

13. REKOMBINÁNS DNS TECHNOLÓGIA; GYAKORLATI ALKALMAZÁSOK.

RFLP és a restrikciós (fizikai) térképek. Southern és Northern analízis. VNTR. *In situ* hibridizáció és a FISH technika. Riportergének, transzgenikus élőlények és génterápia.

A fejezetet Szabad János egyetemi tanár állította össze, módosította Lippai Mónika.

A 12. fejezet bemutatta, hogy egy genom- vagy cDNS-könyvtár vektorok sokaságából áll, és egy-egy vektor egy-egy idegen DNS-szakaszt tartalmaz. Hogyan választható ki a sok vektor közül az, amely éppen azt az idegen DNS-t tartalmazza, amelyre szükség van? Hogyan és milyen célokra használhatóak a felszaporított DNS-darabok a molekuláris biológiában és az orvostudományban?

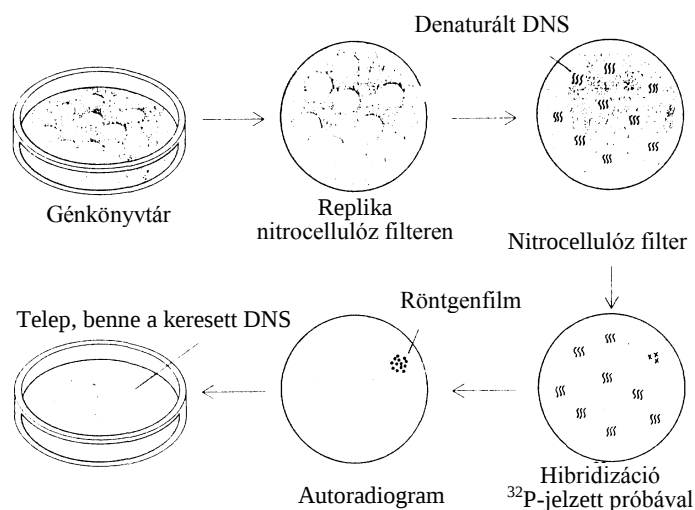
Génkönyvtárak szűrése

A könyvtárakból ki kell tudni választani azt a vektort, amely azt a DNS-szakaszt tartalmazza, amelyikre éppen szüksége van a kutatónak. A kiválasztott vektor szaporítható, majd izolálható belőle az immáron megfelelő mennyiségű, molekulárisan klónozott DNS. A plazmidon alapuló génkönyvtárak szűrésének menete a következő (13.1. ábra).

Első lépésben táptalajon növesztik az idegen DNS-t tartalmazó baktériumok kolóniáit, és róluk a másolatokat készítenek, úgy, hogy a baktériumkolóniákból baktériumokat visznek át egy nitrocellulóz filterre. A nitrocellulóz filtert, rajta az egyes telepekről rátapadt baktériumsejtekkel, NaOH-val kezelik, hogy (i) feltárják a baktériumokat, (ii) denaturálják a DNS-t és (iii) az egyszálú DNS-t a nitrocellulóz filterhez kössék.

A DNS-t 90-95 °C-on „rásütik” a filterre, hogy a továbbiakban stabilan a filteren maradjon. A következő lépésben a filtert ³²P-vel, vagy - ma már többnyire - fluoreszcensen jelölt DNS- (vagy RNS-) próbával inkubálják. Az inkubáció alatt a próba-DNS hibridizál a komplementer DNS szekvenciákkal. A hibridizáció alapja a renaturáció, azaz a komplementer nukleotid szekvenciák egyesülése. A nitrocellulóz filtert radioaktív jelölés esetében röntgenfilmmel borítják. A ³²P bomlása során képződő β-sugárzás hatására fotokémiai reakció játszódik le a röntgenfilmben. A reakció eredményét az előhívás nyomán képződő fekete ezüstszemcsék jelzik a röntgenfilmben. Az ezüstszemcsék megmutatják, hogy melyik kolónia tartalmazza a próbával komplementer DNS-szakaszt (13.1. ábra). Fluoreszcens próba esetében az emittált fény hullámhosszát érzékelő detektorral azonosítják a jelet. A megfelelő baktériumokat az eredeti mesterlemezről ki lehet választani, majd szaporítani lehet. A baktériumokból a már ismertett módon kinyerhetőek a plazmidok, a plazmidokból pedig restrikciós enzimmal folytatott emésztés és gélelektroforézis után izolálható a klónozott DNS.

A fágokban levő génkönyvtárak szűrése lényegében az itt bemutatott technológia alapján történik, természetesen a baktériumpázsiton létrejött, egyedi fágok által képzett tarfoltok, azaz plakkok alapján.



13.1. ábra. Génkönyvtár szűrése.

A KLÓNOZOTT DNS FELHASZNÁLÁSA

A fenti módszerrel „használható” mennyiségű, viszonylag rövid, de azonos szekvenciából álló DNS szakaszok sokszorozhatóak vektorok segítségével, vagy akár a PCR módszerével. A megsokszorozott DNS felhasználására a továbbiakban említünk példákat.

Ahogy erről már szó volt, a restrikciós enzimek a DNS-ben meghatározott szekvenciákat ismernek fel és vágják el ott a DNS-t (ezeket nevezik restrikciós helyeknek). A hasítás nyomán olyan *restrikciós fragmentek* képződnek, amelyek mérete megfelel a restrikciós helyek egymástól mért fizikai távolságának (amit a restrikciós helyek között levő bázispárok számával jellemeznek). A restrikciós fragmenteket gélelektroforézissel el lehet különíteni. Mint ismeretes, az elektroforézis során a hosszabb fragmentek rövidebb, a rövidebb fragmentek hosszabb utat tesznek meg (a sávok helyzete fordítottan arányos a restrikciós fragmentek hosszának logaritmusával). Az azonos hosszúságú fragmentek egy sávot képeznek.

A sávok láthatóvá tételére két megoldás:

(1) A DNS-hez kapcsolódó festékkel

Ha a DNS emésztése nyomán csak kevés számú fragment képződik (a DNS-t vektorból izolálták, vagy PCR-rel készítették), a gélelektroforézis során csak néhány sáv képződik (13.2. ábra). A sávokban levő DNS-t régebben többnyire etidium-bromiddal tették láthatóvá. A DNS-hez kötődő, erősen mutagén etidium-bromid UV fényben narancssárgás színben fluoreszkál. Ma már inkább a kereskedelmi forgalomban kapható, a felhasználó számára nem mutagén hatású fluoreszcens festékeket alkalmaznak.

