakaszok képeznek hajlít. Ilyenkor nem jöhet létre a transzkripció terminátor. A struktúrgének átíródnak.

3. Ha a riboszóma nem kezdi el a vezető peptid transzlációját, akkor az 1.-2. és következésképpen a 3.-4. RNS szakaszok hoznak létre hajlít, a transzkripció bevégeződik, és a struktúrgének nem kerülnek transzkripcióra.

A derepresszált *trp* operonon azonban nem történik minden esetben mRNS szintézis. Ennek oka, hogy a transzkripció elindításához egy újabb szabályozó elem van beépítve, az átírás csak akkor kezdődik, ha a rendszer ismételten megerősítést nyer afelől, hogy az intracelluláris triptofán koncentráció alacsony. Az első struk-

túrgén előtt helyezkedik el a **vezető szekvencia**, amely az ún. **vezető peptidet** kódolja. Az ezen belül elhelyezkedő, ún. **attenuátor régió**ban 4 különböző szekvencia-szakaszt különböztethetünk meg (6-4. ábra). A 3. és 4. szakaszok komplementerek, így közöttük létrejöhet az RNS polimeráz leválását elősegítő hajtú szerkezet (ez tulajdonképpen egy ρ (Ró)-independens transzkripció terminációt jelent, lásd az 5. fejezetben), amelynek következményeként a transzkripció terminációja következhet be. Ha azonban az intracelluláris triptofán koncentráció alacsony, az RNS polimeráz nem válik le a készülő mRNS-nek megfelelő DNS szakasról, hanem megkezdődhet a struktúrgének átírása. Ez azért lehetséges, mert az attenuátor régió belül az 1. és 2., illetve a 2. és 3. RNS szakaszok is komplementerek, tehát hajtút hozhatnak létre. A vezető peptiden belül két egymást követő aminosav is triptofán. Mivel baktériumokban az RNS szintézist közvetlenül követi a fehérje szintézis, ezért az RNS polimerázt szorosan követő, fehérjeszintézist végző riboszóma várakozni kényszerül a triptofánt kódoló tripletnél, ha nincs triptofánnal töltött tRNS, azaz ha az intracelluláris triptofán koncentráció alacsony. Ha a riboszóma itt megáll, lefoglalja az 1. szekvencia szakaszt, így a hajtú szerkezet a 2. és 3. szakasz között jön létre, aminek következtében a 3. és 4. szakasz között az már nem alakulhat ki, és a transzkripció terminációja nem következik be. Ha a sejtben elég triptofán van jelen, akkor a riboszóma továbbhalad, lefedi a 2. szakaszt, így a 3. és 4. szekvencia szakasz között létrejöhet a terminációs hajtú szerkezet és az RNS polimeráz leválik. Ez a mechanizmus a rendszer finomhangolását teszi lehetővé.

DUPress

7. fejezet

Magasabbrendű szervezetek génregulációja

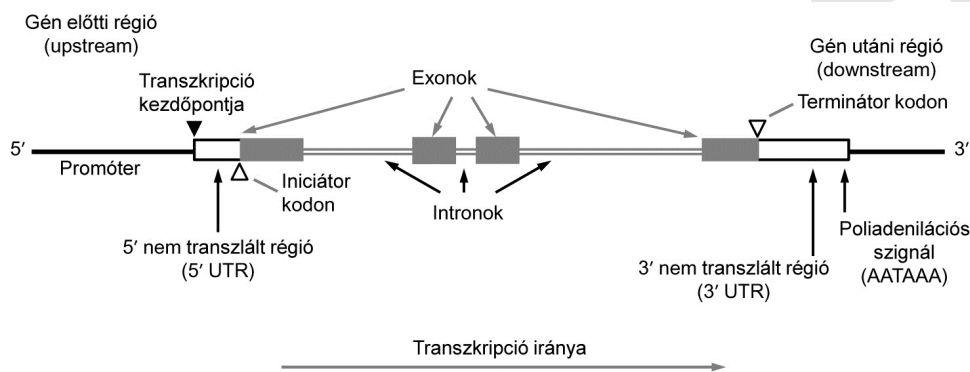
Az eukarióta gének és az eukarióta mRNS

Az **eukarióta genom** az egy kromoszómakészleten található génikus tartalom (gének, regulátor szekvenciák, egyéb szekvenciák) összességét jelenti. Amikor génről beszélünk, akkor ezen általában olyan DNS szakaszt értünk, melyről hírvivő (*messenger*) RNS (mRNS) kópia készül (transzkripció), amiről aztán fehérje szintetizálódik (transzláció). A prokariótákban a genom méret és a gének száma jól korrelál egymással (a genom csaknem 100%-a kódoló funkcióval rendelkezik), míg az eukariótáknál a genom igen nagy része (98-99%-a) nem kódol fehérjét. Egyes nem kódoló részokról is írónak át RNS molekulák (ncRNS – *non coding* = nem kódoló RNS), de ezek RNS-ként funkcionálnak, nem transzlálódnak, hanem a fehérjeszintézisben, illetve a génátírás szabályozásában vesznek részt. Ilyenek a transzfer RNS-ek (tRNS), a riboszómális RNS-ek (rRNS), a kis sejtmagi RNS-ek (*small nuclear* = snRNS), a kis sejtmagvacskai RNS-ek (*small nucleolar* = snoRNS), a mikro RNS-ek (miRNS), a kis interferáló RNS-ek (*small interfering* = siRNS), a hosszú nem kódoló RNS-ek (*long non coding* = lncRNS), katalitikus aktivitással rendelkező ribozimok stb.

Az eukarióta gén nem csak kódoló szakaszokat tartalmaz. A fehérjeszekvenciáról információt hordozó DNS-t megszakítják rövidebb-hosszabb nem kódoló szakaszok: ezeket nevezzük **intron**oknak, szemben a kódoló **exon**okkal. Sok esetben a gén nagyobb részét teszik ki az intronok, például a humán disztrofín gén (1. Duchenne muszkuláris disztrofia [DMD], 3. fejezet) több mint 99%-át. Szintén a gén részei az RNS-be átíródó, az RNS 5'- és 3'-végén található nem transzlálódó régiók (5'- és 3'-UTR = *untranslated region* vagy NTR = *nontranslated region*). A gén részének tekintjük még a nem átíródó, hanem a génátírás szabályozásában közvetlenül résztvevő régiókat: a **promotert** (az RNS polimeráz kötődési helye), az **enhanszer**(ek)et (*enhancer*, a transzkripciót serkentő szekvenciák), a **silencer**(ek)-et (a transzkripciót gátló szekvenciák). Fontos, hogy a prokariótáktól eltérően az eukarióta gének sosem szerveződnek operonokba, minden gén önálló szabályozási egységet alkot, saját promoterral rendelkezik. A fehérjekódoló gének esetén ez a promoter mindig a gén előtt helyezkedik el (5' vagy másként *upstream* irányban), míg az enhanszerek és a silencerek bárhol lehetnek, akár nagyobb távolságra is a gén előtt (*upstream*) és/vagy a gén mögött (3' vagy másképpen *downstream* irányban).

Mivel a gén mindig önálló átírási egységet alkot, ezért az eukarióta mRNS-ek monocisztronálisak (vagyis csak egy génről hordoznak információt). A génről

viszont közvetlenül nem mRNS készül, hanem úgynevezett pre-mRNS vagy más-ként hnRNS (heterogén nukleáris RNS), melyből még el kell távolítódnia az intronoknak (intronkivágás), az exonoknak össze kell kapcsolódniuk (*exon splicing*), illetve az 5'- és a 3'-végnek még módosulnia kell. Ezeket a folyamatokat összefoglaló névvel RNS érésnek vagy RNS processzálnak (*processing*) nevezzük. Legelőször az 5'-véghez három foszfátcsoporton keresztül kapcsolódik egy guanin, egy ún. sapka, mely a kapcsolódás után metilálódik (metil-guanin sapka, m⁷G; a folyamat neve **capping** vagy magyarul **sapkaképződés**). A következő lépés a 3'-vég módosulása, a **poliadeniláció**. Ennek során a pre-mRNS 3'-vége hasítódik egy adott szekvencia (AAUAAA) után, ezért ezt **poliadenilációs szignálnak** is nevezzük, majd 100-250 adenin nukleotid kapcsolódik hozzá (poli-A farok).

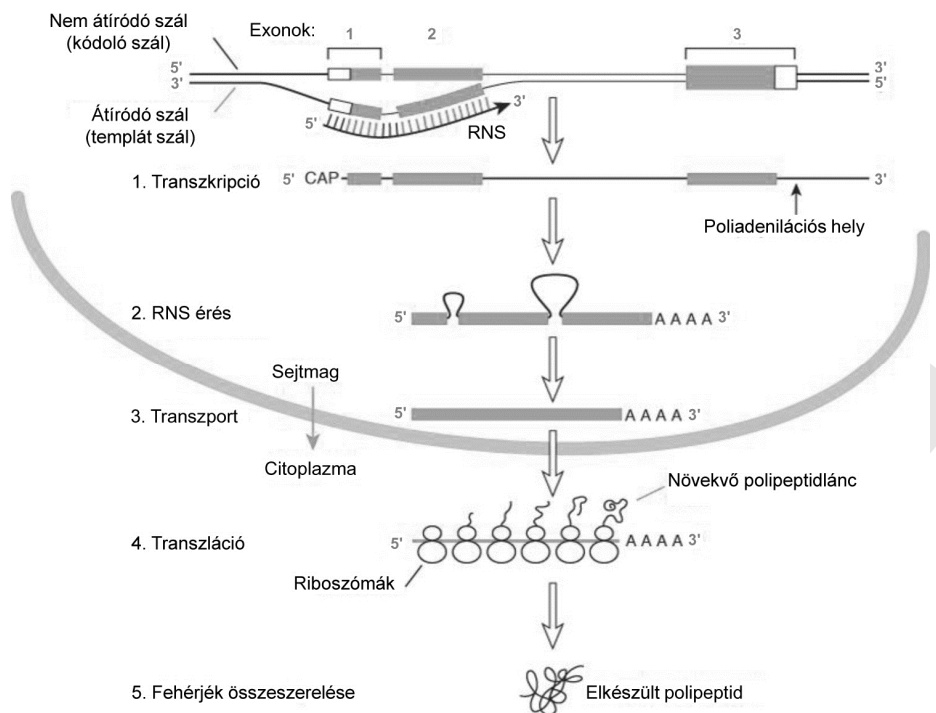


7-1. ábra

Egy átlagos fehérjekódoló eukarióta gén vázlata

A valóban kódoló részeket az exonok jelentik, az intronok eltávolítók az átírt mRNS érése során. A promóter a transzkripció iniciációjához szükséges, illetve a génnel tartozó enhancer és silencer szekvenciákat. Az iniciátor és terminátor kodonok csak a transláció során van szerepe. A transzkripció a komplementer szárról történik.

A mRNS érése során a harmadik folyamat az intronok eltávolítása és az exonok összekapcsolása, melyet közös névvel az utóbbi folyamat után **splicing**nak nevezünk. A legtöbb intron a *spliceosome* segítségével távolítódik el. A szplájszozómák snRNS-ekből és fehérjékből állnak. Vannak olyan intronok is, melyek eltávolításához nincs szükség szplájszozómákra, mivel képesek katalizálni saját kivágódásukat: ezek az ún. önkivágó vagy ön-átszabásra képes intronok (l. 5. fejezet, ribozimok). Az önkivágó intronok szekvenciája fontos a kivágódás megtörténtehez, a többi intronnál főleg a donor, akceptor és az elágazási hely nukleotidjai kritikusak.



7-2. ábra

Az információáramlás iránya egy olyan eukarióta gén esetén, melynek három exonja és két intronja van

Az 1. és a 3. exon fehérén hagyott része nem transzlálódik (5'- és 3'-UTR). Az ábra a transzkripciót, RNS érést, az RNS transzportját és transzlációját mutatja. A nem átíródó szál szekvenciája megegyezik a másik, vele komplementer templát szálról átírt RNS-ével (kivéve persze, hogy a DNS-ben deoxiribonukleotidok, az RNS-ben pedig ribonukleotidok vannak, és hogy az RNS-ben uracil található timin helyett), ezért ennek a szálnak a szekvenciáját adjuk meg a gén szekvenciájaként, és ezért ezt a szálat kódoló szálnak nevezzük.

Amint az a 7-2. ábrán is látható, a prokariótáktól eltérően a transzkripció és a transzláció térben és ezért szükségszerűen időben is elkülönül egymástól: a transzkripció és a mRNA érése a sejtmagban, egymással részben szimultán, míg a fehérjeszintézis a citoplazmában, szabad citoplazmatikus vagy éppen a durvafelszínű endoplazmatikus retikulumhoz (RER = *rough endoplasmatic reticulum*) kötődő riboszómákon zajlik (a fehérjék rendeltetési helyének megfelelően). Ezt az jelenti, hogy az érett, és csakis az érett RNS-eknek ki kell jutniuk a citoplazmába a pórus komplexeken keresztül. Az érési folyamat eredményeként keletkező mRNA-eket a lezajlott folyamatok nyomán keletkező változások elkülönítik a többi RNS-től és növelik stabilitásukat, majdani transzlációjuk hatékonyságát, és lehetővé teszik ex-

portjukat. Ebből a szempontból minden érési lépés fontos, de kiemelhető a splicing folyamata és a poli-A farok jelenléte, ami nélkül az mRNS semmiképpen nem exportálódik, és nagyon hamar lebomlik. A poli-A farok az 5'-sapkával együtt szignálként szolgál a riboszóma számára, hogy a mRNS ép, róla lehet fehérjét szintetizálni. Külön kiemelendő még az 5'-sapka szerepe a nukleázok elleni védelemben illetve a fehérjeszintézis iniciációjában.

Az eukarióta gének transzkripciója és a transzkripció szabályozása

A transzkripció iniciációja során az enhanszerhez speciális DNS kötő fehérje³⁷, ún. **transzkripciós aktivátor** kapcsolódik. Ez szervezi a sok alegységből álló **transzkripciós faktorok** kötődését, melyek egyike a promoter részét képező TATA boxhoz³⁸ kötődő TBP (*TATA box binding protein* = **TATA box kötő fehérje**). Az így létrejövő fehérje komplex hidat képez az enhanszer és a promoter között, jelenlétében kötődik az RNS polimeráz, és eme iniciációs komplex kialakulása után megindulhat a transzkripció. Természetesen egy gén transzkripciójának iniciációjára több enhanszer is hatással lehet, illetve silencerek is befolyásolhatják **transzkripciós inhibitorok** segítségével a folyamatot. A gének átírását szabályozó fehérjék rendszerint fajlagosak egy sejt- vagy szövetféleségre. Ugyanaz a fehérje vehet részt aktiváló és gátló komplexek kialakításában is, vagyis egyszer transzkripciós aktivátor, máskor transzkripciós inhibitor szerepben tűnik fel, ezért is helyesebb **transzkripciós szabályozókról** beszélni. A transzkripciós szabályozók aktivitása szintén szabályozott, például poszttranszlációs módosítások segítségével, vagy úgy, hogy egy másik fehérjéhez (általában chaperonhoz³⁹) kötve találhatóak a citoplazmában, amiről csak egy meghatározott jel (szignál) hatására válnak le, és lépnek be a sejtmagba. Ez utóbbira példaként említhetők a szteránvázas hormonok citoplazmatikus receptorai, melyek speciális ún. válaszadó elemeket tartalmazó regulátor szekvenciákhoz kapcsolódnak, de csak ha a megfelelő hormon (a ligandjuk) kötődött hozzájuk.

³⁷ A DNS-kötő fehérjék speciális mintázatot ismernek fel a DNS-en, és fajlagosan képesek ezekhez kapcsolódni a DNS-kötő doménjeik segítségével. Ezek a domének lehetnek *helix-turn-helix* (hélix-fordulat-hélix), *helix-loop-helix* (hélix-hurok-hélix), cink-ujj, leucin cipzár stb. szerkezetűek.

³⁸ A TATA-box a transzkripció kezdőpontjához képest (+1) *upstream*, többnyire a -40 – -25 nukleotidok között, a promoteren belül elhelyezkedő, timin- és adenin-gazdag régió.

³⁹ A chaperonok vagy dajkafehérjék segítenek stabilizálni, kialakítani, regenerálni más fehérjék szerkezetét. A következő mondatban említett példában viszont a receptorhoz kapcsolódva elfedik azt a szekvencia-részletet, mely szükséges a receptor sejtmagba juttatásához (NLS, *nuclear localisation signal/sequence* = sejtmagi lokalizációs szignál/szekvencia). A ligand kötődése megváltoztatja a receptor térszerkezetét, a chaperon leválik, szabadabbá téve az NLS-t.

Amint már említettük, az eukarióta genomnak csak kb. 1-2%-a kódol fehérjét. Emberben ez hozzávetőlegesen 25 000 gént jelent, holott sejteinkben mintegy 250 ezer – 1 millió különböző fehérje található. Ez csak úgy lehetséges, ha egy génről többféle fehérje is készülhet: persze nem egy helyen, nem egy időben, hanem egy génről – néha csak kissé – eltérő fehérjék, **fehérje izoformák** szintetizálódnak a különböző sejttypusokban, illetve az egyed fejlődésének különböző stádiumaiban. A váltás jól szabályozott, és több lehetséges eleme van, ezek egyike az **alternatív promoterek** használata. Az ilyen gének több promoterral és transzkripció kezdőponttal rendelkeznek, az egyes promoterek más-más sejttypusokban vagy az egyed fejlődésének más-más stádiumaiban működnek (7-5. ábra). L. még az alternatív splicingot alább!

A transzkripció elongációja a már ismertetett módon (l. 5. fejezet) történik. Lényegében az RNS-ek (és minden nukleinsav) szintézise során három szabályszerűség fontos:

- 1) bázis komplementaritás (itt G-C; C-G; A-U; T-A; a párok első tagja a templát szálon található, a másik az új száalba vele szemben beépülő nukleotid),
- 2) a templát és a róla szintetizálódó új szál antiparallelitása (az új szál 5'-vége a templát 3'-végéről, míg 3'-vége a templát 5'-végéről készül),
- 3) az új szál 5'-3' irányban való szintetizálódása (vagyis hogy a készülő szál mindenkor 3' végéhez kapcsolódnak új nukleotidok).

Az elongáció tehát e szabályszerűségeken alapulva történik eukariótákban is. Ami különbözik, az az, hogy az RNS szintézise során folyamatosan távolítódnak el az intronok a készülő szekvenciából.

A transzkripció terminációjában a poliadenilációs (poli-A) jelszekvencia vagy szignál (AATAAA a kódoló szálon) játszik fontos szerepet, mivel az RNS polimeráz a készülő pre-mRNS elhasítódása után válik le a DNS-ről. Tehát a transzkripció terminációja a poliadenilációval kapcsolatosan történik.

A transzkripció szabályozásában nemcsak a promoter illetve az enhanszerek és silencerek vesznek részt, hanem hozzájuk hasonlóan nagy fontossággal bír a kromatin kondenzáltsági foka, melyet a DNS és a hozzá kapcsolódó fehérjék módosításai, valamint egyéb regulátor szekvenciák befolyásolnak. Ezeket a tényezőket, melyek egy gén kifejeződését a DNS (kémiai vagy szerkezeti, de nem szekvencia-beli) módosításával befolyásolják, **epigenetikai tényezőknek** nevezzük, a szabályozást pedig **epigenetikai szabályozásnak**.

Az aktívan átíródó gének nagy része az eukromatinban található, mely lazább szerkezetű, így az RNS polimeráz könnyebben hozzáfér a génekhez (l. 1. fejezet). A heterokromatin kondenzált, de szerkezete fellazulhat (**fakultatív heterokromatin**), és róla génátírás történhet. A **konstitutív heterokromatinról** sosem történik RNS szintézis. A váltást, hogy egy régió heterokromatikus vagy eukromatikusvá válik-e, az **LCR** (*locus control region* = lokusz kontroll régió) szabályozza.

A kromatin kondenzáció és így a génátírás mértékét a hiszton kód is befolyásolja (l. 1. fejezet). A hisztonokat módosító enzimek általában egy nagyobb fehérjekomplex, a **kromatin átrendező komplex** (*chromatin remodeling complex*)

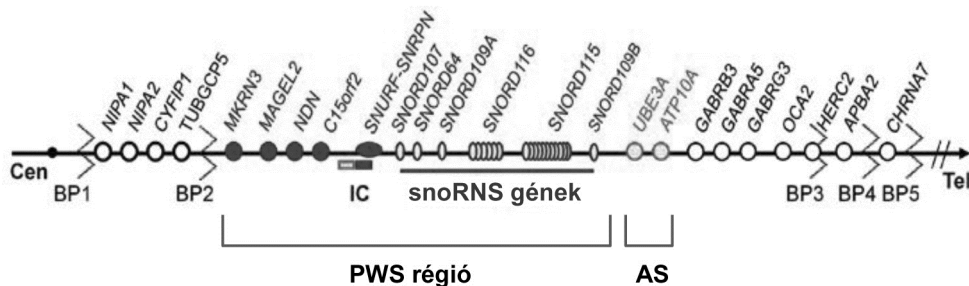
részeként működnek. A komplex a hisztonok megfelelő módosítása után ATP felhasználásával destabilizálja, átstrukturálja, leválasztja a DNS-ről vagy elcsúsztatja a nukleosómákat, így hozzáférhetővé (vagy visszarendeződéskor fedetté) válnak a transzkripció iniciációjához szükséges szakaszok. A kromatin átrendező komplexek egyébként szükségesek a DNS replikációjához, javításához és a rekombinációhoz is (csakúgy, mint a helikázok vagy a topoizomerázok, l. 5. fejezet).

