

7. A FÁGOK ÉS A BAKTÉRIUMOK GENETIKÁJA

A (BAKTÉRIO)FÁGOK GENETIKÁJA.

Markerek. Rekombináció, gének térképezése. Térképezés génen belül: intragénikus rekombináció.

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

BEVEZETÉS

A gének funkciójának, szerkezetének részletesebb vizsgálatát – talán meglepő módon – baktériumok vírusaival, azaz bakteriofágokkal (= „baktériumokat evő” vírusok) kapcsolatos vizsgálatok tették lehetővé kezdetben. A fágoknak vannak olyan jellegzetességei, amelyek alapján térképezni lehetett génjeiket, rekombinációjuk alapján. Bár a genetikai keresztezések során képződő rekombináns fágok ritkák lehetnek, az utód fágok nagy száma, valamint a kiváló szelekciós rendszerek lehetővé tették a ritka rekombinánsok azonosítását - akár az olyanokét is, amelyek *génen belül* bekövetkező (ún. intragénikus) rekombináció során képződnek.

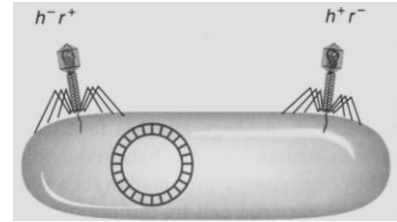
Markerek a bakteriofágok genetikájában

A bakteriofágok, miközben baktériumpázsiton egymás után „falják fel” a baktériumokat, tarfoltokat, plakkokat képeznek. Egy tarfolt egyetlen fág utódainak tevékenysége nyomán képződik. A tarfoltok mérete, alakja a fágok valamely génje által meghatározott tulajdonság. Például az *E. coli* T2 fágja, amely az r^+ ép gént hordozza, a baktérium-pázsiton kis foltokat képez. Az r^- (rapid lysis) mutáns allélt hordozó fágok viszont nagy plakkokat képeznek. Egy további genetikailag meghatározott tulajdonság az ún. gazdaszpecifitás (host range), ami azt mutatja, hogy valamely fág mely baktériumtörzset, törzseket képes fertőzni, és melyeket nem (egy törzset valamilyen szempontból azonos genotípusú élőlények - ebben az esetben baktériumok - alkotnak). Például az *E. coli* T2 fágja, amely a h^+ ép gént hordozza, azokat a baktériumokat fertőzi és „falja fel”, amelyek az *E. coli* #1-es törzséből származnak, a #2-es baktériumtörzs sejtjeit viszont nem képes megfertőzni. A h^- mutáns allélt hordozó T2 fágok viszont mind a #1-es, mind a #2-es baktériumtörzs sejtjeit meg tudják fertőzni, pázsitjaikon plakkokat képezni. A plakkok mérete és a fág fertőzőképessége alapján tehát különbséget lehet tenni az r^+ és az r^- , valamint a h^+ és a h^- allélokat hordozó fágok között.

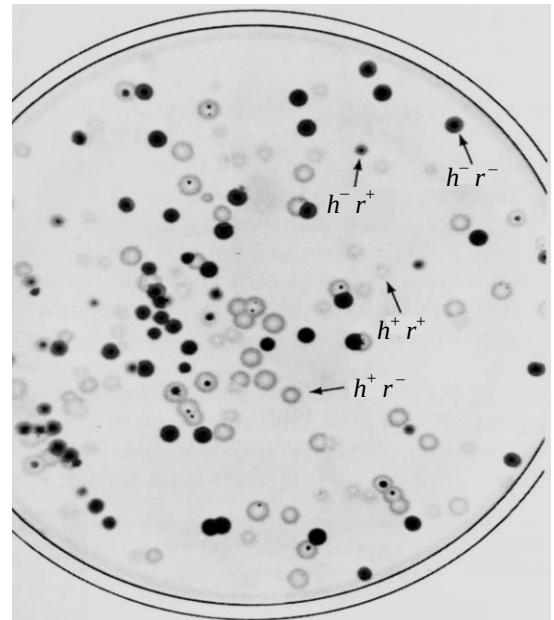
Fágkereszteszt két gén két alléljával

Az előzőekben bemutatott két gén két-két alléljával végezte el munkatársaival Alfred D. Hershey (1949) a következő kísérletet: a #1-es törzs baktériumainak szuszpenziójához egy kémcsőben egyszerre adott $h^- r^+$ és $h^+ r^-$ fágokat, azaz $h^- r^+ \times h^+ r^-$ keresztezést hajtott végre (7.1. ábra). A #1 törzs baktériumain a h^+ és a h^- fágok is szaporodnak. Néhány óra inkubáció után a kémcső tartalma kitisztult, mert a baktériumok szétestek (A baktériumok szuszpenziója tejszerű, mert a látható

fény hullámhosszánál nagyobb baktériumokon szóródik a fény. A fény hullámhosszánál kisebb fágok nem szórják a fényt, a fágok szuszpenziója átlátszó). Hershey a fágok szuszpenziójának kis mintáját olyan baktériumpázsitra tette, amelyet #1-es és #2-es baktériumok keverékéből növesztett, majd néhány órá inkubáció után meghatározta, hogy milyen fágok és milyen gyakorisággal növekedtek a pázsiton (7.2. ábra és 1. táblázat).



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



7.2. ábra. A $h^- r^+ \times h^+ r^-$ fágkereszteszt hatására a #1 és a #2 baktériumok keverékéből álló pázsiton képződő plakks típusai.

7.1. táblázat. A $h^- r^+ \times h^+ r^-$ fágkereszteszt nyomán képződő fágok típusai és gyakoriságai.