(2) DNS/DNS vagy DNS/RNS hibridek kimutatásával

A DNS/DNS vagy a DNS/RNS hibridek jelzett „próbával” folytatott hibridizáció nyomán képződnek. Nagy mennyiségű heterogén, például teljes genomból származó DNS emésztése során olyan sok különböző hosszúságú fragment képződik, hogy azok a gélben nem diszkrét sávokat, hanem egyetlen folyamatos fragment-pástot alkotnak. Azt a módszert, amellyel a pástba olvadó fragmentek közül kiválasztható(ak) a megfelelő(ek), Southern blotolásnak vagy Southern analízisnek nevezik.

Southern blotolás

Ha sejtekből, szövetekből izolált DNS-t restrikciós enzimmel emésztenek, száz és ezerszám képződnek nagyon különböző hosszúságú restrikciós fragmentek. A sokféle hosszúságú restrikciós fragment a gélelektroforézis során egy olyan hosszú „DNS fragment-pástot” képez, amelyen belül egyedi sávok nem ismerhetők fel. A megfelelő sávok felismerését a „sávtengerben” lehetővé tevő módszert - kidolgozója neve után - *Southern blotolásnak* nevezik, célja pedig DNS-fragmentek detektálása jelzett DNS próbával.

A gélelektroforézissal elkülönített DNS fragmenteket nitrocellulóz vagy nejlon filterre „blottolják” (13.2. ábra). (A blottolás azt jelenti, hogy a gélből egy nitrocellulóz filterre húzzák át, pozíciójukat megőrizve, a DNS fragmenteket.) A nitrocellulóz filtert NaOH-al kezelik, majd néhány tíz percen át 90-95 °C-on „sütik”, hogy denaturálják a DNS-t, és hogy az egyszálú DNS fonalakat a nitrocellulóz filterhez kössék. A filtert ^{32}P -vel jelzett, vagy ma már inkább fluoreszcensen jelölt DNS próbával inkubálják, hogy a próba egyszálú szálai hibridizáljanak a komplementer szekvenciákkal. A nem hibridizáló próba DNS-t mosással eltávolítják, majd radioaktív jelölés esetében a filterre röntgenfilmet tesznek. A ^{32}P bomlása nyomán képződő β -sugárzás a

röntgenfilm előhívása után fekete ezüstszemcsék formájában válik láthatóvá. A képződő sötét sávok tehát megmutatják a hibrid DNS-szálak helyét a különböző hosszúságú restrikciós fragmentek között (13.2. ábra).

Northern blotolás

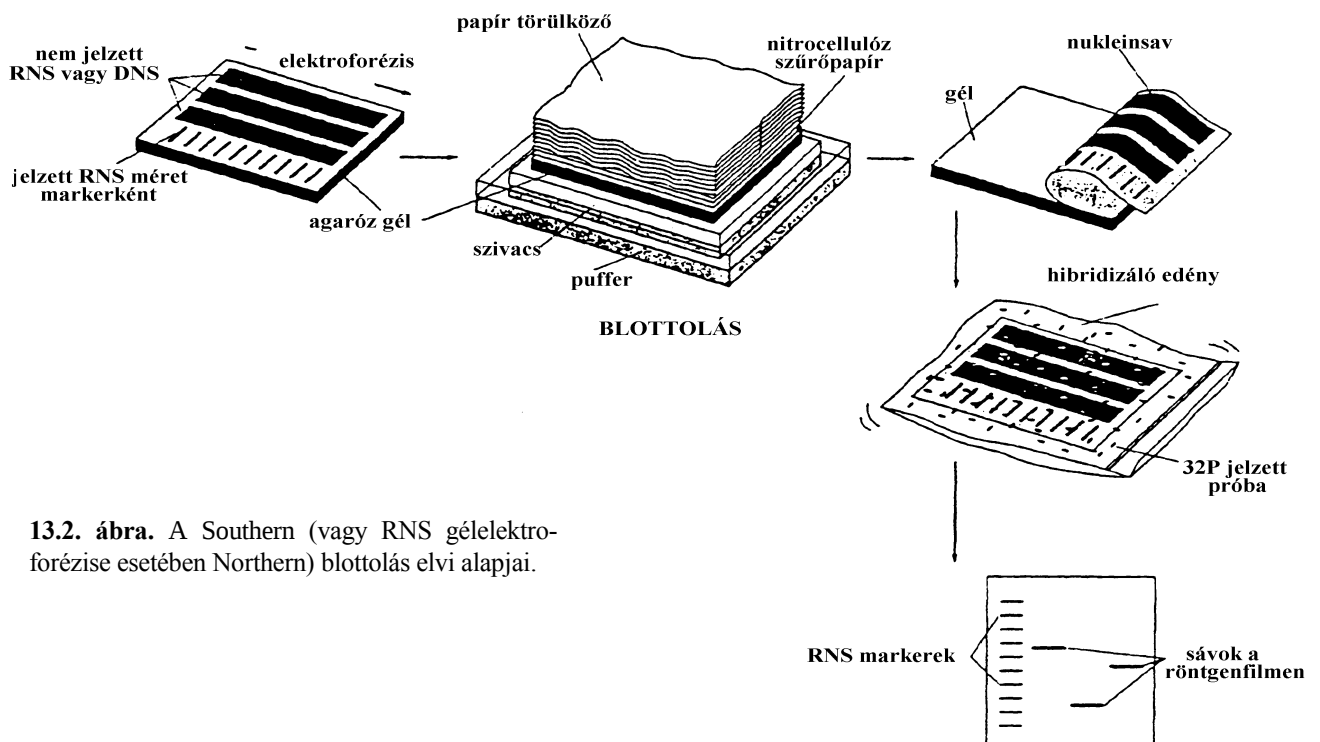
RNS-t szintén lehet izolálni sejtekből, szövetekből. Az RNS-molekulákat (bár az RNS reaktivitása miatt jóval körülményesebben) gélelektroforézissal el lehet különíteni, nitrocellulózra blotolni, majd sütni, és közülük DNS próbával kimutatni azokat, amelyek a DNS próbának komplementerei, így azzal hibridizálnak. Az eljárást Northern blotolásnak nevezik.

Western blotolás

Az ún. Western blotolás során fehérjéket különítenek el gélelektroforézissal, majd blotolnak nitrocellulóz filterre. A különféle méretű fehérjék közül specifikus ellenanyaggal detektálják és teszik láthatóvá a keresett fehérjét. Az ellenanyagok a magasabbrendű eukarióták immunrendszerének fontos fehérjéi, nagy affinitással és specifitással képesek a szervezet számára idegen anyagokhoz kötődni. Ezt használják ki a molekuláris biológiában, úgy, hogy a kimutatni kívánt anyaggal (antigénnel) mesterségesen immunizálnak egy állatot, majd véréből ellenanyagot izolálnak, és később ezt használják fel az antigén kimutatására.