Maga a DNS is módosulhat, ez általában valamely bázis enzimatis módosítást jelenti, egy kémiai csoport kapcsolódását vagy eltávolítását. A génexpresszió regulációja szempontjából leglényegesebb módosítás a CpG dinukleotidok (egy szálon belül, egymással szomszédos nukleotidok, a *p* a köztük lévő foszfodiészter kötést jelöli) citozin tagjának **metilációja**. Ha sok metil csoport található egy DNS szakaszon, az elnémítja az ott található gént, ezért az eukromatin hipometilált, a heterokromatin pedig hipermetilált.

Vannak olyan kromoszóma szakaszok, géncsoportok, melyeken speciális, nemre jellemző metilációs mintázat alakul ki a gametogenezis során, amely az utódban is stabilan, a szomatikus sejtekben (legalábbis az expresszió szempontjából fontos sejtekben, szövetekben) kitörölhetetlenül megmarad. Ezt a jelenséget **genomiális imprintingnek**, **genomi bevésődésnek** nevezzük. Az adott szakaszon a metilált gének inaktívak, nem aktiválhatók. Az elnémításuk ún. **imprinting centrumok** közreműködésével történik. Az imprinting mindkét nem ivarsejtjeiben megjelenik, egy szakaszon alternáló mintázatot mutat a két nemből, vagyis amelyik gén az adott szakaszon inaktiválódott a petesejtben, az aktív a spermiumban, és fordítva. Ez azt jelenti, hogy minden ember csak egy aktív kópiával rendelkezik ezekre a génekre vonatkozóan, ami a géntől függően mindenkinél vagy az apai vagy az anyai eredetű kromoszómán található. Ez a metilációs mintázat csak az ivarsejtek képződése során törlődik az ősvarsejtben, és az ivarsejtben a nemre jellemző inaktivációs mintázat alakul ki.

Egy ilyen terület pl. a 15-ös kromoszómán (15q11.2-q13) található PWS/AS régió vagy domén, melyben a *SNORD116* génklaszter elemei (és más gének) a petesejtben inaktiválódnak és a spermiumban aktívak maradnak, míg az *UBE3A* (és az *ATP10C*) gén a petesejtben marad aktív és a hímvarsejtben inaktiválódik (7-3. ábra). Attól függően, hogy melyik szülőtől származik hibás kromoszóma, a terület két szindróma kialakulásáért lehet felelős. Ha az apai PWS/AS régió deléciót szenved, akkor Prader-Willi szindróma (jellemzői: enyhébb szellemi visszamaradottság, fejlődési retardáció, hipogonadizmus, falánkság és súlyos elhízás); ha az anyai kromoszómán történik hasonló delécia, akkor Angelman szindróma (nagyfokú szellemi visszamaradottság, súlyos mozgászavar, görcsök) alakul ki. Elveszhet a teljes kromoszóma is, de ezek az utódok csak akkor életképesek, ha a másik szülő 15-ös kromoszómájából viszont két példány van jelen (hiszen az autoszomális kromoszómák monoszómiai életképtelenek, l. 2. fejezet). Ezt a helyzetet **uniparentális diszómia**nak (UPD, egyszülős diszómia) nevezzük. Kialakulhat a kromoszóma duplikációjával, a zigóta első osztódásakor bekövetkező mitotikus nondiszjunkcióval, vagy meiotikus nondiszjunkcióval, minek következtében az adott ivarsejtbe eleve két 15-ös kromoszóma került. Természetesen, ha az apai 15-ös kromoszómából két példány van, és az anyai kópia hiányzik (**paternális uniparentális diszómia**), az éppúgy Angelman szindrómához vezet, mint a

régió deléciója az anyai kromoszómán, a **maternális uniparentális diszómia** pedig éppúgy Prader-Willi szindrómához, mint az apai régió törlődése.



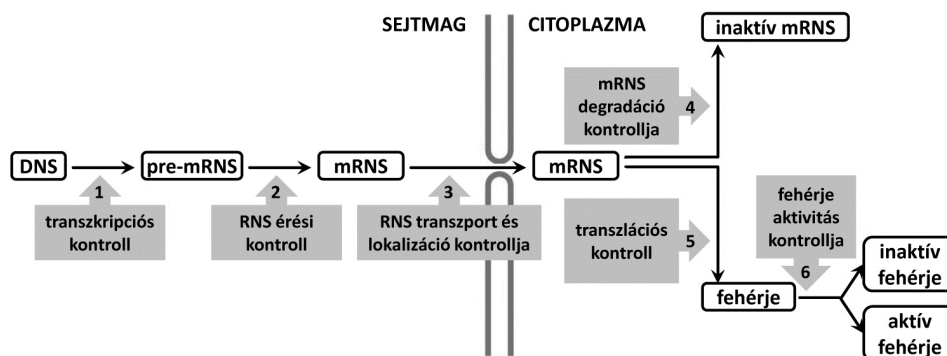
7-3. ábra

A 15-ös kromoszóma genomi imprinting alá eső régiója

A PWS régióban találjuk az apai eredetű kromoszómán aktív géneket, míg az AS régióban található gének az anyai eredetű kromoszómán maradnak aktívak. IC: imprinting centrumok (anyai: üres téglalap; apai: fekete téglalap); BP: a leggyakoribb töréspontok a régió deléciója esetén; Cen: centromer; Tel: telomer

A génkifejeződés poszttranszkripciósi kontrollja

Amint az előzőekben láthattuk, egy mRNS szintézise sokrétűen szabályozott folyamat. Erre azért van szükség, hogy a sejt ne vesztessen feleslegesen nukleotidokat és energiát, ha valójában nincs is szüksége a transzkriptumra. A fehérjeszintézis is energiaigényes folyamat, nemcsak az aminosavak aktiválása, hanem maguknak az aminosavaknak a szintézise illetve felvétele is ATP igényes, nem is beszélve a peptidkötés kialakításáról, tehát a sejt meg fogja válogatni, hogy melyik mRNS-ről készít fehérjét. A szekvencia helyességét ugyan nem tudja ellenőrizni, hiszen (szemben a DNS polimerázzal) az RNS polimeráznak nincs önkorrektív funkciója (*proofreading* aktivitás), de a szerkezeti épség és megfelelőség ellenőrizhető, sőt, ha egy mRNS épnek találtatott, és kikerült a citoplazmába, még akkor sem biztos, hogy transzlálódni fog (7-4. ábra), ellenben könnyen lehetséges, hogy lebomlik, vagy éppen a sejt „elteszi későbbre”. Példaként említhetjük a zigótát, amely a megtermékenyülés után rögtön osztódni kezd. Az első osztódások olyan gyorsan történnek, hogy nincs idő közben „kicsomagolni” a kromoszómákat a transzkripcióhoz, vagyis az ilyenkor szükséges fehérjék szintéziséhez, az mRNS-eknek ott kell tárolódnuk a petesejt citoplazmájában (citoszkeletális elemekhez rögzítve), ráadásul a citoplazma meghatározott részén (pl. mert a főbb testtengelyek – anterior-posterior, cranial-caudal – meghatározásához szükségesek). Mivel a petesejtben tárolódtak, ezért ezek az mRNS-ek csak az anya genomjáról szintetizálódhattak, vagyis ezeknél a géneknél az anya genotípusa egyedül határozza meg az utód fenotípusát: ezt nevezzük **anyai hatásnak**.

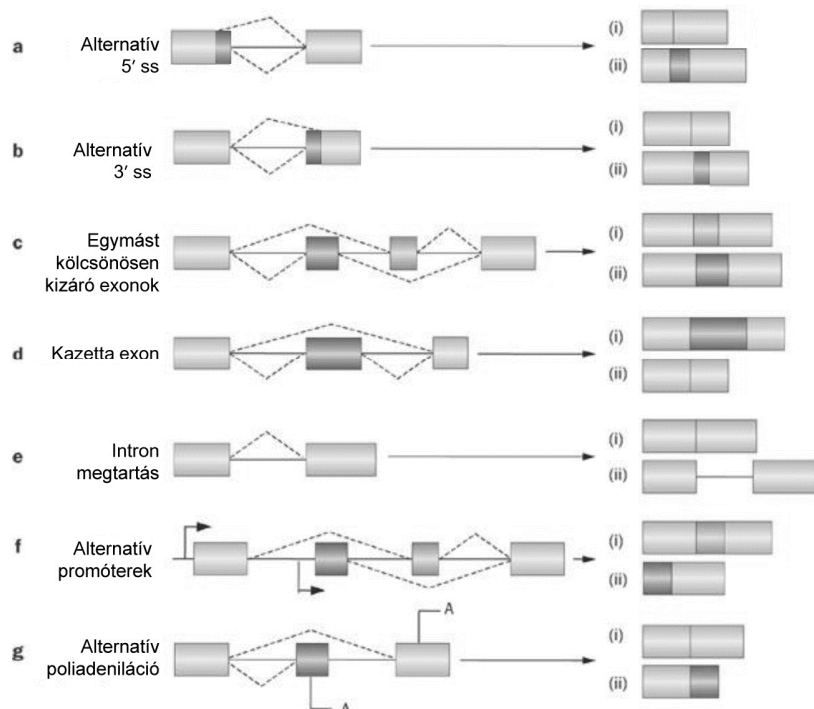


7-4. ábra

Az eukarióta génkifejeződés és szabályozásának szintjei

Minden egyes lépésben számos szabályozási lehetőség rejlik. A transzkripció (1) gátlódhat vagy aktiválódhat a kromatin vagy a DNS módosításai és transzkripció szabályozók révén. Eltérő fehérjék keletkezhetnek ugyanarról a génről az alternatív promoterek illetve alternatív RNS érési folyamatok segítségével (2). Az érési folyamatok fontosak az RNS szállításához (3) is, az RNS szekvencia meghatározza a molekula féléletidejét (4), illetve a róla való transzláció hatásfokát, esetleg késleltetett voltát (5). A végső szabályozást pedig magának a fehérje aktivitásának a szabályozása jelenti (6).

A precízen szabályozott génexpresszió nem csak az anyag- és energiapazarlás elkerülése miatt fontos, hanem azért is, hogy a sejt a rendeltetésének és a környezet által támasztott követelményeknek megfelelően működjön. **A genetikai anyag minden sejtünkben azonos**, a sejtek közötti szerkezeti és működésbeli különbséget az eltérő génkifejeződési mintázat alakítja ki. A fentiekben már említettük, hogy egy génről többféle fehérje is készülhet. Az ilyen **fehérje izoformák** a különböző sejtekben sokszor hasonló, de azért legalább kismértékben eltérő funkcióval, szubsztrátspecifitással, enzim kinetikai paraméterekkel, elhelyezkedéssel, stabilitással stb. rendelkeznek. Kialakításuk leggyakrabban ún. **alternatív splicing** segítségével történik: a különböző sejtípusok a gén más részeit használják exonnak, illetve intronnak, így a képződő mRNS és végső soron a fehérje szekvenciája különbözni fog ezekben a sejtekben (7-5. ábra). Szintén módosíthat a szekvencián (bár többnyire inkább az mRNS stabilitását és transzlációját befolyásolja) az **alternatív poliadeniláció**, amely során a gén 3'-végén több poliadenilációs jelszekvenciát is találunk, és szintén sejtfüggő, hogy melyik lesz a valódi végpont (7-5. ábra).



7-5. ábra

Alternatív mRNS érés típusok és a képződő mRNS-ek (i és ii)

A versengő 5' ss **(a)** és 3' ss **(b)** exon módosítást jelent. **(c)** Az egymást kölcsönösen kizáró exonok esetén két vagy több exon közül csak egy marad az mRNS-ben. **(d)** Az elkülönülő kazetta exonok bármelyike maradhat az RNS-ben vagy kivágódhat belőle. **(e)** Ha az intront határoló ss-t figyelmen kívül hagyja a spliceszóma, akkor az intron az RNS-ben marad. Alternatív splicing előfordulhat **(f)** alternatív promoterek használatakor vagy **(g)** alternatív poliadenilációs szignálok esetén is. A splicing eseményeket exonokat összekötő szaggatott vonalak jelölik. A sötét(ebb)szürke elemek a feltételes exonokat vagy exon részleteket reprezentálják. Rövidítések: A, poliadenilációs hely; ss, *splice site* (splicing hely).

Az **RNS editálás**⁴⁰ vagy **RNS szerkesztés** is a pre-mRNS szekvenciájának módosításával jár, úgy, hogy a genom egy más pontjáról átíródott vezető RNS-t (*guide*

⁴⁰ Ezt a jelenséget protozoonok mitokondriumában fedezték fel, de emberben is előfordul. A májban termelődő apolipoprotein B-100 (4563 aminosav, 100 kDa, feladata lipidek szállítása a vérben) és a vékonybélben átíródó apolipoprotein B-48 (2152 aminosav, 48 kDa, feladata a lipidek felszívása a bélből) ugyanarról a génről készül, csak a vékonybélben egy gRNS segítségével a 2153. kodon STOP kodonná alakul, így a fehérje rövidebb lesz.

RNS, gRNS) vagy RNS-eket mintaként használva, azok szekvenciájához igazítja a pre-mRNS-ét nukleotid cserével, betoldással vagy törléssel.

Az mRNS összes módosítása (pl. eltérő exon összetétel, eltérő hossz, más transzkripció kezdő és végpont, szerkesztés miatti megváltozott szekvencia, a poli-A farok hossza, helye) mind befolyásolja az mRNS exportját a citoplazmába, a stabilitását és a róla történő fehérjeszintézis hatékonyságát, mértékét. A módosítások azt is meghatározzák, hogy azonnal fehérje szintetizálódik-e az mRNS-ről, vagy tárolódni fog a citoplazmában (későbbi felhasználás céljából), esetleg lebomlik. Az utóbbi két folyamat ún. **RNS interferencia (RNSi)** miatt is történhet. Az RNSi során az mRNS-hez rövid (20-25 bázis hosszúságú), az mRNS-sel komplementer ncRNS-ek, ún. mikroRNS-ek (miRNS) illetve kis interferáló RNS-ek (*small interfering* RNS, siRNS) kapcsolódnak. Pontos illeszkedés esetén az mRNS-t egy fehérjekomplex (RISC, *RNA-induced silencing complex* = RNS indukálta elnémító komplex) elhasítja. Nem tökéletes illeszkedés esetén (ez az miRNS-eknél fordulhat elő) nem az mRNS degradációját, hanem szintén a RISC komplexszel karöltve csak a transláció gátlását okozzák, az mRNS tárolódni fog az ún. P-testecskékben (*processing body, P-body*) a citoplazmában. Az RNS interferencia a kromatin állapotára is visszahat, heterokromatizációt okozhat.

A transláció regulációja azért szükséges a sejt számára, mert sokszor gyors változásokra kell reagálnia, és ilyenkor nincs idő a transzkripció – RNS érés – RNS transzport lépések végigjárására. Ráadásul a transláció gátlását vagy iniciálását eredményező folyamatok reverzibilisek. Azokban a sejtekben különösen fontos ez a fajta reguláció, ahol az érett sejtek már nincs sejtmagja (vörösvértest, thrombocyta) és a raktározott mRNS-ek translációja révén nyeri fehérjéit. Fontos az mRNS szekvenciája: a benne kialakuló – önkomplementer – hajtú szerkezetek meggátolhatják, vagy éppen segíthetik a riboszóma kapcsolódását; ilyen hatása egyébként mRNS-hez kapcsolódó kis regulatorikus RNS-eknek is lehet. A transláció iniciációjához szükséges fehérjék aktiválása-inaktiválása poszttranszlációs módosítások révén szintén eredményesen befolyásolhatja a fehérjeszintézist.

Ha a fehérje már elkészült, akkor is előfordulhat, hogy ideiglenesen nincs szükség rá. Ahogy az előbb láttuk a translációs iniciációs faktorok esetén, ekkor a fehérje reverzibilis módosításokkal inaktiválható, és ha újra szükség lesz rá, akkor aktiválható. Leggyakoribb módosítás a kinázok általi foszforiláció, illetve a foszfátok általi defoszforiláció (fehérjéje válogatja, hogy a foszfát csoport kapcsolódása vagy eltávolítása-e az aktiváló hatású), de egyéb módosítások, mint például alkiláció, acetiláció, ubiquitináció, ADP-ribosziláció stb. is gyakoriak. Az ubiquitináció a fehérje proteolízisét is eredményezheti, ha legalább egy négytagú ubiquitin lánc kapcsolódik egy meghatározott lizin oldallánchoz. Ekkor a fehérje a **proteasóma** komplexbe kerül és lebontódik. A fehérjék időleges inaktivációja chaperonokhoz való kapcsolódással is történhet (l. citoplazmatikus hormonreceptorok).

Utoljára meg kell még említenünk, hogy a génexpresszió szabályozása olykor magának a génnek az átszabásával jár (**DNS átszabás, átrendeződés**). Ilyenek a B-lymphocyták által termelt immunglobulinok (Ig, másként antitestek) nehéz és könnyű láncait kódoló gének, illetve a T-lymphocyták felszínén található T-sejt

receptorok (TCR, *T-cell receptor*) fehérjeláncainak génjei. Az összegekben még a teljes DNS megtalálható, a lymphocyták érése során azonban a modulok többsége kivágódik a DNS-ből, míg csak egy modulkombináció marad, amiről az adott fehérje elkészíthető. A lehetséges kombinációk száma több millió, minden sejtben más és más alakulhat ki, ami a szintén millióféle antigén (és ezek különféle epitopjai) elleni védelemhez szükséges: így nagy eséllyel létre tudunk hozni olyan immunglobulint, illetve T-sejt receptort, mely felismerhet egy adott antigént. Amely limfoid sejtek az adott pillanatban hasznos fehérjemolekulát produkálnak, megkapják a jelet ennek további termelésére és a sejtosztódásra, azaz G_0 stádiumból G_1 -be lépésre. Az így létrejövő klónok mindig csak azt az egyféle antitestet szintetizálják, amit – a kialakulás idején még véletlenszerűen – a legelső sejt kezdett el termelni. A nem hasznosítható molekulákat létrehozó sejtek elpusztulnak.

DUPress

8. fejezet

Mutáció

A mutációk a genomban tárolt információ továbbörökíthető változásai, kialakulásukkor az eredeti nukleotid sorrend visszafordíthatatlanul megváltozik. A genom véletlenszerű változásai a legtöbb esetben károsak a sejt számára, azonban az általánosan elfogadott evolúciós paradigma szerint az előnyös mutációk jelentősen hozzájárultak az egyre bonyolultabb, a változó környezethez egyre jobban alkalmazkodni tudó élő szervezetek kialakulásához.

A mutációk típusai

A csíravonal sejtjeit érintő (**germinális**) mutációk nem okoznak tüneteket az azokat elszenvedő (pl. radioaktív sugárzásnak kitett) személyekben, azonban az utódokban molekuláris betegségek kialakulását okozhatják. A testi (**szomatikus**) sejtek mutációi leggyakrabban nem járnak következményekkel, azonban bizonyos gének megváltozása a testi sejtek ellenőrizetlen, túlzott szaporodását idézheti elő (tumor szuppresszorok elvesztése, onkogének keletkezése), így daganatos betegségek kialakulásához vezethetnek. (Részletesen I. 11. fejezet.)

A DNS-ben kódolt információ megváltozása a genomot kisebb vagy nagyobb mértékben érintheti. Kromoszóma vizsgálatokkal azonosíthatók nagy kiterjedésű mutációk: a kromoszómaszám eltérései, illetve a strukturális kromoszóma aberrációk. Mindkét esetben több gén kópiaszáma megváltozhat, így ha a sejt életképessége nem is csökken számottevően, a többsejtű összetett organizmusokban kóros elváltozások jelenhetnek meg a mutáció nyomán. A kromoszómaszám eltéréseit a testi sejtekben a mitotikus apparátus hibája idézheti elő. A kromoszóma szakaszok **inszercióját** (beépülés új helyre) **delécioját** (kiesés), **szubsztitúcióját** (kicserélődés) és **inverzióját** (kromoszóma szakasz megfordulása) ionizáló sugárzások és vírusfertőzések okozhatják.

A mutációk legnagyobb része a klasszikus citogenetika fénymikroszkópos módszereivel nem vizsgálható. Ezek felderítéséhez molekuláris biológiai technikák szükségesek.

A **génmutációk** hosszabb vagy akár egészen rövid DNS szakaszok delécioját, inszercióját vagy szubsztitúcióját jelentik. Az ilyen mutációk teljes gének, intronok vagy exonok kópiaszámának megváltozását eredményezhetik, vagy akár egyetlen bázispárt is érinthetnek (pontmutáció). A **pontmutációk** gyakran nem járnak következményekkel, azonban ha kritikus DNS szakaszon jelennek meg jelentősen megváltoztathatják a géntermék struktúráját vagy kifejeződését.

Pontmutációk gyakran találhatók fehérje kódoló régiókban, azonban nem mindig okozzák a fehérje struktúrájának megváltozását. A legtöbb kodon harmadik bázisa jelentéktelen a növekvő polipeptidláncba beépülő aminosav szempontjából. Az ilyen „lötyögős” bázisok kicserélődése az úgynevezett „*same sense*” (azonos jelentésű) mutáció nem okoz változást az aminosav szekvenciában.

A mutáció „*missense*” (hibás, téves jelentésű), ha a kodon megváltozása aminosav kicserélődést idéz elő. Az új aminosav kémiai szerkezete hasonló lehet az eredetihez, így bár az elsődleges fehérjeszerkezet megváltozik, a másodlagos és a harmadlagos érintetlen maradhat. Ekkor beszélhetünk „*silent*” (csendes) mutációról. Ellenkező esetben a fehérje struktúrája számottevően megváltozhat. Így a mutációk között megkülönböztetünk **funkcióvesztés** (*loss of function*) és **funkciónyerés** (*gain of function*) mutációkat. Az elsőt aligha kell magyarázni, a másodiknál azonban nem csak az érintett gén vagy az általa kódolt fehérje túlműködéséről lehet szó, hanem létezik térben (sejten vagy szervezeten belül) és/vagy időben máshol avagy máskor (nem a kívánt időpontban) kifejeződő génműködés is.