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

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

Hershey kísérletei megmutatták, hogy miközben a kétféle genotípusú fág egyszerre van jelen a baktérium-sejtben, kromoszómáik között rekombináció játszódhat le, rekombináns fágok képződhetnek. A rekombináns fágokat fel lehet ismerni, gyakoriságuk meghatározható.

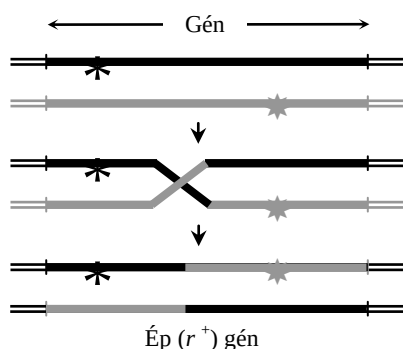
Fágkeresztelés egy gén két alléljával; intragénikus rekombináció

A fenti kísérleti rendszer a fágutódok rendkívül nagy száma és a szelekciós rendszer megbízhatósága miatt lehetővé teszi az igen ritka rekombinációs események detektálását is. Az 1950-es években Seymour Benzer laboratóriuma az *E. coli* baktériumsejteket gyorsan elpusztító T4 fág mutánsaival végzett keresztezéseket, és az általa kidolgozott rendszer alkalmas volt az egymáshoz igen közel lévő, egy génen belüli (ezért nagyon ritka) mutációk kimutatására és vizsgálatára is.

A fentebb ismertetett ép r^+ allélt szintén hordozó T4 fágok az *E. coli* B és K törzsének pázsitján kis plakkokat képeznek. Az r^1 és r^2 mutánsok nagy plakkot képeznek, viszont csak a B törzs sejtjein képesek szaporodni, a K törzsből növesztett pázsiton nem képeznek plakkokat (az r^1 és r^2 mutációk egymástól függetlenül következtek be az r^+ génben).

Benzer egyidejűleg fertőzte meg az r^1 és r^2 mutáns fágokkal a B törzsből származó baktériumok szuszpenzióját. Feltételezte, hogy ha az r^1 és r^2 mutációk a gén különböző helyein vannak, közöttük kis eséllyel, de rekombináció játszódhat le (7.3. ábra). A rekombináció eredményeként olyan fágkromoszóma képződhet, amely nem hordozza sem az r^1 , sem az r^2 mutációt, vagyis lényegében egy r^+ gént hordozó fág jöhet létre, amely a K törzsből készített baktériumpázsiton is plakkot képez.

Ezért a B baktériumok szétválasztása során képződő fáguszuszpenziót (amelynek 1 ml-e akár 10^9 fagot is tartalmazhat!) a K törzsből készített baktériumok pázsitjára tette, ahol bár csak kevés, de a vad típusú fagra jellemző plakk képződött. A plakkok olyan fágok létezését jelezték, amelyek a génen belül bekövetkezett úgynevezett *intragénikus rekombináció* miatt képződtek. A Benzer által kifejlesztett technika olyan érzékeny, hogy akár 10^{-8} - 10^{-9} gyakorisággal, még két egymás melletti bázispár között bekövetkező rekombináció detektálására is alkalmas.



7.3. ábra. A két r mutáns allél (* és *) között a génen belül bekövetkező rekombináció után az ép r^+ gént hordozó fágkromoszóma is képződik.

A fágok genetikája valaha néhány kutató hobbijának tűnhetett. Kiderült azonban, hogy a fágok tanulmányozásával megismerhető a gén szerkezete, a génműködés funkcionális egységei. A különböző mutációkat hordozó fágokkal végzett keresztezések furcsaságainak rejtélyeit kutatva egy új tudományág: a molekuláris biológia bontakozott ki.

A BAKTÉRIUMOK GENETIKÁJA.

Transzformáció, transzdukció, konjugáció. A baktériumok géntérképei.

BEVEZETÉS

Joshua Lederberg és Edward L. Tatum írta le először (1946-ban) az örökítő anyag és a tulajdonságok kombinálódását baktériumokban. Az *E. coli* két törzséből származó sejteket vegyítettek egymással (pl. $a^- b^-$ mutánsokat $c^- d^- e^-$ mutánsokkal), majd - nagy meglepetésükre - az utódok között rekombinációkra, vad típusú baktériumokra lettek figyelmesek.

Hogyan cserélik ki a baktériumok genetikai anyagukat? Ma már tudjuk, hogy a baktériumokban három módja van a genetikai anyag átadásának és kombinálódásának: transzformáció, transzdukció, és a Lederberg és Tatum által felfedezett konjugáció. A baktériumok genetikájának megismerése a molekuláris biológia egyik pillére lett.

Mutáns fenotípusok baktériumokban

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

1. Rezisztens ↔ érzékeny

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

2. Auxotrófok ↔ prototrófok

Amíg a prototróf baktériumoknak minimális a tápanyag-igénye, az auxotrófok létrehozásához szükség van valamilyen segítségre, tápanyagra. Pl. amíg a leu^+ vad típusú baktériumok elő tudják állítani az életükhöz szükséges leucint, addig a leu^- auxotróf mutáns baktériumok növekedésükhöz a környezetből leucint igényelnek.