In situ hibridizáció és a FISH technika

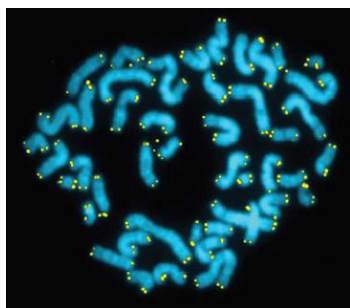
A komplementer nukleinsav-szekvenciák akkor is hibridizálnak egymással, ha az egyik DNS-fonal pl. egy kromoszóma része. A hibrid molekula megfelelő módszerrel láthatóvá tehető, és mikroszkópban tanulmányozható. Annak az eljárásnak, amely egy sejt- vagy szövet-preparátumon „helyben”, a nukleotid-tartalom külön izolálása nélkül specifikus kromoszomális DNS-szakaszt vagy RNS-molekulákat tesz láthatóvá, *in situ* hibridizáció a neve. Az egyedi,



13.2. ábra. A Southern (vagy RNS gélelektroforézise esetében Northern) blotolás elvi alapjai.

sokszor csak egy kópiában jelenlévő DNS- vagy RNS-szekvenciák *in situ* kimutatása során a hibrid szakasz kimutatásához különleges megoldásra, a gyenge jel erősítésére van szükség.

Egy lehetséges megoldás a próba-DNS megjelölése egy erősen immunogén molekulával, pl. digoxigeninnel (DIG). A DIG-et, és ezzel együtt a hibrid DNS-t egy olyan, ún. elsődleges ellenanyag ismeri fel, amely a DIG-gel specifikusan reagál. Az elsődleges ellenanyaghoz viszont olyan másodlagos ellenanyag kapcsolódik, amely fluoreszcens festékekkel van megjelölve. Mivel egyetlen egyszálú DNS próba több DIG molekulát tartalmaz, a DNS hibrid több elsődleges ellenanyaggal kapcsolódhat. Egyetlen elsődleges ellenanyaghoz több másodlagos ellenanyag kapcsolódik. Egyetlen másodlagos ellenanyag több fluoreszcens csoporttal van megjelölve. Végeredményben tehát egy olyan szendvicsszerű szerkezet képződik, amely kellő intenzitással fluoreszkál, és egy fluoreszcens mikroszkópban észrevehető, tanulmányozható. A technika neve: fluoreszcens *in situ* hibridizáció, röviden FISH. A FISH technikát általánosan használják DNS szekvenciák azonosítására kromoszómákban, vagy mRNS molekulák helyének megállapítására sejtekben, szövetekben (13.3. ábra).



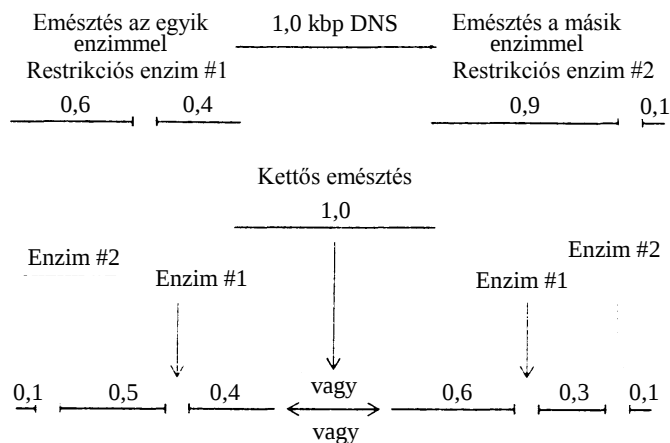
13.3. ábra. Telomer DNS kimutatása a FISH technikával. A telomer szekvencia helyét sárga pöttyök mutatják. A kromatin egy általános DNS-festéknek köszönhetően kéken fluoreszkál.

A restriktív vagy fizikai térképek

Ahhoz, hogy a DNS mentén eligazodjunk, kiváló lehetőséget nyújtanak a *restriktív* vagy *fizikai térképek*. A restriktív térkép olyan ábrázolásmód, amely megmutatja, hogy a különféle restriktív enzimek hasítási helyei milyen sorrendben és távolságban követik egymást a DNS mentén (13.4. ábra). A restriktív térképeket azért szokták *fizikai térképeknek* is nevezni, mert a restriktív helyek helyzete, egymástól mért távolsága arányos az emésztés során képződő fragmentek hosszával, lényegében a DNS-t alkotó bázispárok számával. Ugyanakkor a genetikai térképek nem egyeznek pontosan a fizikai térképekkel, torzítanak, mert a crossing overek nem azonos gyakorisággal következnek be a kromoszómák különböző szakaszain!

A restriktív térképek készítése során valamely DNS-szakaszt különféle restriktív enzimekkel külön-külön és együtt is emésztik. Az emésztés után képződő fragmenteket gélelektroforézissal elkülönítik, és meghatározzák a fragmentek méretét. A restriktív fragmenteket méretük alapján sorrendbe lehet rendezni, *restriktív térképet* lehet készíteni (13.4. ábra).

Sok faj esetében (beleértve az embert is) részletes térképek készültek a restriktív helyek alapján. A restriktív helyek nemcsak a gének térképezését tették lehetővé, hanem molekuláris klónozásukat is. A restriktív térképek készítése a génfunkció molekuláris szintű megismerésének fontos mozzanata volt - és ma is az, amennyiben nem ismerjük az adott faj genomjának szekvenciáját.



13.4. ábra. Restriktív térkép készítésének elvi alapja. Az egy-egy restriktív enzimmel illetve kombinációjukkal folytatott emésztés és gélelektroforézis után meghatározhatóak a restriktív helyek, és ún. restriktív (fizikai) térkép szerkeszthető.