A báziscsere korai stop kodont hozhat létre, amely rövidebb, nem funkcionáló fehérjetermék képződéséhez vezet („*nonsense*”, értelmetlen mutáció). A pontmutációk befolyásolhatják a transzkripció regulátorok kötődését a DNS-hez. Az epigenetikus szabályozásban részt vevő DNS szakaszok pl. lokusz kontroll régiók pontmutációi akár több gén expresszióját is megváltoztathatják.

A bázis kicserélődés oka lehet replikációs hiba vagy a bázisok kémiai struktúráját megváltoztató vegyület (lásd alább).

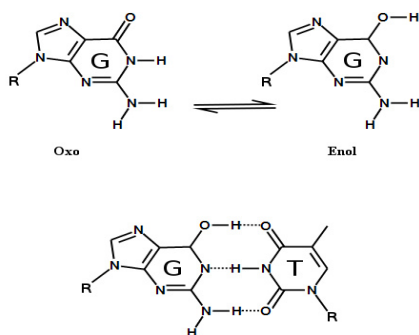
Hárommal nem osztható számú bázis kiesése vagy beépülése „*frameshift*” mutáció kialakulásához vezet. A genetikai kód bázishármasai nincsenek egymástól strukturálisan elválasztva, ezért ha egy bázis kiesik egy kodonból akkor a következő kodon első bázisa lesz a harmadik bázis, és így tovább, tehát az olvasási keret eltolódik (*frame* = keret; *shift* = elcsúszás). Kereteltolódásos mutációt idézhetnek elő a DNS bázispárjai közé ékelődő úgynevezett interkalálódó ágensek (pl. akridin narancs), vagy az UV sugárzás.

A dinamikus mutációk kiterjedése minden egyes DNS replikáció során megváltozhat, így generációról generációra korábbra tolódik az általuk okozott betegség kezdete (**anticipáció**) és növekedhet a súlyossága. A dinamikus mutációk tandem ismétlődő DNS szakaszok expanziója révén alakulnak ki. A Huntington betegség és a fragilis X szindróma hátterében triplet expanziók állnak.

A DNS károsodása és a mutációk mechanizmusai

A környezetünkben számos olyan hatás jelenik meg, amely a DNS bázisait kémiaiilag megváltoztatja. Az ilyen faktorokat **DNS károsító ágensek**nek nevezzük. A károsodott DNS nem egyezik meg a mutáns DNS-sel. A károsodott DNS a sejtek számára felismerhetően megváltozott kémiai szerkezetű, a mutáció viszont kizárólag az információtartalom változását jelenti miközben a kémiai struktúra azonos marad.

A javító (*repair*) mechanizmusok segítségével a legtöbb DNS károsodás kijavítható a hibátlan szál primer szerkezete alapján. A mutáns DNS-t ezzel szemben a sejt nem képes megkülönböztetni az eredeti DNS szekvenciától, így azt nem javítja ki, hanem tovább öröklődik.



8-1. ábra

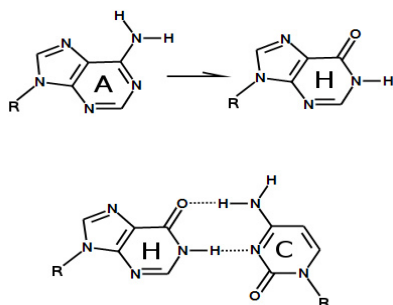
A guanin spontán átalakulhat a stabil oxo- (más néven: keto-) formából a kevésbé stabil enol formává

Ez a citozin helyett a timinnel alkot bázispárt. A replikáció során az enol forma hibás bázis beépülését idézi elő.

A DNS károsodás leggyakrabban akkor okoz mutációt, ha a javítás nem történik meg a replikáció kezdetéig, így a DNS polimeráz hibás bázist épít be az újonnan szintetizálódó DNS-be. Nagyon ritkán a replikáció maga is okozhat mutációt a bázisok spontán oxo-enol tautomerizációja következtében (8-1. ábra).

A szerves bázis és a dezoxiribóz molekula között található N-glikozidos kötés spontán hidrolizálhat. Az így létrejött purin/pirimidin mentes helyekre (*apurinic/aprimidinic acid*) a replikáció során véletlenszerűen épülnek be a nukleotidok. Ennek következtében **transzverzió** (pl. purin pirimidinre cserélődik) és **tranzíció** (pl. purin purinra cserélődik) egyaránt előfordulhat.

Magas oxigénkoncentrációjú légkörünk a genomot erőteljes oxidációs hatásoknak teszi ki. A környezetünkben bekerülő vagy a szervezetünkben termelődő reaktív oxigén formák az adenin, citozin vagy a metilcitozin oxidatív dezaminációját okozhatják (8-2. és 8-3. ábra). A citozin és az adenin dezaminációja uracilt illetve hipoxantint eredményez, amelyek a **DNS-től idegen bázisok**. A metil-citozin dezaminációja következtében viszont a DNS-re jellemző bázis, timin alakul ki, amely a guaninnal nem képes hidrogén kötések kialakítani, így hibás párosodás (*mismatch*) keletkezik.



8-2. ábra

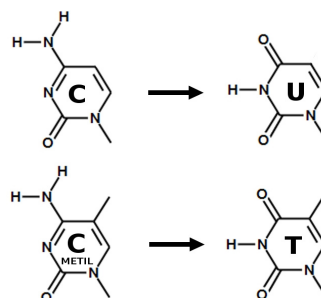
Az adenin oxidatív dezaminációja hipoxantinná

Ezt a bázis exciziós repair rendszer felismeri és kijavítja.

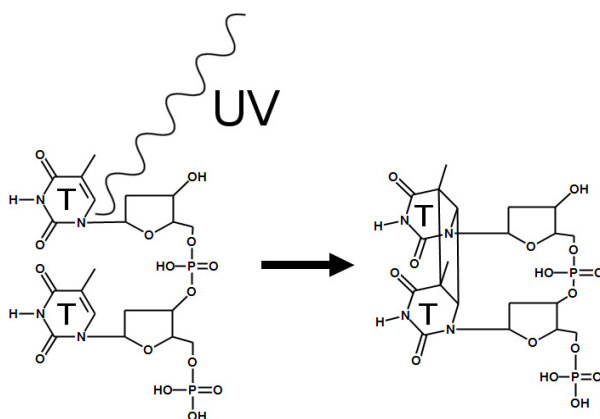
8-3. ábra

A citozin és a metilcitozin oxidatív dezaminációja

A citozinból uracil keletkezik, amelyet a bázis kivágásos javító mechanizmus felismer és javít. A metilcitozinból timin keletkezik, így hibás bázispárosodás alakul ki, amelyet csak a mismatch repair tud javítani.



Az **ultraibolya sugárzás mutagén és karcinogén hatására** a tömegtájékozta-tás is felhívja a figyelmet. Az egymás után két timint tartalmazó DNS-szakaszokon UV hatására kovalens kötéssel timin dimerek jönnek létre. A timin dimerek megakasztják a replikációt, azonban bázis deléció révén kereltolások mutációhoz is vezethetnek (8-4. ábra).



8-4. ábra

Az ultraibolya besugárzás hatása a DNS-re

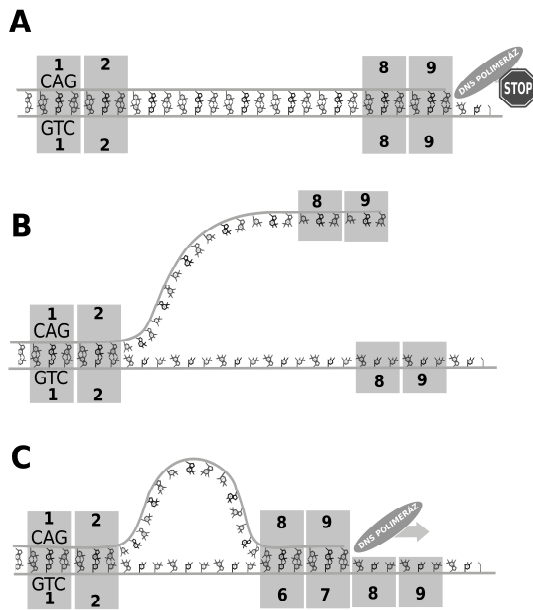
Az egymásután két pirimidint tartalmazó helyen, pirimidin dimerek (pl. timin dimerek) keletkezhetnek.

Az alkiláló ágensek a DNS bázisaihoz nitrogén-szén kötéssel kapcsolódnak, kovalens adduktokat képeznek, amelyek a replikációt gátolják, illetve mutációt idézhetnek elő (pl. busulfan, mitomicin-C).

Azok a vegyületek amelyek hasonlítanak a DNS-t felépítő bázisokhoz beépülhetnek a DNS-be a replikáció illetve hibajavítás során, majd a hibás bázispárosodás következtében mutációk kialakulásához vezethetnek. Ilyen bázisanalógok például a halogénezett uracil származékok (5-bromouracil, 5-fluorouracil⁴¹) amelyek a guaninnal és az adeninnel egyaránt képesek bázispárosodásra.

⁴¹ Az 5-fluorouracil daganatellenes gyógyszerként is használatos.

Az ionizáló sugárzások hatására a DNS molekulán kettősszalú törések jelentkeznek. A mitotikus sejtek fokozottan érzékenyek az ilyen hatásokra. A meta- és anafázisban keletkező DNS törések kromoszóma mutációk kialakulásához vezethetnek. Nagy dózis esetén a γ -sugárzás a DNS-t annyira összetöredezi, hogy a sejt elpusztul. Ez a jelenség a daganatsejtek elpusztítására felhasználható (γ -kés).



8-5. ábra

Triplet expanziók keletkezése a DNS polimeráz megcsúszásával

A: Az egymást követő (tandem) CAG ismétlődéseket hordozó szakaszon a DNS polimeráz elakad.

B: Az újonnan szintetizálódó szál a 9. ismétlődést hordozó végénél leválik.

C: A 8. és 9. ismétlődés tévesen a templát szál 6. és 7. ismétlődéséhez hibridizál. Az új szálon hurok keletkezik, amelyet a templát szál behasítása megszüntet. A folyamat során a DNS szakasz 2 CAG ismétlődéssel hosszabbá válik.

A **dinamikus mutációk** esetén az ismétlődéseket tartalmazó DNS szakasz expanziója (meghosszabbodás) figyelhető meg, amely megváltoztathatja egy gén expresszióját vagy a fehérje termék hosszát. A **Huntington betegség**re és a **familáris mentális retardáció**ra jellemző triplet expanziók kialakulása feltehetően a replikáció megcsúszásához kapcsolódik. A replikációs gépezet az Okazaki fragmentumok végén vagy dNTP-k (dezoxiribonukleotid trifoszfát) hiánya következtében elakadhat. A DNS szintézis megtorpanása esetén előfordul, hogy az épülő DNS szál 3'-vége a DNS polimerázzal együtt leválik a templát szálról (8-5. A és B ábra). A replikáció folytatásához az új DNS szál a komplementaritás elvének megfelelően vissza kell tapadjon a templát szálra. Ha a DNS-en rövid, többszörösen ismétlődő szakaszok találhatóak (pl. tripletek), akkor a visszatapadás nem mindig a megfelelő helyen történik (8-5. C ábra). Minél nagyobb a tandem ismétlődések száma, annál nagyobb a megcsúszás és az expanzió esélye, így ezek a szakaszok **mutációs forrópont**nak tekinthetők (más megfogalmazásban **premutációk**), és felelőssé tehetőek az anticipációért.

A DNS hibajavítása

A DNS kettősszálú törése után a kromoszóma két fele egymástól elsodródik, tehát kizárólag a ligáz enzimek segítségével nem egyesíthető újra. Az ilyen károsodások a diploid sejtekben a **rekombinációs repair** segítségével javíthatók. A két-felé szakadt kromoszóma a töréssel határos szakaszai hibridizálnak az ép homológ kromoszóma megfelelő szekvenciájával, így a kromoszóma fragmentumok végei újra megtalálják egymást és a törés korrigálható. A rekombinációs repair feladata a kromoszóma mutációk megelőzése.

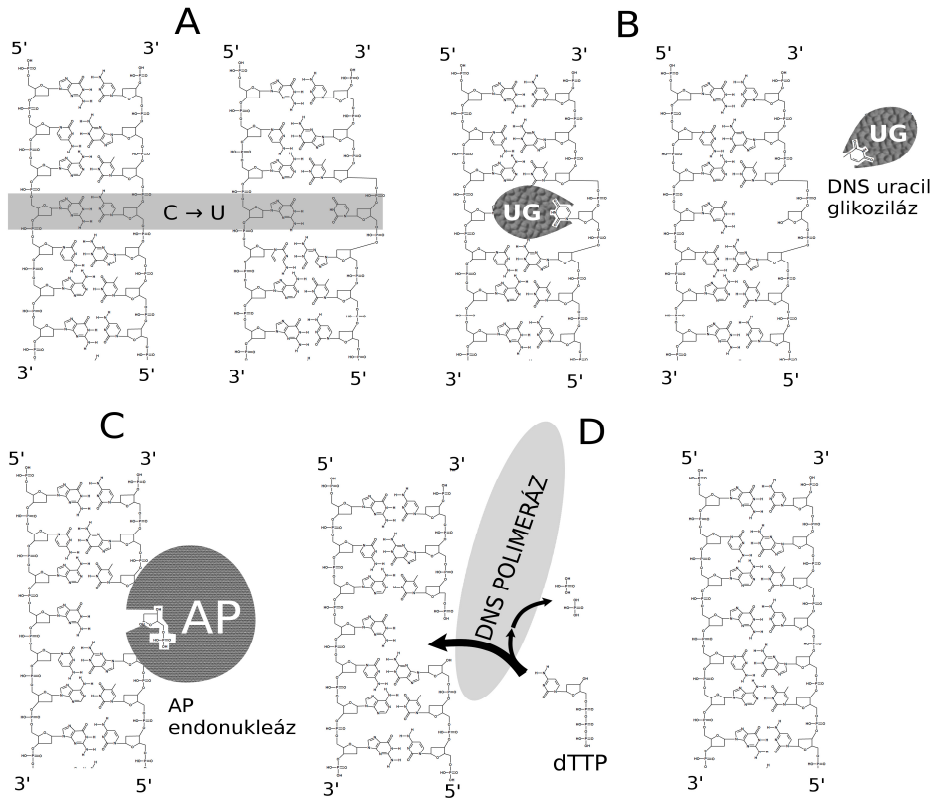
A DNS-től idegen bázisokat a sejtek a **bázis kivágásos hibajavító rendszer** segítségével távolítják el a DNS-ből. A DNS uracil-glikoziláz enzim a DNS-ben a citozin oxidatív dezaminációja következtében kialakuló, DNS-től idegen uracil bázisok (8-6. A ábra) és a dezoxiribóz váz közötti N-glikozidos kötést elhasítja, így egy pirimidin nélküli (depirimidinált) hely keletkezik a DNS-ben (8-6. B. ábra) A depurinált vagy depirimidinált helyeket (amelyek spontán is kialakulhatnak) az úgynevezett AP (*apurinic/apirimidinic*) endonukleázok szüntetik meg a bázis nélküli dezoxiribóz molekula eltávolításával (8-6. C ábra). A keletkezett rést (*gap*) a DNS polimeráz tölti fel (8-6. C ábra).

Az UV hatására kialakuló pirimidin dimerek javításáért a nukleotid excizós repair (NER) a felelős. A NER működése során a károsodott DNS szál két ponton behasad majd leválik az ép szálról. Az így keletkezett egyszálú DNS szakaszt DNS polimeráz egészíti ki kétszálúvá (8-7. ábra). A pirimidin dimerek (pl. timin dimerek; 8-4. ábra) felismerésében és a javító enzimek, mint az endonukleáz és a DNS polimeráz, toborzása a XER fehérjékből álló komplex feladata. A XER fehérjék nevét adó betegségben a *xeroderma pigmentosum*ban szenvedők az UV hatására érzékenyek. Ezekben az egyéneknél már a szórt napfény hatására is az epiteliális sejtek pusztulni kezdenek, emellett nagyon gyakran alakul ki malignus bőrelváltozás a mutációs ráta növekedése következtében. Az ember 9 XER génnel rendelkezik, közülük bármelyik funkcióvesztéses mutációja a NER működésképtelenségét és a xeroderma pigmentosum kialakulását idézi elő a homozigótákban. (L. még 3. fejezet.)

A **replikáció pontossága** meglepően nagy pl. a transzkripcióhoz képest. Csak 10^{10} bázisból egyet épít be hibásan. Az alacsony hiba-ráta oka, hogy a replikációt végző DNS polimeráz enzim hibajavító funkcióval is rendelkezik. A hibásan beépített bázist a DNS polimeráz 3' → 5' exonukleáz aktivitással rendelkező doménje érzékeli, lebontja a hibás szakaszt, amelyet később a polimeráz domén immár helyesen épít vissza. Ezt a mechanizmust nevezzük kefelevonat (*proofreading*) hibajavításnak.

A replikáció pontosságához a *mismatch repair* is hozzájárul, amely a DNS szintézis után érzékeli a hibás bázispárosodásokat. Ez a javító mechanizmus hasonlóan működik a NER-hez, azonban fontos tulajdonsága, hogy csak az újonnan szintetizálódó szálba vág bele, a templát szálát érintetlenül hagyja. Az eredeti szálát a javító rendszer prokarióták esetén a metiláció alapján ismeri fel (a metiláció csak a

replikáció után következnek be). Eukarióták esetén a szálak megkülönböztetése az új szálban található *nick*-eken (bevágás) alapul, amelyek csak később szűnnek meg.

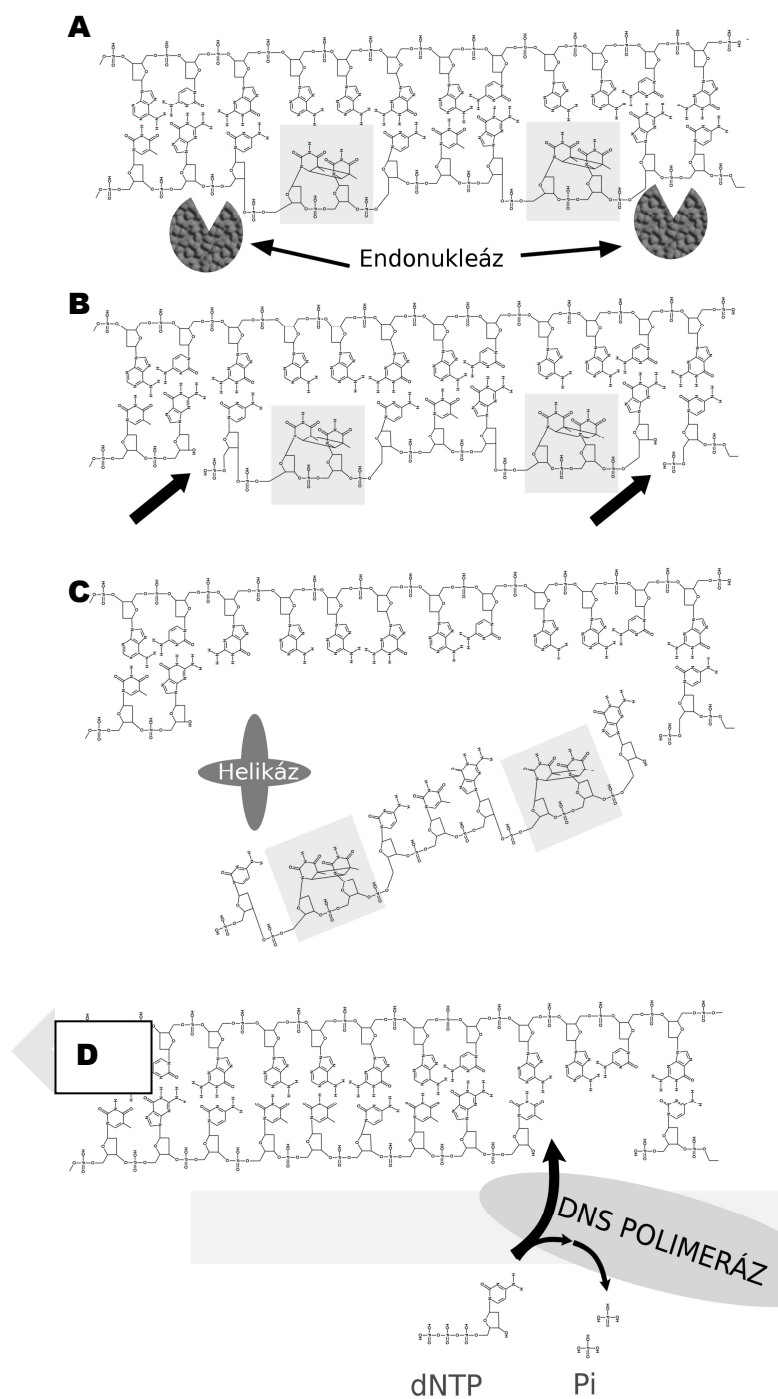


8-6. ábra

A bázis-kivágásos repair működése

A: A citozin dezaminációval uracillá alakul. **B:** A DNS uracil-glikoziláz megtalálja és kivágja az uracil bázisokat. **C:** Az így keletkezett pirimidin nélküli (*apirimidinic*) dezoxiribózt az AP endonukleáz kihalásítja. **D:** A DNS polimeráz az így keletkezett rést feltölti.