3. Szénforrás-hasznosítás képessége

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

4. Kondicionális mutánsok

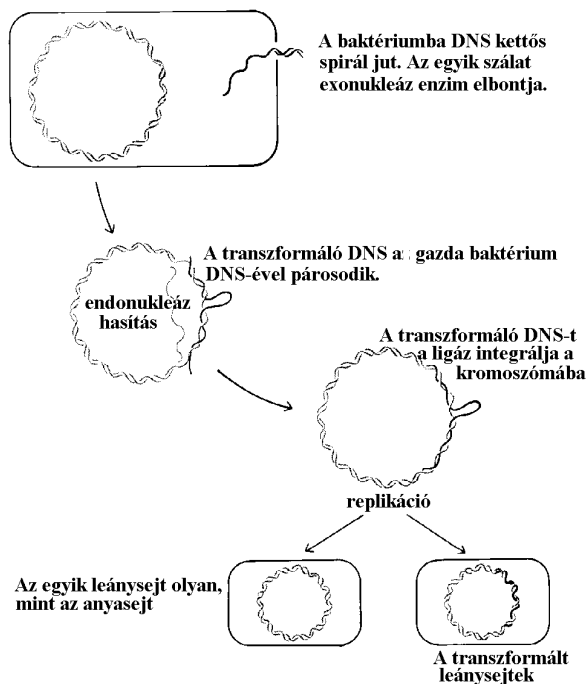
Az ún. kondicionális mutánsok *restriktív* körülmények között (pl. a szokásosnál kissé magasabb hőmérsékleten) nem, de *permisszív* körülmények között szaporodnak. A vad típusú sejtek restriktív körülmények között is osztódnak, szaporodnak.

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

TRANSZFORMÁCIÓ

A transzformáció alapja DNS-darabok felvétele a környezetből, és beépülése a baktérium genomjába. Tudott, hogy a transzformáció sok baktériumfajban megtörténik, mint pl. *Hemophilus influenzae*-ben, *Bacillus subtilis*-ban, *Pseudomonas aeruginosa*-ban, *E. coli*-ban és természetesen *Streptococcus pneumoniae*-ben (lásd Griffith, majd Avery és munkatársai kísérleteit a 3. fejezetben). A transzformáció lépései a következők.

1. A kompetens sejtek felveszik a DNS-t. (Azokat a sejteket nevezzük kompetensnek, amelyek képesek a DNS felvételére. Általában a sejteknek csak kis hányada kompetens. Különböző eljárásokkal, pl. CaCl_2 kezeléssel növelni lehet a kompetens sejtek számát, így a transzformáció gyakoriságát.)
2. A DNS felvétele során a DNS egyik szála megsemmisül, a másik bejut a sejtbe.
3. A bejutott DNS-szál „agresszív”: a baktérium kromoszómájában ún. heteroduplexet képezhet a számára komplementer szakasszal, úgy, hogy szétválasztja az eredeti kettős szálát. A heteroduplexben az idegen és a saját DNS-szál sokszor nem tökéletesen komplementer (7.4. ábra).
4. A „kitúrt” egyszálú DNS-szakasz kitüremkedik, amit aztán enzimek kivágnak és elemésztenek.
5. A ligáz enzim összeköti a szabad végeket, és a transzformáció során a sejtbe jutott DNS a baktérium-kromoszóma részévé válik. Az integrálódás gyakorisága kb. 50%. A replikációt követően csak az egyik sejt lesz transzformáns (7.4. ábra).

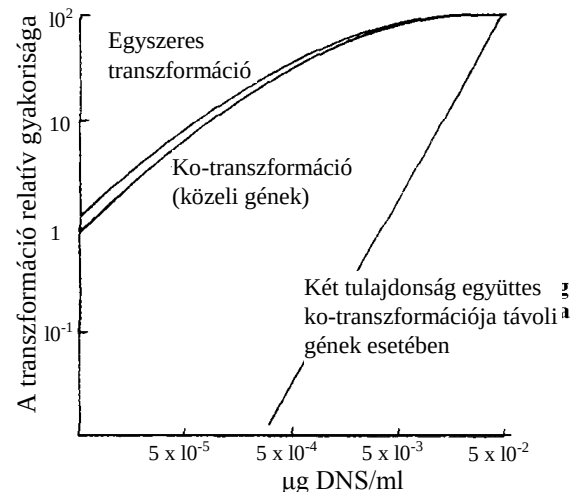


7.4. ábra. A transzformáció mechanizmusa.

A ko-transzformáció (transzformáció egyszerre több génnel) használható baktériumgének térképezésére (7.5. ábra). Ekkor egy adott baktérium darabokra aprított DNS-ét használják transzformálásra. Nyilvánvaló, hogy

amennyiben közel van két gén egymáshoz a donor baktérium kromoszómáján (azaz aprítás után lehetnek egyazon transzformáló DNS szakasz részei), akkor gyakrabban kerülnek át együtt a DNS-t felvevő baktériumba. Fordítva pedig: ha távol vannak, ez csak igen ritkán következhet be: csak ha ugyanazon baktérium egyszerre, két független transzformációs esemény során veszi fel őket. A ko-transzformációt úgy mérik, hogy meghatározzák a transzformáció gyakoriságát a DNS-koncentráció függvényében.

Amint azt a 7.5. ábra mutatja, a transzformáció gyakorisága más összefüggés szerint alakul az egymás közelében levő, illetve a távoli gének esetében. A távoli gének esetében az egyidejűleg bekövetkező transzformáció gyakorisága annyi, mint a két génnel külön-külön számított transzformációs gyakoriságok szorzata. Az egymás közelében levő gének esetében a ko-transzformáció sokkal gyakoribb, mint a külön-külön gyakoriságok alapján várható volna. Ilyen vizsgálatok alapján meg lehetett határozni a baktérium egyes génjeinek helyzetét egymáshoz képest a kromoszómán.