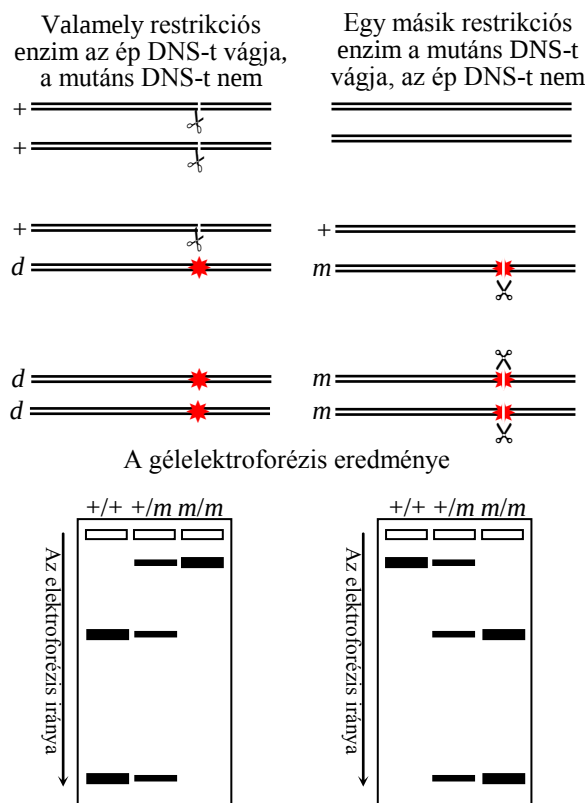
RFLP (restriktív fragment hossz polimorfizmus)

Természetesen egy populációban sok génnek sok allélja létezhet egyidejűleg. Ilyenkor a populáció valamely tulajdonságot illetően *polimorf*. A mutációk időnként restriktív helyeket szüntethetnek meg, és újakat alakíthatnak ki, megteremtve a DNS-polimorfizmus vizsgálatának egyik alapját. A DNS polimorfizmusa a szekvencia valamilyen eltérését jelenti a DNS ugyanazon szakaszán a homológ kromoszómák DNS-ében.

A DNS-polimorfizmus a lehetséges restriktív helyek vizsgálatának szempontjából két dolgot jelent.

(1) Azt, hogy egy faj különböző egyedeiből származó azonos kromoszómák DNS-ének adott pontjában valamely restriktív hely jelen van vagy sem. Polimorfizmus esetén megfelelő restriktív enzimmel folytatott emésztés után eltérő hosszúságú restriktív fragmentek képződnek (13.5. ábra).

(2) A különféle hosszúságú restriktív fragmentek eltérő gyakorisággal lehetnek jelen a különféle populációkban. Vagyis a restriktív fragment hossz polimorfizmus (RFLP) a különféle hosszúságú restriktív fragmentek meglétét és gyakoriságát is mutathatja egy populációban. Mivel mindegyikünk genetikailag egyedi kombináció, mindegyikünk egyedi RFLP mintázat jellemző. Ha tehát elegendően sok polimorf genom helyet, azaz lokuszt vettek figyelembe, az RFLP alkalmas módszer volt személyek azonosítására - éppen úgy, mint az ujjlenyomat. Ma azonban erre a célra már egy másik eljárást (VNTR, lásd később) alkalmaznak.



13.5. ábra. A restriktációs fragmentek diagnosztikus értéke. Sokszorozzák (PCR-rel) az adott DNS-szakaszt $+/+$, $+/m$ és m/m genotípusú emberek genomjáról.

A PCR-terméket az első esetben olyan restriktációs enzimmal emésztik, amely a DNS-t a $\propto$ -el jelölt helyen elvágja. A $+/+$ genotípusú emberek esetében mindkét homológ kromozómáról kétféle méretű fragment képződik: egy rövid és egy hosszabb. Ezért a fragmentek a gélelektroforézis során két vastag sávot alkotnak. Az m mutáns allélban a $*$ mutáció megszüntette a restriktációs helyet, ami miatt a restriktációs enzim nem vágja el (nem emészt) a PCR-terméket. Ezért az m/m emberek esetében egyetlen vastag sáv képződik. A $+/m$ heterozigóták sáv-mintázata különbözik mind a $+/+$, mind pedig az m/m emberekéétől.

Az is megtörténhet (második példa), hogy a $*$ mutáció nyomán olyan új restriktációs hely képződik, amelyet egy restriktációs enzim éppen felismer és elvágja ott a DNS-t. Nyilvánvaló, hogy a $+/+$, a $+/m$ és az m/m emberek fragmentmintázata a második esetben is különbözik.

RFLP markerek és a genetikai térképezés

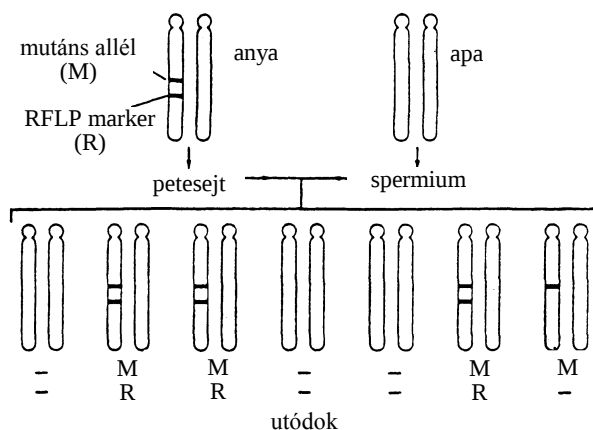
A rekombinációs valószínűségeken alapuló genetikai térképek készítéséhez, marker-mutációkat használtak/használnak. A marker-mutációk látható fenotípust eredményező mutáns allélok, tájékozódási pontokká váltak a kromoszómákon. A restriktációs helyek, hasonlóan a marker-mutációkhoz, tájékozódási pontként szolgálnak a kromoszómák mentén, és fizikai térképezésre használhatóak (13.4. ábra).

Az RFLP hasznos eljárás a genetikai eredetű tulajdonságok vizsgálatára, és sokáig a legfontosabb

kimutatási módszer volt a prenatalis diagnosztikában. Tétélezzük fel, hogy az m/m homozigóták olyan betegség miatt halnak meg, mint pl. a *cisztás fibrózis* (mukoviszcidózis). Ha az m mutáció megszüntet (vagy éppen létrehoz) egy restriktációs helyet, az RFLP mintázat alapján különbséget lehet tenni a $+/+$, a $+/m$, valamint az m/m genotípusú magzatok között (13.5. ábra). A $+/m$ heterozigóta szülőket figyelmeztetni lehet a veszélyre, és magzatjaik genotípusát prenatalisan meg lehet határozni.

Nem minden génmutáció mutatható ki azonban RFLP-vel, mert nem szünt meg vagy hoz létre restriktációs helyet. Egyes gének látható fenotípust okozó marker-mutációi megfelelő közelség esetében a kapcsoltág miatt (lásd 5. fejezet) alkalmas eszközöknek bizonyultak a kromoszómák adott pontjának öröklődési vizsgálatára. A gének azonban a magasabbrendű eukarióták DNS-ének csak kis hányadát foglalják magukba, és közöttük csak nagyon kevésnek van marker-mutáció értékű (azaz könnyen detektálható fenotípusú) allélja.

Polimorf restriktációs helyek viszont bőségesen vannak a genom azon szakaszain is, amelyek nem részei semmilyen génnek sem. Ha egy adott restriktációs hely közel van, és így nagy valószínűséggel kapcsoltan öröklődhet valamely gén mutáns alléljával, a restriktációs hely lehetővé teszi a mutáns allél öröklődésének nyomon követését – akkor is, ha maga a génmutáció nem alkalmas RFLP-analízisre (nem szünt meg vagy hoz létre restriktációs helyet). Minél közelebb van a restriktációs hely a mutáns allélhoz, annál jobban használható a mutáns allél öröklődésének nyomon követéséhez (13.6. ábra).