A metilált citozint tartalmazó DNS szakaszok (CG gazdag régiók) mutációs forrópontok, ugyanis a metilcitozin oxidatív dezaminációja (8-3. ábra) timin kialakulását okozza, így *mismatch* keletkezik. A interfázisos kromoszómán a mismatch repair nem képes a hibás szálát megkülönböztetni a hibátlan száltól, ezért egyenlő eséllyel írja át mindkettőt. Ebből következik, hogy a metilcitozin dezaminációja az estek felében – véletlenszerűen – mutációt eredményez. (Ezt szokták **génkoverzió**ként is említeni.).



8-7. ábra

A timin dimerek javítása a nukleotid exciziós repair segítségével.

A: A XER komplex által felismert károsodott DNS hibás szálát endonukleázok hasítják.

B: Így *nick*-ek (bevágások) keletkeznek. Ezekre mutatnak a nyilak.

C: A hibás szál helikázok hatására leválik.

D: A keletkezett rést a DNS polimeráz feltölti.

A mutagének vizsgálata

A mutációk kialakulását előidéző fizikai és kémiai hatásokat az **Ames-teszt** segítségével vizsgálják, auxotróf *Salmonella* baktérium törzsek segítségével. A baktériumok többsége minden aminosavat és vitamint képes előállítani (**prototrófok**), így csak szén- és energiaforrást igényelnek. **Auxotrófnak** nevezzük azokat a mutáns baktériumokat, amelyek nem képesek az élethez nélkülözhetetlen metabolitok valamelyikének előállítására. Az auxotrófia oka az Ames-tesztben használt mikroorganizmusok esetén, hogy a hisztidin szintézis útvonal (*his* gének) egyik kulcsenzimét kódoló génben bázis csere, vagy kereteltolódásos mutáció található, amely a fehérje funkcióját megszünteti. Ha a baktérium sejtek száma kellően nagy, a mutagén kezelést követő szélesztés (a baktériumsejtek felhígítása majd szétterítése szilárd táptalaj felületén) eredményeképpen keletkező telepek számolható mennyiségben jelennek meg hisztidint nem tartalmazó táptalajon. Minden telep egyetlen prototróffá vált sejt leszármazottaiból áll. A nagy baktériumszám azért szükséges, mert azt a nagyon kis valószínűségű eseményt szeretnénk látni, amely révén a működésképtelen *his*⁻ gén funkciója mutáció következtében helyreáll (visszamuatlás). A reverz mutációt elszennvedő – a hisztidin termelésére képessé váló – telepek számából következtethetünk a mutagén hatás mértékére. Az Ames-tesztet az FDA (U.S. Food and Drug Administration) előírásai szerint minden forgalomba kerülő, emberi szervezettel kapcsolatba lépő mesterséges vegyület (gyógyszer, kozmetikum stb.) esetén kötelező elvégezni.

A máj enzimek az idegen vegyületeket a méregtelenítési folyamatok során átalakítják (lásd 10. fejezet), gyakran azonban éppen ez a reakció eredményezi fokozottan mutagén hatású metabolit kialakulását. Az Ames teszt módosításával a méregtelenítő enzimek hatása modellezhető, ha a kérdéses vegyülethez patkány máj mikroszómális fehérjefrakciót adunk⁴².

Sejtenyészetekben, illetve állatkísérletekben a vegyületek karcinogén (daganatkeltő) hatása is vizsgálható. A daganatképzés és a mutáció között szoros összefüggésre mutat az a tény, hogy szinte minden karcinogén vegyület az Ames-teszt szerint mutagén is. (L. még a Rosszindulatú daganatok genetikai háttere fejezetben.)

⁴² A szóban forgó enzimek a simafelszínű endoplazmatikus retikulumhoz (SER) kötve találhatóak. Ha a sejteket feltárlják, a SER-ből igen apró hólyagcsák keletkeznek, ezeket illetik a mikroszóma névvel.

DUPress

9. fejezet

Populációgenetika

A populációgenetika egzakt, modelleken alapuló tudomány

Alapvető genetikai- (itt és most: diploid élőlényekre vonatkozó) és matematikai összefüggések ismerete, ill. sok esetben a „józan paraszti ész” használata szükséges ahhoz, hogy megfelelő statisztikai vizsgáló módszerekkel választ adjon központi kérdésre, miként és milyen mértékben változott adott időszak alatt egy vizsgált populáció genetikai összetétele. A változás indikátorai a genotípus- és allél-frekvenciák, amelyek egy ideális, modell populációban konstans értéket mutatnak. Fogjuk azonban látni, hogy a gyakorlatban ez a fajta „null-hipotézis” csak igen ritkán teljesül. Számos környezeti (genetikai drift, alapító hatás) és genetikai faktor (véletlen mutációk, reprodukció) valamint társadalmi tényezők (migráció) is befolyásolhatják.

Az elmúlt időszak új generációs szekvenálásai által létrehozott információ-áradatnak részben sikerült feloldania az ellentmondást a populációkon belüli, ill. populációk közt mutatkozó magas fokú diverzitás, és az egyedek közt mutatkozó rendkívül kismértékű DNS szekvencia variancia (max. 1%) között. Az emberi fehérjéket (közel 250 000⁴³ különböző) kódoló gének viszonylagos csekély száma (25 ezer gén) rávilágított a biológiai rendszerek szabályozásának komplexitására.

Köszönhetően a 2000-ben indult nemzetközi **HapMap** (a humán genom haplotípusait térképezi fel) projektnek (lásd még 12. fejezet), ill. a gombamód szaporodó asszociációs analíziseknek, mára mintegy 20 millió variánsra derült fény, melyek pontos helyzetét meghatározták. Becslések szerint ezek 45%-a intronokban, 43%-uk intergénikus szakaszokban, és mindösszesen csak 12%-uk lokalizálódik exonokban. Tovább bonyolítja a helyzetet az a tény, hogy ezek nagy része ún. alternatív SNP, melyek nem kapcsolnak semmilyen funkcióváltozással, esetleg betegséggel.

Látjuk továbbá, hogy a populációgenetikának azért is kiemelkedő a jelentősége, mert migrációs mintázatok, variabilitások (morfológiai, DNS szintű), polimorfizmusok (enzim, kromoszomális) vizsgálatával képet kaphatunk a különböző népcsoportok keveredéséről, divergálásáról (szétválás), vándorlásáról, megszűnéséről.

⁴³ Más források szerint közel egy millió.

ről, esetleg újak keletkezéséről, ezáltal az élővilág – számunkra elsősorban az emberi faj – evolúciójáról.

Genetikai asszociációs vizsgálatokkal (*genome wide association study*) képesek vagyunk betegségek családi halmozódását, rizikóját megbecsülni, amely óriási felelősséggel ruházza fel a vizsgálat. Egy nem megfelelően és körültekintően megválasztott statisztikai vizsgálatmódszer igen félrevezető, fals eredményeket létrehozván, akár jelentős közegészségügyi vonzattal is járhat.

Genotípus- és allélfrekvenciák

Ahhoz, hogy megfelelően definiált időintervallumon belül nyomon követhessük és megbecsülhessük változásukat, tisztában kell lennünk az itt említett fogalmak jelentésével. A genotípus frekvenciák adott genotípusok populációban való megoszlására utalnak. Autoszómákon elhelyezkedő génekre vonatkozóan megkülönböztetjük a domináns homozigóta, heterozigóta, ill. a recesszív homozigóta genotípusok gyakoriságát. Egyszerű gyakoriságot számolunk, amelyhez szükséges a populáció összegyedszámának, valamint a különböző genotípussal rendelkező egyedek számának ismerete. Ebből következik, hogy az allélfrekvenciák pedig az adott allél(ok) populációs gyakoriságaira engednek következtetni.

A domináns allél frekvenciájának mutatója – egyezményes alapon – a p , a recesszív allél pedig a q . Multiplex allélia esetén (mint pl. amilyen az ABO vércsoportrendszer), minden egyes alternatív allélt külön jelzéssel látunk el. Azt se felejtjük el, hogy autoszómális öröklődés esetén minden egyedben két allél található, így az allélfrekvenciák kalkulálásánál tanácsos már a kezdetekkor beszorozni a populációban található egyedek számát kettővel, hogy megkapjuk, összesen hány darab allél található a populációban. Ahhoz, hogy pl. megkapjuk a domináns homozigóta genotípus frekvenciáját a populációban, elég a homozigóta dominánsok egyedszámát kettővel szorozni (hiszen bennük két allél található), ehhez hozzáadni a heterozigótákban lévő domináns allélok számát (amely ez esetben megegyezik a heterozigóta egyedek számával), és a kapott értéket egyszerűen elosztani a populációban megtalálható allélok számával.

Értelemszerűen mind a genotípus-, mind pedig az allélfrekvenciák levezethetők egymásból. Fontos megjegyeznünk továbbá azt is, hogy a genotípus-, ill. allélgyakoriságoknak valószínűség tartalmuk is van. Tehát bizonyos genotípus gyakoriság nem csak az adott genotípus populációs megoszlásáról ad információt, hanem arról is, hogy egy, a populációból véletlenszerűen kiemelt egyén/egyed, milyen eséllyel rendelkezik az adott genotípussal.

Reális vs. ideális populációk

Minden, a természetben fellelhető populáció **reális populáció**, de gyakorlatilag egyik sem ideális. A térben és időben, adott habitat folton (területen) élő, szaporodási közösséget alkotó egyedek tartoznak azonos populációba, melynek határait a gyakorlatban igen nehézkesen, sok esetben éppen a genetikai markervizsgálatok révén tudjuk megállapítani. Ezzel szemben az **ideális** (egyensúlyi) **populáció** tulaj-

donképpen a populációgenetika egyik alap-modellje, melynek leírása Hardy (angol matematikus) és Weinberg (német szülészdoktor) nevéhez fűződik. Éppen ezért nem téveszthető szem elől a tény, hogy a valóságban NEM, találkozhatunk ideális populációval.

Ahhoz, hogy ennek a jelenségnek az okát megértsük, lássuk mely tényezőknek kell egyszerre teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgált populációt ideálisnak tekinthes-sük. Fogalmazhatnánk úgy is, hogy mely tényezők vannak közvetlen hatással az adott populáció „genpool”-jára (génállományára).

Végtelen nagy egyedszám. Az ideális populációra vonatkozó összefüggések sta-tisztikus jellegűek, amelyekre a nagy számok törvényei érvényesülnek.

Véletlen szaporodás, párválasztás (*random mating*). Nincs kitüntetett fenotípusos kategória, azonos eséllyel párosodik minden egyed bármelyik másik – ellen-kező nemű – egyeddel. Minden párnak azonos számú utóda születik.

Nincs szelekció. A környezeti tényezők minden egyedre azonos módon hatnak. Nem befolyásolják az egyes egyedek szaporodó-, ill. életképességét.

Nincs mutáció. Nem befolyásolja az egyensúlyt új allélok megjelenése.

Nincs migráció. Az ideális populáció elszigetelt, sem be-, sem kivándorlás nem történik.

Az itt vázolt kritériumok teljesülése értelmében tehát egy **ideális populációban** genetikai egyensúly van, ennek értelmében **mind a genotípus-, mind pedig az al-lél-gyakoriságok generációról generációra állandó értéket mutatnak,** változatlanok.

Reális populációkra és populációrendszerekre ható tényezők

Számos olyan evolúciós hatás ismert, amelyek képesek megzavarni vagy fenntartani a Hardy-Weinberg (H-W) egyensúlyt.

Kis populációkat érintő hatások. Mennél nagyobb az adott populáció egyedszá-ma, annál nagyobb eséllyel érhető el a várt, ideális populációkat jellemző genotípus frek-venciák. Annak megítélésére, hogy adott populáció eltér-e az ideális modelltől, azaz a Hardy-Weinberg egyensúlytól, χ^2 (Pearson féle khi-négyzet) próbát végezhetünk. Köztu-dott tény azonban, hogy kis populációk kevés eséllyel követik a khi-négyzet eloszlást. En-nek oka a kis populációkat érintő, ún. „*random walk*” jelenségében, azaz az allélgyakorisá-gok nagymértékű szórásában keresendő.

Ez a generációról generációra zajló „genetikai mintavételi hiba” a **genetikai sodródás,** azaz **drift.** Mennél kisebb adott populáció mérete, annál nagyobb az allélgyakoriságok szó-rása. Ez az öngerjesztő folyamat pedig mindaddig zajlik, amíg az egyik allél nem fixálódik (**allélfixálódás;** $p=1$) miáltal a másik allél ki nem esik (**allélkiesés;** $q=0$). A kis populációk evolúciós flexibilitását pedig az ily módon bekövetkező véletlen hatások nagymértékben befolyásolják, hiszen a környezetben hirtelen beálló változásokhoz csak egy variábilis populáció képes megfelelően adaptálódni. Könnyen megbecsülhető tehát a genetikai drift jelentősége a fajok kialakulásában és divergálásában. A jelenség különféle természeti té-nyezőkre vezethető vissza. Ilyen lehet, pl. egy kisebb részpopuláció elsodródása, elzáródása az anyapopulációtól, amikor is már nem képes azzal visszakereszteződni.

A **genetikai sodródás** egyik speciális esete az ún. **palacknyak hatás**, azaz „*bottle neck*” effektus. Ilyenkor a populáció egyedszáma valamilyen – pl. természeti katasztrófa – hatásra hirtelen, egyik pillanatról a másikra lecsökken. A katasztrófát véletlenül túlélő néhány egyed genetikai variabilitása jelentősen lecsökken az eredeti populációhoz képest. Később ugyan, mikor a körülmények újra kedvezőre fordulnak a populáció majd ismét az exponenciális (logaritmik) növekedési fázisba lép, de örökre fogja őrizni a katasztrófa nyomait, hiszen lesznek majd olyan lokuszok, amelyek alacsonyabb variabilitással rendelkeznek, mint a katasztrófa előtt. Szélsőséges esetben előfordulhat az is, hogy kihal egy populáció, ilyenkor a megüresedett terület alkalmassá válik más populációkból származó alapító egyedek befogadására.

Az ún. **alapító hatás** a sodródás egy speciális formája, melynek során egy kis csoport kiválik egy nagyobb populációból, és ennek alléllösszetétele már az elszakadásnál eltérhet az utóbbiétól. A populációk szubpopulációkra (alpopuláció) való tagolódását követően az egyes populációkban egymástól függetlenül zajlik majd az allélgyakoriságok változása. Mennél kisebbek az adott populációk, egy idő után annál nagyobb különbségek alakulnak ki közöttük. Ezt a jelenséget nevezzük genetikai differenciálódásnak.

A genetikai differenciálódás ellen ható folyamatok közül kiemelendő a **migráció**. A genetikai diverzitás következményeként a szomszédos populációkban lesznek majd olyan egyedek, amelyek képesek populációk közt mozogni, vándorolni és az ún. reprodukciós gátat (amely – emberre vonatkozóan – lehet etnikai, kulturális, vallási, földrajzi) átlépni. Bizonyára lesznek köztük olyanok is, amelyek képesek egymás közt szaporodni is. A **génáramlás** eredményeként csökkennek majd a populációk közti genetikai különbségek.

Irányított párválasztás

Amikor a párválasztás során valamely fenotípusos jelleg, vagy viselkedési forma előnyt élvez, ezáltal bizonyos genotípusok párosodása gyakrabban következik be, mint az a gyakoriságuk alapján várható lenne. Egy emberi populációban természetesen elképzelhetetlen a nem irányított párválasztás. Továbbá ugyancsak az emberi szempontok szerinti kiválogatás hatása érvényesül különböző haszonállatok tenyésztése és növénynevelések esetén (mesterséges szelekció).

A **válogató párválasztásnak** két speciális esete van. **Asszortatív szaporodás** esetén azonos vagy hasonló (geno- és) fenotípusú egyedek egymást részesítik előnyben. A válogatás legtöbbször pozitív (testalkat, intelligencia stb.), de ismerünk ellenpéldákat is. Az autoszomális domináns öröklődésű achondroplasiás (törpenövésű) érintettek többnyire kizárólag egymás között keresnek párt, de példaként említhetnénk a recesszíven öröklődő süketnémaságot is, ahol ugyancsak elősegíti a pozitív válogatást az a tény, hogy az ilyen személyek általában a speciális képzésükről gondoskodó intézményekben, azaz magukhoz hasonlók társaságában élnek. Amennyiben a preferált tulajdonság örökletes, akkor ez a beltenyésztéshez hasonlóan a homozigóták dúsulását és a heterozigóták ritkulását eredményezi. Kivétel,

ha a párválasztás alapjául szolgáló jelleg intermedier öröklésmentet mutat és a heterozigóta genotípus a preferált. A preferencialítások másik esete a **disszortatív szaporodás**, amikor is a különböző geno- és fenotípusok párosodása élvez előnyt.

A beltenyésztés

A beltenyésztés rokonsági alapon történő asszortatív házasodási forma, amelynek következményeként a heterozigóták gyakorisága a beltenyésztés mértékével arányosan csökken. Identikus, azaz **autohomozigóták** úgy jönnek létre, hogy a szülők, amelyek az allélokot hordozták rokonok voltak, ezzel szemben a nem identikus, azaz **allohomozigóták** alléljai nincsenek leszármazási kapcsolatban egymással. *Homo sapiens* esetén kiváló példát szolgáltatnak erre az ún. konzangvinikus, azaz **rokonházasságok**, ahol a káros, recesszív allélok családi halmozódást mutatnak. Ennek eredményeként a heterozigóta hiány mellett, azzal egyenértékű homozigóta többlet is jelentkezik, amely szokatlan recesszív betegségek felbukkanását eredményezheti.

Jól ismerjük a genetikai komplementáció jelenséget (l. 3. fejezet), ahol normális esetben a házastársak különböző lokuszokon hordozzák a mutációt, melynek következményeként a gyermekük heterozigóta vad fenotípusú lesz (mindkét lokuszon), míg a rokonok nagy eséllyel ugyanazt a ritka allélt hordozván, homozigóta recesszív gyermekeket hoznak a világra. De előfordulhat beltenyésztés genetikai izolátumokban is. Erre kiváló példát szolgálta a Tay-Sachs betegség, amely az askenázi zsidók közt 100-szor nagyobb gyakoriságot mutat, mint egyéb népegekben. A beltenyésztéses leromlás következményeként tehát azáltal csökken a **populáció rátermettsége** (fitnesze), hogy megnő a különböző káros allélokra homozigóta egyedek gyakorisága. A variabilitás egyik fontos indikátora a heterozigótaság mértéke, míg a beltenyésztés és a drift egyaránt csökkentik a genetikai diverzitást.

Mutáció és szelekció

Annak ellenére, hogy a genetikai rátermettség (fitnesz) feltétele a variabilitás, melynek forrása a mutáció, ez utóbbi jelenség ellen **szelekció** hat. A **mutáció** az egyetlen olyan folyamat, amelynek eredményeként új allélok jöhetnek létre. A mutációk fitneszre gyakorolt hatásuk alapján eltérőek lehetnek. Megkülönböztetünk letális, káros, neutrális és előnyös mutációkat. Amennyiben a mutáció hatására hibás allélok jönnek létre, és a szelekció ezek eltávolítása irányában hat, akkor beszélhetünk letális vagy káros mutációkról. Ilyen esetekben a mutáció és szelekció összehangolt működésének eredménye egyensúlyi állapotot eredményező allélfrekvencia változás.

Annak a megbecsülésére, hogy adott genotípus milyen mértékben vesz részt a következő generáció genetikai állományának kialakításában, a **relatív fitnesz** fogalmat használjuk, amely a generációról generációra történő relatív génátadási valószínűséget határozza meg. Ez nem más, mint adott genotípus által létrehozott utódszám és a populációban a legtermékenyebb genotípus utódszámának a hánya-

dosa. Értéke 0-1 között változik. A legalkalmasabbak a $W=1$, míg a letális genotípusok a $W=0$ értékkel jellemezhetők. Ez az alkalmassági, rátermettségi mutató, fordítottan arányos a szelekció intenzitásával, azaz mennél kevésbé rátermett az illető genotípus, annál erősebben hat ellene a szelekció. A szelekció intenzitását pedig a **szelekciós koeficienssel** (s) jellemezhetjük, amely nem más, mint az alkalmasság csökkenésének mérőszáma ($s=1-W$).

Megkülönböztethetünk recesszív- és domináns homozigóta ellen irányuló szelekciót. Létezik továbbá ún. **heterozigóta hátrány** (underdominancia) ill. **heterozigóta előny** (overdominancia). Előfordulhat, hogy egy káros, recesszív allél súlyos betegséghez vezet homozigóta formában, azonban a heterozigóta genotípus fitnessze felülmúlja a vad típusú, homozigótákét. A heterozigóta előny jellegzetes példája a sarlósejtes anémia. Közismert tény, hogy olyan területeken ahol a malária endémiás (pl. Nyugat-Afrika), a maláriának ellenálló, normális oxigén tenzió mellett tünetmentes $Hb^A Hb^S$ heterozigóták fitnessze a legmagasabb.

Végezetül még szót kell ejtsünk röviden a szelekciós kényszer, az ún. **genetikai teher** fogalmáról, ugyanis egy szelekciónak kitett populáció egyedszáma csak abban az esetben maradhat állandó, ha többletutódot hoz létre.

H-W egyensúly alakulása autoszomális öröklésment esetén

Ahogy azt már fentebb említettük, a genotípus-, ill. allélgyakoriságoknak valószínűség tartalmuk is van. Ennek értelmében tehát annak ez esélye, hogy adott lokuszon domináns allél található p . A recesszív allél megtalálási esélye pedig q . Annak az esélye továbbá, hogy egyáltalán van allél az adott lokuszon ($p + q$). Autoszomális öröklésment esetén annak az esélye, hogy adott lokuszon megtalálható mindkét allél $(p + q)^2$, amely valószínűség nem más, mint $p^2 + 2pq + q^2$.