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

TRANSZDUKCIÓ

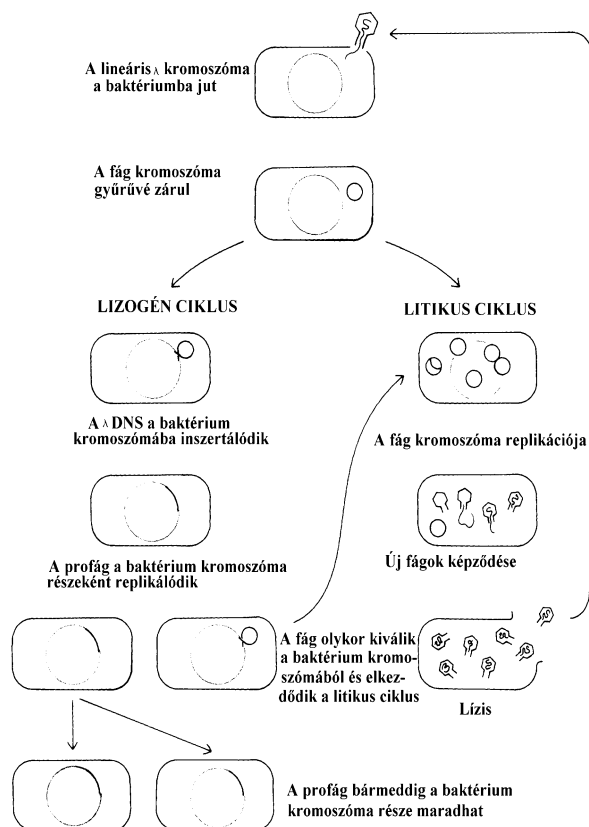
A transzdukció baktérium-DNS átvitele egyik baktérium-sejtből egy másikba bakteriofágok közvetítésével. A transzdukciónak két típusa van: *általános*, ha a donor baktérium kromoszómájának bármely szakasza, és *specializált*, ha csak egy adott része juthat át a transzdukció során a recipiensbe. Specializált transzdukcióra csak az úgynevezett *mérsékelt fágok* képesek, a baktériumot rögtön elpusztító *virulens fágok* nem. Először a mérsékelt fágokkal ismerkedjünk meg, a specializált transzdukció közvetítőivel.

Mérsékelt (temperált) fágok

A λ fág a legismertebb mérsékelt fág. Genomját egyetlen, kb. 48.500 bázispárból álló DNS alkotja. A mérsékelt fágoknak *lizogén* és *litikus* ciklusa is van (7.6. ábra). A lizogén ciklus során a fág kromoszómája saját enzimek segítségével a baktérium kromoszómájába

inszertálódik. Az inszerció speciális, a fág-DNS egy rövid szakaszával azonos szekvenciájú helyen történhet, ún. *helyspecifikus rekombinációval* (lásd később, 8.9 ábra). Ez a λ fág esetében az *E. coli* baktérium galaktóz- illetve biotinsintézisért felelős szekvenciái (*gal*, illetve *bio*) között található. A baktérium-kromoszómába inszertálódott fágot *profágnak* nevezik. A kromoszómájukban profágot hordozó baktériumok a *lizogén baktériumok*. A profág a baktérium kromoszómájával együtt elvileg korlátlan ideig replikálódhat és fennmaradhat, nem fejeződik ki, nem pusztítja el a gazdasejtet. A profág jelenlétének egyetlen jele az, hogy a lizogén baktériumok ellenállóak egy, a profággal azonos típusú fág fertőzésével szemben.

A mérsékelt fágok lítikus ciklusa valamilyen drasztikus hatás, pl. UV besugárzás hatására kezdődhet el. A lítikus ciklus kezdetén a fágkromoszóma kirekombinálódik a baktérium kromoszómájából, replikálódik, átíródik és fágfehérje termelődik róla. Miután kész fágok képződtek, a baktériumsejtet elpusztítják, kiszabadulnak az utód-fágok, hogy újabb sejteket fertőzzenek meg. A fágok ekkor tehát lizálják a gazdabaktériumokat, és plakkot képeznek a baktériumpázsiton. Amíg a mérsékelt fágoknak lizogén és lítikus ciklusa is van, a *virulens* fágoknak csak lítikus ciklusuk van: nem képesek a gazda kromoszómájába beépülni, azonnal szaporodnak és elpusztítják azt.



7.6. ábra. A λ mérsékelt fág lizogén és lítikus ciklusai.

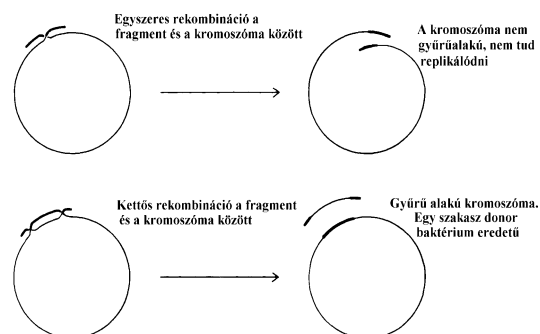
1. Általános transzdukció

Norton Zinder és Joshua Lederberg írta le először (1951-ben), hogy *általános transzdukció* során egy baktériumsejt genetikailag átalakítható egy donor

baktérium kromoszómájának *bármely* szakaszával. Az általános transzdukció úgy következik be, hogy a donor baktérium genomja a sejt pusztulása, a lízis folyamán fragmentálódik, így bármely szakasza kis valószínűséggel, de becsomagolódhat egy fágfejbe és a következő fertőzéskor bejuthat egy másik, recipiens baktériumsejtbe. Átlagosan kb. 10^{-4} azon fágok gyakorisága, amelyek fejében nem fág-, hanem baktérium-DNS van. Ha egyetlen ilyen virulens fág fertőz meg egy baktériumot, nem tudja elpusztítani (nem tartalmazza az ehhez szükséges saját genetikai anyagot), de be tudja juttatni a donor baktériumból származó DNS-darabot, amely kis valószínűséggel, de be is épülhet a recipiens genomjába.