13.6. ábra. A restriktációs helyek haszna a géntérképezésben. A mutáció (M) és egy RFLP marker (R) közötti kapcsoltág lehetővé teszi a mutáció követését az utódokban (a M és az R jel az M mutáció és az R marker meglétét jelzi). Számolni kell azonban azzal, hogy az R marker és az M mutáció között bizonyos valószínűséggel (a távolság függvényében) rekombináció következik be (lásd az utolsó esetet az utódok genotípusai közül)!

SNP (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)

Az egyponyos vagy egyedi nukleotid-polimorfizmus (angolul Single Nucleotide Polymorphism, SNP) egyetlen bázis mutációján alapuló DNS szekvencia-variáció. Akkor alkalmazzák az SNP-t a genom egy adott helyének genetikai jellemzőjeként, ha a mutáns változat a vizsgált populációban az egyedek legalább 1%-ában jelen van (például az AAGCCTA szekvencia C helyén T bukkan fel: AAGCTTA). Az SNP-k teszik ki az ismert humán genetikai variációk 90%-át, és minden 100-300 bázispáronként jelen vannak a humán genomban. Az SNP-k kétharmadában a C helyén T van. Mivel egyik generációról a másikra az SNP-k csak kis eséllyel változnak meg, komoly segítséget jelentenek - egyebek mellett - a gyógyászatban. Érthető, hogy az SNP-k értékes „markerek” a leszármazási vizsgálatokban is.

Rekombináns DNS technológia és prenatális diagnosztika

Minthogy az öröklődő betegségek az örökítő anyag változásaival kapcsolatosak, az örökítő anyag változása pedig gyakran jár a restrikciós helyek változásával, lehetőségek kínálkoznak a magzat genotípusának megállapítására már a terhesség 10. hetében. Magzati sejtek gyűjtésére négy megoldást alkalmaznak. (1) Az *amniocentézis* során a magzatvízből gyűjtenek magzati sejteket (13.7. ábra). (2) *Korionboholyból* vesznek kis mintát (a korionboholy genotípusa a magzatéval azonos). (3) A magzat *köldökvénájából* vesznek pár csepp vért. (4) *Az anya véréből* össze lehet gyűjteni a belekerült magzati sejteket. A magzati sejteken kromoszóma-, enzim- és/vagy DNS-vizsgálatokat lehet elvégezni.

A DNS-vizsgálat is többféle lehet. Régebben a DNS-t először restrikciós enzimmal emésztették, a fragmenteket gélelektroforézissel elkülönítették és nitrocellulóz filterre blottolták, majd elvégezték a Southern analízist alkalmasan megjelölt DNS próbával (13.2. ábra). Ma leggyakrabban a DNS jól meghatározott szakaszát először PCR-rel amplifikálják,



13.7. ábra. Egy 13. hetes emberi embrióról készült felvétel.

majd a PCR-terméket vizsgálják, pl. az RFLP módszerével (13.5. ábra). Egyre gyakoribbak az olyan vizsgálatok, amelyekben meg is szekvenálják a PCR-terméket. Természetesen a mutáns allélokot nemcsak magzatokban, hanem felnőttekben is ki lehet mutatni, és fel lehet használni a genetikai tanácsadás során.

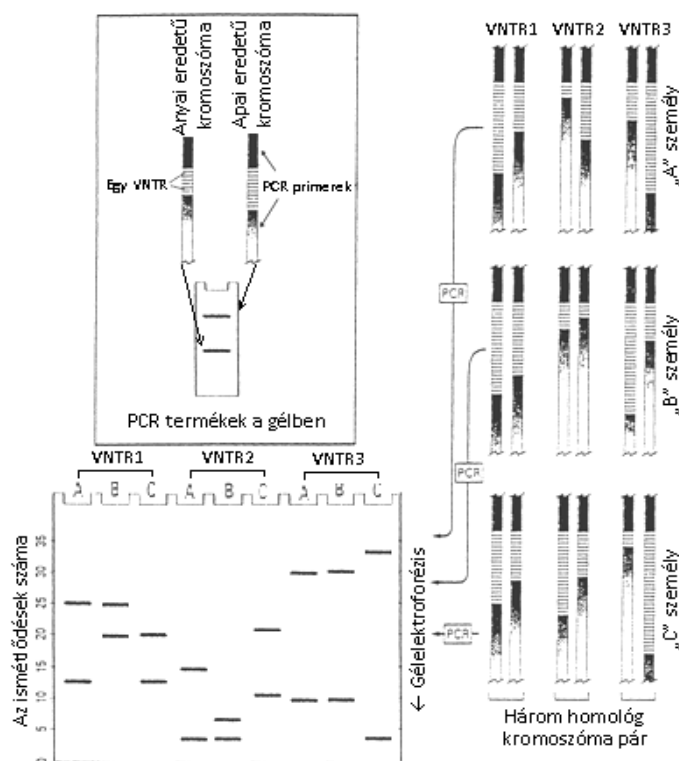
VNTR: példa a molekuláris technikák igazságügyi orvostani felhasználására

Az igazságügyi orvostan gyakran kihasználja azt a tényt, hogy mindannyian (kivéve az egyetétű ikreket) egyedi genetikai kombinációk vagyunk. A molekuláris módszerekkel csekély mennyiségű DNS-ből kiindulva azonosítanak embereket az ún. DNS-alapú ujjlenyomat-vizsgálat valamelyik módszerével.

Az eukromatinban rövid DNS-szekvenciák tandem módon ismétlődő kópiái találhatók. Ezen mérsékelt ismétlődő szekvenciák egyik típusát VNTR-eknek (angolul: variable number of tandem repeats) nevezik. Mivel a kópiák száma az egyes VNTR-blokkokban és az emberekben is gyakran különböző, a VNTR-analízis az igazságügyi orvostanban jól használható személyek azonosítására (13.8. ábra).

Első lépésben a különböző típusú VNTR-régiókat PCR-rel amplifikálják (13.8. ábra). A PCR-primerek közvetlenül a VNTR-hely szomszédságában lévő, az anyai és az apai eredetű kromoszómákban azonos DNS szekvenciákhoz hibridizálnak.

A PCR termékek hossza két dologtól függ: (i) milyen hosszú annak az „egység” DNS szakaszának a hossza, amely a VNTR-ben ismétlődik, és (ii) a kópiák számától.



13.8. ábra. A VNTR-analízis elvi alapjai. Magyarázat a szövegben.