Mivel autoszomális öröklésment esetén a genotípusfrekvenciák mind a hímek, mind pedig a nőstények esetében azonosak, ezért a következő keresztezési kísérletet tekintjük modell kísérletnek, amely ideális populációkban feltételezi a véletlenszerű párosodást, ebből adódóan elméletileg egyensúlyi populációkban a domináns A (p) ill. a recesszív a (q) allélok gyakoriságának összege generációról generációra állandó értéket ($p + q = 1$) mutat. Nem szabad összetévesztenünk a Hardy-Weinber egyenletet ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) és összefüggéseket, amelyeket fent bemutattunk, a **Hardy-Weinber törvény** meghatározásával. Ez azt mondja ki, hogy ideális populációban az allélgyakoriságok nemzedékről nemzedékre változatlanul öröklődnek, állandók maradnak, azaz a génegyensúlyt fogalmazza meg. Levezethető matematikailag a fentiekből, de ne feledjük, hogy ez csak ideális populációban érvényes. Ugyanakkor az allélgyakoriságok nemzedékről nemzedékre való változásából (azaz a Hardy-Weinberg törvénytől való eltérésekből) a reális populációkra vonatkozó információkat nyerhetünk.

Több allél esetén a Hardy-Weinberg egyenlet módosul, pl. az AB0 rendszerre vonatkozóan így: $p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$.

$Aa \text{ ♂} \times$		$Aa \text{ ♀}$	
		♂	
		A (p)	a (q)
♀	A (p)	AA p^2	Aa pq
	a (q)	aA qp	aa q^2

A H-W összefüggés értelmében: $AA (p^2) + 2Aa (2pq) + aa (q^2)$

Ideális populáció esetén: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

H-W egyensúly alakulása X-hez kötött lokuszok esetén

Nemhez kötött öröklődés esetén a homogaméciás (X-hez kötött öröklődés esetén a nő) ivar esetében adott allél megtalálási valószínűsége ugyancsak $(p+q)^2$, míg a heterogaméciás ivar (X-hez kötött öröklődés esetén a hemizigóta hím) esetében ez csupán $(p+q)$. Fontos kiemelni, hogy az alléfrekvenciák minden esetben a populáció egészére vonatkoznak. Amennyiben tehát adott populációban a nemek arányát azonosnak vesszük, akkor ugyanazon alléfrekvenciák vonatkoznak férfiakra és a nőkre egyaránt. Ezzel szemben a nemek közti genotípusfrekvenciák eltérőek lesznek, és a Hardy-Weinberg egyensúlyi modellnek megfelelően a következőképp módosulnak:

	♀		♂	
Fenotípus	Genotípus	Genotípus frekvenciák	Genotípus	Genotípus frekvenciák
Domináns	$X^A X^A$	p^2	X^A	$X^A (p)$
	$X^A X^a$	$2pq$		
Recesszív	$X^a X^a$	q^2	X^a	$X^a (q)$

DUPress

10. fejezet

Farmakogenetika, ökogenetika, farmakogenomika, ökogenomika

A farmakogenetika és a farmakogenomika alapjai

Az orvostudomány kezdetei óta ismerjük, hogy a legtöbb gyógyszer hatása egyénenként eltérhet. A dózis, amely a populáció nagy részében hatékony, néhány páciensben hatástalan, máskor káros vagy túlzott reakciót válthat ki. Az orvosi praxisban ma még a medikamentumok egyéni kipróbálásával választható ki a megfelelő kezelés, a lehetséges mellékhatások, és a beteg állapotának állandó megfigyelése mellett. A gyógyszerek használatának kockázatairól a gyártók a 2005. évi XCV. törvény 5.§ értelmében a kezelőorvost és a beteget kötelesek tájékoztatni. Az óvintézkedések ellenére gyakran előfordulnak a farmakonokhoz köthető egészségkárosodások, szélsőséges esetben a beteg élete is veszélybe kerül. Az illegális tudatmódosító, stimuláns, pszichotróp és egyéb drogok kontrollálatlan fogyasztása esetén pedig a helyzet még súlyosabb. Néhány drogfogyasztó függőségre való hajlama nagyobb, a halálos túladagoláshoz vezető dózis pedig alacsonyabb lehet az átlagos értéknél. A környezetünkben (gyógyszerekben, kozmetikumokban, élelmiszerekben stb) fellelhető ártalmatlannak ítélt vegyületek legtöbbje – mesterséges és természetes egyaránt – okozhat váratlan, olykor súlyos reakciókat az arra érzékeny személyekben (*adverse reaction*). Ráadásul mindezek befolyásolhatják egy okkal-joggal alkalmazott (másik) gyógyszer hatását.

A szervezettől idegen anyagok vagy más néven **xenobiotikumok** (*xeno* = idegen; *bio* = élő) metabolizmusuk, illetve hatásuk kifejtése során reakcióba lépnek a testünket felépítő biomolekulákkal – többségben fehérjékkel: enzimek, receptorok, transzportfehérjék – amelyek szerkezete génikusan kódolt (l. 5. fejezet). A fehérjéket kódoló génekre gyakran nagyfokú allélikus polimorfizmus jellemző, tehát jogosan következtethetünk arra, hogy a gyógyszerekre adott válasz szoros összefüggést mutat az individuumban genetikai struktúrájával, genomjával. Az egy-egy ikreket kivéve minden ember genetikai összetétele különböző, tehát várhatóan a xenobiotikumok hatása is kisebb vagy nagyobb mértékben minden egyénben eltérhet.

A farmakogenetika – és ma már egyre inkább a farmakogenomika – célja a gyógyszerek (és egyéb szervezettől idegen vegyületek) hatásainak az egyének közötti különbségeiért felelős genetikai polimorfizmusok felderítése, valamint az így megszerzett ismeretek alkalmazása a diagnosztikában és a terápiában. Eredményei lehetőséget teremtenek a gyógyszer helyes megválasztására és a dózis optimalizálására, valamint a lehetséges kockázatok megítélésére a kezelés megkezdése előtt,

így súlyos mellékhatások, egészségkárosodások vagy akár halálesetek is megelőzhetők. A gyógyszeres kezelés így egyre inkább személyre szabhatóvá válik.

A technikai lehetőségek határt szabnak a tudomány és gyakorlat fejlődésének. Már az 1950-es években felismerték a farmakogenetika jelentőségét és számos lokuszt azonosítottak (pl. pszeudokolineszteráz, lásd alább), azonban csak a molekuláris biológia elterjedésével indulhatott a farmakogenetika – immár mint farmakogenomika – robbanásszerű fejlődésének.

Ma már lehetőségünk van az egyes páciensek genetikai állományának vizsgálatára. A DNS chipek segítségével a gyógyszerhatásokért felelős génekre jellemző polimorfizmusok tanulmányozhatók. A modern, új generációs szekvenátorok, illetve a Humán Genom Projekt eredményei lehetővé teszik a genom teljes bázissorrendjének megismerését. A **személyre szabott orvoslásnak** (l. alább) gyakorlatilag csak anyagi korlátai maradtak.

A genetikai polimorfizmusok és a gyógyszerhatás összefüggéseinek feltárása több megközelítésben is lehetséges. A klasszikus családfa- és ikerkutatáson alapuló módszerek segítségével megállapítható, hogy a normálistól eltérő gyógyszerhatásokat – fokozott érzékenységet, vagy más esetekben a gyógyszerrel szembeni érzéketlenséget – mennyire befolyásolják örökletes faktorok. Az adott allélt hordozó egyéneknél a gyógyszerhatás *in vivo* vizsgálható. Az adott gén különböző alléljairól szintetizálódó fehérje-variánsok és a gyógyszerek kölcsönhatásai kísérletesen *in vitro* tanulmányozhatók (pl. egy receptor fehérje allélikus variánsai milyen erősen kötik a gyógyszermolekulát). A fenti módszerek klasszikus élettani, biokémiai és genetikai vizsgálatok a gyógyszerekkel közvetlen összefüggésbe hozható fehérjék/gének hatásának megállapítását teszik lehetővé.

Ezzel szemben a genomikai módszerek a teljességre törekszenek, a genom és a farmakon hatásának összefüggéseire világítanak rá a teljes genomra kiterjedő asszociációs tanulmányok segítségével. A módszer lényege, hogy pácienseket a gyógyszerhatás (vagy egyéb orvosi relevanciájú fenotípus) alapján csoportokba sorolják (pl. nem érzékeny, érzékeny, túlérzékeny), majd a teljes genomjukat megszekvenálják. Számítógépes statisztikai programok segítségével minden polimorfizmushoz hozzárendelnek egy számértéket, amely annak a valószínűségére utal, hogy az adott polimorfizmus és a gyógyszerhatás változatossága egymástól független, azaz véletlenszerű vagy sem.

A klasszikus farmakogenetika a gyógyszerhatást befolyásoló géneket két fő csoportba sorolja. Az első csoport a **farmakokinetikai** tulajdonságokat befolyásolja, tehát a gyógyszer felvételét illetve metabolizmusát. A második csoportba tartoznak a **farmakodinamikai** jellemzőket befolyásoló gének, amelyek a gyógyszerhatás célpontjait és az azokhoz kapcsolódó biokémiai útvonalak elemeit kódolják (receptorok, enzimek stb.).

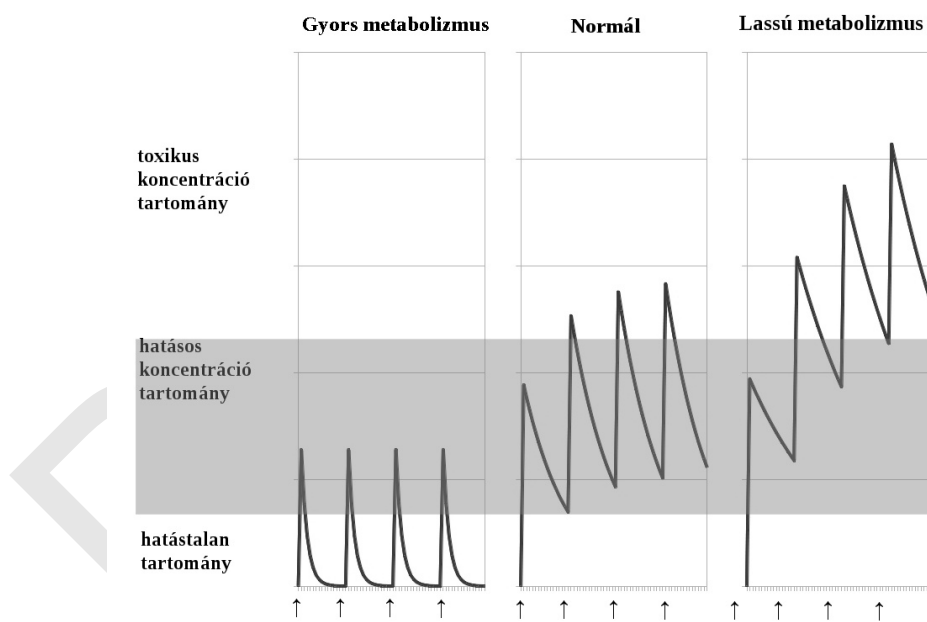
A farmakogenomikai megközelítés arra világított rá, hogy léteznek olyan polimorfizmusok, amelyek nem hozhatók farmakokinetikai vagy farmakodinamikai szempontból közvetlen összefüggésbe a gyógyszerek hatásával, azonban szoros

asszociációt mutatnak azzal. Sok esetben a gyógyszerhatást befolyásoló polimorfizmus nem fehérjét kódoló régióban található.

A gyógyszerek metabolizmusáért felelős enzimek

A szervezetbe *per os* (szájon át), intravénásan, vagy egyéb módon bejutó xenobiotikumokat a májsejtek felveszik és két lépésben kiválasztható formává alakítják. Az első fázis a molekulák oxidációja a citokróm típusú CYP (más néven: P-450) enzimek által katalizált redox reakció segítségével. A második fázisban a hidroxil származék konjugálódik (glükuronsavval, acetáttal stb.).

A humán genomban 56 funkcionális CYP lokusz található, az általuk kódolt enzimek 20 fehérje családba sorolhatók. Az 1-es, 2-es és 3-as típusú kis specifitású CYP enzimek összesen 6 izoformája felelős az orvosi gyakorlatban használt gyógyszerek mintegy 90%-ának biotranszformációjáért. A CYP enzimek lokuszai polimorfak, a CYP2 D6 génnek például 26 főbb és összesen mintegy 70 allélját ismerjük. A különböző allélok által meghatározott enzimek lehetnek inaktívák (az utóbbi esetben 15), csökkent, illetve túlzottan nagy aktivitásúak. Ennek eredményeképpen a páciens lehet az adott gyógyszert gyorsan, normálisan, vagy nagyon lassan metabolizáló.



10-1. ábra

A gyógyszerkoncentráció alakulása a szervezetben különböző metabolikus sebességek mellett

A nyilak a gyógyszer beadásának időpontjait jelzik.

A **gyorsan metabolizálók** esetén a szokásos gyógyszeradagolással nem lehet fenntartani a hatásos koncentrációt a szervezetben, így a kezelés hatástalan marad. A probléma sokkal súlyosabb lehet a **lassan** illetve **nem metabolizálók** esetén, ahol a szokásos adagolás mellett akár súlyos mérgezési tünetek is kialakulhatnak (10-1. ábra). A gyógyszeres kezelés célja a hatásos koncentráció állandó fenntartása a szervezetben, amihez meg kell találni az alkalmazott dózis és a lebontás kinetikájának egyensúlyát.

A második fázis enzimjeit hasonlóan a CYP enzimekhez polimorf lokuszok kódolják. Az UDP-glikozil-transzferáz (*UGT1A1*) enzim az első fázisban hidroxilált xenobiotikumot glikozilálja, így az a vesék által kiválasztható lesz. Az *UGT1A1* gén gyenge promoterral rendelkező 28-as alléljára homozigóta páciensek a daganatterápiában alkalmazott kamptotecint csak lassan képesek lebontani, így nagyobb eséllyel szenvednek el súlyos kamptotecin mérgezést. A tuberkulózis (tüdőgümőkór) gyógykezelésében alkalmazott izonikotinsav-hidrazid (INH) átalakításáért egy N-acetil-transzferáz enzim a felelős (*NAT2*). A nagy *NAT2* aktivitással rendelkező egyének esetén a tuberkulózis kezelése hatástalan a szokásos dózis mellett. A lassú metabolizálók esetén pedig a perifériás idegeket érintő toxicitás alakulhat ki.

Számos gyógyszermolekula hasonlít a szervezet által termelt vegyületekhez. Az ilyen analóg molekulák bontása nem feltétlenül a májban megy végbe, hanem gyakran a vérserumban található enzimek végzik. Az aneszteziológiában izomlazítóként alkalmazott szukcinilkolin az acetilkolin neurotranszmitter molekula analógja. A szukcinilkolin bontásáért a szérumban található butirilkolineszteráz (*BCHE*; más néven: pszeudokolineszteráz) enzim a felelős. Az enzim hiányában a szukcinilkolin altatás után a vesén keresztül nagyon lassan ürül ki a szervezetből, így a légzőmozgást végző izmok nem tudják ellátni a feladatukat, légzésbénulás alakul ki, amely a páciens halálát okozhatja. Az európai populációban a hibás *BCHE* allélra nézve homozigóta egyének aránya kb. 1:3000, az észak-amerikai inuitok között viszont ennek több, mint tízszerese. A viszonylag magas kockázat ellenére a *BCHE* enzimaktivitás vizsgálata a szérumban költséges, tehát nem képezi a rutin vizsgálatok részét. Altatás után az autonóm légzés visszaállásáig a betegeket minden esetben megfigyelés alatt tartják. A DNS szintű vizsgálatok megoldást jelenthetnek a veszélyeztetett lassú metabolizálók kiszűrésére, azonban a molekuláris biológiai módszerek költsége a hatékonyságuk folyamatos növekedése ellenére még túl magas, a rutin aneszteziológia ezért nem alkalmazza.

A gyógyászatban felhasznált vegyületek egy része nem mutat biológiai hatást *per se*. Ezek aktiválásához és a gyógyhatásuk kifejtéséhez a célszervek sejtjeiben, a májsejtokban, enterocitákban, az intersticiális folyadékban vagy a vérplazmában található enzimek szükségesek. Az ilyen készítményeket **prodrug**-nak („előgyógyszer”) nevezzük. (Számos mérgezőanyag pl. a halálos áldozatokat is követelő cianobakteriális toxin, a cilindrospermopsin biológiai aktivitása a máj enzimek hatására alakul ki, tehát ez **protoxin**. Ismerünk olyan vegyületeket is, amelyek önmagukban nem rákkeltők, csak a szervezetben válnak karcinogénné.)

A farmakodinamikai tulajdonságokat befolyásoló gének

Számos olyan polimorfizmus ismert, amely a gyógyszerhatás célpontjait érinti, vagy új célpontok megjelenését idézi elő, így szokatlan mellékhatások kialakulását okozza. A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim (G6PD) X kromoszómához kötődő hiánya nem okoz számottevő tünetet az érintettekben, azonban oxidáló hatású gyógyszerek⁴⁴ és szekunder metabolitok (pl. a *Vicia faba* vagy más néven lóbab oxidáló hatású metabolitjai, de egyes virágpороk nem allergén komponensei) hatására elfogy a vörösvérsejtek NADPH (redukált koenzim) készlete. A NADPH a sejtek redox homeosztázisában kitüntetett szereppel bíró redukálószer, előállításáért a vörösvérsejtekben elsősorban a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz felelős. NADPH hiányában a vvt-k elpusztulnak, hemolízis következik be. A lóbab hatására kialakuló, többek között vesekárosodással is járó tünetegyüttest (favizmus) már az ókorban felismerték. A primaquine (malária gyógyszer) szedése, illetve a lóbab fogyasztása a fentiek alapján ellenjavalt a G6PD hiányban szenvedők esetén.

A gyógyszer-rezisztenciáért felelős polimorfizmus gyakran az adott farmakon célpontját képező fehérje génjében található. Az antikoaguláns warfarin (vérrög képződést gátló szer) esetén a gátlás célpontja – a VKORC1 (K-vitamin epoxid redukáz komplex) – olyan polimorfizmusát figyelték meg, amely hatására háromszorosára nőhet az enzim mennyisége, tehát a hatás eléréséhez növelni kell a gyógyszer-dózist.

A személyre szabott orvoslás

2002-ben mutatták ki, hogy a HLA-B*57:01 allélt hordozók között jóval gyakoribb az abacivir (az AIDS kezelésében alkalmazott reverz transzkriptáz gátló) hatására kialakuló túlérzékenységi reakció. A HLA-B lokusz és az abacivir közötti kapcsolat részletei nem ismertek. A HLA lokuszok szerológiai és PCR alapú analízise a szervátültetések kapcsán az orvosi rutin részét képezi, így a HLA-B*57:01 az abacivir kezelés kimenetelének előzetes megítélését segítő, a valós diagnosztikában alkalmazható marker. A felfedezés tanulsága, hogy nemcsak a gyógyszer metabolizmusában vagy hatásában részt vevő fehérjék génjei segíthetnek hozzá a kezelés prognózisának megítéléséhez, hanem látszólag független markerek is. A napjainkban egyre gyakoribb GWAS tanulmányok (l. 4. és 12. fejezet) lehetővé tehetik számos rutinszerűen vizsgálható marker felfedezését. A jövőben elképzelhető, hogy a páciensek teljes genomszekvenciája ismert lesz, így az összes, a

⁴⁴ Ebbe a körbe tartozik az Aspirin, számos közönséges lázcsillapító stb. A *G6PD*-defektus bizonyos populációkban, pl. Szardínia szigetén, meglehetősen gyakori. Mivel a hemolízist kiváltó hatások elég könnyen elkerülhetők, nem befolyásolja az érintettek életkilátásait. A magas allélgyakoriság miatt hordozó nők és *G6PD*-defektusos férfiak házassága nem ritka, azaz a homozigóta nők is elég nagy számban fordulnak elő az ilyen népességben.

gyógyszerhatással összefüggő polimorfizmus egyszerre vizsgálható. A ritka mellékhatások, túladagolás és egyéb kóros esetek gyakorisága minimalizálható.

Tekintettel a CYP enzimek – relatíve, a szóba kerülő anyagokhoz viszonyított – kis számára és sokoldalú funkciójára, nem meglepő, hogy az egyidejűleg szedett medikamentumok megzavarhatják (kölcsonösen vagy egyirányúan) egymás anyagcseréjét, következésképpen hatását. Ugyanez igaz a szervezetünkbe bekerülő egyéb xenobiotikumokra is: interferálhatnak valamely gyógyszer felvételével, metabolizmusával, azaz hatásával.

Ökogenetika

A szervezetünket az anyaméhben töltött időtől egészen a halálunkig számos környezeti hatás éri (fizikai, kémiai, emocionális stb.) Az ökogenetika tárgya annak megítélése, hogy az örökölhető faktorok milyen mértékben befolyásolják a szervezetünket érő bármilyen mérhető vagy becsülhető – leginkább kémiai – környezeti hatás következményeit. Láttuk a fentiekben, hogy a G6PD defektben szenvedők bizonyos, a környezetükben normálisan megjelenő hatásra ugyanúgy reagálnak, mint egyes gyógyszerekre. Jó példa az *MTHFR* gén. Az embrionális és magzati fejlődés során a tápanyagokhoz, köztük a folsavhoz, a placentán keresztül jutunk. Az *MTHFR* gén hőlabilis mutációja következtében gyakrabban alakulnak ki velőcsőzáródási rendellenességek (pl. nyitott gerinc, *spina bifida*). A folsav enyhe fokú túladagolásával a probléma orvosolható, ez ugyanis a metil tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) aktivitást helyreállítja. A környezeti hatás (az anya vérplazmájának folsav szintje) a génikus különbségek nyomán (*MTHFR* hőlabilis mutáció) eltérő hatást mutat: velőcsőzáródás hibái⁴⁵.