Ez csak akkor történhet meg, ha a donor baktérium kettős szálú DNS-e rekombinációval a recipiens baktérium kromoszómájának részévé válik. De csak a kettős rekombináció vezet ilyen teljes, *komplett* transzdukcióhoz. Ugyanis az egyszeres rekombináció eredményeként keletkező kromoszómának két szabad vége van (7.7. ábra), ami nem teszi lehetővé a tökéletes replikálódást és szétválást a baktérium osztódása során.

A sikeres transzdukció után mindkét utódsejt, és az ő utódai is tartalmazzák a donor baktériumból származó géneket. A transzdukció gyakorisága 10^{-5} - 10^{-7} . Egy alkalommal a baktériumgenom maximum kb. 1%-a (néhány tízezer bázispár, kb. a vírusgenom mérete) integrálódhat.

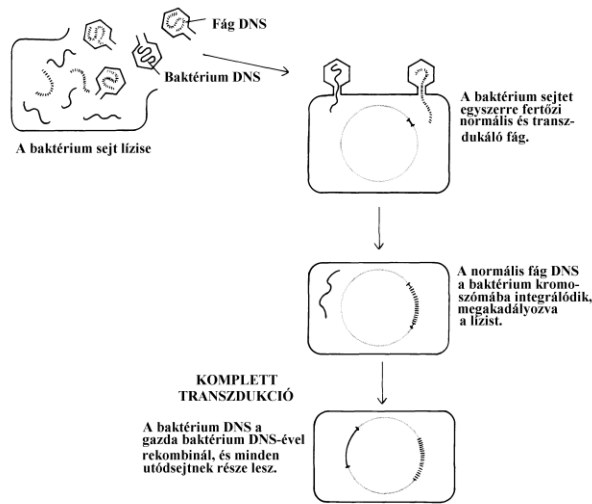


7.7. ábra. Csak a kettős rekombináció vezet komplett transzdukcióhoz, amikor az átjuttatott örökítő anyag stabilan fennmarad, mert a genom része lesz.

Az általános transzdukció lizogén típusú fágok fertőzése során is bekövetkezhet, hiszen ha lítikus ciklusba lépnek, kiváltják a baktérium pusztulását, és vihetnek magukkal bármilyen bakteriális genetikai anyagot. Ha baktérium-DNS-t tartalmazó fágburok és egy ép lizogén fág *egyszerre* jut be a recipiens baktériumsejtbe (7.8. ábra), az ép fág beépülhet a kromoszómába, azaz lizogén ciklusba léphet, éppen hagyva a gazdasejtet és megakadályozva a további fágfertőzést. Ha a donor baktériumból származó DNS is sikeresen beépül, további fennmaradása a kromoszómában jobban garantált a profág „védelmező” hatása miatt (7.8. ábra).

2. Specializált transzdukció

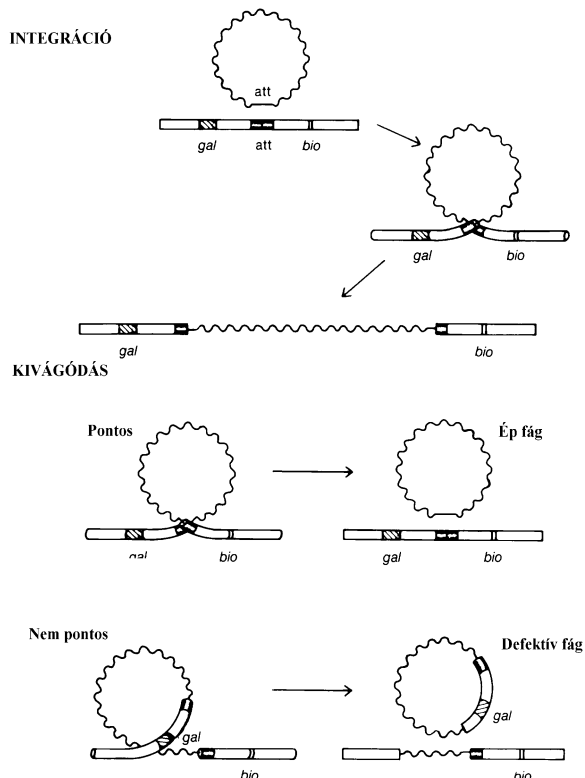
A lizogén fágok lítikus ciklusának kezdetén a fág-kromoszóma kivágódása az esetek nagy többségében tökéletes (ún. precíz excízió). Azonban az esetek kb.



7.8. ábra. A komplett transzdukció mechanizmusa lizogén fágok jelenlétében.