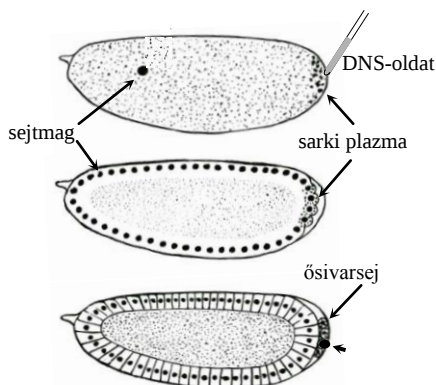
A VNTR-ekről képződött PCR-termékeket gélelektroforézissal elkülönítik. Az adott VNTR-régióra jellemző „egységnyi” DNS-szakasz hosszának ismeretében, valamint a PCR-termék mérete alapján meghatározható a PCR-termékeket alkotó kópiák száma (az apai és az anyai eredetű kromoszómákból származó DNS jó eséllyel eltérő mintázatot ad). Végeredményben egy, az adott emberre jellemző mintázat képződik (13.8. ábra).

A VNTR-analízis, miután PCR-en alapul, nagyon érzékeny: egyetlen hajhagymában, vagy egy vércsöppben van annyi DNS, amely alapján elvégezhető a VNTR-analízis.

Riporter- és transzgének

A rekombináns DNS technológia (vagyis a különböző eredetű DNS-szakaszok tervszerű kombinálása és használata) lehetővé teszi a DNS-szekvenciák mérnöki pontosságú kombinálását, tetszés szerinti módosítását, a rekombináns DNS-szekvenciák transzformálását sejtekbe, élőlényekbe.

A DNS-t különféle módszerekkel lehet a sejtekbe juttatni. Vannak kereskedelmi forgalomban beszerezhető preparátumok, amelyekbe a DNS becsomagolható, és miután a sejtekhez keverik, bejuttatják a DNS-t a sejtekbe. Az ún. *génpuskák* olyan apró fémgömböket lőnek be a sejtekbe, amelyek felszínére DNS-molekulákat rögzítettek. Az *elektroporáció* során DNS-oldatba tesznek sejteket, elektromos kisüléssel apró pórusokat nyitnak a sejthártyán, amelyeken át DNS-molekulák áramlanak a sejtbe, amíg a pórusok nyitva vannak. Gyakori eljárás, hogy a DNS oldatot vékony *kapillárral injektálják* be a sejtekbe, embriókba (13.9. ábra).

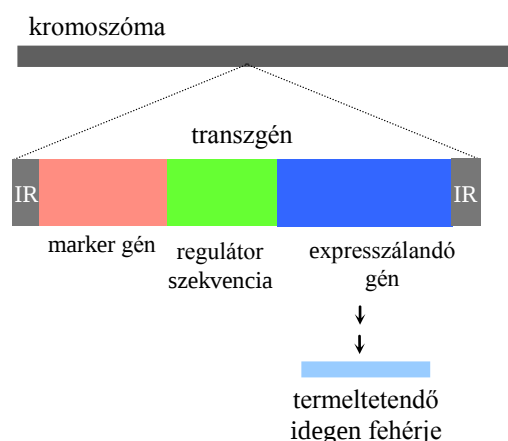


13.9. ábra. Idegen DNS bejuttatása muslicába. A muslica leendő ősvarsejtjei a pete citoplazma hátulsó végének (sarki plazma) megfelelő területen alakulnak majd ki, úgy, hogy a korai embrióban itt található sejtmagvak körül kialakuló sejtmembránok magukba zárják ezt a részt. A sejthártyák kialakulása előtt a sarki plazmába injektált DNS-molekulák tehát bekerülhetnek a leendő ősvarsejtbe. Ha az injektált DNS ráadásul módosított transzpozont tartalmaz, egy része - transzpozáz enzim hatására - beékelődhet valamelyik ősvarsejt egyik kromoszómájába, és a továbbiakban a kromoszóma részeként, transzgénként öröklődik (lásd a szövegben). A vastag fekete nyíl egy olyan ősvarsejtre mutat, amely egyik kromoszómájába belekerült egy transzgén.

A sejtekbe juttatott DNS gyakran nem válik a kromoszómák részévé. Ekkor a benne kódolt genetikai információ átmeneti, tranzienst módon expresszálódik: addig kódolhatja fehérjék képződését, amíg le nem bomlik. A képződő fehérjék szerepe viszont addig is tanulmányozható.

A bejuttatott DNS olyan szekvenciákat is tartalmazhat azonban, amelyek lehetővé teszik, hogy a DNS-konstrukció a kromoszómák DNS-ébe beépüljön (inszertálódjon). Ekkor *transzgénként* öröklődik tovább, sejtől sejt, generációról generációra (13.9. és 13.10. ábra).

Sokszor módosított transzpozonokat, retrotranszpozonokat vagy retrovírusokat alkalmaznak az idegen DNS genomba építésére, hiszen ezek eredeti működésük szerint képesek a befogadó sejt kromoszómájába inszertálódni. A beékelődéshez szükséges enzimet (pl. transzpozáz vagy integráz) általában külön juttatják a sejtbe.

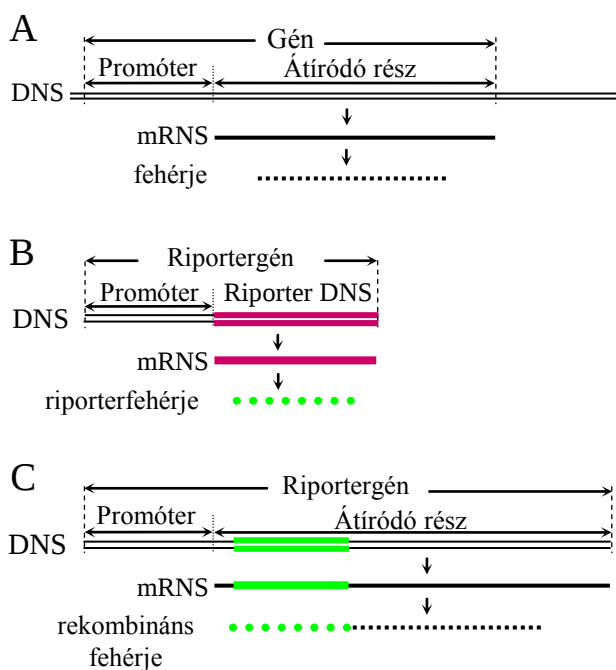


13.10. ábra. Egy tipikus transzpozon alapú transzgén szerkezete. A regulátor szekvencia szabályozza az expresszálandó gén működését. A marker gén a transzgén jelenlétének kényelmes detektálását teszi lehetővé. Az IR (inverted repeat) az a szekvencia, amely a mobilis genetikai elemek DNS-be történő beékelődését biztosítja.