Az ökogenetikai (és ökogenomikai) ismeretek lehetővé teszik az egyén környezetének (élelmiszerek, gyógyszerek, kozmetikumok stb.) a genetikai sajátságok figyelembevételével történő kialakítását (akár már az anyaméhben), hogy a lehető legkisebbre csökkenjen a külső hatások nyomán kialakuló egészségkárosodás esélye (lásd még: familiáris hiperkoleszterinémia). **A folsavra vonatkozó tapasztalatok alapján ma igen határozottan javallják ennek (és vele más vitaminoknak) magzatvédő vitaminként való adagolását a megfogás előtt 3 hónappal kezdett és a várandósság ideje alatt végig folytatott kúrában.**

Tekintettel genomunk egyediségére, nem meglepő, hogy egy-egy környezeti xenobiotikum, ami szoros kapcsolatba kerül szervezetünkkel (élelmiszer színezék, egyéb élelmiszer adalék, kozmetikum, növényvédőszer stb.), ha egyáltalán okoz valamilyen káros/kóros tünetet, az csak olyan csekély számú egyénben, ami már észrevétlen marad a népességben.

⁴⁵ Az MTHFR tulajdonképpen a homocisztein→metionin átalakulás kulcsenzime. A homocisztein erős mérég, jóllehet a szervezetünkben képződik. Számos anyagcsereút megzavarására képes.

11. fejezet

Rosszindulatú daganatok génikus háttere

Jó- és rosszindulatú daganatok

A daganatos megbetegedések csoportja a fejlett országokban a második leggyakoribb halálok, csak a kardiovaszkuláris betegségek előzik meg (mint a szívinfarktus és a stroke [„gutaütés’’]). A rosszindulatú daganatok, kialakulásuk és kórlefolásuk kiszámíthatatlansága miatt rengeteg megalapozott és megalapozatlan félelmet, tévhitet szülnek a laikus közvéleményben. A daganatkutatás az orvosbiológia fejlődésének egyik fő mozgatórugója, a sejtek daganatos elfajulásának megelőzése vagy hatékony, mellékhatások nélküli kezelése az elméleti orvostudomány „Szent Grálja”.

Először tekintsük át az e fejezetben használt alapfogalmakat! Azon sejthalmazokat, amelyeket szabálytalan sejtszaporulat hoz létre, **daganatnak** vagy **tumornak** (alkalmasint **neoplazmának**) nevezzük.

A **jóindulatú** (benignus) daganatok olyan sejtekből állnak, amelyeknek osztódási képessége korlátozott, a tumor lehatárolt marad, nem tör át a környező szövetekbe, és nem képez áttétet a szervezet távolabbi pontjain. (Ám ettől még fenyegetheti a beteg életét, ha pl. a koponyaüregben növekszik, vagy elzár egy fontos eret.)

A **rosszindulatú** (malignus) daganatok növekedésének elvileg nincsenek korlátai, képesek áttörni a szövetek közti határokat, valamint távoli áttétet (**metasztázist**) létrehozni. A hámeredetű malignus tumorokat **ráknak** nevezzük. A rosszindulatú daganatok egyrészt a szövetek közvetlen, fizikai károsítása, másrészt az általuk termelt anyagok révén lerontják a szervezet állapotát, kezeletlenül (de gyakran megfelelő kezelés mellett és ellenére is) halált okoznak.

A daganatképződés folyamata genetikai szempontból

A daganat egyetlen, mutációt szenvedett sejtől indul ki, amely szinte korlátlan osztódó képességre tesz szert: ezt **daganatos transzformációnak** nevezzük. (Arról, hogy mely génekben bekövetkezett mutáció készítheti osztódásra a sejtet, az alábbi alfejezetekben írunk részletesebben.) A legtöbb így keletkezett túlszaporodó sejt azonban elpusztul az immunrendszer közreműködésének köszönhetően.

Ahhoz, hogy a transzformált sejt életben maradjon, és végül betegséget okozzon a szervezetben, számos feltételnek kell megfelelnie. Képesnek kell lennie az immunrendszer „kijátszására” (pl. a 4. fejezetben említett **HLA antigének** kifejeződésének gátlása révén), erek képződését kell indukálnia, amelyek ellátják oxigénnel és tápanyagokkal a tumorszövetet, valamint át kell törnie a szövetek termé-

szetes határait, hogy először helyileg, majd a nyirok- és vérkeringésbe jutva a szervezet távolabbi pontjain is áttéteket képezzen.

Míndez a daganatos szövet szempontjából lényegében nem más, mint **adaptáció** a környezethez: az immunrendszerével védekező emberi test nyújtotta mostoha körülményekhez. Az adaptáció, ahogy az evolúcióban általában, itt is **mutáció** és **szelekció** révén valósul meg. A daganatos sejtek genomja rendkívül labilis: átrendeződések, kromoszomális és génszintű mutációk sokasága alakul ki bennük. Ezen eltérések többsége káros a sejtre nézve, gyakran el is pusztítja azt. A szelekció azonban „kiválasztja” azt a néhány sejtet, amelyek számukra előnyös mutációk estek át: ezek hatékonyabban osztódnak, nehezebben elpusztíthatók, így hamar többségbe kerülnek a daganatos szövetben, és a következő fázisban már az ő mutáns genomjuk képezi a kiindulópontot, amelyet újabb mutációk és egyéb változások színeznék majd tovább. Nem véletlenül hasonlítottuk tehát e folyamatot az evolúcióhoz: a kétségtelen párhuzam miatt a daganatok kifejlődésének jellemző lefutása a **klonális evolúció** nevet kapta. (**Daganatos klónnak** az eredeti, mutációt szenvedett sejt utódait tekintik.)

A sejtciklus kontrollja

Ahhoz, hogy megértsük, mit jelent a daganatos transzformáció, meg kell vizsgánunk, milyen kontroll alatt áll a sejtciklus az egészséges sejtekben. (Magával a sejtciklus menetével, fázisaival kapcsolatban az 1. fejezetben találunk bővebb információt.)

Azon tényezőket, amelyek előremozdítják a sejtciklust, ezáltal a sejteket **osztódásra készítetik**, vagy a már beindult sejtosztódási folyamatban látnak el fontos funkciót, összefoglaló néven **protoonkogénként** ismerjük. A protoonkogéneknek számos csoportját különböztetjük meg: ide tartoznak a növekedési faktorok és azok receptorai, jelátviteli fehérjék, protein kinázok, valamint az ún. **ciklinek** és **CDK-k**. E fejezet keretein belül az utóbbi két csoportról szólunk részletesebben.

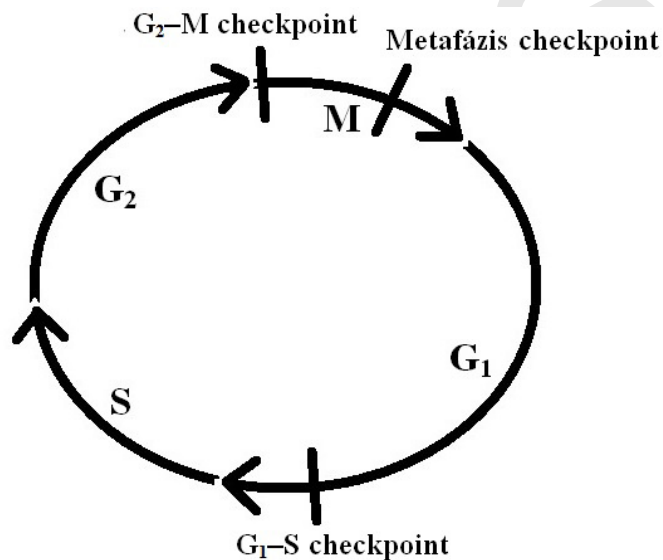
A ciklinek a sejtciklust szabályozó fehérjecsald; eredetileg azért kapták ezt az elnevezést, mert **koncentrációjuk oszcillál**, vagyis jellemző mintázat szerint emelkedik és süllyed a sejtciklus egyes fázisaiban. Aszerint sorolják őket osztályokba, hogy mely fázisban látják el feladatukat: beszélhetünk pl. G₁-, G₁-S-, S- és M-ciklinekről.

A CDK-k, vagyis **ciklin-dependens kinázok** elnevezése egyúttal tájékoztat is a legfontosabb tulajdonságaikról. Egyrészt kinázokról van szó, tehát olyan **enzimekről, amelyek foszforilálják célmolekuláikat** (itt és most fehérjéket), másrészt pedig, noha önmagukban inaktívak, a ciklinekhez kötődve aktívvá válnak, így a **ciklinek koncentrációja** közvetlenül szabályozza a **CDK-k aktivitását**. (A CDK-k aktivitása ennek köszönhetően ciklikus, míg koncentrációjuk – a ciklinekével szemben – állandónak tekinthető.)

A sejtciklus egyes szakaszaiban az adott fázisnak megfelelő **ciklin-CDK komplexek** alakulnak ki, hogy különböző fehérjék foszforilációja révén elősegítsék a fázisra jellemző folyamatokat. Az S-ciklin és S-CDK egyesüléséből kelet-

kező komplex az ún. preiniciációs komplexet hozza létre, amely elengedhetetlen a helikáz és a DNS-polimeráz működéséhez, ezáltal a **DNS replikáció** előfeltétele. Az M-ciklin és az M-CDK komplexe pedig a **mitózis** folyamatát vezérli azáltal, hogy többféle fehérjét foszforilál a kromoszómákban, a magburokban, valamint az oszlási orsót létrehozó mikrotubulusokhoz asszociáltan.

Természetesen a sejtciklust előremozdító tényezők mellett szükség van ezzel ellentétes, gátló szabályozásra is. **Tumorszuppresszor**nak nevezzük mindazon faktorokat, amelyek **leállíthatják a sejtosztódást**, ha valamilyen körülmény nem megfelelő. A tumorsuppresszorok a sejtciklus különböző fázisaiban, ún. **ellenőrzési pontokban** (angolul *checkpoint*) vizsgálják meg, hogy minden feltétel teljesül-e ahhoz, hogy a sejt megkezdje, ill. folytassa az osztódást (11-1. ábra). Ha hibát találnak, beindíthatják a DNS javítását, vagy ha ez nem lehetséges, **apoptózist** (génikusan programozott sejthalált) indukálhatnak, hogy megelőzzék a sejt daganatos elfajulását.

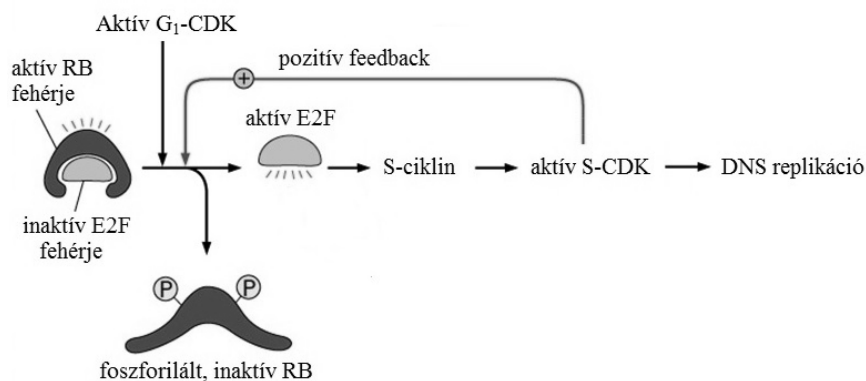


11-1. ábra

Az ellenőrzési pontok elhelyezkedése a sejtciklus egyes fázisaiban

A G₁-S ellenőrző pontban dől el, hogy a sejt osztódni kezdjen-e, vagy maradjon a nyugalmi, ún. G₀ fázisban. (Ennek fő meghatározói pl. a szőben forgó sejt típusa, valamint a külső körülmények.) A G₂-M ellenőrző ponton a sejt többek közt azt ellenőrzi, hogy a DNS replikációja megfelelően megtörtént-e az S fázisban, míg a metafázis checkpointban azt, hogy minden kromoszóma kapcsolódik-e az oszlási orsóhoz (ha igen, megkezdődhet az anafázis).

A tumorszuppresszorok közé is számos különböző gént, ill. azok fehérjetermékeit sorolja a szakirodalom. Ide tartozik pl. a **retinoblasztóma protein**, rövidítve **RB** (11-2. ábra).



11-2. ábra

Az RB fehérje funkciója (némileg leegyszerűsítve)

A fehérje inaktív állapotban tartja az E2F-et, ezáltal nem engedi továbblépni a sejtet az S fázisba. Amikor eldőlt, hogy a DNS replikáció meg fog történni, aktív G₁-CDK jelenik meg a sejtben, amely foszforilálja, ezáltal inaktíválja az RB-t, így az E2F szabaddá válik, és kiváltja az S-ciklinek koncentrációjának emelkedését. Ezáltal aktív S-CDK képződik, amely egyrészt a DNS replikációt vezérli, másrészt pozitív visszacsatolás révén még több RB-t inaktívál.

Egy másik jól ismert tumorszuppresszor a **p53**. E fehérje legfontosabb feladata, hogy még az S fázis előtt **leállítsa a sejtciklust abban az esetben, ha a sejt DNS-e sérült** (hiszen a sérült DNS replikációja kiszámíthatatlan eredménnyel járna, pl. daganatos sejtburjánzáshoz vezethetne). A DNS törése esetén a p53 foszforilálódik, így aktívvá válik, az aktív p53 pedig **transzkripciós faktorként** működve képes egy másik gén, a **p21 promoteré**hez kötődve beindítani annak transzkripcióját. (A transzkripciós faktorokról és a promoterekről bővebben l. a 7. fejezetet.) Az így képződő p21 képes megkötni az aktív G₁-S- és S-CDK-kat, ezáltal inaktíválni őket és megakadályozni, hogy a DNS replikáció bekövetkezzen.

Mutációk a daganatos transzformáció hátterében

A protoonkogének és a tumorszuppresszor gének egyaránt sokféle mutációt szenvedhetnek el, a pontmutációktól kezdve a fénymikroszkópban is látható kromoszóma – számbeli és strukturális – aberrációkig. (A génikus változások spektrumáról részletesebben olvashatunk a *Mutáció* című fejezetben.) Szintén e fejezetet utalunk a **funkciónyerés** és **funkcióvesztés** mutációk fogalmát illetően.

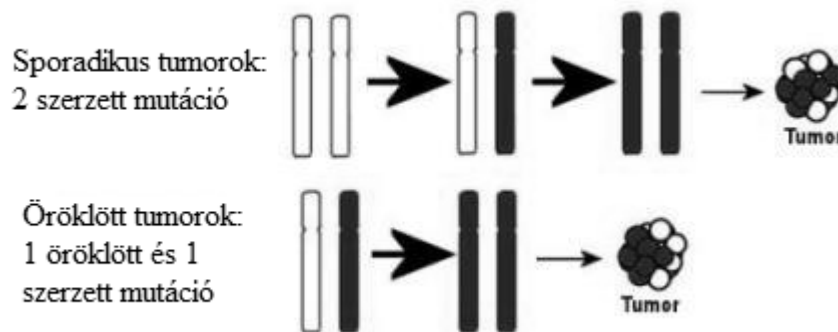
Egy protoonkogén túlműködése vagy funkcióyeréses mutációja esetén onkogénről beszélünk. **Onkogénnek** olyan mutáns gént (ill. fehérjét) nevezünk, amely kontrollálatlan sejtosztódást vált ki, szemben az onkogén vad típusú alléljával, a protoonkogénnel, amely szabályozható módon mozdítja előre a sejtciklust.

E fontos különbség háttérben többfajta genetikai eltérés húzódhat meg. Elképzelhető pl., hogy a mutáns enzim olyan szubsztráttal is rendelkezik, amivel a vad típusú változat nem (funkcióyeréses mutáció), de előfordul a szabályozó elemek hibája is, amely túlzott expresszióhoz vezet, ezáltal jóval több fehérje képződhet, mint amennyit a *checkpoint*-rendszer inaktíválni képes. Egy másik lehetőség, hogy **transzlokáció** révén fúziós gén jön létre, amely már onkogén-tulajdonságokkal rendelkezik. Jó példa erre a krónikus mieloid leukémiákban (CML) leírt ún. **Philadelphia-kromoszóma**: a 9-es és a 22-es kromoszóma közötti reciprok transzlokáció megtöri a 22-es kromoszómán található *ABL*, valamint a 9-es kromoszómán lévő *BCR* protoonkogének szekvenciáját. A létrejövő fúziós gén nem tartalmazza a regulációs régiót, ám megőrzi az enzimaktivitásért felelős szakaszt, vagyis a *BCR-ABL* onkogén egy állandóan működő enzim, amit az érintett sejt nem tud „kikapcsolni”, így a sejtciklus megállíthatatlanul folytatódik, ez pedig végül leukémiához vezet.

A tumorszuppresszorok funkcióvesztéses mutációja is daganatot eredményezhet, azonban (legalábbis a klasszikus modell szerint) ehhez **mindkét kópiának ki kell esnie**, hiszen egyetlen működő allélról is elegendő tumorszuppresszor fehérje termelődik ahhoz, hogy el tudja látni a funkcióját. Természetesen elképzelhető a tumorszuppresszorok túlműködése, valamint a protoonkogének funkcióvesztéses mutációja is, azonban ezeknek nincs gyakorlati jelentősége, hiszen nem vezetnek tumor kialakulásához (pusztán azt eredményezik, hogy az adott sejt, amiben a mutáció kialakult, képtelen lesz az osztódásra).

A rák, mint öröklődő betegség

Régi megfigyelés, hogy a **sporadikus** (szórványos, családi előzmény nélkül jelentkező) rákos megbetegedésekkel szemben bizonyos daganatok halmozottan fordulnak elő egyes családokban, ami arra utal, hogy **a daganatképződésre való hajlam öröklhető**. Kiderült, hogy az esetek jelentős részében egy tumorszuppresszor mutációja felelős a jelenségért. A heterozigóták, akik egy vad típusú és egy mutáns kópiát hordoznak egészségesek, ám a mutáns allélt örökíthetik az utódaikra. Ha a heterozigóta utód valamely sejtjében mutációt szenved a megmaradt kópia (ez a **heterozigótaság elvesztése**), akkor daganat fejlődhet ki. 1971-ben Knudson írta le az ún. „kétütéses hipotézist” (*2-hit hypothesis*) a gyermekkori retinoblasztómára (11-3. ábra). Lehet persze daganatos a hibás allélt örökítő szülő is.



11-3. ábra

A „kétütéses” hipotézis

Retinoblasztóma akkor alakul ki, ha az *RB* tumorszuppresszor mindkét kópiája mutációt szenved (az ábrán a fehér oszlopok jelzik a működő, míg a feketék a mutáns kópiákat). Ahhoz, hogy sporadikus tumor alakuljon ki olyan személyben, aki 2 egészséges alléllal rendelkezik, ugyanazt a sejtet legalább 2 „találat” kell érje, inaktíválva mindkét *RB* kópiát. Ha a személy az egyik mutáns kópiát örökölte, akkor az minden diploid sejtjében jelen van, így a retina bármely sejtjét érő egyetlen „találat”, amely „kiüti” a maradék *RB* allélt ($RB \rightarrow rb$), elegendő a tumor megjelenéséhez.

A retinoblasztóma mellett más daganatos betegségekről is tudjuk, hogy öröklődhetnek (11-1. táblázat).

Mutációk szerepe a daganatkeletkezésben népegészségügyi nézőpontból

Amint a *Mutáció* című fejezetben láttuk, ha **ionizáló sugárzás**ról van szó, elméletileg akár egyetlen részecske is változást idézhet elő a DNS-ben, ezáltal daganatkeletkezés kiindulópontja lehet. Ahogy fent utaltunk rá, éppen e miatt a véletlenszerűség miatt annyira félelmetes betegség a rák. Ugyanakkor a természetes sugárforrások (pl. a talaj vagy a kozmikus sugárzás) a legtöbb esetben nem jelentenek komoly kockázati tényezőt. Lássuk tehát, milyen fő okai lehetnek a daganatos betegségek kialakulásának.

Az ionizáló sugárzásoknál maradv, jól ismert pl. a **röntgensugarak**nak kitett egészségügyi dolgozók fokozott daganatos kockázata, valamint a bőrrák egyre magasabb incidenciája annak köszönhetően, hogy az ózonréteg elvékonyodása miatt egyre több, a Nap felől érkező **UV-sugár** éri el a földfelszínt.

Legalább ugyanilyen jelentős a vegyi anyagok szerepe a daganatbiológiában. Azon anyagokat (ipari és mezőgazdasági vegyszereket, a mindennapi életben használt cikkeket, valamint gyógyszereket), amelyek a kromoszómákhoz kötődve durva szerkezeti változást vagy pontmutációt okozhatnak, **mutagének**nek nevezük. Ezzel összefüggő fogalom a **karcinogén**: ezt olyan anyagokra használjuk, amelyek daganatot okoznak. Az egyes anyagok mutagenitása és karcinogenitása

legtöbbször összefüggést mutat, bár nem minden karcinogén mutagén is egyben (egyes karcinogén vegyületek nem okoznak változást a DNS-ben, hanem a sejtosztódást serkentik, ez pedig ugyancsak daganathoz vezethet).