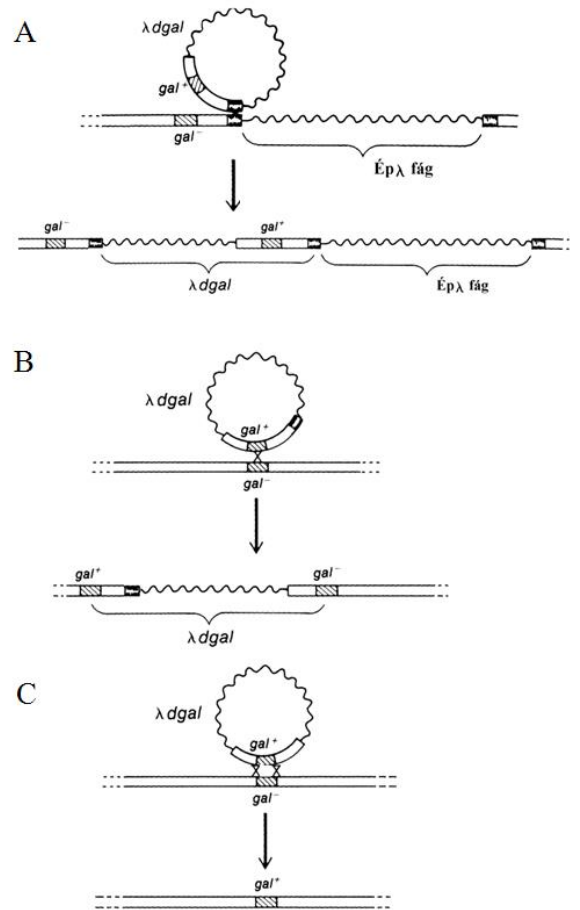
milliomod részében a fág kromoszóma kivágódása tökéletlen (nem precíz excízió; 7.9. ábra). A tökéletlen kivágódás miatt olyan, ún. *defektív fágok* képződnek, amelyek DNS-ét fág- és baktérium-DNS is alkotja.

Nyilvánvaló, hogy a defektív fágok DNS-e csak olyan baktérium-DNS szakaszokat tartalmazhat, amelyek a profág beépülési helyével szomszédosak (7.9. ábra), tehát nem a baktérium-kromoszóma bármely részét – innen a specializált transzdukció kifejezés.



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

A defektív fág, miután saját inszerciók szekvenciája (att, „attachment site” a 7.9. ábrán) elromlott, többé



7.10. ábra. A defektív fág által közvetített génátadás módjai.

nem tud önállóan integrálódni az új gazdasejt genomjába. Ha azonban egyszerre fertőz egy ép fággal, annak beépülése után, a kialakult rekombináns kapcsolódási helyre beintegrálódhat (7.10. A ábra). A beépülés eredményeként olyan rekombináns baktérium-kromoszóma jön létre, amely ugyanannak a génnek két (akár különböző) allélját hordozza. Az ilyen baktériumokat *parciális diploidoknak* nevezik, hiszen csak részben, az adott genomterület tekintetében diploidok.

Parciális diploidok akkor is létrejöhetnek, ha a rekombináció a donor baktériumból származó és a recipiens baktériumban is megtalálható homológ szekvenciák között zajlik (7.10. B ábra). Ez jóval ritkábban esik meg, nem segítik a vírus saját enzimeit, hiszen nem az általuk felismert kapcsolódási helyen történik a beépülés. Ugyanakkor stabil utódok jönnek létre a transzdukción átesett baktérium osztódása után, mert nincs a genomban ép lizogén fág.

Még ritkább esemény, ha kettős rekombináció eredményeként a homológ szakaszok kicserélődnek. Ekkor a baktérium nem lesz parciális diploid, és fággenom sem épül be (7.10. C ábra).

A transzdukciót először géntérképezésre használták. Ekkor a recipiens baktériumtörzsek mutációt hordoztak valamilyen jól detektálható tulajdonságra (pl. a λ fág esetében lehetnek gal^- -ok vagy bio^- auxotrófok), a donor baktériumok pedig az ép gént hordozták. A transzdukció sikerét mutatta, ha létrejöttek olyan utódsejtek, amelyek

már nem mutatták a mutáns fenotípust (pl. prototrófok lettek). Együttes transzdukcióból a rekombinációs gyakoriságra, azaz gének egymástól való távolságára lehetett következtetni, hasonlóan a ko-transzformációhoz.

Fágok a molekuláris biológiában

A transzdukció mechanizmusát a molekuláris biológia ma is alkalmazza genomkönyvtárak létrehozásához és fenntartásához (lásd majd a 12. fejezet anyagát). A defektív fágok DNS-e *rekombináns*: egyaránt alkotja fág, valamint *idegen* DNS. Egyetlen defektív fágból kiindulva sok-sok ciklus után az idegen DNS-nek lényegében korlátlan számú kópiája állítható elő. A fág tehát egyfajta hordozó, *vektor*, amellyel idegen eredetű DNS-szakaszok klónozzhatóak, azaz korlátlan méretben szaporíthatóak.

A lizogén fágok által használt homológ rekombinációban résztvevő enzimeket és szekvenciákat pedig arra aknázzák ki, hogy magasabbrendűekben (akár emlősökben is) hatékonyan juttassanak idegen géneket a genomba.

KONJUGÁCIÓ

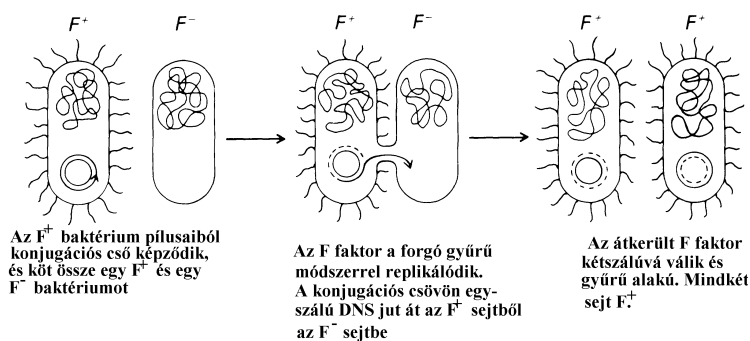
Konjugáció: a baktérium-kromoszóma átadása egyik baktériumsejtből egy másikba konjugációs cső (pílus) segítségével. A bevezetőben említett 1946-os Lederberg-Tatum kísérlet során derült fény erre a folyamatra. A DNS átviteléről az úgynevezett F (fertilitás) faktor, egy speciális plazmid "gondoskodik". A konjugáció nem történik meg minden baktériumfajban, de sok faj (pl. az *E. coli*, a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Vibrio comma*) képes rá.