A *transzgén* tehát olyan idegen eredetű DNS egy élőlény valamelyik kromoszómájában, amely az ember céltudatos tevékenységének eredménye. A transzgént minden sejtjükben hordozó élőlényeket nevezik *transzgénikus élőlényeknek*. Ők egyben az ún. genetikailag manipulált organizmusok (GMO) egyik típusát alkotják.

A riporter-konstrukciók egy részében a vizsgálandó gén szabályozó (promóter) részét, vagy annak jól meghatározott részeit olyan gének átíró - strukturális - részével (gyakran cDNS-ével) kombinálják, amelyek terméke könnyen felismerhető (13.11. ábra). Az átíró részt *riportergénnek* nevezik. Minthogy az ilyen DNS-konstrukciók által kódolt ún. *riporterfehérjék* megjelenési mintázatát a másik gén szabályozó része határozza meg, a riporterfehérje jelenléte alapján vizsgálandó gén expressziós mintázatára lehet következtetni.

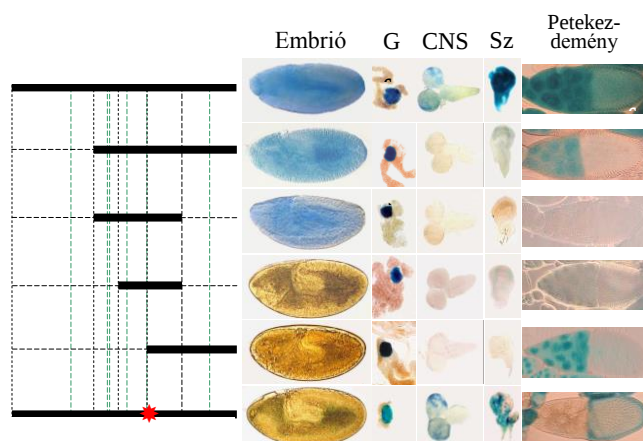
Riportergénként gyakran használják az *E. coli lac* operonjának *lacZ* génjét, amely terméke - a β -galaktozidáz - az X-gal nevű szintelen vegyületből kékszínű, jól felismerhető terméket készít (13.12. ábra). Riporterként - egyebek mellett - használják pl. a szentjánosbogár luciferáz génjét is, amely terméke - a luciferáz enzim - bontja a luciferint, és közben lumineszkál. Ma a leggyakrabban használt riportergén az *Aequorea victoria* medúzafaj *GFP* génje, amely a zölden fluoreszkáló proteint (GFP, green fluorescent protein) kódolja. Sőt, a *GFP* génnek vannak olyan mutáns változatai, amelyek kéken, sárgán, vagy vörösen „világítanak” (13.13. ábra).



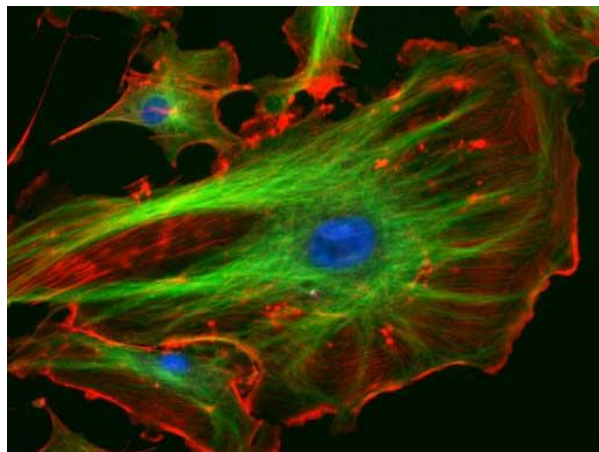
13.11. ábra. Riportergén-típusok. (A) A vizsgálandó gén expresszióját saját promótere (a szabályozó rész) szabályozza. (B) A vizsgálni kívánt promótert valamilyen riporterfehérjét kódoló DNS-sel kombinálják: a kódolt riporterfehérje expressziós mintázata jól követhető, és a promóter szabályozása alatt áll (C) A tanulmányozandó génben a kódoló szakasz mellé, a leolvasási keret megtartásával pl. a GFP-t kódoló DNS-szakaszt illesztik - a képződő rekombináns fehérje „ki van világítva”. A riportergéneket sejtekben vagy teljes élőlényekben kifejeztetve tanulmányozható a vizsgált (itt az A ábrán feltüntetett) gén expressziójának sajátosságai.

Transzgénikus élőlények

Gyakori eljárás, hogy baktériumgének erős promóterét kombinálják eukarióta gének cDNS-ével, és transzformálják mikroorganizmusokba, élesztőbe, növényekbe vagy akár emlősökbe, azért, hogy bennük a cDNS által kódolt idegen fehérjét termeltessek. Ma már génszerkezeti eljárással készített rekombináns DNS alapján termeltetnek baktériumokban pl. emberi inzulint, növekedési hormont, vagy antigéneket vakcináláshoz, természetesen olyan transzgénikus növényeket, amelyek

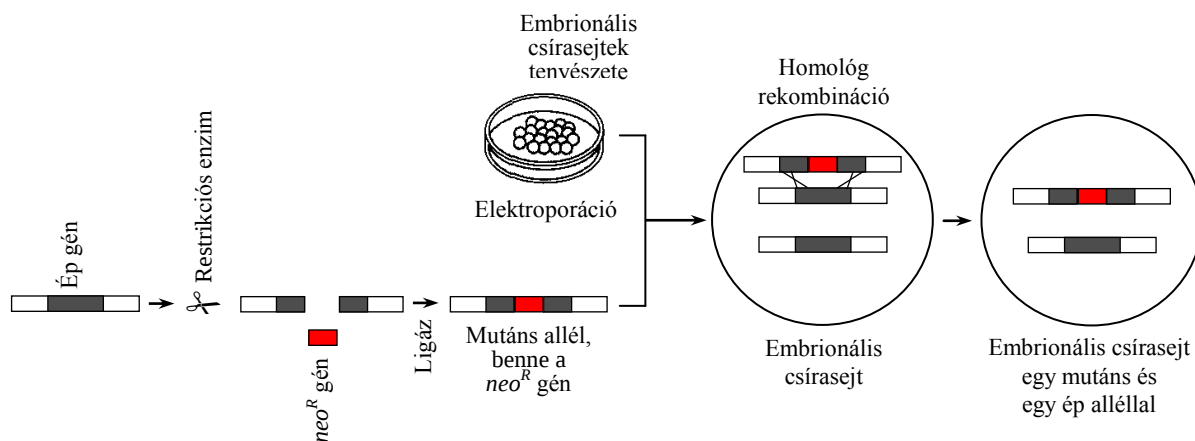


13.12. ábra. A *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) Importin- β képződését kódoló *Ketel* génje promóterének itt kivastagított szakaszait az *E. coli LacZ* (riporter)génjével kombinálva lehetett megállapítani, hogy a promóter mely része biztosítja a *Ketel* gén szövetspecifikus expresszióját. A * jel egy olyan *in vitro* indukált mutáció helyét mutatja, amely megszüntette egy transzkripció faktor kötőhelyét. G: gonád (ivarszervkezdemény a lárvában); CNS: központi idegrendszer a lárvában; Sz: szemdiszkusz (a szemet kialakító sejtek csoportja a lárvában) (Lásd: Villányi et al., Mechanisms of Development 125, 822, 2008.)