11-1. táblázat

Néhány daganatos kórkép, amelyeknek (legalább részben) ismerjük a genetikai hátterét

<u>Klinikai kép</u>	<u>Felelős gén(ek) neve</u>	<u>Felelős gén(ek) funkciója</u>
Li-Fraumeni szindróma (hajlam számos tumorra)	<i>p53</i>	Tumorszuppresszor, transzkripciós faktor
Emlórák	<i>BRCA1, BRCA2</i>	Tumorszuppresszor, DNS repair
Retinoblasztóma	<i>RB</i>	Tumorszuppresszor, sejtciklus-regulátor
Xeroderma pigmentosum (hajlam bőrrákra)	<i>XPA, XPB, XPD</i> stb.	DNS (excíziós) repair
Melanoma malignum	<i>p16</i>	Tumorszuppresszor, CDK-gátló
Familiáris adenomatózus polipózis (kezdetben jóindulatú vastagbél-tumorok)	<i>APC</i>	Tumorszuppresszor, jelátviteli fehérje

Olyan vegyi anyagokat is ismerünk, amelyek önmagukban ugyan nem okoznak mutációt, ám más anyagokkal együttműködve megnövelik a daganatok kialakulásának veszélyét: ezek a **komutagének**. Ebbe a csoportba tartozik pl. a **koffein**, amely a nukleotid-excíziós repair gátlása révén megnehezíti a DNS-ben képződő hibák kijavítását, így ha olyan mutagénnel együtt van jelen, amely nukleotidcserét okoz, akkor fokozottan magas daganatos kockázattal kell számolnunk.

A daganatokkal összefüggésbe hozott életmódbeli és környezeti tényezőket még egy vastkos jegyzetben is lehetetlen lenne a teljesség igényével tárgyalni. A **dohányzásról** köztudott, hogy elsődleges szerepe van a légzőszervi, szájüregi, garat- és nyelöcső- valamint egyéb rákok kialakulásában. Az **alkoholfogyasztás**-nak a májtumorok mellett a szájüregi és gégedaganatokban is szerepet tulajdo-

nítanak. Jól ismert a levegő-, víz- és talajszennyezés, a táplálkozási tényezők, valamint a munkahelyi környezet jelentősége is; leírták pl. az ételben előforduló penészgombák (ill. az általuk termelt aflatoxin) és a májrák, a kipufogógázok és a tüdőrák, a túlfinomított cukrok és a vastagbélrák összefüggését, valamint az arzén-nel dolgozók bőrrákját, bizonyos kőolajipari üzemek alkalmazottainak hasnyálmirigyrákját, és műanyaggyárak munkásainak májdaganatát.

11-2. táblázat

Rákkeltő vírusok és az általuk okozott fertőzések, daganatok
Maguk a vírusok többnyire igen gyakoriak, ám szerencsére ritkán okoznak rákos megbetegedést.

<u>Vírus</u>	<u>Fertőző betegség</u>	<u>Daganat</u>
HPV (humán papillómavírus)	Papillóma (vírusos szemölcs)	Méhnyakrák
Epstein-Barr vírus	Mononucleosis infectiosa	Burkitt-limfóma, nazofaringeális rák (az orrgarat rákja)
Hepatitisz B vírus	Fertőző májgyulladás	Májrák
Adenovírus	Nátha, hörghurut	Adenokarcinóma (a mirigyhám rákja)

Bizonyos esetekben **vírusfertőzés** is eredményezhet daganatos elváltozást. A korábbi alfejezetekben részletezett protoonkogének, amelyek mutációt szenvedve onkogénné alakulhatnak, a **sejt saját génjei**, ezért **celluláris** protoonkogénnek nevezzük őket (a belőlük létrejött onkogéneket pedig **celluláris onkogén**nek). Vírusfertőzés esetén azonban e protoonkogének másolata beépülhet a vírus genomjába, ahol vagy mutációt szenved, vagy olyan szabályozó elemhez kapcsolódik, ami sejtbe kerülve megnöveli az expresszióját. Ekkor beszélünk **virális onkogén**ről, amely minden sejtbe bejut, amit az adott vírus megfertőz, és a gazdasejt daganatos transzformációját okozza. Néhány ismertebb, vírusfertőzéshez köthető daganatról tájékoztat a 11-2. táblázat.

Genetikai módszerek a tumorok diagnosztikájában és kezelésében

A múltban a **citogenetikai eljárások** jelentették az egyetlen lehetőséget a daganatos sejtek genomi változásainak vizsgálatára; a transzlokációk és más rendellenességek kimutatásának ma is nagy jelentősége van a daganatok elkülönítésében, a megfelelő terápiás protokoll kiválasztásában (pl. a leukémiák esetében).

Ma már lehetőség van az öröklődő mutációk közvetlen kimutatására: a legbiztosabb a kérdéses tumorszuppresszor gének **szekvenálása**, azonban ez a módszer egyben a legidőigényesebb és a legköltésesebb is. A gyakorlatban sok esetben jó eredményt lehet elérni a gyakoribb mutációk tesztelésével, pl. *microarray* vagy allélspecifikus oligonukleotidok használatával. (E módszerekkel kapcsolatban a 12. fejezetre utalunk.)

A daganatok jó része jellegzetes „**génexpressziós aláírás**”-sal rendelkezik: a tumorban kifejeződő gének mintázata segíthet elkülöníteni olyan altípusokat, amelyek mind klinikailag, mind szövettanilag hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, ám eltérő a prognózisuk, esetleg másfajta kezelést igényelnek. E célra egyre szélesebb körben alkalmazzák a qPCR-t, valamint a *microarray*-t.

Újabbban nem csak a különféle génekről átíródó mRNS-ek, hanem a miRNS-ek (mikro-RNS-ek) expressziós mintázatát is vizsgálják bizonyos daganatokban. A mutációk és a génexpressziós jellemzők együttese adja meg a daganat **molekuláris profilját**.

A molekuláris biológia új eredményei a **daganatok kezelésében** is változást hoztak. A hagyományos sebészi, valamint radio- és kemoterápiás eljárások mellett egyre több rosszindulatú tumornál próbálják ki pl. az **RNS interferencia** módszerét. Ennek lényege, hogy olyan egyszálú RNS-t visznek be a sejtekbe, amely komplementer egy átíródó mRNS-sel, így kétszálúvá teszi azt. Mivel a kétszálú RNS nem transzlálódik, ezáltal megszüntethető a célpontként kiválasztott gén (pl. egy onkogén) expressziója. Noha az eljárás még gyerekcipőben jár, a kezdeti eredmények okot adnak a bizakodásra.

DUPress

12. fejezet

Molekuláris genetikai módszerek és alkalmazásuk

A molekuláris genetika forradalma napjainkban zajlik

Jelen fejezetben röviden ismertetjük a molekuláris biológia alapvető technológiai eszköztárát. Vázoljuk, mely módszerek, technikák használatosak az alap, ill. az alkalmazott genetika területén. A genomikai medicina taglalása mellett érintőlegesen szót ejtünk olyan divatos fogalmakról is, mint a személyre szabott orvoslás (*personalized medicine*) kapcsán felmerülő „biomarker vadászat”, amely napjainkban – a bizonyítékokon alapuló orvoslás mellett – egyre hangsúlyosabb szerephez jut. Ezt a fajta paradigmaváltást ugyancsak a tudomány és technológiai fejlődés iniciálják, ám a hozzá fűzött remények ellenére fokozott aggodalom és etikai dilemmák is kísérik.

Rekombináns DNS technológiák, „genetic engineering”

Számos fontos felfedezésnek hála, rendkívül gazdag a rekombináns DNS technológia arzenálja. Nincs olyan terület (sem az alap, sem pedig az alkalmazott kutatás, ill. a gyakorlati klinikai medicina területén), ahol ne vennénk hasznát. Gondoljunk csak a rekombináns fehérjék orvosi alkalmazásaira; immunválaszt kiváltó vakcinák, rekombináns ellenanyagok, immunmoduláns hatású készítmények előállítására. Ugyancsak példaként említhetjük a rekombináns hormonok géntechnológiai előállítását (inzulin, szomatosztatin), számos növekedési, véralvadási faktor, interferonok ipari előállítását.

Molekuláris klónozás során különböző eredetű DNS molekulákat szabdalunk szét, illesztünk össze és az ily módon kapott, tetszőleges DNS molekulákat sokszorosítjuk fel élő organizmusok, legtöbbször baktériumok (pl. *Escherichia coli*) közreműködésével. Azokat a gazdaszervezeteket, amelyeknek az idegen eredetű DNS már szerves részét képezi, *rekombináns organizmusoknak* hívjuk. A bejuttatott nukleinsav integrálódhat a genomba, lehet plazmidon kódolt, de mindenképpen fennmarad és a gazdaszervezet replikációja mellett sokmilliószorosára szaporodik. (Transzgénikus állatok, növények, mikroorganizmusok.)

Nem tévesztendő össze természetesen ez a fajta klónozás a különböző sci-fik témájául szolgáló, vagy a mindenki számára jól ismert, híres Dolly bárány klónozásával. Ez utóbbi esetben sejtmagtranszferrel egész szervezetet klónoztak, míg a molekuláris genetikai laboratóriumokban végrehajtott, etikailag teljesen rendben levő klónozás élő sejtek, szervezetek molekuláris klónozással létrehozott homógen populációját jelenti, amelyek egyetlen közös őst leszármazottjai (klonális szaporodás).

dás) – eltekintve természetesen a véletlenül keletkező mutációktól –, génikusan identikusak, tehát egymásnak tökéletes másolatai/klónjai.

Restriktív enzimek alkalmazása nélkül elképzelhetetlen a génszűrés, a géntechnológia. Természetes formában ezek az enzimek kizárólag baktériumokban és kék-algákban fordulnak elő. Céljuk az idegen, a sejtekbe bejutó DNS (pl. fág) felismerése és eliminálása.

A II-es típusú restriktív endonukleázok egyedi, 4-8 bp hosszúságú szekvenciákat ismernek fel rendkívüli specificitással, melyek igen nagy része palindrom (mind-két szálon 5'→3' irányban olvasva ugyanazt a bázissorrendet adja, l. még 4. fejezet). A hasítás eredményeként tompa, ill. ragadós (kohéziós) végek keletkeznek. Tompa vég csak tompa véggel illeszthető össze, míg a ragadós végek csak komplementer ragadós végekkel (12-1. ábra).

A kereskedelmi forgalomban elérhető restriktív enzimek száma több ezerre becsülhető. Egyszerű használhatóságuk, olcsó, könnyű, ill. gyors hozzáférhetőségüknek köszönhetően felhasználásuk rendkívül széles palettán mozog.

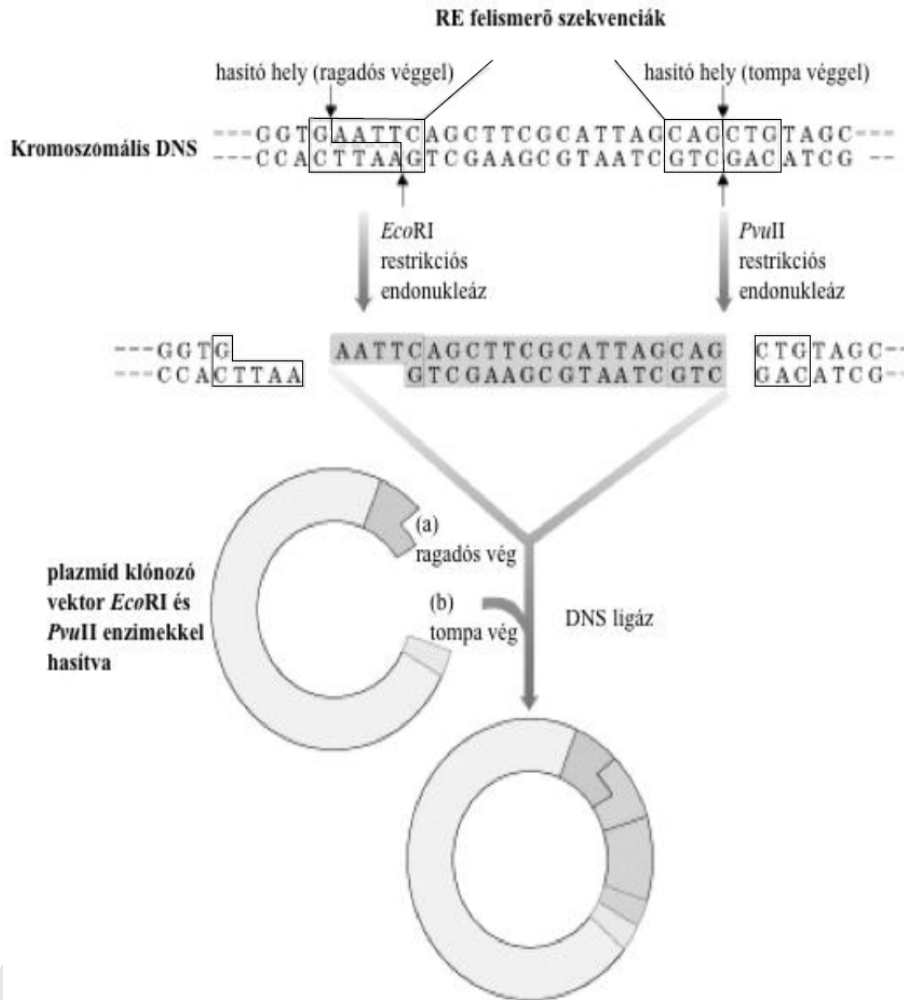
A **hordozó vektorok** lehetnek kis, ill. nagy kópiaszámúak, olyanok, amelyek képesek a genomba integrálódni, míg mások nem. Végző célunktól függően megkülönböztetünk **klónozó** ill. **expressziós vektorokat**.

Ez utóbbiak, a génműködést pozitívan, ill. negatívan (esetleg mindkettő) szabályozó regulatorikus elemeken kívül tartalmaznak olyan genetikai elemeket, amelyeket felismer a gazdaszervezet transzkripció (erős, ill. gyenge bakteriális promóter és transzkripció terminátor szakasz) és fehérjeszintetizáló („Shine-Dalgarno” szekvencia, amely az mRNA riboszómához való kötődését biztosítja) apparátusa, ezáltal képesek idegen géntermékek nagy mennyiségű előállítására. (Pl. gyógyászatban használt nagymennyiségű, rekombinánsan előállított inzulin, növekedési-, véralkalmazó faktorok stb.)

Minden fajta vektor közös jellemzője, hogy cirkulárisak, kettőszálú, önálló replikációra képes DNS molekulák. Replikációs origójuk „ori”, e mellett rendelkeznek továbbá egy mesterségesen létrehozott, ún. **poliklónozó régióval**, amely egyszerre több restriktív enzim (lásd alább) számára tartalmaz felismerő helyet. Megkülönböztetünk csak bakteriális, ill. eukarióta vektorokat, de léteznek ún. Ingázó (*shuttle*) vektorok is, amelyek baktériumokban (pl. *E. coli*) és eukariótákban (pl. élesztők) egyaránt képesek fennmaradni és replikálódni. A közönséges pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) könnyen tenyészthető mikroorganizmus, ideális választás eukarióta fehérjék termeltetésére, hiszen benne mind az intronkivágás, mind pedig a hnRNA átszabási folyamatok végbemennek, amelyek prokariótákban nem.

Mivel mind a transzformáció, mind pedig a különböző eredetű DNS molekulák összeillesztésének hatékonysága meglehetősen alacsony, hiszen az esetek nagy részében a plazmid idegen DNS beépülése nélkül záródik gyűrűvé, ezért gondoskodni kell a **megfelelő szelekcióról**. Szelekciós lehetőség számos létezik. Előszórással használtak az antibiotikum rezisztencia gének; ampicillin (*amp^R*), ill. tetraciklin (*tet^R*), amelyek megléte és kifejeződése esetén csak azok a gazdasejtek képesek az antibiotikum tartalmú táptalajon túlélni és szaporodni, amelyek fel-

vették a hordozó vektort (**pozitív szelekció**). Inszerciós inaktiválás esetén pedig éppen a marker gént szakítjuk meg.



12-1. ábra

Egyik végén „ragadós”, másik végén tompa DNS plazmidba építésének sémája

Molekuláris klónozás(ok)kor a megfelelő orientáció biztosításának több módja is ismert. Ilyen az itt bemutatott *forced-cloning*.

A módszer továbbfejlesztett változata az ún. negatív szelekció (12-2. ábra), amelyben két antibiotikum rezisztencia gén szerepel. Az egyik marker aktivitásával azokat a klónokat jelöli, amelyek felvették a plazmidot, míg a másik inaktivitással pedig azokat, amelyek rekombináns plazmidokat tartalmaznak. Azaz: az idegen DNS beépült a rezisztencia génbe és azt megszakítva inaktiválta.

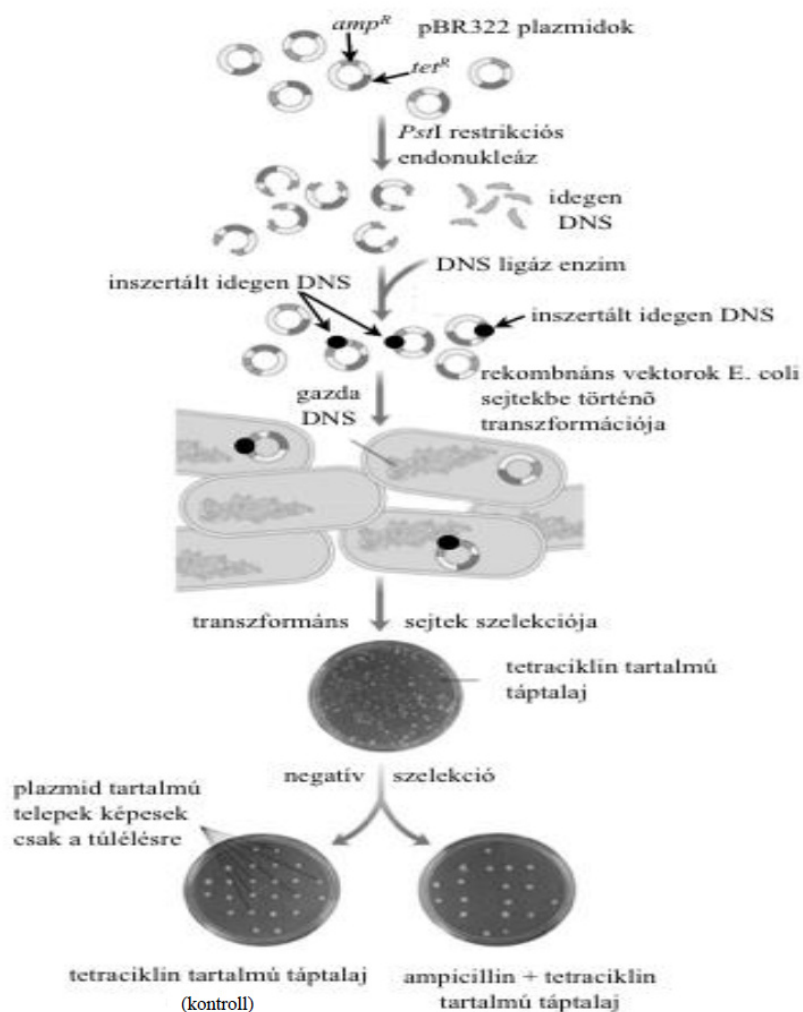
Teljes genom szekvenálások alkalmával elengedhetetlen a genomot tartalmazó molekuláris klóntár készítése, de egy génkönyvtárnak számos más esetben is hasznát vehetjük, lévén, hogy baktériumsejtek millióiból áll, ahol minden egyes klón külön DNS darabot (genomiális DNS, komplementer DNS) hordoz (12-2. ábra). Amennyiben genomiális DNS könyvtárak esetében, az adott faj genomjának minden részlete legalább egyszer képviseltetve van valamely klónban, akkor az adott könyvtárat teljesnek tekintjük.

Az első genomiális könyvtár 1974-ben készült, amely közel 2000, egyedi klónból állt és az *E. coli* génjeit tartalmazta. Mivel plazmidokban a klónozható DNS fragmentek mérete meglehetősen kicsi, ezért a klónozást inkább bakteriofágok (az *E. coli*t fertőzni képes lambda fág vektor és származékai) esetenként mesterséges kromoszómák (baktérium BAC, élesztő YAC⁴⁶) közreműködésével végzik. A génkönyvtárak *screenelése*, azaz adott nukleinsav tartalmú rekombináns klónnak a több ezer többi közül kiválasztása leginkább ahhoz hasonlítható, mint amikor tűt keresünk a szénakazalban.

A kiválasztásnak több módja is ismert. Az egyik leggyakrabban használt módszer a hibridizációs technika, amely azon az egyszerű törvényszerűségeen alapul, hogy komplementer nukleinsavak (DNS, RNS) a Watson-Crick bázispárosodás törvényei alapján nagy specificitással képesek egymáshoz kötődni (12-3. ábra).