Az F faktor

Az F faktor egy kb. 10^5 bázispárból álló plazmid, egy kör alakú DNS-molekula, és mint minden plazmid, önállóan képes replikálódni. Hordozza azokat a géneket, amelyek a pílus növesztéséhez szükségesek: a pílusokból képződik az a konjugációs cső, amelyek segítségével megtörténhet a DNS átadása az F^+ sejtből az F^- sejtbe. (Maga a DNS átadása nem a píluson keresztül történik, az csak lehetővé teszi két baktérium kontaktusát). Az F faktort tartalmazó, illetve nem tartalmazó baktériumokat F^+ -nak illetve F^- -nak nevezik. Az F^- sejteknek természetesen nincsenek pílusaik.

A konjugáció lépései a következők (7.11. ábra). 1. Konjugációs cső képződik egy F^+ és egy F^- sejt között. 2. Az F faktorban forgó gyűrű-replikáció kezdődik. Az F^+ sejtből a képződött (egyszálú) DNS-fonal a két baktérium között létesült póruson keresztül átjut az F^- sejtbe. 3. Befejeződik az F faktor replikációja az F^+ és az F^- sejtekben, miközben az F^- sejt F^+ -á alakul. Az F faktor tehát fertőző: egy baktériumtenyészetben egyetlen F^+ sejt jelenlétében minden F^- sejt rövid idő alatt F^+ -á alakul.

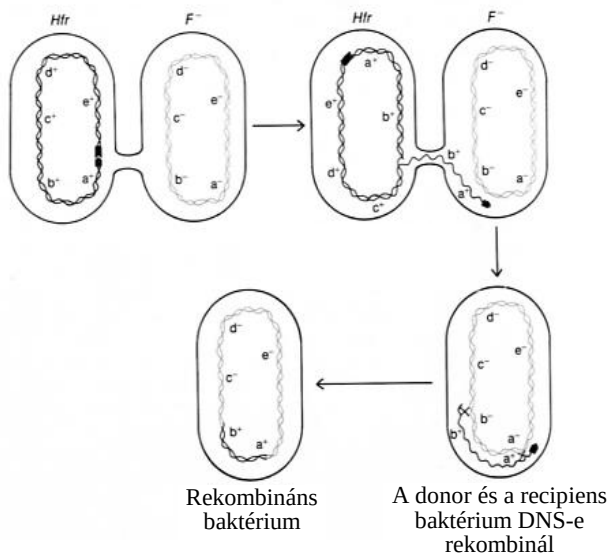
Emellett az F faktor az ún. *episzómák* jellegzetes képviselője: mint autonóm módon replikálódó plazmid,



7.11. ábra. Az F faktor átadása F^+ és F^- sejtek között a konjugáció során.

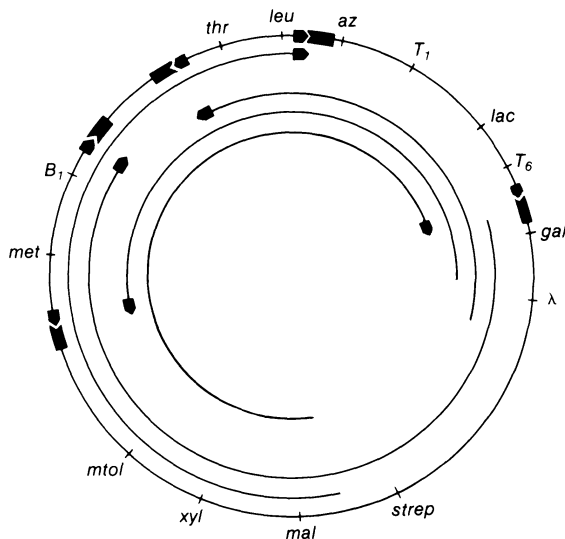
és ritkán, mint a kromoszóma inszertálódott DNS is létezhet (hasonlóan a profágokhoz). Az úgynevezett Hfr (*high frequency recombination*) törzsekben az F faktor a baktérium kromoszóma inszertálódott, ahol továbbra is jellegzetes F faktorként viselkedik: konjugációt képes indukálni és DNS-t is átjuttathat a recipiens F^- baktériumokba (7.12. ábra). A konjugáció ugyanúgy kezdődik, mint a nem inszertálódott F faktor esetében: egy egyszálú DNS jut át a recipiens sejtbe. A DNS eleje (5' vége) az F faktor eleje, a további része azonban már a kromoszómából származik (7.12. ábra)!

Az átjutott egyszálú DNS -ugyanúgy, mint a transzformáció esetében - párosodhat a fogadó sejt saját kromoszómájának komplementer szálával, lehetőséget teremtve új genetikai kombinációk kialakítására (7.12. ábra). Ugyanakkor a recipiens baktérium legtöbbször továbbra is F^- marad, mert az F faktor másik fele csak a teljes kromoszóma átjutása után kerülhet át, ami igen ritkán történik meg.



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

Mivel az F faktor a baktérium kromoszómájába több helyen és mindkét orientációban inszertálódhat, nem meglepő, hogy a DNS átvitele a különböző Hfr törzsekben különböző helyről kezdődhet és az óramutató járásával egyező, vagy ellenkező irányban is haladhat (7.13. ábra).