13.13. ábra. Az ábrán a mikrotubulusok zöldek, az aktin mikrofilamentumok vörösek, mert a mikrotubulusokat alkotó tubulint zölden, a mikrofilamentumokat alkotó aktint vörösen fluoreszkáló riporterfehérjéhez fuzionálták. A sejtmagok DNS-festékkel kéken vannak „kivilágítva”.

például kártékony rovarokat távoltartó fehérjéket szintetizálnak és tartalmaznak. Léteznek olyan transzgénikus növények, amelyek valamilyen gyomirtószerre rezisztensek, ezért környezetükből a gyomokat ezzel a gyomirtószerrel ki lehet irtani, anélkül, hogy magát a haszonnövényt károsítaná. Vannak olyan transzgénikus birkák, amelyek teje az ember egyik véralvadási faktort tartalmazza.

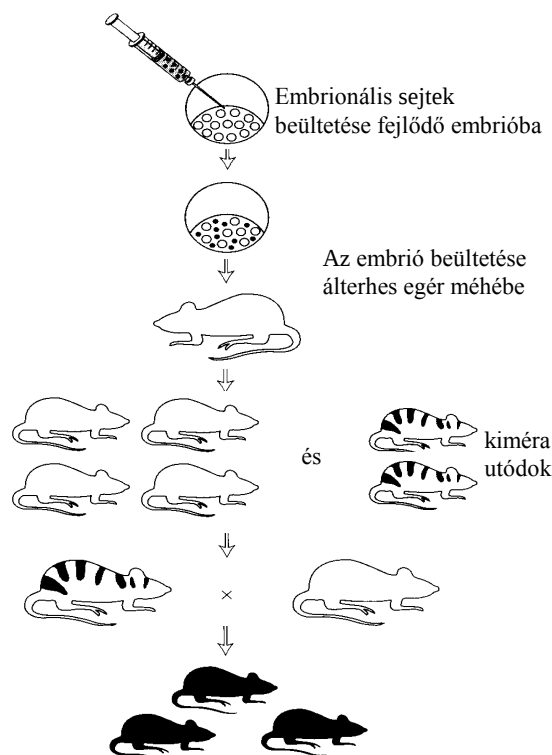


13.14. ábra. Módszer géncserére. Az ép gén klónozott DNS-ét két restrikciós enzimmal „felnyitják”. A génbe idegen eredetű DNS-t ékelnek, ezért a gén elveszti funkcióját. A génbe illesztett DNS valamilyen (pl. neomicin) rezisztenciát kódol (*neo^R*), valamint tartalmaz olyan markert is, ami a transzgénikus állatot azonosíthatóvá teszi (egerekben ez leggyakrabban szőrszín-marker). Ezt a rekombináns DNS-t megfelelő vektorban embriónális őssejtek tenyészetébe keverik, majd elektroporációval lehetővé teszik, hogy a sejtekbe bejussanak a DNS-molekulák. A sejtek némelyikében ritkán két homológ rekombináció következik be, amelynek hatására az ép allél a mutánsra cserélődik ki. Minthogy a mutáns allélt hordozó (arra heterozigóta) sejtek neomicinre rezisztensek, neomicin kezeléssel kiszekelthetők, szaporíthatók.

Elvben az öröklődő betegségek is gyógyíthatók lehetnek génszabályozási módszerekkel egy olyan folyamatban, amit *génterápiának* neveznek. DNS-el ugyanis elvileg bármelyik génfunkció hiányát pótolni lehet, úgy, hogy a sejtekbe/élőlényekbe transzformálják az ép fehérjét kódoló gént. Ez rutinszerű eljárás prokariótákban, élesztőkben és *Drosophilában* (azzal a különbséggel, hogy ott nem nevezik génterápiának). A gerincesek legtöbb génje sokkal nagyobb, semhogy egyetlen vektorba beférne: túlságosan hosszú az a DNS szakasz, amely mind a strukturális, mind pedig a génexpressziót szabályozó szekvenciákat magába foglalja. Ilyenkor a cDNS egy alkalmasan megválasztott promotórral megoldhatja a problémát, más kísérletekben mesterséges kromoszómákba építenek be nagy DNS-blokkokat, és ezek a kromoszómák vektorként funkcionálhatnak. A nehézségektől függetlenül már emberben is folyamatban vannak az első génterápiás próbálkozások.

A génszabályozási és sejtbioológiai módszerek azt is lehetővé teszik, hogy pl. egerek adott génjének ép alléljait kémcsőben készített, ún. *in vitro* mutagenézissel előállított mutáns allélokkal cseréljék ki (13.14. és 13.15. ábra). Az ilyen „géncserés” egerekben aztán tanulmányozható a mutáció hatása, és következtetni lehet az ép gén szerepére is. Azokat a kísérleti állatokat, amelyekben egy gén ép allélját egy funkcióját veszített allélra cserélték ki, „knock out”-oknak (pl. „knock out” egereknek) nevezik.

A géncserés vagy a „knock-out” egér példa a genetikailag manipulált organizmusok másik típusára: nem idegen eredetű gént hordoz (azaz nem transzgénikus), hanem céltudatos emberi tevékenység nyomán az egyik *saját* génjének változott meg a genetikai tartalma.



Megfelelő keresztezések után olyan egerek születnek, amelyek valamennyi sejtje egy genetikailag módosított, beültetett sejtől származik

13.15. ábra. Módszer olyan egerek „készítésére”, amelyek homozigóták a 13.14. ábrán bemutatott, a „génkiütött” mutációra.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt nagyjából három évtizedben kifejlődött génszabályozás nemcsak a DNS-en alapuló diagnózist tette lehetővé, hanem a génexpresszió szabályozásának molekuláris szintű megértését, származástani kapcsolatok megismerését vagy genetikailag módosított élőlények előállítását is. A molekuláris biológia alapvetően megváltoztatta az életről, az élővilágról alkotott elképzeléseinket.