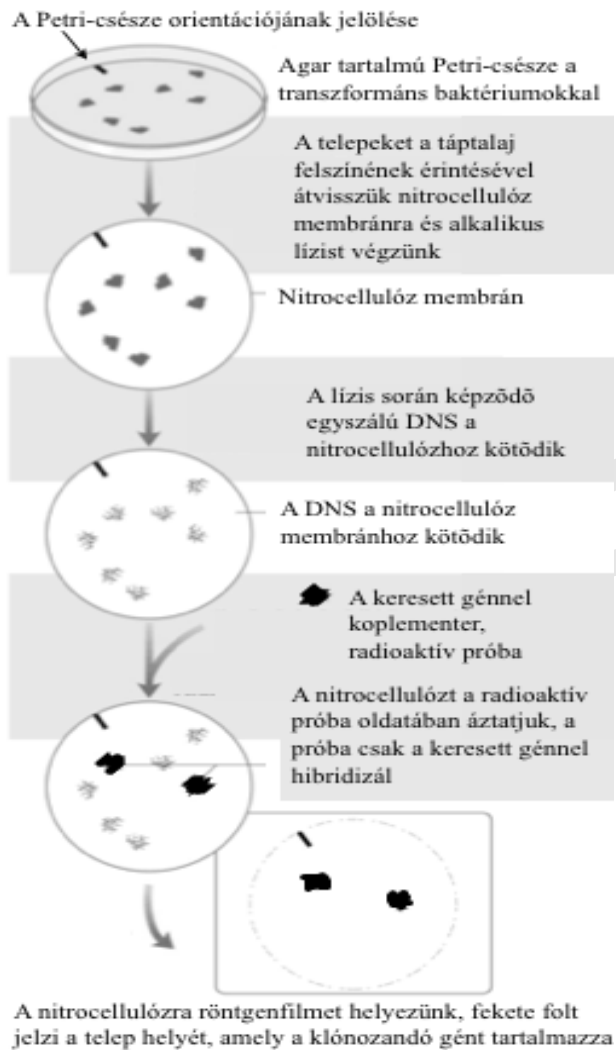
Az eukarióta gének nagy része intronális szakaszokat tartalmaz, hozzájuk képest az exonok a gének teljes szekvenciájának csak kis százalékát teszik ki. Ahhoz, hogy eukarióta géneket prokarióta sejtekben klónozhassunk, majd a klónozott géneket kifejeztethessük, és a génterméket általuk nagy mennyiségben előállíthassuk, szükséges, hogy a nem kódoló, intronális szakaszokat eltávolítsuk. Ehhez először mRNS-t izolálunk a homogenizált sejt- vagy szövettenyészetből és azt reverz transzkriptáz enzimmel cDNS-sé írjuk át. Az izolált mRNS populációt reverz transzkriptázzal kezelve először RNS-DNS hibrid molekulát kapunk, majd pedig az RNS leemésztése után visszamaradt egyszálú DNS-t DNS polimeráz enzimmel kétszálúvá egészítjük ki. Az ily módon előállított kétszálú DNS azon túl, hogy csak a gének kódoló régióit tartalmazza, tökéletes komplementere lesz az mRNS-nek. Ebből ered az elnevezés; cDNS (komplementer DNS). Az így kapott eukarióta gének már alkalmasak prokariótákban való kifejeztetésre. A mennyiség egyenesen utal továbbá expressziójuk mértékére is, ezen alapulnak a különböző expressziós vizsgálatok (l. *microarray*). Ha az így nyert cDNS-ekből klóntárat készítünk, akkor azt cDNS könyvtárnak hívjuk.

⁴⁶ BAC = *bacterial artificial chromosome*, YAC = *yeast artificial chromosome*.



12-2. ábra

Klontár készítésének menete pBR322 plazmid vektor használata esetén
 Az ampicillin- és tetraciklin rezisztens plazmidokat és az idegen DNS-t ugyanazon restrikciós enzimmal hasítjuk. A *Pst*I a cirkuláris pBR322 plazmidot ampicillin rezisztencia génjében hasítja, ezáltal linearizálja. Miután az idegen DNS fragmenseket pBR322 plazmidokba klónoztuk, azokat *E. coli* sejtekbe transzformáljuk. Negatív szelekciót végzünk, mely során a transzformánsokból – megegyező pozícióban – két különböző táptalajra oltunk. A rekombináns, plazmidjaikon ampicillin rezisztencia génjeikben megszakított baktériumok nem lesznek képesek növekedni az ampicillin + tetraciklin tartalmú táptalajokon. A megfelelő pozicionálást követően kikereszük a tetraciklin tartalmú táptalajról a transzformánsokat.



12-3. ábra

Génkönyvtárak szűrése hibridizációval

Agar lemez rekombináns plazmíddal transzformált baktériumokkal. Az egyedi baktérium telepeket a táptalaj felszínének érintésével nitrocellulóz membránra vesszük és NaOH-dal alkalikus lízist végzünk. A sejtek DNS-e kiszabadul, a két szál elválik egymástól, és a DNS rátapad a membránra. A kitapadt egyszálú DNS-hez radioaktívan jelölt, komplementer DNS (esetleg RNS) próbát hibridizáltatunk, és a membránt mossuk az aspecifikus kötődés eltüntetésére. Ezt követően a radioaktivitás csak azoknak a klónoknak a helyén detektálható, amelyekben a DNS komplementer a radioaktívan jelölt próbával, értelemszerűen, amelyek a keresett génnel tartalmazzák.

Felfedezések, melyek forradalmasították a molekuláris biológiát

Az alábbiakban röviden bemutatjuk azokat a módszereket, amelyek nélkül nemcsak rekombináns géntechnológia, de molekuláris diagnosztika sem létezne. Sőt, a mindennapi életünkben egyre jelentősebb szerephez jutnak az igazságügyi orvostan, a célzott diagnosztika (biomarker vadászat), ill. a célzott terápia területén is. Legyen az egy egyszerű fragment analízis, vagy genetikai markerek, betegség-hordozó allélek, mutáció, polimorfizmus kimutatás, szükséges a megfelelő mennyiségű DNS megléte.

Egy Nobel díjas találmány, a **polimeráz láncreakció (PCR)** megfelelő optimalizálást követően alkalmas bármilyen mintából, a néhány, vagy akár csak egyetlen példányban jelen levő DNS szakaszt milliószeresére felszaporítani. Ez az *in vitro* DNS szintézis alapvetően egy másolási (replikációs) folyamat, a sejtekben végbenemő, bonyolult DNS-kettőződésnek egy mesterséges, lecsupaszított változata, amely szintézis többszöri ismétlése révén adott DNS mennyisége exponenciális mértékben növelhető (12-4. ábra). Az amplifikációt végző hőstabil DNS polimeráz sem képes az új szál építését a semmiből megkezdeni, ezért primerről nekünk kell gondoskodnunk mesterségesen előállított, rövid oligonukleotidok formájában. Ez azért jó, mert így irányíthatjuk a másolandó szakasz kijelölését. A sejtekben a duplaszálú DNS-ek szétcsavarását fehérje komplexek végzik, míg laboratóriumi körülmények között ezt a hőmérséklet emelésével érhetjük el (denaturáció). Ismét alacsony hőmérsékleten a primerek hozzákötődnek a denaturált, felszaporítani kívánt egyszálú DNS molekula komplementer szakaszaihoz.

Ezt követően a – hőforrásokban élő baktériumokból izolált – polimeráz enzim a számára optimális hőmérsékleten (72 °C), a mintaszál nukleotid sorrendjének megfelelően egymás mellé csatolja a rendszerhez ugyancsak hozzáadott dezoxiribonukleotid-trifoszfátokat úgy, hogy adott bázissal szemben kizárólag csak annak komplementere kerülhet beépítésre. Így a két szál hidrogén hidakkal kapcsolódik, stabilizálva a kettős hélixet (extenzió). A replikáció következő ciklusában pedig már a primerek mind a régi, mind pedig az új szálhoz kötődnek.

A **PCR alapú RFLP** módszer egy adott célszekvencia eltéréseit, polimorfizmusait hivatott kimutatni. Az SNP-k a DNS szekvenciák azon részeit jelölik, melyek egyetlen nukleotidban térnek el egymástól. Pl. az egyik allélon adenin bázis helyett guanin található a másikhoz képest. Ebből következik, hogy heterozigóta genotípus esetén az SNP-t tartalmazó DNS szakaszt megfelelő restriktív enzimmel hasítva eltérő fragmentum mintázatot kapunk. Ha a felismerő hely jelen van, akkor hasít az enzim, eltérés (pl. [pont]mutáció esetén) pedig nem.

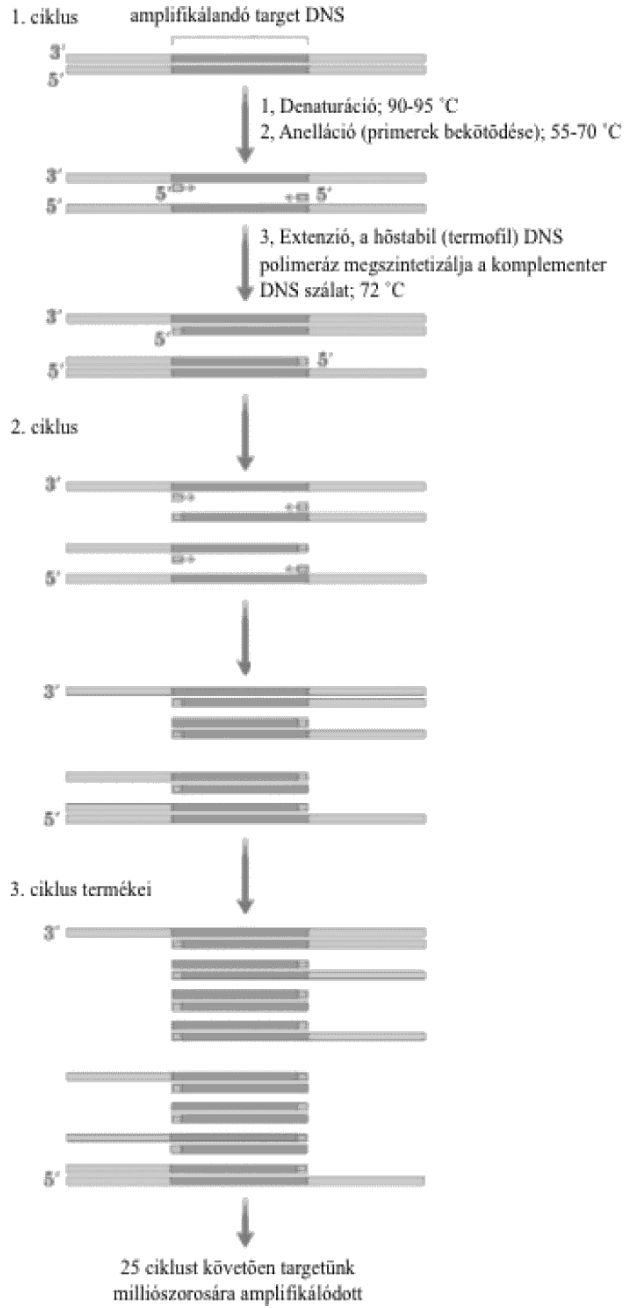
A restriktív fragmentum-hossz polimorfizmust (RFLP) tehát olyan SNP-k hozzák létre, amelyek kialakítanak vagy megszüntetnek restriktív hasító helyeket. A fragmentek kimutatása gélelektroforézissel történhet.

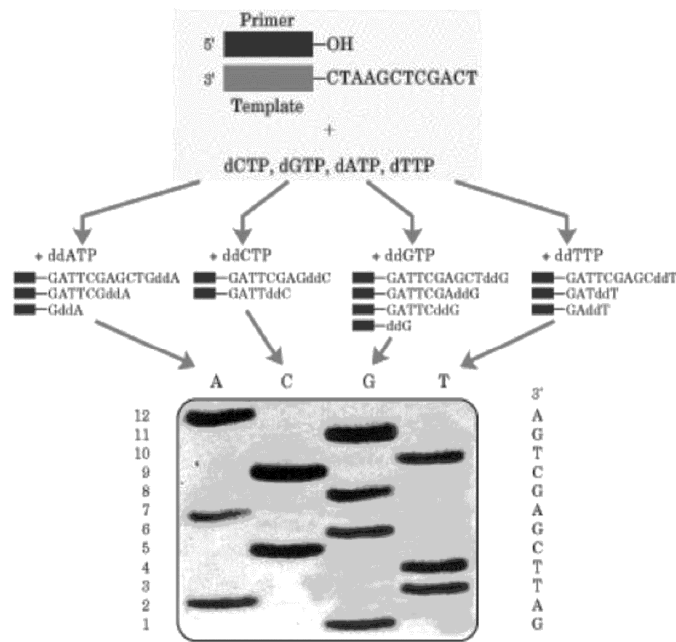
Szót kell ejtenünk a **PCR valós-idejű alkalmazásáról** (*real-time PCR*), amely új fejezetet nyitott a nukleinsav analízis területén. Ez a minőségi analízis mellett rendkívül szenzitív detektálásra (femtogram tartomány) és nagyon pontos mennyiségi meghatározásra egyaránt lehetőséget biztosít.

12-4. ábra

A PCR reakció elve

A sejtekben a duplaszálú DNS-ek szétcsavarását fehérje komplexek végzik, míg laboratóriumi körülmények között ezt a hőmérséklet emelésével érhetjük el (denaturáció). Alacsony hőmérsékleten a primerek a felszaporítani kívánt szekvencia két végén kötődnek a denaturált, egyszálú DNS-ekhez úgy, hogy 3'-végük egymás felé mutat (anelláció). Az ideális anellációs hőmérséklet a primerek bázisösszetételének függvényében alakul, amely a szekvenciák ismeretében pontosan meghatározható. Cél, hogy a primerek anellációs hőmérsékleti értékei közel essenek egymáshoz. Minél több a szekvenciákban a hármas H-kötéseket kialakító G-C párosodások száma, az anellációk annál magasabb értéket adnak.





A komplementer szál autoradiogramos képe és nukleinsav szekvenciája

12-5. ábra

Sanger szekvenálás

A módszer lényegét tekintve egyszerű: négy különálló csőben, párhuzamosan kivitelezett *in vitro* DNS szintézis azzal a módosítással, hogy a polimeráz enzim a megszekvenálandó templát DNS komplementer szálához módosított, ún. lánctermináló 2'-3'-didezoxi- (dd-) nukleotidokat is képes hozzáépíteni. Az egyes reakcióelegyek különböző lánctermináló nukleotidokat tartalmaznak. Ezeket a módosított nukleotidokat megfelelő arányban keverik a DNS-t alkotó normál dezoxi-ribonukleotidok mellé. (Jelölésként radioaktív dATP-t alkalmaznak.) Minden alkalommal, amikor egy ilyen nukleotid-analóg (amely 3' helyzetben nem tartalmaz -OH csoportot) épül be, lánctermináció történik. A szekvenálási szintézis végeztével a négy reakciócső a keletkezett összes, különböző hosszúságú DNS molekula elegyét tartalmazza, amelyek a templátot teljesen lefedik. Végezetül a létrejött fragmenteket poliakrilamid gélen méretüknek megfelelően szétválasztják és a radioaktív jelölésnek köszönhetően a különböző méretű fragmentek mintázata egy autoradiogramról leolvasható. (Ahogy a modern molekuláris biológia más területein, itt is igyekeznek a radioaktív jelölés helyett fluoreszcens technikát alkalmazni.)

A **DNS szekvenálás**, azaz a nukleinsavakat felépítő bázisok szekvencia meghatározásának technológiája új fejezetet nyitott a molekuláris tudományok területén.

Az első, történelmi Nobel díjjal jutalmazott mérföldkő letétele, Frederick Sanger nevéhez fűződik, aki az 1970-es években kifejlesztette az ún. láncterminációs (didezoxi) szekvenálási eljárást. Innen ered az elnevezés: Sanger szekvenálás (12-5. ábra).

Ennek a módszernek a továbbfejlesztett változatában a lánctermináló nukleotidokat négy különböző fluoreszcens festékkel jelölik, a négy különböző reakcióelegyet összekeverik, és kapilláris elektroforézist végeznek. A leolvasás végül fluoreszcencia detektálással történik.

Hajsza az emberi genomokért

Annak ellenére, hogy sokan azt remélték, olyan hatást gyakorol majd a humán genom program az élettudományokra, mint anno az űrkutatás a fizikára, végül mégsem hozott akkora áttörést. Az első humán genom megszekvenálásán munkálkodó két, egymással versengő csoport: az International Human Genome Sequencing Consortium (az USA állami NIH intézménye keretein belül) és a Craig Venter vezette Celera biotechnológiai magántársaság közel három évig volt a figyelem középpontjában. Fáradságos munkájuk során mindketten az ún. *shotgun* klónozás módszerét alkalmazták. Ez azt jelenti, hogy a megszekvenálni kívánt genomot restriktációs endonukleázokkal kisméretű, átfedő fragmentekre szabdalták, klónozták, végül a releváns DNS szakaszokat mindkét végükön 400-500 bázispár hosszúságban meghatározták⁴⁷.

A mintegy 3 milliárd bázispárt tartalmazó humán genom legelső változatának megszekvenálása 2003-ban fejeződött be és mintegy 3 milliárd USA dollárba került (azaz 1 bázispár meghatározása 1 dollár). Ehhez képest a nukleotid-sorrend meghatározás automatizálásának és számos fontos technikai újításnak köszönhetően – pl. emulziós PCR, piroszekvenálást stb. – egyes magáncégek a munkát 1700 dollár körüli áron és töredék idő alatt elvégzik⁴⁸. Mára már se szeri se száma a különböző GWAS-oknak (*genome-wide association study*, l. még a 4. és 10. fejezetben). Ezek olyan eset-kontroll tanulmányok, amelyek fókuszában major génes SNP-k állnak. 2002-ben indult a nemzetközi **HapMap** (haplotípus térkép) **Projekt** (l. még a 9. fejezetben), amelyben a tudósok elsősorban olyan haplotípusok (SNP mintázatok) után kutatnak, amelyek betegségekkel asszociáltak. Mivel a különböző emberek genomja mintegy 99,5%-ban mutat egyezést⁴⁹, ezért a fennmaradó „fontos

⁴⁷ Shotgun = (sörétes) vadászpuska. Egy menetben hosszabb szakasz meghatározása azért nem volt lehetséges, mert a gélen túl sűrűvé és ezáltal egymástól megkülönböztethetlenné váltak volna a csíkok, amelyek sorrendjét le kellett olvasni.

⁴⁸ Rövidebb, meghatározott DNS szakaszok genetikai diagnosztika céljából történő megszekvenálását már nagyobb közönség számára is elfogadható áron kínálják.

⁴⁹ Fontos megállapítás ezen a téren: néha nagyobb fokú a hasonlóság két, nem azonos etnikumba, akárha nem azonos rasszba tartozó ember között, mint két azonos etnikumú személy esetén.

kevés”-nek a megfejtése rendkívül inspirálóan hat a kutatókra és a molekuláris biológiai tudományok további fejlődésére, nem csak a medicina szempontjából, hanem a *Homo sapiens* evolúcióját, az egyes népcsoportok vándorlását, keveredését illetően is.

Microarray alkalmazások és bioinformatikai vonatkozásaik

A DNS chip elnevezés szilárd lemezre rögzített nagyszámú (több millió) egyedi – 20-150 bp hosszúságú – oligo- vagy rövid polinukleotid próba sorozatára (*array*) utal, amelyekhez jelölt nukleinsav mintákat hibridizálnak. A funkcionális genomika használja ezeket expressziós profilozásra, azaz akár több ezer gén expressziójának egyidejű vizsgálatára, meghatározott környezeti paraméterek mellett. Közreműködésükkel lehetséges különböző biológiai folyamatokban részt vevő gének azonosítása (*gene discovery*), ill. génaktivitások relatív mérése.

A tárgylemezek felületén pontos koordinátákkal meghatározott próbák (szondák) szintézise történhet *ex situ*, mely eljárásban előre gyártott, jelölt próbákat kötnek a felülethez, vagy *in situ*, amikor a szintézis magán a hordozó felületen történik. Ezekhez a próbákhoz hibridizálják a vizsgálati és kontroll minták fluoreszcensen jelölt cDNS-eit.

A *microarray* módszer elve egyszerű. Amennyiben a meghatározott paraméterek mellett tenyésztett sejtek, vagy páciensekből műtétilag, ill. biopsziával vett szövetdarabok izolált mRNS populációja reverz transzkripció átírást követően tartalmaz olyan cDNS-t, amely a mikrochip valamely pontjához kötött próbákkal komplementer, azokhoz a kompetitív hibridizáció elvén (l. alább) specifikusan hozzáköt. Ha a szereplő nukleinsavakat előzetesen fluoreszcensen jelölik és – az aspecifikus kötődést kizáró mosás után – a megfelelő hullámhosszú fényel gerjesztik, akkor a kapott jelet az erre szolgáló berendezéssel (konfokális mikroszkóppal) felfogják és számítógépbe viszik, amely „ismeri” a tárgylemezen elhelyezett próbák mintázatát. Az eljárás kétféle eredményt szolgáltat. Egyfelől **azonosíthatók a gének**, amelyek kifejeződtek a vizsgált mintában. Másfelől a fluoreszcens jel intenzitása arányos az **expresszió mértékével**, azaz minél nagyobb az adott gén kifejeződésének mRNS-ben meghatározható értéke, annál több mRNS termelődik róla és annál több jelölt cDNS kötődik a megfelelő próbákhoz a tárgylemez felszínén. Ha a génkifejeződés szintjét befolyásolják transzlációs folyamatok és/vagy poszttranszlációs módosítások, akkor egyéb, pl. proteomikai eljárások is szükségesek lehetnek a pontos diagnózishoz.

A **komparatív genomi hibridizációs array-k** (*array-CGH* vagy aCGH) egész kromoszómákat vagy genomokat, avagy csak bizonyos szakaszokat (szubkromoszomális régiókat, ill. géneket) érintő kópiaszám variációk (*copy number variations*, l. még a 8. fejezetben) kimutatására alkalmasak referencia (kontroll, kezeltlen) és a vizsgált (pl. tumoros, kezelt stb.) minták összehasonlításával. Az eljárásban szereplő molekulákat különböző fluoroforokkal jelölik, az egyiket pl. zölddel, a másikat pirossal. Amennyiben az adott szakaszra vonatkozóan a kontrollban és a vizsgált DNS-ben azonos kópiaszám tapasztalható, akkor az adott koordinátáknál azonos zöld és piros intenzitás állapítható meg, a két szín elegye sárgának látszik. Ha a bennünket érdeklő és pirossal jelzett mintában kópiaszám többlet van, az adott koordinátáknál a piros szín dominál, ellenkező esetben pedig a zöld. A kiértékelés konfokális mikroszkóppal és a számítógép erre a célra fejlesztett szoft-

verével történik. Ezzel a módszerrel követhető pl. a daganatok reagálása a kemoterápiára: a rezisztencia oka lehet az ezért felelős gén(ek) nagyfokú felszaporodása.

DUPress