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

Gének térképezése konjugációval

Konjugáció során *E. coli*-ban a teljes genom átjuttatása bármely Hfr törzsből egy F^- sejtbe 37°C -on 100 percet vesz igénybe. A konjugáció azonban erős keveréssel megszakítható, ekkor a genomnak csak bizonyos része juthat át az F^- sejtbe. Ha a konjugációt meghatározott idő elteltével mesterségesen félbeszakítják, megfelelő szelekciós módszerekkel megállapítható, hogy (i) milyen gének (ii) milyen sorrendben, és (iii) mennyi idő elteltével jutnak át a recipiens sejtekbe. A gének sorrendjének és egymáshoz viszonyított távolságának meghatározásával géntérkép készíthető, a térkép egysége pedig a perc lett (7.14. ábra). Az *E. coli* genetikai térképén ma is percekben mérik az egyes gének közötti távolságot!

Az F-dukció (szex-dukció)

Az F faktor - hasonlóan a λ profághoz - kiválhat a baktérium kromoszómából és ismét önállóan replikálódó plazmidként létezhet a baktériumsejtekben. Az F faktor excíziója többnyire pontos, precíz. Néha azonban a kivágódás pontatlan, ekkor az F faktor magával viszi a baktérium-kromoszóma egy részét is. Az ilyen módosult faktort F' -vel jelölik. Az F' faktor a következő konjugációk során a baktérium-DNS egy darabkáját is viszi magával, a fogadó baktériumban plazmidként is hordozza a kivágódott kromoszóma-darabot -lehetőséget teremtve új genetikai kombinációk kialakulására. Ezért ezt a folyamatot *F-dukciónak* vagy *szex-dukciónak* is

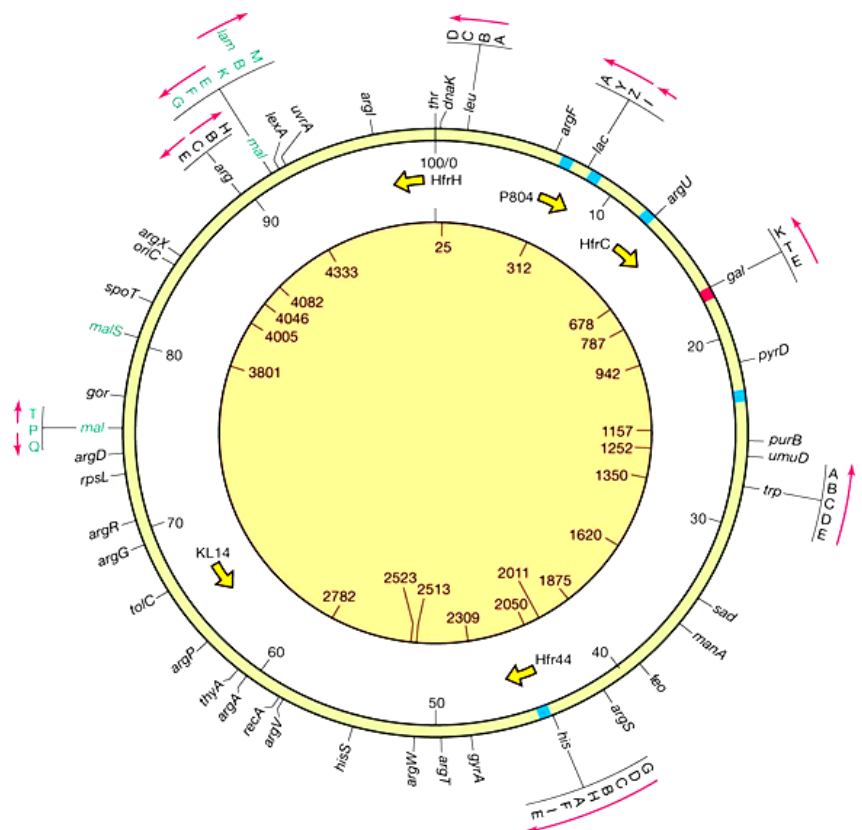
nevezik. Ha egy F' faktor egyszer létrejött, az általa indukált konjugáció után minden recipiens baktérium parciális diploidként fog viselkedni, hiszen minden, az F' faktor által átvitt gén a saját kromoszómáján is megtalálható.

Az F' faktor tulajdonképpen egy olyan rekombináns DNS-molekula, amelyet egyszerre alkot plazmid és más eredetű (itt a donor baktérium kromoszómából származó) DNS. Beléjük azonban más idegen DNS-szakasz is illeszthető, és baktériumtörzsbe juttatva az F' faktorral együtt az idegen DNS is tetszőleges mértékben szaporítható, azaz molekulárisan klónozható, és baktériumban szaporítva tetszőleges mennyiségben izolálható. Az F-faktor (és más plazmidok is) a vektorok egy másik típusát reprezentálják, és a fágokkal egyetemben a molekuláris biológia fontos eszközei.

ÖSSZEFOGLALÁS

A transzformáció, a transzdukció és a konjugáció biztosítja az örökítő anyag változatosságát baktériumokban. Bár a három mechanizmus különböző, a végeredmény hasonló: a genetikai változatosság. A baktériumok közismert alkalmazkodóképességét a változó környezeti feltételekhez a változatok csillagászati sokfélesége biztosítja.

A baktérium-genetika ismerete alapján nyílt lehetőség a fágok és a plazmidok vektorként történő felhasználására, DNS-szakaszok klónozására. A klónozás teremtette meg a lehetőséget az úgynevezett *rekombináns DNS technika* megalapítására, a biológiai jelenségek molekuláris szintű megismerésére, és azok gyakorlati felhasználására.



7.14. ábra. Az *E. coli* géntérképe (csak néhány gén feltüntetésével). A térkép egysége a perc